

Chemoenzymatische Synthese von Guerbet-Alkoholen

wissenschaftliche Arbeit
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld

von
Marc Biermann, M. Sc.
aus Siegen

Bielefeld, November 2016

Erstgutachter: Prof. Dr. Harald Gröger

Zweitgutachter: Prof. Dr. Norbert Sewald

Tag der Disputation:

9. Dezember 2016

Ort:

Bielefeld

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Organische Chemie I der Universität Bielefeld unter Leitung von Prof. Dr. Harald Gröger in der Zeit vom Februar 2013 bis November 2016 angefertigt. Die Finanzierung erfolgte durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Projektes „Biotechnologie 2020+, Nächste Generation biotechnologischer Verfahren“ (Fördernummer: 031A184A).

Es wurden keine anderen als die in dieser Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Die Dissertation wurde selbstständig verfasst und hat in der gegenwärtigen oder einer anderen Fassung noch nicht einer anderen Fakultät oder Hochschule vorgelegen.

Die Dissertation wurde von der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld auf Basis der Promotionsordnung vom 1. Juli 2011 genehmigt.

Marc Biermann

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht oder wurden im Rahmen von Konferenzen vorgestellt:

Publikationen

M. Biermann, H. Gruß, W. Hummel, H. Gröger,

Guerbet Alcohols: From Processes under Harsh Conditions to Synthesis at Room Temperature under Ambient Pressure, *ChemCatChem* **2016**, 8, 895-899.

M. Biermann, D. Bakonyi, W. Hummel, H. Gröger,

Design of Recombinant Whole-Cell Catalysts for Double Reduction of C=C and C=O Bonds in Enals and Application in the Synthesis of Guerbet Alcohols as Industrial Bulk Chemicals for Lubricants, *Green Chem.* **2016**, DOI: 10.1039/c6gc01668e.

Vortrag

Synthesis of α -branched aldehydes via combination of a chemocatalytic aldol condensation and an enzymatic C=C reduction, 7th Workshop on Fats and Oils as Renewable Feedstock for the Chemical Industry, März 2014, Karlsruhe.

Posterpräsentationen

Chemoenzymatic Multistep Synthesis of Guerbet Alcohols, BIOTRANS 2015, Juli 2015, Wien.

Synthesis of α -branched aldehydes via combination of a chemocatalytic aldol condensation and an enzymatic C=C reduction, 47. Jahrestreffen Deutscher Katalytiker, März 2014, Weimar.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Harald Gröger bedanken, der mich seit Beginn meines Forschungspraktikums im Januar 2012 nicht mehr losgeworden ist und mich trotzdem bei all meinen Vorhaben unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Prof. Dr. Norbert Sewald danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, für seine Hilfe bei der Organisation meines Forschungspraktikums in Schottland und dafür, dass er stets ein offenes Ohr, auch für Studenten hat.

Besonderen Dank möchte ich außerdem an Prof. Dr. Werner Hummel und seinen Arbeitskreis richten, die mich mit Enzymen und molekularbiologischem Fachwissen versorgt haben. Hier seien vor allem Daniel Bakonyi, ohne den, große Teile meines Projekts nicht möglich gewesen wären und Dalia Bulut, ohne die die Biotrans nur halb so lustig gewesen wäre, genannt.

Die Bezeichnung „gute Seele des Labors“ ist in fast jeder Dissertation der vergangenen Jahre aufgetaucht und dennoch kenne ich niemanden auf den diese eher zutreffen würde als Thomas Geisler. Danke für alles.

Unter den (ehemaligen) Doktoranden gilt mein Dank allen voran Tina Reiß, die mich mit Kickern in den Arbeitskreis gelockt hat. Ich hätte mir keine bessere Labornachbarin wünschen können. Komplettiert wird das Büro-Quartett von Anna Reimer und Ramona Bringmann. Danke, dass ihr mich so oft von der Arbeit abgehalten habt. ;-)

Ich danke allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitskreise Gröger und Mattay, insbesondere Wilko Greschner, Richard Metzner, Marcel Heidlindemann und Philipp Böhm, die mir allesamt vor allem zu Beginn meiner Arbeit mit guten Ratschlägen zur Seite gestanden haben. Allen aktuellen Mitgliedern danke ich außerdem dafür, dass sie den Geist der OCI aufrechterhalten.

Ich danke Tina Reiß, Daniel Bakonyi, Nadine Zumbrägel und Tobias Betke für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ohne tatkräftige Unterstützung bei experimentellen Arbeiten wären sicherlich nur halb so viele Ergebnisse möglich gewesen. Hierfür danke ich allen voran meinen Azubis Evelyn Schulde, Alena Schnitker und Inga Wißbrock, die tolle Arbeit geleistet haben. Besonders hervorheben möchte ich außerdem Isabell Kemker und Hendrik Gruß, die mir nicht nur als Hiwis und Praktikanten, sondern auch als Freunde sehr ans Herz gewachsen

sind. Hinzu kommen Franziska Kühn, Timo Glodde und Philipp Schultzeisz, denen ich für ihre Hilfe im Rahmen ihrer Praktika danken möchte.

Ich danke dem Team der Massenspektrometrie um Dr. Jens Sproß, Heinz-Werner Patruck und Sandra Heitkamp, sowie Peter Mester und Gerd Lipinski am NMR für das Messen unzähliger, teils übelriechender Proben.

Den größten Dank schulde ich Jenny, die in den vergangenen 11 Jahren mit mir durch Dick und Dünn gegangen ist und immer für mich da ist. Danke, dass es dich gibt!

Zur guter Letzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinen Schwestern dafür, dass sie mich bei allem was ich tue unterstützen.

Twenty years from now you will be more disappointed by the things you didn't do than by the ones you did do. So throw off the bowlines. Sail away from the safe harbor. Catch the trade winds in your sails. Explore. Dream. Discover.

Mark Twain

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Stand der Wissenschaft	5
2.1	Guerbet-Alkohole und Optionen zur nachhaltigen Alkoholproduktion...	5
2.2	Selektive Oxidation primärer Alkohole zu Aldehyden.....	13
2.3	Enzymatische Reduktion aktivierter Doppelbindungen.....	18
2.4	Enzymatische Reduktion von Aldehyden.....	23
3	Motivation und Zielsetzung	29
4	Ergebnisse und Diskussion	31
4.1	Substratsynthese, einleitende Versuche und Analytik	31
4.1.1	Wahl des Modellsubstrats	31
4.1.2	Synthese von Substraten und Referenzverbindungen	32
4.1.2.1	Homo-Aldolkondensation aliphatischer Aldehyde zu α,β -ungesättigten, verzweigten Aldehyden	32
4.1.2.2	Swern-Oxidation primärer Alkohole zu Aldehyden.....	33
4.1.3	Oxidationsempfindlichkeit von Aldehyden	34
4.1.4	Analytik	36
4.2	Oxidation primärer, aliphatischer Alkohole	38
4.2.1	Alkoholdehydrogenasen	38
4.2.2	TEMPO-vermittelte Oxidation	40
4.2.2.1	Etablierung eines Benchmarks	40
4.2.2.2	Nebenproduktbildung	42
4.2.2.3	Dosierung von Hypochlorit	44
4.2.2.4	Vergleich verschiedener Katalysatoren.....	45
4.2.2.5	Vergleich organischer Lösungsmittel	48
4.2.2.6	Optimierung der Hypochlorit-Menge	49
4.3	Chemokatalytische Aldolkondensation aliphatischer Aldehyde	51
4.3.1	Aldolkondensation in wässrigem Medium	51
4.3.2	Aldolkondensation in organischem Medium	53
4.4	Kombination von Alkohol-Oxidation und Aldolkondensation	58
4.5	Enzymatische C=C-Reduktion α,β-ungesättigter Aldehyde	59
4.5.1	Einsatz von isoliertem Enzym.....	59
4.5.1.1	Einleitendes Screening nach En-Reduktasen.....	59
4.5.1.2	Parameter-Screening isolierter GoxER.....	61
4.5.1.3	Bestimmung kinetischer Parameter der GoxER	66
4.5.2	Enzymimmobilisierung.....	68
4.5.2.1	Auswahl eines geeigneten Trägers.....	69
4.5.2.2	Bestimmung der Restaktivität immobilisierter GoxER.....	71
4.5.2.3	Präparative Versuche mit immobilisierter GoxER	72
4.6	Enzymatische Reduktion von Aldehyden	75
4.7	Kombination der enzymatischen C=C- und C=O-Reduktionen	78
4.7.1	Allgemeine Aspekte der Eintopf-Biotransformation mit ER und ADH.....	78
4.7.1.1	Auswirkung auf Kinetik und Umsatz.....	78
4.7.1.2	Nebenproduktbildung	78
4.7.1.3	Stereoselektivität.....	80
4.7.2	Isolierte Enzyme	82

4.7.2.1	Vergleich der individuellen und kombinierten Reduktionen unter Einfluss von organischem Cosolvens	82
4.7.2.2	Erhöhung der Substratkonzentration	84
4.7.3	Ganzzellkatalyse	85
4.7.3.1	Konstruktion des Ganzzellkatalysators (GZK4)	87
4.7.3.2	Charakterisierung der Ganzzellkatalysatoren	88
4.7.3.3	Mikro-präparatives Screening der Ganzzellkatalysatoren.....	90
4.7.3.4	Erhöhung der Katalysatormenge	92
4.7.3.5	Optimierung des pH-Werts.....	93
4.7.3.6	Substratscreening	95
4.7.3.7	Erhöhung der Substratkonzentration und Verwendung von organischem Cosolvens	98
4.8	Entwicklung und Analyse des Gesamtprozesses zur Synthese von Guerbet-Alkoholen.....	103
4.8.1	Allgemeine Aspekte der Kombination von Reaktionen.....	103
4.8.2	Gesamtprozess mit isolierten Enzymen	104
4.8.3	Optimierung des Prozesses durch Verwendung eines Ganzzellkatalysators	105
4.8.4	Alternativer Prozess ausgehend von Aldehyden.....	107
5	Zusammenfassung	111
6	Abstract	117
7	Experimenteller Teil.....	123
7.1	Allgemeines	123
7.1.1	Chemikalien	123
7.1.2	Enzyme, Plasmide und Gene	123
7.1.3	Geräte und Methoden.....	124
7.1.3.1	Gaschromatographie.....	124
7.1.3.2	Spektrophotometrie.....	124
7.1.3.3	NMR-Spektroskopie	124
7.1.3.4	Massenspektrometrie	124
7.1.3.5	Molekularbiologie und Zellkultur.....	124
7.1.3.6	Arbeiten unter Vakuum/Schutzgas.....	124
7.1.3.7	Reaktionen bei konstantem pH-Wert	125
7.1.4	Allgemeine Methoden.....	125
7.1.4.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV1): Photometrischer Aktivitätstest in reduktiver Richtung	125
7.1.4.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV2): Photometrischer Aktivitätstest in oxidativer Richtung.....	126
7.2	Synthese von Substraten und Referenzverbindungen	127
7.2.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV3): Synthese von α,β -ungesättigten, verzweigten Aldehyden.....	127
7.2.1.1	2-Butyl-2-octenal (51).....	127
7.2.1.2	2-Hexyl-2-decenal (54).....	128
7.2.1.3	2-Octyl-2-dodecenal (55)	128
7.2.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AAV4): Synthese von β -verzweigten Aldehyden.....	129
7.2.2.1	<i>rac</i> -2-Butyloctanal (52).....	130
7.2.2.2	<i>rac</i> -2-Hexyldecanal (56).....	130
7.2.2.3	<i>rac</i> -2-Octyldodecanal (57).....	131
7.2.3	Synthese von <i>E</i> -2-Butyloct-2-en-1-ol (66)	131
7.2.4	Synthese von Hexanaldihexylacetal (58)	132
7.3	Oxidationsempfindlichkeit von Aldehyden	133
7.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift 5A (AAV5A): Oxidationsempfindlichkeit von Aldehyden (Reinsubstanz).....	133

7.3.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift 5B (AAV5B): Oxidationsempfindlichkeit von Aldehyden in wässriger Lösung	133
7.3.3	Allgemeine Arbeitsvorschrift 5C (AAV5C): Oxidationsempfindlichkeit von Aldehyden im wässrig-organischen Zwei-Phasen-System	133
7.4	Alkohol-Oxidation	134
7.4.1	Oxidativer Aktivitätsassay von ADHs gegenüber 1-Hexanol	134
7.4.2	Präparativer Einsatz von Ct- und LkADH für die Oxidation von 1-Hexanol	134
7.4.3	Iodometrische Titration wässriger Natriumhypochlorit-Lösung	135
7.4.4	Iodometrische Titration wässriger Thiosulfat-Lösung	135
7.4.5	TEMPO-katalysierte Oxidation von 1-Hexanol durch Hypochlorit	136
7.4.6	Synthese von Polyamin-immobilisiertem Piperidinyloxyl (PIPO)	137
7.4.7	Bestimmung der Löslichkeit von PIPO in organischen Lösungsmitteln	137
7.4.8	Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 (AAV6): Piperidinyloxyl-katalysierte Oxidation von 1-Hexanol mit dosierter Zugabe von Hypochlorit	138
7.4.8.1	Einfluss des Dosierens von Hypochlorit	138
7.4.8.2	Vergleich verschiedener Piperidinyloxyl-basierter Katalysatoren	139
7.4.8.3	Vergleich verschiedener organischer Lösungsmittel	139
7.4.8.4	Zeitlicher Verlauf der Oxidation und Optimierung der nötigen Menge an Hypochlorit	140
7.4.9	Vergleichsversuch zur Bildung der Nebenprodukte	140
7.5	Chemokatalytische Aldolkondensation	141
7.5.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift 7 (AAV7): Katalysator-Screening für die Aldolkondensation	141
7.5.1.1	Katalysator-Screening in wässrigem Medium	141
7.5.1.2	Katalysator-Screening in organischem Medium	142
7.5.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift 8 (AAV8): Lysin-katalysierte Aldolkondensation von Hexanal in verschiedenen Lösungsmitteln	142
7.5.2.1	Zeitlicher Verlauf der Lysin-katalysierten Aldolkondensation von Hexanal in Dichlormethan	143
7.5.2.2	Aldolkondensation in Acetonitril und Ethylacetat	143
7.5.2.3	Aldolkondensation in Methanol	143
7.5.2.4	Aldolkondensation in Methanol/Puffer	144
7.5.3	Einfluss von PIPO auf die Aldolkondensation	144
7.5.4	Einfluss von, mit Wasser gesättigtem Lösungsmittel auf die Aldolkondensation	145
7.6	Kombination von Alkohol-Oxidation und Aldolkondensation	146
7.7	Enzymatische Reduktion aktivierter Doppelbindungen	147
7.7.1	Aktivitätsassay verschiedener En-Reduktasen	147
7.7.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift 9 (AAV9): Präparative Versuche mit En-Reduktasen	147
7.7.2.1	Screening von En-Reduktasen im mikropräparativen Maßstab	148
7.7.2.2	Optimierung der Biotransformation mit isolierter GoxER (Statistische Versuchsplanung)	148
7.7.3	Aktivitätsassay von En-Reduktase-Rohextrakten auf ADH-Aktivität	149
7.7.4	Aktivitätsassay <i>E.coli</i> eigener Alkoholdehydrogenasen	150
7.7.5	Untersuchung der Deaktivierung der GoxER durch 2-Butyl-2-octenal und 2-Butyloctanal	151
7.7.6	Relativer Verlust von 2-Butyl-2-octenal und 2-Butyloctanal in Gegenwart der GoxER	151
7.7.7	Substratkinetik der GoxER	152
7.7.8	Aufarbeitungssimulation der enzymatischen Reduktion	152
7.7.9	Qualitative Untersuchung der Präzipitation von GoxER in Anwesenheit von Aldehyden	153
7.7.10	Immobilisierung von GoxER	153
7.7.10.1	Immobilisierung von GoxER auf Epoxid-Träger	153

7.7.10.2	Immobilisierung von GoxER auf Amin-Träger.....	154
7.7.10.3	Bestimmung der Restaktivität immobilisierter GoxER.....	155
7.7.10.4	Konjugierte Reduktion von 2-Butyl-2-octenal mit immobilisierter GoxER..	155
7.7.10.5	Rezyklisierung immobilisierter GoxER.....	156
7.8	Enzymatische Reduktion von Aldehyden.....	158
7.8.1	Aktivitätsassay verschiedener Alkoholdehydrogenasen.....	158
7.8.2	Aktivitätsassay der ADH aus <i>Pichia pastoris</i> (PpADH)	158
7.8.3	Reduktion von 2-Butyloctanal mit PpADH	159
7.9	Kombination der enzymatischen Reduktionen.....	160
7.9.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift 10 (AAV10): Mikro-präparative Experimente zur enzymatischen Reduktion mit isolierten Enzymen	160
7.9.1.1	Enzymatischen Reduktionen in verschiedenen Solvenssystemen	160
7.9.1.2	Erhöhung der Substratkonzentration	161
7.9.2	Aktivitätsassay von GoxER und RrADH mit Methanol als Cosolvens ..	162
7.9.3	Kombinierte Biotransformation im 15 mL-Maßstab	162
7.9.4	Kombinierter Gesamtprozess unter Verwendung isolierter Enzyme	163
7.10	Ganzzellkatalyse	164
7.10.1	Konstruktion und Expression der Ganzzellkatalysatoren	164
7.10.1.1	Amplifikation des Inserts	164
7.10.1.2	Verdau des Inserts	164
7.10.1.3	Verdau und Aufreinigung des Vektors	164
7.10.1.4	Ligation, Transformation in <i>E. coli</i> JM109 und Testverdau.....	165
7.10.1.5	Transformation und Anzucht der Ganzzellkatalysatoren	165
7.10.2	Bestimmung von Aktivitäten und Proteingehalt der Ganzzellkatalysatoren	166
7.10.3	Allgemeine Arbeitsvorschrift 11 (AAV11): Mikro-präparative Ganzzell-Biotransformationen	166
7.10.3.1	Einleitende Versuche zum Vergleich der Ganzzellkatalysatoren.....	167
7.10.3.2	Erhöhung der Katalysatormenge	167
7.10.3.3	Optimierung des pH-Werts.....	168
7.10.3.4	Substratscreening	168
7.10.3.5	Erhöhung der Substratkonzentration und Verwendung von organischem Cosolvens	169
7.10.4	Allgemeine Arbeitsvorschrift 12 (AAV12): Hochskalierte Ganzzell- Biotransformationen	169
7.10.4.1	Ganzzell-Biotransformationen im 25 mL-Maßstab.....	170
7.10.4.2	Aufarbeitungssimulation von Ganzzell-Biotransformationen im 25 mL- Maßstab	170
7.10.4.3	Ganzzell-Biotransformation im 500 mL-Maßstab.....	170
7.11	Kombination von Aldolkondensation und Ganzzellkatalyse.....	171
8	Anhang - Thioester-vermittelte Amidbildung.....	173
8.1	Einleitung.....	173
8.2	Ergebnisse und Diskussion.....	174
8.2.1	Aminolyse von Thioestern mit Piperidin-Derivaten.....	174
8.2.2	Gleichgewicht der Transthoesterifizierung.....	175
8.2.3	Aminolyse von Thioestern mit 7-Aminocephalosporansäure	175
8.3	Experimenteller Teil.....	176
8.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift 13 (AAV13): Synthese von Amid- und Thioestern mit T3P®	176
8.3.1.1	Synthese von <i>rac</i> -2-Methyl- <i>N</i> -phenoxyacetyl-piperidin (77)	177
8.3.1.2	Synthese von <i>S</i> -Phenoxyacetylmercaptoessigsäureethylester (82).....	177
8.3.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift 14 (AAV14): Aminolyse von Thioestern ..	178
8.3.2.1	Screening sekundärer Amine.....	178
8.3.2.2	Screening von Additiven	178

8.3.2.3	Lösungsmittelscreening	178
8.3.2.4	Einfluss der Temperatur	178
8.3.3	Aminolyse von S-Phenoxyacetylmercaptoessigsäureethylester (82)... ..	179
8.3.4	Synthese von 1,3-Bis(3,5-bis(trifluormethyl)phenyl)harnstoff (83)	179
8.3.5	Aminolyse von Thioestern mit 7-ACA	180
8.3.6	Harnstoff-katalysierte Transthoesterifizierung	180
8.3.7	Aminolyse von Thioestern mit 7-ACA über Harnstoff-katalysierte Transthoesterifizierung	181
9	Anhang - Gen- und Proteinsequenzen.....	183
9.1	En-Reduktasen.....	183
9.2	Dehydrogenasen.....	189
10	Literaturverzeichnis.....	195

Abkürzungsverzeichnis

2-MeTHF	2-Methyltetrahydrofuran
AAOYE	En-Reduktase aus <i>Acetobacter acetii</i>
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
ABNO	9-Azabicyclo[3.3.1]nonan- <i>N</i> -oxyl
ACN	Acetonitril
ADH	Alkoholdehydrogenase
adhP	Alkoholdehydrogenase aus <i>Escherichia coli</i>
AKR	Aldo-Keto-Reduktase
Äq.	Äquivalent
Asn	Asparagin
AtoB	Acetyl-CoA-Acetyl-Transferase
AZADO	2-Azaadamantan- <i>N</i> -oxyl
BktB	β -Ketothiolase
Bp	<i>Boiling Point</i> (= Siedepunkt)
bpy	2,2'-Bipyridin
BTX	Benzol, Toluol, Xylol
ByADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Baker's Yeast</i>
CLEA	<i>Cross-Linked Enzyme Aggregates</i>
CoA	Coenzym A
Cp	Pentamethylcyclopentadien
Crt	Crotonase
CtADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Comamonas testosteroni</i>
δ	Chemische Verschiebung
d	Schichtdicke
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	Dichlormethan
DKR	Dynamisch-kinetische Racematspaltung
DMP	Dess-Martin-Periodan
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dppm	Bis(diphenylphosphino)methan
ϵ	Extrinktionskoeffizient
E	Extinktion
EATOS	<i>Environmental Assessment Tool for Organic Syntheses</i>
EC-NemA	En-Reduktase aus <i>Escherichia coli</i>
E-Faktor	<i>Environmental Factor</i>
ER	En-Reduktase
ESI	<i>Electron Spray Ionization</i>
Evo 200	Alkoholdehydrogenase von evocatal GmbH
f	Verdünnungsfaktor
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDH	Formiatdehydrogenase
FMN	Flavinmononukleotid
G6PDH	Glucose-6-phosphatdehydrogenase
GC	Gaschromatographie
GDH	Glucosedehydrogenase
GlyDH	Glycerin-Dehydrogenase
GoxER	En-Reduktase aus <i>Gluconobacter oxydans</i>
GZK	Ganzzellkatalysator
Hbd	Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase
His	Histidin
HLADH	<i>Horse Liver Alcohol Dehydrogenase</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
IBX	2-Iodoxybenzoesäure
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
KPi	Kaliumphosphat
KYE	En-Reduktase aus <i>Kluyveromyces lactis</i>
LkADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus kefir</i>
logP	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient

MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MDR	<i>Medium-Chain Dehydrogenase/Reductase</i>
MeOYE	En-Reduktase aus <i>Methylobacter extorquens</i>
MO	Monooxygenase
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
MTO	<i>Methanol-to-Olefins</i>
MTP	<i>Methanol-to-Popylene</i>
NAD(P) / NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NCR	En-Reduktase aus <i>Zymomonas mobilis</i>
NdeI	Restriktionsenzym aus <i>Neisseria denitrificans</i>
NfsA/B	En-Reduktase aus <i>Escherichia coli</i>
NMI	<i>N</i> -Methylimidazol
NMR	<i>Nuclear-Magnetic Resonance Spectroscopy</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure-Agarose
OD ₆₀₀	Optische Dichte (bei 600 nm)
OPR1/2.6/3	En-Reduktase aus <i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomate)
ori	<i>Origin of Replication</i>
OYE(1-3)	<i>Old Yellow Enzyme</i> (En-Reduktase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
PAA	Polyacrylamid
PCL	Polycaprolacton
Pdc	Pyruvat-Decarboxylase
PETNR	Pentaerythritoltetranitratreduktase (En-Reduktase aus <i>Enterobacter cloacae</i>)
Pfor	Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase
PIPO	Polymer-immobilisiertes Piperidinyloxyl
PLADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Parvibaculum lavamentivorans</i>
PpADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Pichia pastoris</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PP-NemA	En-Reduktase aus <i>Pseudomonas putida</i>
PPOYE	En-Reduktase aus <i>Pseudomonas putida</i>
R	Bestimmtheitsmaß
RrADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Rhodococcus ruber</i>

RT	Raumtemperatur
ScADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDR	<i>Short-Chain Dehydrogenase/Reductase</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SyADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Sphingobium yanoikuyae</i>
t	Zeit
TADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Thermus</i> sp. ATN1
TbADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Thermoanaerobicum brockii</i>
TBD	1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-en
TeADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>
TEMPO	2,2,4,4-Tetramethylpiperidinyloxyl
Ter	<i>trans</i> -Enoyl-CoA-Reduktase
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
TMS	Trimethylsilan
Tyr	Tyrosin
U	Units (Enzymaktivität)
v_s	Volumen der Enzymlösung
v_t	Volumen der Küvette
XHD	Xylitol-Dehydrogenase
XhoI	Restriktionsenzym aus <i>Xanthomonas holcicola</i>
XI	Xylose-Isomerase
XR	Xylose-Reduktase
YADH	<i>Yeast Alcohol Dehydrogenase</i>
yahK	Alkoholdehydrogenase aus <i>Escherichia coli</i>
yjgB	Alkoholdehydrogenase aus <i>Escherichia coli</i>
yqhD	Alkoholdehydrogenase aus <i>Escherichia coli</i>
YqjM	En-Reduktase aus <i>Bacillus</i> sp.
ZRE	Zellrohextrakt

1 Einleitung

Zu Zeiten der industriellen Revolution war Kohle der wichtigste Rohstoff für die chemische Industrie. Mit dem steigenden Bedarf an Treibstoffen wurden Rohöl und Erdgas zunehmend günstiger und sind zudem einfacher zu transportieren. Heutzutage basieren 72% aller in Deutschland hergestellten Chemikalien auf Rohöl. Etwa 14 % werden aus Erdgas, 13% aus nachwachsenden Rohstoffen und nur noch 1% aus Kohle erzeugt.^[1] Erdöl, bzw. das aus ihm gewonnene Naphtha, wird über *Cracking*- und *Reforming*-Prozesse in Ethylen, Propylen und Aromaten (BTX = Benzol, Toluol, Xylol) umgewandelt. Erdgas hingegen bietet die Möglichkeit aus Methan über *Steam-Reforming* Synthesegas zu bilden aus dem z.B. Methanol, Ammoniak (Haber-Bosch-Verfahren), Aldehyde (Hydroformylierung) und Alkane (Fischer-Tropsch-Synthese) zugänglich sind. Synthesegas kann jedoch nicht nur aus fossilen Rohstoffen, sondern auch aus Biomasse gewonnen werden. Über diesen, als Gasifizierung bezeichneten Prozess können nachwachsende Rohstoffe in die bestehende Produktionskette der chemischen Industrie integriert werden (Abb. 1).

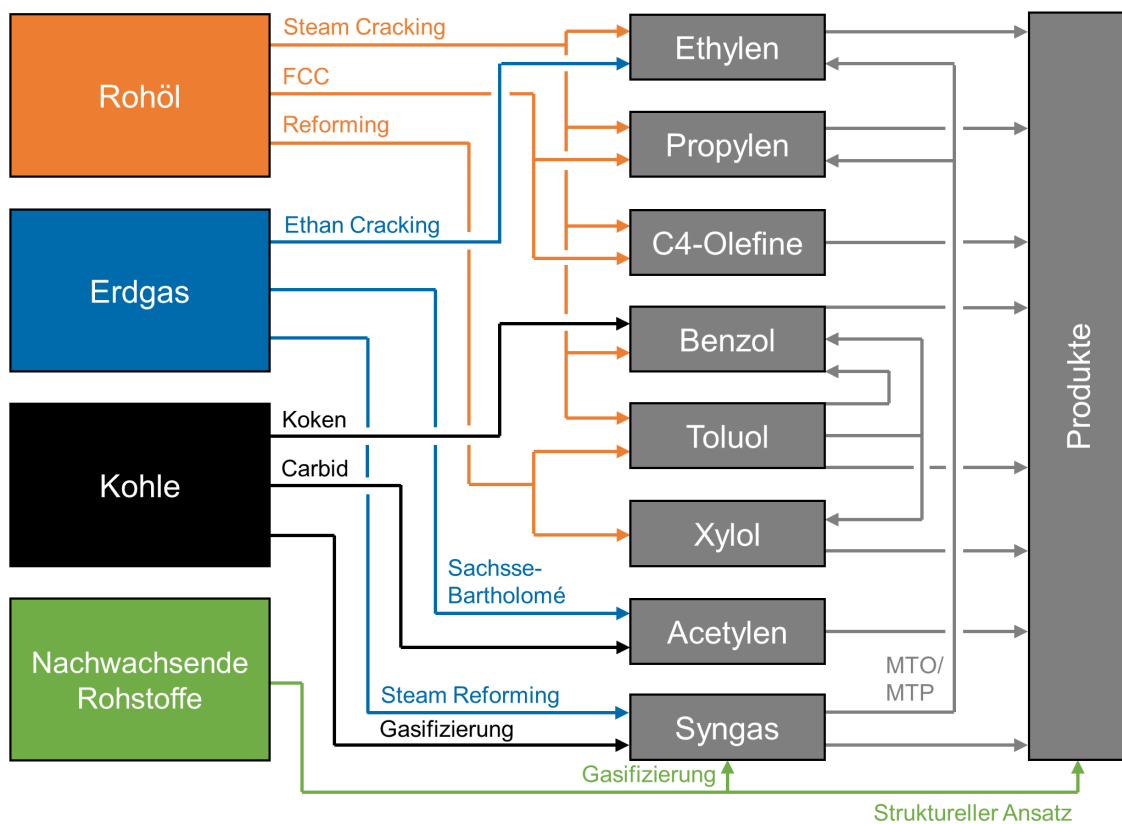
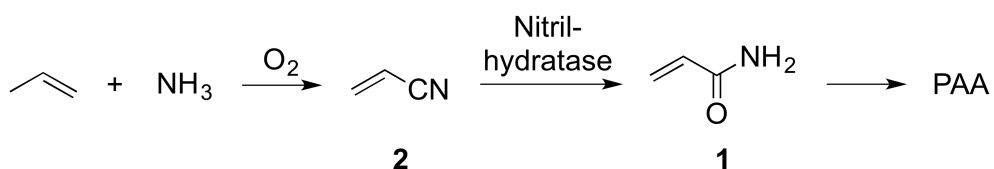


Abb. 1: Industrielle Produktionswege von Plattform-Intermediaten aus Kohlenstoffquellen (FCC = *Fluid Catalytic Cracking*, MTO = *Methanol-to-Olefins*, MTP = *Methanol-to-Propylene*).^[1,2]

Die meisten dieser Prozesse sind jedoch energieintensiv. Ein struktureller Ansatz, bei dem die bereits in der Biomasse vorhandenen strukturellen Motive genutzt und effizient in die gewünschten Ziel-Verbindungen überführt werden, als Alternative zur Gasifizierung, bietet entscheidende Vorteile. In einer Bio-Raffinerie werden zunächst Cellulose, Hemicellulose und Lignin voneinander getrennt. Vor allem aus Cellulose und Hemicellulose kann durch *Metabolic Engineering* eine Reihe von Verbindungen (z.B. Ethanol, Essig-, Zitronen- und Milchsäure, Aminosäuren, Antibiotika, etc.) fermentativ erzeugt werden. Lignin spielt zurzeit noch eine untergeordnete Rolle, wird aber, sobald die entsprechenden Technologien zur Verfügung stehen eine wichtige Quelle für aromatische Verbindungen darstellen.

Biokatalysatoren haben aufgrund ihrer hohen Chemo-, Regio- und Stereoselektivität eine große Bedeutung bei der strukturellen Herangehensweise. Dies trifft umso mehr zu, da sie auch für die Synthese nicht natürlicher Produkte eingesetzt werden können und beinahe beliebig in Form artifizierender Kaskaden, auch in Kombination mit chemokatalytischen Schritten kombiniert werden können. Schon heute werden sie vor allem in der Feinchemie zur Produktion von Arzneimitteln oder Duftstoffen eingesetzt, wo sie Syntheserouten verkürzen und Ausbeuten erhöhen.^[3] Insbesondere umfangreiche und mit niedriger Atomökonomie verbundene Schutzgruppenstrategien sind bei Nutzung enzymatischer Schritte häufig nicht notwendig. Ein großer Vorteil im Bereich der Bulkprodukte, wo Kosten für Energie und Abfall einen großen Anteil an den Gesamtkosten des Produkts ausmachen, sind die milden Reaktionsbedingungen (Raumtemperatur, Atmosphärendruck, wässriges Solvens) unter denen Biokatalysatoren arbeiten. Ihre Nutzung erfüllt damit auch einige der 12 Prinzipien grüner Chemie.^[4]

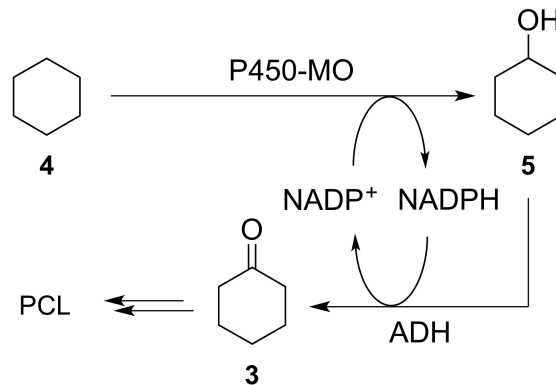
Bis heute konnten sich jedoch nur wenige biokatalytische Verfahren im Bereich der Bulkprodukte etablieren, wobei die Synthese von Acrylamid (**1**) aus Acrylnitril (**2**) das wohl prominenteste Beispiel darstellt (Schema 1).^[5]



Schema 1: Enzymatische Synthese von Acrylamid (**1**) aus Acrylnitril (**2**) mittels einer Nitrilhydratase (PAA = Polyacrylamid).^[5]

Gerade enzymatische Reduktionsreaktionen haben es aufgrund der Notwendigkeit teurer Cofaktoren und entsprechender Regenerierungssysteme schwer gegen etablierte industrielle Prozesse, weshalb Redox-neutrale Reaktionen bevorzugt werden. Ein Beispiel

hierfür ist die Synthese von Cyclohexanon (**3**), einem Vorläufer von Polycaprolacton (PCL), aus Cyclohexan (**4**) über Cyclohexanol (**5**) (Schema 2).^[6–8]



Schema 2: Konzept einer Redox-neutralen Synthese von Cyclohexanon (**3**) über Cyclohexanol (**5**) aus Cyclohexan (**4**) (MO = Monooxygenase, ADH = Alkoholdehydrogenase, PCL = Polycaprolacton).

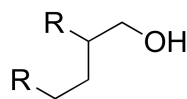
Durch die zunehmende Limitierung fossiler Rohstoffe und den damit verbundenen Rohstoffwandel, sowie strengere gesetzliche Vorgaben hinsichtlich des Umweltschutzes, werden enzymatische Reaktionen künftig an Attraktivität gewinnen.

2 Stand der Wissenschaft

2.1 Guerbet-Alkohole und Optionen zur nachhaltigen Alkoholproduktion

Guerbet-Alkohole sind eine Klasse aliphatischer, α -verzweigter, primärer Alkohole die vor allem in Schmierstoffen, Weichmachern, Waschmitteln und Treibstoffen zum Einsatz kommen.^[9-11] Besonders interessant für diese Anwendungsbereiche macht sie die Eigenschaft eines deutlich niedrigeren Schmelzpunktes im Vergleich zu den linearen Alkoholen mit gleicher Kohlenstoffanzahl (Tab. 1). Aufgrund der Tatsache, dass sie auch bei sehr niedrigen Temperaturen ihren flüssigen Aggregatzustand behalten, sind sie prädestiniert für die Verwendung als Schmierstoffe in kalten Umgebungen. Ähnliche Eigenschaften in linearer Form weisen nur ungesättigte Alkohole auf, die jedoch nicht die gleiche, hohe Stabilität gegenüber Oxidation zeigen. Als Weichmacher in Polyvinylchlorid-basierten Kunststoffen werden v.a. Ester von Guerbet-Alkoholen mit Phthal- und Adipinsäure eingesetzt. Die Waschmittel-Industrie macht sich ihren amphiphilen Charakter zunutze und zieht vor allem sulfatierte Derivate als oberflächenaktive Substanzen heran.^[12] Im Vergleich zu linearen Alkoholen mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften, haben sie außerdem eine höhere Energiedichte, was sie als Treibstoff-Zusatz attraktiv macht. Angeboten werden Guerbet-Alkohole und ihre Derivate vor allem von Sasol, die sie unter dem Markennamen Isofol[®] vertreiben.^[13]

Tab. 1: Allgemeine Struktur und Schmelzpunkte [°C] von Guerbet-Alkoholen.^[9]



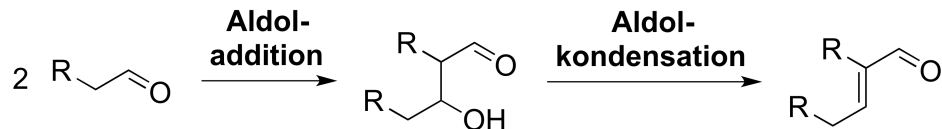
Kohlenstoff- anzahl	Alkohol	
	linear	Guerbet
12	24	-30
16	50	-18
18	58	-8
20	62	0
24	69	19

Die namensgebende Guerbet-Reaktion erfolgt ausgehend von linear-aliphatischen, primären Alkoholen in vier Schritten:^[9,14-17]

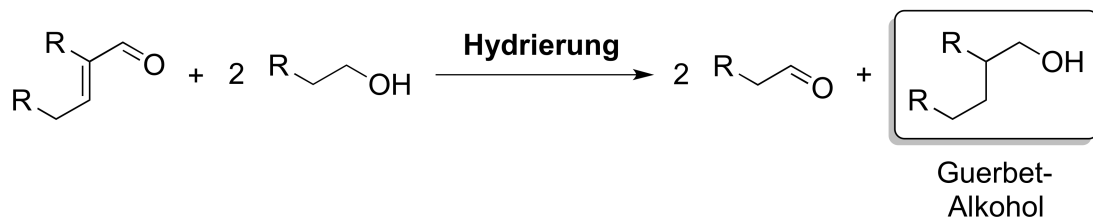
1. Dehydrierung des Alkohols zum Aldehyd,



2. Homo-Aldolkondensation zweier Aldehyd-Moleküle,



3. Hydrierung des α -verzweigten, α,β -ungesättigten Aldehyds zum gesättigten Aldehyd und weiter zum Guerbet-Alkohol, wobei der Edukt-Alkohol als Wasserstoff-Donor fungiert und so eine Kettenreaktion initiiert,

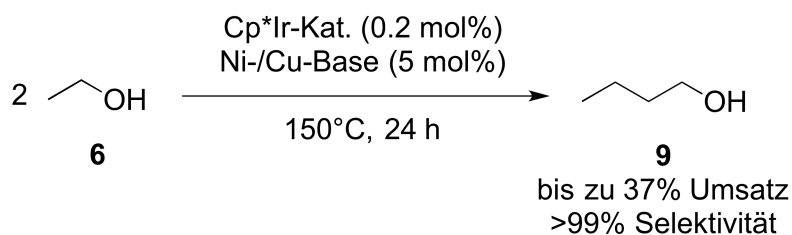


4. Disproportionierung des Aldehyds zum Alkohol und zur Säure, was einen Kettenabbruch hervorruft.



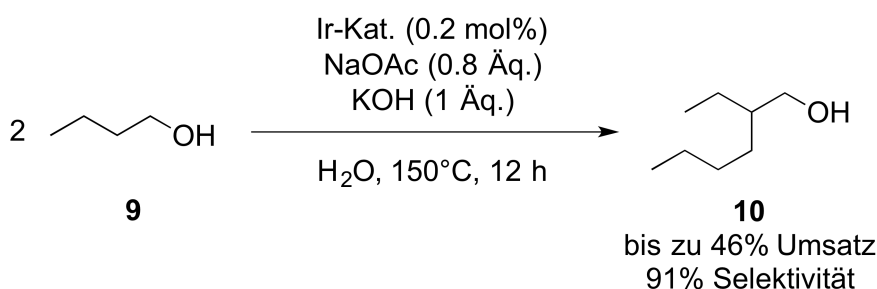
Varianten der Guerbet-Reaktion unterscheiden sich im Wesentlichen nur im verwendeten Katalysatorsystem und den Reaktionsbedingungen bezüglich Temperatur und Druck. Es werden Reaktionen mit homogener Base, mit homogener Base und homogener oder heterogener Hydrier-Katalysator sowie mit rein heterogenem Katalysator unterschieden. Industriell sind letztere am attraktivsten, da sich die Katalysatoren leicht abtrennen und ggf. wiederverwenden lassen und außerdem kaum Leaching stattfindet.^[18] Die klassische Variante nutzt metallisches Natrium, das mit den eingesetzten Alkoholen Alkoxide bildet.^[15,16] Aufgrund der Reaktivität des Alkalimetalls werden jedoch Alkalihydroxide bevorzugt. SULZBACHER^[19] beschreibt, dass ein rein basischer Katalysator für die Kondensation von Cetylalkohol (C₁₂) hohe Temperaturen (300°C) benötigt um die Dehydrierung, die als geschwindigkeitsbestimmender Schritt gilt, zu beschleunigen.

Anfängliche Versuche der Guerbet-Reaktion von Ethanol (**6**) zu 1-Butanol (**9**) mit Iridium-Katalysatoren^[32–34] setzten noch auf den Einsatz organischer Lösungsmittel (*p*-Xylol), anorganischer Basen (KOH oder NaOMe) und Alken-Promotoren (1,7-Octadien). Kürzlich wurde eine Reaktion mit Cp*Ir-Katalysator^[45] und komplexen Ni- oder Cu-basierten Basen unter lösungsmittelfreien Bedingungen ohne Promotor entwickelt, wobei Umsätze bis zu 37% mit >99% Selektivität erzielt werden konnte (Schema 4). Die Reaktion konnte mit nur 16% Umsatz, aber gleich bleibender Selektivität auch bei 100°C durchgeführt werden.^[35]



Schema 4: Guerbet-Reaktion von Ethanol (**6**) zu 1-Butanol (**9**) unter Einsatz eines Cp*Ir-Katalysators und komplexen Übergangsmetall-Basen nach CHAKRABORTY.^[35]

Die Kondensation von 1-Butanol (**9**) zu 2-Ethyl-1-hexanol (**10**) mithilfe eines Iridium-Katalysators mit wasserlöslichen Phenanthrolin-Liganden lieferte bei 150°C einen Umsatz von 54% mit 91% Selektivität (Schema 5).^[36] Der Katalysator konnte mehrfach rezykliert und so seine Stabilität in Wasser gezeigt werden.



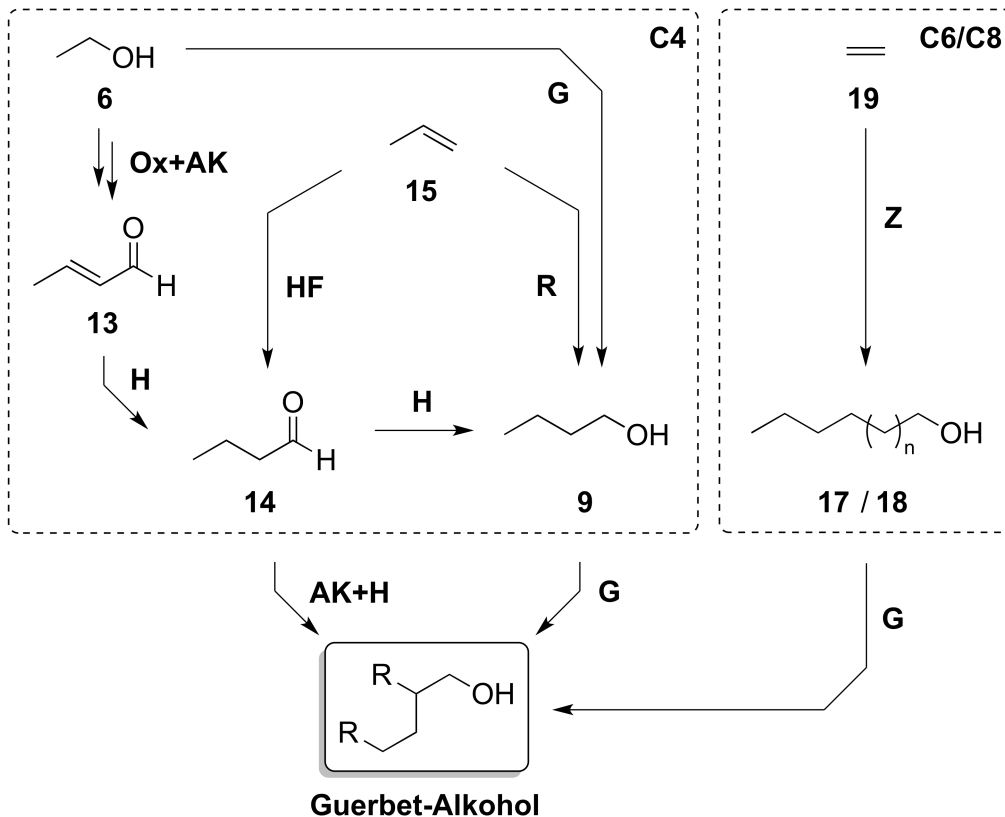
Schema 5: Kondensation von 1-Butanol (**9**) zu 2-Ethyl-1-hexanol (**10**) in Wasser nach XU.^[36]

Für die Guerbet-Reaktion geeignete, heterogene Übergangsmetall-Katalysatoren basieren in der Regel auf Metalloxiden^[46,47], elementaren (Cu^[48]) oder geträgerten Metallen (Pt/C^[49], Pd/C^[50], Ir^[36,51]). CARLINI^[38,39] verwendete zur Synthese von Isobutanol (**8**) aus Methanol (**7**) / *n*-Propanol (**11**) oder Methanol (**7**) / Ethanol (**6**) Kupferchromit oder Nickel auf Kieselgel zusammen mit Natriummethanolat als Base. Es wurde ein Umsatz von bis zu 77% bei 200°C erreicht.

Industriell attraktiv und von hohem, aktuellem Forschungsinteresse sind auch vollständig heterogene Katalysatorsysteme, die die Fähigkeiten zur Katalyse der Aldolkondensation und der Hydrierung miteinander vereinen. KOZLOWSKI und DAVIS^[52] geben einen umfassenden Überblick über mögliche Katalysatoren von Magnesiumoxid^[53–56] und bi-funktionalen Mg/Al-Oxiden^[57–61] hin zu Hydroxyapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$)^[62–67] und basischen Zeoliten^[68]. Generell laufen Reaktion mit rein heterogenen Katalysatoren bei Temperaturen $>300^\circ\text{C}$, weshalb kein zusätzlicher Übergangsmetall-Katalysator benötigt wird. Methanol konnte bei 380°C mit verschiedenen primären Alkoholen reagieren und lieferte einen moderaten Umsatz von 50% bei 80% Selektivität.^[53,54] Bi-funktionale Katalysatoren hingegen, zeigen vor allem deutlich bessere Selektivitäten und werden im Gegensatz zu homogenen, basischen Katalysatoren nicht von Wasser inaktiviert.^[61,65] Auch das Verhältnis von sauren (Mg) zu basischen (Al) Funktionen spielt eine wichtige Rolle.^[56] Ähnliches gilt auch für das Ca/P-Verhältnis von Hydroxyapatiten.^[66,67]

Das jährliche Produktionsvolumen des wichtigsten Gerbet-Alkohols 2-Ethyl-1-hexanol (**10**) beläuft sich auf etwa 3.3 Millionen Tonnen weltweit (2010). Er ist nach den niedermolekularen Alkoholen $\text{C}_1\text{-C}_4$ der am häufigsten produzierte Alkohol überhaupt.^[69,70] Das für seine Synthese nötige 1-Butanol (**9**) kann auf verschiedenen Wegen hergestellt werden (Schema 6).^[71] Ein heutzutage nicht mehr genutzter Prozess geht von Ethanol (**6**) aus, welcher zu Acetaldehyd (**12**) oxidiert wird. Nach Homo-Aldolkondensation zu 2-Butenal (**13**, Crotonaldehyd) wird dieser über Butanal (**14**) zu 1-Butanol (**9**) reduziert. Ein weiterer Prozess der kaum Anwendung findet ist der Reppe-Prozess, die Reaktion von Propen (**15**) mit Kohlenmonoxid und Wasser unter Verwendung modifizierter Eisenpentacarbonyl-Katalysatoren. Er liefert ein Gemisch (85:15) von 1-Butanol (**9**) und Isobutanol (**8**) unter recht milden Reaktionsbedingungen ($90\text{-}110^\circ\text{C}$, 10-15 bar).^[72] Der mit Abstand am häufigsten eingesetzte Prozess ist die Hydroformylierung (Oxo-Prozess) von Propen (**15**) zu Butanal (**14**) mithilfe von Cobalt- oder Rhodium-Katalysatoren.^[73–76] In der Praxis wird für die Produktion von 2-Ethyl-1-hexanol (**10**) nicht die klassische Gerbet-Reaktion verwendet, sondern das aus dem Oxo-Prozess entstehende Butanal (**14**) einer Homo-Aldolkondensation mit wässriger Natriumhydroxid-Lösung unterzogen. Das Produkt 2-Ethyl-2-hexenal (**16**) wird abschließend zu 2-Ethyl-1-hexanol (**10**) hydriert.^[69]

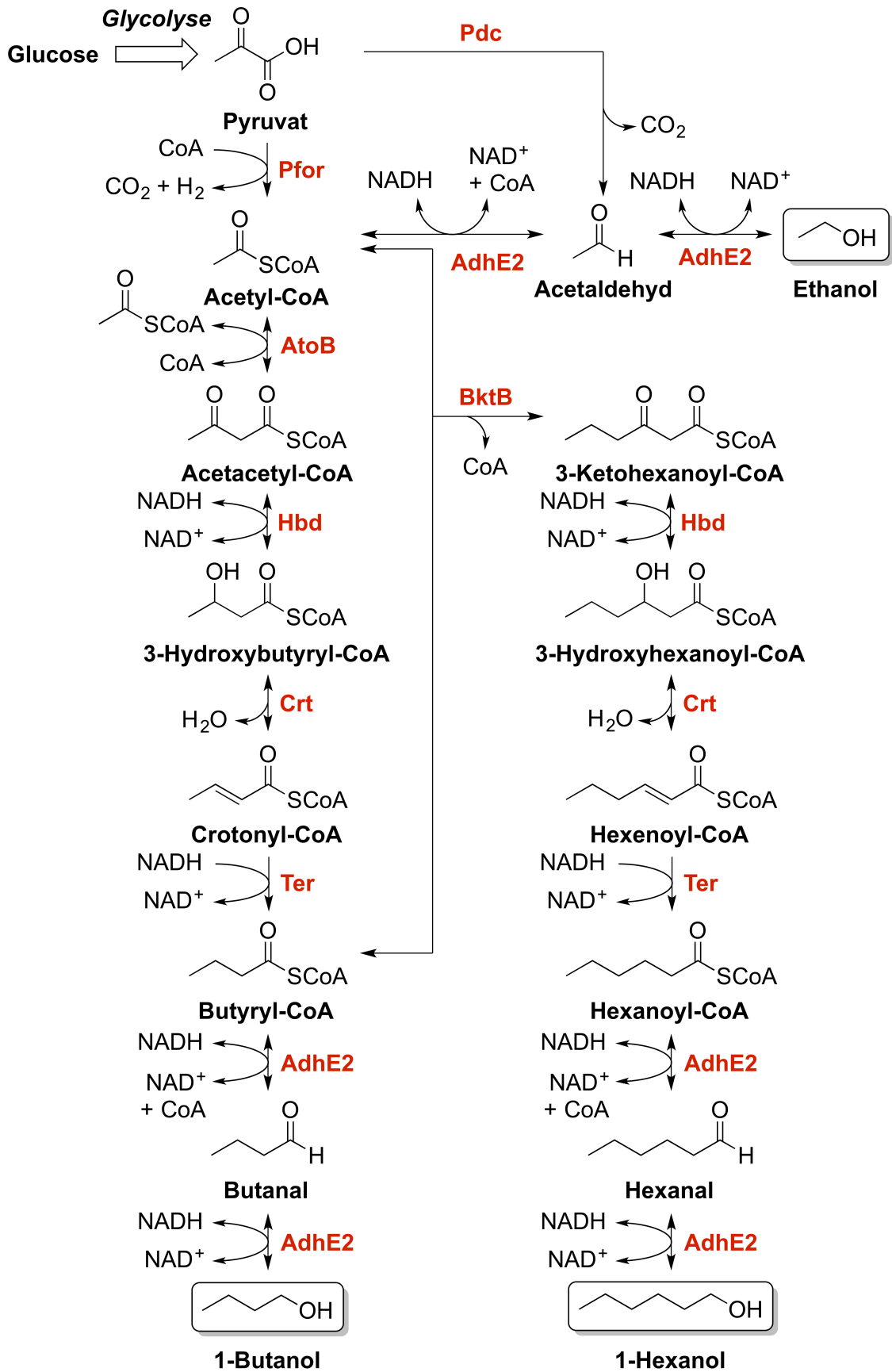
Die Produktion von 1-Hexanol (**17**) und 1-Octanol (**18**) basiert hingegen nicht auf Hydroformylierung der terminalen Alkene, da diese zu Isomerisierung tendieren und daher verzweigte Aldehyde liefern. Hier findet der Ziegler-Prozess (Alfol-Synthese), also die Oligomerisierung von Ethylen (**19**) unter Einsatz von Organoaluminium-Katalysatoren Anwendung.^[17] Der Prozess verläuft über eine Kettenreaktion, die durch terminale Oxygenierung gestoppt wird und die gewünschten Alkohole liefert.



Schema 6: Industrielle Prozesse zur Synthese von Guerbet-Alkoholen. (Ox = Oxidation, AK = Aldolkondensation, H = Hydrierung, HF = Hydroformylierung (Oxo-Prozess), R = Reppe-Prozess, Z = Ziegler-Alfol-Synthese, G = Guerbet-Reaktion).

Die klassischen Prozesse basieren auf fossilen Rohstoffen, könnten jedoch in Zukunft durch nachhaltige Prozesse ersetzt werden. Fermentative Verfahren zur Synthese von Ethanol (**6**, aus *Saccharomyces cerevisiae*) und 1-Butanol (**9**, aus *Clostridium acetobutylicum*) sind seit langem etabliert, wurden jedoch, wie im Fall des ABE-Prozesses (Aceton-Butanol-Ethanol-Fermentation) teilweise aufgrund zu hoher Kosten im Vergleich zu den klassischen Verfahren in den 1950er-Jahren wieder eingestellt.^[77–82] Auch gibt es bereits erfolgreiche Versuche zur Klonierung und Erweiterung des Biosynthesewegs von *C. acetobutylicum* in *E. coli*. durch *Metabolic Engineering* um auch 1-Hexanol (**17**) zugänglich zu machen (Schema 7).^[83]

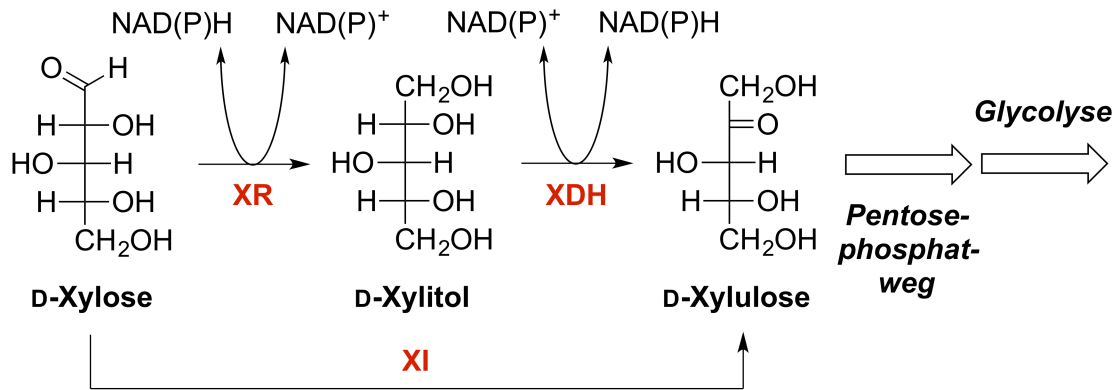
Das, aus der Glycolyse entstehende Pyruvat wird mithilfe der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (Pfor), einem vorwiegend in *Clostridien* vorkommenden Enzymkomplex, in Acetyl-CoA umgewandelt. Dabei findet eine Decarboxylierung statt und es wird, im Gegensatz zum, in den meisten aeroben Organismen aktiven Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, welcher NADH produziert, elementarer Wasserstoff freigesetzt. Im Hefen-Metabolismus arbeitet zusätzlich eine Pyruvat-Decarboxylase (Pdc), die direkt aus Pyruvat Acetaldehyd generiert, der dann von einer Alkoholdehydrogenase (AdhE2) zu Ethanol reduziert wird.^[84]



Schema 7: Biosynthese primärer, aliphatischer Alkohole.^[84]

Zwei Moleküle Acetyl-CoA werden von einer Acetyl-CoA-Acetyl-Transferase (AtoB) zu Acetacetyl-CoA umgesetzt. Die β -Carbonylgruppe wird anschließend von der 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (Hbd) reduziert und es entsteht 3-Hydroxybutyryl-CoA. Aus diesem wird mithilfe der Crotonase (Crt) Wasser eliminiert. Crotonyl-CoA wird von einer *trans*-Enoyl-CoA-Reduktase (Ter) zu Butanal und dieses weiter von AdhE2 zu 1-Butanol reduziert. Der Biosyntheseweg von 1-Hexanol unterscheidet sich lediglich in einem Schritt. So wird Acetyl-CoA nicht mit einem weiteren Molekül Acetyl-CoA, sondern mit dem Intermediat Butyryl-CoA von β -Ketothiolase (BktB) zu 3-Ketohexanoyl-CoA acetyliert.^[84] Die weiteren Schritte entsprechen der 1-Butanol-Biosynthese. Durch Ersetzen der Hbd durch eine Variante aus *Ralstonia eutropha* welche vorzugsweise längerkettige Moleküle umsetzt konnte sogar 1-Octanol zugänglich gemacht werden.^[85]

Fermentative Prozesse basieren derzeit vor allem auf D-Glucose. Da so jedoch ein ethischer Konflikt durch Konkurrenz mit der Nahrungsmittelproduktion entsteht, wäre ein Wechsel der Rohstoffbasis zu anderen Kohlenhydraten wünschenswert. Zudem ist D-Glucose ein relativ teurer Rohstoff, was Prozesse hin zu günstigen Bulk-Produkten ökonomisch unattraktiv macht. Die, z.B. bei der Gewinnung von Stärke anfallende Lignocellulose könnte künftig eine Alternative darstellen. Sie besteht neben Lignin, aus Cellulose und Hemicellulose.^[86] Cellulose selbst setzt sich ausschließlich aus D-Glucose-Einheiten zusammen und kann daher durch Cellulasen relativ leicht in seine Monomere zerlegt werden und als Fermentationsnähstoff dienen. Ein Prozess zur 1-Butanol-Fermentation aus kristalliner Cellulose wurde kürzlich von GAIDA entwickelt.^[87] Hemicellulose hingegen besteht aus vielen verschiedenen Zuckern und Zuckerderivaten, was eine enzymatische Hydrolyse kompliziert und eine thermische oder chemische Vorbehandlung nötig macht, welche die Energiebilanz des Prozesses negativ beeinflusst. Hemicellulose besteht zudem zum großen Teil aus Pentosen wie D-Xylose, die vom bakteriellen Stoffwechsel nicht umgesetzt und zunächst in D-Xylulose umgewandelt werden müssen. Dies kann entweder durch eine Kombination von Xylose-Reduktase (XR) und Xylitol-Dehydrogenase (XDH) oder direkt durch eine Xylose-Isomerase (XI) erfolgen. Zwar ist auch D-Xylulose noch eine Pentose, kann jedoch im Gegensatz zu D-Xylose zu Xylulose-5-phosphat phosphoryliert und als solches im Pentosephosphatweg verwertet und als Glycerinaldehyd-3-phosphat in die Glykolyse eingeschleust werden (Schema 8). Die Isomerisierung über XR und XDH birgt je nach Cofaktorspezifität der Enzyme den Nachteil, dass ein Cofaktorungleichgewicht entstehen kann, was zur Akkumulation von D-Xylitol führt, weshalb die Verwendung von XI bevorzugt wird.^[84,88] Auch spielen Transporterproteine für die Aufnahme der beteiligten Zucker eine wichtige Rolle.^[89,90]



Schema 8: Isomerisierung von D-Xylose aus Hemicellulose zu D-Xylulose.^[89]

Das große Interesse an Bio-Kraftstoffen eröffnet neue Wege zu linearen, primären Alkoholen, ausgehend von erneuerbaren Rohstoffen. Es gibt bereits etablierte fermentative Verfahren, die effizient, insbesondere zu Ethanol und 1-Butanol führen, wobei für letzteren ein Titer von bis zu 30 g L⁻¹ durch Fermentation von D-Glucose erreicht werden konnte.^[79,84] Die Produktion von 1-Hexanol auf diesem Weg steht noch am Anfang und erreicht derzeit nur 47 mg L⁻¹, da es mit dem 1-Butanol-Weg konkurriert.^[83] Alternative Prozesse hin zu länger-kettigen Alkoholen über die Decarboxylierung von Ketosäuren sind ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung.^[91]

2.2 Selektive Oxidation primärer Alkohole zu Aldehyden

Die Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden oder Ketonen ist eine bedeutende Transformation der organischen Synthese, da sie eine relativ unreaktive in eine sehr viel reaktivere funktionelle Gruppe überführt und so die ganze Vielfalt der Carbonylchemie, insbesondere Aldolreaktionen, ermöglicht. Pfizer^[92] und GlaxoSmithKline^[93] (GSK) veröffentlichten in der Vergangenheit Richtlinien zur Verwendung von Reagenzien für verschiedene organische Transformationen, u.a. für die selektive Oxidation von Alkoholen. Die Reaktionen bzw. deren Reagenzien werden hinsichtlich ihres Einflusses auf Umwelt und Gesundheit sowie sicherheitstechnische Aspekte in Klassen eingeteilt, die an eine Verwendungsempfehlung geknüpft sind. Pfizer berücksichtigt neben der Nachhaltigkeit (*Greenness*) zusätzlich praktische Aspekte wie Skalierbarkeit (*Scalability*) und breite Anwendbarkeit (*Wide Utility*). Nur Reaktionen, die alle drei Voraussetzungen erfüllen, wird eine uneingeschränkte Empfehlung ausgesprochen. Abb. 2 zeigt ein Venn-Diagramm, dass die im Folgenden diskutierten Reaktionen anhand dieser Aspekte gruppiert.

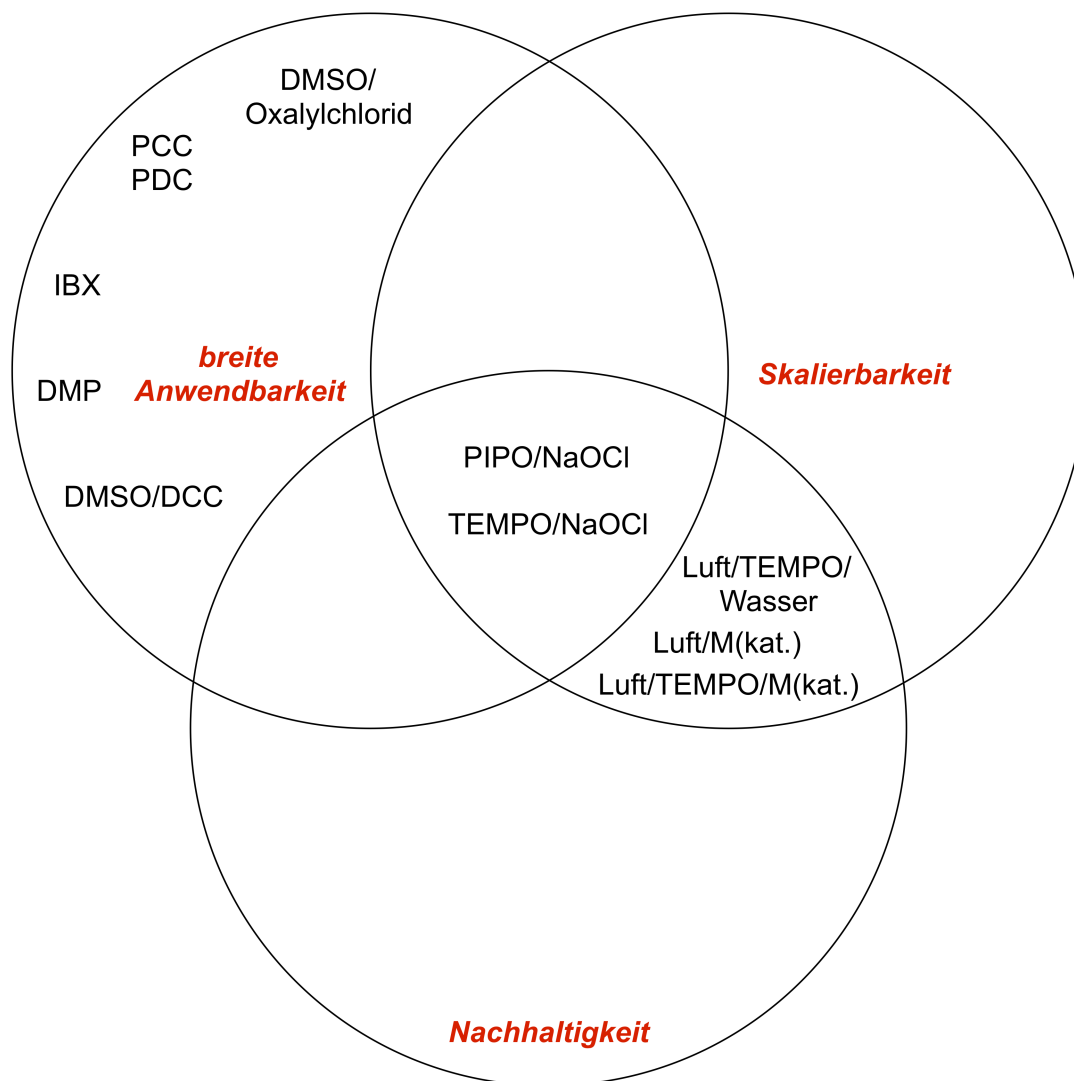
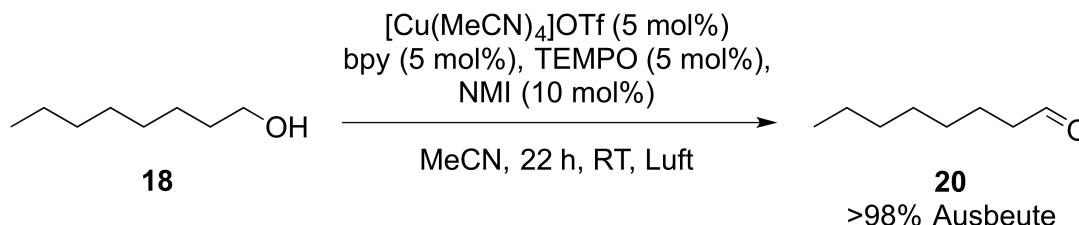


Abb. 2: Einstufung gängiger Methoden zur Alkoholoxidation bezüglich den Aspekten Nachhaltigkeit, Skalierbarkeit und breite Anwendbarkeit.^[92]

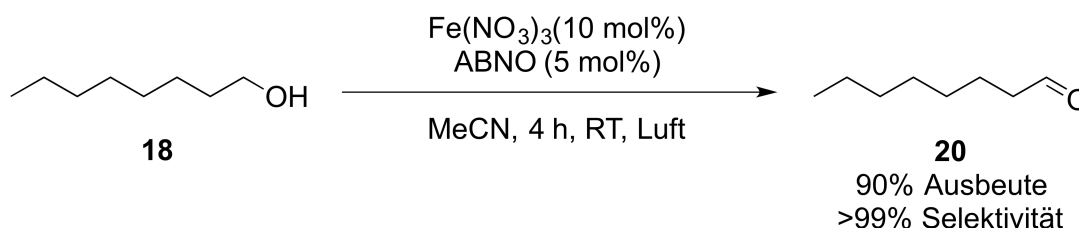
Breite Anwendbarkeit, vor allem im Labormaßstab, finden Reaktionen wie die auf Alkoxysulfonium-Yliden basierenden Swern^[94–96] und Pfitzner-Moffatt-Oxidationen^[97]. Sie erzeugen jedoch toxische Nebenprodukte, sowie mit strengem Geruch verbundenes Dimethylsulfid.^[98] Die Dess-Martin-Oxidation mit Dess-Martin-Periodan (DMP) oder 2-Iodoxybenzoesäure (IBX) setzt die energieintensive Synthese von DMP oder IBX voraus und hat zudem eine schlechte Atomökonomie. Verfahren basierend auf Chrom(IV)-Verbindungen finden aufgrund ihrer karzinogenen Wirkung auch im Labormaßstab kaum noch Anwendung. Reaktionen, die Sauerstoff oder Luft als Oxidationsmittel nutzen wurden in der nahen Vergangenheit besonders intensiv untersucht. Allerdings ist der Einsatz von reinem Sauerstoff v.a. in Kombination mit leicht entflammaren organischen Lösungsmitteln im großen Maßstab nicht unproblematisch. Zudem werden Übergangsmetallkatalysatoren wie Kupfer^[99,100] oder Palladium^[101–103] benötigt. Die Kombination dieser Übergangsmetallkatalysierten Reaktionen mit 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy

(TEMPO), einem stabilen Nitroxyl-Radikal, ermöglichte schließlich die Nutzung von Luft anstatt reinem Sauerstoff als Oxidationsmittel.^[104–107] Sie eröffnete zugleich die Oxidation aliphatischer, primärer Alkohole, die zuvor aufgrund ihrer niedrigeren Reaktivität nur in moderaten Ausbeuten erhalten werden konnten. Für die Oxidation von 1-Octanol (**18**) zu Octanal (**20**) wurde eine Ausbeute von >98% erreicht (Schema 9).^[106]



Schema 9: Cu/TEMPO-katalysierte Oxidation von 1-Octanol (**18**) zu Octanal (**20**) nach HOOVER (bpy = 2,2'-Bipyridin, NMI = *N*-Methylimidazol).^[106]

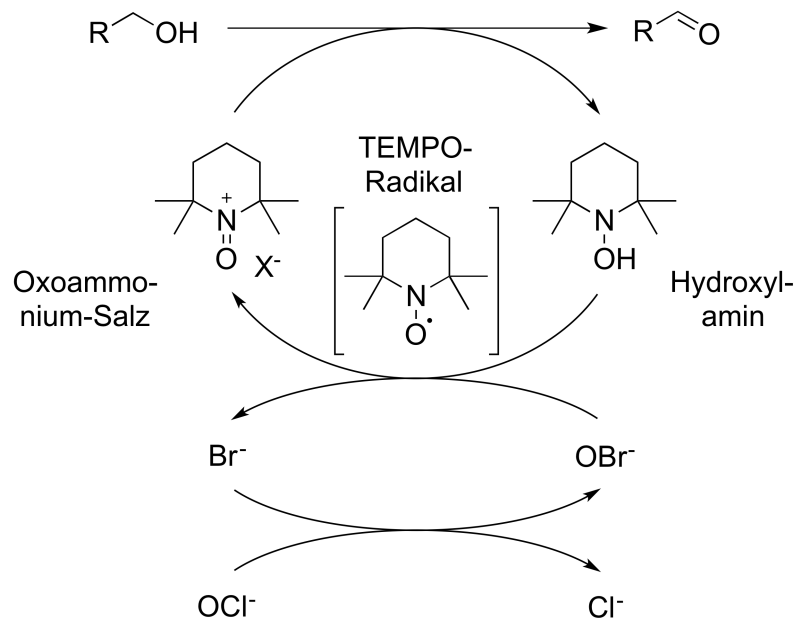
Nachteil dieser Reaktion ist die große Anzahl und Menge an Katalysatoren und die relativ lange Reaktionszeit. Alternativ zur Verwendung üblicher Kupfer-Katalysatoren gibt es auch eine Variante, die kupferhaltige Laccase nutzt. Auch diese Reaktionen benötigen jedoch lange Reaktionszeiten (>12 h) und teurere TEMPO-Derivate, wie das sterisch weniger anspruchsvolle 2-Azaadamantan-*N*-oxyl (AZADO).^[108,109] WANG^[110] berichtete kürzlich von einer Prozedur, die statt eines Kupferkomplexes Eisen(III)nitrat verwendet und weder einen Liganden, noch eine zusätzliche Base benötigt. Es kam mit 9-Azabicyclo[3.3.1]nonan-*N*-oxyl (ABNO) eine reaktivere Alternative zu TEMPO zum Einsatz. 1-Octanol (**18**) wurde innerhalb von 4 h mit 90% Ausbeute und >99% Selektivität zu Octanal (**20**) oxidiert (Schema 10). Eine Reihe weiterer, u.a. aliphatischer Substrate wurden ebenfalls in quantitativen Ausbeuten erhalten.



Schema 10: Fe/ABNO-katalysierte Oxidation von 1-Octanol (**18**) zu Octanal (**20**) nach WANG.^[110]

Die einzige Methode zur Oxidation primärer Alkohole, die nach dem Venn-Diagramm von Pfizer alle drei Kriterien erfüllt, ist die TEMPO-Oxidation mit Natriumhypochlorit als stöchiometrischem Oxidationsmittel. Sie wurde von ANELLI^[111] erstmals beschrieben und

nutzt neben Hypochlorit, welches als sehr günstiges Oxidationsmittel auch in Haushaltsbleiche verwendet wird, auch Natrium- oder Kaliumbromid als Co-Katalysator. Als einziges Nebenprodukt entsteht Natriumchlorid. Das Konzept der Reaktion ist in Schema 11 dargestellt.^[112,113]



Schema 11: Mechanismus der selektiven Oxidation primärer Alkohole zu Aldehyden mittels TEMPO (Katalysator), Bromid (Co-Katalysator) und Hypochlorit (stöchiometrisches Oxidationsmittel).^[114]

Zunächst oxidiert Hypochlorit Bromid zu Hypobromit. Die Instabilität von Hypobromit erfordert eine niedrige Reaktionstemperatur um $0^\circ C$. Das TEMPO-Radikal wird nun von Hypobromit zum Oxoammonium-Salz oxidiert. Als solches tritt es dann als primäres Oxidationsmittel für die Oxidation des Substrats zum Aldehyd auf und wird selbst zum Hydroxylamin reduziert. Dieses wird von Hypobromit, welches von Hypochlorit regeneriert wird, wieder zum Oxoammonium-Salz oxidiert.^[114–116] Für die Reaktion wird in der Regel ein Zwei-Phasen-System (DCM/Wasser) verwendet, wobei die eigentliche Oxidation des Alkohols in der organischen Phase stattfindet. Die Oxidation stark hydrophiler Substanzen, wie Zuckern, kann unter diesen Bedingungen nicht stattfinden. Hier werden rein wässrige Systeme oder Phasen-Transfer-Katalysatoren genutzt. Allerdings beschleunigen Phasen-Transfer-Katalysatoren die Überoxidation zur Säure, welche grundsätzlich eine Nebenreaktion der TEMPO-Oxidation darstellt. Sie wird jedoch nicht von TEMPO katalysiert, sondern kann bei starken Oxidationsmitteln von diesen direkt durchgeführt werden. Stattdessen hilft TEMPO sogar, die Überoxidation zu unterdrücken, da es überschüssiges Oxidationsmittel abfängt. Eine weitere Nebenreaktion bei der Verwendung von Hypochlorit ist die Chlorierung von Alkenen. Hier entwickelte ZHAO^[117] eine alterna-

tive Variante, die auf Chlorit in stöchiometrischen und Hypochlorit in katalytischen Mengen setzt. Auch die Chlorierung kann durch TEMPO unterdrückt werden, weshalb nicht selten auch stöchiometrische Mengen TEMPO eingesetzt werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der pH-Wert der Reaktion. Beim nativen pH-Wert wässriger Hypochlorit-Lösung (pH 12.7) ist die TEMPO-Oxidation nur sehr langsam. Mit Hydrogencarbonat wird auf pH 8.6 gepuffert um die optimale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen. Im Säuren sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit ebenfalls, da für die Deprotonierung im Übergangszustand eine externe Base nötig ist, während im Basischen die Deprotonierung intermolekular erfolgt (Abb. 3).^[114,116] Zudem kann Hypochlorit bei saurem pH Chlor freisetzen.

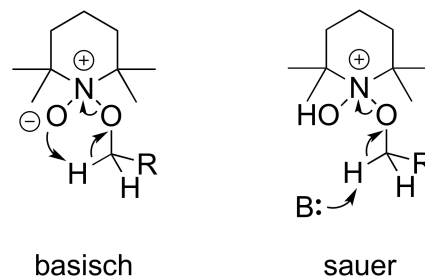


Abb. 3: Übergangszustand der TEMPO-Oxidation bei basischem und saurem pH-Wert.^[114,116]

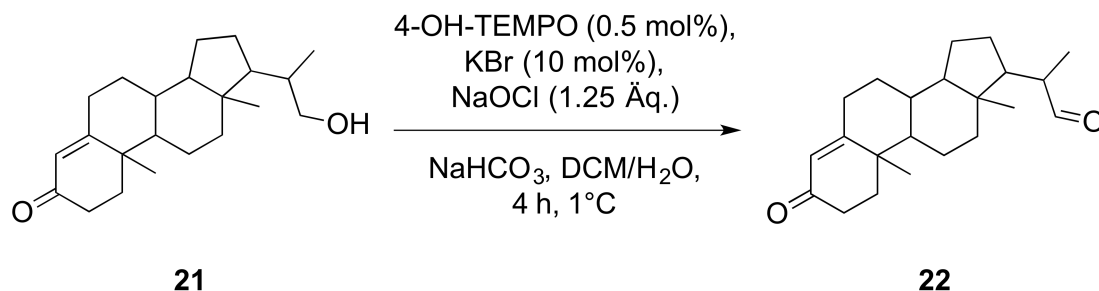
TEMPO wird durch Kondensation von Aceton und Ammoniak hergestellt.^[118] Es entsteht zunächst 4-Oxo-TEMPO (Triacetonamin), welches zu TEMPO reduziert wird. Aus 4-Oxo-TEMPO können eine Reihe weiterer TEMPO-Derivate, wie 4-Hydroxy-, 4-Methoxy- oder 4-Acetamido-TEMPO synthetisiert werden, die günstiger sind (3 \$ kg⁻¹ vs. 80-100 \$ kg⁻¹) und ggf. andere Reaktivitäten aufweisen.^[119]

Die Selektivität der TEMPO-Oxidation für primäre Alkohole ist v.a. auf die, dem Radikal benachbarten Methylgruppen zurückzuführen. Durch die so entstehende sterische Abschirmung kann es nur langsam mit sekundären Alkoholen reagieren. Ein weniger sterisch anspruchsvolles Radikal, das auch sekundäre Alkohole reduziert ist ABNO (s.o.).

Wegen des hohen Preises ist eine Rezyklisierung des Katalysators wünschenswert. Während azeotrope Destillation zwar möglich, aber relativ kostspielig ist, werden v.a. verschiedene Adsorptionsverfahren an hydrophoben Materialien eingesetzt. Eine interessante Alternative stellen immobilisierte Nitroxyl-Radikale dar. Gerade Polymer-immobilisiertes Piperidinyloxyl (PIPO) wird aufgrund seines hohen Molekulargewichts (3000 g mol⁻¹) und der damit verbundenen, einfachen Rezyklisierbarkeit durch Abdestillieren des Produkts oder Ultrafiltration des Katalysators, häufig verwendet.^[120,121]

Industriell wird die TEMPO-Oxidation mit Hypochlorit v.a. in der Spezial- und Feinchemie eingesetzt. In der Bulkchemie hat es sich bisher aufgrund der relativ hohen Kosten für

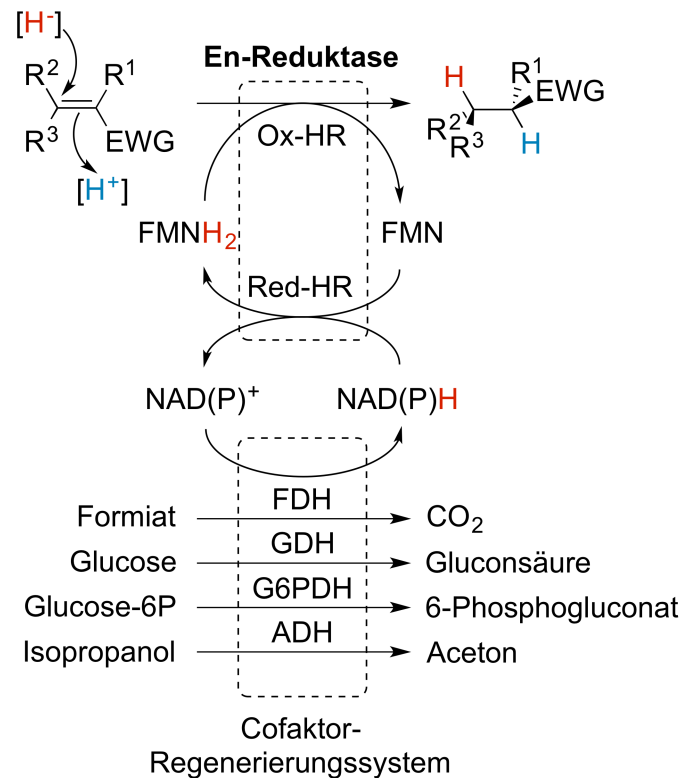
Katalysator und Oxidationsmittel, sowie der Notwendigkeit Bromid und chlorierte Lösungsmittel einsetzen zu müssen, nicht durchsetzen können.^[119,122–124] Das bekannteste industrielle Verfahren, ist die von Upjohn Co. USA (heute Pfizer) entwickelte Oxidation von Bisnoralkohol (**21**) zu Bisnoraldehyd (**22**), einer Vorstufe der Progesteron-Synthese. Statt TEMPO wird das kostengünstigere 4-Hydroxy-TEMPO verwendet (Schema 12).^[125]



Schema 12: Synthese von Bisnoraldehyd (**22**) aus Bisnoralkohol (**21**) nach Upjohn Co. USA.^[125]

2.3 Enzymatische Reduktion aktivierter Doppelbindungen

Die enzymatische Reduktion von C=C-Bindungen wird von der Enzymklasse der En-Reduktasen (ER) katalysiert, die erstmals 1932 von WARBURG^[126,127] als *Old Yellow Enzyme* (OYE) beschrieben wurden. Wie sich später herausstellte ist die gelbe Farbe auf das im Enzym gebundene und an der Wasserstoffübertragung beteiligte Flavinmononukleotid (FMN) zurückzuführen.^[128–130] Die Reaktion wird gemein hin, bezogen auf das Enzym, in eine oxidative und eine reduktive Halbreaktion unterteilt (Schema 13). In der oxidativen Hälfte findet die Reduktion des Substrats und die Oxidation von FMNH₂ zu FMN statt. Die reduktive Hälfte beinhaltet die Regeneration von FADH₂ (Flavinadenin-dinukleotid) durch den externen Cofaktor NAD(P)H, welcher seinerseits zu NAD(P)⁺ oxidiert wird.^[131–133] Aufgrund der hohen Kosten des Cofaktors, wird dieser üblicherweise unter Verbrauch eines weniger teuren Reduktionsmittels regeneriert. Es kommen unterschiedliche enzymgekoppelte Verfahren zum Einsatz. Formiatdehydrogenase (FDH) oxidiert Ameisensäure (Formiat) zu Kohlendioxid (CO₂). Glucosedehydrogenase (GDH) und Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G6PDH) hingegen nutzen Glucose oder Glucose-6-phosphat als Substrat und oxidieren sie zum jeweiligen Lacton, welches sich anschließend zur Säure öffnet. Durch Neutralisation wird die Rückreaktion unterbunden und die gesamte Reaktion irreversibel. Auch die Kopplung mit einer Alkoholdehydrogenase (ADH) ist möglich. In diesem Fall oxidiert die ADH z.B. Isopropanol zu Aceton.



Schema 13: Prinzip der Reduktion aktivierter Doppelbindungen durch En-Reduktasen.^[131,133]

En-Reduktasen setzen eine, durch eine elektronenziehende Gruppe aktivierte Doppelbindung voraus. Nicht aktivierte Doppelbindungen werden nicht akzeptiert. Substrate, für die ERs höchste Aktivität zeigen umfassen v.a. α,β-ungesättigte Aldehyde^[134–136], Ketone und Nitro-Verbindungen^[137,138]. Ester, freie Säuren und Nitrile benötigen in der Regel zusätzliche aktivierende Gruppen.

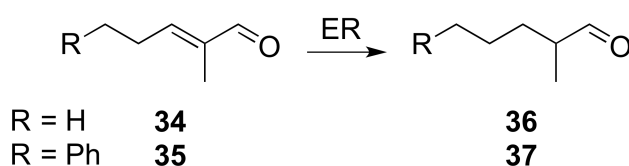
Der Mechanismus der Reaktion wurde intensiv untersucht und die Struktur der OYE^[139,140], sowie die Rolle aller an der Katalyse beteiligten Aminosäuren umfassend aufgeklärt.^[141–144] Es wird ein Hydrid des FMNH₂ in einer Michael-artigen Addition auf das β-Kohlenstoffatom übertragen (Schema 14).

Das α-Kohlenstoffatom wird parallel vom benachbarten Tyrosin-196 (Tyr196) protoniert und so die entstehende negative Ladung neutralisiert. Das Substrat wird im aktiven Zentrum von Histidin-191 (His191) und Asparagin-194 (Asn194), die außerdem die Aufgabe haben, das Michael-System zu aktivieren, so orientiert, dass der Hydridtransfer von der einen und die Protonierung von der anderen Seite der Doppelbindung stattfindet. Somit handelt es sich stets um eine *anti*-Addition und es entsteht das *trans*-Produkt. Befinden sich Substituenten (nicht H) an α- und β-Position, können in einem Schritt zwei Stereozentren erzeugt werden.

Außerdem wurden Sulcaton (**31**), das Produkt einer Citral-Lyase-Reaktion und dessen reduzierte Form Sulcatol (**32**), sowie Geranium- ((*E*)-**33**) und Nerolsäure ((*Z*)-**33**), die durch Oxidation der Aldehyde entstanden, beobachtet.^[134,135]

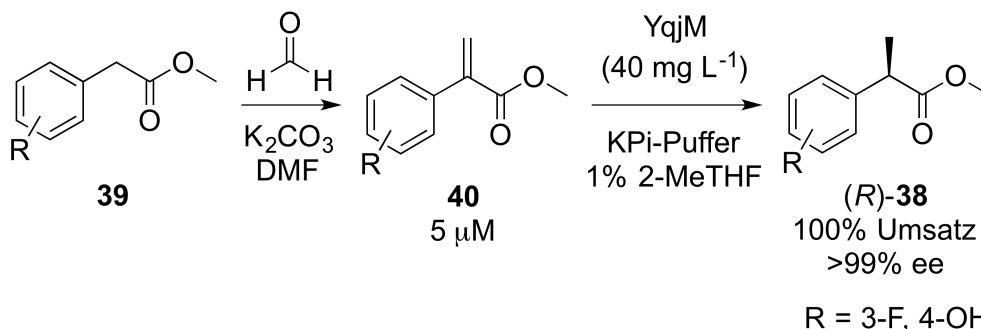
Für α -substituierte Enale, wie 2-Methyl-2-pentenal (**34**) zeigten OPR1 und 3, YqjM nur schlechte bis moderate Stereoselektivitäten. Ein inhärentes Problem dieser Verbindungen im Gegensatz zu β -substituierten Enalen ist die Möglichkeit der Racemisierung, welche von manchen En-Reduktasen katalysiert zu werden scheint. Ähnliches ist auch für die entsprechenden Nitro-Verbindungen bekannt.^[137] Hingegen konnten für OYE1-3 perfekte (>99% ee) und für NCR und PETNR gute (*S*)-Selektivitäten (~70% ee) erzielt werden. In einigen Fällen wurde eine Umkehr der Selektivität beim Wechsel von β - zu α -substituierten Enalen beobachtet. Bemerkenswert ist auch, dass OYE1-3 und NCR für 3-Phenyl-2-methyl-2-propenal (**35**), sich nur durch einen Aryl- statt Ethyl-Rest von **34** unterscheidend, hoch (*R*)-selektiv waren (Tab. 2).^[151,152,156,157]

Tab. 2: Selektivitäten verschiedener En-Reduktasen gegenüber α -substituierten Enalen.



Eintrag	R =	Substratkonz. [mM]	En-Reduktase	Enzymmenge [g L ⁻¹]	Selektivität [%]
1	H	5	OPR1	k.A.	47 (<i>R</i>) ^[152]
2	H	5	OPR3	k.A.	19 (<i>S</i>) ^[152]
3	H	5	YqjM	k.A.	10 (<i>R</i>) ^[152]
4	H	20	OYE1	1.50	>95 (<i>S</i>) ^[156]
5	Ph	20	OYE1	1.50	~80 (<i>R</i>) ^[156]
6	H	20	OYE2	1.50	>95 (<i>S</i>) ^[156]
7	Ph	20	OYE2	1.50	~75 (<i>R</i>) ^[156]
8	H	20	OYE3	1.50	>95 (<i>S</i>) ^[156]
9	Ph	20	OYE3	1.50	~70 (<i>R</i>) ^[156]
10	H	20	NCR	1.50	~80 (<i>S</i>) ^[156]
11	Ph	20	NCR	1.50	~45 (<i>R</i>) ^[156]
12	H	5	PETNR	0.08	66 (<i>S</i>) ^[151]

PIETRUSZKA^[158] entwickelte eine Synthese von (*R*)-2-(3-Fluor-4-hydroxyphenyl)propansäuremethylester ((*R*)-**38**) einer Vorstufe von (*R*)-Flurbiprofen, des einzigen (*R*)-Profens, das eine pharmazeutische Wirkung aufweist. Es wurde eine Aldolkondensation von 2-(3-Fluor-4-hydroxyphenyl)essigsäuremethylester (**39**) mit Formaldehyd zu 2-(3-Fluor-4-hydroxyphenyl)acrylsäuremethylester (**40**) sequenziell mit einer enzymatischen C=C-Reduktion durch die En-Reduktase YqjM kombiniert. Es konnte ein quantitativer Umsatz zu (*R*)-**38** mit >99% ee erreicht werden (Schema 18). μ



Schema 18: Sequenzielle Kombination von Aldolkondensation und enzymatischer C=C-Reduktion in der Synthese von (*R*)-2-(3-Fluor-4-hydroxyphenyl)propansäuremethylester ((*R*)-**38**).^[158]

2.4 Enzymatische Reduktion von Aldehyden

Da die enzymatische Reduktion von Aldehyden im Gegensatz zu Ketonen kein Stereozentrum erzeugt und damit die Stereoselektivität als Hauptanreiz für den Einsatz von Biokatalysatoren wegfällt, sind nur wenige Beispiele für die präparative Nutzung dieser Biotransformation bekannt. Die Tatsache, dass Alkoholdehydrogenasen auch in der Lage sind Aldehyde, die im Gegensatz zu Ketonen aufgrund des fehlenden induktiven Effekts eines Alkylrests sogar eine höhere Reaktivität aufweisen, umzusetzen, ist lange bekannt. Vor allem kommerziell erhältliche Enzyme wie die YADH (*yeast alcohol dehydrogenase*) oder HLADH (*horse liver alcohol dehydrogenase*) können hierfür eingesetzt werden.^[133]

Die Gruppe der Alkoholdehydrogenasen (ADHs) ist divers und weist teilweise <40% Sequenzübereinstimmung untereinander auf. Aufgrund dessen lässt sie sich weiter in Aldo-Keto-Reduktasen (AKR), *Medium-Chain Dehydrogenases/Reductases* (MDR) und *Short-Chain Dehydrogenases/Reductases* (SDR) unterteilen. Gemeinsam haben die Untergruppen, dass die Protonierung/Deprotonierung entweder von einem Tyrosin-Rest oder direkt von Wasser erfolgt. Viele ADHs sind abhängig von Zn^{2+} , welches an der Aktivierung der Carbonylgruppe beteiligt ist. Ähnlich der ER-katalysierten C=C-Reduktion

wird ein Hydrid von NADPH und ein Proton benötigt. Exemplarisch ist in Abb. 4 der Mechanismus einer Zimtaldehyd-Dehydrogenase dargestellt, bei der die Protonierung ausgehend von Threonin-49 (Thr49) erfolgt. Die Reprotonierung des Thr49 geschieht über eine Kaskade von Wasserstoffbrücken von einem Wassermolekül des Lösungsmittels. Die Triebkraft der Reaktion ist die Aromatisierung des Cofaktors. Durch das entstehende Kation bleibt die Möglichkeit der Rückreaktion jedoch erhalten.^[132,159–162]

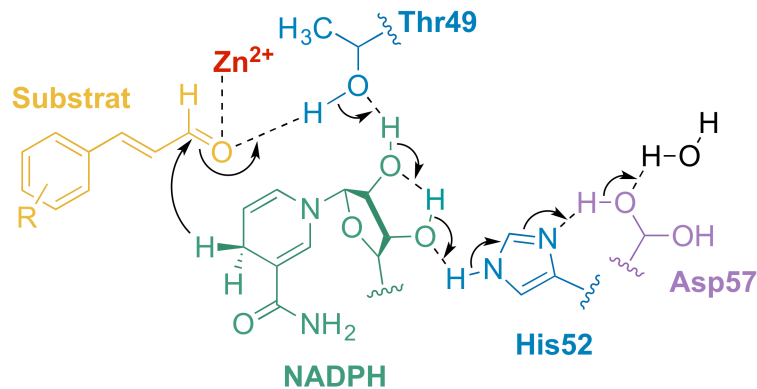


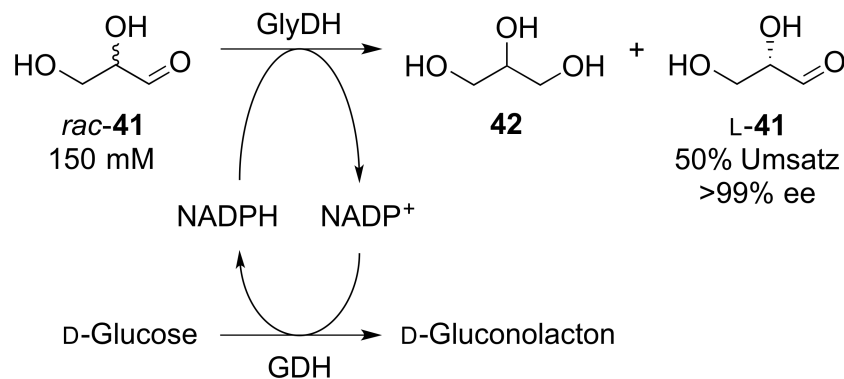
Abb. 4: Mechanismus der enzymatischen C=O-Reduktion einer Zn^{2+} -abhängigen Zimtaldehyd-Alkoholdehydrogenasen.^[161,162]

Aus Kostengründen muss ähnlich den En-Reduktasen der Cofaktor regeneriert werden. Zusätzlich zu den in Abschnitt 2.3 bereits erwähnten Verfahren, kommt für die ADHs die Substratgekoppelte Variante hinzu, wobei dieselbe ADH das stöchiometrische Reduktionsmittel (z.B. Isopropanol) oxidiert und das Substrat reduziert. Der entscheidende Vorteil ist, dass kein zweites Enzym benötigt wird. Da ADH-katalysierte Reaktionen reversibel sind, kann das Regenerierungssystem auch dazu verwendet werden, das Gleichgewicht in Richtung der Produkte zu verschieben. Im Falle der substratgekoppelten Regenerierung mit Isopropanol wird zum einen ein großer Überschuss des Reduktionsmittels und zum anderen die Flüchtigkeit des Produkts Aceton durch ein sog. *in situ product removal* genutzt.^[132,133]

Da Aldehyde insbesondere für die Duft- und Aromastoff-Industrie relevant sind, sind biokatalytische Teilschritte hier besonders häufig anzutreffen.^[163] Als Substrate dienen beispielsweise aliphatische Aldehyde, wie 3-Hexenal^[164], und aromatische Aldehyde, wie 2-Phenylethanal^[165] und Zimtaldehyd^[166]. Trotz der Tatsache, dass kein Stereozentrum bei der C=O-Reduktion von Aldehyden erzeugt wird, kann die ADH dennoch selektiv für die Konfiguration am α -Kohlenstoffatom sein und für eine Racematspaltung genutzt werden. Es können Prozesse unterschieden werden, bei denen entweder der zurückbleibende Aldehyd oder aber der entstehende Alkohol das gewünschte Produkt darstellt. Im ersten Fall ist ein vollständiger Umsatz nur über Reoxidation des Alkohols möglich. Voll-

ständiger Umsatz zum enantiomerenreinen Alkohol kann hingegen in Form einer dynamisch-kinetischen Racematspaltung (DKR) durch *in situ* Racemisierung erreicht werden.^[132]

Ein von RICHTER^[167] entwickeltes Verfahren nutzt eine Glycerin-Dehydrogenase (GlyDH) aus *Gluconobacter oxydans* für die Racematspaltung von *rac*-Glyceraldehyd (*rac*-**41**) in Kombination mit einem GDH/D-Glucose-Cofaktorregenerierungssystem. Nur D-Glyceraldehyd (D-**41**) wird umgesetzt und es entsteht achirales Glycerin (**42**). Das zurückbleibende L-Glyceraldehyd (L-**41**) konnte bei einem Umsatz von 50% mit >99% ee erhalten werden (Schema 19).

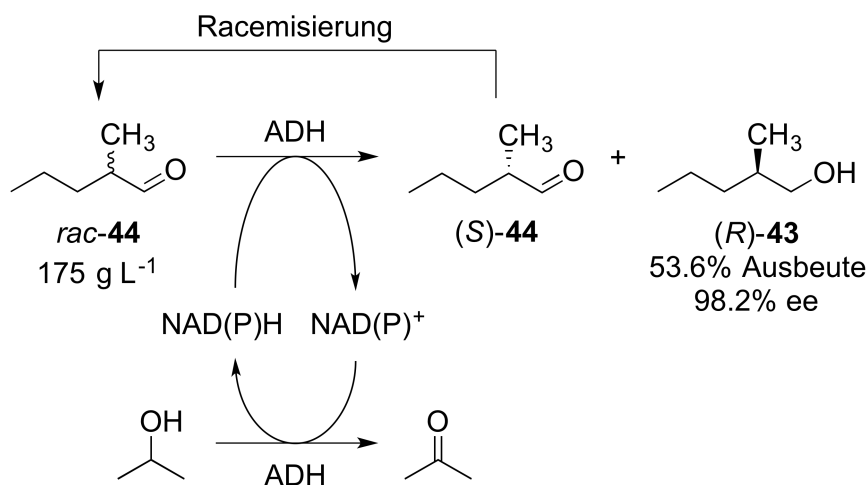


Schema 19: Synthese von L-Glyceraldehyd (L-**41**) durch Racematspaltung.^[167]

Codexis, Inc. entwickelte einen ähnlichen Prozess zur Synthese von (*R*)-2-Methylpentanol ((*R*)-**43**) ausgehend von *rac*-2-Methylvaleraldehyd (*rac*-**44**). Die optimierte ADH aus *Lactobacillus kefir* reduzierte selektiv nur (*R*)-**44**. Eine Dynamisch-kinetische Racematspaltung (DKR) war aufgrund des dafür nötigen hohen pH-Werts nicht realisierbar und der Umsatz damit auf 50% beschränkt. Allerdings wurde eine elegante Methode entwickelt, um (*R*)-**43** von (*S*)-**44** abzutrennen und letzteres anschließend zu racemisieren und zurückzuführen. Hierzu wurde die Reaktion von Natriumbisulfid mit ungehinderten Aldehyden ausgenutzt. Es bildet sich ein Hydroxyalkylsulfonat-Ion, das im Gegensatz zum zurückbleibenden Alkohol, wasserlöslich ist. Der Cofaktor wurde substratgekoppelt mit Isopropanol als stöchiometrisches Reduktionsmittel regeneriert. Der Prozess wurde bis zu einer Substratmassenkonzentration von ~175 g L⁻¹ in einer 2 m³-Pilotanlage skaliert und erreichte eine Ausbeute von 96.4 kg (*R*)-**43** (53.6% Ausbeute, basierend auf max. 50% Umsatz) und 98.2% ee (Schema 20).^[168]

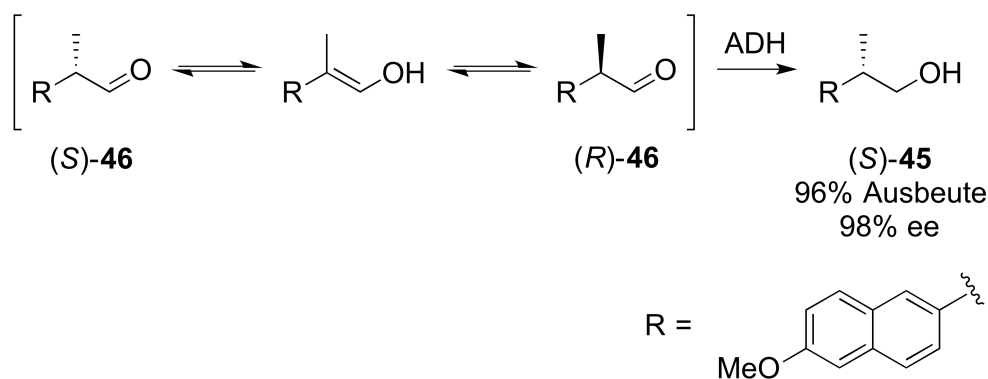
Auch (*S*)-Profenole, die wichtige Vorstufen von Arzneimitteln wie Naproxen, Ibuprofen und Ketoprofen darstellen, konnten mithilfe einer ADH-katalysierten DKR aus den entsprechenden 2-Arylpropionaldehyden hergestellt werden. Die aus einer Buchwald-Hart-

wig-Kupplung mit anschließender Reduktion synthetisierten racemischen Substrate wurden mit HLADH oder einer ADH aus *Sulfolobus sulfataricus* zum entsprechenden (S)-Alkohol reduziert.



Schema 20: Synthese von (R)-43 durch Racematspaltung von *rac*-2-Methylvaleraldehyd (*rac*-44).^[168]

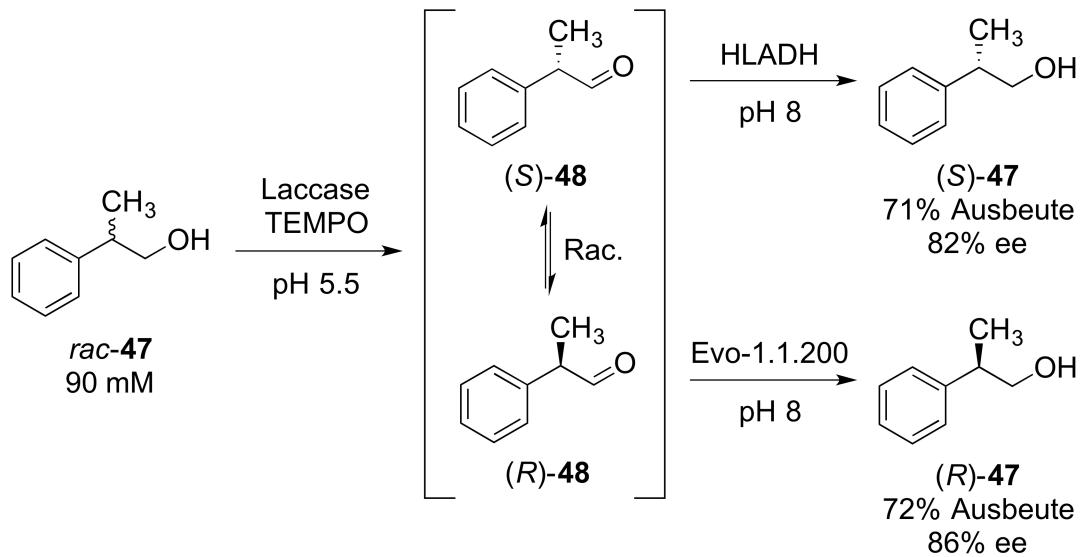
Da 2-Arylpropionaldehyde im Gegensatz zu rein aliphatischen Substraten, aufgrund der Konjugation der Enol-Form mit dem aromatischen System, auch schon bei neutralem pH racemisieren, konnte die Reaktion ohne Zusatz eines Racemisierungskatalysators als DKR durchgeführt werden. So wurde beispielsweise (S)-2-(6-Methoxynaphthalen-2-yl)-1-propanol ((S)-45), das Profenol des Naproxens, aus dem racemischen Aldehyd (*rac*-46) in einer Ausbeute von 96% mit 98% ee erhalten (Schema 21).^[169–171]



Schema 21: Dynamisch-kinetische Racematspaltung zum (S)-Profenol des Naproxens ((S)-45).^[171]

Ein Verfahren zur Deracemisierung von *rac*-2-Phenyl-1-propanol (*rac*-47), einem Profenol-Modellsubstrat, entwickelte DÍAZ-RODRÍGUEZ^[172] indem eine unselektive, Lac-case/ TEMPO-katalysierte Oxidation^[109] zum racemisierenden 2-Phenylpropanal (48) mit einer selektiven Reduktion in einem sequentiellen Eintopfverfahren kombiniert

wurde. Eine parallele Reaktion war aufgrund der unterschiedlichen, optimalen pH-Werte der Enzyme nicht realisierbar. (*S*)- und (*R*)-**47** wurden mithilfe der HLADH und Evo-1.1.200 in Ausbeuten von 71 und 72%, sowie ee-Werten von 82 und 86% erhalten (Schema 22). Als Nebenprodukte entstanden durch Überoxidation die Säure und bei der C=O-Reduktion Acetophenon, was ein bekanntes Problem dieser Verbindungsklasse darstellt.^[170,173,174] Weiterhin zeigten komplexere Strukturen wie Ibuprofenol und Naproxenol eine schlechte Löslichkeit und eine erhöhte Tendenz zu Überoxidation.

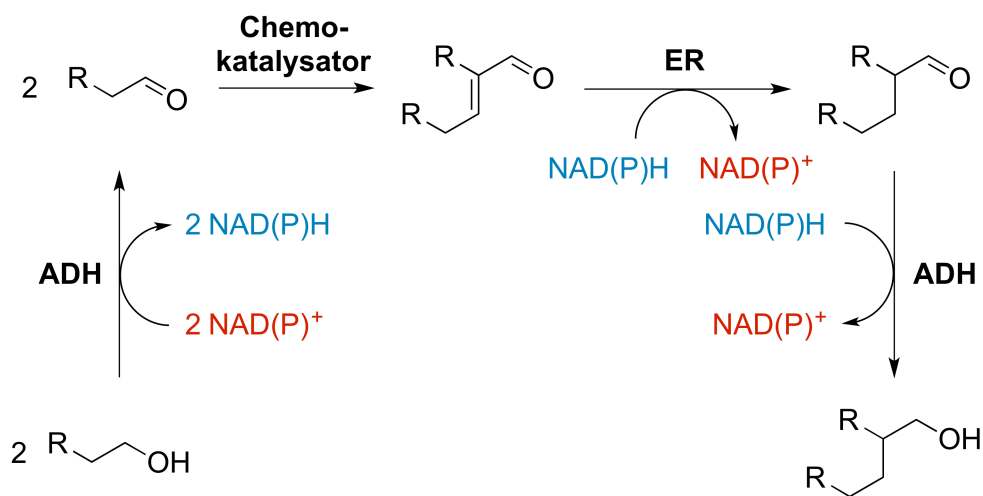


Schema 22: Deracemisierung von 2-Phenyl-1-propanol (**47**) durch Kombination von Laccase/TEMPO-katalysierter Oxidation, Racemisierung und enantioselektiver Reduktion in einer sequenziellen Eintopfreaktion.^[172]

3 Motivation und Zielsetzung

Die Guerbet-Reaktion kommt industriell in großem Maßstab vor allem für kürzere Alkohole bzw. in abgewandelter Form auch für Butanal zum Einsatz. Allerdings ist die Reaktion mit niedrigen Umsätzen und Selektivitäten bei hohen Temperaturen und teilweise erhöhten Wasserstoffdrücken unter Einsatz komplexer Übergangsmetallkatalysatoren verbunden. Aufwendige Aufbereitungsverfahren über mehrstufige Destillationen erhöhen insbesondere für die länger-kettigen Alkohole die Produktionskosten. In Anbetracht der Fortschritte in der fermentativen Produktion linearer, primärer Alkohole, die in Zukunft aufgrund der steigenden Nachfrage nach bio-basierten Kraftstoffen weiter an Bedeutung gewinnen wird, wäre eine chemoenzymatische Guerbet-Reaktion die konsequente Entwicklung hin zu nachhaltigeren Schmierstoffen, Weichmachern und Waschmitteln, Produkte, die bisher fast ausschließlich auf fossilen Rohstoffen basieren. Auch als Zusatz zu Treibstoffen werden Guerbet-Alkohole wichtiger, da sie eine höhere Energiedichte besitzen als niedermolekulare Alkohole, aufgrund ihrer Struktur aber ähnliche Fluiditätseigenschaften aufweisen.

Eine chemoenzymatische Variante der Guerbet-Reaktion könnte dem Reaktionsmechanismus der klassischen Variante (Abschnitt 2.1) folgen (Schema 23). Beginnend mit der enzymatischen Oxidation des primären, linearen Alkohols zum korrespondierenden Aldehyd, schließt sich die chemokatalytische Aldolkondensation zum α -verzweigten, α,β -ungesättigten Aldehyd an. Dieser wird hiernach, mithilfe enzymatischer C=C- und C=O-Reduktionen vollständig zum Guerbet-Alkohol reduziert.



Schema 23: Konzept einer chemoenzymatischen Guerbet-Reaktion (ADH = Alkoholdehydrogenase, ER = En-Reduktase).

Die Reaktion wäre Redox-neutral, da die im ersten Schritt aus zwei Oxidationen entstehenden Reduktionsäquivalente in den beiden finalen Biotransformationen wieder verbraucht und die Oxidationsäquivalente für den ersten Schritt regeneriert werden würden. Ziel ist ein chemoenzymatischer Prozess, der in wässrigem Solvens bei Raumtemperatur und Umgebungsdruck mit quantitativen Umsätzen und hohen Selektivitäten zu den gewünschten Guerbet-Alkoholen führt und damit sowohl wirtschaftlich, als auch ökologisch eine Alternative zu aktuellen Prozessen darstellt.

Die Entwicklung des Prozesses beginnt mit der Untersuchung der individuellen Reaktionen und diskutiert im Fall der Alkohol-Oxidation eine alternatives, nicht-enzymatisches Verfahren (Abschnitt 4.2.2). Am Beispiel der En-Reduktase werden Methoden zur statistischen Versuchsplanung (Abschnitt 4.5.1) und Enzymimmobilisierung (Abschnitt 4.5.2) angewandt. Es folgt die Kombination der Alkohol-Oxidation und Aldolkondensation, sowie die der Biotransformationen zunächst mit isolierten Enzymen (Abschnitt 4.7.2) und im weiteren Verlauf in Form eines Ganzzellkatalysators (Abschnitt 4.7.3). Abschließend werden alle Schritte zu einem Gesamtprozess vereint (Abschnitt 4.8.2) und Möglichkeiten zur Optimierung der Kombination, sowie ökologische Aspekte (Abschnitt 4.8.3) des Prozesses erörtert (Abb. 5).

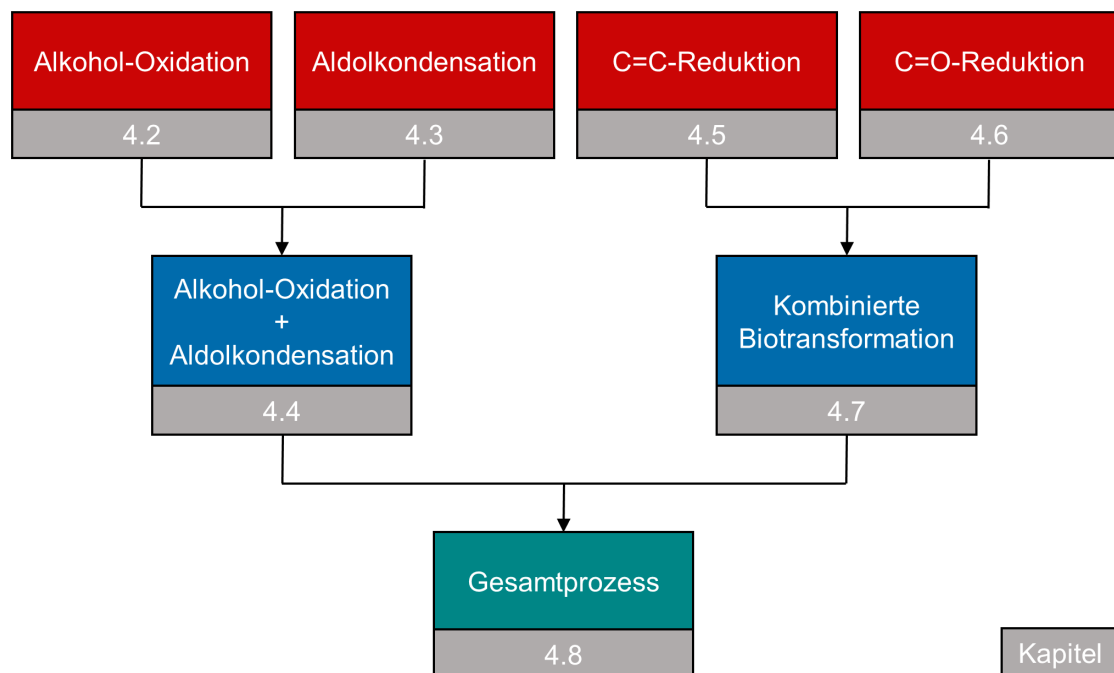


Abb. 5: Entwicklung des Prozesses von den individuellen (rot), über kombinierte Reaktionen (blau), hin zum Gesamtprozess (grün).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Substratsynthese, einleitende Versuche und Analytik

4.1.1 Wahl des Modellsubstrats

Für alle Reaktionen werden Substrate und Produkte als Referenzverbindungen benötigt. Auch Referenzen etwaiger Nebenprodukte müssen zur Verfügung stehen. Ihre Synthese wird in den Abschnitten 4.2.2.2 und 4.7.1.2 beschrieben. Grundsätzlich ist es sinnvoll, sich zunächst auf ein Modellsubstrat zu konzentrieren und ausgehend von diesem, die Reaktionen zu entwickeln. Eine Erweiterung des Substratspektrums kann darauf aufbauend in einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium auf Basis eines weitgehend optimierten Prozesses erfolgen.

Als Modellverbindung kommen grundsätzlich alle langkettigen, aliphatischen, primären Alkohole mit einer geraden Anzahl Kohlenstoffatome in Frage. Da sowohl die natürliche, als auch die industrielle Synthese weitestgehend auf C2-Bausteinen (Acetyl-CoA bzw. Ethylen) basiert, spielen Alkohole mit ungerader Kohlenstoffanzahl kaum eine Rolle. Für alle Reaktionen wurden die C6/12-Substrate und -Intermediate ausgehend von 1-Hexanol (**17**) verwendet. Sie sind wenig flüchtig, was Substanzverlust während der Reaktion verringert und weisen dennoch eine ausreichende Löslichkeit in Wasser auf, wodurch eine ausreichende Reaktionsgeschwindigkeit gewährleistet wird. Innerhalb einer Substanzklasse haben die Verbindungen höherer Molekulargewichte zwar einen höheren Siedepunkt, jedoch auch eine niedrigere Löslichkeit in Wasser. Die einzige, aber kritische Stufe bezüglich der Flüchtigkeit stellt die erste Aldehyd-Stufe dar. Die Siedepunkte von Butanal (**14**), Hexanal (**49**), Octanal (**20**) und Decanal (**50**) sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Siedepunkte und Löslichkeiten aliphatischer Aldehyde.^[175]

Aldehyd	Siedepunkt [°C]	Löslichkeit in Wasser [g L⁻¹] ([mM])
Butanal (14)	75	37.0 (514)
Hexanal (49)	129	6.0 (60)
Octanal (20)	171	0.21 (1.70)
Decanal (50)	220	0.048 (0.30)

Vor allem Butanal (**14**) hat mit 75°C einen sehr niedrigen Siedepunkt, was Probleme bei der Reaktionsführung hervorrufen kann, da während der Reaktion oder bei Entfernen des organischen Lösungsmittels nach der Extraktion signifikante Mengen verdampfen könnten. Die Löslichkeit der Verbindungen kann insofern ein Problem darstellen, als dass sie für eine enzymatische Reaktion zu mindest teilweise gelöst sein müssen. In Tab. 3 sind exemplarisch die Löslichkeiten der ersten Aldehyd-Stufen dargestellt. Die Löslichkeit höherer Kondensationsprodukte in Wasser liegen bei <1 mM (Tab. 4).

Tab. 4: Löslichkeiten der höheren Kondensationsprodukte.

Verbindung	Löslichkeit in Wasser^a [g L ⁻¹] ([mM])
2-Butyl-2-octenal (51)	0.13 (0.71)
2-Butyloctanal (52)	0.04 (0.21)
2-Butyl-1-octanol (53)	0.013 (0.071)

^a berechnet mit *ACD/Labs* Software.

Zwar genügt prinzipiell eine geringe Restlöslichkeit, da nach dem Umsatz eines Substratmoleküls ein neues nachgelöst werden kann, jedoch ist für die maximale Aktivität im Sättigungsbereich der Enzymkinetik eine Konzentration etwa zehnmal höher als der K_m -Wert nötig. Gelöste Substratkonzentrationen von 5-10 mM sind vorteilhaft. Durch den Einsatz von organischem Cosolvens lässt sich diese Konzentration in der Regel auch für schwerlösliche Substanzen erreichen, sodass sich diese Einschränkung im Gegensatz zur Flüchtigkeit relativ leicht umgehen lässt. Dennoch sollte eine sterisch nicht allzu komplexe Verbindung gewählt werden, da sie von Enzymen üblicherweise besser akzeptiert werden.

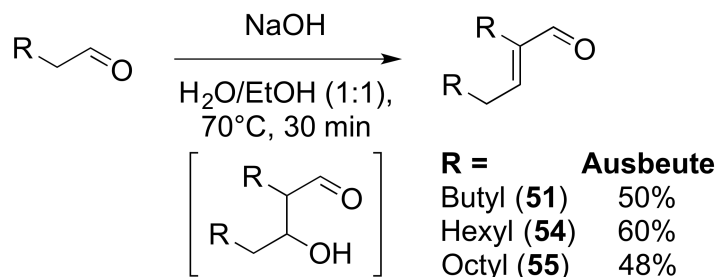
4.1.2 Synthese von Substraten und Referenzverbindungen

4.1.2.1 Homo-Aldolkondensation aliphatischer Aldehyde zu α,β -ungesättigten, verzweigten Aldehyden

Durch die Homo-Aldolkondensation zweier langkettiger, aliphatischer Aldehyde wird die für Guerbet-Alkohole charakteristische Verzweigung erzeugt. Es entsteht ein α -verzweigter, α,β -ungesättigter Aldehyd (Enal).

Der Aldehyd wurde nach einer Vorschrift von ROBERT^[176] in wässrig-ethanolischer Natriumhydroxid-Lösung für 30 min bei 70°C erhitzt (Schema 24). Hierbei wird zunächst ein Molekül Aldehyd in der α -Position deprotoniert, wobei die entstehende negative Ladung

über das Enolat mesomeriestabilisiert ist. Ein nucleophiler Angriff am Carbonylkohlenstoff eines zweiten Moleküls Aldehyd mit anschließender Reprotonierung liefert zunächst den β -Hydroxyaldehyd. Die erhöhte Reaktionstemperatur fördert die folgende Dehydratisierung zum 2-Alkyl-2-alkenal, welcher nach fraktionierter Hochvakuumdestillation als farblose Flüssigkeit in Ausbeuten von 48-60% erhalten wurde.



Schema 24: Homo-Aldolkondensation aliphatischer Aldehyde zu α -verzweigten Enalen über α -verzweigte β -Hydroxyaldehyde.

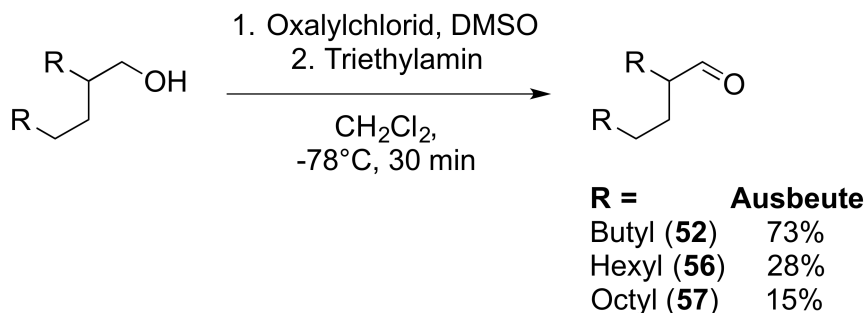
Die für die Eliminierung von Wasser nötige Temperatur begünstigt die Polymerisation insbesondere sterisch ungehinderter Aldehyde, was die moderaten Ausbeuten erklärt. Es wurden keine Reste des β -Hydroxyaldehyds gefunden. Die Reaktion lieferte ein Stereoisomerengemisch mit einem *E/Z*-Verhältnis von etwa 98:2 bis 95:5, wobei das *Z*-Isomer sowohl im NMR, als auch im GC nachweisbar war. Im Folgenden ist, sofern nicht explizit anders beschrieben, stets das Isomerengemisch der Alkenale gemeint.

4.1.2.2 Swern-Oxidation primärer Alkohole zu Aldehyden

Bei der selektiven Oxidation primärer Alkohole zu Aldehyden besteht die Gefahr der Überoxidation zur Säure.^[177] Es gibt verschiedene Reaktionen, bei denen diese unterdrückt wird. Neben der hier verwendeten Swern-Oxidation stehen u.a. die Jones-Oxidation mit Chromaten, die Dess-Martin-Oxidation mit Dess-Martin-Periodan (DMP) oder 2-Iodoxybenzoesäure (IBX), sowie die TEMPO-Oxidation zur Verfügung, wobei letztere mit Natriumhypochlorit (Chlorbleiche) als stöchiometrisches Oxidationsmittel die wohl nachhaltigste Methode darstellt (Abschnitt 2.2). Kommerziell erhältliche Guerbet-Alkohole wurden über eine Swern-Oxidation zu den korrespondierenden Aldehyden oxidiert (Schema 25).

Nach einer Vorschrift von MANCUSO^[96] wurde aus Oxalylchlorid und Dimethylsulfoxid (DMSO) unter Freisetzung von Kohlendioxid und Kohlenmonoxid zunächst ein Dimethylchlorosulfonium-Ion gebildet, welches bei -78°C mit dem Alkohol zum Alkoxysulfonium-Ion reagierte. Unter Zusatz von Triethylamin wurde eine der am Schwefel gebundenen

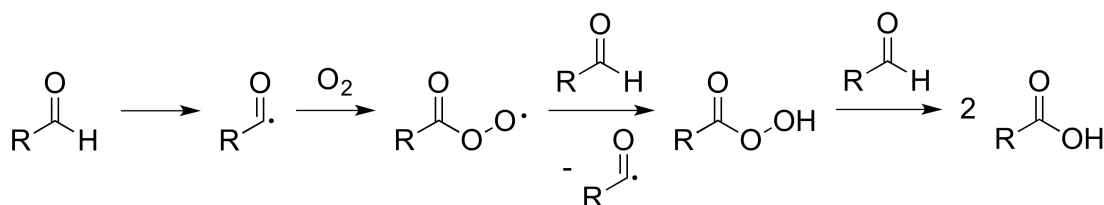
Methylgruppen deprotoniert. Es bildete sich ein Ylid, aus welchem im Anschluss Dimethylsulfid eliminiert wurde.^[95,96] Nach fraktionierter Hochvakuumdestillation wurden die Aldehyde als farblose Flüssigkeiten in Ausbeuten von 15-78% erhalten. Die teilweise niedrigen Ausbeuten v.a. höherer Homologe sind auf die hohen Siedepunkte und damit verbundenen Verlust bei der Destillation zurückzuführen.



Schema 25: Swern-Oxidation von Guerbet-Alkoholen zu den korrespondierenden Aldehyden.

4.1.3 Oxidationsempfindlichkeit von Aldehyden

Aldehyde neigen unter Einfluss von Sauerstoff zur Oxidation und bilden die korrespondierende Säure. Sie verläuft radikalisch über eine Peroxo-Spezies (Schema 26).^[177,178]



Schema 26: Aerobe Oxidation von Aldehyden zu Carbonsäuren.^[177]

Da alle Zwischenprodukte und Intermediate des Prozesses Aldehyde sind, würde eine Oxidation auf einer dieser Stufen jedwede Reaktion zum gewünschten Guerbet-Alkohol unterbinden. Carbonsäuren sind weder in der Lage die Aldolkondensation zur verzweigten Verbindung durchzuführen, noch sind sie Substrate für die C=O-Reduktion von Alkoholdehydrogenasen. Zur Quantifizierung der Oxidationsempfindlichkeit wurden Hexanal (**49**), 2-Butyl-2-octenal (**51**) und 2-Butyloctanal (**52**) je als Reinsubstanz, 20 mM wässrige Lösung und 20 mM Lösung in einer 1:1-Mischung von D₂O und CDCl₃ 24 h unter Luftatmosphäre gerührt und zu verschiedenen Zeitpunkten mittels ¹H-NMR der Anteil an Säure bestimmt (Abb. 6). Es ist zu bemerken, dass 2-Butyl-2-octenal (**51**) und 2-Butyloctanal (**52**) nicht zu 20 mM in reinem Wasser löslich sind und es sich daher um Suspensionen handelte.

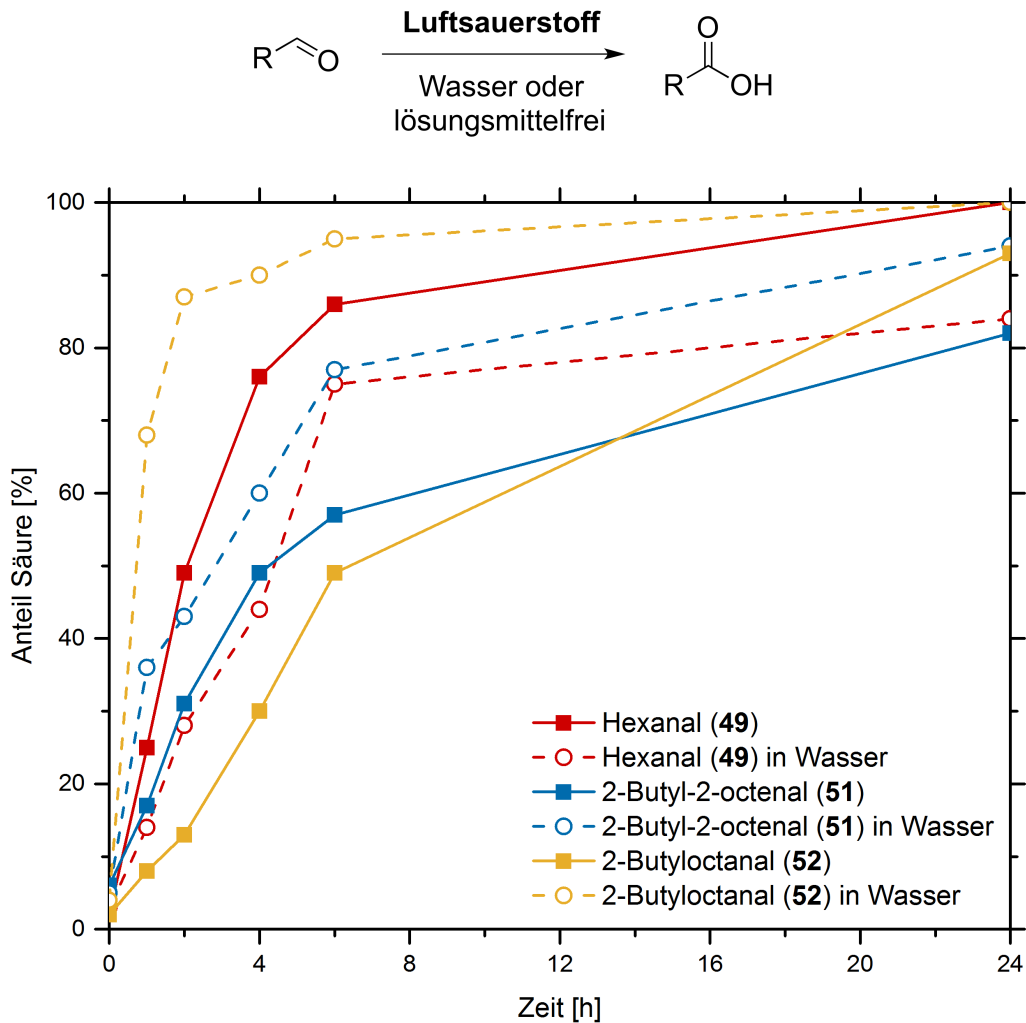


Abb. 6: Oxidationsempfindlichkeit von Hexanal (**49**, rot), 2-Butyl-2-octenal (**51**, blau) und 2-Butyloctanal (**52**, gelb) als Reinsubstanz (durchgängige Linie) und 20 mM in wässriger Lösung (gestrichelte Linie). Die Verbindungslinien dienen lediglich der Visualisierung und stellen keine gemessenen Werte dar.

Als Reinsubstanz reagierten alle drei Aldehyde unter den o.g. Reaktionsbedingungen binnen 24 h annähernd quantitativ zur entsprechenden Säure, wobei Hexanal (**49**) deutlich schneller oxidierte als die anderen beiden Aldehyde. Dies könnte auf die, durch den schwächeren +I-Effekt des Hexanals (**49**) höhere Reaktivität des Radikals zurückzuführen sein. In Wasser erhöhte sich die Oxidationsgeschwindigkeit der hydrophoberen Aldehyde 2-Butyl-2-octenal (**51**) und 2-Butyloctanal (**52**) drastisch. Letzteres war bereits nach 2 h zu 87% oxidiert. Der Zusatz von nicht mit Wasser mischbarem Chloroform unterdrückte die Oxidation aller Aldehyde vollständig (nicht in Abb. 6 dargestellt, siehe Abschnitt 7.3.3). Beide Beobachtungen stehen in Einklang mit den Ergebnissen von SHAPIRO^[177]. Dies hat zur Folge, dass alle Reaktion, bei denen Wasser das alleinige Lösungsmittel ist oder in Kombination mit einem mischbaren, organischen Solvens eingesetzt wurde, unter Sauerstoffausschluss durchgeführt werden mussten. Reaktionen

im Zwei-Phasen-System, bei denen das organische Solvens nur eine geringe Wasserlöslichkeit aufweist, konnten unter Luft stattfinden.

4.1.4 Analytik

Da alle Substrate, Intermediate, sowie Zwischen-, Neben- und Endprodukte des Prozesses zu Guerbet-Alkoholen leicht verdampfbar sind, wurde eine weitgehend gaschromatographische Analytik (GC) gewählt. So konnten in einer einzigen Messung alle relevanten Verbindungen aufgelöst und analysiert werden (Abb. 7, siehe auch Abschnitt 7.1.3.1). Die einzigen gaschromatographisch nicht voneinander trennbaren Substanzen waren der Guerbet-Alkohol und der α,β -ungesättigte Alkohol.

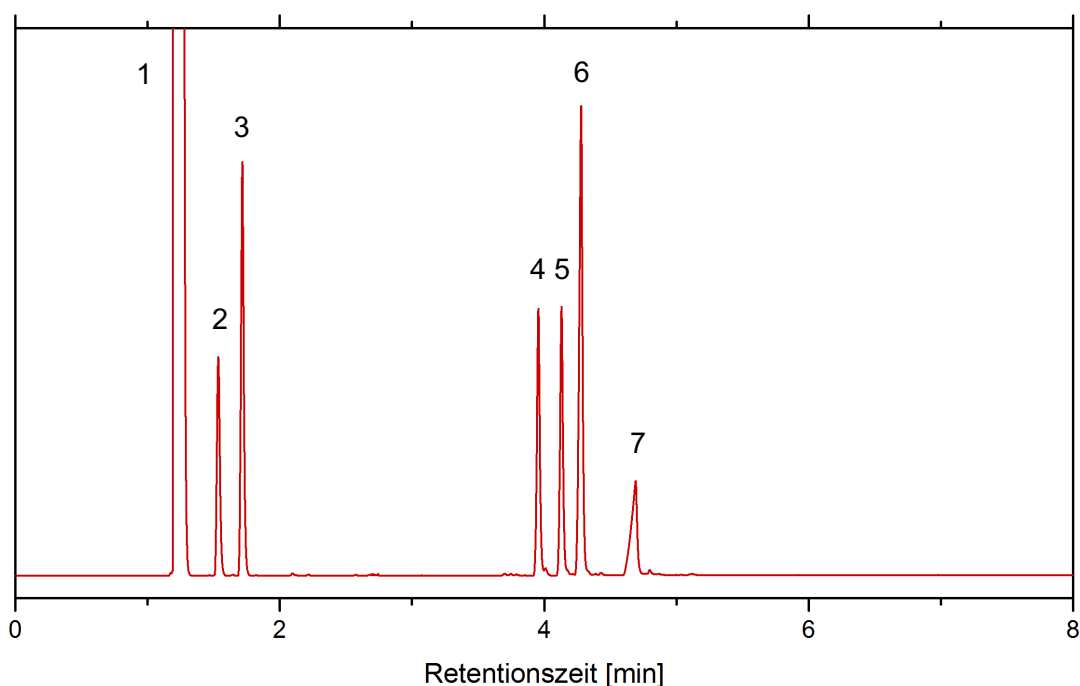


Abb. 7: GC-Chromatogramm aller C6/12-Substrate, -Intermediate und -Produkte. 1: MTBE (Solvens), 2: Hexanal (**49**), 3: 1-Hexanol (**17**), 4: 2-Butyloctanal (**52**), 5: 2-Butyl-2-octenal (**51**), 6: 2-Butyl-1-octanol (**53**) + 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**), 7: 2-Butyloctansäure + 2-Butyl-2-octensäure.

Hierfür wurde eine $^1\text{H-NMR}$ -basierte Analytik verwendet, wobei die α -Protonen des Guerbet-Alkohols (für 2-Butyl-1-octanol (**53**) bei 3.56 ppm) mit dem allylischen Proton des α,β -ungesättigten Alkohols (für 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**) bei 5.42 ppm) verglichen wurden (Abb. 8).

Für die quantitative, gaschromatographische Analyse aller Verbindungen wurden Eichgeraden über den betrachteten Konzentrationsbereich erstellt. Die Eichgerade wurde um die Reinheit der, für ihre Erstellung verwendeten Charge korrigiert. Da v.a. die Aldehyde auch bei sorgfältiger Lagerung unter Argon nach einiger Zeit zum Teil oxidieren, wurde

ihre Reinheit kontinuierlich überprüft. In regelmäßigen Abständen und insbesondere nach Änderung der Gerätekonfiguration wurde die Genauigkeit der Eichgeraden getestet. Die Abweichung lag stets unter 3%. Bei größeren Abweichungen wurden neue Eichgeraden erstellt. Dieses Prozedere stellte die Vergleichbarkeit aller Ergebnisse sicher. Die Reinheitsbestimmung erfolgte mittels $^1\text{H-NMR}$ und hochreinem Dimethylterephthalat als internem Standard.

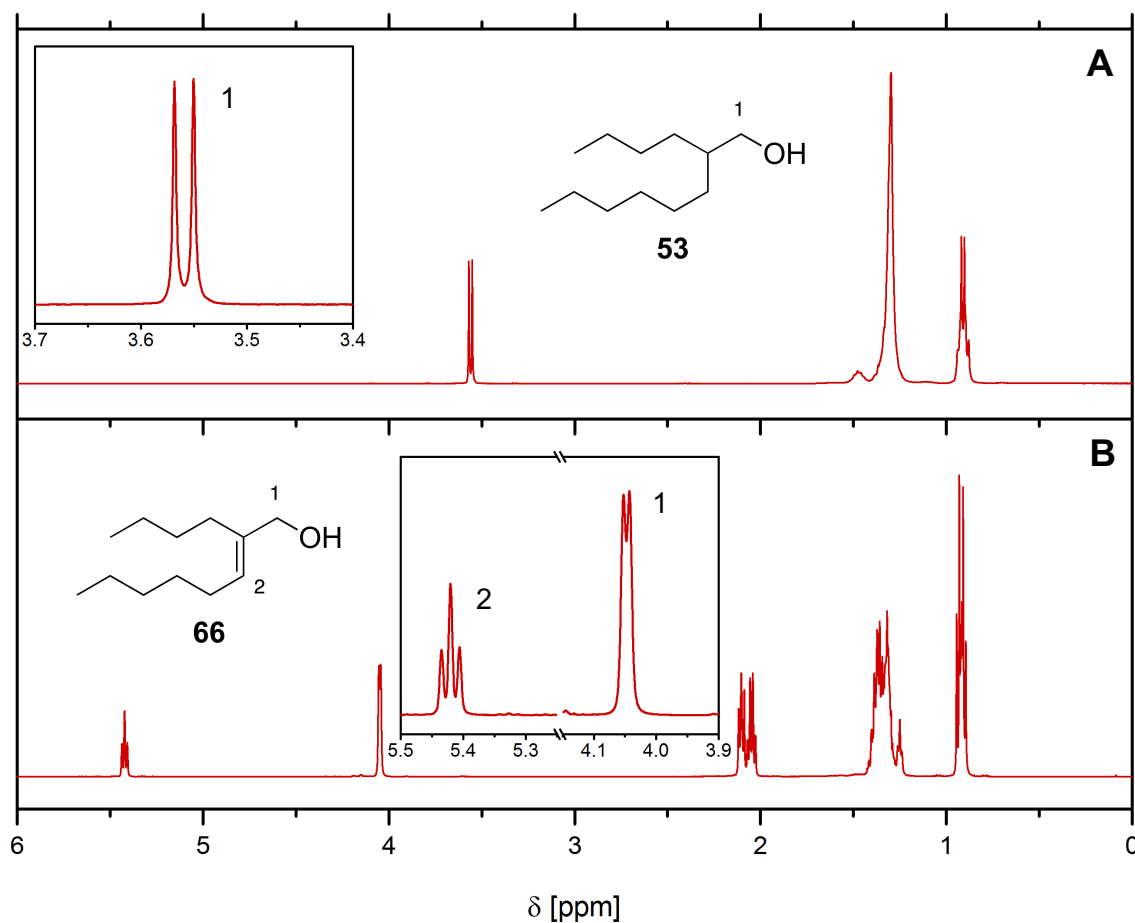


Abb. 8: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von (A) 2-Butyl-1-octanol (**53**) und (B) 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**) in CDCl_3 (Lösungsmittel-Signal nicht dargestellt).

4.2 Oxidation primärer, aliphatischer Alkohole

4.2.1 Alkoholdehydrogenasen

Der erste Schritt der chemo-enzymatischen Synthese von Guerbet-Alkoholen ist die Oxidation eines primären, aliphatischen Alkohols. Aus atomökonomischer Sicht und zur Etablierung eines sich selbst erhaltenden Cofaktorregenerierungssystems stellen ADHs die Katalysatoren der Wahl dar. Es wurde ein Aktivitätsscreening verschiedener ADHs für die Oxidation von 1-Hexanol (**17**) durchgeführt (Abb. 9).

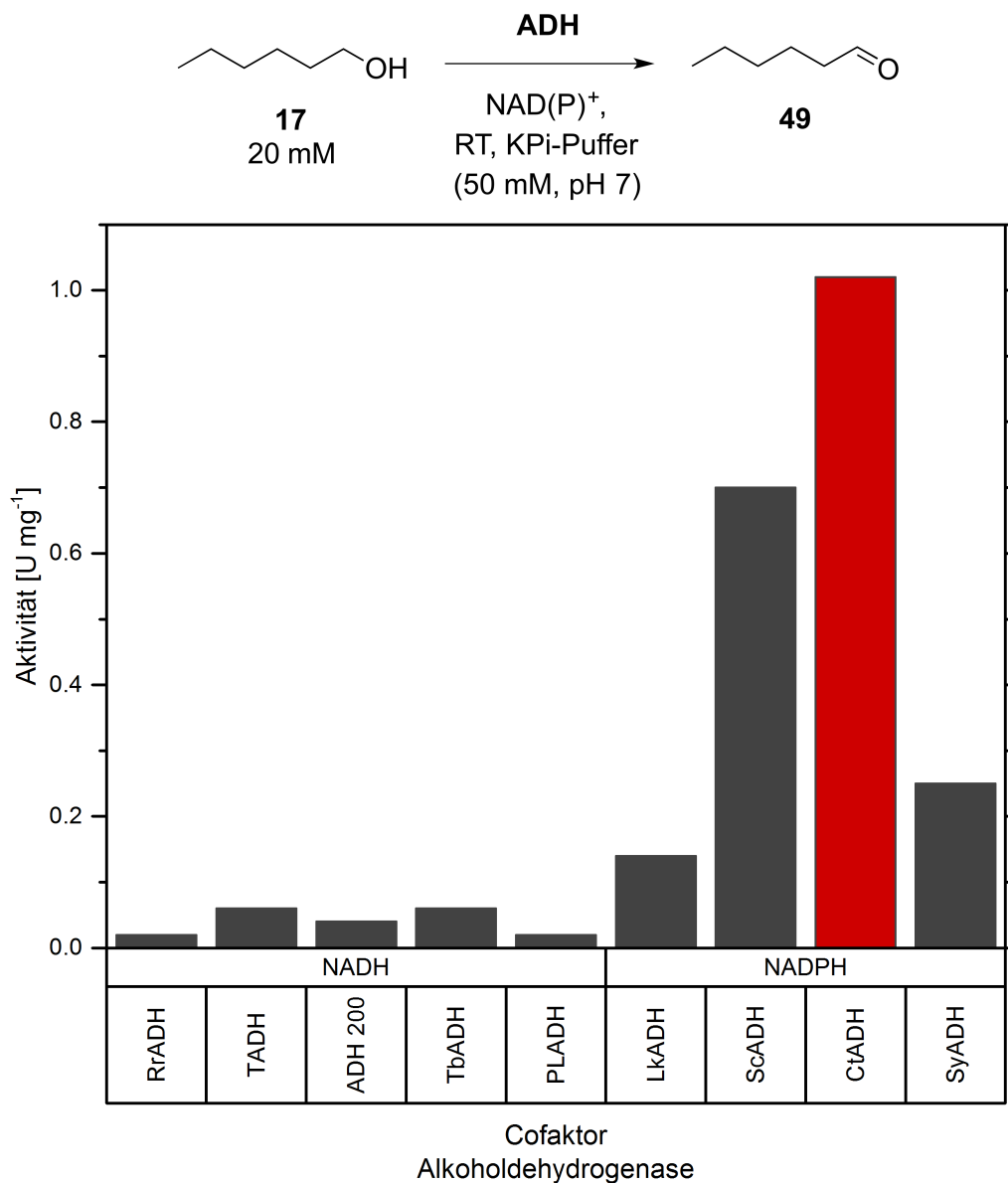
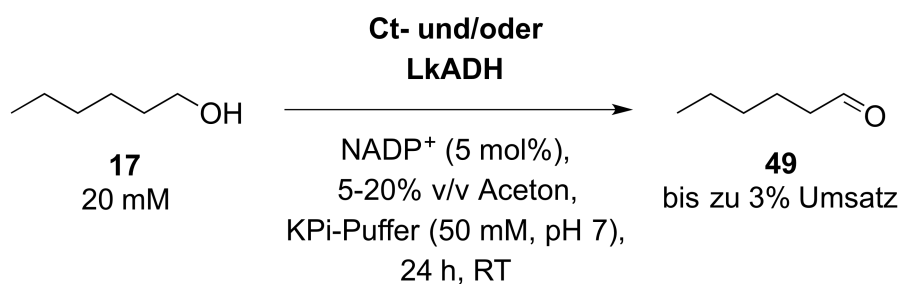


Abb. 9: Screening nach ADHs für die Oxidation von 1-Hexanol (**17**). Rr: *Rhodococcus ruber*, T: *Thermus* sp. ATN1, Tb: *Thermoanaerobicum Brockii*, PL: *Parvibaculum lavamentivorans*, Lk: *Lactobacillus kefir*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Ct: *Comamonas testosteroni*, Sy: *Spingobium yanoikuyae*.

Die höchste Aktivität zeigte die CtADH mit 1.0 U mg^{-1} . Generell liegt das Gleichgewicht von ADHs weit auf Seiten der Reduktion, sodass eine starke Triebkraft nötig ist, es in die gewünschte oxidative Richtung zu verschieben.^[133] In der finalen Kaskade (siehe Abschnitt 3) würde diese Rolle der anschließenden Aldolkondensation zukommen. Wird die Reaktion jedoch individuell betrachtet, kann die Regenerierung des Cofaktors durch Reduktion von Aceton zu Isopropanol durchgeführt und so ebenfalls das Gleichgewicht verschoben werden. Dies wurde sowohl Substrat-gekoppelt mit der CtADH alleine und Enzym-gekoppelt mit der LkADH, die eine hohe Aktivität für die Reduktion aufweist, getestet. Trotz Einsatzes eines Überschusses an Aceton bis zu 20% v/v und Erhöhung der Menge an CtADH auf bis zu 200 U mmol^{-1} konnte maximal ein Umsatz von 3% erreicht werden. Auch der Zusatz von LkADH bzw. deren alleiniger Einsatz ergab keine Steigerung des Umsatzes (Tab. 5). Andere Cofaktorregenerierungssysteme für oxidative Reaktionen, die zudem eine hohe spezifische Aktivität aufweisen, wie NADH-Oxidasen oder Porphyrine, basieren auf dem Einsatz von Luft-Sauerstoff, der zur Oxidation des Produkts führen würde (siehe Abschnitt 4.1.3) oder akzeptieren nur NADH als Cofaktor.^[179]

Tab. 5: Einsatz von Ct- und/oder LkADH mit Substrat- bzw. Enzym-gekoppelter Cofaktorregenerierung für die Oxidation von 1-Hexanol (**17**).



Eintrag	CtADH [U mmol ⁻¹]	LkADH [U mmol ⁻¹]	Aceton [% v/v]	Umsatz [%]
1	10	-	5	2
2	10	-	10	2
3	10	-	20	3
4	100	-	10	2
5	200	-	10	3
6	10	100	10	2
7	-	100	10	2

4.2.2 TEMPO-vermittelte Oxidation

4.2.2.1 Etablierung eines Benchmarks

Die TEMPO-Oxidation von 1-Hexanol (**17**) wurde zunächst im Batch unter Zusatz unterschiedlicher Mengen Hypochlorit getestet (Abb. 10). Als Cokatalysator kam Natriumbromid zum Einsatz. Da das pH-Optimum der Oxidation bei ca. pH 9 liegt, wurde mit Natriumhydrogencarbonat gepuffert. Das *in situ* gebildete Hypobromit ist nur bei tiefen Temperaturen stabil, weshalb die Reaktion unter Eisbad-Kühlung durchgeführt wurde. Die verwendete wässrige Hypochlorit-Lösung wurde vor jedem Einsatz iodometrisch gegen Thiosulfat titriert. Die Thiosulfat-Lösung wiederum wurde regelmäßig gegen Iodat titriert.

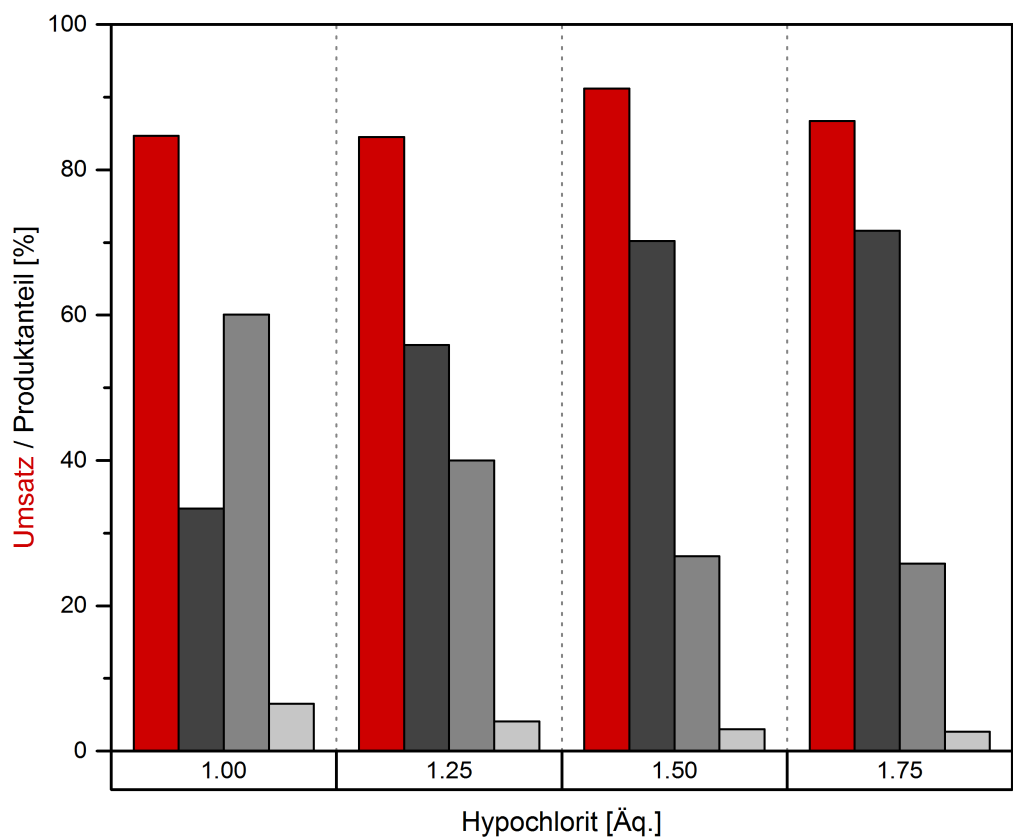
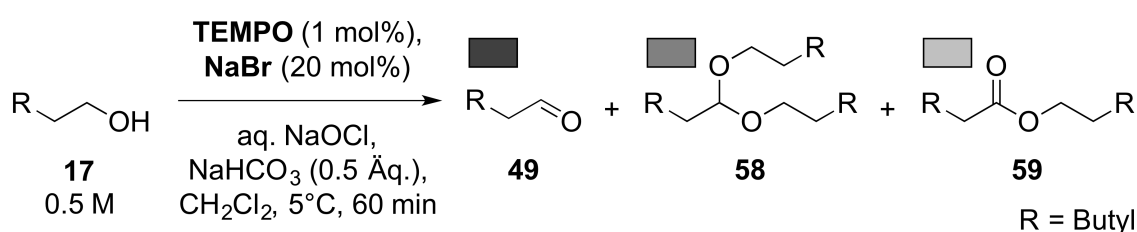


Abb. 10: TEMPO-vermittelte Oxidation von 1-Hexanol (**17**) im Batch unter Einsatz verschiedener Mengen Hypochlorit.

Bei der Reaktion wurden Hexanaldiethylacetal (**58**) und Hexansäurehexylester (**59**) als Nebenprodukte detektiert. Ihre Bildung wird im Abschnitt 4.2.2.2 diskutiert. Der Gesamt-

umsatz der Reaktion bewegte sich unabhängig von der verwendeten Menge Hypochlorit zwischen 85 und 91%. Jedoch wurden bei 1.0 Äq. Hypochlorit nur 33% Hexanal (**49**) und 60% Hexanaldiethylacetal (**58**), sowie 7% Hexansäurediethylacetal (**59**) gebildet. Mit zunehmender Menge Hypochlorit (1.5 Äq.) stieg der Anteil an Hexanal (**49**) auf 70% und der an Acetal **58** und Ester **59** fiel auf 27 bzw. 3%. Interessant ist die Tatsache, dass trotz unvollständigem Gesamtumsatz, eine weitere Erhöhung auf 1.75 Äq. Hypochlorit keine weitere Verbesserung brachte. Da die Acetalbildung maximal katalytische Mengen Hypochlorit (durch dessen Zerfall in Chlorwasserstoff) benötigt sollte auch bei nur 1.0 Äq. Hypochlorit genug Oxidationsmittel für einen quantitativen Umsatz zur Verfügung stehen. Eine Inaktivierung der Katalysatoren, sowie ein zu starkes Absinken des pH-Werts konnten durch erneuten Zusatz von TEMPO, Natriumbromid und Natriumhydrogencarbonat als Gründe für den unvollständigen Gesamtumsatz ausgeschlossen werden (siehe Abschnitt 7.4.5, Tab. 20).

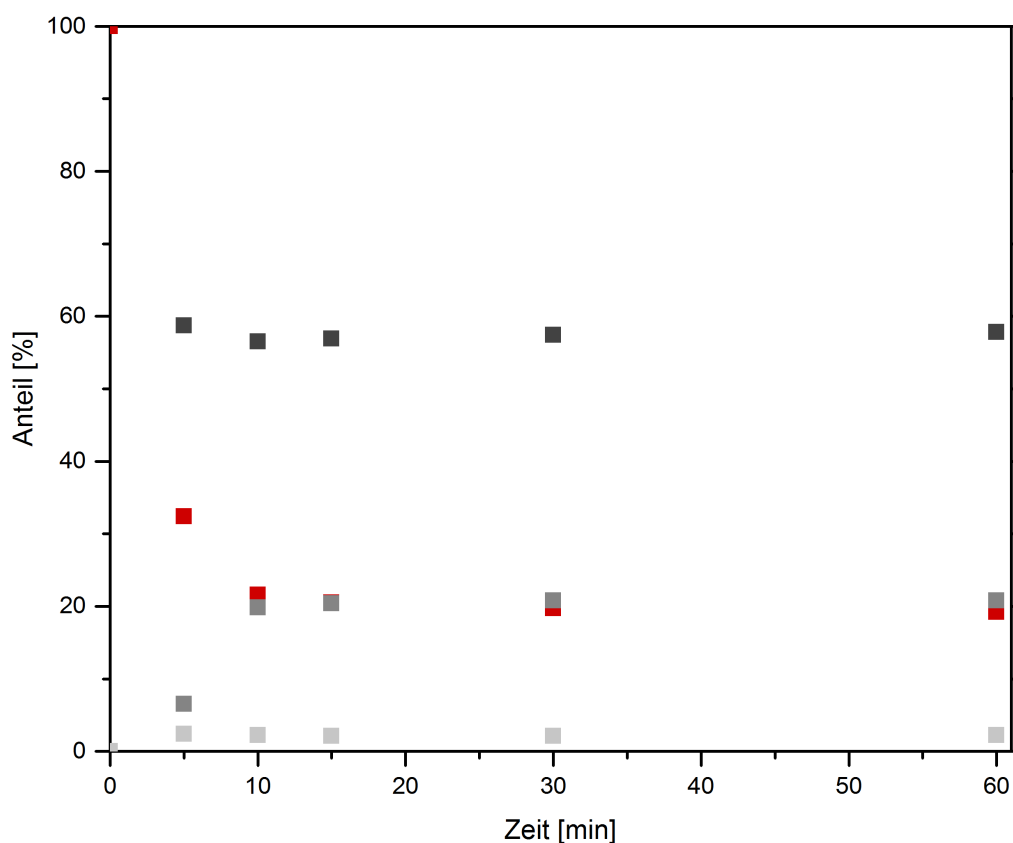
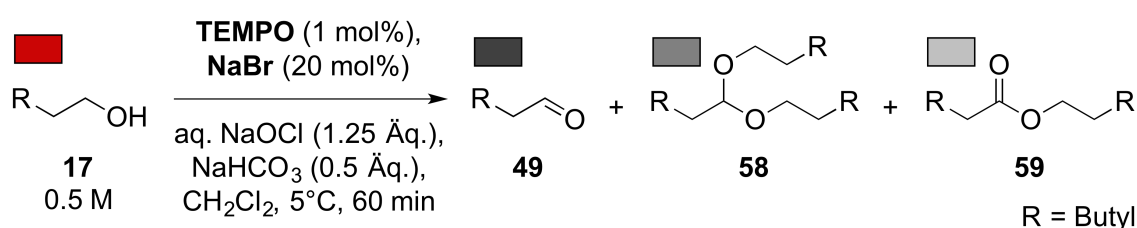


Abb. 11: Zusammensetzung der Reaktionsmischung der TEMPO-Oxidation mit 1.25 Äq. Hypochlorit in Abhängigkeit von der Zeit.

Neben einer Endpunktbestimmung wurde für den Versuch mit 1.25 Äq. Hypochlorit auch die Zusammensetzung der Reaktionsmischung zu bestimmten Zeitpunkten ermittelt (Abb. 11). Bereits nach 5 min stieg der Anteil an Hexanal (**49**) auf 59% und blieb von dort an konstant. Der Anteil an 1-Hexanol (**17**) fiel nach 5 min auf 32% und nach 10 min weiter auf 22%. Nach 5 min wurden 7%, nach 10 min 20% Acetal **58** gebildet. Dies zeigt, dass alles zwischen 5 und 10 min erzeugte Hexanal (**49**) im Acetal **58** gebunden wurde. Bemerkenswert ist, dass nach 10 min keine weitere Acetalbildung und trotz des Überschusses an Hypochlorit keine vollständige Oxidation des 1-Hexanols (**17**) stattfindet. In keinem der Experimente wurde Hexansäure als Produkt der Oxidation von Hexanal (**49**) nachgewiesen.

4.2.2.2 Nebenproduktbildung

Im Zuge der ersten Experimente zur TEMPO-vermittelten Oxidation primärer, aliphatischer Alkohole traten zwei Nebenprodukte auf, die mittels ^1H -Analytik als Hexanaldiethylacetal (**58**) und Hexansäurehexylester (**59**) identifiziert werden konnten (Abb. 12).

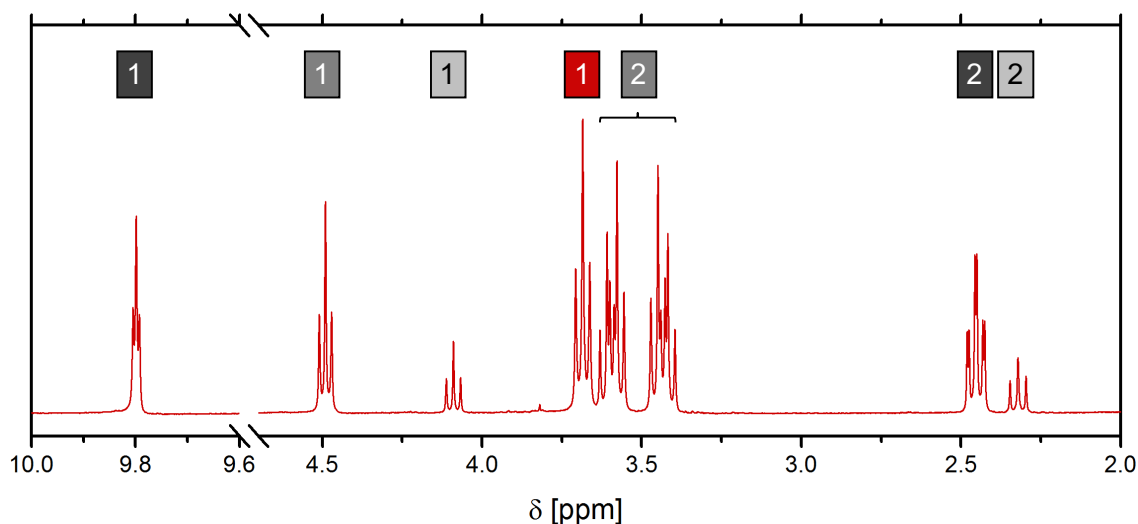
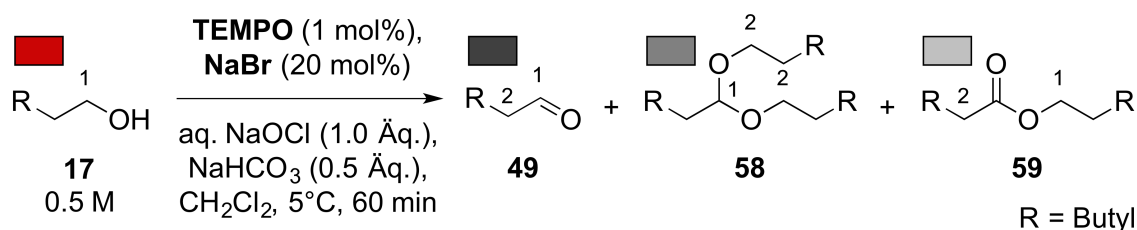
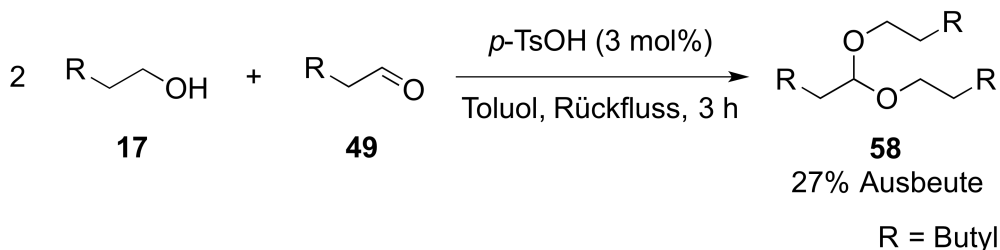


Abb. 12: Identifikation der Nebenprodukte Hexanaldiethylacetal (**58**) und Hexansäurehexylester (**59**) im Substrat/Produkt-Gemisch der TEMPO-Oxidation mit 1-Hexanol (**17**) und Hexanal (**49**) (Die Ziffern repräsentieren die jeweiligen Protonen der Verbindungen).

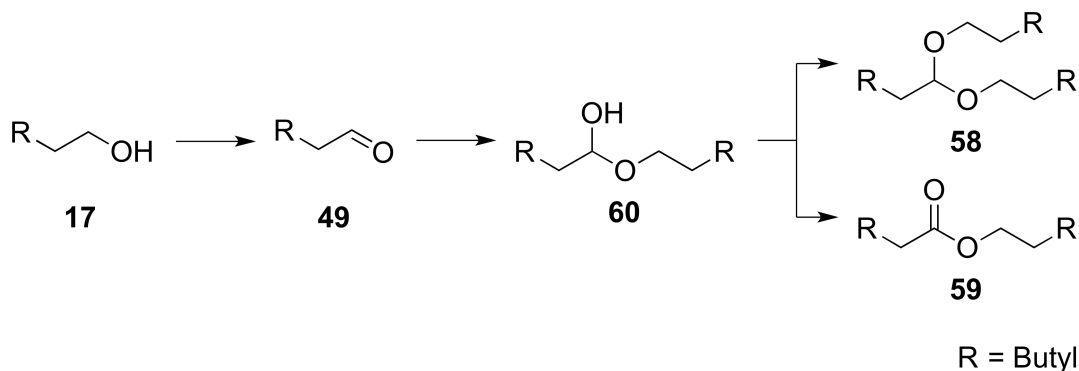
Es sind vor allem die Protonen in direkter Nachbarschaft zur jeweiligen funktionellen Gruppe charakteristisch. Das zentrale Carbonyl-Proton des Acetals **58** resoniert als Triplett bei ca. 4.5 ppm. Die diastereotopen α -Protonen der Alkoholsubstituenten stellen je ein AA'X₂-Spinsystem dar und ergeben entsprechende Multipletts bei ca. 3.4 und 3.6 ppm. Die α -Protonen des Esters **59** erzeugen je ein Triplett für die Säure (2.3 ppm) und die Alkohol-Komponente (4.1 ppm).

Hexansäurehexylester (**59**) ist kommerziell erhältlich und erscheint in der gaschromatographischen Analyse bei 4.063 min. Hexanaldihexylacetal (**58**) wurde nach einer Vorschrift von Greene^[180] synthetisiert (Schema 27). Hierzu wurde Hexanal (**49**) mit einem zehnfachen Überschuss an 1-Hexanol (**17**) und katalytischen Mengen *para*-Toluolsulfonsäure (*p*-TsOH) in Toluol am Wasserabscheider zu Rückfluss erhitzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde Hexanaldihexylacetal (**58**) mit einer Ausbeute von 27% erhalten. Seine Retentionszeit bei gaschromatographischer Analyse lag bei 5.693 min.



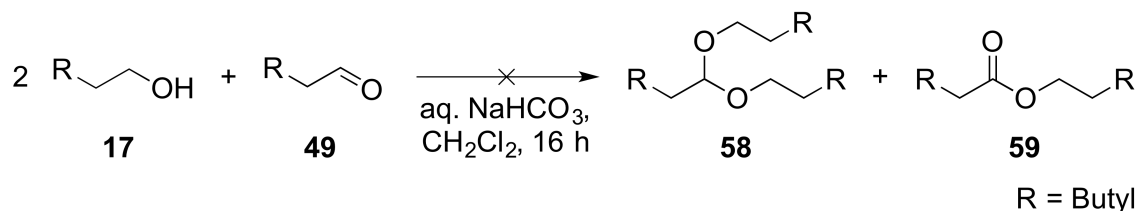
Schema 27: Synthese von Hexanaldihexylacetal (**58**) aus 1-Hexanol (**17**) und Hexanal (**49**).

Ein möglicher Mechanismus für die Bildung beider Nebenprodukte ist in Schema 28 dargestellt. Aus je einem Molekül 1-Hexanol (**17**) und Hexanal (**49**) bildet sich zunächst das Hemiacetal (**60**). Dieses kann nun entweder durch TEMPO-Oxidation zu Hexansäurehexylester (**59**) oxidiert werden oder mit einem weiteren Molekül 1-Hexanol (**17**) zu Hexanaldihexylacetal (**58**) reagieren.



Schema 28: Postulierter Mechanismus der Nebenproduktbildung bei der TEMPO-Oxidation.

Es wurde ein Vergleichsversuch zur Nebenproduktbildung durchgeführt, bei dem 1-Hexanol (**17**) und Hexanal (**49**) im Verhältnis 2:1 in DCM gelöst und mit Hydrogencarbonat-Lösung versetzt wurden (Schema 29).



Schema 29: Vergleichsversuch zur Nebenproduktbildung ohne Oxidationsmittel.

Es konnte auch nach 16 h kein Nebenprodukt nachgewiesen werden. Dies erscheint plausibel für die Bildung von Hexansäurehexylester (**59**), da weder TEMPO oder Natriumbromid, noch Hypochlorit als Oxidationsmittel zugesetzt wurden. Für die Bildung des Acetals **58** war kein Oxidationsmittel nötig. Dennoch konnte es im Vergleichsversuch nicht nachgewiesen werden. Es liegt nahe, dass es sich bei der Acetalisierung um eine säurekatalysierte Reaktion handelte, da die eingesetzte Base Hydrogencarbonat nicht stark genug war um das Alkoholat zu erzeugen. Da keine Säure zugesetzt wurde, muss sie *in situ* aus Hypochlorit gebildet worden sein. Hypochlorit steht in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit hypochloriger Säure, welche spontan zu Sauerstoff und Chlorwasserstoff zerfallen kann. Auch wenn Letzterer durch Hydrogencarbonat neutralisiert wird um die Freisetzung von Chlorgas zu verhindern, könnte die Menge genügen um die Acetalbildung zu katalysieren.

4.2.2.3 Dosierung von Hypochlorit

Es wurde getestet inwieweit sich das Dosieren des Oxidationsmittels Hypochlorit binnen 30 bzw. 60 min auf die Bildung von Nebenprodukten und damit die Selektivität der Reaktion auswirkt (Abb. 13). Die Reaktion wurde jeweils 5 min nach Beendigung des Dosierens abgebrochen. Da die Oxidation, wie zuvor erläutert, sehr schnell abläuft, wurde angenommen, dass hiernach kein weiterer Umsatz stattfand. Beide Reaktionen zeigten hohe Umsätze von 87 bzw. 91% und perfekte Selektivitäten. Nebenprodukte entstanden demnach nicht. Die geringfügige Differenz im Umsatz könnte auf die insgesamt höhere Reaktionszeit zurückzuführen sein. Das Ausbleiben von Nebenprodukten liegt in der hohen Geschwindigkeit der Oxidation begründet. Alles zugegebene Hypochlorit wurde sofort reduziert und die Konzentration ist zu keinem Zeitpunkt so hoch, dass aus der Zerfallsreaktion genug Säure für die Katalyse der Acetalbildung erzeugt wurde. Auch für die Oxidation zu Hexansäurehexylester (**59**) ist eine vorgelagerte, säurekatalysierte Bildung des Hemiacetals (**60**) nötig.

Nach einer modifizierten Vorschrift von DIJKSMAN^[121] wurde eine höhere Menge Natriumhydrogencarbonat verwendet. Da in einem vorherigen Versuch nach der ursprünglichen Vorschrift sich die Produktzusammensetzung durch weitere Zugabe von Hydrogencarbonat nicht veränderte, kann ein diesbezüglicher Einfluss ausgeschlossen werden. So ist die höhere Selektivität nur auf die geänderte Reaktionsführung durch Dosieren des Oxidationsmittels zurückzuführen.

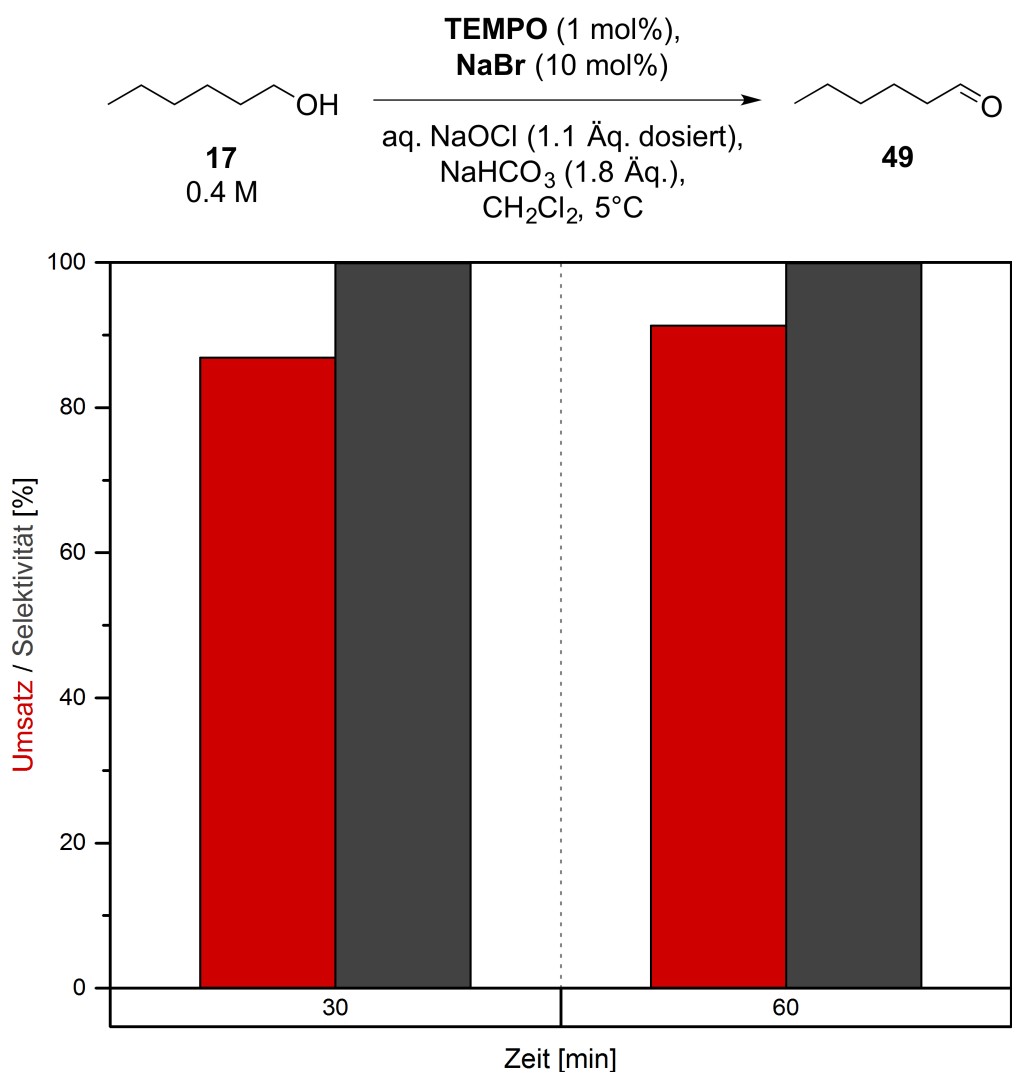


Abb. 13: TEMPO-Oxidation von 1-Hexanol (**17**) mit Dosieren des Oxidationsmittels Hypochlorit über 30 bzw. 60 min.

4.2.2.4 Vergleich verschiedener Katalysatoren

Neben TEMPO existieren eine Reihe strukturell verwandter Verbindungen, die in der Lage sind, die selektive Oxidation primärer Alkohole zu katalysieren. Sie alle besitzen als gemeinsames Strukturmotiv ein Piperidinyloxy-Radikal, welches beidseitig durch je zwei Methylgruppen in direkter Nachbarschaft stabilisiert wird. Retrosynthetisch wird TEMPO aus 4-Hydroxy-TEMPO und dieses wiederum aus 4-Oxo-TEMPO erhalten. Von

In semi-quantitativen Versuchen wurde die Löslichkeit von PIPO (**61**) in verschiedenen organischen Lösungsmitteln bestimmt (Tab. 6). Entgegen der Literatur^[121] konnte keine signifikante Löslichkeit in den, für die TEMPO-Oxidation üblichen, chlorierten Lösungsmitteln Chloroform und Dichlormethan festgestellt werden. In den ökologisch verträglicheren Lösungsmitteln Ethylacetat und MTBE hingegen lag die Löslichkeit mit 1.5 bzw. 15 g L⁻¹ bereits in einem Bereich, in dem das nur in katalytischen Mengen eingesetzte Polymer bereits weitestgehend gelöst wäre.

Tab. 6: Löslichkeit von Polyamin-immobilisiertem Piperidinyloxyl (**61**, PIPO) in organischen Lösungsmitteln.

Org. Lösungsmittel	Löslichkeit [g L ⁻¹]
Cyclohexan	<0.4
Xylol	<0.4
Toluol	<0.4
Chloroform	<0.4
Diethylether	0.5
Ethylacetat	1.5
Dichlormethan	<0.4
MTBE	15

Auf Basis der Versuche mit dosiertem Hypochlorit wurden TEMPO, 4-Hydroxy-TEMPO und PIPO (**61**) auf ihre Eignung für die Oxidation von 1-Hexanol (**17**) hin untersucht (Abb. **14**). Die Menge an TEMPO konnte von vormals 1 mol% auf 0.1 mol% ohne Einbußen hinsichtlich Umsatz und Selektivität reduziert werden. Das kostengünstigere 4-Hydroxy-TEMPO lieferte auch bei 1 mol% nur einen Umsatz von 85% bei einer Selektivität von 87%. Mit PIPO (**61**) hingegen wurde bei 1 mol% quantitativer Umsatz mit 98% Selektivität erreicht. In allen Fällen mit unvollständiger Selektivität war Hexansäurehexylester (**59**) das einzige Nebenprodukt. Hexanaldihexylacetal (**58**) konnte nicht nachgewiesen werden. 4-Hydroxy-TEMPO scheint die Oxidation insbesondere bei niedriger Katalysatorbeladung derart zu verlangsamen, dass signifikante Mengen des Hemiacetals (**60**) gebildet und zu Hexansäurehexylester (**59**) oxidiert werden können.

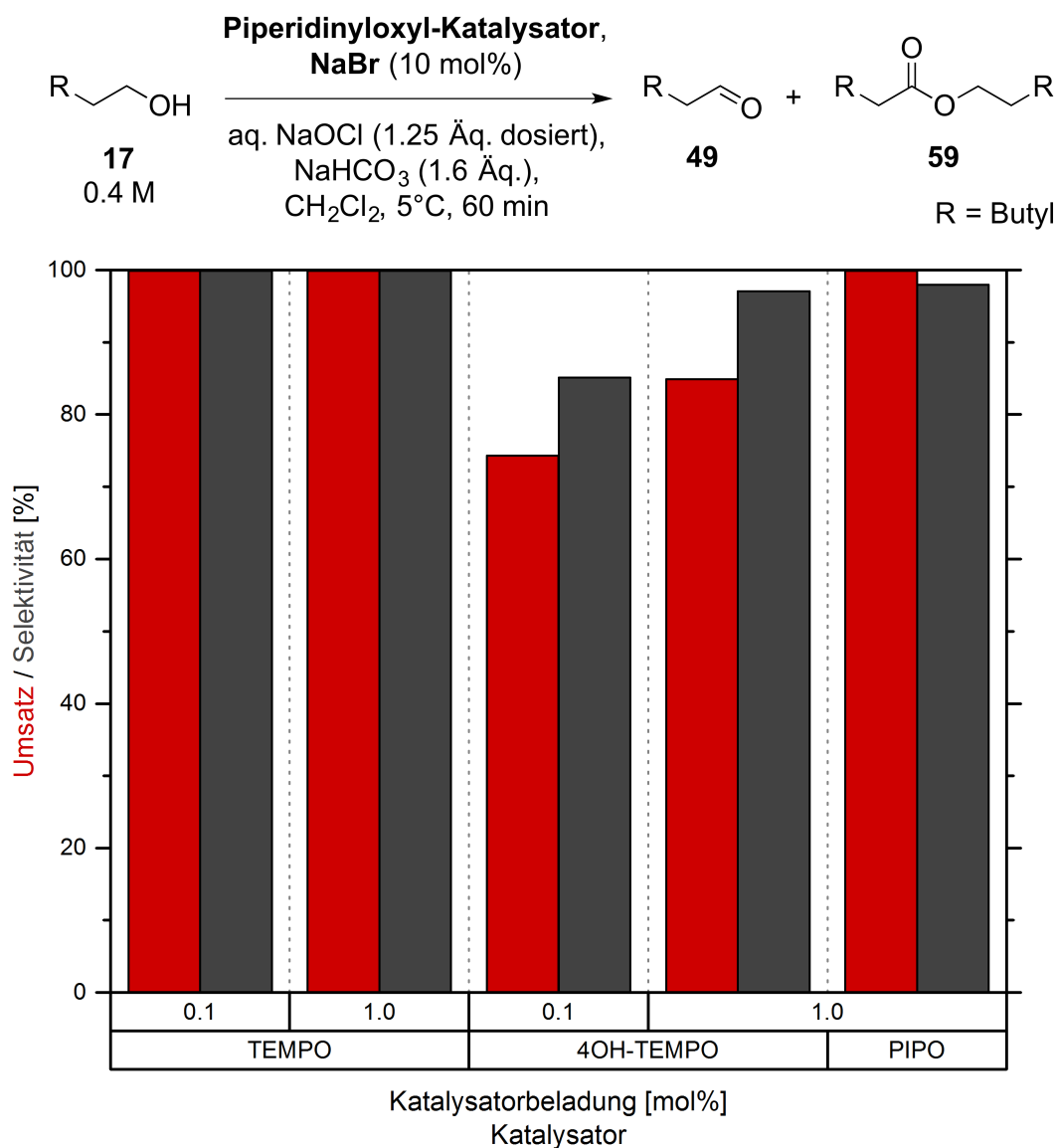


Abb. 14: Vergleich verschiedener Piperidinyloxy-basierter Katalysatoren für die Oxidation von 1-Hexanol (17). Die Selektivität ist definiert als der Anteil an Hexanal (49) an der Produktmischung.

4.2.2.5 Vergleich organischer Lösungsmittel

Das in der TEMPO-Oxidation am häufigsten eingesetzte Lösungsmittelgemisch ist Dichlormethan-Wasser. Ebenfalls sind Beispiele mit Aceton-, Acetonitril- und Ethylacetat-Wasser-Gemischen bekannt.^[114] Die Verwendung von Aceton wurde nicht in Betracht gezogen, da es zu unerwünschten Kondensationsreaktionen mit dem Produkt hätte kommen können. Stattdessen wurde neben Acetonitril und Ethylacetat auch MTBE in die Untersuchungen mit aufgenommen (Abb. 15). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass sowohl in Acetonitril, als auch in Ethylacetat hohe Umsätze (88 bis >99%) und nahezu perfekte Selektivitäten ($\geq 99\%$) erreicht wurden, jedoch in MTBE fast ausschließlich Hexanaldiethylacetal (58) nachweisbar war. Möglicherweise beschleunigt MTBE den Zerfall von Hypochlorit und beschleunigt so die säurekatalysierte Acetalbildung. Der

niedrigere Umsatz der Reaktion im Acetonitril-Wasser-Gemisch könnte auf eine langsamere Oxidation hinweisen. Dies könnte darin begründet sein, dass es sich nicht wie bei den anderen betrachteten Systemen um ein Zwei-Phasen-, sondern um ein homogenes System handelt. Die hohe Konzentration an organischem Lösungsmittel in der wässrigen Phase könnte die Stabilität des *in situ* gebildeten Hypobromits und damit die Reaktionsgeschwindigkeit negativ beeinflussen.

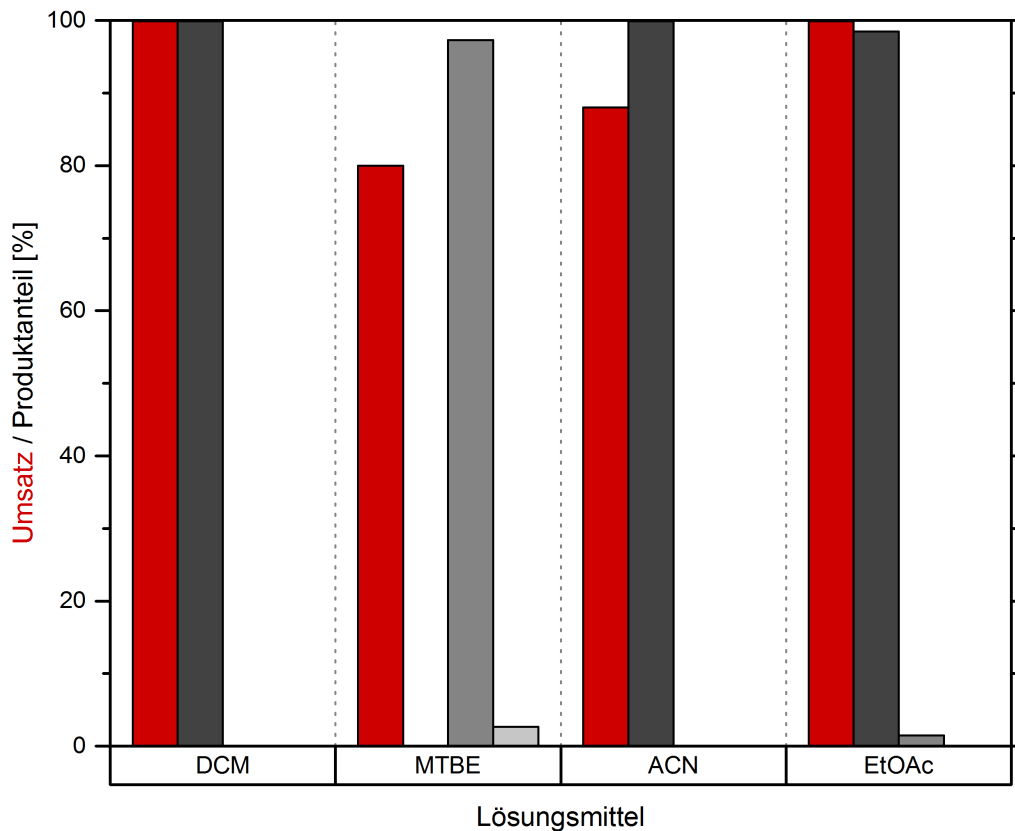
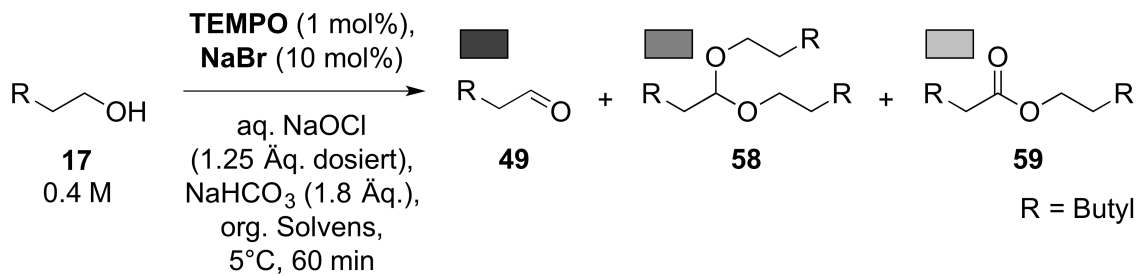


Abb. 15: Vergleich verschiedener organischer Lösungsmittel für die TEMPO-Oxidation von 1-Hexanol (17).

4.2.2.6 Optimierung der Hypochlorit-Menge

Zum Abschluss wurde die TEMPO-Oxidation bezüglich der dosierten Menge an Hypochlorit optimiert. Insgesamt wurden 1.5 Äq. Hypochlorit binnen 60 min zugegeben. Beginnend nach Zugabe von 1.0 Äq. (40 min) wurde in Abständen von 0.1 Äq. (4 min) die Zusammensetzung der organischen Phase gaschromatographisch untersucht (Abb. 16).

Es wurden zu keinem Zeitpunkt Nebenprodukte detektiert, woraus durchweg perfekte Selektivitäten resultierten. Der Umsatz lag nach Zugabe von 1.0 Äq. (40 min) bereits bei 81%. und nach 1.1 Äq. (44 min) bei 98%. Nach 1.2 Äq. (48 min) war der Umsatz vollständig, sodass dies als die maximal nötige Menge an Hypochlorit angenommen werden kann.

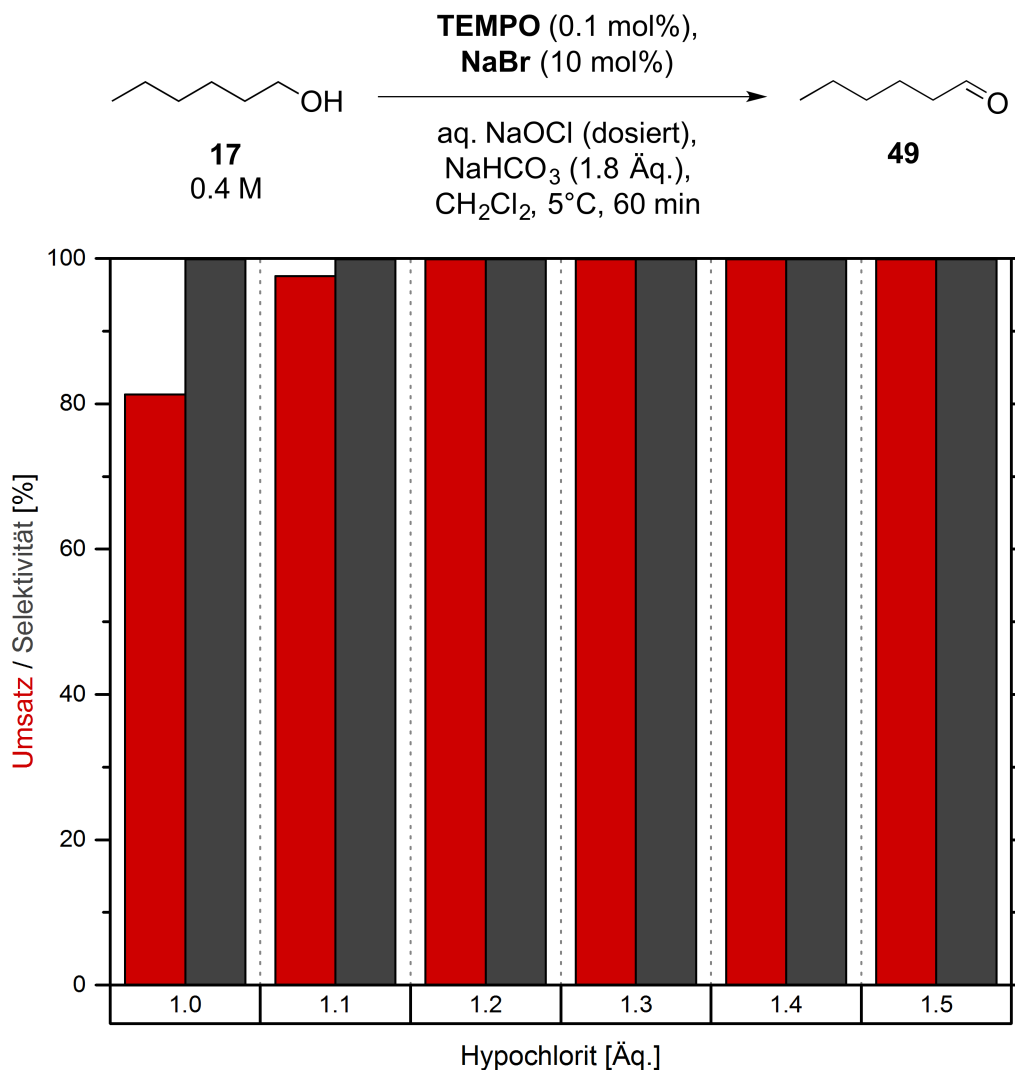
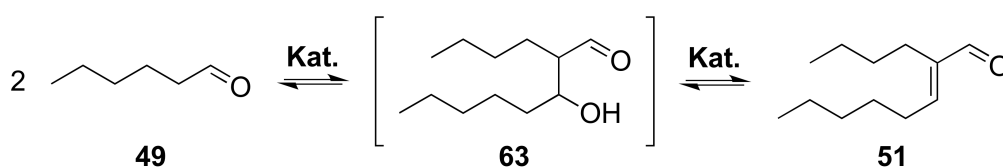


Abb. 16: Optimierung der dosierten Menge Hypochlorit. Die Selektivität ist definiert als der Anteil an Hexanal (**49**) an der Produktmischung.

4.3 Chemokatalytische Aldolkondensation aliphatischer Aldehyde

4.3.1 Aldolkondensation in wässrigem Medium

Mit dem Ziel, die Aldolkondensation von Hexanal (**49**) zu 2-Butyl-2-octenal (**51**) in Form einer Eintopf-Reaktion mit der anschließenden Biotransformation zu koppeln, wurde zunächst ein Katalysator-Screening in wässrigem Medium durchgeführt. Dies stellt insofern eine besondere Herausforderung dar, als dass nach der Addition zum 2-Butyl-3-hydroxyoctanal (**63**) die Eliminierung von Wasser in Gegenwart eines Wasserüberschusses und damit gegen das Reaktionsgleichgewicht erfolgen muss (Schema 31).



Schema 31: Reaktionsgleichung der Homo-Aldolkondensation von Hexanal (**49**) über 2-Butyl-3-hydroxyoctanal (**63**) zu 2-Butyl-2-octenal (**51**).

Die Aldolkondensation ist sowohl rein basen-, als auch rein säurekatalysiert oder mit einem bifunktionalen Katalysator denkbar. Im ersten Schritt kann der Aldol-Donor durch Deprotonierung als Enolat aktiviert werden. Der Akzeptor kann entweder am Carbonyl-Sauerstoff protoniert werden oder mit einem sekundären Amin ein Iminium-Ion bilden. In beiden Fällen sorgt das positiv geladene Heteroatom für eine höhere Elektrophilie des benachbarten Kohlenstoffatoms. Im zweiten Schritt wird Wasser eliminiert. Auch dies kann entweder durch Deprotonierung am α -Kohlenstoff und anschließende Eliminierung von Hydroxid oder durch Protonierung der Hydroxy-Gruppe und direkte Eliminierung von Wasser geschehen. Letztere Variante ist deutlich einfacher, da Wasser im Gegensatz zum Hydroxid-Ion eine gute Abgangsgruppe ist. Die basenkatalysierte Eliminierung erfordert in der Regel zusätzlich hohe Temperaturen, was jedoch zur Polymerisation des Substrats führen kann (siehe Abschnitt 4.1.2.1).

Als Katalysatoren wurden stark basischer Ionenaustauscher, die starken Amidin- bzw. Guanidinbasen 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) und 1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-en (TBD), NaOH, DL-Prolin, sowie die Trifluoressigsäure-Salze (TFA) von DBU und TBD verwendet (Abb. 17). Der Umsatz wurde gaschromatographisch nach Extraktion mit MTBE bestimmt. Lediglich die ersten vier genannten Katalysatoren lieferten Umsatz zu 2-Butyl-2-octenal (**51**). Vermutlich ist die katalytische Wirkung nicht auf die Katalysatoren selbst, sondern auf den hohen pH-Wert, den sie erzeugen, zurückzuführen.

Dies wird besonders deutlich, da die Reaktion bereits von einfacher NaOH-Lösung (pH 12) katalysiert wird. Zudem führen die TFA-Salze von Basen nicht zu Umsatz, wohingegen die Basen alleine die Reaktion katalysieren. Der Ionentauscher lieferte mit 78% den höchsten Umsatz. Dies mag darin begründet sein, dass dieser im Gegensatz zu den anderen ein heterogener Katalysator ist und im Inneren des Polymers lokal eine sehr hohe OH⁻-Konzentration erzeugt.

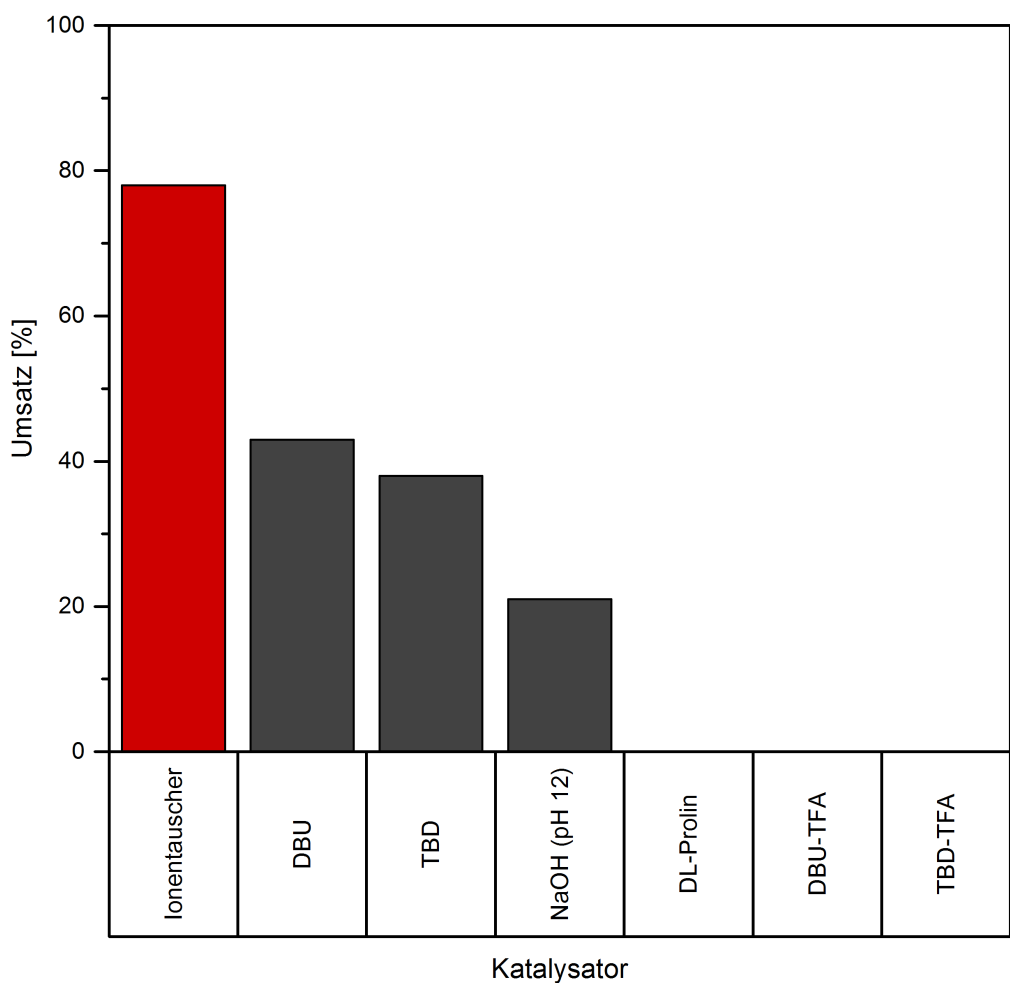


Abb. 17: Katalysator-Screening für die Homo-Aldolkondensation von Hexanal (**49**) in Wasser.

Die Tatsache, dass alle Katalysatoren, die signifikanten Umsatz lieferten auch einen hohen pH-Wert erzeugten, hat zur Folge, dass die Aldolkondensation in dieser Form, im Sinne einer Eintopf-Reaktion, nicht kompatibel mit der Biotransformation ist. Denkbar wäre eine Tandem-Reaktion mit einer Neutralisierung nach der Aldolkondensation. In Anbetracht der bereits im Zwei-Phasen-Gemisch stattfindenden Alkohol-Oxidation, wäre eine Aldolkondensation im rein organischen Medium jedoch die attraktivere Variante. Der Aldehyd könnte durch einfache Phasentrennung von der Reaktionsmischung der Alkohol-Oxidation isoliert werden. Das Problem der Eliminierung von Wasser entgegen dem Gleichgewicht würde so ebenfalls nicht bestehen.

4.3.2 Aldolkondensation in organischem Medium

Um die Limitierungen in wässrigem Medium zu umgehen, wurde zudem ein Katalysator-Screening in organischem Solvens durchgeführt. Da die vorgeschaltete Alkoholoxidation in Dichlormethan stattfindet, wurde dieses aus Kompatibilitätsgründen auch für die Homo-Aldolkondensation von Hexanal (**49**) getestet (Abb. 18). Es kamen rein basische Katalysatoren, wie Natriumhydroxid (fest bzw. als 25%ige Lösung in Wasser) und ein Ionentauscher, verschiedene Aminosäuren (L-Prolin, L-Histidin, L-Arginin und L-Lysin), sauer-basische-Salzpaare (Ammoniumacetat und Benzoesäure/Pyrrolidin), sowie Scandiumtriflat als Lewis-Säure zum Einsatz. Die Reaktionen fanden in deuteriertem Chloroform statt und wurden $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch untersucht.

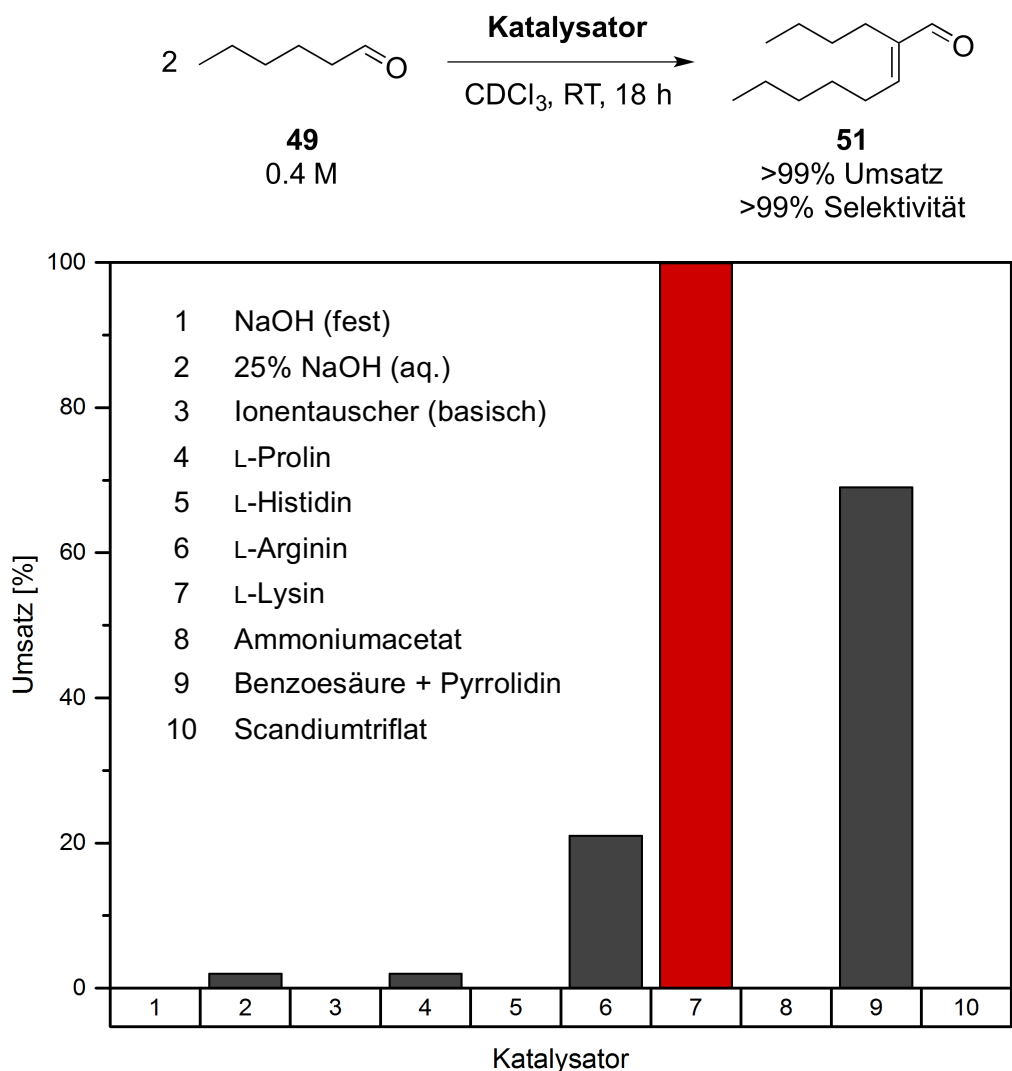


Abb. 18: Katalysator-Screening für die Aldolkondensation in Chloroform.

Lediglich die Aminosäuren L-Arginin und L-Lysin, sowie die Mischung aus Benzoesäure und Pyrrolidin zeigten Umsatz, wobei L-Lysin (20 mol%) als einziger Katalysator vollständigen Umsatz lieferte. Es hat den zusätzlichen Vorteil, dass es in Chloroform zumindest partiell unlöslich und somit potentiell rezyklisierbar ist.

Im nächsten Schritt wurde der zeitliche Verlauf der Aldolkondensation mit L-Lysin in Chloroform untersucht. Hierzu wurden nach zwei, vier, sechs und 24 Stunden Proben entnommen und $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch untersucht (Abb. 19). Bereits nach sechs Stunden lag der Umsatz bei sehr hohen 94%. Die Selektivität lag zu jedem Zeitpunkt bei >99% mit einem *E/Z*-Verhältnis von 98:2.

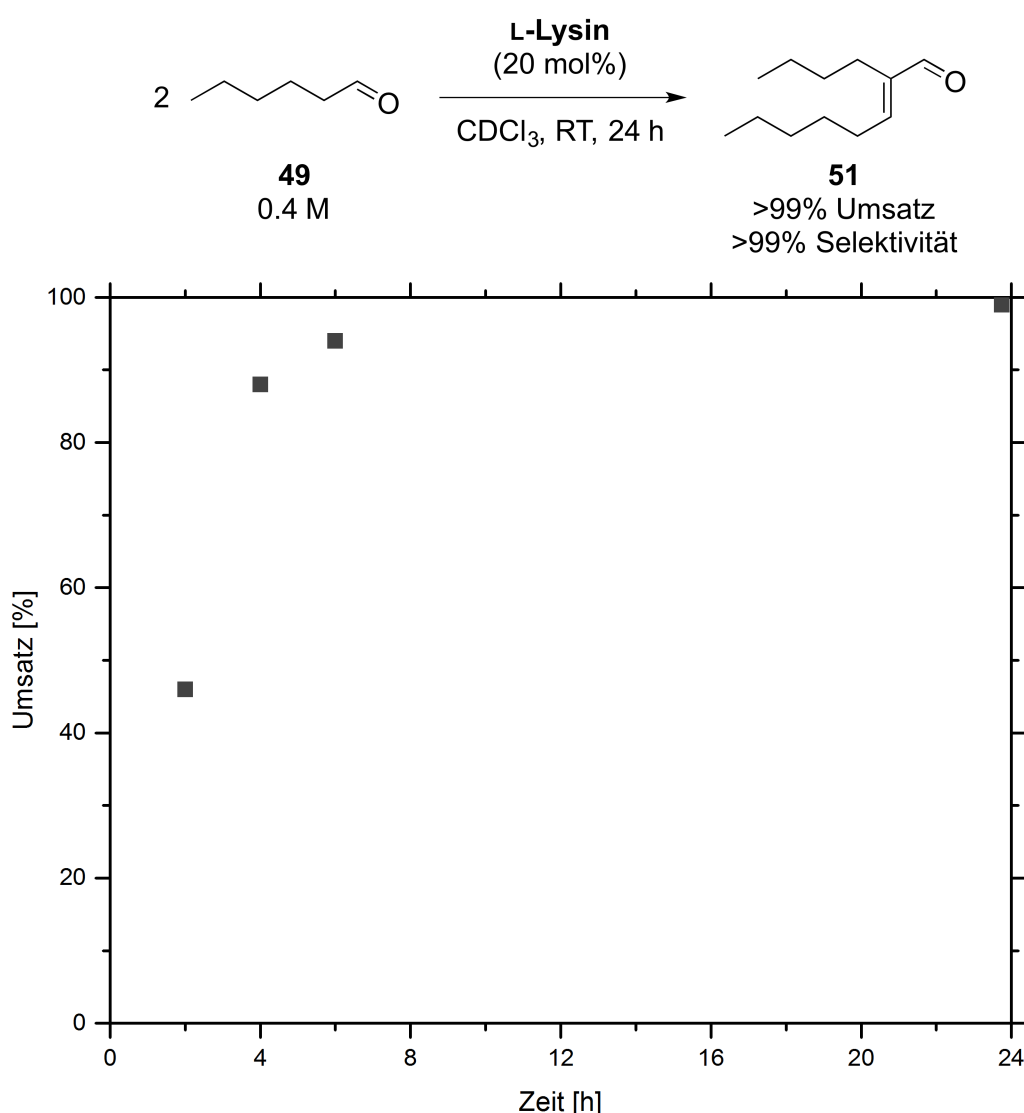
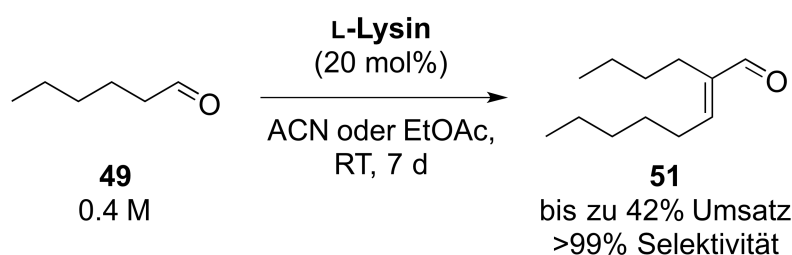


Abb. 19: Zeitlicher Verlauf der Lysin-katalysierten Homo-Aldolkondensation von Hexanal (**49**) in Chloroform.

Die Aldolkondensation in den anderen, für die TEMPO-Oxidation getesteten Lösungsmitteln Acetonitril (ACN) und Ethylacetat (EtOAc) ergab deutlich schlechter Umsätze von

42 bzw. 30%. Die Selektivitäten lagen auch hier konstant hoch bei >99%. Gekreuzte Aldoladditionsprodukte von Hexanal (**49**) mit den Lösungsmitteln wurden nicht beobachtet. Im Gegensatz zu allen bisher betrachteten Reaktionsbedingungen wurden jedoch *E/Z*-Verhältnisse von 90:10 bis 86:14 ermittelt (Tab. 7). Dies könnte sich, je nach Präferenz der En-Reduktase, für einen vollständigen Umsatz als hinderlich erweisen, was sich bei schneller Interkonversion der beiden Isomere jedoch relativieren würde. Findet die Interkonversion statt, ist jedoch nicht schneller als die enzymatische C=C-Reduktion, könnte sie der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein (vgl. Abschnitt 4.7.1.3). Ein möglicher Grund für die schlechteren Umsätze, verglichen mit Dichlormethan oder Methanol (s.u.), könnte eine unterschiedliche Gleichgewichtskonstante der Keto-Enol-Tautomerie sein. Auch die Stabilität des Übergangszustandes ist lösungsmittelabhängig.^[181,182]

Tab. 7: Aldolkondensation von Hexanal (**49**) in Ethylacetat und Acetonitril.



Eintrag	Lösungsmittel	Zeit [d]	Umsatz [%]	<i>E/Z</i>
1	ACN	3	24.9	86:14
2	ACN	7	42.2	90:10
3	EtOAc	3	14.9	87:13
4	EtOAc	7	29.8	88:12

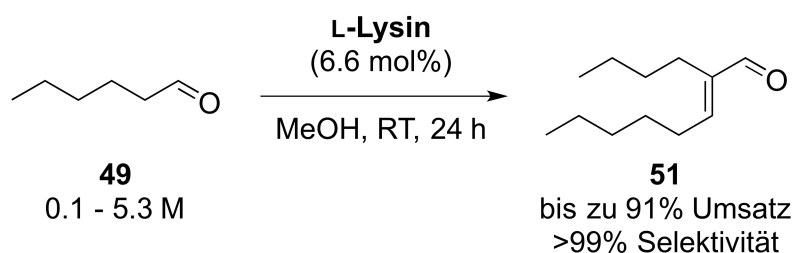
Da im Verlauf der Prozessentwicklung als Cosolvens für die Biotransformationen Methanol gewählt wurde, käme es auch als Solvens für die Aldolkondensation in Frage. Es wurde die Umsetzung von Hexanal (**49**) zu 2-Butyl-2-octenal (**51**) in verschiedenen Konzentrationen mit 6.6 mol% L-Lysin als Katalysator untersucht.^[183] Ebenso wurde der Einsatz von Molekularsieb, zur Bindung des während der Reaktion gebildeten Wassers, sowie Ultraschall, zur Steigerung der Löslichkeit des Katalysators getestet (Tab. 8).

Die Reaktion konnte erfolgreich in einem Konzentrationsbereich von 0.1 bis 5.3 M Hexanal (**49**) durchgeführt werden, wobei das Substrat auch bei 5.3 M noch vollständig in Methanol löslich ist. Der Umsatz stieg durch die Konzentrationserhöhung von 40 auf

86%, was ein Hinweis darauf ist, dass die Reaktion bei niedrigen Konzentrationen durch die Diffusionsgeschwindigkeit limitiert ist. Ein ähnlicher Effekt wurde von WATANABE^[184] für Aldolkondensationen in Wasser beobachtet. Bei 2.2 M Hexanal (**49**) konnte der Umsatz durch Einsatz von Ultraschall von 80% auf 85% nach 24 h bzw. 91% nach 48 h gesteigert werden. Auch der kombinierte Einsatz von Ultraschall und Molekularsieb erhöhte den Umsatz auf 88%. Durch eine Erhöhung der Katalysatorbeladung von 6.6 auf 20 mol% L-Lysin konnte der Umsatz nur geringfügig auf 83% gesteigert werden. In allen Reaktionen lag die Selektivität bei >99% mit einem *E/Z*-Verhältnis von 98:2.

Durch Kombination der höchsten Konzentration mit Ultraschall, Molekularsieb und höherer Katalysatorbeladung könnte ein annähernd quantitativer Umsatz erreicht werden. Im Anschluss könnte diese Reaktionsmischung direkt und ohne weitere Aufarbeitung als Substratlösung in die Biotransformation eingesetzt werden.

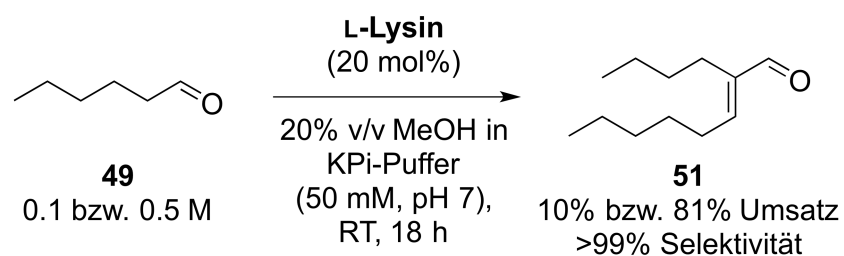
Tab. 8: Lysin-katalysierte Homo-Aldolkondensation von Hexanal (**49**) in Methanol.



Eintrag	Substratkonz. [M]	Umsatz [%]
1	0.1	40.4
2	0.5	67.2
3	1.0	75.8
4	2.2	79.6
5	2.7	78.6
6	4	83.5
7	5.3	85.6
8^a	2.2	85.0 (91.1) ^d
9^b	2.2	87.8
10^c	2.2	83.0

^a Ultraschall, ^b Ultraschall und Molekularsieb, ^c 20 mol% L-Lysin, ^d nach 48 h

Für eine potentielle Kombination der Aldolkondensation mit der Biotransformation in Form einer Eintopf-Reaktion, wurden auch 20% v/v MeOH in KPi-Puffer als Lösungsmittel getestet (Schema 32). Auch hier wurde eine Abhängigkeit von der Substratkonzentration festgestellt. Eine Erhöhung von 0.1 auf 0.5 M führte zu einer Steigerung des Umsatzes von 10 auf 81% nach 18 h.

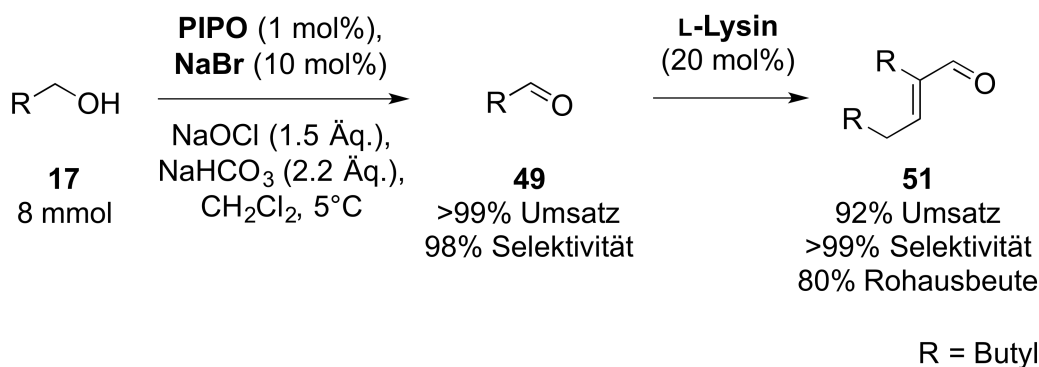


Schema 32: Aldolkondensation von Hexanal (**49**) in 20% v/v MeOH in KPi-Puffer.

4.4 Kombination von Alkohol-Oxidation und Aldolkondensation

Da aufgrund einer fehlenden, effizienten, enzymatischen Alkohol-Oxidation auf die in einem Zwei-Phasen-System aus Dichlormethan und Wasser stattfindende, chemokatalytische TEMPO-Oxidation zurückgegriffen wurde, lag nahe, die Aldolkondensation ebenfalls im organischen Medium durchzuführen. Dies hat den Vorteil, dass die Gleichgewichtslage der Eliminierung von Wasser deutlich günstiger ist. Des Weiteren befindet sich das hydrophobe Produkt der TEMPO-Oxidation nach der Reaktion ohnehin in der organischen Phase und es genügt eine einfache Phasentrennung. Ein Wechsel des Lösungsmittels ist nicht nötig. Zwar konnte gezeigt werden, dass die TEMPO-Oxidation auch in Acetonitril und Ethylacetat erfolgreich durchgeführt werden konnte, eine Aldolkondensation konnte in diesen Lösungsmitteln jedoch nicht realisiert werden.

Entsprechend wurden nach der Oxidation von 1-Hexanol (**17**) zu Hexanal (**49**) mit PIPO, welche >99% Umsatz und 98% Selektivität erreichte, die Phasen getrennt und die organische Phase mit 20 mol% L-Lysin versetzt. Nach 16 h Reaktionszeit konnte lediglich ein Umsatz von 69% festgestellt werden. Erst durch weitere Zugabe von 20 mol% L-Lysin und eine Gesamtreaktionszeit von 48 h konnte mit 92% annähernd quantitativer Umsatz erzielt werden. Die Selektivität lag bei >99% und die Rohausbeute nach Entfernen des Lösungsmittels bei 80% 2-Butyl-2-octenal (**51**) (Schema 33). Ein Grund für die notwendige Erhöhung der Menge an L-Lysin konnte nicht gefunden werden. In Vergleichsexperimenten konnte ein Einfluss von PIPO und mit Wasser gesättigtem organischem Lösungsmittel auf die Aldolkondensation ausgeschlossen werden (siehe Abschnitte 7.5.3 und 7.5.4). Beide Versuche zeigten quantitative Umsätze nach 4 h Reaktionszeit.



Schema 33: Sequenzielle Kombination der PIPO-katalysierten Alkohol-Oxidation mit der Lysin-katalysierten Aldolkondensation.

4.5 Enzymatische C=C-Reduktion α,β -ungesättigter Aldehyde

4.5.1 Einsatz von isoliertem Enzym

4.5.1.1 Einleitendes Screening nach En-Reduktasen

In einem ersten photometrischen Screening wurden insgesamt 12 En-Reduktasen (als Zellrohextrakte (ZRE) überexprimiert in *E. coli* BL21 (DE3)) auf ihre Aktivität bezüglich 2-Butyl-2-octenal (**51**) hin untersucht (Abb. 20).

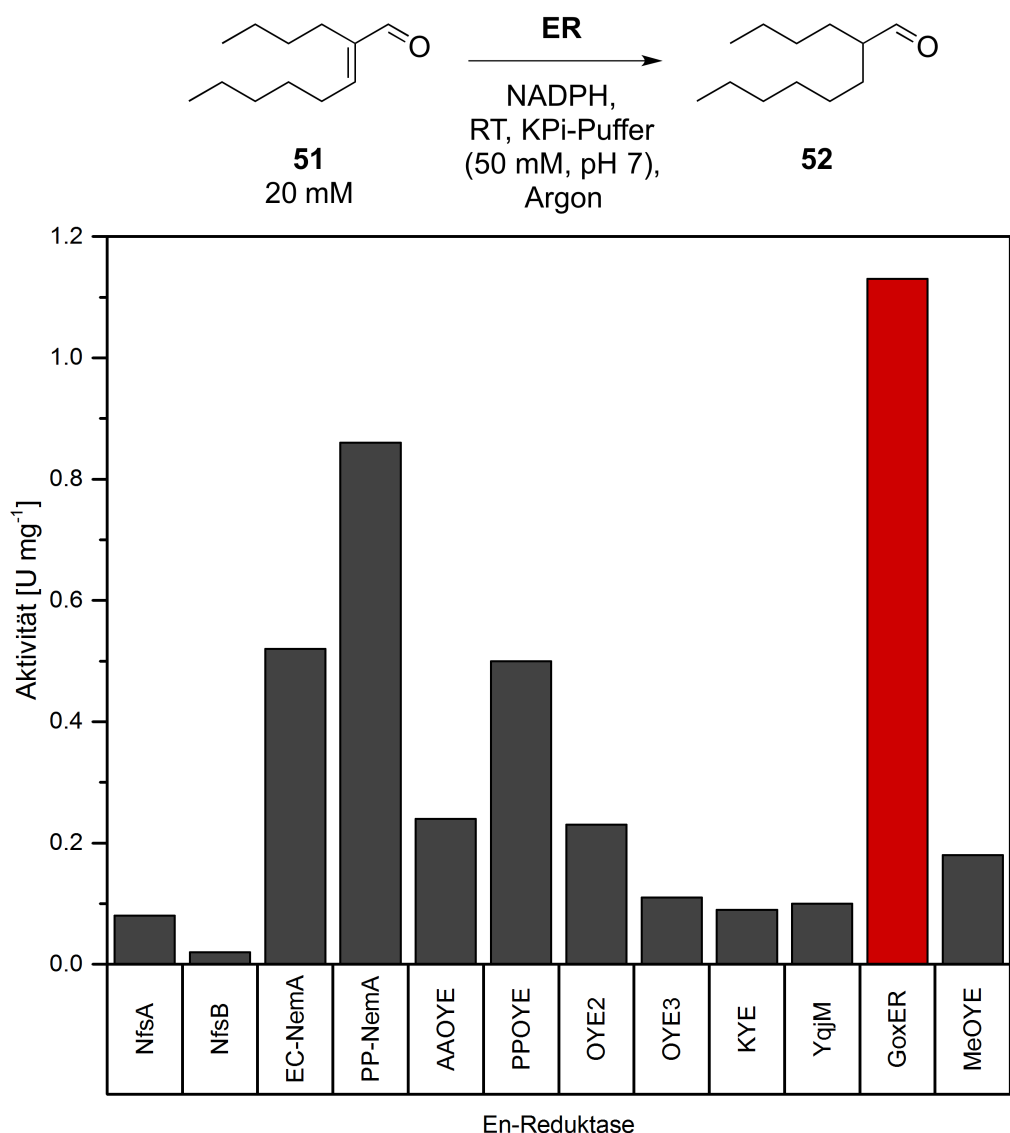


Abb. 20: Aktivitätsassay verschiedener En-Reduktasen bezüglich der C=C-Reduktion von 2-Butyl-2-octenal (**51**). NfsA/B und EC-NemA: aus *Escherichia coli*, PP-NemA und PPOYE: aus *Pseudomonas putida*, AAOYE: aus *Acetobacter acetii*, OYE2/3: aus *Saccharomyces cerevisiae*, KYE: aus *Kluyveromyces lactis*, YqjM: aus *Bacillus* sp., GoxER: aus *Gluconobacter oxydans*, MeOYE: aus *Methylobacter extorquens*.

Es wurde NADPH als Cofaktor eingesetzt, da ERs diesen meist gegenüber NADH bevorzugen.^[132] Die meisten Enzyme zeigten eine eher geringe Aktivität von $\leq 0.2 \text{ U mg}^{-1}$. Moderate bis gute Aktivitäten zwischen 0.5 und 0.9 U mg^{-1} wurden für EC-NemA aus *E. coli*, sowie PP-NemA und PPOYE aus *P. putida* gemessen. Die höchste Aktivität erreichte die GoxER aus *G. oxydans*^[167] mit über 1.1 U mg^{-1} . Da die Bestimmung der Aktivität die Stabilität des Katalysators über die Reaktionszeit nicht berücksichtigt, liefert sie lediglich einen Anhaltspunkt für einen potentiell guten Biokatalysator. Aufschluss über die tatsächliche Eignung kann nur ein präparatives Screening geben. Ein solches wurde zunächst im 1 mL-Maßstab mit 10 mM 2-Butyl-2-octenal (**51**) und D-Glucose/GDH^[185] zur Cofaktorregenerierung für die o.g. 12 ERs durchgeführt (Abb. 21).

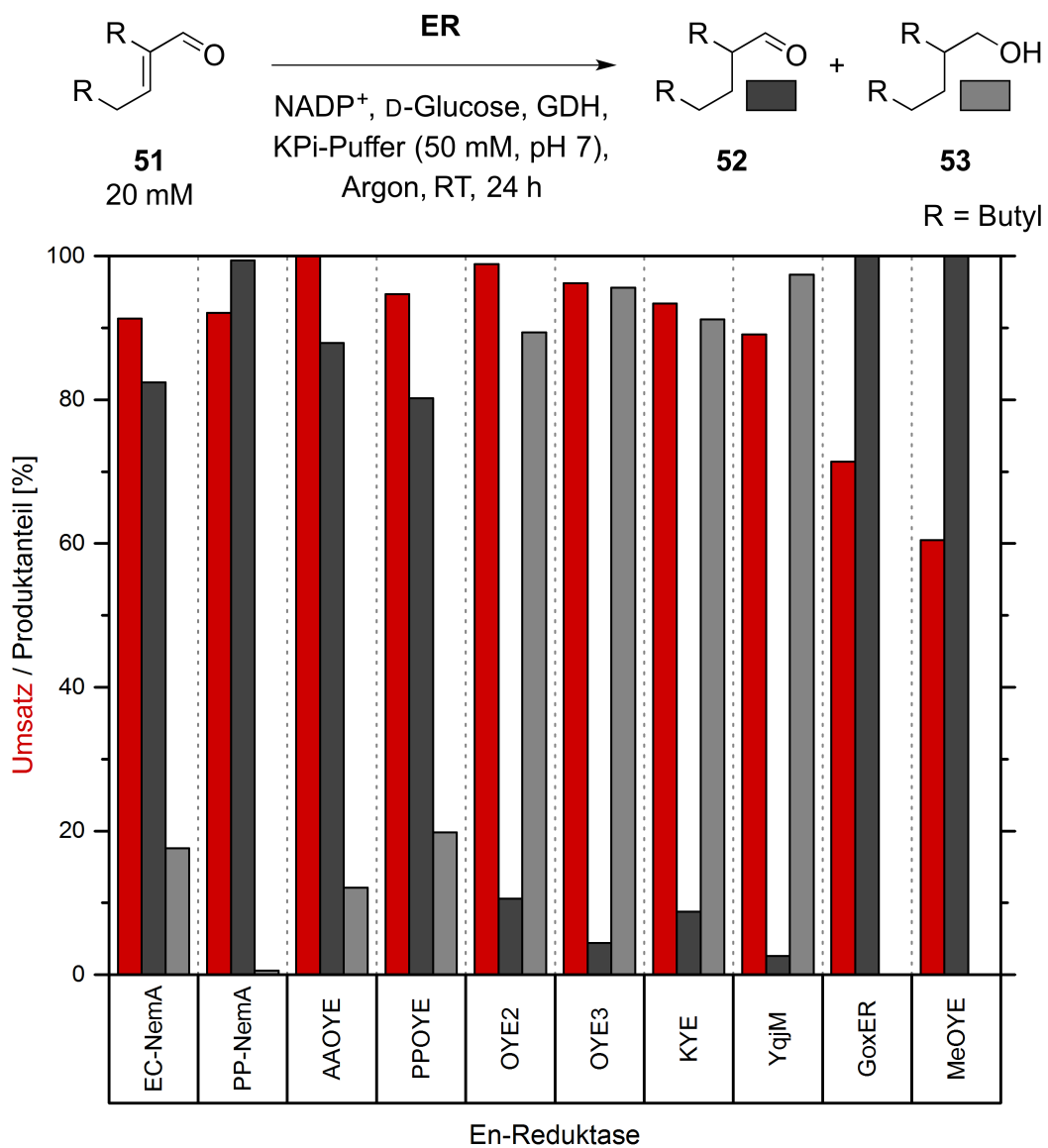


Abb. 21: Mikropräparatives Screening der En-Reduktasen (vgl. Abb. 20) im 1 mL-Maßstab bezüglich 2-Butyl-2-octenal (**51**).

Das sonst auch übliche System aus Ammoniumformiat und Formiatdehydrogenase (FDH) kam aufgrund der schlechten bzw. nicht vorhandenen Aktivität der FDH gegenüber NADP^+ nicht zum Einsatz.^[186,187] Für alle Enzyme lagen die Gesamtumsätze bei >60%, in der Regel sogar >90%. Interessant ist, dass v.a. bei OYE2, OYE3, KYE und YQJM fast ausschließlich und bei EC-NemA, AAOYE und PPOYE zwischen 10 und 20% 2-Butyl-1-octanol (**53**) erhalten wurden. Dies ist ein, aus der Verwendung von ERs in Ganzzellkatalysatoren bekannter Umstand, der zunächst wünschenswert scheint, da **53** das Endprodukt des Gesamtprozesses ist. Allerdings ist diese Nebenaktivität, die vermutlich auf *E. coli* eigene ADHs zurückzuführen ist, unkontrolliert. Keiner der Zellrohextrakte zeigte signifikante ADH-Aktivität (siehe Abschnitt 7.7.3), was für eine grundsätzlich schlechte Aktivität der ADHs gegenüber 2-Butyl-2-octenal (**51**) oder relativ geringes Expressionslevel spricht. Weiterhin würde bei Erhöhung der Substratkonzentration die Menge an ADH nicht für einen vollständigen Umsatz ausreichen. Vier der acht *E. coli* eigenen ADHs (yqhD, yahK, yjgB und adhP) wurden auf pET28a in *E. coli* BL21 (DE3) überexpressiert. Die Zellrohextrakte dieser Expressionen zeigten jedoch keine signifikante Aktivität gegenüber 2-Butyl-2-octenal (**51**) (siehe Abschnitt 7.7.4).

Aufgrund der hohen photometrischen Aktivität und des guten Umsatzes im präparativen Screening wurde die GoxER für die weiteren Untersuchungen gewählt.

4.5.1.2 Parameter-Screening isolierter GoxER

E. coli BL21 (DE3) mit N-terminal, His-getaggtter GoxER aus einer Hochzelldichtefermentation wurden vom AK HUMMEL zur Verfügung gestellt. Sie wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Mittels einer statistischer Versuchsplanung (*Design of Experiments*, DoE) und *Response Surface Analyse* (Software: Stat-Ease Design-Expert® 10) wurde die optimale Kombination an Reaktionsparametern (Enzymmenge, Temperatur und Reaktionszeit) einer Biotransformation von 2-Butyl-2-octenal (**51**) zu 2-Butyloctanal (**52**) im 5 mL-Maßstab bestimmt. Aufgrund der geringen Löslichkeit des Substrats **51** wurden 20% v/v 2-Methyltetrahydrofuran als Cosolvens verwendet (vgl. Abschnitt 4.7.2.1).^[188] Es wurde ein dreidimensionaler Versuchsplan nach dem Box-Wilson-Modell (*Central Composite Design*) gewählt, bei dem zum vollfaktoriellen Plan (acht Eckpunkte) noch ein Zentralpunkt, sowie sechs Sternpunkte (hier: Flächenpunkte) hinzukommen (Abb. 22). Durch die zusätzlichen Punkte erhöht sich zwar die Anzahl der Experimente, jedoch können so nicht nur lineare, sondern auch quadratische Abhängigkeiten der betrachteten Parameter untersucht werden.^[189–193]

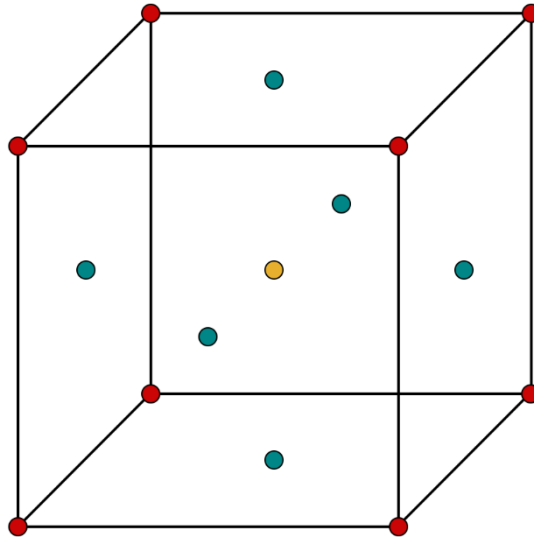


Abb. 22: Geometrisches Modell eines dreidimensionalen Box-Wilson-Versuchsplans mit acht Eckpunkten (rot), einem Zentralpunkt (gelb) und sechs Flächenpunkten (grün). Die drei Dimensionen repräsentieren die drei betrachteten Reaktionsparameter.

Die, aus der *Response Surface Analyse* resultierende Hyperfläche zeigt die theoretischen Umsätze aller Kombinationen aus Temperatur und Reaktionszeit innerhalb der jeweils betrachteten Grenzen (Abb. 23). Die Enzymmenge wurde für diese Darstellung als konstant 144 U mmol^{-1} gewählt. Dies entspricht dem errechneten Optimalwert für das globale Umsatzmaximum. Die Beziehung zwischen Umsatz und Reaktionszeit ist erwartungsgemäß. Bei 6 h liegt er zwischen 10 und 40%. Mit steigender Reaktionszeit steigt der Umsatz annähernd linear mit einem leicht sigmoidalen Verlauf auf 90 bis 98% nach 48 h. Auch die Abhängigkeit des Umsatzes von der Temperatur ist für enzymatische Reaktionen im Rahmen der Erwartungen. Da die Aktivität von Enzymen u.a. von deren dreidimensionaler Struktur und diese wiederum von der Temperatur abhängig ist, kann insbesondere eine zu hohe Temperatur zu Änderungen in der Struktur und damit zum Verlust der Aktivität, bis hin zur vollständigen Denaturierung und Deaktivierung führen. Den größten Einfluss auf den Umsatz hat eine Temperaturänderung bei kurzen Reaktionszeiten. Eine lange Reaktionszeit kompensiert Abweichungen vom Temperaturoptimum. Die Werte von Temperatur und Reaktionszeit bei denen der Umsatz theoretisch maximal ist, liegen bei $18 \text{ }^\circ\text{C}$ und 48 h. Die Reaktionen wurden unter Argon-Atmosphäre durchgeführt und es konnte keine korrespondierende Säure detektiert werden. Die Selektivitäten aller Reaktionen lagen bei $>99\%$.

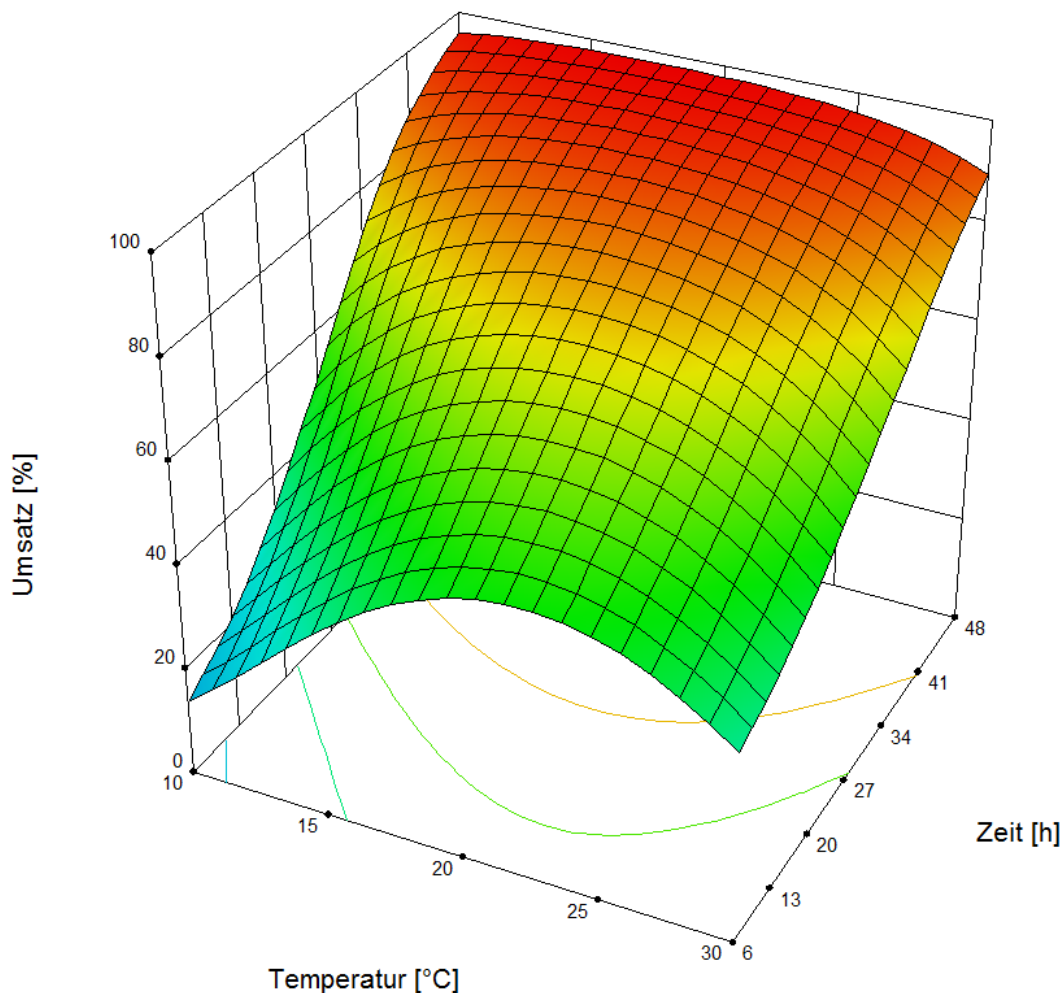
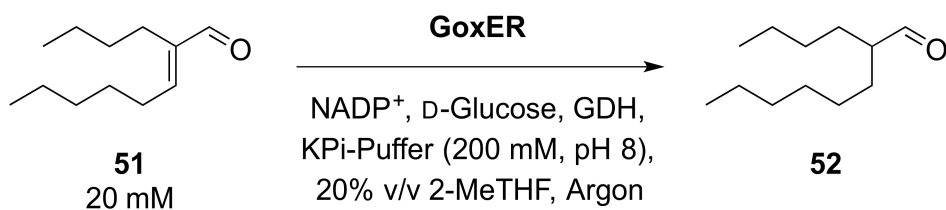


Abb. 23: *Response Surface Analysis* der GoxER-katalysierten Biotransformation von 2-Butyl-2-octenal (**51**) zu 2-Butyloctanal (**52**) bezüglich der Parameter Enzymmenge (hier konstant 144 U mmol^{-1}), Temperatur und Reaktionszeit. (Software: Stat-Ease Design-Expert[®] 10)

Die Qualität des Modells lässt sich anhand des Vergleichs der experimentellen mit den theoretischen Werten bestimmen (Abb. 24). Jeder der 18 experimentell bestimmten Umsätze wurde gegen seinen theoretischen Wert aufgetragen, wobei die Diagonale ein perfektes Modell darstellt, bei dem jeder experimentelle Wert dem theoretischen entspricht. Das vorliegende Modell beschreibt die experimentellen Daten sehr gut und besitzt ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0.9844$. Lediglich im mittleren Wertebereich weicht das Modell um bis zu 10% ab. Bei hohen und niedrigen Umsätzen liegt die Abweichung bei <5%.

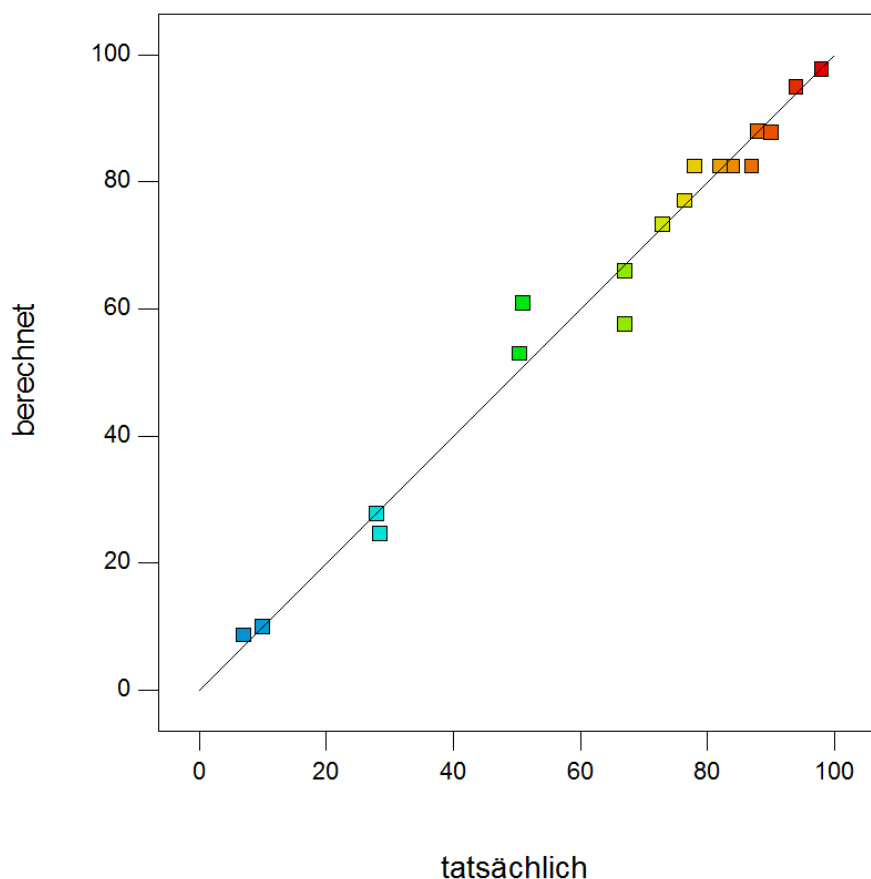
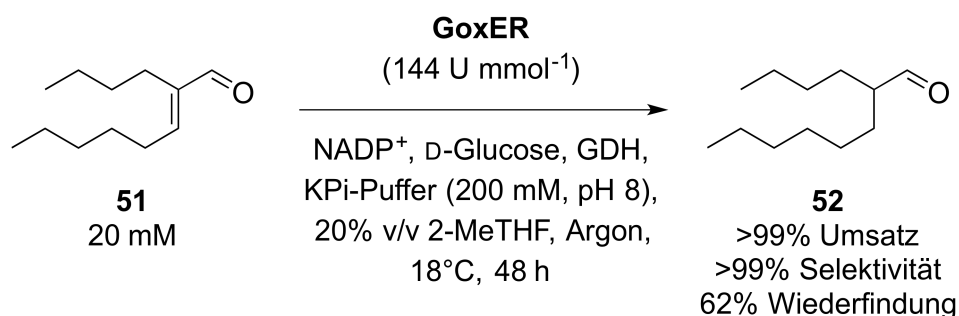


Abb. 24: Vergleich der experimentell bestimmten, mit den theoretischen Umsätzen des Modells. Die diagonale Linie stellt ein perfektes Modell dar, bei dem jeder experimentelle dem theoretischen Wert entspricht.

Im nächsten Schritt wurde mit den errechneten, optimalen Reaktionsparametern eine Biotransformation durchgeführt (Schema 34) und es wurde ein quantitativer Umsatz mit einer Selektivität von >99% erreicht. Sowohl *E*- als auch *Z*-**51**, wobei letzteres nur einen Anteil von ca. 2% am Substrat ausmacht, wurden vollständig umgesetzt.



Schema 34: DoE-optimierte Reduktion von 2-Butyl-2-octenal (**51**) zu 2-Butyloctanal (**52**) mithilfe von GoxER.

Auffällig ist die geringe Wiederfindung, die mittels gaschromatographischer Analyse mit externem Standard aus der organischen Extraktionsphase erfolgte. Da eine Simulation

der Aufarbeitung ohne Enzymzusatz gute Wiederfindungswerte von 87 bis 94% lieferte (vgl. Abschnitt 7.7.8), ist anzunehmen, dass das Substrat bzw. Produkt durch das Enzym zurückgehalten wird. Da das Enzym bei Extraktion der Reaktionsmischung präzipitiert, besteht die Möglichkeit, dass die Verbindungen innerhalb des Präzipitats eingeschlossen werden oder gar eine kovalente Bindung mit dem Enzym ausbilden. Letzteres wird auch von der Tatsache unterstützt, dass bereits bei Inkubation einer rein wässrigen Enzymlösung mit 2-Butyl-2-octenal (**51**) oder 2-Butyloctanal (**52**) nach wenigen Minuten mit bloßem Auge sichtbare Präzipitation auftritt. Dies wurde auch für andere Aldehyde wie Benzaldehyd (**64**) und *E*-2-Hexenal (**65**) beobachtet (vgl. Abschnitt 7.7.9). Insbesondere Lysin-Reste, die aufgrund ihres polaren Charakters zumeist an der Oberfläche von Proteinen lokalisiert sind, kommen für eine kovalente Bindung mit den Aldehyden in Form einer Schiff-Base in Frage. Auch eine Michael-Addition nucleophiler Aminosäuren, wie Lysin, Histidin oder Arginin an Alkenale wurde bereits in der Literatur beschrieben.^[194–200]

Da ein unterschiedlich starker Verlust von 2-Butyl-2-octenal (**51**) und 2-Butyloctanal (**52**) die Validität der Umsatzbestimmung negativ beeinflussen würde, wurde eine wässrige Enzymlösung mit einer Mischung (56:44) der beiden Verbindung inkubiert und das Verhältnis über drei Stunden verfolgt (Abb. 25).

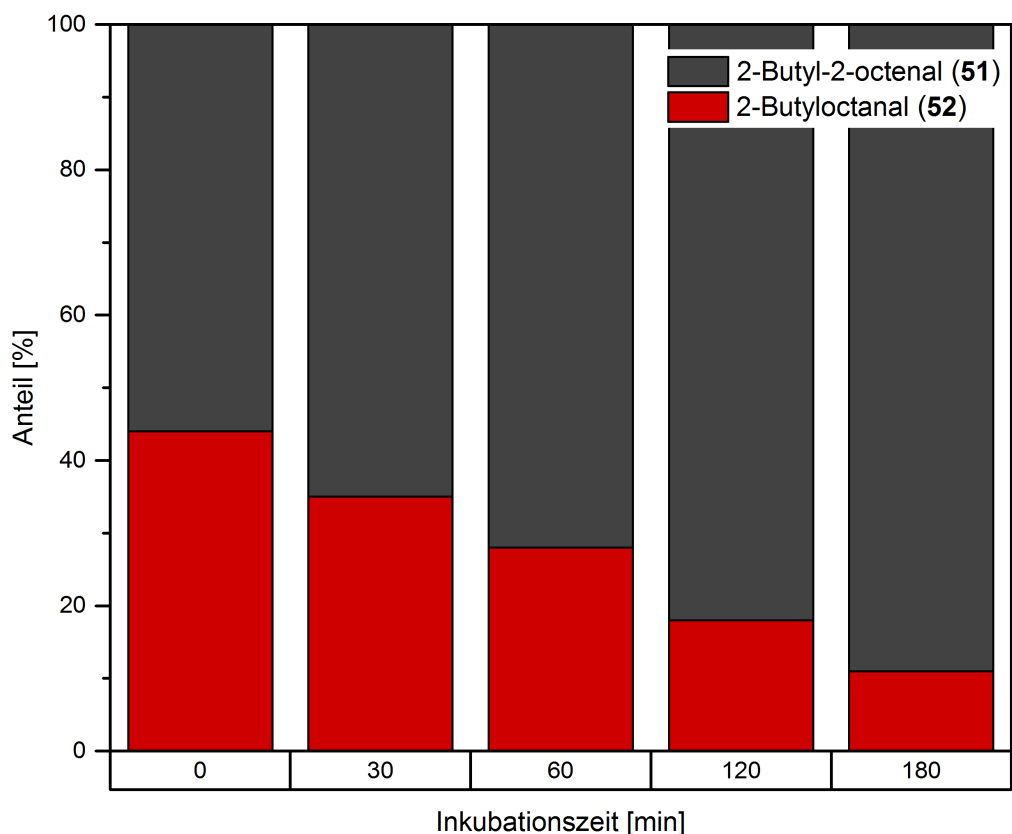


Abb. 25: Relativer Verlust von 2-Butyl-2-octenal (**51**, grau) und 2-Butyloctanal (**52**, rot) nach Inkubation mit GoxER.

Bereits nach 30 min sank der Anteil an 2-Butyloctanal (**52**) von 44 auf 35% und nach drei Stunden weiter auf nur noch 11%. Dies zeigt, dass der Verlust an Produkt **52** deutlich größer ist, als der des Substrats **51**. Zum einen ist dies wiederum ein Hinweis darauf, dass es sich um eine kovalente Bindung handelt, da eine der Verbindungen in größerer Menge verloren geht, zum anderen bedeutet es, dass die erhaltenen Umsätze nicht unbedingt die tatsächlichen Umsätze widerspiegeln. Allerdings werden tendenziell niedrigere als die tatsächlichen Umsätze erhalten werden. Eine Erklärung für die unterschiedliche Reaktivität könnte die Stabilität der Verbindungen sein. Der gesättigte Aldehyd **52** besitzt gegenüber dem konjugierten Doppelbindungssystem des Substrats **51** die weniger stabile Struktur und wird daher eher mit dem Protein reagieren.

4.5.1.3 Bestimmung kinetischer Parameter der GoxER

Enzyme können verschiedenen Arten von Inhibierung unterliegen, die ihre Aktivität negativ beeinflussen. Bei der Substratinhibierung führt eine zu hohe Substratkonzentration entweder zur gegenseitigen Behinderung der Substratmoleküle bei der Bindung an das aktive Zentrum oder es existiert eine nicht-katalytische Bindungsstelle zur allosterischen Regulation der Enzymaktivität.^[201] Auch die Produktinhibierung ist ein häufig auftretendes Phänomen, welches v.a. auf die strukturelle Ähnlichkeit von Substrat und Produkt und die damit einhergehende Konkurrenz um das aktive Zentrum zurückzuführen ist.^[202]

Es wurde eine mögliche Substratinhibierung der GoxER durch *E*-2-Hexenal (**65**) und 2-Butyl-2-octenal (**51**) untersucht, indem die spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms photometrisch bei verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelt wurde (Abb. **26**). Für *E*-2-Hexenal (**65**) wurde eine maximale Aktivität von 4.7 U mg^{-1} bei 1 mM bestimmt. Bei steigender Substratkonzentration sank die Aktivität bis 42 mM stetig auf 1.4 U mg^{-1} , was für eine Substratinhibierung spricht. Für 2-Butyl-2-octenal (**51**) hingegen lag die Aktivität zwar mit etwa 2.3 U mg^{-1} generell niedriger als für *E*-2-Hexenal (**65**), dafür blieb sie über den gesamten betrachteten Konzentrationsbereich konstant. Der Grund hierfür ist vermutlich die niedrige Löslichkeit von 2-Butyl-2-octenal (**51**), die bei etwa 0.7 mM (berechnet mit *ACD/Labs* Software) liegt (siehe Tab. 4). Hierdurch kann die Konzentration an gelöstem Substrat nicht den für eine eventuelle Inhibierung nötigen Wert erreichen. Tatsächlich liegt die Aktivität im unteren Konzentrationsbereich (0.1 mM) mit 2.3 U mg^{-1} trotz niedriger Löslichkeit höher als für *E*-2-Hexenal (**65**) mit 1.9 U mg^{-1} , was trotz der komplexeren Struktur von 2-Butyl-2-octenal (**51**) auf einen niedrigeren K_m -Wert hinweist.

In einem Gesamtprozess mit doppelter Reduktion nimmt 2-Butyloctanal (**52**) die Stellung eines Intermediates ein und wird direkt von einer ADH weiter umgesetzt, wodurch seine

Konzentration während des Gesamtprozesses niedrig bleibt. Zudem ist eine Produktinhibierung durch 2-Butyloctanal (**52**) oder, in einem Gesamtprozess, durch 2-Butyl-1-octanol (**53**) aufgrund der niedrigen Löslichkeiten dieser beiden Verbindungen unwahrscheinlich. Eine niedrige Produktlöslichkeit ist generell von Vorteil, da das Produkt aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt wird und so das Gleichgewicht in Richtung des Produkts verschoben wird.

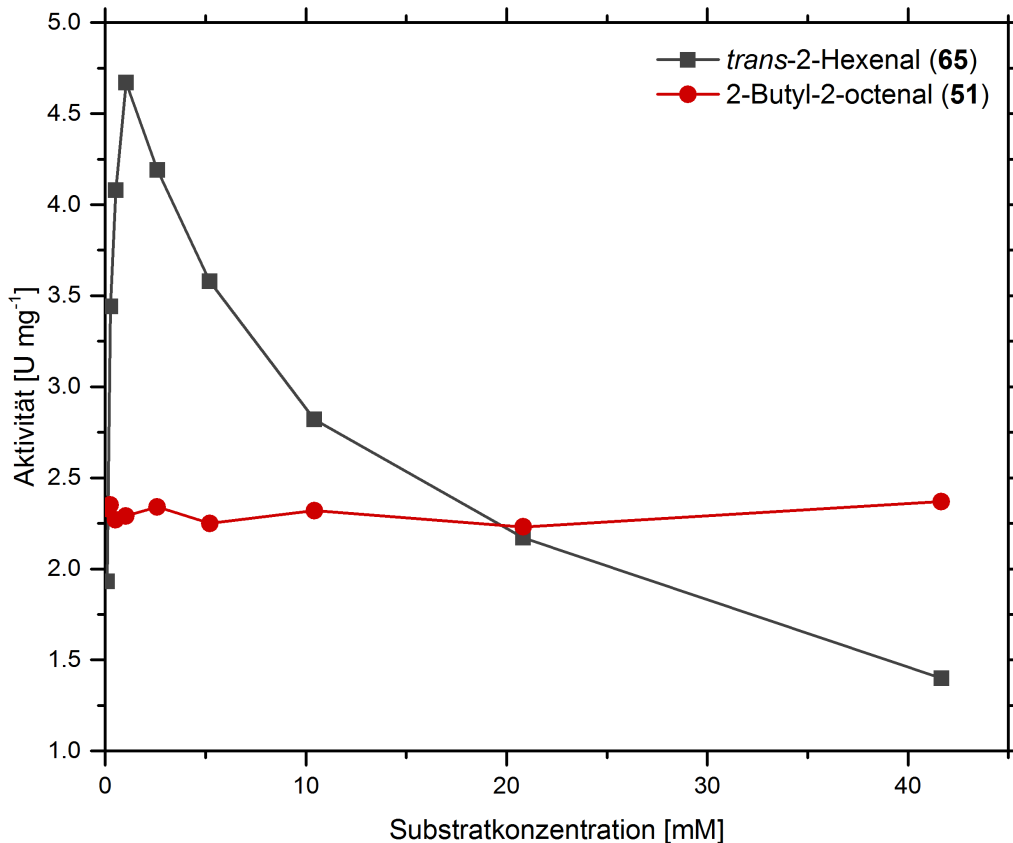


Abb. 26: Untersuchung der Substratinhibierung der GoxER durch trans-2-Hexenal (**65**) und 2-Butyl-2-octenal (**51**)

Ein weiteres Kriterium ist die Stabilität von Enzymen in Gegenwart der Reaktionskomponenten. Häufig beeinflusst beispielsweise ein organisches Cosolvens die Stabilität negativ. Aber auch Substrate und Produkte mit reaktiven funktionellen Gruppen können das Enzym deaktivieren und müssen berücksichtigt werden. Dabei ist die Stabilität nicht notwendigerweise konzentrationsabhängig. Eine Deaktivierung ist auch bei schlecht löslichen Verbindungen möglich, da sie auch an der Grenzfläche stattfinden kann. Es wurde die Stabilität der GoxER durch 24-stündige Inkubation in 20 mM 2-Butyl-2-octenal (**51**) bzw. 2-Butyloctanal (**52**) und anschließende photometrische Bestimmung der Aktivität untersucht (Abb. 27). Das resultierende Gemisch bei dieser Konzentration ist eine Suspension, da die Löslichkeiten bei 0.7 bzw. 0.2 mM liegen (siehe Tab. 4). In beiden Fällen konnte ein Rückgang der Aktivität um 40 bzw. 50% beobachtet werden. Möglichkeiten

zur Erhöhung der Stabilität von Enzymen bieten deren Immobilisierung oder der Einsatz von Ganzzellkatalysatoren, bei denen sich die Enzyme in ihrer nativen Umgebung befinden und durch Kompartimentierung vor z.B. organischem Cosolvens oder großen Konzentrationen an Substrat oder Produkt geschützt werden.

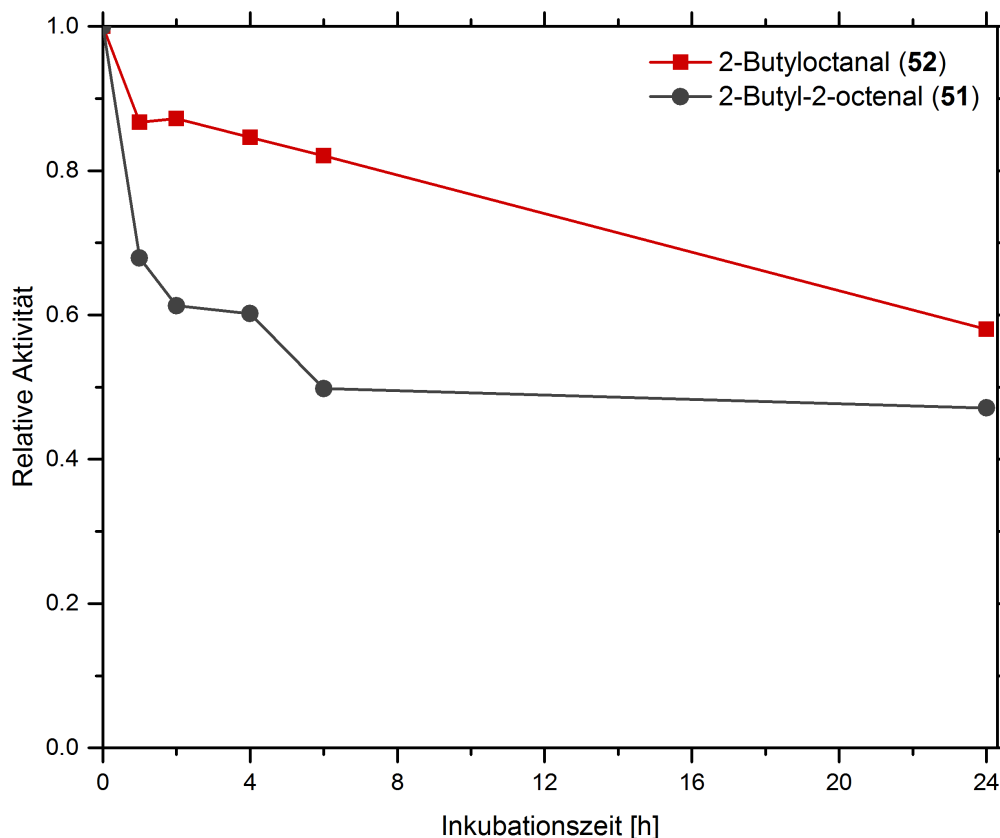
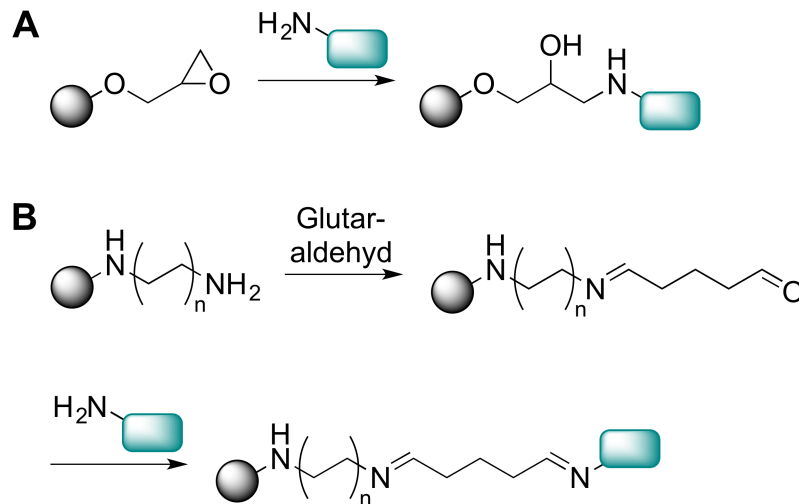


Abb. 27: Photometrische Aktivitätsbestimmung der GoxER ggü. 2-Butyl-2-octenal (**51**) nach Inkubation mit 20 mM 2-Butyloctanal (**52**, rot) bzw. 2-Butyl-2-octenal (**51**, grau). Die Verbindungslinien dienen lediglich der besseren Visualisierung und stellen keine gemessenen Werte dar.

4.5.2 Enzymimmobilisierung

Die Immobilisierung von Enzymen an polymeren Trägermaterialien kann ihre Stabilität erhöhen und durch Rezyklisierung zu einer Reduktion der Katalysatorbeladung führen. Ein Nachteil ist vor allem der Verlust an Aktivität, der in der Regel mit der Immobilisierung einhergeht. Aber auch ein limitierter Massentransfer und eine niedrige mechanische Stabilität des Immobilisats können sich negativ auswirken. Neben der hier betrachteten kovalenten Immobilisierung an z.B. Amin- oder Epoxid-basierte Träger besteht auch die Möglichkeit einer Immobilisierung durch nicht kovalente Adsorption oder ionische Interaktion, sowie den Einschluss des Enzyms, z.B. in Superabsorber, oder eines kovalenten Cross-Linkings (CLEA).^[203–218] Bei der kovalenten Bindung werden in der Regel freie Amin-Funktionen (v.a. Lysin-Reste) an der Oberfläche des Enzyms funktionalisiert. Bei

der Reaktion mit Epoxid-Trägern fungieren sie als ringöffnendes Nucleophil und es entsteht ein β -Hydroxyamin (Schema 35A). Amin-Träger werden zunächst mit Glutaraldehyd, welches auch als Spacer dient und für einen größeren Abstand zwischen Träger und Enzym sorgt, funktionalisiert. Es bildet sich das Imin zwischen Glutaraldehyd und dem Amin des Trägers und es bleibt eine freie Aldehyd-Gruppe, welche wiederum mit einem Amin an der Oberfläche des Enzyms reagieren und ein Imin bilden kann (Schema 35B).^[219]



Schema 35: Immobilisierung von Enzymen (grüner Quader) an (A) Epoxid- und (B) Amin-basierte Trägermaterialien (graue Kugel).^[219]

4.5.2.1 Auswahl eines geeigneten Trägers

Es wurden zwei Epoxid- und ein Amin-Träger der Firma Resindion (EP113, EP403 und HA113/S) für die Immobilisierung der GoxER eingesetzt. Alle Träger basieren auf einem Methacrylat-Polymer.^[219] Der Amin-Träger wurde zunächst mit wässriger Glutaraldehyd-Lösung inkubiert und gewaschen. Die Epoxid-Träger wurden ohne weitere Modifikation mit einer Lösung der GoxER in KPi-Puffer inkubiert. Der Erfolg der Immobilisierung wurde über die Beladungseffizienz quantifiziert. Hierzu wurde die Differenz aus der Proteinkonzentration der ursprünglichen Proteinlösung, mit der des Überstands nach der Inkubation gebildet und durch die anfängliche Proteinkonzentration geteilt.

Bei der Immobilisierung auf den Amin-Träger wurden trotz intensiven Waschens nach der Modifikation mit Glutaraldehyd, eine große Menge präzipitiertes Enzym festgestellt. Da bereits zuvor eine Empfindlichkeit der GoxER gegenüber Aldehyden beobachtet wurde, wurde (siehe Abschnitt 4.5.1.3) davon ausgegangen, dass restliches Glutaraldehyd zur Präzipitation führte. Bei der Verwendung der Epoxid-Träger EP113 und EP403 wurde kein präzipitierendes Protein festgestellt. Sie wurden zum Vergleich zunächst derselben Immobilisierungsprozedur unterzogen und es wurden Beladungseffizienzen von

29 bzw. 34% für EP113 (Tab. 9, Einträge 1 und 2) und 43 bzw. 58% für EP403 (Einträge 3 und 4) erhalten, weshalb für die folgenden Versuche EP403 als Träger gewählt wurde.

Tab. 9: Immobilisierung von GoxER auf Epoxid-Träger.

Eintrag	Träger [mg]	Inkubations-temp. [°C]	Volumen ^a [mL]	Protein-konz. vor [mg mL ⁻¹]	Protein-konz. nach [mg mL ⁻¹]	Beladungseffizienz [%]
1	EP113 25.0	25	1	2.21	1.46	34
2	EP113 25.3	25	1	2.21	1.58	29
3	EP403 25.3	25	1	2.21	0.93	58
4	EP403 25.3	25	1	2.21	1.27	43
5 ^b	EP403 307.1	10	12.5	2.20	0.17	92
6 ^b	EP403 304.5	10	12.5	2.28	0.29	87
7 ^b	EP403 300.6	10	25	2.29	0.12	95
8 ^b	EP403 300.4	10	25	2.27	0.14	94
9 ^b	EP403 306.4	10	25	2.28	0.12	95
10 ^b	EP403 300.1	10	25	2.28	0.15	94

^a Volumen der zur Inkubation verwendeten Enzymlösung, ^b lyophilisierter Träger, dadurch absolut ca. 50% mehr Träger verwendet.

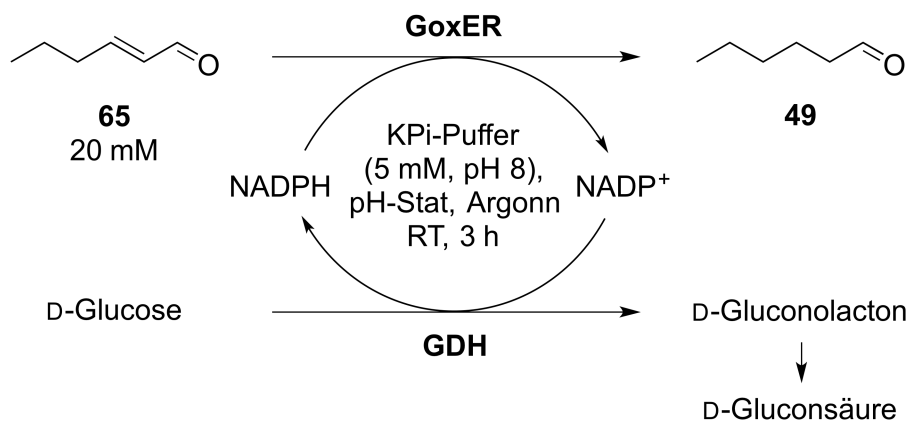
Zur Vereinheitlichung der Prozedur wurde der Träger in den folgenden Versuchen vor und nach der Immobilisierung lyophilisiert, was zu einem Massenverlust des Trägermaterials von ca. 50% führte, sodass im Vergleich zu den ersten Versuchen absolut etwa doppelt so viel Träger eingesetzt wurde. Hierdurch konnte in einer Immobilisierung mit 12-fach höherem Volumen und 12-fach größerer Trägermenge mit ca. 90% eine deutlich höhere Beladungseffizienz erreicht werden (Einträge 5 und 6). Durch Reduktion der Inkubationstemperatur auf 10°C sollte einem Aktivitätsverlust vorgebeugt werden. Die Beladungseffizienz blieb jedoch mit 95% auch bei Verdoppelung der verwendeten Enzymmenge (durch Verdopplung des Volumens an Enzymlösung) konstant hoch (Einträge 7

bis 10). Das Verhältnis von Träger zur Enzym entsprach hier etwa dem der ersten Versuche (Einträge 3 und 4), sodass als einzige veränderte Variable die Inkubationstemperatur auch einen positiven Effekt auf die Beladungseffizienz hat. Die Beladung (nicht Beladungseffizienz), also die immobilisierte Proteinmenge pro Menge Immobilisat, liegt bei etwa 16% w/w (für Einträge 7 bis 10). Tatsächlich ist die Masse des Lyophilisats nach der Immobilisierung jedoch deutlich höher, was vermutlich auf die hohe Konzentration an Puffersalzen (1 M) zurückzuführen ist. Zu beachten ist daher, dass im Folgenden die Beladung auf die tatsächliche Masse des Lyophilisat, nicht die theoretische Masse (Summe aus Träger und Protein) bezogen ist.

4.5.2.2 Bestimmung der Restaktivität immobilisierter GoxER

Durch die Immobilisierung verlieren Enzyme an Aktivität, die durch Erhöhung der Katalysatormenge kompensiert werden muss, was wiederum mit höheren Kosten verbunden ist. Ein möglichst niedriger Aktivitätsverlust und damit auch eine möglichst hohe Restaktivität sind erstrebenswert. Da immobilisierte Enzyme nicht löslich sind, kommt aufgrund der auftretenden Streueffekte ein photometrischer Aktivitätsassay nicht in Frage. Es wurde daher ein präparativer Ansatz zur Bestimmung der Aktivität gewählt, bei dem die äquivalente Bildung von Gluconsäure zur Cofaktorregenerierung genutzt wurde (Tab. 10).

Tab. 10: Bestimmung der Restaktivität immobilisierter GoxER.



Enzymformulierung	Menge ^c [mg]	Aktivität [U]	Spezifische Aktivität ^d [U mg ⁻¹]
freies Enzym ^a	5.1 (3.3)	0.94	0.29
immobilisiert ^b	88.7 (3.5)	0.62	0.18

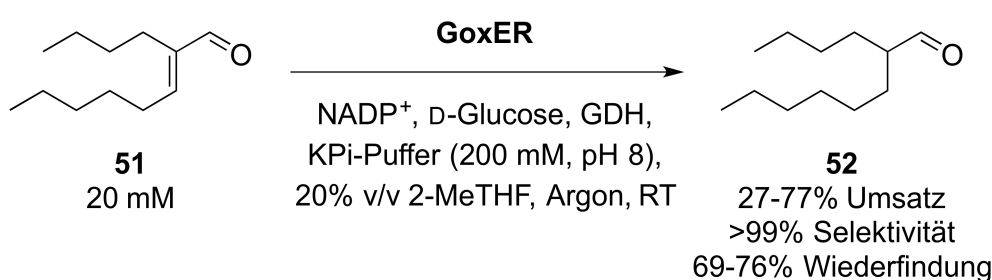
^a Spezifische Aktivität (photometrisch) = 0.95 U mg⁻¹, Proteingehalt = 0.64 mg mg⁻¹, ^b Beladung = 0.039 mg Protein mg⁻¹ Lyophilisat, ^c Menge an Lyophilisat bzw. Immobilisat. Absolute Proteinmenge in Klammern, ^d jeweils bezogen auf absolute Proteinmenge.

Mithilfe eines Titrinos, welcher kontinuierlich den pH-Wert misst und mit NaOH neutralisiert, wurde der pH-Wert der Reaktion konstant gehalten. Da der NaOH-Verbrauch direkt mit der Produktbildung korreliert, lässt sich analog zum photometrischen Assay aus der Anfangssteigung die Aktivität bestimmen. Da die so bestimmte Aktivität nicht identisch mit dem photometrisch bestimmten Wert ist, wurde zum Vergleich zunächst die Aktivität des freien Enzyms gegenüber dem Standardsubstrat *trans*-2-Hexenal (**65**) mit 0.29 U mg^{-1} ermittelt. Somit lag die am Titrino bestimmte Aktivität etwa 70% unter dem photometrisch bestimmten Wert von 0.95 U mg^{-1} . Zur Gewährleistung möglichst einheitlicher Reaktionsbedingungen wurde eine etwa äquivalente immobilisierte Menge an GoxER, bezogen auf den tatsächlichen Proteingehalt, eingesetzt und ihre Aktivität mit 0.18 U mg^{-1} bestimmt, was einer guten Restaktivität von 62% entspricht.

4.5.2.3 Präparative Versuche mit immobilisierter GoxER

Nachdem die Immobilisierung gute Ergebnisse lieferte, sollte die Tauglichkeit immobilisierter GoxER in präparativen Experimenten untersucht werden. Sie wurde unter gleichen Reaktionsbedingungen zunächst mit dem freien Enzym verglichen, zeigte jedoch nur 27% Umsatz, was weniger als der Hälfte des Umsatzes mit freier GoxER entsprach. Nur durch eine sechsmal längere Reaktionszeit und 2.5-fache Erhöhung der Enzymmenge, konnte ein moderater Umsatz von 77% erzielt werden (Tab. 11).

Tab. 11: C=C-Reduktion von 2-Butyl-2-octenal (**51**) mit immobilisierter GoxER.



Eintrag	GoxER	Zeit [h]	Aktivität [U] ^a	Umsatz [%] ^b	Wiederfindung [%] ^b
1	frei	4	10	69	74
2	immob.	4	10	27	69
3	immob.	24	25	77	76

^a am Titrino bestimmt. ^b mittels GC bestimmt.

Dies lässt sich nicht mit der niedrigeren Aktivität nach der Immobilisierung erklären, da äquivalente Enzymmengen, bezogen auf die am Titrino bestimmten Aktivitäten, eingesetzt wurden. Allerdings könnte die Immobilisierung zu einer generellen Destabilisierung

des Enzyms geführt haben, ähnlich der Deaktivierung durch Inkubation in Substrat-/Produktlösung (vgl. Abschnitt 4.5.1.3), wenngleich sich die Stabilität immobilisierter Enzyme üblicherweise verbessert.^[220] Die Wiederfindung veränderte sich im Vergleich zur Verwendung freien Enzyms nicht, obwohl die Immobilisierung über die Lysin-Reste erfolgt, welche potentiell auch für den Verlust an Substrat bzw. Produkt verantwortlich sind. Der Hauptvorteil immobilisierter Enzyme ist ihre einfache Abtrennbarkeit durch Filtration, was sie potentiell rezyklisierbar macht. Jedoch findet während der Reaktion häufig eine gewisse Deaktivierung des Katalysators statt, die die tatsächliche Rezyklisierbarkeit beeinflussen kann. Der Aktivitätsverlust muss durch Zugabe weiteren Katalysators kompensiert werden, was die Effizienz deutlich herabsetzt.

Die immobilisierte GoxER wurde in präparativen Experimenten am Titrino mit je 3 h Reaktionszeit eingesetzt und die Anfangsaktivität, wie in Abschnitt 4.5.2.2 beschrieben, bestimmt. Es wurde stets das Immobilisat eines Zyklus abfiltriert und für den nächsten wiedereingesetzt. Als Substrat kam *E*-2-Hexenal (**65**) zum Einsatz. Es wurde bewusst kein vollständiger Umsatz angestrebt, da ansonsten Deaktivierungseffekte nicht unmittelbar ersichtlich wären (Abb. 28). Der Umsatz sank von anfänglich 57% bereits im zweiten Zyklus auf 22% und im dritten Zyklus weiter auf 17%, was für eine starke Deaktivierung der GoxER spricht. Leaching, also das Freisetzen von Enzym aus dem Immobilisat während der Reaktion und damit dessen Verlust im Zuge der Filtration, konnte ausgeschlossen werden. Der Proteingehalt der Reaktionslösung lag stets unterhalb der Nachweisgrenze des Bradford-Assays. Auch die spezifische Aktivität sank stetig von 0.27 U mg^{-1} im ersten auf 0.17 U mg^{-1} im letzten Zyklus. Die Wiederfindung hingegen stieg mit fortschreitender Rezyklisierung von 53% im ersten, auf 66% im dritten Zyklus. Dies unterstützt die These der Deaktivierung durch Bindung von Substrat bzw. Produkt. Das im ersten Zyklus verlorene Substrat bzw. Produkt bindet an das Enzym und führt zur Deaktivierung. Diese erscheint im zweiten Zyklus durch eine niedrigere spezifische Aktivität und einen geringeren Umsatz. Die Wiederfindung hingegen steigt, da bereits ein Teil der Oberflächen-Lysine abgesättigt ist und so weniger Moleküle Aldehyde gebunden werden können.

Trotz der Tatsache, dass die Immobilisierung mit 95% Beladungseffizienz und 62% Restaktivität erfolgreich war, ergeben sich aufgrund der niedrigen Umsätze und schlechten Rezyklisierbarkeit keine Vorteile gegenüber der Nutzung des freien Enzyms.

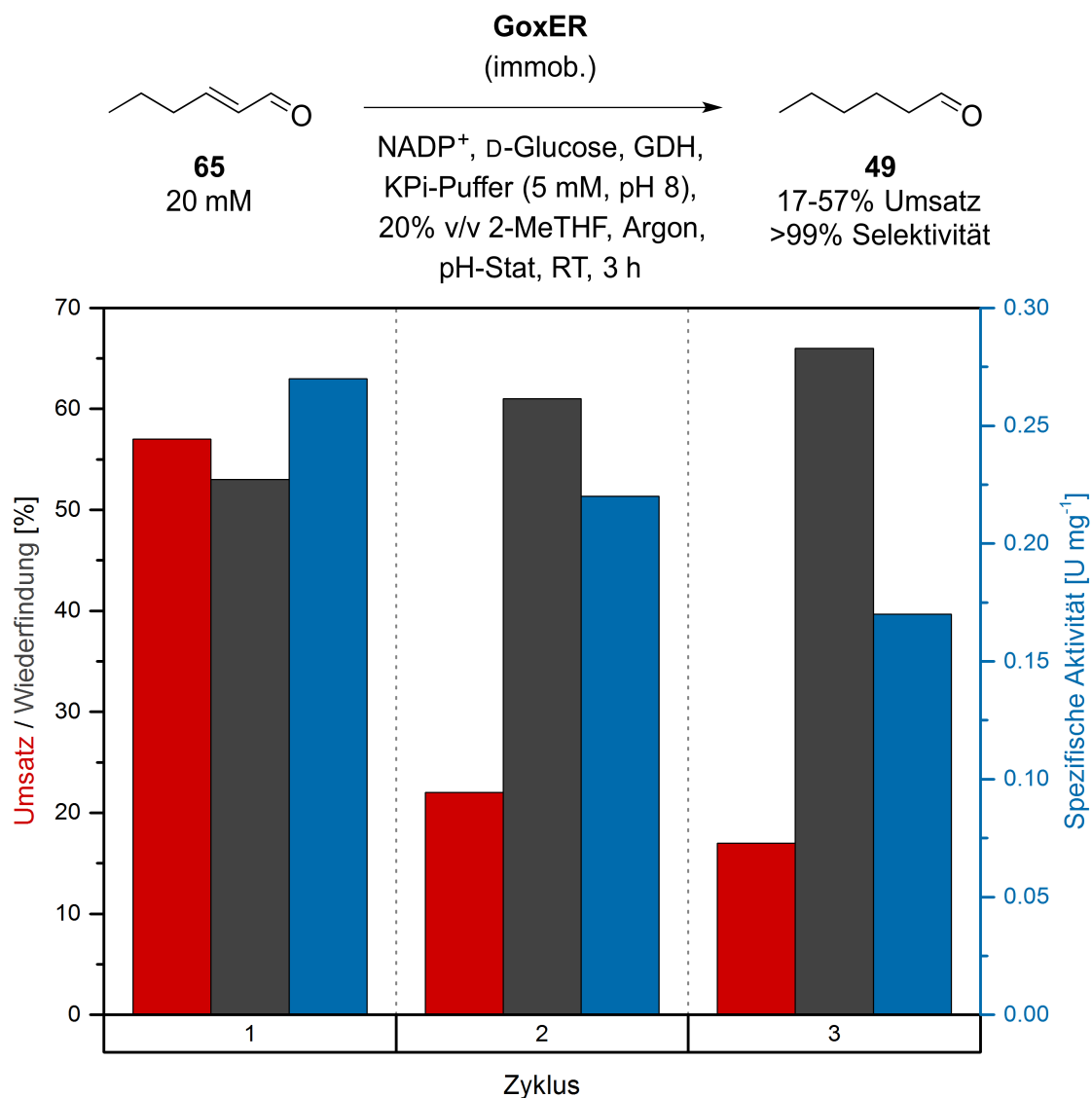


Abb. 28: Umsatz (rot), Wiederfindung (grau) und spezifische Aktivität (blau) bei der Rezyklisierung immobilisierter GoxER in der konjugierten Reduktion von *E*-2-Hexenal (**65**).

4.6 Enzymatische Reduktion von Aldehyden

Analog zur enzymatischen C=C-Reduktion wurde ein photometrisches Screening nach geeigneten Enzymen zur C=O-Reduktion durchgeführt. Für jede Alkoholdehydrogenase (ADH) wurde die Aktivität sowohl mit NADH, als auch mit NADPH bestimmt. Es ist jeweils das bessere Ergebnis dargestellt (Abb. 29).

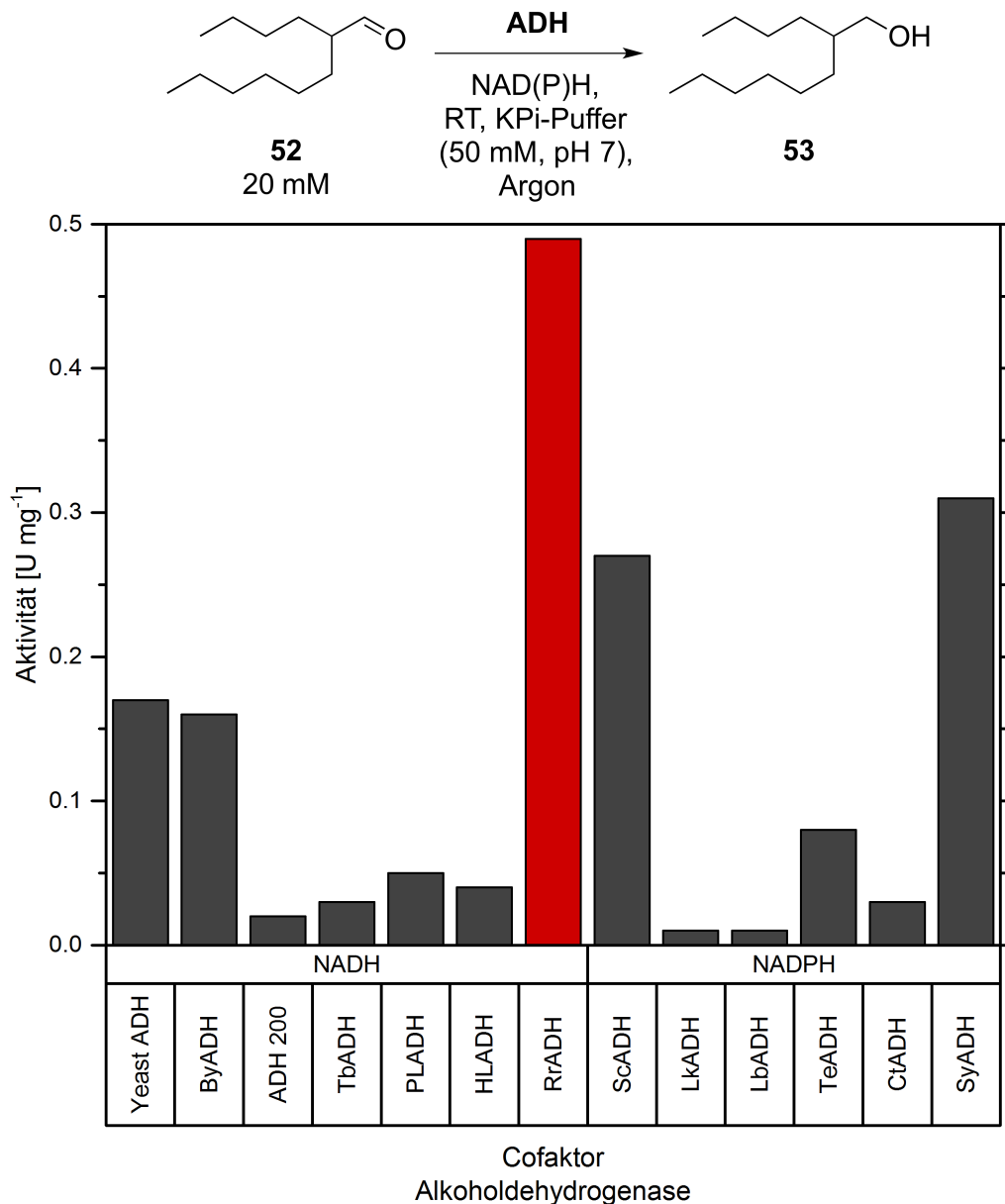


Abb. 29: Aktivitätsassay verschiedener Alkoholdehydrogenasen bezüglich der C=O-Reduktion von 2-Butyloctanal (**52**). By: *Bakers yeast*, Tb: *Thermoanaerobicum Brockii*, PL: *Parvibaculum lavamentivorans*, HL: horse liver (equine), Rr: *Rhodococcus ruber*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Lk: *Lactobacillus kefir*, Lb: *Lactobacillus brevis*, Te: *Thermoanaerobacter ethanolicus*, Ct: *Comamonas testosteroni*, Sy: *Sphingobium yanoikuyae*.

Die höchste Aktivität bezüglich 2-Butyloctanal (**52**) lieferte die ADH aus *Rhodococcus ruber* (RrADH) mit 0.49 U mg^{-1} . Alle anderen ADHs zeigten Aktivitäten von $<0.3 \text{ U mg}^{-1}$,

größtenteils sogar $<0.1 \text{ U mg}^{-1}$. Im Gegensatz zur GoxER ist die RrADH spezifisch für NADH. Dies wirkt sich zum einen negativ auf die Kosten und zum anderen negativ auf ihre Verwendung in einem möglichen chemoenzymatischen, selbstregenerierenden Gesamtprozess, bei dem alle Enzyme dieselbe Cofaktorspezifität aufweisen müssen, aus. Ein weiterer Nachteil der RrADH besteht darin, dass sie sich nicht mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufreinigen lässt, da das Anbringen eines His-Tags zu starkem Aktivitätsverlust führt.^[221] So konnte sie lediglich als ZRE eingesetzt werden, was in Kombination mit ihrer niedrigen Aktivität zur Folge hat, dass sie einen großen Volumenanteil der Reaktionslösung einnimmt. Sie kann damit nicht ohne Aufkonzentrieren in großen Mengen eingesetzt werden, was insbesondere bei Erhöhung der Substratkonzentration problematisch ist. Die Ergebnisse präparativer Experimente unter Verwendung der RrADH mit und ohne Cosolvens werden in Abschnitt 4.7.2.1 diskutiert und mit dem kombinierten Prozess aus GoxER und RrADH verglichen.

Im Verlauf des Projekts wurde von BULUT^[222] eine ADH aus *Pichia pastoris* (PpADH) isoliert, die eine hohe Aktivität für die Reduktion von aliphatischen, auch α -verzweigten Aldehyden (z.B. 2-Methylpentanal) zeigt. Für 2-Butyloctanal (**52**) liegt die Aktivität mit 2.1 U mg^{-1} mehr als viermal so hoch, verglichen mit der Aktivität der RrADH (Abb. 30).

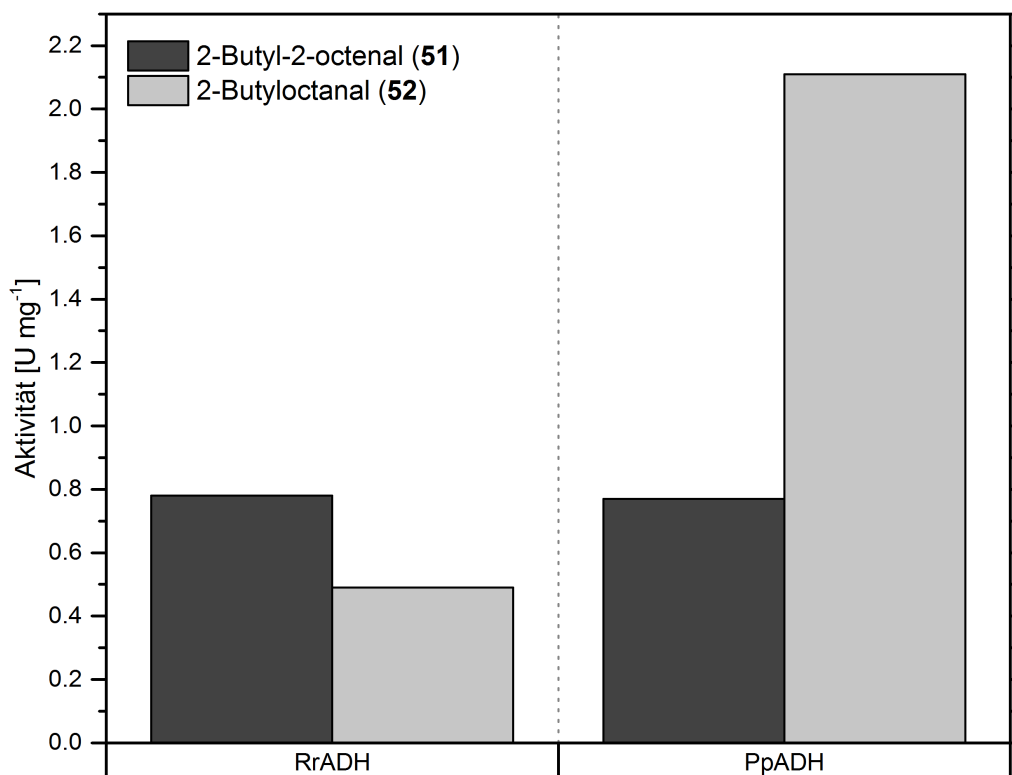
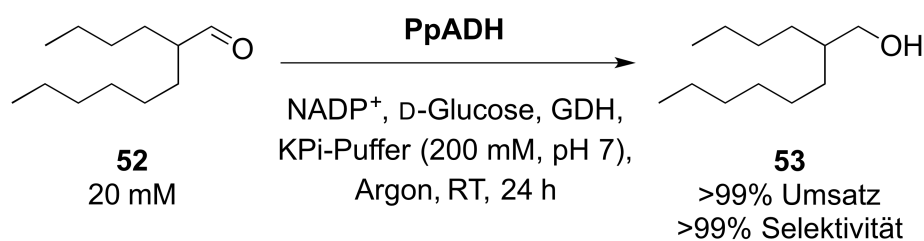


Abb. 30: Vergleich der Aktivitäten von RrADH und PpADH gegenüber 2-Butyl-2-octenal (**51**) und 2-Butyloctanal (**52**). Die Aktivität der PpADH bezieht sich auf das reine Enzym, die der RrADH auf den Gesamtproteingehalt des Zellrohextrakts (50-60% davon RrADH nach Gelelektrophorese).

Hinzukommt, dass ihre Aktivität für 2-Butyl-2-octenal (**51**) nur etwa einem Drittel der Aktivität für 2-Butyloctanal (**52**) entspricht, was einen positiven Einfluss auf die Unterdrückung der Nebenproduktbildung (Abschnitt 4.7.1.2) haben kann. Im Gegensatz dazu liegt die Aktivität der RrADH für **51** etwa 60% höher als für **52**. Weiterhin lässt sich die PpADH leicht mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufreinigen und erfährt bei Vorhandensein eines His-Tags sogar eine Steigerung der Aktivität. Für einen mit GoxER kombinierten oder gar einen chemoenzymatischen Gesamtprozess hat sie zudem den Vorteil, dieselbe Cofaktorspezifität für NADPH wie die meisten ERs zu besitzen. Bevor sie gemeinsam mit der GoxER in einem Ganzzellkatalysator co-exprimiert wurde (Abschnitt 4.7.3), wurde in einem Vorversuch die Eignung der PpADH für die präparative Umsetzung von **52** zu 2-Butyl-1-octanol (**53**) getestet. Es wurde bei 20 mM **52** und 100 U mmol⁻¹ PpADH quantitativer Umsatz mit einer Selektivität von >99% erreicht (Schema 36).



Schema 36: Präparativer Einsatz der PpADH für die Reduktion von 2-Butyloctanal (**52**) zu 2-Butyl-1-octanol (**53**).

4.7 Kombination der enzymatischen C=C- und C=O-Reduktionen

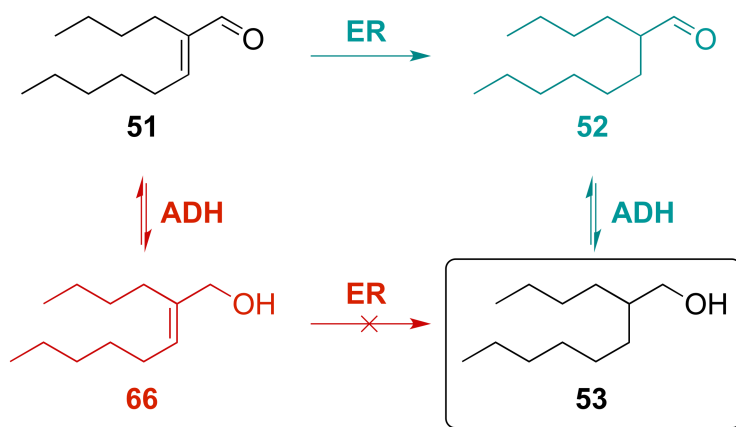
4.7.1 Allgemeine Aspekte der Eintopf-Biotransformation mit ER und ADH

4.7.1.1 Auswirkung auf Kinetik und Umsatz

Die Wechselwirkung zwischen den Reduktionen ist komplex, da die Reaktionsgeschwindigkeit der C=O-Reduktion von der Konzentration des Intermediates und damit auch von der Geschwindigkeit der C=C-Reduktion abhängt. Solange die C=C-Reduktion nicht schnell genug ist, eine stabile, ausreichend hohe Intermediat-Konzentration ($\gg K_{m,ADH}$) zu liefern, wird die ADH nicht im Sättigungsbereich arbeiten. Die C=C-Reduktion kann demnach zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt werden, was zur Folge hat, dass Änderungen der Aktivität bzw. Stabilität durch z.B. Variation der Reaktionsbedingungen sich nicht im Umsatz der C=O-Reduktion wiederfinden, solange sie schneller bzw. stabiler ist als die C=C-Reduktion. Die C=O-Reduktion in dieser Kaskade lässt sich mit einer Reaktion vergleichen, bei der Substrat zu dosiert wird. Ist die Reaktion schneller oder gleich der Dosiergeschwindigkeit, akkumuliert kein Substrat. Ist sie langsamer, steigt die Konzentration an Substrat. Anhand des Umsatzes kann zwar ein eindeutiger Effekt auf die C=O-Reduktion festgestellt werden, jedoch lassen sich Effekte, die sich nur auf die C=C- oder auf beide Reduktionen gleichermaßen auswirken, nicht unterscheiden.

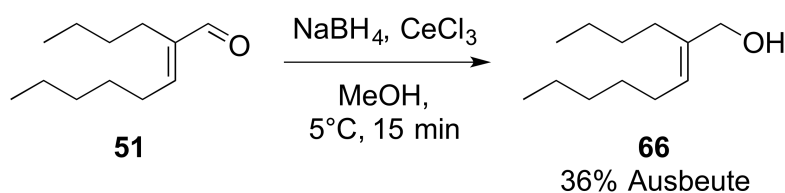
4.7.1.2 Nebenproduktbildung

Werden ER und ADH in einem Eintopf-Verfahren kombiniert, ergibt sich die Möglichkeit der Bildung von 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**), da 2-Butyl-2-octenal (**51**) nicht nur ein Substrat für die ER, sondern auch für die ADH darstellt (Schema 37). Im Gegenzug setzt die ER jedoch eine, durch eine elektronenziehende Gruppe aktivierte Doppelbindung voraus, womit **66** kein Substrat mehr für die ER ist. Durch die Kopplung mit einer GDH, deren Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconolacton und der irreversiblen Bildung von Natriumgluconat sind theoretisch alle Reaktionen irreversibel für die reduktive Richtung. Dies ist ein Vorteil für die Bildung von 2-Butyl-1-octanol (**53**) im letzten Schritt, jedoch ein Nachteil für die Nebenproduktbildung, da hiernach die C=O-Reduktion favorisiert wäre. Dennoch besteht prinzipiell die Möglichkeit der Reversibilität für ADH-katalysierte Reaktionen und **51** stellt mit seinem konjugierten Doppelbindungssystem gegenüber **66** das thermodynamisch stabilere Produkt dar. ER-katalysierte Reduktionen sind in der Regel irreversibel. Die oxidative Richtung wird von ihnen nicht katalysiert.^[223]



Schema 37: Nebenproduktbildung durch C=O-Reduktion von 2-Butyl-2-octenal (**51**).

Somit wird **51** durch die C=C-Reduktion aus dem Gleichgewicht entfernt, wodurch es in Richtung der Oxidation verschoben wird. Als Referenz zur Entwicklung der Nebenproduktanalytik wurde 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**) in einer 1,2-selektiven Luche-Reduktion ausgehend von 2-Butyl-2-octenal (**51**) hergestellt. Hierzu wird letzteres mit äquimolaren Mengen CeCl_3 und einem Überschuss an NaBH_4 in Methanol umgesetzt (Schema 38). Es konnte nach Säulenchromatographie eine isolierte Ausbeute von 32% erreicht werden. Da Borhydride als weiche Reduktionsmittel die 1,4-Reduktion bevorzugen, wird angenommen, dass intermediär gebildete, harte Alkoxyborhydride das eigentliche Reduktionsmittel darstellen. Zunächst koordiniert Ce^{3+} an Methanol und erhöht so die Acidität des Protons. Es bildet zusammen mit einem Hydrid-Ion des Borats Wasserstoff und Boran, welches wiederum mit dem übrigen Methanolat zum Alkoxyborhydrid reagiert. Die Carbonylgruppe von **51** wird vom Cer-Methanol-Komplex protoniert und anschließend vom Alkoxyborhydrid reduziert.^[224,225]



Schema 38: Luche-Reduktion von 2-Butyl-2-octenal (**51**) zu 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**).

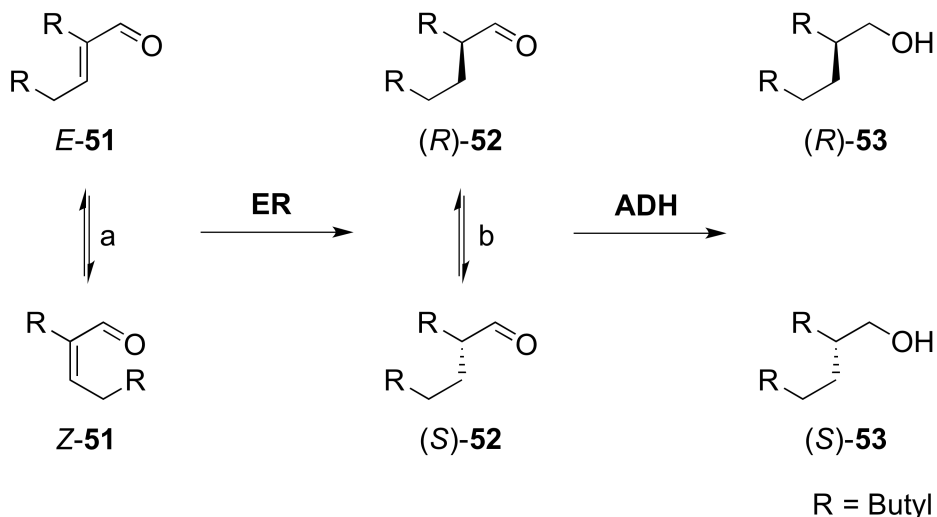
Die Analytik des Nebenprodukts im Zuge der bestehenden, auf Gaschromatographie basierenden Analytik erwies sich als schwierig, da die Siedepunkte von 2-Butyl-1-octanol (**53**) und 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**) annähernd identisch sind. Auch bei geringstmöglicher Temperatur konnte nach zwei Stunden keine vollständige Trennung der Verbindungen erfolgen. Es wurde daher eine NMR-basierte Analytik gewählt, wozu nach einer Biotransformation das organische Extraktionssolvens im Vakuum entfernt und der Rückstand in deuteriertem Chloroform vermessen wurde. Durch gaschromatographische

Analyse wurde so zunächst der Gesamtanteil der beiden Alkohole am Produktgemisch ermittelt. Aus dem Integralverhältnis der NMR-Signale der jeweiligen β -Protonen an den Doppelbindungen bei 6.64 bzw. 5.40 ppm wurde dann der Einzelanteil der Alkohole am Gesamtanteil bestimmt.

Aus der Ähnlichkeit der Siedepunkte der Alkohole folgt auch die Notwendigkeit, die Nebenproduktbildung, nicht nur im Interesse einer höheren Produktreinheit, sondern auch hinsichtlich der schlechten Abtrennbarkeit durch abschließende Destillation, bereits während der Reaktion zu unterdrücken.

4.7.1.3 Stereoselektivität

Eine der interessantesten und wichtigsten Eigenschaften von Biokatalysatoren ist ihre Stereoselektivität. Guerbet-Alkohole als Massenprodukt finden als Racemat Anwendung, sodass die Konfiguration keine Rolle spielt. Dennoch muss bei der Prozessentwicklung eine mögliche Enantioselektivität und die diesbezügliche Kompatibilität der beteiligten Enzyme berücksichtigt werden, um Umsatzlimitierungen zu vermeiden. Bezogen auf die beiden betrachteten Reduktionen bedeutet dies, dass sowohl die *E/Z*-Isomerie von 2-Butyl-2-octenal (**51**), als auch das Stereozentrum des Intermediates 2-Butyloctanal (**52**) beachtet werden müssen (Schema 39). Auf die analoge Betrachtung der Nebenproduktbildung (vgl. Abschnitt 4.7.1.2) wurde der Übersichtlichkeit halber verzichtet.



Schema 39: Zusammenspiel von (a) *E/Z*-Isomerisierung, (b) Keto-Enol-Tautomerie/Racemisierung und potentiell stereoselektiven Biotransformationen in der enzymatischen Doppelreduktion von 2-Butyl-2-octenal (**51**).

2-Butyl-2-octenal (**51**) wird als *E/Z*-Isomerengemisch mit einem Verhältnis von 98:2 eingesetzt. Es besteht die Möglichkeit der *E/Z*-Interkonversion analog zu Geranial ((*E*)-**28**)

und Neral ((*Z*)-**28**), den beiden Isomeren des Citrals (**28**) (vgl. Abschnitt 2.3). Die Präferenz der ER bezüglich des umgesetzten Isomers spielt daher nur eine untergeordnete Rolle. Allerdings könnte, insbesondere bei einer Präferenz für (*Z*)-**51**, die *E/Z*-Interkonversion zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt werden, da das Gleichgewicht auf Seiten von (*E*)-**51** liegt. Die enzymatische C=C-Reduktion ist formal stets eine *trans*-Addition von Wasserstoff und erzeugt ein Stereozentrum in α -Position.^[133] Durch Koordination von Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms an die elektronenziehende Carbonylgruppe ist deren Orientierung und damit auch die Richtung aus der der Hydrid-Transfer und die Protonierung stattfinden in der Regel festgelegt (vgl. Abschnitt 2.3). Damit liefert die Reduktion von (*E*)-**51** stereospezifisch eines der Enantiomere und die von (*Z*)-**51** das andere. Allerdings kommt hinzu, dass ein Substituent in α -Position eine stereoselektive Protonierung voraussetzt. Im Gegensatz zum stereoselektiven Hydrid-Transfer, wie im Fall β -substituierter Enale, kann eine Protonierung von vielen verschiedenen Aminosäuren und Lösungsmittelmolekülen erfolgen, was die Kontrollierbarkeit deutlich erschwert.^[226] Da das Intermediat **52** ein in α -Stellung deprotonierbarer Aldehyd ist, kann das dortige Stereozentrum durch Keto-Enol-Tautomerie einer Racemisierung unterliegen. Für die C=O-Reduktion hat dies zur Folge, dass eine mögliche Selektivität der ADH für eines der Enantiomere keinen Einfluss auf den maximal erreichbaren Umsatz hätte, da eine Deracemisierung in Form einer dynamisch-kinetischen Racematspaltung stattfinden würde. Tatsächlich ist eine Präferenz der ADH für eines der Enantiomere jedoch recht unwahrscheinlich, da sich die Alkylsubstituenten am Stereozentrum in ihrer Länge lediglich um zwei Methylengruppen unterscheiden. Für die Prozessentwicklung bedeuten die Racemisierung und die Tatsache, dass die Stereochemie des Produkts **53** für dessen industriellen Einsatz unerheblich ist, dass keine Rücksicht auf die Selektivität der Enzyme genommen werden muss. Ungewöhnlich für einen biokatalytischen Prozess, sind nicht-selektive Enzyme von Vorteil, da die Notwendigkeit von Isomerisierung und Racemisierung zum Erreichen eines hohen Umsatzes entfällt.

Es wurde mithilfe verschiedener Methoden versucht, die Konfiguration des Intermediates **52** und des Produkts **53** zu bestimmen. Bei sorgfältiger GC- und HPLC-Analyse auf verschiedenen chiralen Säulen konnte auch nach über zwei Stunden Analysezeit keine Trennung der Enantiomere beobachtet werden. Des Weiteren wurden ohne Erfolg eine NMR-Analytik über chirale Derivatisierung und Shift-Reagenzien getestet. Hingegen konnten die beiden *E/Z*-Isomere des Substrats **51** erfolgreich gaschromatographisch getrennt werden. Die Tatsache, dass bei der C=C-Reduktion beide Isomere umgesetzt werden, zeigt, dass die ER entweder nicht selektiv ist oder sie zwar selektiv arbeitet, jedoch die Interkonversion zu einer ständigen Isomerisierung führt und so trotzdem vollständigen Umsatz erlaubt. Dies gilt analog auch für die ADH, wobei der vollständige

Umsatz der C=O-Reduktion beweist, dass die ADH entweder beide Enantiomere akzeptiert oder auch hier die Isomerisierung, in diesem Fall eine Racemisierung, stattfindet und trotz Selektivität zu quantitativem Umsatz führt.

4.7.2 Isolierte Enzyme

4.7.2.1 Vergleich der individuellen und kombinierten Reduktionen unter Einfluss von organischem Cosolvens

Nachdem mit der GoxER und der RrADH (die PpADH stand erst später zur Verfügung) einleitend bereits passende Enzyme für die C=C-Reduktion von 2-Butyl-2-octenal (**51**) und die C=O-Reduktion von 2-Butyloctanal (**52**) gefunden wurden, bestand der nächste Schritt in der Kombination der beiden Reaktionen in einem Eintopfverfahren. Wie bereits bei der Untersuchung der GoxER allein, wurde ein organisches Cosolvens zu Steigerung der Löslichkeit der Substrate eingesetzt. Neben 2-MeTHF wurde auch Methanol getestet. Aus Arbeiten von GRUBB^[188] war bekannt, dass zumindest die GoxER keine signifikante Deaktivierung in diesen Lösungsmitteln erfährt. Daraufhin wurde ein Aktivitätsassay für 2-Butyl-2-octenal (**51**) bzw. 2-Butyloctanal (**52**) unter Einsatz von bis zu 20% v/v Methanol durchgeführt (Abb. 31).

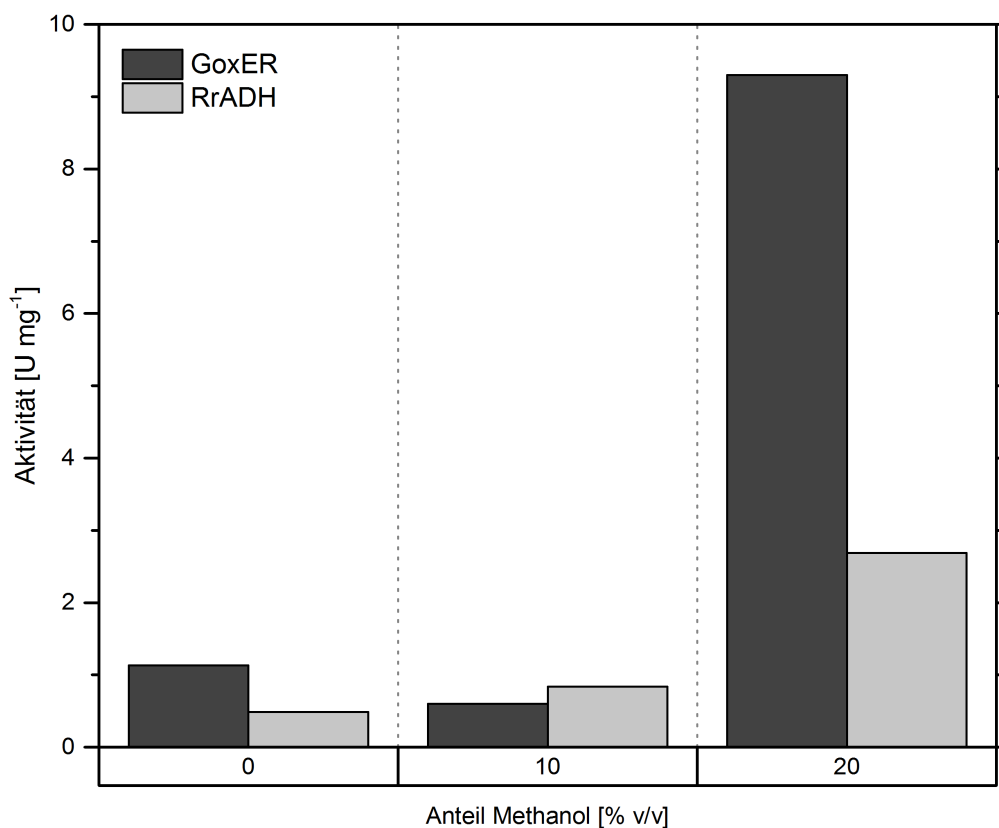


Abb. 31: Aktivitäten der GoxER für 2-Butyl-2-octenal (**51**) und der RrADH für 2-Butyloctanal (**52**) mit verschiedenen Volumenanteilen Methanol.

2-MeTHF konnte im photometrischen Assay aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit und den damit einhergehenden Streuungseffekten nicht vermessen werden. Beide Enzyme zeigten eine in der höheren Substratlöslichkeit begründete Aktivitätssteigerung bei Zusatz von 20% v/v Methanol. Die Aktivität der GoxER steigerte sich dabei etwa um das Achtfache, die der RrADH um mehr als das Fünffache.

Im nächsten Schritt wurden jeweils die individuellen und die kombinierten Reduktionen in reinem KPi-Puffer, sowie mit 20% v/v 2-Methyltetrahydrofuran (2-MeTHF) bzw. Methanol (MeOH) durchgeführt und der Umsatz, sowie die Selektivität bezüglich 2-Butyl-1-octanol (**53**) bestimmt (Abb. 32). Die Cofaktoren NADH und NADPH wurden mithilfe von Glucosedehydrogenase und D-Glucose regeneriert.

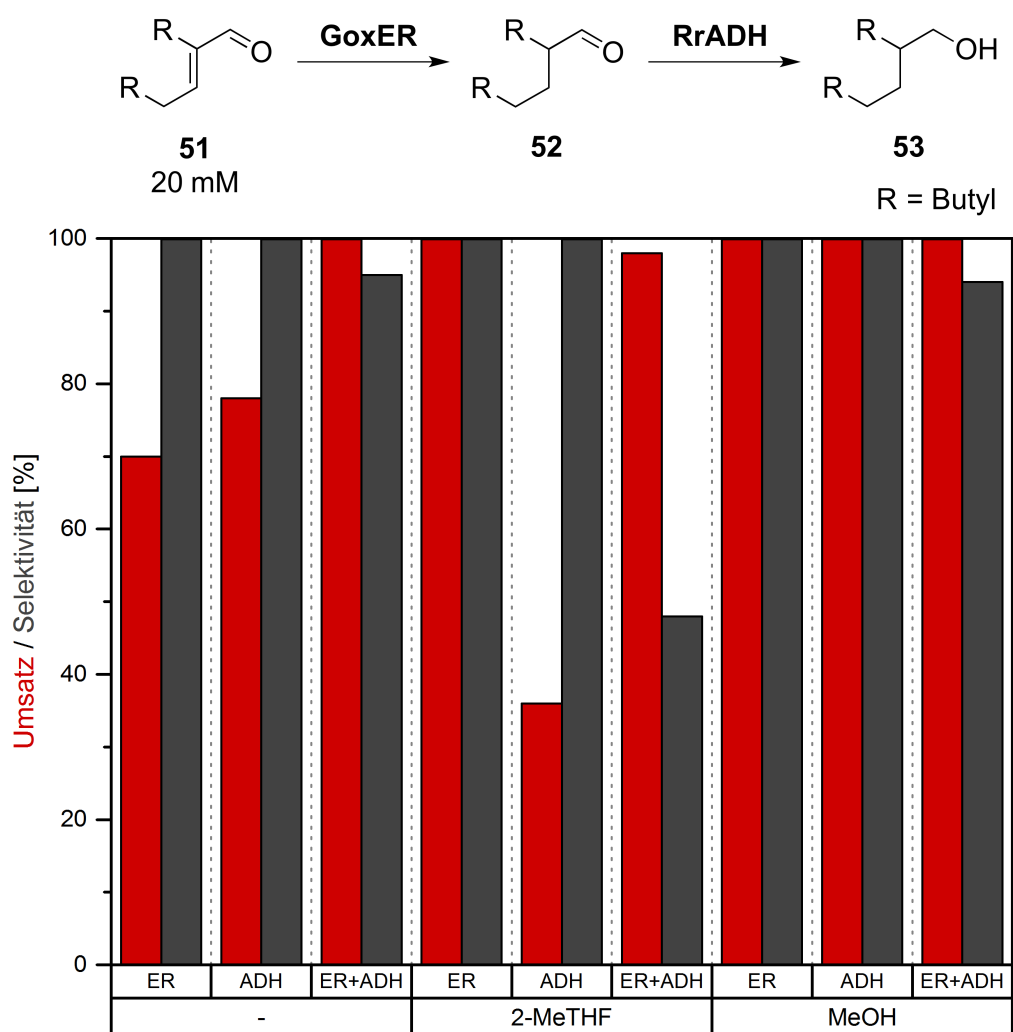


Abb. 32: Individuelle und kombinierte C=C- und C=O-Reduktionen mit GoxER und RrADH unter Einfluss von organischem Cosolvens. Die Bildung des Nebenprodukts 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**) in der kombinierten Reaktion betrug stets <2%.

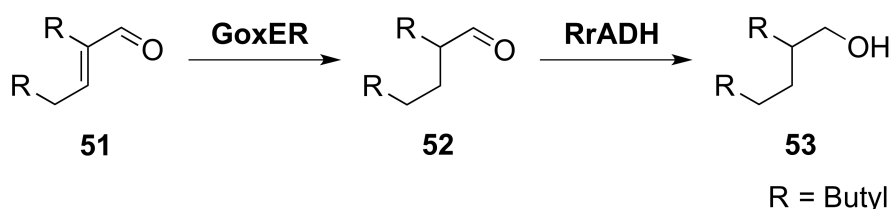
Der Gesamtumsatz der kombinierten Reaktion ist definiert als der Verbrauch an 2-Butyl-2-octenal (**51**). Die Selektivität entspricht dem Anteil 2-Butyl-1-octanol (**53**) am Gesamtumsatz. Die Bildung des Nebenprodukts 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**) (siehe Abschnitt 4.7.1.2) betrug in allen Reaktionen <2%. Damit ist der Gesamtumsatz mit dem Umsatz der GoxER und die Selektivität mit dem Umsatz der RrADH gleichzusetzen. Die C=C- und C=O-Reduktionen erreichten in reinem KPi-Puffer Umsätze von 70% bzw. 78% bei >99% Selektivität. Die moderaten Umsätze sind auf die schlechte Löslichkeit der Substrate und damit niedrige Aktivität der Enzyme zurückzuführen. Eine Verlängerung der Reaktionszeit könnte, stabile Enzyme vorausgesetzt, den Umsatz erhöhen. Interessant ist, dass die Eintopfreaktion trotz der unvollständigen individuellen C=C-Reduktion vollständigen Umsatz lieferte. Grund hierfür könnte eine erhöhte Substratlöslichkeit in der Eintopfreaktion sein, da die große Menge an RrADH-Zellrohextrakt als Emulgator fungiert. Die verringerte Selektivität lässt sich mit dem niedrigen Umsatz der individuellen C=O-Reduktion erklären. In 2-MeTHF zeigte die C=C-Reduktion einen quantitativen Umsatz mit perfekter Selektivität. Der Umsatz der C=O-Reduktion hingegen ging signifikant auf 36% zurück, was durch eine verringerte Stabilität der RrADH in diesem Solvenssystem hervorgerufen worden sein könnte. Folgerichtig war der Gesamtumsatz der Doppelreduktion, also der Umsatz bezogen auf 2-Butyl-2-octenal (**51**) quantitativ, die Selektivität und damit der Umsatz der C=O-Reduktion mit 48% aber eher schlecht. In Methanol zeigten beide Enzyme individuell betrachtet vollständigen Umsatz und hohe Selektivitäten von >99%. Sie scheinen durch die erhöhte Substratlöslichkeit unter Einsatz von organischem Cosolvens an Aktivität zu gewinnen, was zu einem höheren Umsatz führt. Auch scheint über den Zeitraum der Reaktion keine Destabilisierung durch Methanol stattzufinden. Die kombinierte Reaktion ergab quantitativen Umsatz mit einer hohen Selektivität von 94%.

4.7.2.2 Erhöhung der Substratkonzentration

Aus den Versuchen mit organisch-wässrigem Solvens ergab sich ein vielversprechendes System, auf dessen Basis versucht werden konnte, die Substratkonzentration zu steigern. Es wurde die kombinierte Doppelreduktion von 2-Butyl-2-octenal (**51**) mit GoxER und RrADH in 20% v/v Methanol bei verschiedenen Substratkonzentrationen bis 200 mM untersucht (Tab. 12). Die eingesetzte, absolute Aktivität der GoxER lag konstant bei 10 U (10 - 100 U mmol⁻¹). Mit 20 U RrADH (200 U mmol⁻¹) bei 20 mM **51** wurde nach 24 h quantitativer Umsatz mit einer sehr guten Selektivität von 93% erreicht. Jedoch ließ letztere bereits auf eine Limitierung der RrADH schließen, die sich bei Erhöhung der Substratkonzentration auf 100 mM bei konstanten Enzymmengen bestätigte. Hier konnte zwar erneut vollständiger Umsatz erzielt werden, die Selektivität ging aber auf

58% zurück. Allerdings stieg die absolut generierte Menge Produkt 2-Butyl-1-octanol (**53**), da in Relation zur Substratmenge weniger Enzym eingesetzt wurde (40 statt 200 U mmol⁻¹). Erst durch Verdopplung der Menge an RrADH auf 80 U mmol⁻¹ erreichte die Gesamtreaktion auch bei 100 mM eine Selektivität von >99% erreicht. Eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration auf 200 mM ließ auch den Gesamtumsatz auf 43% und die Selektivität, also den Umsatz der RrADH auf 61% sinken. Die Verdopplung der Substratkonzentration führte bei beiden Reaktionen etwa zur Halbierung des Umsatzes, was dafür spricht, dass es sich bei 20 bzw. 80 U mmol⁻¹ für die GoxER bzw. RrADH um die optimalen Enzymmengen handelt.

Tab. 12: Erhöhung der Substratkonzentration der enzymatischen Doppelreduktion.



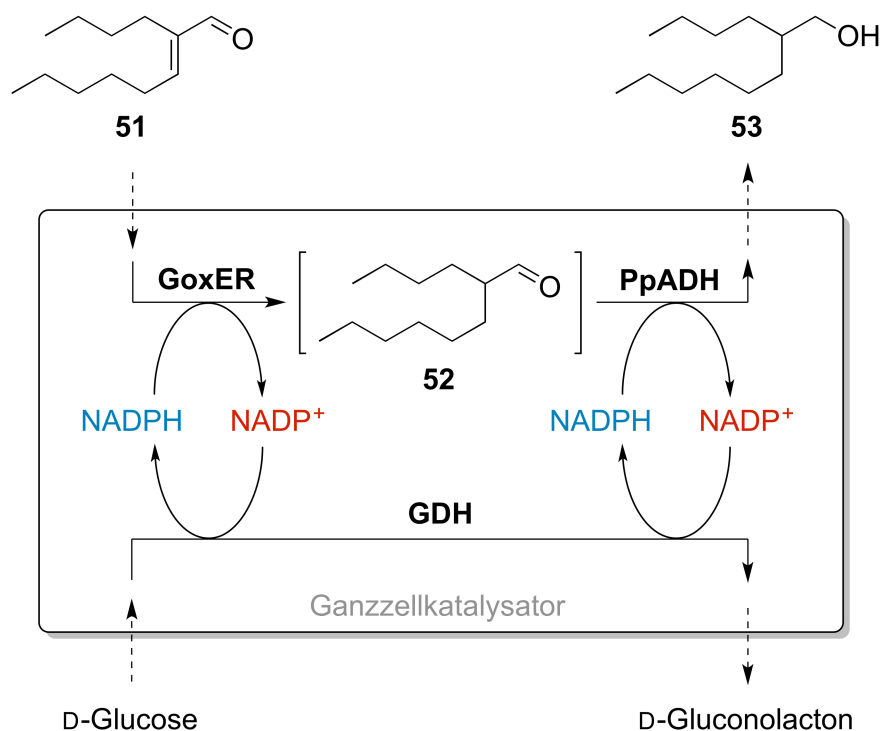
Eintrag	Substrat [mM]	GoxER [U] ([U mmol ⁻¹])	RrADH [U] ([U mmol ⁻¹])	Gesamtumsatz ^a [%]	Selektivität ^b [%]
1	20	10 (100)	20 (200)	>99.9	93.1
2	100	10 (20)	20 (40)	98.5	58.1
3	100	10 (20)	40 (80)	97.8	>99.9
4	200	10 (10)	20 (40)	42.6	60.5

^a Der Gesamtumsatz der Reaktion bezieht sich auf den Verbrauch an 2-Butyl-2-octenal (**51**), ^b die Selektivität der Gesamtreaktion bezieht sich auf den Anteil von 2-Butyl-1-octanol (**53**) am Produkt.

4.7.3 Ganzzellkatalyse

Ganzzellkatalysatoren (GZKs) sind Mikroorganismen, die die für eine Reaktion benötigten Enzyme exprimieren und weitestgehend intakt, ohne Isolation der Enzyme eingesetzt werden können. Ihre Verwendung stellt die konsequente Weiterentwicklung eines Prozesses dar, der zuvor auf isolierten Enzymen basierte, da der Zellaufschluss und die ggf. nötige Reinigung entfallen und damit die Prozesskosten reduziert werden. Ein weiterer Vorteil liegt in der potentiell höheren Stabilität der Enzyme in ihrer nativen Umgebung.^[227] Idealerweise werden alle nötigen Enzyme in einer Zelle coexpressiert, sodass die Diffusionslimitierung über biologische Membranen, welche ein Nachteil bei der Nutzung von ganzen Zellen darstellen kann, minimiert wird.

Es wurden Ganzzellkatalysatoren konstruiert, die in der Lage sind, die doppelte Reduktion von α,β -ungesättigten Aldehyden zum gesättigten Alkohol durchzuführen (Schema 40). Sie beinhalten sowohl die reduktiven Enzyme GoxER und PpADH, als auch die GDH für die Cofaktorregenerierung, die D-Glucose zu D-Gluconolacton oxidiert. Die PpADH bietet gegenüber der, im Abschnitt 4.7.2 verwendeten RrADH den Vorteil, dass sie, wie die GoxER NADPH als Cofaktor bevorzugt. Außerdem hat sie eine mehr als viermal höhere spezifische Aktivität für 2-Butyloctanal (**52**) und eine niedrigere spezifische Aktivität für 2-Butyl-2-octenal (**51**), was zum einen die nötige Biomasse reduziert und zum anderen zu Nebenproduktbildung unterdrückt (vgl. Abschnitt 4.6).



Schema 40: Prinzip der Ganzzell-katalysierten Doppelreduktion von 2-Butyl-2-octenal (**51**) zu 2-Butyl-1-octanol (**53**) mit *in situ* Cofaktorregenerierung.

Bei der Transformation zweier Plasmide in eine *E. coli*-Zelle muss darauf geachtet werden, dass sie unterschiedliche *origins of replication* (*ori*) und Antibiotika-Resistenzen besitzen. GoxER und PpADH wurden gemeinsam in ein pETDuet-Plasmid (ColE1 *ori*, Ampicillin-Resistenz) kloniert.^[228] Da die oxidativ agierende GDH mit sehr hoher Aktivität agiert, wurde sie zur Verminderung des zellulären Stresses auf ein zweites *low copy* pACYCDuet-Plasmid (P15A *ori*, Chloramphenicol-Resistenz) kloniert.^[229,230] Die so erreichte Trennung von reduktiven und oxidativen Enzymen erhöht die Flexibilität für zukünftige Entwicklungen in Richtung eines Prozesses, der für die Cofaktorregenerierung auf den zelleigenen Metabolismus zurückgreifen könnte. Duet-Plasmide besitzen zwei

Multiple Cloning Sites (MCS), wobei für das Gen in der zweiten MCS eine höhere Expressionsrate zu erwarten ist, da es teilweise auch vom Ribosom, das an der Promotorsequenz *upstream* der ersten MCS bindet, mit abgelesen wird. Ein Transkriptionsterminator existiert nur downstream der zweiten MCS, nicht aber zwischen den beiden MCS.^[230] Auf diese Weise kann indirekt eine Kontrolle des Expressionsverhältnisses der beiden Gene erfolgen. In vorigen Arbeiten von BULUT^[222] wurde festgestellt, dass ein N-terminaler His-Tag die Aktivität der PpADH erhöht. Entsprechend wurden Plasmide für die reduktiven Enzyme konstruiert, welche GoxER und PpADH/PpADH(N) in allen vier möglichen Kombinationen in MCSI und MCSII tragen. Die resultierenden GZKs mit beiden Plasmiden sind in Tab. 13 zusammengefasst.

Tab. 13: Verwendete Ganzzellkatalysatoren (GZK).

GZK	Plasmide ^a
1	pETDuet_GoxER_PpADH & pACYC_GDH
2	pETDuet_PpADH_GoxER & pACYC_GDH
3	pETDuet_PpADH(N)_GoxER & pACYC_GDH
4	pETDuet_GoxER_PpADH(N) & pACYC_GDH

Die Expression erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3), ^a Definition: pET-Duet_MCSI_MCSII, (N) = N-terminaler His-Tag, die Plasmide pETDuet_GoxER_PpADH, pETDuet_PpADH_GoxER, pET-Duet_PpADH(N)_GoxER und pACYC_GDH wurden von Daniel Bakonyi zur Verfügung gestellt.

4.7.3.1 Konstruktion des Ganzzellkatalysators (GZK4)

Aus dem vom AK HUMMEL zur Verfügung gestellten Plasmid^[222] wurde das Gen der PpADH mithilfe einer Standard-PCR amplifiziert. Der *forward*-Primer (Tab. 53) wurde so gewählt, dass dem Gen ein N-terminaler His-Tag angehängt wurde. Das *target*-Plasmid pETDuet_GoxER_PpADH wurde mit *NdeI* und *XhoI* verdaut, gelelektrophoretisch aufgereinigt und so das vorhandene Gen in der MCSII entfernt. Der Vektor wurde mit dem Insert ligiert und in *E. coli* JM109, welcher für hohe Ausbeuten isolierter Plasmid-DNA optimiert ist, transformiert. Der Ligationsansatz wurde zunächst auf Agar und die 16 erhaltenen Kolonien erneut einzeln in Flüssigmedium (enthält Carbenicillin, ein stabileres Ampicillin-Derivat) kultiviert. Aus den 15 verbleibenden Kulturen wurden die Plasmide extrahiert, einem Testverdau unterzogen und gelelektrophoretisch auf Vorhandensein des Inserts hin untersucht (Abb. 33).

Die Bande bei 1.1 kb stammt vom Insert der PpADH(N), die Bande bei 6.4 kb vom Rest des Vektors. Die Kolonien 5, 7 und 13 zeigen kein Insert, wobei Kolonie 7 auch kaum

Vektor-DNA aufweist, stattdessen aber nicht identifizierte DNA von ca. 3 kb Länge besitzt. Aus den positiv getesteten wurden zufällig die Plasmide 2, 9 und 15 zur Sequenzierung ausgewählt, wobei alle drei die korrekte Sequenz des Inserts aufwiesen. Die drei weiteren Plasmide pETDuet_GoxER_PpADH, pETDuet_PpADH_GoxER und pETDuet_PpADH(N)_GoxER wurden auf analogem Weg hergestellt.

Die vier pETDuet-Plasmide wurden jeweils gemeinsam mit pACYC_GDH in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert und in für Carbenicillin- (pETDuet) und Chloramphenicol-Resistenz (pACYC) selektivem TB-Medium bei 37°C zunächst bis zu einer OD₆₀₀ von 0.7 kultiviert und mit 0.5 mM IPTG induziert. Anschließend wurde weitere 72 h bei 15°C kultiviert. Zur Steigerung der Zelldichte wurde das TB-Medium mit 0.5 g L⁻¹ D-Glucose angereichert, sodass zwischen 34.6 und 37.9 g L⁻¹ Zellen (Feuchtmasse) erhalten wurden. Vor der Verwendung wurden die Zellen zur Permeabilisierung der Zellmembran bei -20°C eingefroren

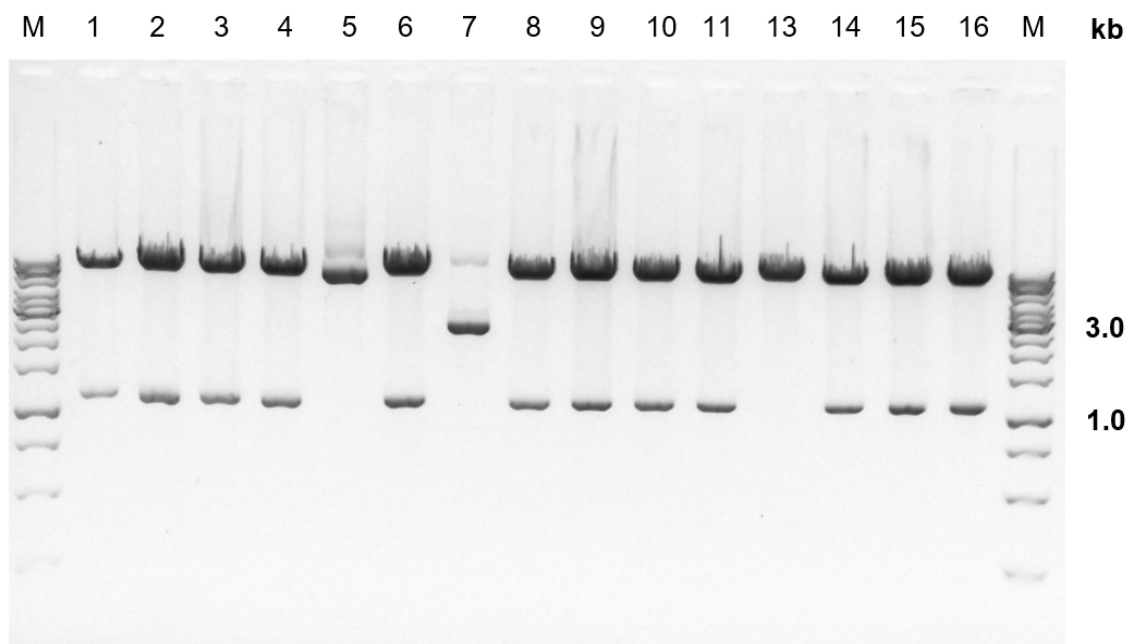


Abb. 33: Testverdau (NdeI/XhoI) der Plasmide aus den angewachsenen Kolonien (Gengröße PpADH(N): 1.1 kb).

4.7.3.2 Charakterisierung der Ganzzellkatalysatoren

Zur Kontrolle der Expression wurden die Ganzzellkatalysatoren (GZK1-4) aufgeschlossen und mittels SDS-PAGE untersucht (Abb. 34).

Zum Vergleich wurden Leervektoren pETDuet-1 und pACYCDuet-1 in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert (GZK0), welcher die Hintergrundexpression repräsentiert. Die Auflösung

der SDS-PAGE ist nicht hoch genug um GoxER und PpADH bzw. PpADH(N) voneinander unterscheiden zu können, da sie mit 39.4 und 39.2 bzw. 40.5 kDa sehr ähnliche Molekulargewichte aufweisen. Lediglich die GDH mit 28.1 kDa zeigt eine von den anderen Proteinen unterscheidbare Bande. Alle vier Ganzzellkatalysatoren besitzen die gewünschten Proteine in vergleichbaren Mengen. In der unlöslichen Fraktion befinden sich keine Proteine im Bereich der theoretisch berechneten Molekulargewichte, was darauf hinweist, dass die Proteine keine *inclusion bodies* bilden.

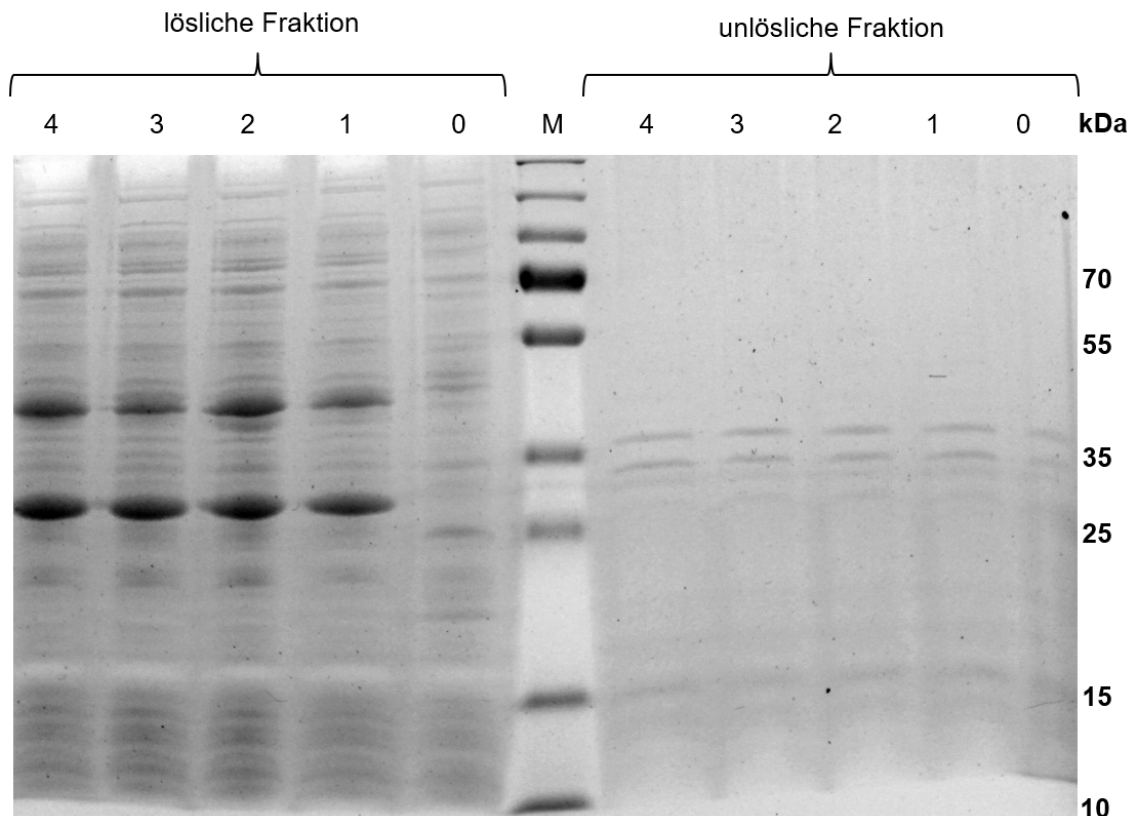


Abb. 34: Expressionskontrolle der Ganzzellbiokatalysatoren 0 (leer), 1, 2, 3 und 4 (GoxER: 39.4 kDa, PpADH: 39.2 kDa, PpADH(N): 40.5 kDa, GDH2: 28.1 kDa).

Die Ganzzellkatalysatoren wurden aufgeschossen und die Zellrohextrakte (ZREs) auf ihre Aktivität gegenüber D-Glucose (oxidativ), 2-Butyl-2-octenal (**51**, reduktiv) und 2-Butyloctanal (**52**, reduktiv), sowie ihren Proteingehalt hin untersucht (Abb. 35).

Die Aktivität des ZRE gegenüber D-Glucose ist jeweils etwa 40-fach höher als die Aktivität gegenüber **51**, sodass eine Limitierung aufgrund der Cofaktorregenerierung nicht zu erwarten ist. Letztere wiederum ist zwischen 36 und 325% höher als die Aktivität gegenüber **52**. Zu beachten ist, dass sich die gemessene Aktivität gegenüber **51** aus den Aktivitäten der beiden reduktiven Enzymen GoxER und PpADH zusammensetzt, wohingegen nur die PpADH Aktivität für **52** zeigt. Das Verhältnis der Aktivitäten der rei-

nen PpADH gegenüber **51** und **52** liegt bei 1:2.74 (Abschnitt 4.6). Daher wurde die Aktivität des Rohextrakts bezüglich **51** um seine Aktivität für **52**, multipliziert mit diesem Verhältnis (Abb. 35, quergestreifte Fläche), korrigiert. Es lässt sich feststellen, dass für alle konstuierten GZKs der Anteil der GoxER an der Gesamtaktivität für **51** mindestens dreimal so hoch ist, wie der Anteil der PpADH. Dies ist erwünscht, da so bevorzugt die GoxER zunächst die Doppelbindung und anschließend die PpADH die Carbonylgruppe reduziert, was weniger Bildung des Nebenprodukts 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**) zur Folge hat. Auffällig ist weiterhin die geringe Aktivität des GZK3 für **52** von $<0.05 \text{ U mg}^{-1}$, was vermutlich auf eine schlechte Überexpression der PpADH zurückzuführen ist. Die Proteingehalte von GZK1 und 3 liegen bei 60 mg g^{-1} , die von GZK2 und 4 bei 80 mg g^{-1} Zellen.

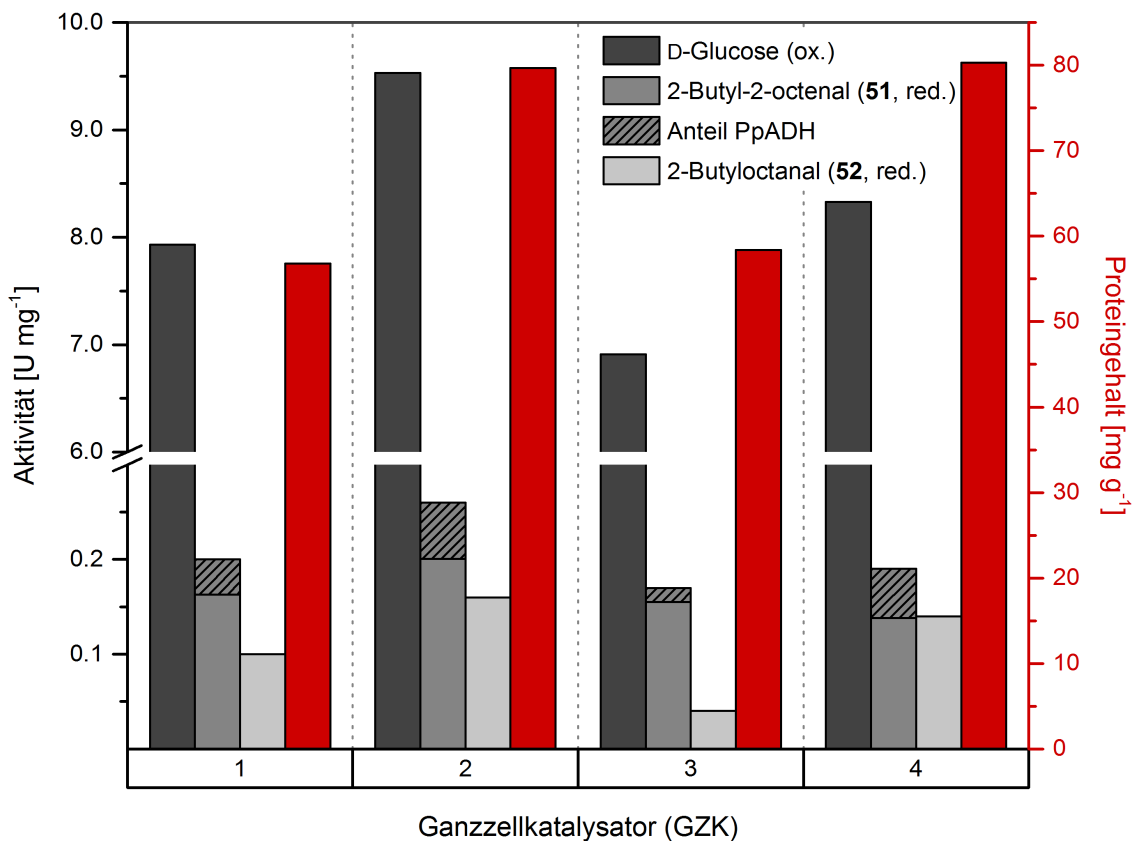


Abb. 35: Aktivitäten (Graustufen) und Proteingehalt (rot) der Rohextrakte der Ganzzellkatalysatoren. Der berechnete Anteil der PpADH am Anteil der Gesamtaktivität für 2-Butyl-2-octenal (**51**) ist durch Querstreifen gekennzeichnet.

4.7.3.3 Mikro-präparatives Screening der Ganzzellkatalysatoren

Zur ersten Evaluierung der verschiedenen Ganzzellkatalysatoren wurde ein mikro-präparatives Screening bezüglich des Umsatzes von 2-Butyl-2-octenal (**51**, 20 mM) im 5 mL-Maßstab bei pH 7 in rein wässrigem Medium für 48 h durchgeführt (Abb. 36). Es wurde eine Zellkonzentration von 20 mg mL^{-1} verwendet. Für alle folgenden Reaktionen

ist die Zellfeuchtmasse der GZKs angegeben. Es ist zu bemerken, dass die Handhabung der Ganzzellkatalysatoren durch deren Konsistenz erschwert wurde, sodass sie im gefrorenen Zustand eingewogen wurden. Jedoch hat dies eventuell eine inkonsistente Zelldichte der gefrorenen Zellmasse und damit trotz identischer Einwaage eine leicht unterschiedliche absolute Zellmenge in den Reaktionen zur Folge. Reaktionen bei gleicher Zellmenge verschiedener Katalysatoren sind daher nur bedingt vergleichbar. Alle vier Katalysatoren erreichten annähernd quantitative Umsätze ($\geq 94\%$) für beide Reduktionen.

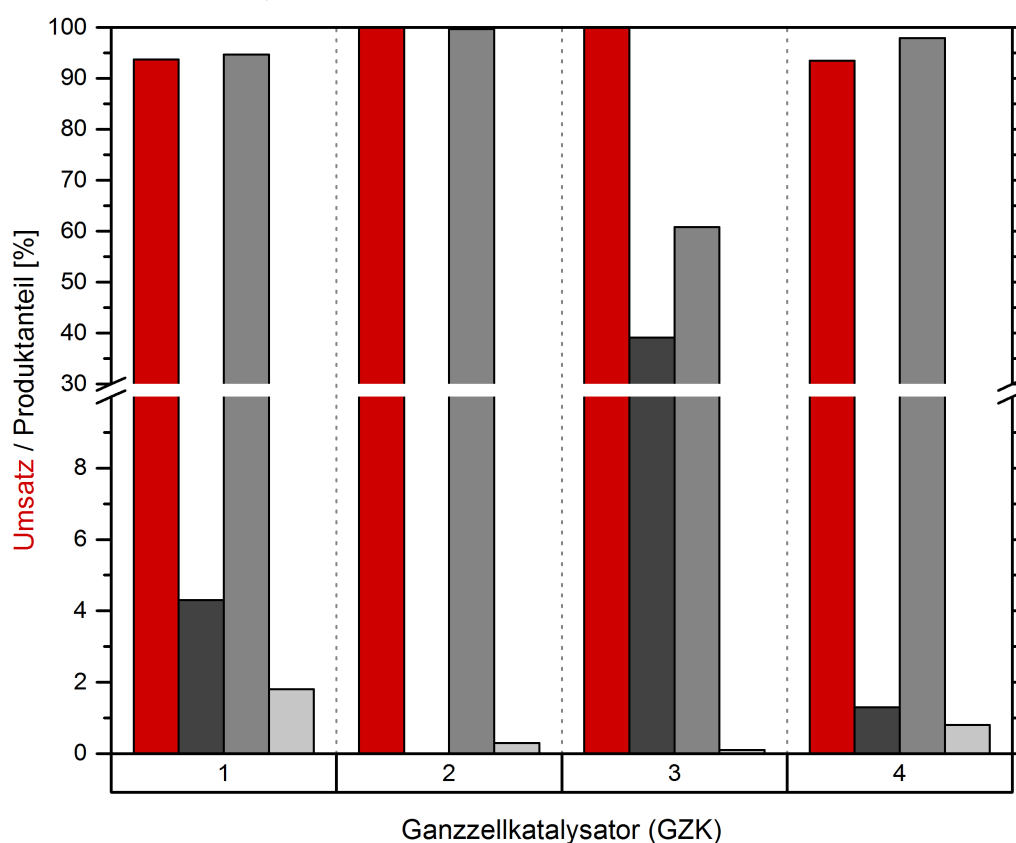
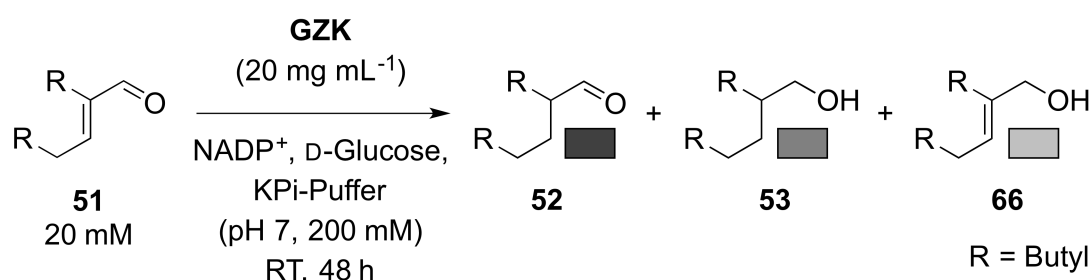


Abb. 36: Einleitendes, mikro-präparatives Screening der Ganzzellkatalysatoren bezüglich des Umsatzes (rot) von 2-Butyl-2-octenal (51) zu 2-Butyloctanal (52, dunkelgrau), 2-Butyl-1-octanol (53, grau) und 2-Butyloct-2-en-1-ol (66, hellgrau). Angegeben ist die Zellfeuchtmasse des GZK.

Lediglich GZK3 zeigte mit etwa 40% verbleibendem Intermediat 2-Butyloctanal (52) einen niedrigeren Umsatz für die Reduktion der C=O-Doppelbindung. Dieses Ergebnis

steht in Einklang mit der Aktivitätsmessung von GZK3 bezüglich dieses Substrats, welche deutlich unter der Aktivität der anderen GZKs lag. Die Bildung des Nebenprodukts 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**) lag in allen Experimenten unter 2%. Bemerkenswert ist, dass auch die Verwendung von GZK4, welcher ein Aktivitätsverhältnis C=O-/C=C-Reduktion von etwa 1:1 aufwies, nicht zu einer erhöhten Nebenproduktbildung führte. Die Reversibilität der C=O-Reduktion von 2-Butyl-2-octenal (**51**) und damit die Reoxidation zur thermodynamisch stabileren Verbindung scheint einen größeren Einfluss auf die verminderte Nebenproduktbildung zu haben als eine höhere Aktivität für die irreversible C=C-Reduktion.

4.7.3.4 Erhöhung der Katalysatormenge

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Menge an GZK2 und 4 untersucht (Abb. 37). Es wurden dieselben Reaktionsbedingungen wie zuvor gewählt, jedoch wurde die Reaktionszeit auf 24 h reduziert um einen sichtbaren Effekt zu erhalten. Bezüglich der Vergleichbarkeit gilt dieselbe Einschränkung wie zuvor.

Der Anteil an 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**) wurde für diese Versuche nicht bestimmt. In Anbetracht der vorherigen und folgenden Experimente ist jedoch davon auszugehen, dass nicht mehr als 2% Nebenprodukt entstanden. GZK2 zeigt bei 20 mg mL^{-1} , wie zuvor bei 48 h Reaktionszeit, einen annähernd quantitativen Umsatz (97%). Für GZK4 wurde dagegen ein deutlich geringerer Umsatz von 46% erhalten, jedoch blieb der Umsatz der C=C-Reduktion quantitativ, zu erkennen am niedrigen Anteil Intermediat 2-Butyloctanal (**52**). Der Grund für den signifikanten Unterschied zwischen den beiden Katalysatoren ist vermutlich die insgesamt höhere Aktivität von GZK2, sodass sich eine Verringerung der Reaktionszeit hier kaum negativ auswirkt. Durch Verringerung der Katalysatormenge auf 10 mg mL^{-1} sank der Umsatz mit GZK2 geringfügig auf 84%. Eine Erhöhung der Reaktionszeit könnte hier wieder zu vollständigem Umsatz führen. Die Verwendung von GZK4 führte zu einem geringfügig höheren Umsatz von 56%.

Geringe positive oder negative Abweichungen dieser Größenordnung, v.a. bei niedrigen Zellkonzentrationen, lassen sich auf die beschriebene Ungenauigkeit der Zelleinwaage zurückführen. Interessant ist die Tatsache, dass für GZK2 auch bei Erhöhung der Katalysatormenge auf 100 mg mL^{-1} ein geringfügig niedrigerer Umsatz von 89% erhalten wurde. Für GZK4 steigt hier der Umsatz mit 92% in einen, mit GZK2 vergleichbaren Bereich. Eine mögliche Erklärung für den unvollständigen Umsatz in beiden Fällen ist die höhere Viskosität konzentrierter Zellsuspensionen, sodass die ohnehin vorwiegend diffusionslimitierte Umsetzung durch schlechtere Durchmischung weiter limitiert wird. Insgesamt lässt sich feststellen, dass GZK4 im Vergleich zu GZK2 der schlechtere Katalysator ist, sodass letzterer für alle folgenden Versuche verwendet wurde.

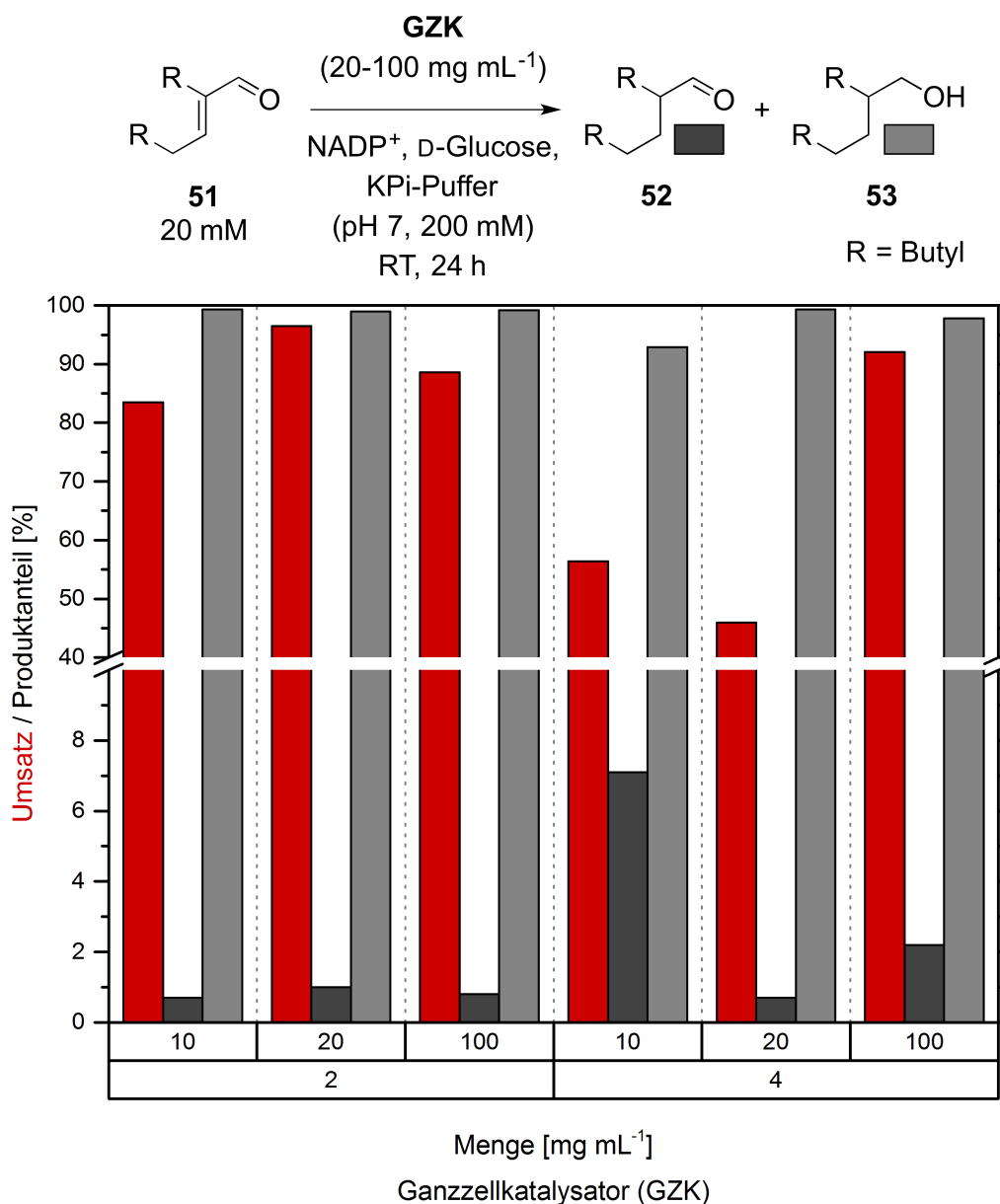


Abb. 37: Erhöhung der Menge an verwendetem GZK2 und 4 und deren Einfluss auf den Umsatz (rot) von 2-Butyl-2-octenal (51) zu 2-Butyloctanal (52, dunkelgrau) und 2-Butyl-1-octanol (53, grau). Angegeben ist die Zellfeuchtmassenzahl des GZK.

4.7.3.5 Optimierung des pH-Werts

Enzyme besitzen für ihre jeweiligen Reaktionen ein spezifisches pH-Optimum. Katalysieren sie, wie ADHs die Hin- und Rückreaktion, kann dieses für beide Reaktionen unterschiedlich sein. Zu beachten ist, dass der pH-Wert, bei dem das Enzym seine höchste Aktivität zeigt, nicht unbedingt der pH-Wert höchster Stabilität ist. Für ein Multienzym-System, wird die Bestimmung des optimalen pH-Werts mit jedem hinzukommenden Enzym komplexer. Ein denkbarer Lösungsansatz ist es, für jedes Enzym individuell, z.B. photometrisch optimale pH-Werte für Aktivität und Stabilität zu bestimmen und anschließend einen kombinierten, optimalen Wert festzulegen. Allerdings wäre dieser Wert eher

theoretischer Natur und würde weder die Kombination der Enzyme als Kaskade, noch den (stabilisierenden) Effekt der Zellmembran berücksichtigen. Aus diesem Grund wurde ein pragmatischer, umsatzbezogener Ansatz, der den gesamten Ganzzellkatalysator betrachtet, verwendet (Abb. 38).

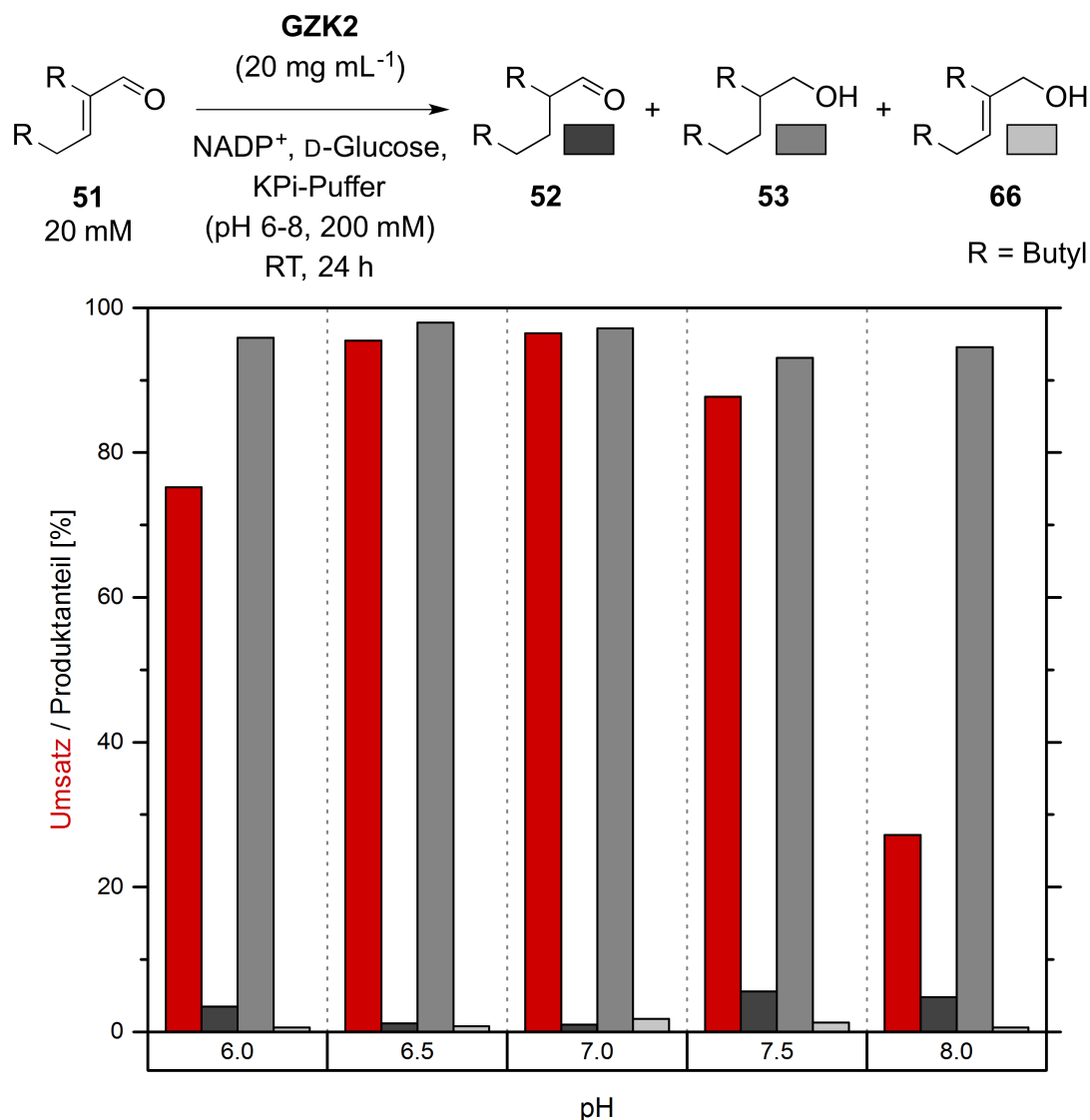


Abb. 38: Optimierung des pH-Werts für GZK2 bezüglich des Umsatzes (rot) von 2-Butyl-2-octenal (**51**) zu 2-Butyloctanal (**52**, dunkelgrau), 2-Butyl-1-octanol (**53**, grau) und 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**, hellgrau). Angegeben ist die Zellfeuchtmasse des GZK.

Es wurde für alle Experimente dieselbe Zellstammlösung in KPi-Puffer (pH 7) verwendet. Dies könnte zwar den pH-Wert geringfügig verändert haben, sorgte im Gegenzug aber für eine bessere Vergleichbarkeit der Experimente. Die Reaktionen wurden ansonsten unter denselben Bedingungen wie die vorherigen durchgeführt. Es wurde davon ausgegangen, dass auch bei Abweichung vom optimalen pH der GDH (pH 8.5) ihre Aktivität, die der reduktiven Enzyme (GoxER und PpADH) deutlich übersteigt, sodass die Cofaktorregenerierung nicht der limitierende Faktor ist.^[185,231,232]

Das Absenken des pH-Werts auf 6.5 hatte noch keine negativen Auswirkungen zur Folge. Erst bei pH 6.0 zeigte sich ein deutlich niedrigerer Umsatz von 75%, was auf eine geringere Aktivität der GDH zurückzuführen sein könnte. Der Anteil an 2-Butyloctanal (**52**) stieg lediglich geringfügig von 1 auf 4%. Bei steigendem pH-Wert fiel der Umsatz bereits bei pH 7.5 auf 88% und bei pH 8.0 bereits auf 27%. Auch hier stieg der Anteil an 2-Butyloctanal (**52**) nur auf 5 bzw. 6%. In beide Richtungen ist zunächst nur der geringere Umsatz der ER offensichtlich, wobei die leicht gestiegenen Anteile an 2-Butyloctanal (**52**) auch ein Hinweis auf eine niedrigere Aktivität/Stabilität der ADH sind. Da jedoch auch weniger Substrat für die ADH zur Verfügung stand, schlug sich dies nicht unmittelbar in deren Umsatz nieder. Der geringere Umsatz der GoxER ist wohl darauf zurückzuführen, dass sie ihre maximale Aktivität im Bereich pH 5.5 - 7.0 erreicht und im Basischen (>pH 7) stark an Aktivität verliert.^[167] Die PpADH hingegen weist eine weitestgehend stabile Aktivität über den gesamten betrachteten pH-Bereich auf.^[222]

Weiterhin stieg der Anteil an Nebenprodukt 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**) nicht, sondern sank tendenziell sogar von 2% auf unter 1%. Bei niedriger Aktivität/Stabilität der ER und gleichbleibender oder steigender Aktivität/Stabilität der ADH wäre trotz des vermutlich thermodynamisch günstigeren 2-Butyl-2-octenals (**51**) ein höherer Anteil an 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**) zu erwarten, da die C=C-Reduktion, welche ersteres aus dem Gleichgewicht entfernt, langsamer abläuft. Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass pH 7 der, bezogen auf den Gesamtumsatz und den Anteil an 2-Butyl-1-octanol (**53**) am Produkt, optimale pH-Wert für diese Biotransformation darstellt.

4.7.3.6 Substratscreening

Neben dem bisher betrachteten Modellsubstrat 2-Butyl-2-octenal (**51**) wurden auch 2-Ethyl-2-hexenal (**16**) als niedrigeres, sowie 2-Hexyl-2-decenal (**54**) und 2-Octyl-2-dodecenal (**55**) als höhere Homologe als Substrate für die Biotransformation mit GZK2 getestet (Abb. 39).

Die Reaktionsbedingungen waren identisch mit den vorherigen, lediglich die Reaktionszeit wurde auf 48 h erhöht. 2-Ethyl-2-hexenal (**16**) zeigt, wie das Modellsubstrat, einen quantitativen Umsatz über 2-Ethylhexanal (**69**) zum gewünschten Produkt 2-Ethyl-1-hexanol (**10**). Die höheren Homologen weisen mit steigender Kettenlänge einen abnehmenden Umsatz auf. Mit 2-Hexyl-2-decenal (**54**) sinkt der Gesamtumsatz auf 87%, wovon wiederum lediglich 73% auf das gewünschte Produkt 2-Hexyl-1-decanol (**67**) entfallen. Das Intermediat 2-Hexyldecanal (**56**) macht etwa 18% des Produkts aus. 2-Octyl-2-dodecenal (**55**) liefert einen Gesamtumsatz von nur noch 12%, wovon das Produkt 2-Octyl-1-dodecanol (**68**) 43% und das Intermediat 2-Octyldodecanal (**57**) 48% ausmachen. Mit 9% liegt der Anteil an Nebenprodukt bei beiden Substraten deutlich über den

für 2-Butyl-2-octenal (**51**) erhaltenen Werten. An den hohen Anteilen an Intermediat der Produktmischungen beider Substrate lässt sich erkennen, dass die ADH stärker an Aktivität/Stabilität verliert als die ER. Die hohen Nebenprodukt-Anteile wiederum deuten auf eine höhere Aktivität/Stabilität der ADH hin. Sie ließen sich aber auch mit einer weniger günstigen Gleichgewichtslage aufgrund eines thermodynamisch weniger favorisierten Enals erklären.

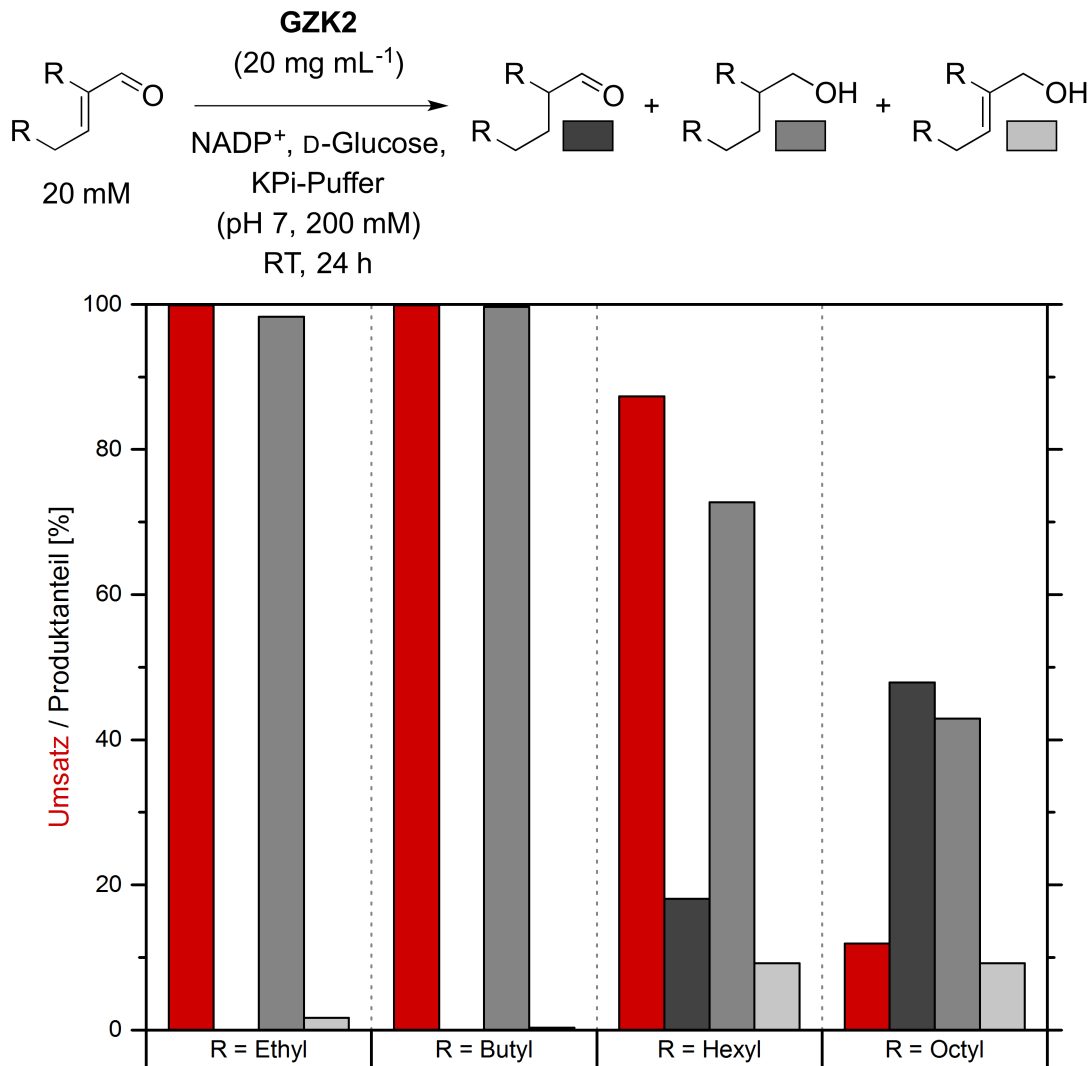


Abb. 39: Substratscreening für GZK2 bezüglich des Umsatzes (rot) von 2-Alkyl-2-alkenalen zu 2-Alkylalkanal (dunkelgrau), 2-Alkyl-1-alkanol (grau) und 2-Alkylalk-2-en-1-ol (hellgrau). Angegeben ist die Zellfeuchtmasse des GZK.

Grundsätzlich gibt es verschiedene Erklärungen, die alle, auch in Kombination, für den generell niedrigeren Umsatz der höheren Homologen in Frage kommen: (a) niedrigere Affinität (höherer K_m -Wert) der Enzyme für das Substrat aufgrund der sterisch anspruchsvolleren Struktur und daraus resultierend eine geringere Aktivität bei niedrigen Konzentrationen bzw. schlechter Löslichkeit; (b) niedrigere Löslichkeit des Substrats aufgrund höherer Lipophilie und dadurch eine geringere gelöste Konzentration, was auch

bei gleich bleibendem K_m -Wert eine niedrigere Aktivität zur Folge hat; (c) verringerte Stabilität des Enzyms durch z.B. Denaturierung in Gegenwart von lipophilen Substanzen oder Bildung von Schiff-Basen an Lysin-Resten der Enzymoberfläche; (d) geringere Stabilität des Ganzzellkatalysators durch, die Zellmembran destabilisierende lipophile Substanzen, wodurch indirekt die Stabilität der Enzyme beeinträchtigt werden kann.^[233] Treffen die, sich auf die Aktivität auswirkenden Erklärungen (a) und (b) zu, könnte durch Erhöhung der Reaktionszeit oder der Katalysatormenge der Umsatz gesteigert werden. Im Fall von (c) und (d), welche die Stabilität beeinflussen, käme nur eine höhere Katalysatorbeladung oder eine Änderung der Reaktionsbedingungen in Frage.

Im vorliegenden Fall tragen (a) und (b) vermutlich am ehesten zum niedrigeren Umsatz bei. Die Affinität des Enzyms zum Substrat beruht auf Interaktionen auf molekularer Ebene und ist damit konzentrationsunabhängig, womit auch kleine Änderungen der Struktur einen großen Einfluss haben können. Nach dem Michaelis-Menten-Modell hat zudem eine kleine Konzentrationsänderung besonders im niedrigen Bereich eine große Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge. Die Konzentration des Substrats ist ohnehin sehr niedrig, sodass eine Verlängerung der Alkylketten kaum einen nennenswerten Einfluss auf die Stabilität des Enzyms bzw. des Ganzzellkatalysators haben dürften. Ein für die Stabilität von Ganzzellkatalysatoren gegenüber den Substraten gerne herangezogenes Maß ist der logP-Wert.^[233] Je größer der Wert umso höher die Hydrophobizität des Substrats. Er lässt nicht nur einen Rückschluss auf seine Löslichkeit, sondern auch auf sein Diffusionsverhalten durch biologische Membranen zu. Hydrophobe Substanzen können die Membran leicht passieren, während hydrophile Substanzen Transporter-Systeme benötigen.^[234] Die Fähigkeit einer Verbindung Membranen zu penetrieren hat einen großen Einfluss auf die Stabilität der Zelle.^[235] Substrate mit einem logP-Wert von 1-4 diffundieren gut in Membranen hinein und sind noch wasserlöslich genug um die Integrität der Zelle zu beeinträchtigen. Stark hydrophobe Substanzen mit logP-Werten >4 akkumulieren zwar in der Membran, erreichen aber keine, für die Stabilität der Zelle kritische Konzentration.^[233] Die logP-Werte der betrachteten Substrate wurde mithilfe der Software *ACDLabs* berechnet und liegen mit Ausnahme von 2-Ethyl-2-hexenal (**16**, logP 2.66), weit über einem Wert von 4 (Tab. 14). Es ist daher sehr unwahrscheinlich, dass sie die Integrität des Ganzzellkatalysators stören.

Vielversprechend ist die Tatsache, dass die höheren Homologen zumindest akzeptiert und zum gewünschten Produkt umgesetzt werden. Der Zusatz von Cosolvens zur Verbesserung der Löslichkeit würde voraussichtlich höhere Umsätze liefern und auch die Möglichkeit zur Erhöhung der Substratkonzentration bieten.

Tab. 14: Berechnete logP-Werte der Substrate der Biotransformation (Software: *ACD/Labs*).

Substrat	logP (± 0.32)
2-Ethyl-2-hexenal (5)	2.66
2-Butyl-2-octenal (1)	4.78
2-Hexyl-2-decenal (6)	6.91
2-Octyl-2-dodecenal (7)	9.04

4.7.3.7 Erhöhung der Substratkonzentration und Verwendung von organischem Cosolvens

Die geringe Löslichkeit der Substrate stellt im Hinblick auf den Umsatz der Biotransformation die größte Limitierung dar. Ab Erreichen der Löslichkeitsgrenze ist eine Steigerung der Aktivität durch Erhöhung der Substratmenge nicht mehr möglich, da sich die gelöste Substratkonzentration nicht weiter erhöht. Bei gleichbleibender Reaktionszeit kann so nur durch Erhöhung der Katalysatormenge mehr Substrat umgesetzt werden. Sofern nicht schon im Sättigungsbereich des Enzyms gearbeitet wird, ermöglicht der Einsatz von organischem Cosolvens hingegen eine Steigerung der Löslichkeit des Substrats und damit auch der Aktivität des Enzyms. Die Wahl des Lösungsmittels ist Abhängig von dessen Eigenschaften und seinem Einfluss auf das Enzym. Zum einen sollte es wasserlöslich sein, da bei Ausbildung einer zweiten Phase durch den ungünstigen Verteilungskoeffizienten lipophiler Verbindungen eher Substrat aus der wässrigen Umgebung des Enzyms extrahiert und tatsächlich der gegenteilige Effekt erreicht würde. Dieser Ansatz kann in Fällen von Substrat- oder Produktinhibierungen hilfreich sein. Zum anderen sollte das Cosolvens möglichst die Stabilität des Enzyms nicht beeinträchtigen.

Die angestrebte, erhöhte Substratkonzentration bedingt eine Erhöhung der Pufferkonzentration, um die größere Menge gebildeten Gluconats zu neutralisieren, die ansonsten den pH-Wert der Reaktionslösung bis zur Deaktivierung der Enzyme absenken könnte. Um dessen Einfluss festzustellen, wurde zunächst die Benchmark-Reaktion mit niedriger Substratkonzentration von 20 mM in 500 mM KPi-Puffer durchgeführt (Abb. 40).

Es war ein Rückgang des Umsatzes auf 84% und eine Anreicherung von 14% 2-Butyl-octanal (**52**) im Produkt zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass sowohl die ER als auch die ADH von der höheren Pufferkonzentration negativ beeinflusst wurden. Eine Steigerung der Substratkonzentration auf 50 bzw. 100 mM ließ den Umsatz weiter auf 54 bzw. 34% sinken. In absoluten Mengen wurde bei höheren Konzentrationen jedoch mehr Substrat umgesetzt als bei niedrigen. Zudem verschob sich das Produktverhältnis leicht zugunsten des gewünschten Produkts 2-Butyl-1-octanol (**53**). Dies lässt darauf

schließen, dass beide Enzyme, geringfügig mehr jedoch die ADH bei steigender Substratkonzentration noch an Aktivität gewinnen. Durch den Zusatz von 20% v/v Methanol, welcher zuvor bereits als unproblematisch für die Stabilität der Enzyme bestätigt wurde (Abschnitt 4.7.2.1), konnte der Umsatz für 50 und 100 mM auf 93 bzw. 77% erhöht werden. Auch der Anteil an gewünschtem Produkt 2-Butyl-1-octanol (**53**) war mit 96 bzw. 97% sehr hoch. Das unerwünschte Nebenprodukt 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**) wurde in allen Versuchen zu weniger als 2% gebildet.

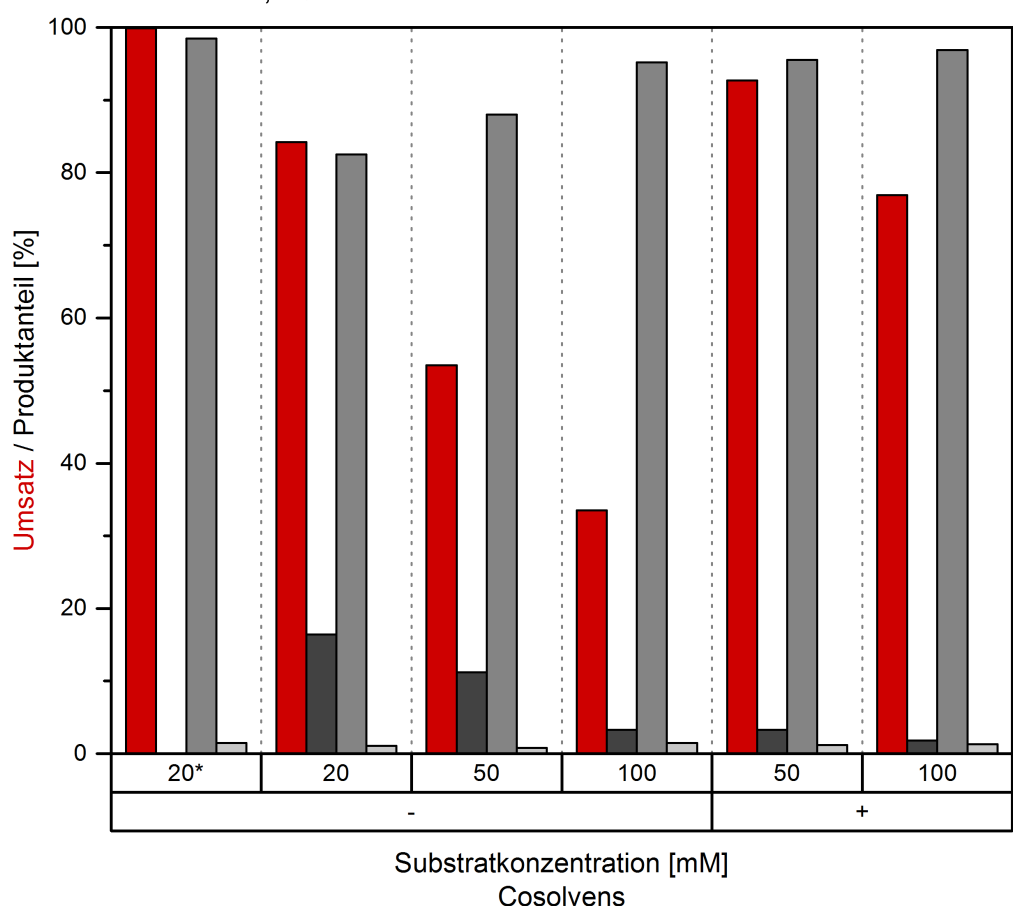
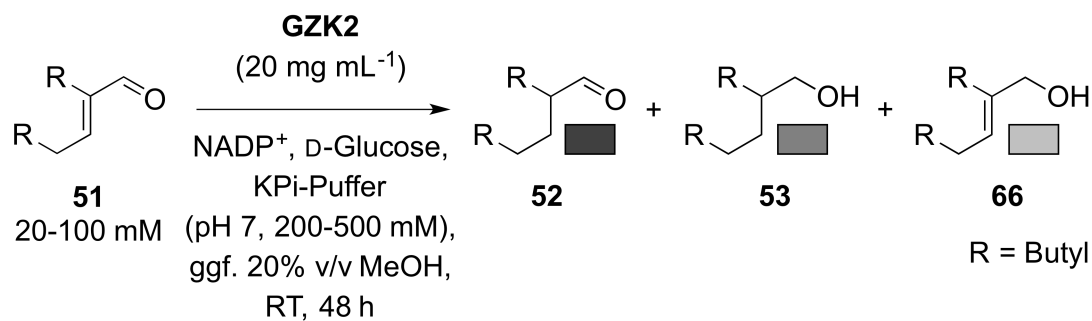
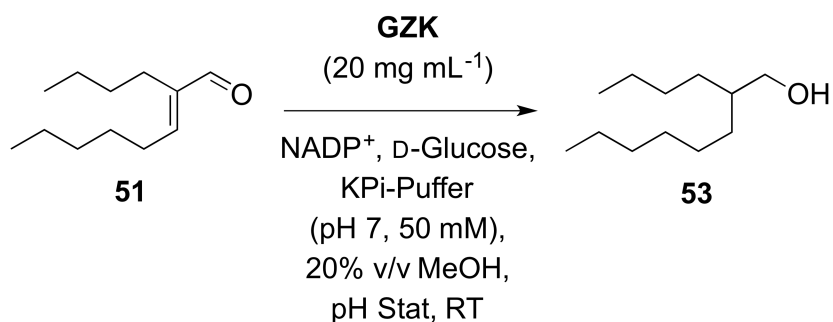


Abb. 40: Erhöhung der Substratkonzentration mit (+) und ohne (-) Zusatz von 20% MeOH als Cosolvens für GZK2 bezüglich des Umsatzes (rot) von 2-Butyl-2-octenal (**51**) zu 2-Butyloctanal (**52**, dunkelgrau), 2-Butyl-1-octanol (**53**, grau) und 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**, hellgrau).

* 200 mM KPi-Puffer statt 500 mM verwendet. Angegeben ist die Zellfeuchtmasse des GZK.

Zur weiteren Steigerung des Umsatzes wurden ein 50 mM KPi-Puffer und ein pH-Stat-Apparat, welcher kontinuierlich den pH-Wert der Reaktionslösung misst und mit Natronlauge (1-5 M) neutralisiert, eingesetzt. So konnte der negative Einfluss der hohen Pufferkonzentration umgangen werden. Die Reaktionen wurden zunächst im 25 mL-Maßstab durchgeführt und nach vollständigem Umsatz (erkennbar am Titrationsverlauf) beendet (Tab. 15).

Tab. 15: Ganzzell-Biotransformationen mit erhöhter Substratkonzentration.



Eintrag	GZK	Volumen [mL]	Substrat [g L ⁻¹]	Zeit [h]	Ausbeute [%]	Katalytische Produktivität ^a
1	2	25	17.2	16	80 ^{b,d}	0.7
2	2	25	37.2	48	89 ^d	1.7
3	2	25	93.6	68	86 ^d	4.0
4	4	25	18.2	22	85 ^c	0.8
5	2	500	18.5	48	97 ^e	0.9

^a Menge GZK pro Menge Produkt ; 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**): ^b 2.4%, ^c 4.4%; ^d >95% Reinheit; ^e 88% Reinheit

Da neben der betrachteten Reaktion, der pH-Wert auch durch CO₂-Eintrag verringert werden kann, besteht die Möglichkeit, dass auch vor dem Abbruch der Reaktionen nach den angegebenen Zeiten der Umsatz bereits vollständig war. Entsprechend gelten die Reaktionszeiten als nicht optimiert. Bereits bei einer Substratkonzentration von 17.2 g L⁻¹ (ca. 100 mM) konnte nach 16 h ein vollständiger Umsatz erreicht werden. Die Substratkonzentration konnte weiter bis auf industriell relevante 94 g L⁻¹ (etwa 0.5 M) erhöht werden, wobei sich die Reaktionszeit auf 68 h erhöhte. Die Ausbeuten lagen zwischen 80 und 89% mit einem Anteil von etwa 2% 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**). Die höchste erreichte katalytische Produktivität (Menge Produkt pro Menge GZK) lag bei 4.0. Zum Vergleich wurde eine Reaktion mit GZK4 durchgeführt, bei der etwa 4% des Nebenprodukts entstanden, was sich auf das größere Aktivitätsverhältnis GoxER/PpADH (siehe Abschnitt 4.7.3.2) zurückführen lässt. Die Aufarbeitung wurde im 25 mL-Maßstab simuliert und es wurde festgestellt, dass bei Extraktion mit MTBE lediglich 88% der eingesetzten

Menge 2-Butyl-1-octanol (**53**) wiedergewonnen wurden. Auch Durchführung einer Reaktion im vergrößerten Labormaßstab der von 0.5 L Volumen bei 18.5 g L^{-1} ergab nach 48 h quantitativen Umsatz bei einer Produktreinheit von 88%, was 8.1 g 2-Butyl-1-octanol (**53**) entsprach. Diese ließe sich durch eine finale Destillation weiter erhöhen.

In Abb. 41 ist der typische Titrationsverlauf einer Biotransformation am pH-Stat-Apparat dargestellt. Da pro Reduktion ein Molekül Gluconat gebildet und neutralisiert wird, repräsentiert der Verbrauch an Natronlauge direkt die Reaktionsrate. Nach einer kurzen Initiationsphase, welche zum einen auf die Pufferkapazität und zum anderen auf die Zeit zurückzuführen sein könnte, die die ersten Substratmoleküle benötigen, um die Zellmembran zu passieren, erreicht die Reaktion bereits nach zwei Stunden ihre maximale Geschwindigkeit und damit den Wendepunkt der Kurve.

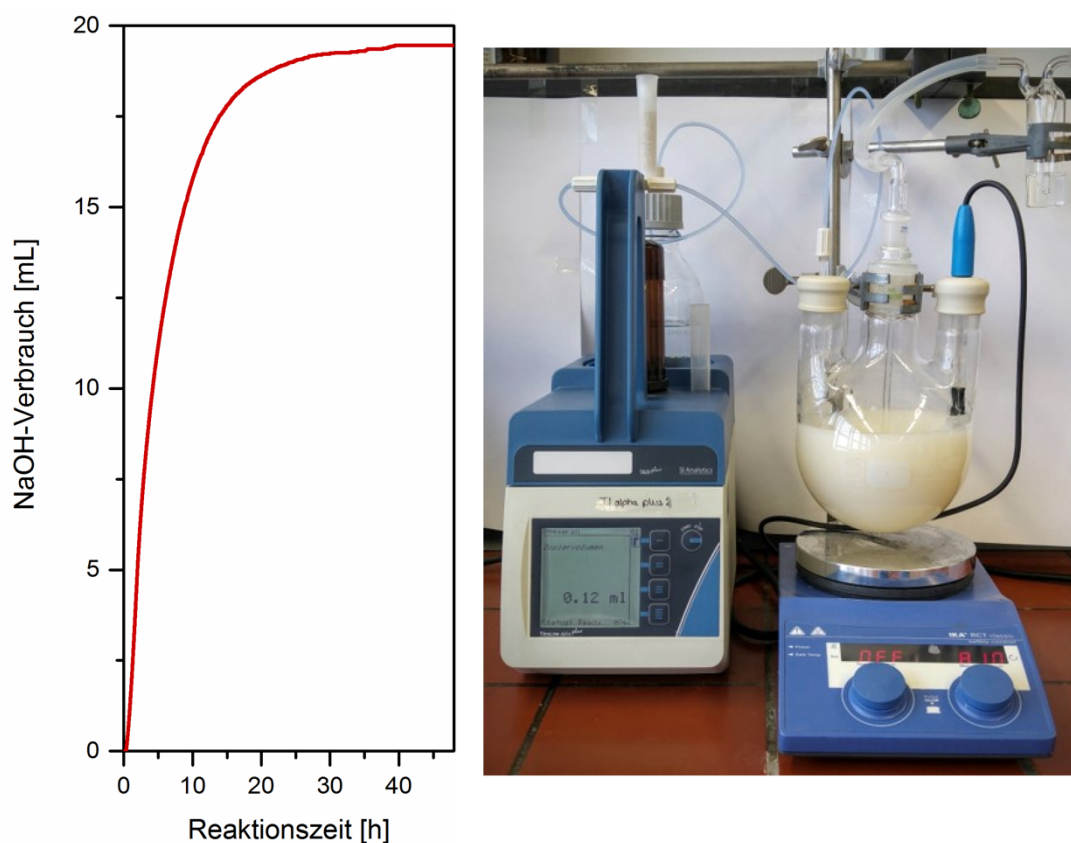


Abb. 41: Titrationsverlauf der Natronlauge und Aufbau der Biotransformation im 500 mL-Maßstab.

Ab diesem Zeitpunkt sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit, bis sie nach 24 h praktisch gegen Null geht. Es ist ersichtlich, dass bei effizienter Reaktionsführung, ein Abbruch der Reaktion bereits nach 24 h oder weniger, ohne nennenswerte Umsatzeinbußen sinnvoll wäre. Die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion ist die Summe der Geschwindigkeiten der C=C- und C=O-Reduktion. Da am Anfang noch kein Substrat für die C=O-Reduktion zur Verfügung steht (die Nebenreaktion kann aufgrund der Gleichgewichtslage

vernachlässigt werden) arbeitet zunächst nur die ER. Erst wenn genug 2-Butyl-octanal (**52**) gebildet wurde, setzt auch die C=O-Reduktion ein. Zum Ende hin ist nicht mehr genug 2-Butyl-2-octenal (**51**) vorhanden und die ER verliert immer mehr an Aktivität, sodass der Anteil der Geschwindigkeit der C=O-Reduktion an der Gesamtgeschwindigkeit zunimmt bis schließlich alles Intermediat verbraucht und die Reaktion beendet ist.

Die Reaktion fand in einem 1 L-Dreihalskolben mit Anschlüssen für pH-Elektrode, Titrier-einheit und Argonzufuhr statt. Das Volumen des Reaktionsgefäßes ist ein Kompromiss zwischen möglichst geringem Gasvolumen über der Reaktionslösung und der Gewährleistung homogener Mischbarkeit. Letztere wird auch durch die Verwendung eines Circulum-Magnetrührkerns bei 800 rpm gefördert. Um Sauerstoff möglichst vollständig aus der Reaktion zu entfernen, wurde vor Zugabe von Substrat und Cosolvens etwa 30 min Argon durch die Reaktionsmischung geleitet. Während der Reaktion wurde jedoch auf das Durchleiten von Argon verzichtet und stattdessen das Reaktionsgefäß gasdicht verschlossen um sowohl Sauerstoff Eintritt von außen, als auch das Verdampfen von Cosolvens zu vermeiden.

4.8 Entwicklung und Analyse des Gesamtprozesses zur Synthese von Guerbet-Alkoholen

4.8.1 Allgemeine Aspekte der Kombination von Reaktionen

Aus wirtschaftlichen und ökologischen Gründen, ist das Ziel der Kombination einzelner Reaktionen stets die Minimierung der Anzahl an Aufarbeitungs- und Isolationsschritten (Abb. 42).^[236] So kann beispielsweise die anfallende Menge Abfall reduziert und die Gesamtausbeute durch verlustreiche Isolation gesteigert werden. Im Idealfall werden die Einzelreaktionen in Form eines Tandem-Eintopf-Prozesses vereint, sodass die Reaktion, einmal gestartet, ohne weiteres Eingreifen zum gewünschten Produkt führt. Sollte dies nicht möglich sein, kann auch ein sequenzieller Eintopf-Prozess, bei dem erst nach Abschluss einer Reaktion die Reaktionskomponenten der nächsten Stufe zugegeben werden, zum Erfolg führen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, den Übergang zwischen zwei, nicht in o.g. Form kombinierbaren Stufen zu optimieren indem ein Wechsel des Lösungsmittels vermieden wird.

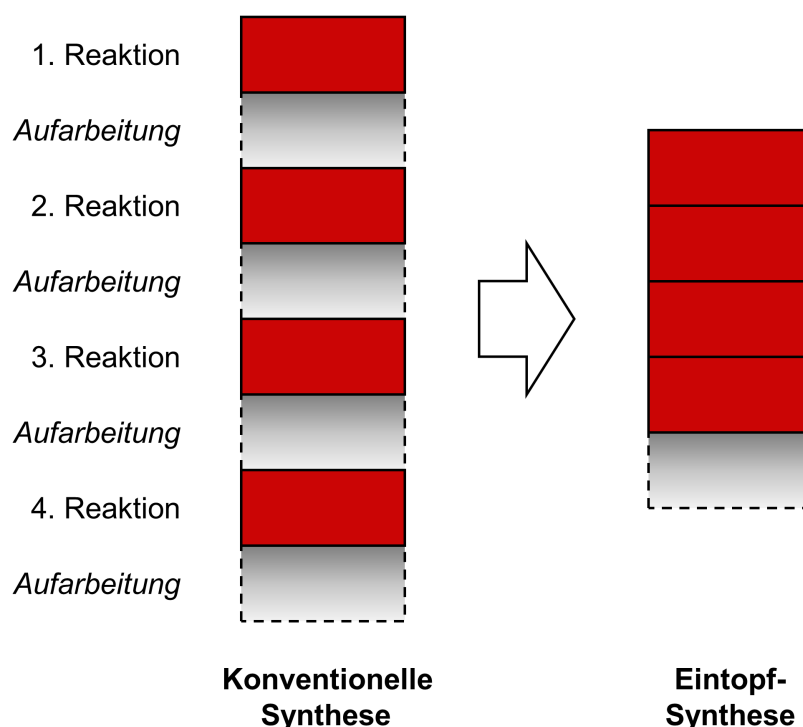


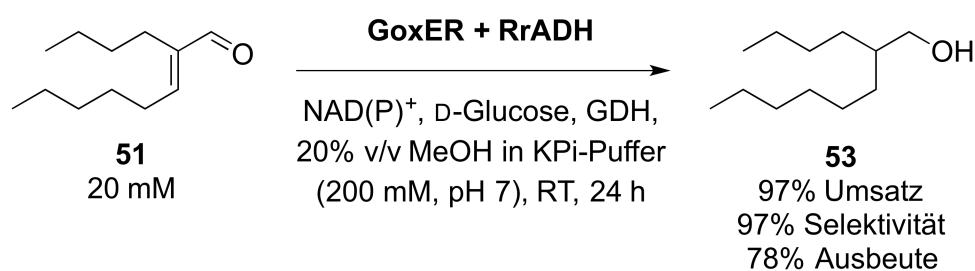
Abb. 42: Optimierung einer konventionellen Synthese hin zu einer Eintopf-Synthese.

Insbesondere bei Beteiligung von Enzymen, kann sich die Kombination einzelner Reaktionen schwierig gestalten. Reaktionskomponenten anderer Stufen können zur Inhibition oder Deaktivierung führen. Hier können auch Strategien zur Kompartimentierung Anwendung finden.^[237]

Bereits in den Abschnitten 4.4 und 4.7 wurden die Kombination von Alkohol-Oxidation und Aldolkondensation durch Vermeidung eines Lösungsmittelwechsels, sowie die Kombination der enzymatischen C=C- und C=O-Reduktionen in einer Eintopf-Reaktion diskutiert.

4.8.2 Gesamtprozess mit isolierten Enzymen

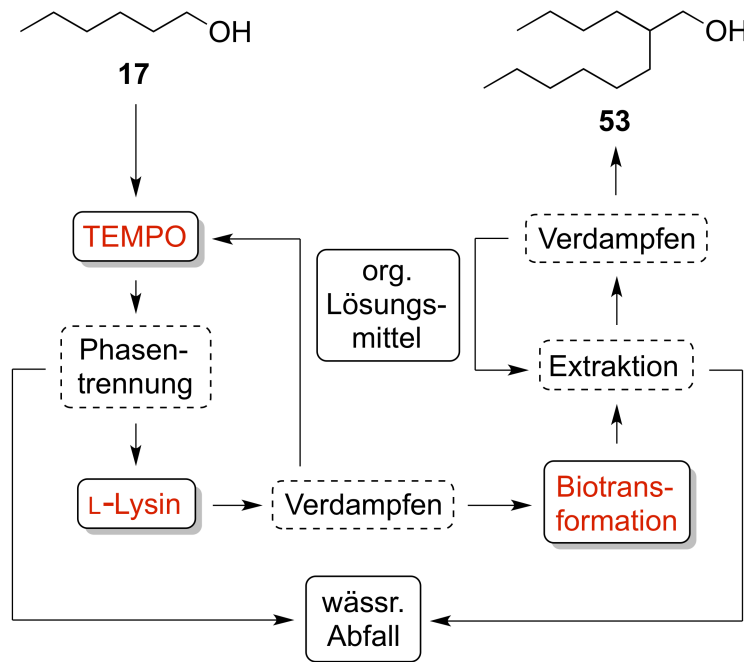
Im nächsten Schritt wurde der chemokatalytische erste Teil des Prozesses, bestehend aus Alkohol-Oxidation und Aldolkondensation (Abschnitt 4.4) und der biokatalytische zweite Teil, bestehend aus C=C- und C=O-Reduktion (Abschnitt 4.7) in einem Gesamtprozess vereint. Da Dichlormethan als Cosolvens der Biotransformation aufgrund der Instabilität insbesondere der GoxER nicht in Frage kam, musste ein Lösungsmittelwechsel stattfinden. So wurde das Rohprodukt der o.g. chemokatalytischen Kaskade in die enzymatische Doppelreduktion mit GoxER und RrADH mit Methanol als Cosolvens eingesetzt (Schema 41).



Schema 41: Enzymatische Doppelreduktion unter Verwendung des Rohproduktes der chemokatalytischen Kaskade aus Alkohol-Oxidation und Aldolkondensation.

Es wurde ein quantitativer Umsatz mit 97% Selektivität und einer Ausbeute von 78% erhalten. Gemeinsam mit der Ausbeute des ersten Prozessteils von 80%, entspricht dies einer Ausbeute von 68% über den gesamten Prozess. Das Produkt wies ohne weitere Aufreinigung durch Destillation eine Reinheit von 95% auf, was ein guter Wert für die direkte Verwendung als Massenchemikalie ist.

Ein Flusschema des Gesamtprozesses ist in Schema 42 dargestellt und zeigt die nötigen Aufarbeitungsschritte, sowie die Rezyklisierung von organischem Cosolvens. Nach der Alkohol-Oxidation, die in Dichlormethan/Wasser stattfand, wurde eine Phasentrennung durchgeführt, wobei sich das Produkt in der organischen Phase befand. Die wässrige Phase, die v.a. Natriumbromid und -chlorid, sowie Hydrogencarbonat enthielt, stellt Abwasser dar. Zur organischen Phase wurde L-Lysin gegeben, welches die Aldolkondensation katalysierte. Dichlormethan wurde verdampft und kann im nächsten Zyklus wiederverwendet werden.



Schema 42: Flussschema des Gesamtprozesses.

Das Rohprodukt wurde der Biotransformation in Methanol/Wasser zugeführt. Nach Extraktion mit MTBE, bei der auch ein Großteil des Methanols extrahiert wurde, wurde erneut das organische Lösungsmittel verdampft. Durch fraktionierte Destillation könnte Methanol von MTBE getrennt und beides rezykliert werden. Die wässrige Phase wurde verworfen. Das erhaltene Rohprodukt sollte zur Steigerung der Reinheit im Anschluss destilliert werden.

4.8.3 Optimierung des Prozesses durch Verwendung eines Ganzzellkatalysators

Aufgrund der niedrigen Aktivität der RrADH und da sie sich nicht einfach über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufreinigen ließ, war eine sehr große Biomasse in Form eines Zellrohextraktes nötig. Außerdem war eine Erhöhung der Substratkonzentration nicht ohne parallele Erhöhung der absoluten Enzymmenge möglich, was die maximal mögliche Substratkonzentration durch das Volumen der Reaktion limitiert. In diesem Fall nähme der Zellrohextrakt der RrADH das gesamte Reaktionsvolumen ein. Ein Aufkonzentrieren oder Lyophilisieren des ZREs führte zum vollständigen Aktivitätsverlust.

Ganzzellkatalysatoren stellen die konsequente Weiterentwicklung der Verwendung isolierter Enzyme dar, da der Zellaufschluss und ggf. die Aufreinigung der Enzyme entfallen. Dies senkt die Kosten des Prozesses und ebnet den Weg hin zu einem fermentativen Prozess. Zudem bleibt die native Umgebung der Enzyme erhalten, was ihre Stabilität

insbesondere gegenüber große Substratkonzentrationen und organischen Solvenzien erhöht.^[238,239]

Ein wichtiges Kriterium für die industrielle Anwendung eines Prozesses ist seine Ökoefizienz. Die diesbezügliche Analyse umfasst sicherheits- und prozesstechnische, sowie umweltbezogene Parameter, wobei die ersten beiden in der Regel unternehmensspezifischen Vorgaben gerecht werden müssen, die vor allem von der vorhandenen Infrastruktur abhängen.^[240] Der Einfluss auf die Umwelt, wie die Menge an produziertem Abfall kann hingegen direkt quantifiziert werden. Für den vorliegenden Prozess wurden die Biotransformationen mit isolierten Enzymen und Ganzzellkatalysatoren bezüglich ihres E-Faktors (*environmental factor*) verglichen (Abb. 43). Dieser beschreibt die anfallende Menge Abfall in Kilogramm pro Kilogramm Produkt. Zur Berechnung wurde die Software EATOS (*environmental assessment tool for organic syntheses*) verwendet.^[241,242]

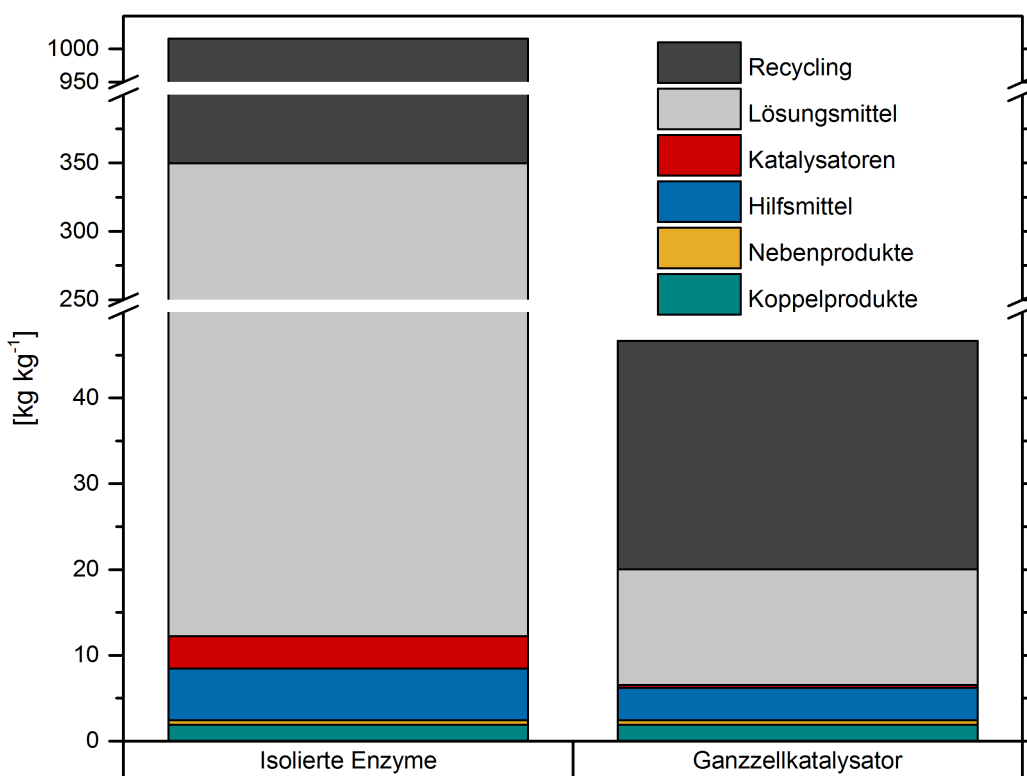


Abb. 43: Vergleich der Umwelteinflüsse der Biotransformationen mit isolierten Enzymen und Ganzzellkatalysator. Berechnet mit EATOS (*environmental assessment tool for organic syntheses*).^[241,242]

Die Biotransformation mit isolierten Enzymen produziert insgesamt 1016 kg kg⁻¹, wovon der größte Teil Lösungsmitteln zugeordnet werden kann. Für organische Lösungsmittel wurde eine Rezyklisierbarkeit von 95% angenommen, was etwa zwei Drittel der Abfallmenge einspart und die anfallende Gesamtmenge auf 350 kg kg⁻¹ reduziert. Auch hier-

von lassen sich wiederum 97% (338 kg kg^{-1}) auf, vor allem wässrige Lösungsmittel zurückführen. Die Verwendung von Ganzzellkatalysatoren erlaubt es, die Gesamtmenge auf 47 kg kg^{-1} , bzw. 20 kg kg^{-1} , unter Berücksichtigung der Rezyklisierbarkeit von 95% des organischen Cosolvens, zu verringern. Auch in diesem Fall stehen 68% (13.5 kg kg^{-1}) in Zusammenhang mit Lösungsmitteln. Der Grund für diese enorme Diskrepanz zwischen isolierten Enzymen und Ganzzellkatalysatoren ist im Wesentlichen in der höheren möglichen Substratkonzentration bei der Verwendung letzterer zu suchen. Für isolierte Enzyme wurde eine Substratkonzentration von 20 mM angenommen, da ohne Erhöhung der Enzymmenge keine Erhöhung der Substratkonzentration möglich war. Ganzzellkatalysatoren hingegen ermöglichten eine Konzentration von bis zu 500 mM. Für beide System gilt, dass diese Konzentrationen nicht den maximal möglichen Wert darstellen und weitere Optimierung vermutlich in beiden Fällen höhere Konzentrationen erlauben.

Eine mögliche Visualisierung der Stoffströme kann über ein sogenanntes Sankey-Diagramm erfolgen. Neben den Abfallströmen lassen sich so auch die Ströme aller anderen beteiligten Komponenten (Substrate, Lösungsmittel) auch zwischen den einzelnen Stufen des Prozesses darstellen. Abb. 44 zeigt ein Sankey-Diagramm der gesamten chemoenzymatischen Synthese der Guerbet-Alkohole unter Verwendung des Ganzzellkatalysators. Es fällt auf, dass den größten Anteil in beiden Prozessteilen die Lösungsmittel ausmachen. Summiert werden in allen Schritten 70.3 kg kg^{-1} Wasser und 84.4 kg kg^{-1} organische Lösungsmittel (Dichlormethan, Methanol und MTBE) benötigt. Aufgrund der potentiellen Rezyklisierbarkeit von 95% des organischen Solvens, verringert sich sein Wert auf 4.2 kg kg^{-1} . Es ist anzumerken, dass der erste, chemokatalytische Teil des Prozesses nicht hinsichtlich der Konzentration optimiert wurde. Jedoch gelten beide Reaktionen als leicht skalierbar, sodass einer Erhöhung der Konzentration und damit Verringerung der nötigen Komponenten und anfallenden Abfälle nichts im Weg steht.

4.8.4 Alternativer Prozess ausgehend von Aldehyden

Eine Alternative zum vorgestellten Prozess ausgehend von primären, aliphatischen Alkoholen ist ein Variante, die auf der Stufe der korrespondierenden Aldehyde beginnt. Die Aldolkondensation kann so in Methanol stattfinden, in dem erwiesenermaßen eine sehr hohe Konzentration (bis zu 5.6 M) und eine niedrigere Katalysatorbeladung (6.6 mol%) möglich sind (Abschnitt 4.3.2). Anschließend kann die Produktlösung ohne weitere Aufarbeitung als Substratlösung in die Biotransformation eingesetzt werden.

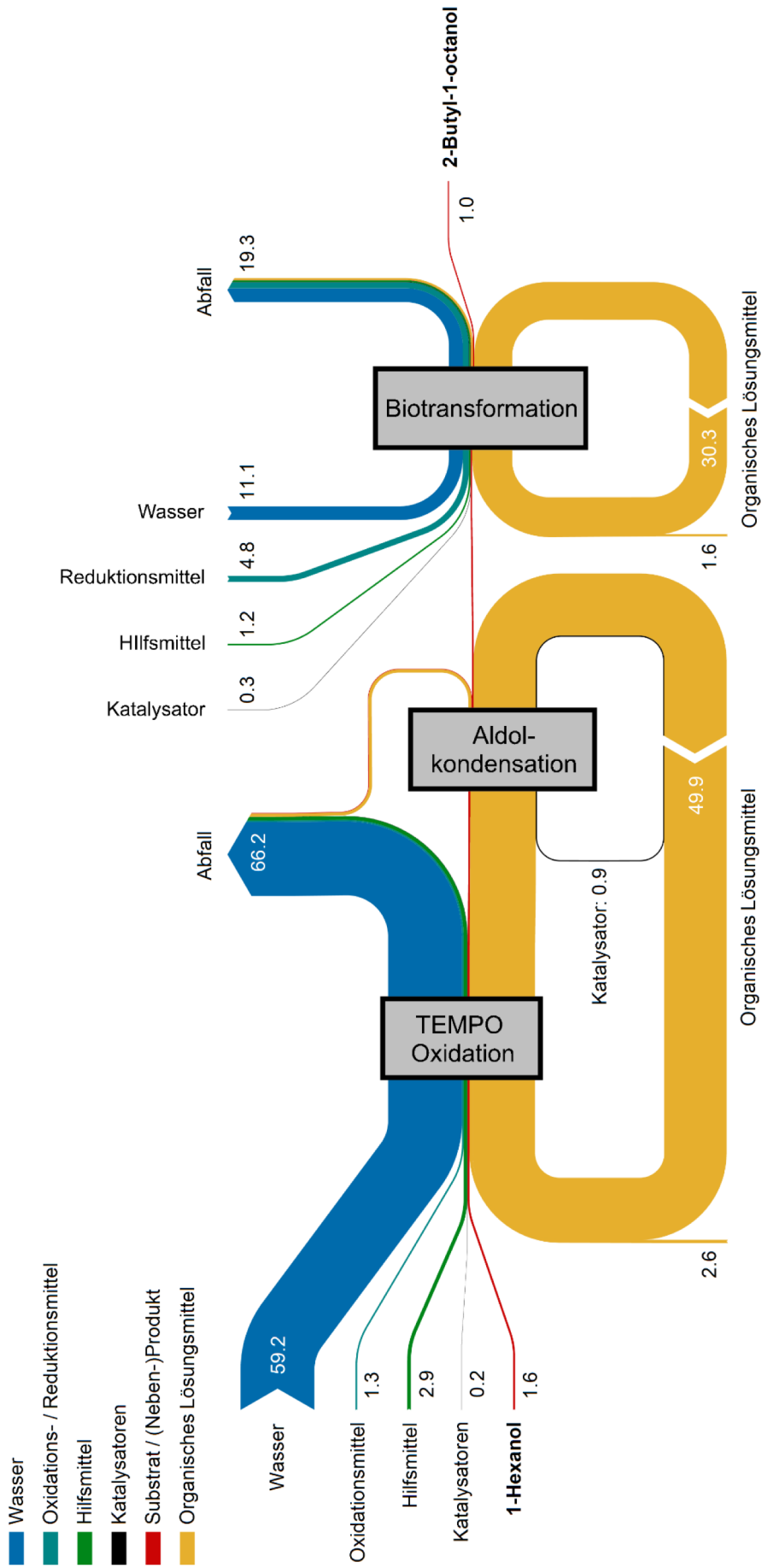
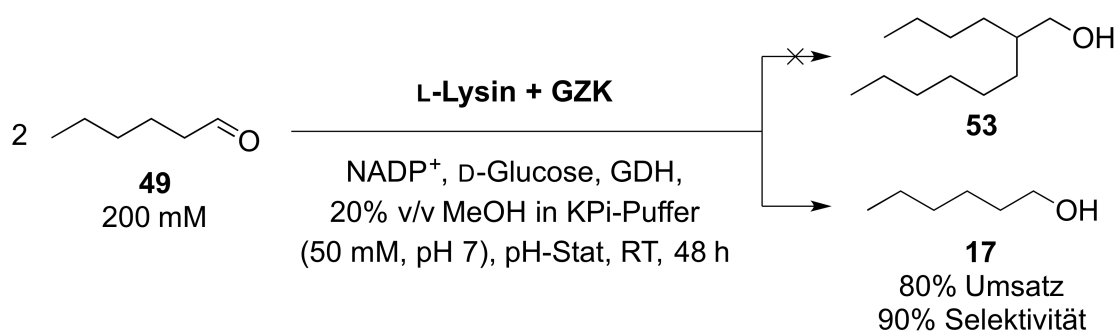


Abb. 44: Sankey-Diagramm des Gesamtprozesses unter Verwendung eines Ganzzellkatalysators (Software: e!Sankey).

Eine Kombination mit der Alkohol-Oxidation ist in Methanol jedoch nicht möglich, da Methanol zu Formaldehyd oxidiert werden würde. Da aber v.a. Butanal industriell schon in sehr großen Mengen aus der Hydroformylierung von Propen erzeugt wird und damit kostengünstig zur Verfügung steht, könnte die Alkohol-Oxidation entfallen und der Prozess auf der Aldehyd-Stufe beginnen. Es konnte gezeigt werden, dass die Aldolkondensation auch in einer Mischung von 20% v/v Methanol in Puffer erfolgreich durchgeführt werden kann (siehe Abschnitt 4.3.2). Dennoch ist eine Eintopf-Reaktion der Aldolkondensation mit der Biotransformation nicht möglich, da der Aldehyd, bevor die Kondensation stattfinden kann, sehr schnell von der ADH zum Alkohol reduziert wird und nicht mehr für die Aldolkondensation zur Verfügung steht. Ein entsprechender Versuch zeigte einen Umsatz von 80% zu 1-Hexanol (**17**) (Schema 43).

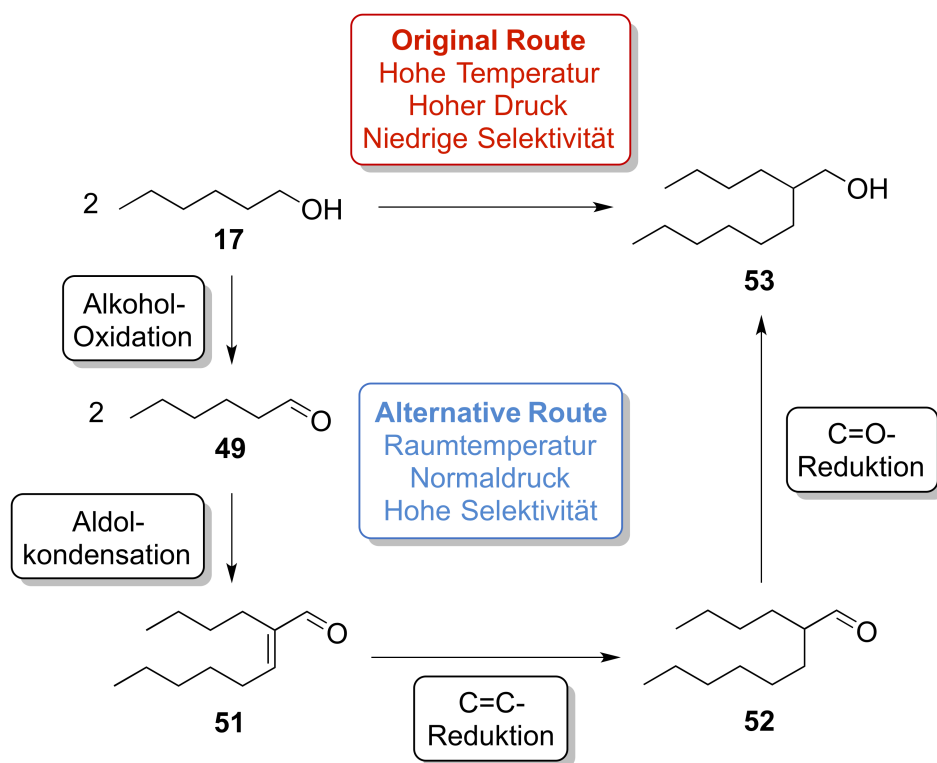


Schema 43: Versuch zur Kombination der Aldolkondensation und Biotransformation als Eintopf-Reaktion (weitere Produkte: 4% 2-Butyl-2-octenal (**51**), 6% Säuren).

Eine TEMPO-Oxidation in z.B. Ethylacetat (siehe Abschnitt 4.2.2.5) ist möglich. Da aber die Aldolkondensation in diesem Solvens nicht realisierbar ist, müsste ein Lösungsmittelwechsel stattfinden, der jedoch aufgrund der Flüchtigkeit von Aldehyden zu großem Verlust an von Hexanal (**49**) führen würde. So ist eine Substitution von chlorierten Lösungsmitteln im ersten Teil des Prozesses derzeit nur für die Aldolkondensation, nicht aber für die TEMPO-Oxidation möglich.

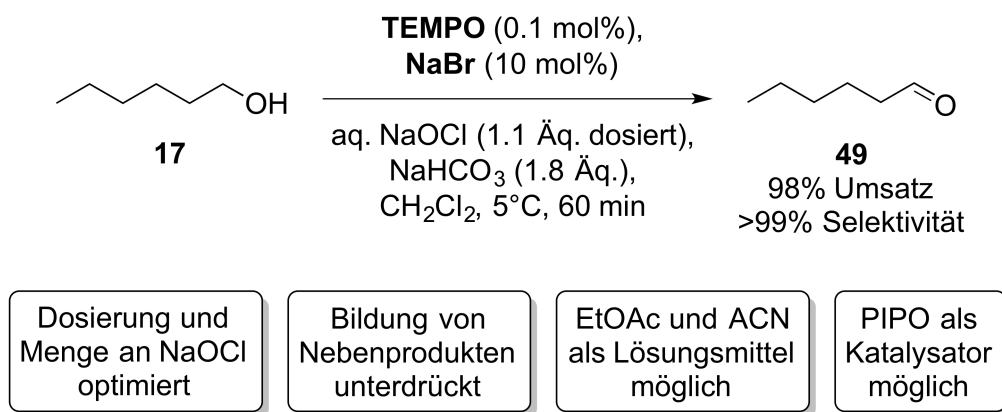
5 Zusammenfassung

Es wurde ein chemoenzymatischer Prozess zur Synthese von Guerbet-Alkoholen, die wichtige, großindustrielle Produkte im Bereich der Schmierstoffe, Weichmacher und Waschmittel darstellen, entwickelt. Als Alternative zur ursprünglichen Guerbet-Reaktion, die bei hohen Temperaturen und Drücken eine vergleichsweise niedrige Selektivität für das Produkt aufweist, wurden eine chemokatalytische Alkohol-Oxidation von 1-Hexanol (**17**) und eine chemokatalytische Aldolkondensation von Hexanal (**49**) mit enzymatischen C=C- und C=O-Reduktionen von 2-Butyl-2-octenal (**51**) bzw. 2-Butyloctanal (**52**) kombiniert. Der resultierende Gesamtprozess arbeitet bei Raumtemperatur und Normaldruck und erreicht hohe Umsätze und Selektivitäten (Schema 44).



Schema 44: Übersicht des chemoenzymatischen Prozesses zur nachhaltigen Synthese von Guerbet-Alkoholen.

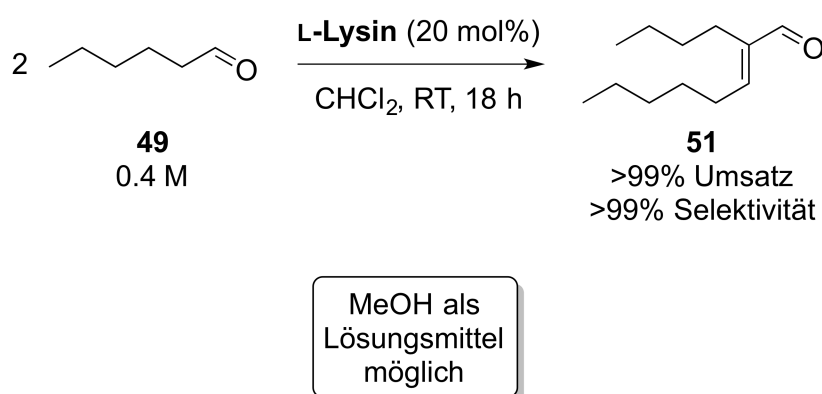
Ursprünglich als Redox-neutrale Kaskade mit drei enzymatischen und einem chemokatalytischen Schritt geplant, wurde mangels geeigneter Alkoholdehydrogenasen, die Oxidation primärer, aliphatischer Alkohole zu Aldehyden als chemokatalytische Reaktion mit TEMPO als Katalysator und Hypochlorit als stöchiometrischem Oxidationsmittel realisiert. Unter Einsatz von nur 0.1 mol% TEMPO konnte für die Oxidation von 1-Hexanol (**17**) zu Hexanal (**49**) nach 60 min ein quantitativer Umsatz mit einer Selektivität von >99% erreicht werden (Schema 45).



Schema 45: Oxidation von 1-Hexanol (**17**) zu Hexanal (**49**) mit TEMPO/NaBr als Katalysatoren und Hypochlorit als stöchiometrisches Oxidationmittel.

Die Bildung von Nebenprodukten wurde durch Dosierung und Optimierung hinsichtlich der verwendeten Menge Hypochlorit weitestgehend unterdrückt. Die Nutzung eines polymeren TEMPO-Derivates (PIPO) eröffnet die Möglichkeit zur Rezyklisierung des Katalysators. Es konnte zudem gezeigt werden, dass neben Dichlormethan auch Ethylacetat oder Acetonitril als organische Komponente des Zwei-Phasen-Systems verwendet werden können.

Da sich eine Aldolkondensation in wässrigem Solvens als schwierig herausstellte und zudem aufgrund des hohen pH-Werts nicht direkt kompatibel mit der Biotransformation war, wurde eine Reaktion in organischem Solvens mit L-Lysin als Katalysator entwickelt. Sie ist sowohl in Dichlormethan, als auch in Methanol möglich. In beiden Fällen wurden sehr gute bis quantitative Umsätze mit perfekten Selektivitäten erzielt (Schema 46).

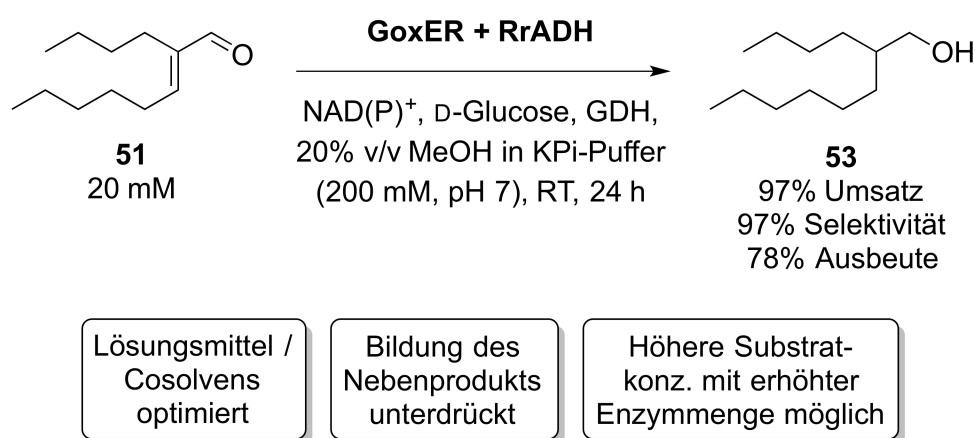


Schema 46: Lysin-katalysierte Aldolkondensation von Hexanal (**49**) zu 2-Butyl-2-octenal (**51**).

Für die enzymatischen C=C- und C=O-Reduktionen wurde zunächst ein Screening durchgeführt und eine En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* (GoxER) und eine Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus ruber* (RrADH) mit der höchsten Aktivität gegenüber 2-Butyl-2-octenal (**51**) bzw. 2-Butyloctanal (**52**) identifiziert. Die C=C-Reduktion

wurde mithilfe von statistischer Versuchsplanung hinsichtlich der eingesetzten Enzymmenge, der Temperatur, sowie der Reaktionszeit optimiert. Die Immobilisierung der GoxER an Epoxid-Träger resultierte in einer sehr guten Restaktivität von 62%. Eine adäquate Rezyklisierung konnte aufgrund von Enzymdeaktivierung nicht erreicht werden.

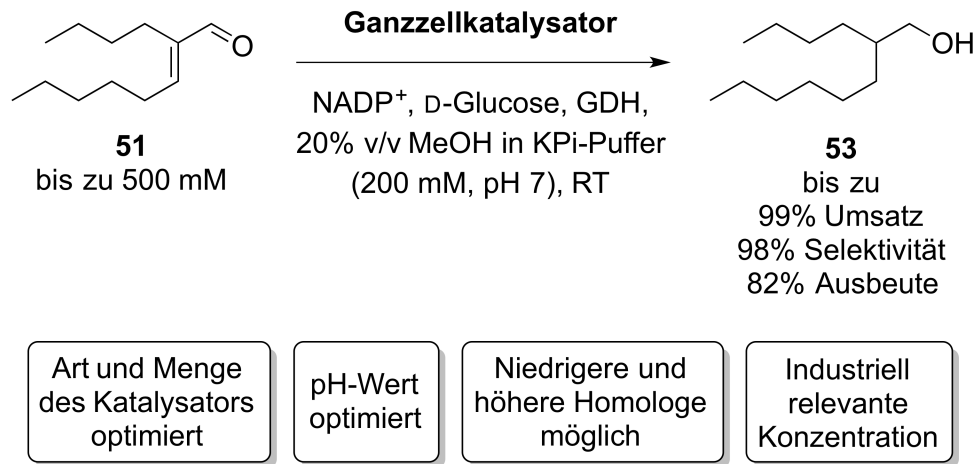
Die beiden enzymatischen Reaktionen wurden in einer Eintopf-Synthese kombiniert und mit den individuellen Reaktionen verglichen. Der Einsatz von Methanol als Cosolvens ermöglichte einen quantitativen Umsatz von 2-Butyl-2-octenal (**51**) zu 2-Butyl-1-octanol (**53**) mit einer sehr guten Selektivität von 97% (Schema 47). Die Bildung des Nebenprodukts 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**) konnte auf ein Minimum reduziert werden.



Schema 47: Kombination von C=C- und C=O-Reduktion mit isolierten Enzymen.

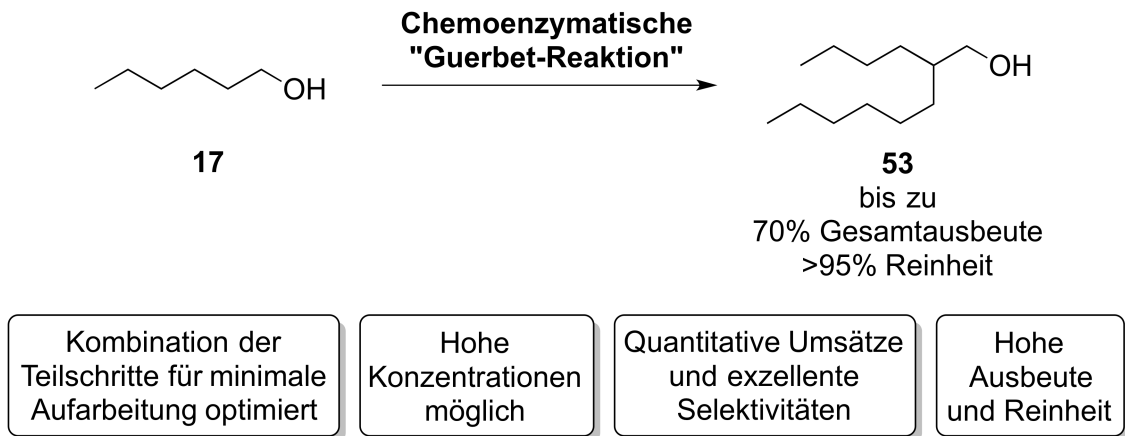
Es wurde ein Ganzzellkatalysator durch Kombination der GoxER mit einer ADH aus *Pichia pastoris* (PpADH) entwickelt, der zudem Glucosedehydrogenase (GDH) zur Regenerierung des Cofaktors enthielt. Aus vier verschiedenen Ganzzell-Konstrukten wurde basierend auf dem Umsatz und der Nebenproduktbildung der beste ausgewählt und bezüglich Katalysatormenge und pH-Wert optimiert. Ein Substratscreening zeigte, dass erfolgreich auch niedrigere und höhere homologe zu den korrespondierenden Guerbet-Alkoholen konvertiert werden konnten. Die Reaktion von 2-Butyl-2-octenal (**51**) zu 2-Butyl-1-octanol (**53**) wurde bis zu einer industriell relevanten Konzentration von 94 g L⁻¹ (~500 mM) optimiert. Bei 19 g L⁻¹ (~100 mM) wurden im 500 mL-Maßstab 7.9 g (82% Ausbeute) des Produkts erhalten (Schema 48).

Die Biotransformation mit Ganzzellen wurde mit der Variante mit isolierten Enzymen hinsichtlich der anfallenden Abfallmenge durch Berechnung des E-Faktors (*environmental factor*) verglichen. Sie konnte durch den Einsatz von Ganzzellen von 350 kg kg⁻¹ auf 20 kg kg⁻¹ reduziert werden.



Schema 48: Ganzzellkatalytische Biotransformation von 2-Butyl-2-octenal (**51**) zu 2-Butyl-1-octanol (**53**).

Die effiziente Kombination der chemokatalytischen Teilschritte durch Vermeidung eines Solvenswechsels erlaubte eine einfachere Reaktionsführung bei gleichzeitig geringerer Gefahr von Ausbeuteverlust durch Aufarbeitung. So wurden für beide Reaktionen vollständige Umsätze mit sehr guten Selektivitäten und eine Ausbeute von 80% in diesem ersten Teil des Gesamtprozesses erreicht. Gleiches gilt für den zweiten Teil, in dem die C=C- und C=O-Reduktionen als Eintopf-Biotransformation mit 88% Ausbeute zu einer kombinierten Gesamtausbeute von bis zu 70% mit einer Produktreinheit von >95% führen (Schema 49).



Schema 49: Kombinierte chemoenzymatische „Guerbet-Reaktion“.

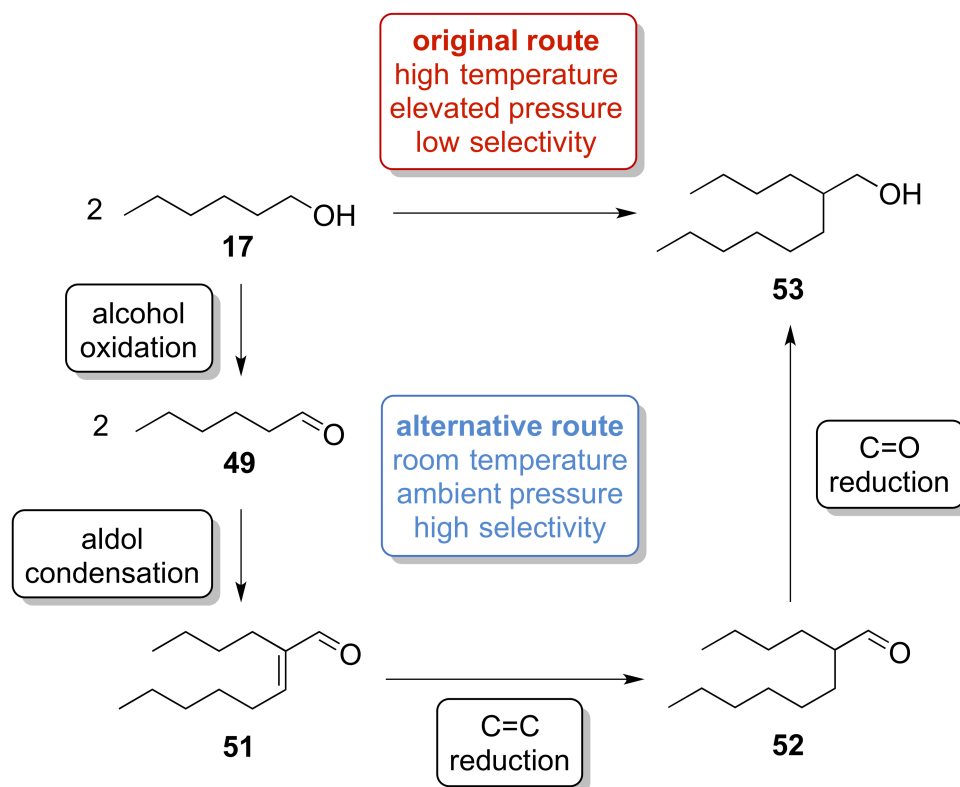
Eine Alternative, bei der ein Solvenswechsel nicht nötig wäre, ist eine Prozessvariante ausgehend vom Aldehyd, bei der die Aldolkondensation in Methanol durchgeführt und die Reaktionsmischung anschließend direkt in die Biotransformation eingesetzt werden würde.

In folgenden Arbeiten könnte vor allem die Substratkonzentration gesteigert und so auch die Abfallmenge weiter gesenkt werden. Eine höhere Raumzeitausbeute würde durch Erhöhung der Menge an Ganzzellkatalysator erreicht werden können. Die kostenkritische Komponente des aktuellen Verfahrens stellt die große Menge D-Glucose dar. In einem Verfahren, welches den bakteriellen Metabolismus zur Cofaktorregenerierung nutzt könnten statt derzeit einem, theoretisch alle 12 Reduktionsäquivalente, die aus einem Molekül D-Glucose gewonnen werden können, genutzt werden. Eine interessante Möglichkeit wäre weiterhin die Nutzung von Cellulose oder Hemicellulose zur Vermeidung der Konkurrenz um potentielle Nahrungsmittel. Hierfür wären cellulolytische Enzyme nötig, die im Ganzzellkatalysator coexpressiert werden müssten.

Diese Verbesserungen gemeinsam würden den Prozess näher an die Konkurrenzfähigkeit zur klassischen Guerbet-Reaktion bringen und ihn vor allem zu einer Alternative in der Synthese der höherpreisigen, längerkettigen Guerbet-Alkohole machen.

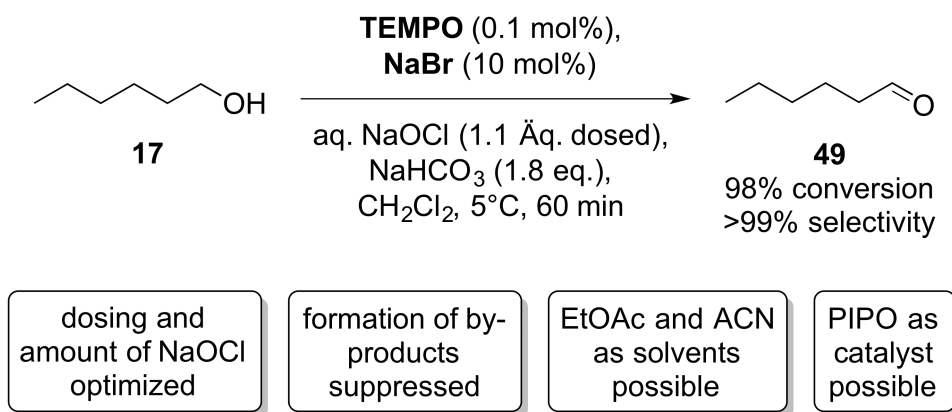
6 Abstract

A chemoenzymatic process for the synthesis of Guerbet alcohols, which are important bulk products in the area of lubricants, plasticizers and surfactants, was developed. As an alternative to the original Guerbet reaction, which at high temperature and elevated pressure only reaches relatively low selectivities for the desired product, a chemocatalytic alcohol oxidation of 1-hexanol (**17**) and a chemocatalytic aldol condensation of hexanal (**49**) were combined with enzymatic C=C and C=O reductions of 2-butyl-2-octenal (**51**) and 2-butyloctanal (**52**), respectively. The resulting process runs at room temperature and ambient pressure and results in high conversions and selectivities (Scheme 1).



Scheme 1: Overview of the chemoenzymatic process towards a sustainable synthesis of Guerbet alcohols.

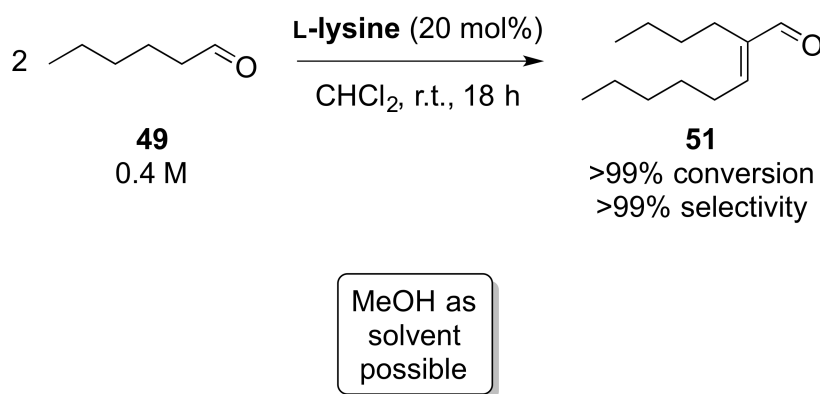
The process was originally planned as a redox neutral cascade with three enzymatic and one chemocatalytic step. Due to the lack of a suitable alcohol dehydrogenase, the oxidation of primary, aliphatic alcohols to the corresponding aldehydes was realized as a chemocatalytic reaction utilizing TEMPO as the catalyst and hypochlorite as the stoichiometric oxidant. With only 0.1 mol% TEMPO, quantitative conversion and a selectivity >99% for the oxidation of 1-hexanol (**17**) to hexanal (**49**) was achieved after 60 min (Scheme 2).



Scheme 2: Oxidation of 1-hexanol (**17**) to hexanal (**49**) with TEMPO/NaBr as catalysts and hypochlorite as stoichiometric oxidizing agent.

The formation of by-products was suppressed by dosing and optimizing the amount of hypochlorite. Using a polymeric TEMPO derivative (PIPO) opens up the possibility of catalyst recycling. It could be shown, that besides dichloromethane also ethyl acetate and acetonitrile are possible organic components of the two-phase solvent system.

Since the aldol condensation did not proceed well in aqueous solvent and because it was not directly compatible with the biotransformation due to the high pH involved, the reaction was developed in organic solvent with L-lysine as the catalyst. It is possible to perform the reaction in dichloromethane as well as methanol. In both cases, very good to quantitative conversions and perfect selectivities were obtained (Scheme 3).

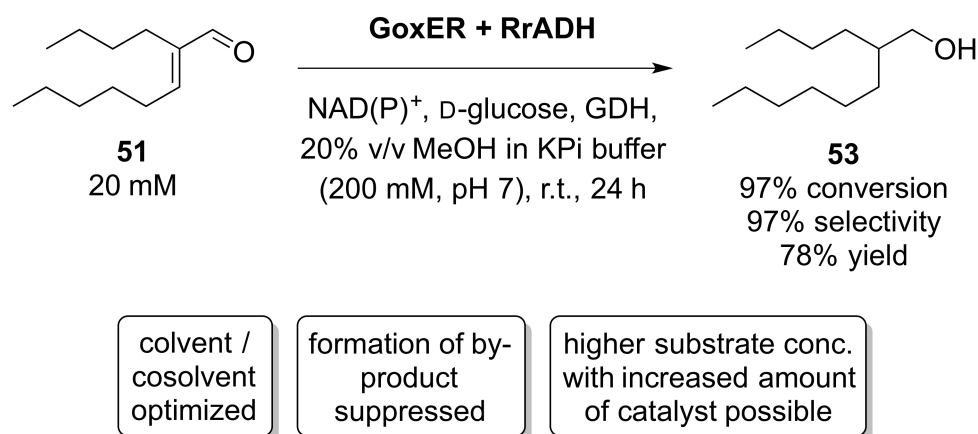


Scheme 3: Lysine-catalyzed aldol condensation of hexanal (**49**) to 2-butyl-2-octenal (**51**).

As part of a screening for the enzymatic C=C and C=O reductions, an ene reductase from *Gluconobacter oxydans* (GoxER) and an alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus ruber* (RrADH) showed the highest activities towards the conversion of 2-butyl-2-octenal (**51**) and 2-butyloctanal (**52**), respectively. The C=C reduction was optimized for the amount of enzyme, the temperature and and the reaction time using design of experiment (DoE) methods. Immobilization of the GoxER on epoxide resin resulted in a

very good residual activity of 62%, however due to enzyme deactivation recycling was not possible.

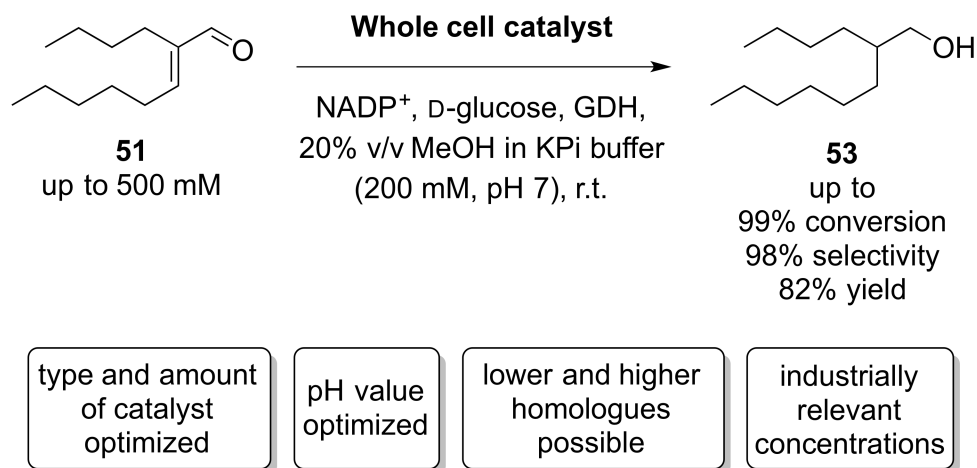
Both enzymatic reactions were combined in a one-pot synthesis and as such compared with the individual reactions. Methanol as a cosolvent enabled a quantitative conversion of 2-butyl-2-octenal (**51**) to 2-butyl-1-octanol (**53**) at a very high selectivity of 97% (Scheme 4). The formation of the by-product 2-butyloct-2-en-1-ol (**66**) could be reduced to a minimum.



Scheme 4: Combination of C=C and C=O reduction using isolated enzymes.

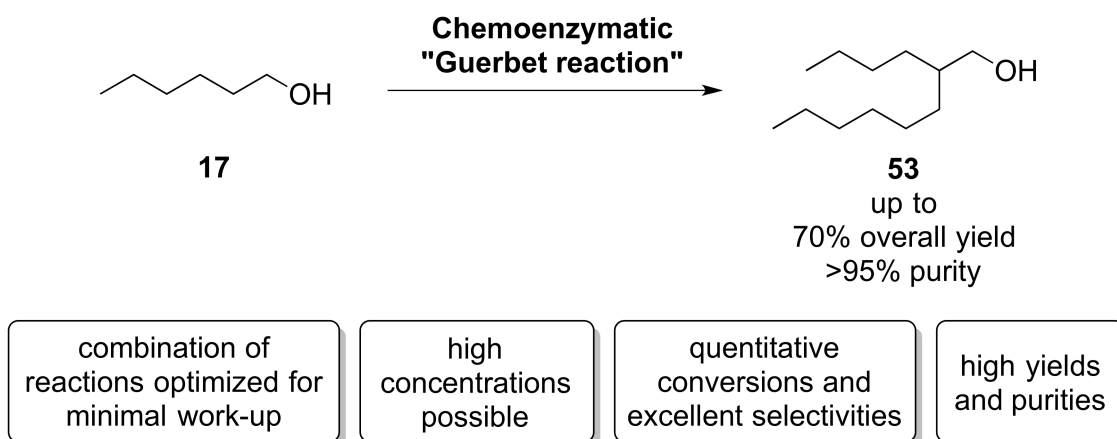
A whole cell catalyst containing over-expressed GoxER and an ADH from *Pichia pastoris* (PpADH) as well as a glucose dehydrogenase (GDH) for cofactor regeneration was constructed. From four different catalysts, the best was chosen based on conversion and by-product formation. It was optimized towards the amount of catalyst and the pH value. A substrate screening revealed successful conversion also for lower and higher homologues. The reaction of 2-butyl-2-octenal (**51**) to 2-butyl-1-octanol (**53**) was improved up to an industrially relevant concentration of 94 g L⁻¹ (~500 mM). At 19 g L⁻¹ (~100 mM) on a 500 mL scale 7.2 g of product (82% yield) were obtained (Scheme 5).

The biotransformation utilizing whole cell catalysts was compared to the variant utilizing isolated enzymes regarding the amount of waste produced by calculating the E factor (environmental factor). By using whole cell catalysts, it could be reduced from 350 kg kg⁻¹ to 20 kg kg⁻¹.



Scheme 5: Whole cell catalytic biotransformation of 2-butyl-2-octenal (**51**) to 2-butyl-1-octanol (**53**).

An efficient combination of the chemocatalytic steps by avoiding a change of solvent allowed for an easier reaction procedure while lowering the risk of product loss due to work-up. Quantitative conversions as well as very good selectivities resulted in an overall yield of 80% for these first two steps of the process. The same is true for the second part, in which the C=C and C=O reductions were combined in a one-pot fashion giving 88% yield which leads to an overall combined yield of up to 70% and a product purity of >95% (Scheme 6)



Scheme 6: Combined chemoenzymatic "Guerbet reaction".

An alternative process, in which a solvent change would not be necessary, starts from the aldehyde instead of the alcohol. The aldol condensation would be performed in methanol and the resulting reaction mixture subsequently added to the biotransformation.

In an extension of this project, especially the substrate concentration could be further increased while simultaneously decreasing the amount of waste. A higher space-time yield would be achieved by raising the amount of catalyst used. The most cost critical

component of the current system is D-glucose. Instead of only one, a process which uses the bacterial metabolism for cofactor regeneration could make use of all 12 reduction equivalents available from D-glucose. An interesting possibility would also be the utilization of cellulose or hemicellulose to circumvent the competition with potential food products. Additional cellulolytic enzymes would be necessary which would need to be coexpressed in the whole cell catalyst.

Jointly, these improvements would increase the competitiveness of the process compared to the classic Guerbet reaction, and could make it an alternative in particular for higher-priced, longer-chain Guerbet alcohols.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeines

7.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden wie folgt in höchster erhältlicher Reinheit erworben: Chitmassorb 944, Natriumhypochlorit-Lösung (10-15% in Wasser), 2-Hexyl-1-decanol, 2-Octyl-1-dodecanol, 2-Butyl-1-octanol, 2-Butyloctansäure, Butanal, Heptanal, Decanal, 1-Butanol, 1-Hexanol (alle von *Sigma-Aldrich*, Steinheim), 2-Ethyl-2-hexenal, 2-Ethylhexenal, Hexansäurehexylester (alle von *TCI Deutschland GmbH*, Eschborn), Hexanal, 1-Decanol, 2-Ethyl-1-hexanol (alle von *Merck KGaA*, Darmstadt), Hexansäure, Octanal, Natriumwolframat, Oxalylchlorid, TEMPO, 4-OH-TEMPO (alle von *Acros Organics*, New Jersey, USA), L-Lysin, Heptanal (beide von *Alfa Aesar*, Karlsruhe), 1-Octanol (von *Carl Roth GmbH*, Karlsruhe). Lösungsmittel stammten von *VWR*, Darmstadt. Alle Aldehyde wurden vor der Verwendung destilliert und unter Argon gelagert.

7.1.2 Enzyme, Plasmide und Gene

PLADH aus *Parvibaculum lavamentivorans* (Art.-Nr.: 75449), HLADH aus *equine* (Art.-Nr.: 79854) und ScADH aus *Saccharomyces cerevisiae* (Art.-Nr.: A7011) wurden von *Sigma-Aldrich*, Steinheim erworben. ADH 200 stammte von Evocatal GmbH, Monheim am Rhein. Alle übrigen Enzyme bzw. Gene wurden vom AK HUMMEL in Form von Plasmiden, ganzen Zellen oder Zellrohextrakten zur Verfügung gestellt (siehe Anhang). Plasmide wurden in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert und die Zellen anschließend analog zu Abschnitt 7.10.1.5 in Antibiotika-haltigem TB-Medium kultiviert. Ganze Zellen aus Hochzell-dichte-Fermentationen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen. Zellrohextrakte wurden ohne weitere Behandlung eingesetzt.

Die Reinigung von GoxER mittels Affinitätschromatographie fand an einem Äkta Purifier mit folgenden Modulen statt: CU-950, P-900, UPC-900, Box-900, M-925, INV-907 und Frac-920. PpADH wurde mithilfe des GE His GraviTrap Kits aufgereinigt.

7.1.3 Geräte und Methoden

7.1.3.1 Gaschromatographie

Es wurde ein Gaschromatograph Shimadzu GC-2010 Plus mit AOC-20i/s Auto Injektor/Auto Sampler und Stickstoff als Trägergas verwendet. Sofern nicht ausdrücklich anders beschrieben, kam eine Säule vom Typ Phenomenex ZB-5MSi mit folgendem Temperaturprogramm zum Einsatz: 1 min, 100°C; 30°C min⁻¹ auf 230°C; 3 min, 230°C (Einstellungen: Linear Velocity: 40.8 cm s⁻¹, Purge Flow: 3.0 mL min⁻¹, Split: 56.1, Pressure: 139.1 kPa, Total Flow: 100 mL min⁻¹, Column Flow: 1.7 mL min⁻¹).

Desweiteren wurden chirale Säulen der Typen BGB-174 und Macherey-Nagel Lipodex E verwendet. Sofern nicht ausdrücklich anders beschrieben, stimmten die Retentionszeiten aller detektierten Verbindungen mit denen der Referenzverbindungen überein.

7.1.3.2 Spektrophotometrie

Für Aktivitätsmessungen im 1 mL Maßstab wurde ein Photometer vom Typ Jasco V-630 mit einer Temperaturkontrolleinheit PSC-763 verwendet. Bradford-Assays in 96-well Platten wurden an einem Thermo MultiSkan GO vermessen. Messungen der optischen Dichte von Zellkulturen (OD₆₀₀) fanden an einem Amersham Biosciences Ultrospec 10 statt.

7.1.3.3 NMR-Spektroskopie

Kernresonanz-Spektren (NMR) wurden an Geräten vom Typ Bruker Avance 500 oder Bruker DRX 500 aufgenommen. Als Lösungsmittel kam in der Regel deuteriertes Chloroform zum Einsatz.

7.1.3.4 Massenspektrometrie

Zur Aufnahme von Massenspektren kam ein Esquire 3000 zum Einsatz.

7.1.3.5 Molekularbiologie und Zellkultur

Es kamen folgende Inkubatoren zum Einsatz: VWR Inculine IL53 (Platten), Universal Labortechnik Thermoshaker 100 (Eppendorf-Gefäße) und Infors HT Ecotron ET25 (Kolben).

7.1.3.6 Arbeiten unter Vakuum/Schutzgas

Reaktionen unter Schutzgas wurden, wenn möglich in Schlenk-Kolben unter Argon durchgeführt. Es wurde eine Ölschieber-Pumpe Vacuubrand RZ 2.5 verwendet. Das

Entgasen von wässrigen Lösungen beinhaltet deren dreimaliges Entgasen und Überschichten mit Argon unter Einfluss von Ultraschall. Organische Lösungsmittel wurden durch Durchleiten von Argon von Sauerstoff befreit.

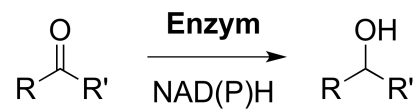
Organische Lösungsmittel wurden an einem Rotationsverdampfer Büchi Rotavapor R-114 mit Wasserbad B-480 und Membranpumpe Vacuubrand MD4C verdampft.

7.1.3.7 Reaktionen bei konstantem pH-Wert

Reaktionen, welche die Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Werts erforderten, wurden an einem pH-Stat-Apparat SI Analytics TA20 plus durchgeführt. Für die Titration wurde Natronlauge verwendet.

7.1.4 Allgemeine Methoden

7.1.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV1): Photometrischer Aktivitätstest in reduktiver Richtung



Die Anfangsaktivität wurde photometrisch bei 340 nm durch Bestimmung des Verbrauchs an NAD(P)H bestimmt. Es wurden 970 μL 20 mM Substratlösung in KPi-Puffer, 10 μL 20 mM NAD(P)H-Lösung (Endkonzentration: 0.2 mM) und 20 μL Enzymlösung einer angemessenen Verdünnung ($\Delta E/t \approx 0.1 \text{ min}^{-1}$) verwendet. Mithilfe der folgenden Formel wurden die Aktivitäten in Dreifachbestimmung ermittelt:

$$\text{Aktivität [U mL}^{-1}] = \frac{\Delta E}{t} \cdot \frac{v_t \cdot f}{\epsilon \cdot v_s \cdot d}$$

v_t = Volumen der Küvette (hier: 1 mL)

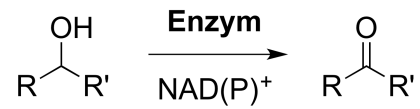
f = Verdünnungsfaktor

ϵ = Extinktionskoeffizient (hier: $6.3 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

v_s = Volumen der Enzymlösung

d = Schichtdicke (hier: 1 cm)

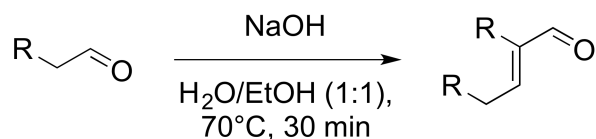
7.1.4.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV2): Photometrischer Aktivitätstest in oxidativer Richtung



Die Anfangsaktivität wurde photometrisch bei 340 nm durch Bestimmung der Bildung von NAD(P)H bestimmt. Es wurden 970 μL 100 mM Substratlösung in KPi-Puffer, 10 μL 200 mM NAD(P)⁺-Lösung (Endkonzentration: 0.2 mM) und 20 μL Enzymlösung einer angemessenen Verdünnung ($\Delta E \text{ t}^{-1} \approx 0.1 \text{ min}^{-1}$) verwendet. Mithilfe der Formel aus AAV1 wurden die Aktivitäten in Dreifachbestimmung ermittelt.

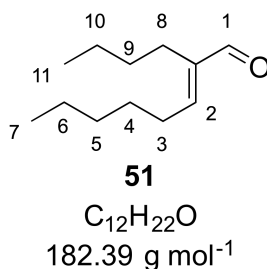
7.2 Synthese von Substraten und Referenzverbindungen

7.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV3): Synthese von α,β -ungesättigten, verzweigten Aldehyden



Nach einer Vorschrift von ROBERT^[176] wurde NaOH (1.35 g) in 50 mL einer Mischung aus dest. Wasser und Ethanol (1:1, v/v) gelöst. Es wurde der Aldehyd (80 mmol) zugegeben und 30 min bei 70 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen, wurde die sich bildende, organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit 50 mL MTBE extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Die Aufreinigung erfolgte über fraktionierte Vakuumdestillation.

7.2.1.1 2-Butyl-2-octenal (**51**)



Analog zur AAV3 wurde aus Hexanal (**49**, 9.90 mL, 80.0 mmol) (*E*)-2-Butyl-2-octenal (**51**, 3.65 g, 20.0 mmol, 50%) als farblose Flüssigkeit erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[243,244] überein.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ (ppm) = 0.87 - 0.99 (6H, m, H-**C7/C11**), 1.23 - 1.42 (8H, m, H-**aliphatisch**), 1.47 - 1.59 (2H, m, H-**C4**), 2.25 (2H, t, H-**C8**), 2.31 - 2.41 (2H, m, H-**C3**), 6.44 (1H, t, (*E*)-H-**C2**), 6.81 (1H, t, (*Z*)-H-**C2**), 9.38 (1H, s, (*E*)-H-**C1**), 10.12 (1H, s, (*Z*)-H-**C1**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 14.00, 14.05, 22.57, 22.87, 23.88, 28.48, 28.99, 31.06, 31.66, 143.90, 155.47, 195.42.

MS (ESI): m/z = 183.4 [M+H]⁺, 205.4 [M+Na]⁺.

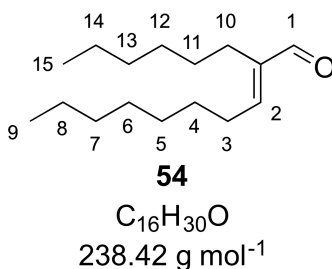
Elementaranalyse (C₁₂H₂₂O) berechnet: C: 79.06%, H: 12.16%, gefunden: C: 79.03%, H: 12.68%.

GC (Phenomenex ZB-5MSi): t_R (min) = 3.741 (*E*), 3.809 (*Z*).

Bp (bei 0.2 mbar) = 59...63°C.

Isomerenverhältnis (*E/Z*): 98:2.

7.2.1.2 2-Hexyl-2-decenal (**54**)



Analog zur AAV3 wurde aus Octanal (**20**, 12.5 mL, 80.0 mmol) (*E*)-2-Hexyl-2-decenal (**54**, 5.68 g, 23.8 mmol, 60%) als farblose Flüssigkeit erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[243,245] überein.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.86 - 0.90 (6H, m, H-**C9/C15**), 1.26 - 1.34 (16H, m, H-**aliphatisch**), 1.46 - 1.52 (2H, m, H-**C4**), 2.22 (2H, t, H-**C10**), 2.32 - 2.36 (2H, m, H-**C3**), 6.43 (1H, t, (*E*)-H-**C2**), 6.80 (1H, t, (*Z*)-H-**C2**), 9.35 (1H, s, (*E*)-H-**C1**), 10.12 (1H, s, (*Z*)-H-**C1**).

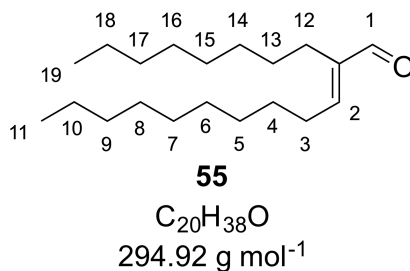
MS (ESI): m/z = 261.2 [M+Na]⁺, 499.4 [2M+Na]⁺.

GC (Phenomenex ZB-5MSi): t_R (min) = 5.319 (*E*), 5.385 (*Z*).

Bp (bei $1.9 \cdot 10^{-2}$ mbar) = 95...100°C.

Isomerenverhältnis (*E/Z*): 98:2.

7.2.1.3 2-Octyl-2-dodecenal (**55**)



Analog zur AAV3 wurde aus Decanal (**50**, 15.1 mL, 80.0 mmol) (*E*)-2-Octyl-2-dodecenal (**55**, 5.70 g, 19.3 mmol, 48%) als farblose Flüssigkeit erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[246] überein.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.86 - 0.89 (6H, m, H-**C11/C19**), 1.25 - 1.32 (24H, m, H-**aliphatisch**), 1.46 - 1.51 (2H, m, H-**C4**), 2.22 (2H, t, H-**C12**), 2.32 - 2.38 (2H, m, H-**C3**), 6.43 (1H, t, (*E*)-H-**C2**), 6.82 (1H, t, (*Z*)-H-**C2**), 9.36 (1H, s, (*E*)-H-**C1**), 10.12 (1H, s, (*Z*)-H-**C1**).

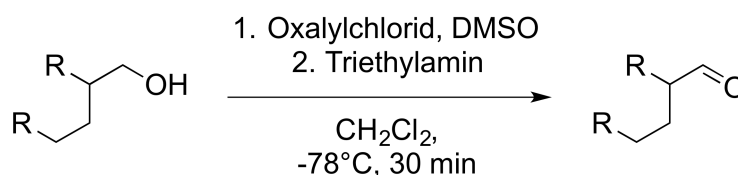
MS (ESI): *m/z* = 317.3 [M+Na]⁺, 611.5 [2M+Na]⁺.

GC (Phenomenex ZB-5MSi): *t_R* (min) = 7.101 (*E*), 7.232 (*Z*).

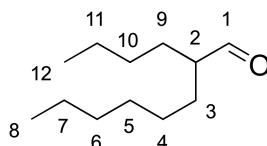
Bp (bei 7.5 · 10⁻³ mbar) = 140...146°C.

Isomerenverhältnis (*E/Z*): 95:5.

7.2.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AAV4): Synthese von β-verzweigten Aldehyden



Analog zu einer Vorschrift von MANCUSO^[96] wurde Oxalylchlorid (3.00 mL, 33.0 mmol, 1.1 Äq) in Dichlormethan (50 mL) gelöst und mithilfe eines Aceton/Trockeneis-Bades auf -78°C abgekühlt. Binnen je fünf Minuten wurden nacheinander Lösungen von DMSO (5.10 mL, 66.0 mmol, 2.2 Äq) in Dichlormethan (15 mL) und des Alkohols (30 mmol) in Dichlormethan (30 mL) hinzugegeben. Nach weiteren 15 Minuten Rühren wurde Triethylamin (21.0 mL, 150 mmol) hinzugefügt. The Reaktionsmischung wurde fünf Minuten gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und mit dest. Wasser (120 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde sukzessive mit 0.5 M HCl, dest. Wasser und gesättigter NaCl-Lösung (je 250 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über fraktionierte Vakuumdestillation aufgereinigt.

7.2.2.1 *rac*-2-Butyloctanal (**52**)**52**C₁₂H₂₄O184.32 g mol⁻¹

Analog zur AAV4 wurde aus 2-Butyl-1-octanol (**53**, 6.70 mL, 30.0 mmol) *rac*-2-Butyloctanal (**52**, 4.03 g, 22.0 mmol, 73%) als farblose Flüssigkeit erhalten. Die spektroskopischen Daten stehen in Analogie zu denen von kommerziell erhältlichem 2-Ethylhexanal (**69**) und 2-Hexyldecanal (**56**). Eine Elementaranalyse ergab aufgrund des hohen C/H-Gehalts keine zufriedenstellenden Werte.

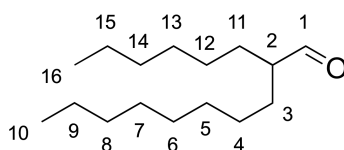
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.84 - 0.95 (6H, m, H-**C8/C12**), 1.22 - 1.35 (12H, m, H-**C4-7/C10-11**), 1.39 - 1.49 (2H, m, H-**C9**), 1.68 - 1.56 (2H, m, H-**C3**), 2.17 - 2.28 (1H, m, H-**C2**), 9.55 (1H, d, H-**C1**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 14.01, 14.16, 22.70, 22.89, 27.17, 28.74, 29.06, 29.38, 29.50, 31.76, 52.10, 205.79.

MS (ESI): *m/z* = 185.3 [M+H]⁺, 207.3 [M+Na]⁺.

GC (Phenomenex ZB-5MSi): *t_R* (min) = 3.607.

Bp (bei 0.12 mbar) = 62...64°C.

7.2.2.2 *rac*-2-Hexyldecanal (**56**)**56**C₁₆H₃₂O240.43 g mol⁻¹

Analog zur AAV4 wurde aus 2-Hexyl-1-decanol (**67**, 8.70 mL, 30.0 mmol) *rac*-2-Hexyldecanal (**56**, 2.02 g, 8.40 mmol, 28%) als farblose Flüssigkeit erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[247] überein.

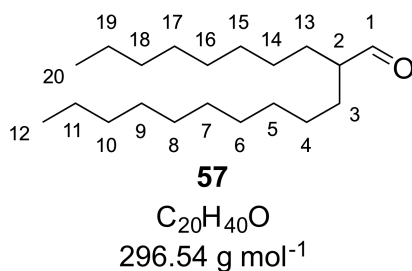
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.86 - 0.89 (6H, m, H-**C10/C16**), 1.25 - 1.29 (20H, m, H-**aliphatisch**), 1.39 - 1.46 (2H, m, H-**C11**), 1.57 - 1.65 (2H, m, H-**C3**), 2.19 - 2.25 (1H, m, H-**C2**), 9.55 (1H, d, H-**C1**).

MS (ESI): $m/z = 263.2 [M+Na]^+$, $503.3 [2M+Na]^+$.

GC (Phenomenex ZB-5MSi): t_R (min) = 5.210.

Bp (bei $1.8 \cdot 10^{-2}$ mbar) = 95...100°C.

7.2.2.3 *rac*-2-Octyldodecanal (**57**)



Analog zur AAV4 wurde aus 2-Octyl-1-dodecanol (**68**, 10.7 mL, 30.0 mmol) *rac*-2-Octyldodecanal (**57**, 1.35 g, 4.60 mmol, 15%) als farblose Flüssigkeit erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[248] überein.

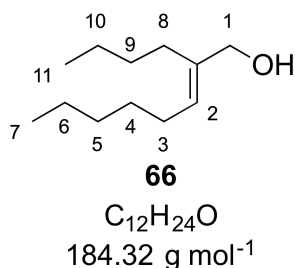
¹H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 0.86 - 0.89 (6H, m, H-**C12/C20**), 1.23 - 1.31 (12H, m, H-**aliphatisch**), 1.41 - 1.45 (2H, m, H-**C13**), 1.56 - 1.64 (2H, m, H-**C3**), 2.19 - 2.24 (1H, m, H-**C2**), 9.55 (1H, d, H-**C1**).

MS (ESI): $m/z = 319.3 [M+Na]^+$, $615.4 [2M+Na]^+$.

GC (Phenomenex ZB-5MSi): t_R (min) = 6.935.

Bp (bei $8.1 \cdot 10^{-3}$ mbar) = 118...124°C.

7.2.3 Synthese von *E*-2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**)



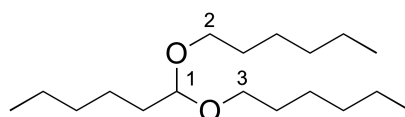
$CeCl_3 \cdot 7 H_2O$ (0.929 g, 2.5 mmol, 1 Äq) wurde in Methanol (6.25 mL) gelöst. Unter Eiskühlung wurden 2-Butyl-2-octenal (**51**, 0.570 mL, 2.50 mmol, 1 Äq) und $NaBH_4$ (143 mg, 3.75 mmol, 1.5 Äq) hinzugegeben und 15 min bei $<5^\circ C$ gerührt. Es wurde mit Diethylether (3 x 6.25 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (6.25 mL) gewaschen. Es wurde über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel

entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Cyclohexan/Ethylacetat, 95:5) wurde *E*-2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**, 0.16 g, 0.88 mmol, 36%) als farblose Flüssigkeit erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[244] überein.

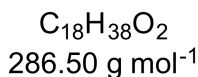
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.87 - 0.92 (6H, m, H-**C7/11**), 1.26 - 1.40 (10H, m, H-**aliphatisch**), 2.02 (2H, q, H-**C3**), 2.08 (2H, t, H-**C8**), 4.02 (2H, d, H-**C1**), 5.42 (1H, t, H-**C2**).

GC (Phenomenex ZB-5MSi): t_R (min) = 3.915.

7.2.4 Synthese von Hexanaldiethylacetal (**58**)



58



Hexanal (**49**, 0.49 mL, 6.0 mmol) und 1-Hexanol (**17**, 4.99 mL, 60.0 mmol) wurde mit *para*-Toluolsulfonsäure (34.2 mg, 0.18 mmol, 3 mol%) in 35 mL Toluol gelöst und 3 h am Wasserabscheider zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde mit 150 mL Cyclohexan verdünnt und sukzessive mit ges. NaHCO₃-Lösung (30 mL), dest. Wasser (3 x 50 mL) und ges. NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Aluminiumoxid (Cyclohexan/Ethylacetat, 9:1) aufgereinigt. Es wurde Hexanaldiethylacetal (**58**, 0.464 g, 1.62 mmol, 27%) als farblose Flüssigkeit erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur^[248] überein.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.89 - 0.94 (9H, m, H-**aliphatisch**), 1.30 - 1.42 (18H, m, H-**aliphatisch**), 1.54 - 1.63 (6H, m, H-**aliphatisch**), 3.38 - 3.46 (2H, m, H-**C2/C3**), 3.54 - 3.62 (2H, m, H-**C2/C3**), 4.48 (1H, t, H-**C1**).

GC (Phenomenex ZB-5MSi): t_R (min) = 5.693.

7.3 Oxidationsempfindlichkeit von Aldehyden

7.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift 5A (AAV5A): Oxidationsempfindlichkeit von Aldehyden (Reinsubstanz)

100 μL des Aldehyds wurden in einem 3 mL Glasgefäß unter Luftatmosphäre offen gerührt (500 rpm). Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten je 10 μL entnommen und mittels NMR in CDCl_3 der prozentuale Anteil der Säure bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 16 dargestellt.

7.3.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift 5B (AAV5B): Oxidationsempfindlichkeit von Aldehyden in wässriger Lösung

In einem 3 mL Glasgefäß wurde der Aldehyd (20 mM) in 1 mL D_2O gelöst und unter Luftatmosphäre offen gerührt (500 rpm). Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten je 100 μL der Lösung entnommen und mittels NMR in CDCl_3 der prozentuale Anteil der Säure bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 16 dargestellt.

7.3.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift 5C (AAV5C): Oxidationsempfindlichkeit von Aldehyden im wässrig-organischen Zwei-Phasen-System

In einem 3 mL Glasgefäß wird der Aldehyd (20 mM) in 1 mL einer 1:1-Mischung von D_2O und CDCl_3 gelöst und unter Luftatmosphäre offen gerührt (500 rpm). Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten je 100 μL der Lösung entnommen und mittels NMR in CDCl_3 der prozentuale Anteil der Säure bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 16 dargestellt.

Tab. 16: Oxidationsempfindlichkeit der verwendeten C6/C12-Aldehyde.

Zeit [h]	Hexanal (49)			2-Butyl-2-octenal (51)			2-Butyloctanal (52)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0	2	3	0	6	5	9	2	4	2
1	25	14	0	17	36	9	8	68	2
2	49	28	0	31	43	9	13	87	2
4	76	44	0	49	60	9	30	90	2
6	86	75	0	57	77	9	49	95	2
24	100	84	0	82	94	9	93	100	2

angegeben ist der Anteil an Säure in %

7.4 Alkohol-Oxidation

7.4.1 Oxidativer Aktivitätsassay von ADHs gegenüber 1-Hexanol

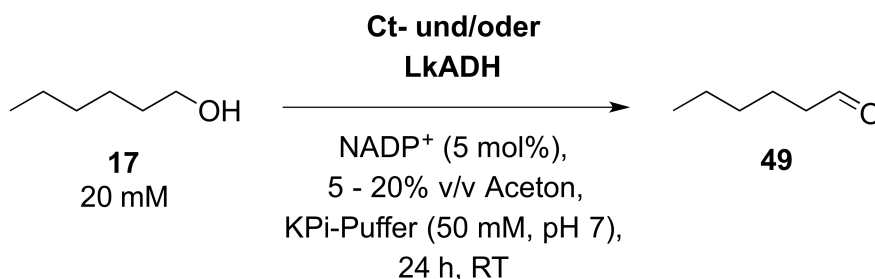
Die oxidative Aktivität verschiedener ADHs gegenüber 1-Hexanol (**17**) mit NAD(P)⁺ als Cofaktor wurde analog zur AAV2 bestimmt (Tab. 17).

Tab. 17: Oxidativer Aktivitätsassay verschiedener ADHs gegenüber 1-Hexanol (**17**).

ADH	Cofaktor	Aktivität [U mg ⁻¹]
RrADH	NAD ⁺	0.02
TADH	NAD ⁺	0.06
ADH 200 ^a	NAD ⁺	0.04
TbADH ^b	NAD ⁺	0.06
PLADH ^b	NAD ⁺	0.02
LkADH	NADP ⁺	0.14
ScADH ^b	NADP ⁺	0.70
CtADH	NADP ⁺	1.02
SyADH	NADPH	0.25

^a von evocatal GmbH, Monheim am Rhein, Deutschland, ^b von Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, Deutschland, Rr: *Rhodococcus ruber*, T: *Thermus* sp. ATN1, Tb: *Thermoanaerobicum brockii*, PL: *Parvibaculum lavamentivorans*, Lk: *Lactobacillus kefir*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Ct: *Comamonas testosteroni*, Sy: *Sphingobium yanoikuyae*.

7.4.2 Präparativer Einsatz von Ct- und LkADH für die Oxidation von 1-Hexanol



1-Hexanol (**17**, 13 μ L, 0.10 mmol, 20 mM), NADP⁺ (3.8 mg, 5.0 μ mol, 5 mol%), sowie CtADH (55 - 1100 μ L ZRE mit 18.3 U mL⁻¹, 10 - 200 U mmol⁻¹) und/oder LkADH (197 μ L ZRE mit 50.8 U mL⁻¹, 100 U mmol⁻¹) wurden in entgastem KPi-Puffer (50 mM, pH 7) bis zu einem Volumen von 4.00 - 4.75 mL gelöst und mit 0.25 - 1.00 mL Aceton (5 - 20%

v/v, 5 mL Gesamtvolumen) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 24 h bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Es wurden 0.5 mL 0.5 M HCl zugegeben und mit MTBE (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über einen Phasentrennfilter filtriert und gaschromatographisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 18 dargestellt.

Tab. 18: Präparativer Einsatz von Ct- und/oder LkADH für die Oxidation von 1-Hexanol (**17**).

Eintrag	CtADH [U mmol ⁻¹]	LkADH [U mmol ⁻¹]	Aceton [% v/v]	Umsatz [%]
1	10	-	5	2
2	10	-	10	2
3	10	-	20	3
4	100	-	10	2
5	200	-	10	3
6	10	100	10	2
7	-	100	10	2

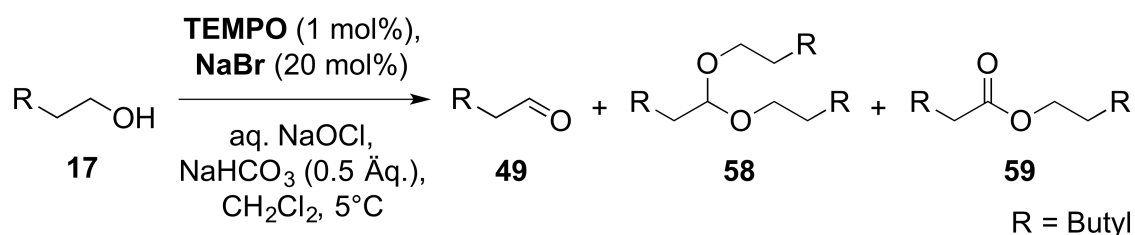
7.4.3 Iodometrische Titration wässriger Natriumhypochlorit-Lösung

10 mL einer NaOCl-Lösung unbekannter Konzentration wurden in einem Maßkolben mit dest. Wasser auf 250 mL verdünnt. Kaliumiodid (1.0 g, 6.0 mmol) wurde in 50 mL Wasser gelöst, mit Essigsäure (5.00 mL, 87.5 mmol) und 25 mL der verdünnten NaOCl-Lösung versetzt und mit Natriumthiosulfat-Maßlösung (0.1 M) bis zur Entfärbung titriert. Kurz vor der Entfärbung wurden 0.5 mL gesättigte Stärke-Lösung zur besseren Sichtbarkeit des Umschlagpunktes zugegeben. Bei der Berechnung ist nun die 25-fache Verdünnung zu berücksichtigen!

7.4.4 Iodometrische Titration wässriger Thiosulfat-Lösung

10 mL einer 0.05 M Kaliumiodat-Maßlösung wurden mit 5 mL 6 M Schwefelsäure versetzt und mit Thiosulfat-Lösung unbekannter Konzentration bis zur Entfärbung titriert. Kurz vor der Entfärbung wurden 0.5 mL gesättigte Stärke-Lösung zur besseren Sichtbarkeit des Umschlagpunktes zugegeben.

7.4.5 TEMPO-katalysierte Oxidation von 1-Hexanol durch Hypochlorit



1-Hexanol (**17**, 251 μL , 2.00 mmol, 1 Äq.) wurde in 4 mL CH_2Cl_2 vorgelegt und unter Eisbad-Kühlung sukzessive mit NaOCl -Lösung (2.02 M, 2.0 - 3.5 mmol, 1.0 - 1.75 Äq.), NaBr (41 mg, 0.40 mmol, 20 mol%), NaHCO_3 (84 mg, 1.0 mmol, 0.5 Äq.) und TEMPO (3.1 mg, 20 μmol , 1 mol%) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 60 min bei 5°C gerührt und gaschromatographisch der Umsatz bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 19 und Tab. 20 dargestellt.

Tab. 19: TEMPO-katalysierte Oxidation von 1-Hexanol (**17**) durch variierende Mengen an Hypochlorit.

NaOCl [Äq.]	Umsatz [%] ^a	Hexanal (49) [%] ^b	Ester (59) [%] ^b	Acetal (58) [%] ^b
1.00	84.7	33.4	6.5	60.1
1.25	84.5	55.9	4.1	40.0
1.50	91.2	70.2	3.0	26.8
1.75	86.7	71.6	2.7	25.8

Alle Werte basieren auf GC-Area% der Komponenten, ^a Verbrauch an Produkt unter Berücksichtigung der Stöchiometrie, ^b Anteil an Summe aller Produkte

Tab. 20: Zeitlicher Verlauf der TEMPO-katalysierten Oxidation von 1-Hexanol (**17**) durch 1.25 Äq. Hypochlorit.

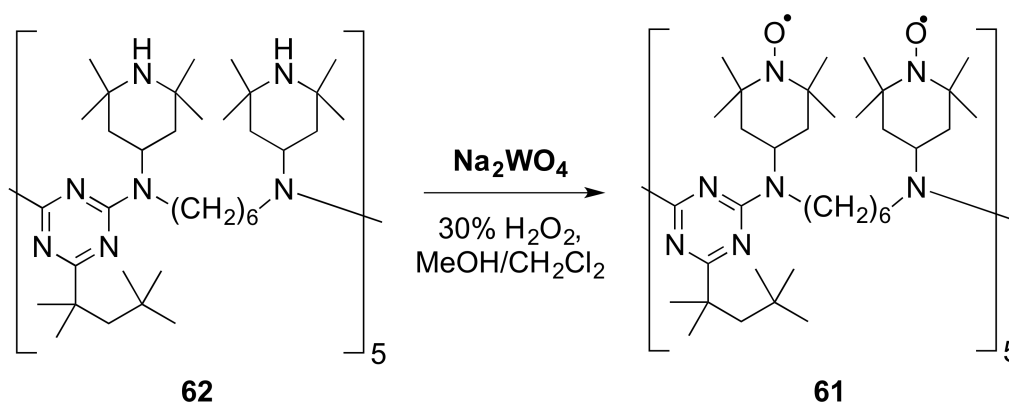
Zeit [min]	1-Hexanol [%]	Hexanal (49) [%]	Ester (59) [%]	Acetal (58) [%]
0	>99.9	<0.1	<0.1	<0.1
5	32.4	58.7	2.4	6.5
10	21.6	56.5	2.2	19.8
15	20.5	56.9	2.1	20.4
30	19.7	57.4	2.1	20.8
60	19.2	57.8	2.2	20.8

Tab. 20: Zeitlicher Verlauf der TEMPO-katalysierten Oxidation von 1-Hexanol (**17**) durch 1.25 Äq. Hypochlorit. (Fortsetzung)

Zeit [min]	1-Hexanol [%]	Hexanal (49) [%]	Ester (59) [%]	Acetal (58) [%]
120 ^a	19.4	57.7	2.2	20.7
180 ^b	19.1	57.9	2.3	20.7
240 ^c	19.2	57.8	2.2	20.8

Alle Werte basieren auf GC-Area% der Komponenten und stellen den Anteil einer Komponente an der Summe aller Komponenten dar. ^a nach erneuter Zugabe von 1 mol% TEMPO, ^b nach erneuter Zugabe von 20 mol% NaBr, ^c nach erneuter Zugabe von 0.5 Äq. NaHCO₃.

7.4.6 Synthese von Polyamin-immobilisiertem Piperidinyloxy (PIPO)



Die Synthese basiert auf der Vorschrift von DIJKSMAN^[121]. Chimassorb 944 (**62**, 1.5 g, 0.5 mmol, entsprechend 5 mmol Amin) wurde mit Natriumwolframatdihydrat (0.05 g, 0.15 mmol, 3.3 mol% bzgl. Amin) in 10 mL Wasser und 30%-igem Wasserstoffperoxid (10 mL, 0.10 mol, 2 Äq.) suspendiert und 8 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde über einen Glasfildertiegel filtriert, mit 30 mL Wasser gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. PIPO wurde als blass-rotes Pulver (**61**, 1.44 g, 4.68 mmol Amin, 94%) gewonnen.

7.4.7 Bestimmung der Löslichkeit von PIPO in organischen Lösungsmitteln

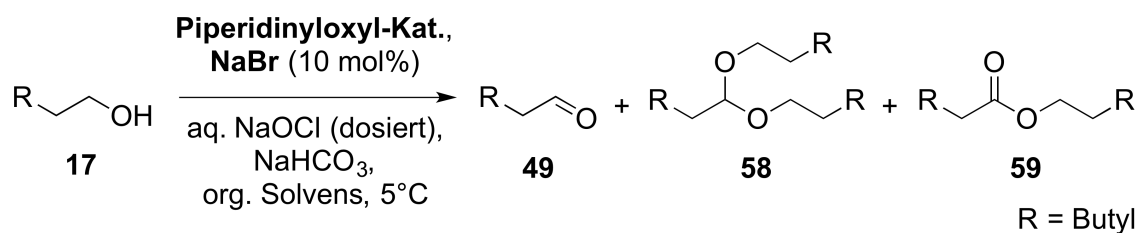
PIPO (**61**, 3.0 mg, 1.0 µmol) wurde eingewogen. Es wurde in Schritten von je 100 µL organisches Solvens zugegeben und das Lösungsverhalten beobachtet. Die benötigten Lösungsmittelvolumina und die daraus resultierenden Löslichkeiten sind in Tab. 21 dargestellt.

Tab. 21: Löslichkeit von PIPO in organischen Solventien.

Org. Solvens	Volumen [mL]	Löslichkeit [g L ⁻¹]
Cyclohexan	8.0 ^a	<0.4
Xylol	8.0 ^a	<0.4
Toluol	8.0 ^a	<0.4
Chloroform	8.0 ^a	<0.4
Diethylether	6.0	0.5
Ethylacetat	2.0	1.5
Dichlormethan	8.0 ^a	<0.4
MTBE	0.2	15.0

^a nach Zugabe von 8 mL noch nicht gelöst.

7.4.8 Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 (AAV6): Piperidinyloxy-katalysierte Oxidation von 1-Hexanol mit dosierter Zugabe von Hypochlorit



Basierend auf einer modifizierten Vorschrift von DIJKSMAN^[121] wurde 1-Hexanol (**17**, 1.0 mL, 8.0 mmol) in 20 mL org. Solvens gelöst und unter Eisbad-Kühlung mit NaBr (82.3 mg, 0.80 mmol, 10 mol%) und dem Piperidinyloxy-Katalysator (0.1 - 1 mol%) versetzt. Eine eiskalte, wässrige Lösung von NaOCl (0.35 M) und NaHCO₃ (0.53 M) wurde über eine Spritzenpumpe hinzudosiert und die Reaktionsmischung bei 5°C gerührt.

7.4.8.1 Einfluss des Dosierens von Hypochlorit

Analog zur AAV6 wurde die Reaktion in CH₂Cl₂ mit TEMPO (12.4 mg, 0.08 mol, 1 mol%) als Katalysator durchgeführt. 24.7 mL der wässrigen Lösung von NaOCl (0.35 M, 8.8 mmol, 1.1 Äq.) und NaHCO₃ (0.53 M, 14.8 mmol, 1.8 Äq.) wurden binnen 30 bzw. 60 Minuten zu dosiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 22 dargestellt.

Tab. 22: Einfluss des Dosierens von Hypochlorit.

Zeit [min]	Umsatz [%] ^a	Hexanal (49) [%] ^b	Ester (59) [%] ^b	Acetal (58) [%] ^b
30	86.9	>99.9	<0.1	<0.1
60	91.3	>99.9	<0.1	<0.1

Alle Werte basieren auf GC-Area% der Komponenten, ^a Verbrauch an Produkt unter Berücksichtigung der Stöchiometrie, ^b Anteil an Summe aller Produkte

7.4.8.2 Vergleich verschiedener Piperidinyloxyl-basierter Katalysatoren

Analog zur AAV6 wurde die Reaktion in CH₂Cl₂ mit TEMPO (1.2 - 12.4 mg, 8.0 – 80.0 µmol, 0.1 - 1 mol%), 4-Hydroxy-TEMPO (1.4 - 13.8 mg, 8.0 – 80.0 µmol, 0.1 - 1 mol%) oder PIPO (24 mg, 8 µmol, 0.1 mol% = 1 mol% Oxyl) als Katalysator durchgeführt. 28.1 mL der wässrigen Lösung von NaOCl (0.35 M, 10 mmol, 1.25 Äq.) und NaHCO₃ (0.53 M, 14.8 mmol, 1.8 Äq.) wurden binnen 60 Minuten zu dosiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 23 dargestellt.

Tab. 23: Vergleich verschiedener Piperidinyloxyl-basierter Katalysatoren.

Katalysator ([mol%])	Umsatz [%] ^a	Hexanal (49) [%] ^b	Ester (59) [%] ^b	Acetal (58) [%] ^b
TEMPO (0.1)	>99.9	>99.9	<0.1	<0.1
TEMPO (1.0)	>99.9	>99.9	<0.1	<0.1
4OH-TEMPO (0.1)	74.3	85.1	14.9	<0.1
4OH-TEMPO (1.0)	84.9	97.1	2.9	<0.1
PIPO (1.0)	>99.9	98.0	2.0	<0.1

Alle Werte basieren auf GC-Area% der Komponenten, ^a Verbrauch an Produkt unter Berücksichtigung der Stöchiometrie, ^b Anteil an Summe aller Produkte

7.4.8.3 Vergleich verschiedener organischer Lösungsmittel

Analog zur AAV6 wurde die Reaktion in CH₂Cl₂, MTBE, ACN oder EtOAc mit TEMPO (1.2 mg, 8.0 µmol, 0.1 mol%) als Katalysator durchgeführt. 28.1 mL der wässrigen Lösung von NaOCl (0.35 M, 10 mmol, 1.25 Äq.) und NaHCO₃ (0.53 M, 14.8 mmol, 1.8 Äq.) wurden binnen 60 Minuten zu dosiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 24 dargestellt.

Tab. 24: Vergleich verschiedener organischer Lösungsmittel.

Org. Solvens	Umsatz [%] ^a	Hexanal (49) [%] ^b	Ester (59) [%] ^b	Acetal (58) [%] ^b
MTBE	80.0	<0.1	97.3	2.7
ACN	88.0	>99.9	<0.1	<0.1
EtOAc	>99.9	98.5	1.5	<0.1

Alle Werte basieren auf GC-Area% der Komponenten, ^a Verbrauch an Produkt unter Berücksichtigung der Stöchiometrie, ^b Anteil an Summe aller Produkte

7.4.8.4 Zeitlicher Verlauf der Oxidation und Optimierung der nötigen Menge an Hypochlorit

Analog zur AAV6 wurde die Reaktion in CH₂Cl₂ mit TEMPO (1.2 mg, 8.0 µmol, 0.1 mol%) als Katalysator durchgeführt. Insgesamt 33.7 mL der wässrigen Lösung von NaOCl (0.35 M, 12 mmol, 1.5 Äq.) und NaHCO₃ (0.53 M, 14.8 mmol, 1.8 Äq.) wurden binnen 60 Minuten zu dosiert. Die organische Phase wurde nach Zugabe von 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 und 1.5 Äq. NaOCl gaschromatographisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 25 dargestellt.

Tab. 25: Zeitlicher Verlauf der Oxidation und Optimierung der nötigen Menge an Hypochlorit durch schrittweises Dosieren.

NaOCl [Äq.]	Umsatz [%]	Selektivität [%]
1.0	81.3	>99.9
1.1	97.6	>99.9
1.2	>99.9	>99.9
1.3	>99.9	>99.9
1.4	>99.9	>99.9
1.5	>99.9	>99.9

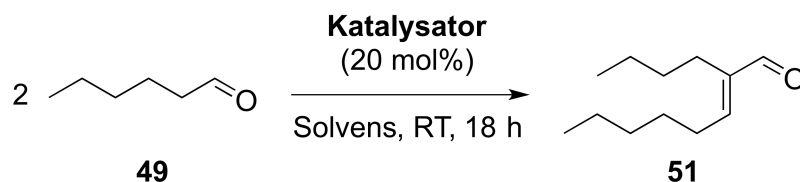
Alle Werte basieren auf GC-Area% der Komponenten und stellen den Anteil einer Komponente an der Summe aller Komponenten dar.

7.4.9 Vergleichsversuch zur Bildung der Nebenprodukte

1-Hexanol (**17**, 82 µL, 1.34 mmol, 2 Äq.) und Hexanal (**49**, 163 µL, 0.660 mmol, 1 Äq.) wurden in 4 mL CH₂Cl₂ gelöst und die Lösung mit 0.5 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung (pH 9) versetzt. Es wurde 1 h unter Eisbad-Kühlung und weitere 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wurde nach 1 h und 16 h gaschromatographisch analysiert. Es konnte kein Nebenprodukt detektiert werden.

7.5 Chemokatalytische Aldolkondensation

7.5.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift 7 (AAV7): Katalysator-Screening für die Aldolkondensation



Hexanal (**49**, 0.4 M) wurde im entsprechenden Solvens gelöst. Der Katalysator (20 mol%) wurde zugegeben und die Mischung für 18 h bei Raumtemperatur gerührt.

7.5.1.1 Katalysator-Screening in wässrigem Medium

Analog zur AAV7 wurde die Reaktion in einem 10 mL Schlenk-Kolben in 5 mL entgastem Wasser durchgeführt. Die Reaktionsmischung wurde mit MTBE (3 x 5 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über einen Phasentrennfilter filtriert und gaschromatographisch der Umsatz bestimmt (Tab. 26).

Tab. 26: Screening verschiedener Katalysatoren für die Homo-Aldolkondensation von Hexanal (**49**) in Wasser.

Katalysator	Umsatz [%]
Ionentauscher ^a	78
DBU	43
TBD	38
OH ⁻ (pH 12) ^b	21
DL-Prolin	0
DBU·TFA	0
TBD·TFA	0

^a 250 mg stark basischer Ionentauscher, ^b 2 M NaOH.

7.5.1.2 Katalysator-Screening in organischem Medium

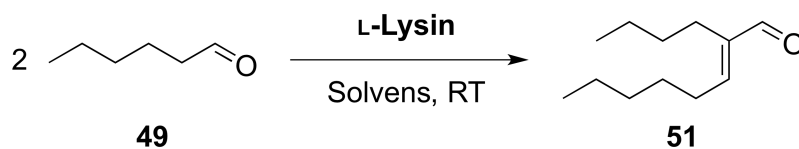
Analog zur AAV7 wurde die Reaktion in einem 1.5 mL Eppendorf-Gefäß in 1 mL deuteriertem Chloroform durchgeführt. Die Reaktionsmischung wurde filtriert und aus der organischen Phase mittels $^1\text{H-NMR}$ der Umsatz bestimmt (Tab. 27).

Tab. 27: Screening verschiedener Katalysatoren für die Homo-Aldolkondensation von Hexanal (**49**) in Chloroform.

Katalysator	Umsatz [%]
NaOH (fest)	0
25% w/v NaOH (aq) ^a	2
Ionentauscher ^b	0
L-Prolin	2
L-Histidin	0
L-Arginin	21
L-Lysin	>95
Ammoniumacetat	0
Sc(OTf) ₃	0
Benzoessäure + Pyrrolidin	69

^a 1 mL 25% aq. NaOH, ^b 50 mg stark basischer Ionentauscher.

7.5.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift 8 (AAV8): Lysin-katalysierte Aldolkondensation von Hexanal in verschiedenen Lösungsmitteln



Hexanal (**49**) wurde im entsprechenden Solvens gelöst. Es wurde L-Lysin zugegeben und die angegebene Zeit bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Aus Reaktionen in organischem Lösungsmittel wurden ohne weitere Aufarbeitung Proben entnommen und gaschromatographisch in MTBE untersucht. Reaktionen in wässrigem Solvens wurden zunächst mit dem dreifachen Reaktionsvolumen an MTBE extrahiert und die organischen Phasen über einen Phasentrennfilter filtriert.

7.5.2.1 Zeitlicher Verlauf der Lysin-katalysierten Aldolkondensation von Hexanal in Dichlormethan

Analog zur AAV8 wurde Hexanal (**49**, 1.0 mL, 8.1 mmol) in 20 mL CH₂Cl₂ gelöst. L-Lysin (238 mg, 1.63 mmol, 20 mol%) wurde hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 24 h gerührt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Die Ergebnisse sind in Tab. 28 dargestellt.

Tab. 28: Reaktionsverlauf der Lysin-katalysierten Homo-Aldolkondensation von Hexanal (**49**).

Zeit [h]	Umsatz [%]	Selektivität [%]
2	46	>99
4	88	>99
6	94	>99
24	> 99	>99

7.5.2.2 Aldolkondensation in Acetonitril und Ethylacetat

Analog zur AAV8 wurde Hexanal (**49**, 1.0 mL, 8.1 mmol) in 20 mL in ACN bzw. EtOAc gelöst. L-Lysin (238 mg, 1.63 mmol, 20 mol%) wurde hinzugegeben und die Reaktionsmischung für sieben Tage gerührt. Es wurden nach drei und sieben Tagen Proben entnommen. Die Ergebnisse sind in Tab. 29 dargestellt.

Tab. 29: Lysin-katalysierte Homo-Aldolkondensation von Hexanal (**49**) in Acetonitril und Ethylacetat.

Eintrag	Lösungsmittel	Zeit [d]	Umsatz [%]	E/Z
1	ACN	3	24.9	86:14
2	ACN	7	42.2	90:10
3	EtOAc	3	14.9	87:13
4	EtOAc	7	29.8	88:12

7.5.2.3 Aldolkondensation in Methanol

Analog zur AAV8 wurde Hexanal (**49**, 12 - 655 µL, 0.10 - 5.30 mmol) bis zu einem Gesamtvolumen von 1 mL in MeOH gelöst. L-Lysin (1.0 - 775 mg, 6.6 - 350 µmol, 6.6 mol%) wurde hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 24 h gerührt. Die Ergebnisse sind in Tab. 30 dargestellt.

Tab. 30: Lysin-katalysierte Homo-Aldolkondensation von Hexanal (**49**) in Methanol.

Eintrag	Substratkonzentration [M]	Umsatz [%]
1	0.1	40.4
2	0.5	67.2
3	1.0	75.8
4	2.2	79.6
5	2.7	78.6
6	4	83.5
7	5.3	85.6
8 ^a	2.2	85.0 (91.1) ^d
9 ^b	2.2	87.8
10 ^c	2.2	83.0

^a Ultraschall, ^b Ultraschall und Molekularsieb, ^c 20 mol% L-Lysin, ^d nach 48 h

7.5.2.4 Aldolkondensation in Methanol/Puffer

Analog zur AAV8 wurde Hexanal (**49**, 25 - 125 μL , 0.20 - 1.00 mmol) in 2 mL einer Mischung von 20% v/v MeOH und KPi-Puffer (50 mM, pH 7) gelöst. L-Lysin (5.8 - 29.0 mg, 40 - 200 μmol , 20 mol%) wurde hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 18 h gerührt. Die Ergebnisse sind in Tab. 31 dargestellt.

Tab. 31: Lysin-katalysierte Homo-Aldolkondensation von Hexanal (**49**) in 20% v/v Methanol/KPi-Puffer.

Substratkonzentration [M]	Umsatz [%]
0.1	9.8
0.5	80.5

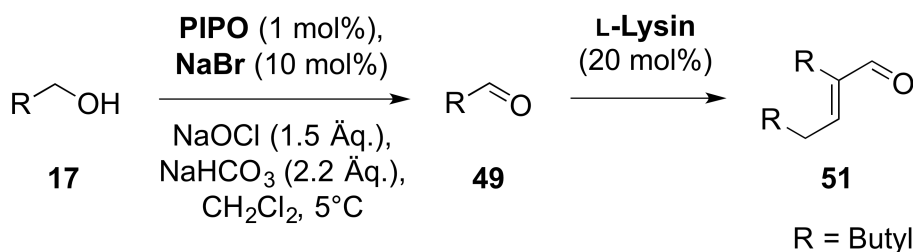
7.5.3 Einfluss von PIPO auf die Aldolkondensation

Hexanal (**49**, 1.0 mL, 8.1 mmol) wurde in 20 mL CH_2Cl_2 gelöst. L-Lysin (238 mg, 1.63 mmol, 20 mol%) und PIPO (**61**, 25 mg) wurden hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Es gaschromatographisch ein Umsatz von 97% mit einer Selektivität von >99% festgestellt.

7.5.4 Einfluss von, mit Wasser gesättigtem Lösungsmittel auf die Aldolkondensation

Hexanal (**49**, 1.0 mL, 8.1 mmol) wurde in 20 mL, mit Wasser gesättigtem CH₂Cl₂ gelöst. L-Lysin (238 mg, 1.63 mmol, 20 mol%) wurde hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Es gaschromatographisch ein Umsatz von 94% mit einer Selektivität von >99% festgestellt.

7.6 Kombination von Alkohol-Oxidation und Aldolkondensation



1-Hexanol (**17**, 1.0 mL, 8.0 mmol) wurde in 20 mL CH_2Cl_2 gelöst. NaBr (82.3 mg, 0.80 mmol, 10 mol%) und PIPO (**61**, 25 mg, 0.08 mmol Aminoxy, 1 mol%) wurden fest hinzugegeben und die Mischung auf 5°C abgekühlt. 33.7 mL einer vorgekühlten Lösung von NaOCl (0.35 M, 12 mmol, 1.5 Äq.) und NaHCO_3 (0.53 M, 17.7 mmol, 2.2 Äq.) wurde über 60 min zugegeben und die Reaktionsmischung für weitere 30 min bei 5°C gerührt. Die organische Phase, aus welcher gaschromatographisch einen Umsatz von >99% mit einer Selektivität von 98% ermittelt wurde, wurde über einen Phasentrennfilter filtriert.

L-Lysin (229 mg, 1.60 mmol, 20 mol%) wurde fest hinzugegeben und die Suspension für 18 h bei Raumtemperatur gerührt und gaschromatographisch ein Umsatz von 69% festgestellt. Es wurde erneut L-Lysin (115 mg, 0.80 mmol, 10 mol%) zugegeben, für weitere 24 h gerührt und ein Umsatz von 90% bestimmt. Es wurde ein letztes Mal L-Lysin (115 mg, 0.80 mmol, 10 mol%) zugegeben und für 6 h gerührt. Der Umsatz betrug 92% bei >99% Selektivität nach 48 h Gesamtreaktionszeit. Die Reaktionsmischung wurde mit 0.5 M HCl (3 x 20 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Solvens wurde im Vakuum entfernt. Es wurde 2-Butyl-2-octenal (**51**, 0.592 g, 3.20 mmol, 80%) als farblose Flüssigkeit erhalten.

7.7 Enzymatische Reduktion aktivierter Doppelbindungen

7.7.1 Aktivitätsassay verschiedener En-Reduktasen

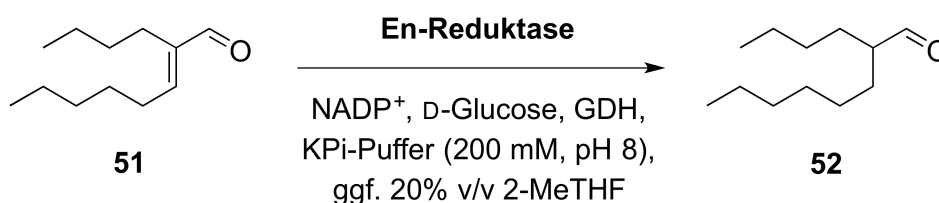
Die Aktivität verschiedener literaturbekannter ERs gegenüber 2-Butyl-2-octanal (**51**) mit NADPH als Cofaktor wurde analog zur AAV1 bestimmt (Tab. 32).

Tab. 32: Aktivitäts-Screening verschiedener ERs gegenüber 2-Butyl-2-octenal (**51**).

Eintrag	Enzym	Aktivität ^a [U mg ⁻¹]
1	NfsA	0.08
2	NfsB	0.02
3	EC-NemA	0.52
4	PP-NemA	0.86
5	AAOYE	0.24
6	PPOYE	0.50
7	OYE2	0.23
8	OYE3	0.11
9	KYE	0.09
10	YQJM	0.10
11	GoxER	1.13
12	MeOYE	0.18

^a bezogen auf Proteingehalt des Rohextrakts bestimmt mittels Bradford Assay, NfsA/B und EC-NemA: aus *Escherichia coli*, PP-NemA und PPOYE: aus *Pseudomonas putida*, AAOYE: aus *Acetobacter acetii*, OYE2/3: aus *Saccharomyces cerevisiae*, KYE: aus *Kluyveromyces lactis*, YQJM: aus *Bacillus* sp., GoxER: aus *Gluconobacter oxydans*, MeOYE: aus *Methylobacter extorquens*.

7.7.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift 9 (AAV9): Präparative Versuche mit En-Reduktasen



2-Butyl-2-octenal (**51**), NADP⁺ (3 mol%), D-Glucose (3 Äq.), GDH (Amano, 1500 U mmol⁻¹) und die En-Reduktase wurden in entgastem KPi-Puffer (200 mM, pH 7)

und ggf. 20% v/v organischem Cosolvens gelöst. Die Reaktionsmischung wurde mit Argon überschichtet für die angegebene Zeit geschüttelt und mit MTBE (3 x Reaktionsvolumen) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden gaschromatographisch untersucht.

7.7.2.1 Screening von En-Reduktasen im mikropräparativen Maßstab

Analog zur AAV9 wurde 2-Butyl-2-octenal (**51**, 2.2 μL , 10 μmol , 10 mM) mit NADP⁺ (0.23 mg, 0.30 μmol , 3 mol%), D-Glucose (5.4 mg, 30 μmol , 3 Äq.), GDH (Amano, 15 U, 0.3 mg, 1500 U mmol^{-1}) und die En-Reduktase (0.5 U, 50 U mmol^{-1}) in entgastem KPi-Puffer (1 mL Gesamtvolumen) gelöst. Es wurde 18 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 33 dargestellt.

Tab. 33: Screening verschiedener ERs im mikropräparativen Maßstab.

Enzym	Umsatz [%]	2-Butyloctanal (52) [%]	2-Butyl-1-octanol (53) [%]
EC-NemA	91.3	82.4	17.6
PP-NemA	92.1	99.4	0.6
AAOYE	100.0	87.9	12.1
PPOYE	94.7	80.2	19.8
OYE2	98.9	10.6	89.4
OYE3	96.2	4.4	95.6
KYE	93.4	8.8	91.2
YQJM	89.1	2.6	97.4
GoxER	71.4	100.0	0.0
MeOYE	60.5	100.0	0.0

7.7.2.2 Optimierung der Biotransformation mit isolierter GoxER (Statistische Versuchsplanung)

Analog zur AAV7 wurde 2-Butyl-2-octenal (**51**, 22 μL , 0.10 mmol, 20 mM) mit NADP⁺ (2.3 mg, 3.0 μmol , 3 mol%), D-Glucose (54 mg, 0.30 mmol, 3 Äq.), GDH (Amano, 150 U, 3 mg, 1500 U mmol^{-1}) und die GoxER in entgastem KPi-Puffer (5 mL Gesamtvolumen) gelöst. Die Reaktionsparameter und Ergebnisse sind in Tab. 34 dargestellt.

Tab. 34: Ergebnisse der nach statistischer Versuchsplanung durchgeführten Biotransformationen mit GoxER.

Eintrag	Temperatur [°C]	Zeit [h]	Enzymmenge [U mmol ⁻¹]	Umsatz [%]
1	10	6	50	7
2	30	6	50	29
3	10	48	50	88
4	30	48	50	73
5	10	6	200	10
6	30	6	200	28
7	10	48	200	94
8	30	48	200	90
9	10	27	125	67
10	30	27	125	51
11	20	6	125	51
12	20	48	125	98
13	20	27	50	67
14	20	27	200	77
15	20	27	125	87
16	20	27	125	84
17	20	27	125	82
18	20	27	125	78

7.7.3 Aktivitätsassay von En-Reduktase-Rohextrakten auf ADH-Aktivität

Die Aktivität verschiedener ER-Rohextrakte wurde analog zur AAV1 mit NADPH als Cofaktor auf ADH-Aktivität gegenüber 2-Butyloctanal (**52**) bestimmt (Tab. 35).

Tab. 35: ADH-Aktivitäten verschiedener ER-Rohextrakte gegenüber 2-Butyloctanal (**52**).

Enzym ^a	Volumenaktivität [U mL ⁻¹]	Proteinkonz. [mg mL ⁻¹] ^b	Aktivität [U mg ⁻¹]
EC-NemA	0.13	15.29	0.01
PP-NemA	0.31	12.72	0.02
AAOYE	0.07	6.69	0.01
PPOYE	0.08	11.53	0.01

Tab. 35: ADH-Aktivitäten verschiedener ER-Rohextrakte gegenüber 2-Butyloctanal (**52**).
(Fortsetzung)

Enzym ^a	Volumenaktivität [U mL ⁻¹]	Proteinkonz. [mg mL ⁻¹] ^b	Aktivität [U mg ⁻¹]
OYE2	0.13	5.88	0.02
OYE3	0.12	11.20	0.01
KYE	0.14	7.89	0.02
YJQM	0.10	5.87	0.02
GoxER ^c	0.41	11.29	0.04
MeOYE ^c	0.37	15.30	0.02
- (ohne Plasmid)	0.46	n.b.	n.b.
- (pET28a)	0.32	n.b.	n.b.
- (pETDuet1)	0.38	n.b.	n.b.

^a in *E. coli* BL21 (DE3) expremiert, ^b nach Bradford Assay, ^c aus Hochzell-dichte-Fermentation, n.b. = nicht bestimmt

7.7.4 Aktivitätsassay *E. coli* eigener Alkoholdehydrogenasen

Die Aktivität *E. coli* eigener ADHs wurde analog zur AAV1 auf Aktivität gegenüber 2-Butyloctanal (**52**) bestimmt (Tab. 36).

Tab. 36: Aktivitäten *E. coli* eigener ADHs gegenüber 2-Butyloctanal (**52**).

Enzym	Cofaktor	Volumenaktivität [U mL ⁻¹]	Proteinkonz. ^a [mg mL ⁻¹]	Aktivität [U mg ⁻¹]
yqhD	NADH	0.56	14.4	0.04
	NADPH	0.48		0.03
yahK	NADH	1.26	19.9	0.06
	NADPH	0.62		0.03
yjbB	NADH	0.52	10.3	0.05
	NADPH	0.62		0.06
adhP	NADH	0.50	12.8	0.04
	NADPH	0.29		0.02

^a Bradford Assay

7.7.5 Untersuchung der Deaktivierung der GoxER durch 2-Butyl-2-octenal und 2-Butyloctanal

Analog zur AAV1 wurden die Aktivitäten gereinigter GoxER gegenüber 2-Butyl-2-octenal (**51**) mit NADPH als Cofaktor nach vorheriger Inkubation mit 20 mM 2-Butyl-2-octenal (**51**) bzw. 2-Butyloctanal (**52**) bestimmt (Tab. 37).

Tab. 37: Aktivitäten der GoxER gegenüber 2-Butyl-2-octenal (**51**) nach Inkubation in 2-Butyl-2-octenal (**51**) bzw. 2-Butyloctanal (**52**).

Eintrag	Inkubationszeit [h]	Relative Aktivität Inkubation in 2-Butyloctanal (52)	Relative Aktivität Inkubation in 2-Butyl-2-octenal (51)
1	0	1.000	1.000
2	1	0.867	0.679
3	2	0.872	0.613
4	4	0.846	0.602
5	6	0.821	0.498
6	24	0.580	0.471

7.7.6 Relativer Verlust von 2-Butyl-2-octenal und 2-Butyloctanal in Gegenwart der GoxER

Eine Mischung (44:56) aus 2-Butyloctanal (**52**) und 2-Butyl-2-octenal (**51**) wurde in entgastem KPi-Puffer (200 mM, pH 7) gelöst (20 mM Gesamtkonzentration) und bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 0.5 mL der Reaktionsmischung entnommen, mit 1 mL MTBE extrahiert und gaschromatographisch der Anteil der Verbindungen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 38 dargestellt.

Tab. 38: Relativer Verlust von 2-Butyloctanal (**52**) und 2-Butyl-2-octenal (**51**) durch Inkubation mit GoxER.

Eintrag	Inkubationszeit [min]	Relativer Anteil 2-Butyloctanal (52) [%]	Relativer Anteil 2-Butyl-2-octenal (51) [%]
1	0	44	56
2	30	35	65
3	60	28	72
4	120	18	82
6	240	11	89

7.7.7 Substratkinetik der GoxER

Analog zur AAV1 wurden die Aktivitäten gereinigter GoxER gegenüber *trans*-Hexenal (**65**) und 2-Butyl-2-octenal (**51**) bei verschiedenen Substratkonzentrationen mit NADPH als Cofaktor bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 39 dargestellt.

Tab. 39: Konzentrationsabhängige Aktivitätsbestimmung der GoxER für *trans*-2-Hexenal (**65**) und 2-Butyl-2-octenal (**51**).

Eintrag	Substratkonzentration [mM]	Aktivität bzgl. <i>trans</i> -2-Hexenal (65) [U mg ⁻¹]	Aktivität bzgl. 2-Butyl-2-octenal (51) [U mg ⁻¹]
1	0.10	1.93	2.33
2	0.26	3.44	2.35
3	0.52	4.08	2.27
4	1.04	4.67	2.29
5	2.60	4.19	2.34
6	5.21	3.58	2.25
7	10.42	2.82	2.32
8	20.83	2.17	2.23
9	41.67	1.40	2.37

7.7.8 Aufarbeitungssimulation der enzymatischen Reduktion

2-Butyloctanal (**52**) wurde in einer Mischung aus 4 mL KPi-Puffer (200 mM, pH 8) und 1 mL 2-MeTHF gelöst und zehn Minuten gerührt. Anschließend wurde mit 1 mL 0.5 M HCl angesäuert und mit MTBE (3 x 5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über einen Phasentrennfilter filtriert und gaschromatographisch die Wiederfindung bestimmt (Tab. 40).

Tab. 40: Aufarbeitungssimulation der enzymatischen Reduktion mit GoxER.

Eintrag	eingesetzt [mg]	wiedergefunden [mg]	Wiederfindung [%]
1	21.18	19.50	92
2	21.20	19.85	94
3	20.61	18.02	87
4	20.85	19.16	92

7.7.9 Qualitative Untersuchung der Präzipitation von GoxER in Anwesenheit von Aldehyden

GoxER (4.42 mg) wurde in 4 mL entgastem KPi-Puffer (200 mM, pH 8) in einem Schlenk-Kolben vorgelegt. Der Schlenk-Kolben wurde evakuiert und mit Argon geflutet. Anschließend wurde das Substrat (0.1 mmol) gelöst in 1 mL 2-MeTHF zugegeben und der Kolben erneut evakuiert und mit Argon geflutet. Die Lösung wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt und die Bildung von Präzipitaten beobachtet. Die Ergebnisse sind in Tab. 41 dargestellt.

Tab. 41: Präzipitation von GoxER in Anwesenheit verschiedener Aldehyde.

Aldehyd	Präzipitation
-	nein
2-Butyl-2-octenal (51)	ja
Hexanal (49)	ja
<i>trans</i> -2-Hexenal (65)	ja
Benzaldehyd (64)	ja

7.7.10 Immobilisierung von GoxER

7.7.10.1 Immobilisierung von GoxER auf Epoxid-Träger

Der Epoxid-Träger (EP403 bzw. EP113) wurde zusammen mit GoxER (4 mg mL⁻¹) in ein verschließbares Kunststoffgefäß eingewogen und mit Phosphatpuffer (1 M, pH 8) versetzt. Die Lösung wurde für 24 h bei 25°C und 600 rpm inkubiert. Das Immobilisat wurde zweimal mit dem anfänglichen Volumen Phosphatpuffer gewaschen. Zur Bestimmung der Beladung wurde ein Bradford Assay vor und nach der Inkubation durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 42 dargestellt.

Tab. 42: Immobilisierung von GoxER auf Epoxid-Träger.

Eintrag	Träger [mg]	Inkubations-temp. [°C]	Volumen [mL]	Protein-konz. vor [mg mL ⁻¹]	Protein-konz. nach [mg mL ⁻¹]	Beladungseffizienz [%]
1	EP113 25.0	25	1	2.21	1.46	34
2	EP113 25.3	25	1	2.21	1.58	29

Tab. 42: Immobilisierung von GoxER auf Epoxid-Träger. (Fortsetzung)

Eintrag	Träger [mg]	Inkubations- temp. [°C]	Volu- men [mL]	Protein- konz. vor [mg mL ⁻¹]	Protein- konz. nach [mg mL ⁻¹]	Bela- dungseffi- zienz [%]
3	EP403 25.3	25	1	2.21	0.93	58
4	EP403 25.3	25	1	2.21	1.27	43
5 ^a	EP403 307.1	10	12.5	2.20	0.17	92
6 ^a	EP403 304.5	10	12.5	2.28	0.29	87
7 ^a	EP403 300.6	10	25	2.29	0.12	95
8 ^a	EP403 300.4	10	25	2.27	0.14	94
9 ^a	EP403 306.4	10	25	2.28	0.12	95
10 ^a	EP403 300.1	10	25	2.28	0.15	94

^a lyophilisierter Träger

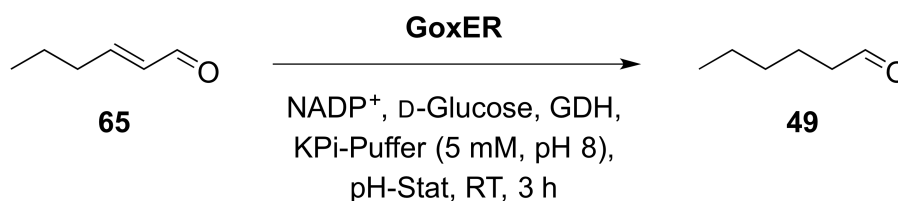
7.7.10.2 Immobilisierung von GoxER auf Amin-Träger

Der Träger (HA113/S) wird in ein 1.5 mL-Eppendorf-Gefäß eingewogen und mit 2.5% v/v Glutaraldehyd (50 µL einer 50% v/v Lösung in dest. H₂O) in 1 mL KPi-Puffer (1 M, pH 8) versetzt. Die Lösung wird 2 h bei 25°C und 600 rpm inkubiert. Anschließend wird der Träger zweimal mit je 1 mL KPi-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von GoxER (4.0 mg) wird die Lösung analog zur Immobilisierung auf Epoxid-Träger inkubiert und aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in Tab. 43 dargestellt. Es wurde in beiden Experimenten nach Inkubation mit Glutaraldehyd denaturiertes Protein beobachtet.

Tab. 43: Immobilisierung von GoxER auf Amin-Träger.

Eintrag	Träger- menge [mg]	Proteinkonz. vor [mg mL ⁻¹]	Proteinkonz. nach [mg mL ⁻¹]
1	26.86	2.31	<0.1
2	24.53	2.31	<0.1

7.7.10.3 Bestimmung der Restaktivität immobilisierter GoxER



Unter Argon wurden D-Glucose (54 mg, 0.30 mmol, 3 Äq.) und NADP⁺ (2.7 mg, 3.5 mmol, 3.5 mol%) in KPi-Puffer (4.5 mL, 5 mM, pH 8) gelöst. GDH (0.51 mL Rohextrakt mit 197 U mL⁻¹, 100 U), GoxER und *trans*-2-Hexenal (**65**, 11.6 µL, 0.10 mmol, 1 Äq.) wurde zugegeben und die Lösung für drei Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Der pH-Wert wurde während der Reaktion durch Titration mit 0.05 M NaOH am pH-Stat-Apparat konstant gehalten. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wird der Verbrauch an NaOH gegen die Zeit aufgetragen und die Anfangssteigung mit der Konzentration der NaOH multipliziert:

$$\text{Aktivität [U]} = \frac{\Delta V (\text{NaOH})}{\Delta t} \cdot c$$

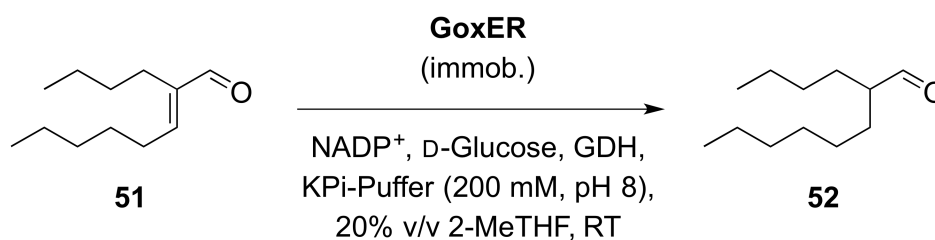
Mit V [mL] = Volumen an NaOH, t [min] = Zeit und c = Konzentration der NaOH (50 µmol mL⁻¹). Die Ergebnisse sind in Tab. 44 zusammengefasst.

Tab. 44: Bestimmung der Restaktivität immobilisierter Gox-ER.

Enzymformulierung	Menge ^c [mg]	Aktivität [U]	Spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]
freies Enzym ^a	5.1 (3.3)	0.94	0.29
immobilisiert ^b	88.7 (3.5)	0.62	0.18

^a Spezifische Aktivität (photometrisch) = 0.95 U mg⁻¹, Proteingehalt = 0.64 mg mg⁻¹, ^b Beladung = 0.039 mg Protein mg⁻¹ Immobilisat, ^c Menge an Lyophilisat bzw. Immobilisat. Absolute Proteinmenge in Klammern.

7.7.10.4 Konjugierte Reduktion von 2-Butyl-2-octenal mit immobilisierter GoxER



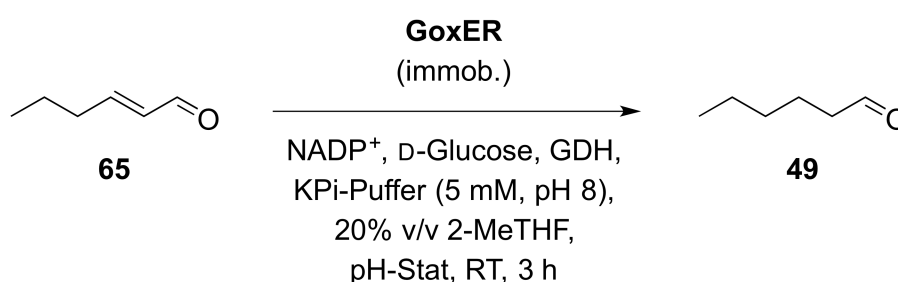
In einem Schlenk-Kolben wurden D-Glucose (54 mg, 0.30 mmol, 3 Äq.) und NADP⁺ (2.7 mg, 3.5 µmol, 3.5 mol%) in 2.5 - 3.0 mL Phosphatpuffer (200 mM, pH 8) gelöst und das Reaktionsgefäß jeweils dreimal evakuiert und mit Argon geflutet. Anschließend wurden BsuGDH (80 U) und GoxER (10 - 25 U, in freier oder immobilisierter Form) in 1.0 mL Puffer zugefügt. Es wurde erneut jeweils dreimal evakuiert und mit Argon geflutet. 2-Butyl-2-octenal (**51**, 22.0 µL, 18.6 mg, 100 µmol) wurde in 2-MeTHF (1.0 mL) gelöst und zur Reaktionsmischung gegeben. Insgesamt betrug das Reaktionsvolumen 5 mL. Es wurde 4 bis 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde 1 mL 0.5 M Salzsäure zugefügt und mit MTBE (3 x 5 mL) extrahiert. Die Phasentrennung bei der Extraktion erfolgte *via* Zentrifugation. Die vereinigten organischen Phasen wurden über einen Phasentrennfilter filtriert und mittels GC der Umsatz und die Wiederfindung bestimmt (Tab. 45).

Tab. 45: Konjugierte Reduktion von 2-Butyl-2-octenal (**51**) mit immobilisierter GoxER.

Eintrag	GoxER	Zeit [h]	Aktivität [U] ^a	Umsatz [%] ^b	Wiederfindung [%] ^b
1	frei	4	10	69	74
2	immob.	4	10	27	69
3	immob.	24	25	77	76

^a am pH-Stat-Apparat bestimmt. ^b mittels GC bestimmt

7.7.10.5 Rezyklisierung immobilisierter GoxER



Unter Argon wurden D-Glucose (54 mg, 0.30 mmol, 3 Äq.) und NADP⁺ (2.7 mg, 3.5 µmol, 3.5 mol%) in 3.5 mL KPi-Puffer (5 mM, pH 8) gelöst. GDH (0.51 mL Rohextrakt mit 197 U mL⁻¹, 100 U), immobilisierte GoxER (10 U) und *trans*-2-Hexenal (**65**, 11.6 µL, 100 µmol), letzteres gelöst in 1 mL 2-MeTHF, wurden zugegeben und die Lösung für drei Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Der pH-Wert wurde während der Reaktionszeit durch Titration mit 0.05 M NaOH am pH-Stat-Apparat konstant gehalten. Die Reaktionsmischung wurde mit 1 mL 0.5 M HCl angesäuert und mit MTBE (3 x 5 mL)

extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über einen Phasentrennfilter filtriert und gaschromatographisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 46 dargestellt.

Tab. 46: Rezyklisierung immobilisierter GoxER.

Zyklus	Umsatz [%]^a	Wiederfindung [%]^a	Spezifische Aktivität [U mg⁻¹]^b
1	57	53	0.27
2	22	61	0.22
3	17	66	0.17

^a mittels GC, ^b mittels pH-Stat-Apparat

7.8 Enzymatische Reduktion von Aldehyden

7.8.1 Aktivitätsassay verschiedener Alkoholdehydrogenasen

Die Aktivität verschiedener kommerzieller und literaturbekannter ADHs gegenüber 2-Butyloctanal (**52**) wurde analog zur AAV1 bestimmt (Tab. 47).

Tab. 47: Aktivitäts-Screening verschiedener ADHs gegenüber 2-Butyloctanal (**52**).

Eintrag	Enzym	Cofaktor	Aktivität ^a [U mg ⁻¹]
1	Yeast ADH ^b	NADH	0.17
2	ByADH ^b	NADH	0.16
3	ADH 200 ^c	NADH	0.02
4	TbADH ^b	NADH	0.03
5	PLADH ^b	NADH	0.05
6	HLADH ^b	NADH	0.04
7	RrADH	NADH	0.49
8	ScADH ^b	NADPH	0.27
9	LkADH	NADPH	0.01
10	LbADH	NADPH	0.01
11	TeADH	NADPH	0.08
12	CtADH	NADPH	0.03
13	SyADH	NADPH	0.31

^a bzgl. Proteingehalt des Lyophilisats (Einträge 1-3 und 8) oder Rohextrakts (Einträge 4-7 und 9-13) bestimmt mittels Bradford Assay, ^b von Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, Deutschland, ^c von evocatal GmbH, Monheim am Rhein, Deutschland, By: *Baker's Yeast*, Tb: *Thermoanaerobicum brockii*, PL: *Parvibaculum lavamentivorans*, HL: horse liver (equine), Rr: *Rhodococcus ruber*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Lk: *Lactobacillus kefir*, Lb: *Lactobacillus brevis*, Te: *Thermoanaerobacter ethanolicus*, Ct: *Comamonas testosteroni*, Sy: *Sphingobium yanoikuyae*.

7.8.2 Aktivitätsassay der ADH aus *Pichia pastoris* (PpADH)

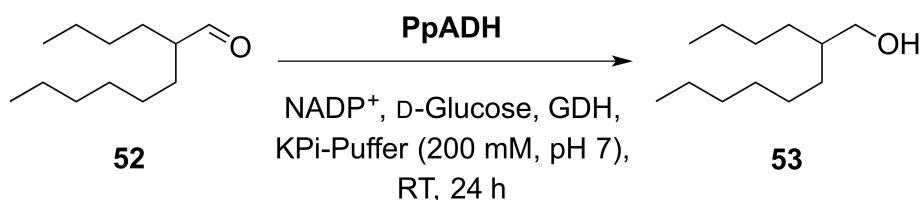
Analog zur AAV1 wurden die Aktivitäten von Rr- und PpADH gegenüber 2-Butyl-2-octenal (**51**) und 2-Butyloctanal (**52**) mit NADH (RrADH) bzw. NADPH (PpADH) als Cofaktoren bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 48 dargestellt.

Tab. 48: Aktivitäten der Rr- und PpADH gegenüber 2-Butyl-2-octenal (**51**) und 2-Butyloctanal (**52**).

Enzym	Volumenaktivität ^a [U mg ⁻¹]	
	2-Butyl-2-octenal (51)	2-Butyloctanal (52)
RrADH	0.78	0.49
PpADH	0.77	2.11

^a RrADH: bzgl. Proteingehalt in ZRE, PpADH: bzgl. gereinigtem Enzym.

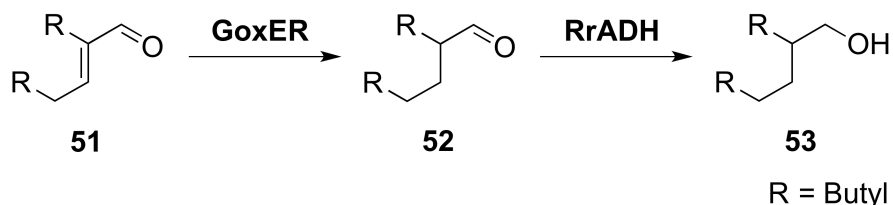
7.8.3 Reduktion von 2-Butyloctanal mit PpADH



In einem Schlenk-Kolben wurden PpADH (100 U mmol⁻¹, gereinigt *via* His-Tag), GDH2 (hitzegefällter Zellrohextrakt), NADP⁺·Na (2.3 mg, 3.0 μmol, 3 mol%) und D-Glucose in entgastem KPi-Puffer (pH 7, 200 mM) zu einem Gesamtvolumen von 5 mL gelöst. Die Lösung wurde entgast und das Gefäß mit Argon geflutet. 2-Butyloctanal (**52**, 18.0 μL, 100 μmol, 20 mM) wurde zur Reaktionsmischung gegeben, der Kolben gasdicht verschlossen und die Mischung 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit 1 mL 0.5 M HCl angesäuert und mit MTBE (3 x 5 mL) extrahiert. Es wurde gaschromatographisch ein Umsatz von >99% zu 2-Butyl-1-octanol (**53**) mit einer Selektivität von >99% ermittelt.

7.9 Kombination der enzymatischen Reduktionen

7.9.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift 10 (AAV10): Mikro-präparative Experimente zur enzymatischen Reduktion mit isolierten Enzymen



In einem Schlenk-Kolben wurden GoxER (gereinigt *via* His-Tag) und/oder RrADH (Zellrohextrakt), GDH2 (hitzegefällter Zellrohextrakt), NADP⁺·Na (2.3 mg, 3.0 μmol, 3 mol%) und/oder NAD⁺ (2.0 mg, 3.0 μmol, 3 mol%) und D-Glucose in entgastem KPi-Puffer (pH 7, 200 mM) zu einem Gesamtvolumen von 4 mL gelöst. Die Lösung wurde entgast und das Gefäß mit Argon geflutet. Das Substrat, sowie 1 mL KPi-Puffer (pH 7, 200 mM) oder organisches Cosolvens (resultierend in 20% v/v org. Cosolvens) wurden zur Reaktionsmischung gegeben, der Kolben wurde gasdicht verschlossen und die Mischung 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit 1 mL 0.5 M HCl angesäuert und mit MTBE (3 x 5 mL) extrahiert.

7.9.1.1 Enzymatischen Reduktionen in verschiedenen Solvenssystemen

Analog zur AAV10 wurden GoxER (10 U, 6.6 mg, 1.5 U mg⁻¹, 100 U mmol⁻¹) und/oder RrADH (20.0 U, 2.73 mg, 7.3 U mg⁻¹, 200 U mmol⁻¹), sowie GDH2 (50.0 U, 500 U mmol⁻¹), NAD(P)⁺ und D-Glucose (54 mg, 0.30 mmol, 3 Äq.) verwendet. Als Substrat kam 2-Butyl-2-octenal (**51**, 18.2 mg, 100 μmol, 20 mM) oder 2-Butyloctanal (**52**, 18.4 mg, 100 μmol, 20 mM) zum Einsatz. Die Reaktionen wurden in reinem KPi-Puffer (pH 7, 200 mM) oder mit 20% v/v organischem Cosolvens (MeOH oder 2-MeTHF) für 24 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Die experimentellen Details sind in Tab. 49, die Ergebnisse Tab. 50 zusammengefasst.

Tab. 49: Experimentelle Details der enzymatischen Reduktionen mit GoxER und RrADH.

Komponente	ER	ADH	ER + ADH
GoxER	+	-	+
RrADH	-	+	+
GDH2	+	+	+ ^a
NADP ⁺	+	-	+
NAD ⁺	-	+	+
D-Glucose	+	+	+ ^a
2-Butyl-2-octenal (51)	+	-	+
2-Butyloctanal (52)	-	+	-

^a es wurde die zweifache Menge verwendet

Tab. 50: Enzymatische Reduktionen mit GoxER und RrADH in verschiedenen Solvenssystemen.

Eintrag	Cosolvens	Reduktion	Umsatz ^a [%]	Selektivität ^b [%]
1	-	ER	70	>99
2	-	ADH	78	>99
3	-	ER + ADH	>99	95
4	2-MeTHF	ER	>99	>99
5	2-MeTHF	ADH	36	>99
6	2-MeTHF	ER + ADH	98	48
7	MeOH	ER	>99	>99
8	MeOH	ADH	>99	>99
9	MeOH	ER + ADH	>99	94

Bildung des Nebenprodukts 2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**) <2%, ^a Gesamtumsatz von 2-Butyl-2-octenal (**51**) = Umsatz der GoxER, ^b Anteil an Zielprodukt 2-Butyl-1-octanol (**53**) = Umsatz der RrADH.

7.9.1.2 Erhöhung der Substratkonzentration

Analog zur AAV10 wurden GoxER (10 U, 6.6 mg, 1.5 U/mg, 100 U mmol⁻¹), RrADH (20.0 - 40.0 U, 2.73 - 5.46 mL, 7.30 U mL⁻¹, 200 U mmol⁻¹), GDH2 (100 U, 1000 U mmol⁻¹), NADP⁺·Na, NAD⁺ und D-Glucose (6 Äq.) verwendet. Als Substrat kam 2-Butyl-2-octenal (**51**, 18.2 - 182 mg, 0.10 - 1.00 mmol, 20 - 200 mM) und als Cosolvens 20% v/v MeOH zum Einsatz. Die Ergebnisse sind in Tab. 51 zusammengefasst.

Tab. 51: Erhöhung der Substratkonzentration der Doppelreduktion.

Eintrag	Substrat [mM]	GoxER [U] ([U mmol ⁻¹])	RrADH [U] ([U mmol ⁻¹])	Umsatz [%]	Selektivität [%]
1	20	10 (100)	20 (200)	>99.9	93.1
2	100	10 (20)	20 (40)	98.5	58.1
3	100	10 (20)	40 (80)	97.8	>99.9
4	200	10 (10)	20 (40)	42.6	60.5

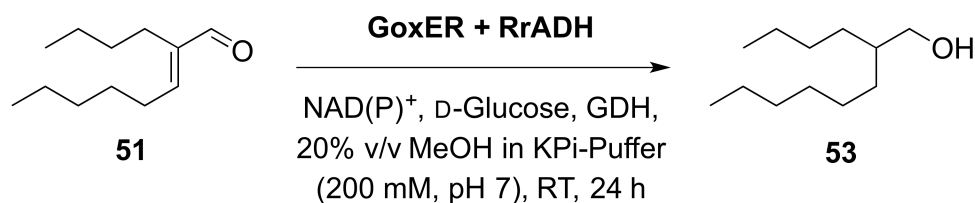
7.9.2 Aktivitätsassay von GoxER und RrADH mit Methanol als Cosolvens

Analog zur AAV1 wurde die Aktivität von gereinigter GoxER gegenüber 2-Butyl-2-octenal (**51**) mit NADPH als Cofaktor und RrADH-Rohextrakt gegenüber 2-Butyl-octanal (**52**) mit NADH als Cofaktor in Gegenwart verschiedener Volumenanteile Methanol bestimmt (Tab. 52).

Tab. 52: Relative Aktivitäten der GoxER gegenüber 2-Butyl-2-octenal (**51**) und der RrADH gegenüber 2-Butyloctanal (**52**) in Gegenwart verschiedener Volumenanteile Methanol.

Anteil MeOH [% v/v]	Relative Aktivität (Aktivität [U mg ⁻¹])	
	GoxER	RrADH
0	1.00 (3.0)	1.00 (0.5)
10	0.53 (1.6)	1.71 (0.9)
20	8.23 (24.7)	5.49 (2.8)

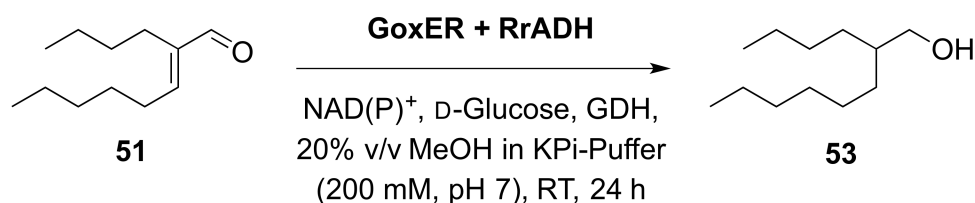
7.9.3 Kombinierte Biotransformation im 15 mL-Maßstab



GoxER (30.0 U, 19.8 mg, 1.50 U mg⁻¹, 100 U mmol⁻¹) und RrADH (60.0 U, 8.19 mL, 7.30 U mL⁻¹, 200 U mmol⁻¹), GDH2 (300 U, 1000 U mmol⁻¹), NADP⁺·Na (6.9 mg, 9.0 µmol, 3 mol%), NAD⁺ (6.0 mg, 9.0 µmol, 3 mol%) und D-Glucose (1.80 mmol, 324 mg, 6 Äq.) wurden in entgastem KPi-Puffer (pH 7, 200 mM) zu einem Gesamtvolumen von 12 mL gelöst. 2-Butyl-2-octenal (**51**, 56.1 mg, 310 µmol, 20 mM) wurde in 3 mL MeOH gelöst

und zur Reaktionsmischung gegeben. Es wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 3 mL 0.5 M HCl angesäuert und mit MTBE extrahiert (3 x 15 mL). Es wurde ein Umsatz von >99% mit einer Selektivität von 95% erreicht. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. 2-Butyl-1-octanol (**53**, 44.7 mg, 0.24 mmol, 78% Ausbeute) wurde als farblose Flüssigkeit erhalten. Die ¹H-NMR-Daten stimmen mit denen der reinen Referenzverbindung (Abschnitt 7.2) überein.

7.9.4 Kombiniertes Gesamtprozess unter Verwendung isolierter Enzyme



GoxER (10 U, 6.6 mg gereinigt *via* His-Tag, 1.5 U mg⁻¹, 100 U mmol⁻¹) und RrADH (20.0 U, 2.73 mL Zellrohextrakt, 7.30 U mL⁻¹, 200 U mmol⁻¹), GDH2 (100 U, 1000 U mmol⁻¹), NADP⁺·Na (2.3 mg, 3.0 μmol, 3 mol%), NAD⁺ (2.0 mg, 3.0 μmol, 3 mol%) und D-Glucose (108 mg, 600 μmol, 6 eq) wurden in entgastem KPi-Puffer (pH 7, 200 mM) zu einem Gesamtvolumen von 4 mL gelöst. Ein Teil des Rohproduktes aus Abschnitt 7.6 (18.1 mg, 100 μmol) wurde in 1 mL MeOH gelöst und zur Reaktionsmischung gegeben. Es wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt, mit 1 mL 0.5 M HCl angesäuert und mit MTBE (3 x 5 mL) extrahiert. Es wurde ein Umsatz von 97% bei 97% Selektivität erreicht. Das organische Solvens wurde im Vakuum entfernt. Es wurde 2-Butyl-1-octanol (**53**, 62% Gesamtausbeute) als farblose Flüssigkeit erhalten. Die ¹H-NMR-Daten stimmen mit denen der reinen Referenzverbindung überein.

7.10 Ganzzellkatalyse

7.10.1 Konstruktion und Expression der Ganzzellkatalysatoren

7.10.1.1 Amplifikation des Inserts

Aus pET28a_PpADH als Template-Plasmid wurde mittels PCR und den Primern PpADH_for und PpADH_rev (Tab. 53) *PpADH(N)* (Gen der PpADH mit N-terminalem His-Tag) amplifiziert. Hierzu wurden Template (1 μL), Phusion-Polymerase (0.5 μL), 5x HF-Puffer (10 μL), 10 mM dNTPs (0.5 μL), Primer (je 1 μL , 100 pmol μL^{-1}), DMSO (2.5 μL) und Nuclease-freies Wasser (33.5 μL) zusammengegeben und die Reaktion am Thermocycler durchgeführt. Begonnen wurde mit einer initialen Denaturierung für 60 sek bei 98 °C, gefolgt von 30 Zyklen Denaturierung für 30 sek bei 98 °C, Annealing für 30 sek bei 65 °C und Elongation für 25 sek bei 72 °C. Den Abschluss bildete eine weitere Elongationsphase für 10 min bei 72 °C. Die DNA wurde nach Anleitung des Herstellers mittels Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Kit isoliert.

Tab. 53: Oligonukleotide (Primer) für die Amplifikation des Inserts.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Restriktionsenzym
PpADH_for	AGTGCAC <u>CATATG</u> GGCAGCAGCCATCAC- CATCATCACCACAGCCAGGTTTCTAAGGTTTTA	<i>NdeI</i>
PpADH_rev	AGCCGACTCGAGTTATTTATTAGCACGCAATATC	<i>XhoI</i>

Restriktionsstellen sind unterstrichen, Start- oder Stopp-Codon sind fett und die für den His-Tag codierende Region ist kursiv dargestellt.

7.10.1.2 Verdau des Inserts

Die Insert-DNA (80 μL), 10x FD-Puffer (10 μL), die Restriktionsenzyme *NdeI* und *XhoI* (je 1 μL) und ddH₂O (8 μL) wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die DNA wurde mittels Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Kit aufgereinigt.

7.10.1.3 Verdau und Aufreinigung des Vektors

Das Plasmid pETDuet_Gox8_PpADH (50 μL), 10x FD-Puffer (6 μL), die Restriktionsenzyme *NdeI* und *XhoI* (je 1 μL) und ddH₂O (2 μL) wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Das Plasmid wurde gelelektrophoretisch (1% Agarose) aufgereinigt und mittels Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Kit isoliert.

7.10.1.4 Ligation, Transformation in *E. coli* JM109 und Testverdau

Die verdauten Plasmid- und Insert-DNAs (je 3 μL) wurden zusammen mit T_4 -Ligase (1 μL), 10x T_4 -Puffer (2 μL) und ddH₂O (11 μL) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der gesamte Ligationsansatz wurde zu den chemisch kompetenten *E. coli* JM109-Zellen (100 μL) gegeben, 60 min auf Eis und 90 sek bei 42 °C inkubiert. Es wurde LB-Medium (700 μL) zugegeben und 60 min bei 37 °C inkubiert. 200 μL der Zellsuspension wurden auf einer LB-Agar-Platte (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Carbenicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Jede Kolonie (hier 16 Kolonien) wurde in LB-Medium (6 mL, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Carbenicillin) über Nacht bei 37 °C inkubiert (Kolonie 12 nicht angewachsen). Die Plasmide wurden mittels Analytik Jena Plasmid Mini-Prep-Kit isoliert und in einem Testverdau auf Vorhandensein des Inserts hin überprüft. Hierzu wurde das jeweilige Plasmid (3 μL) mit 10x FD-Puffer (1 μL), den Restriktionsenzyme *NdeI* und *XhoI* (je 0.07 μL) und ddH₂O (5.9 μL) bei 37 °C für 1.5 h inkubiert und gelelektrophoretisch (1% Agarose, Biotium GelRed) untersucht. Die korrekte Sequenz der Plasmide wurde mittels Sequenzierung (MWG Eurofins, Ebersberg, Deutschland) bestätigt.

7.10.1.5 Transformation und Anzucht der Ganzzellkatalysatoren

Je 1 μL Plasmid-Lösung (pETDuet + pACYC_GDH2) wurden zu chemisch kompetenten *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen (100 μL) gegeben und 40 min auf Eis und anschließend 90 sek bei 42°C inkubiert. Es wurden je 700 μL LB-Medium zugegeben und für 1.5 h bei 37°C schüttelnd (180 rpm) inkubiert. Je 200 μL der Zellsuspension wurden auf einer LB-Agar-Platte (80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Carbenicillin + 28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Chloramphenicol) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurden fünf Kolonien gepickt und in 8 mL LB-Medium (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Carbenicillin + 27 $\mu\text{g/mL}$ Chloramphenicol) über Nacht bei 37°C schüttelnd (180 rpm) inkubiert. In einem 2-L-Kolben wurden 200 mL TB-Medium (24 g L⁻¹ Hefeextrakt, 12 g L⁻¹ Caseinhydrolysat, 5 g L⁻¹ Glycerin und 0.5 g L⁻¹ D-Glucose in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (KPi), pH 7.0) mit 80 $\mu\text{g/mL}$ Carbenicillin und 28 $\mu\text{g/mL}$ Chloramphenicol vorgelegt und mit 1.5 Vol% der Vorkultur angeimpft. Es wurde schüttelnd (180 rpm) bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.7 inkubiert und anschließend mit 0.5 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Es wurde weitere 72 h bei 15°C schüttelnd (180 rpm) inkubiert, die Zellen bei 4000 g für 20 min abzentrifugiert und bei -20°C gelagert (Tab. 54). Die Ganzzellkatalysatoren (GZK1-4) wurden mittels Ultraschall-Homogenisator aufgeschlossen und mittels SDS-PAGE untersucht.

Tab. 54: Produzierte Zellmengen.

GZK	Zellfeuchtmasse [g]
1	6.92
2	7.12
3	7.62
4	7.57

7.10.2 Bestimmung von Aktivitäten und Proteingehalt der Ganzzellkatalysatoren

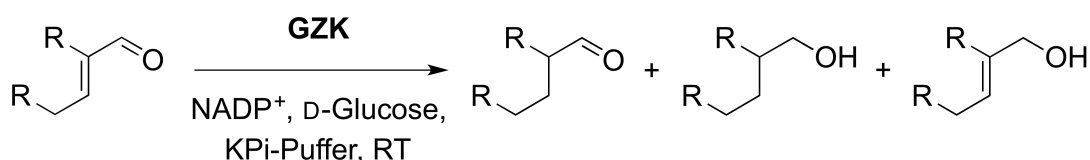
Die Enzymaktivität der Rohextrakte der Ganzzellkatalysatoren (GZK) gegenüber D-Glucose, 2-Butyl-2-octenal (**51**) und 2-Butyloctanal (**52**) wurde analog zu AAV1 und 2 bestimmt. Ein Bradford-Assay mit BSA als Standard wurde für die Bestimmung des Proteingehalts verwendet. Die Ergebnisse sind in Tab. 55 zusammengefasst.

Tab. 55: Enzymaktivitäten und Proteingehalte der Rohextrakte der Ganzzellkatalysatoren.

GZK	Glucose (ox.) ^a	2-Butyl-2-octenal (51) (red.) ^a	2-Butyloctanal (52) (red.) ^a	Proteingehalt ^b
1	7.93	0.20	0.10	56.8
2	9.52	0.26	0.16	79.7
3	6.91	0.17	0.04	58.4
4	8.33	0.19	0.14	80.3

^a Aktivitäten in U mg⁻¹, ^b Proteingehalt in mg Protein g⁻¹ GZK

7.10.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift 11 (AAV11): Mikro-präparative Ganzzell-Biotransformationen



In einem Schlenk-Kolben wurden eine 20% w/v Suspension des GZK (aufgetaute Zellfeuchtmasse) in KPi-Puffer, NADP⁺ (5 mol%) und D-Glucose (4 Äq.) vorgelegt und mit entgastem KPi-Puffer auf 4 mL Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Kolben wurde entgast und mit Argon geflutet. 1 mL KPi-Puffer oder Methanol, sowie das Substrat wurden zur

Reaktionsmischung gegeben. Der Kolben wurde gasdicht verschlossen und bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit 1 mL 0.5 M HCl angesäuert und mit MTBE (3 x 5 mL) extrahiert. Zur Förderung der Phasentrennung wurde zentrifugiert.

7.10.3.1 Einleitende Versuche zum Vergleich der Ganzzellkatalysatoren

Analog zur AAV11 wurden die Biotransformationen mit 20 mM 2-Butyl-2-octenal (**51**, 22 μL , 0.10 mmol) in KPi-Puffer (pH 7, 200 mM) mit 20 mg mL^{-1} GZK für 48 h durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 56 zusammengefasst.

Tab. 56: Direkter Vergleich der vier Ganzzellkatalysatoren.

GZK	Umsatz [%]	2-Butyl-octanal (52) [%]	2-Butyl-1-octanol (53) [%]	2-Butyloct-2-en-1-ol (66) [%]
1	93.7	4.3	94.7	1.8
2	>99.9	<0.1	99.7	0.3
3	>99.9	39.1	60.8	0.1
4	93.5	1.3	97.9	0.8

7.10.3.2 Erhöhung der Katalysatormenge

Analog zur AAV11 wurden die Biotransformationen mit 20 mM 2-Butyl-2-octenal (**51**, 22 μL , 0.10 mmol) in KPi-Puffer (pH 7, 200 mM) mit 10-100 mg mL^{-1} GZK2 oder 4 für 24 h durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 57 zusammengefasst.

Tab. 57: Erhöhung der Menge an GZK2 und 4.

Eintrag	GZK	Menge GZK [mg mL^{-1}]	Umsatz [%]	2-Butyl-octanal (52) [%]	2-Butyl-1-octanol (53) [%]
1	2	10	83.5	0.7	99.3
2	2	20	96.5	1.0	99.0
3	2	100	88.6	0.7	99.2
4	4	10	56.4	7.1	92.9
5	4	20	46.0	0.7	99.3
6	4	100	92.1	2.2	97.8

7.10.3.3 Optimierung des pH-Werts

Analog zur AAV11 wurden die Biotransformationen mit 20 mM 2-Butyl-2-octenal (**51**, 22 μL , 0.10 mmol) in KPi-Puffer (pH 6-8, 200 mM) mit 20 mg mL⁻¹ GZK2 für 24 h durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen und Ergebnisse sind in Tab. 58 zusammengefasst.

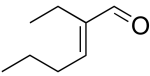
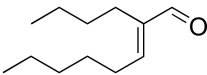
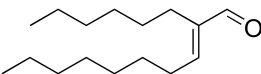
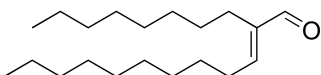
Tab. 58: Optimierung des pH-Werts für GZK2.

pH	Umsatz [%]	2-Butyl-octanal (52) [%]	2-Butyl-1-octanol (53) [%]	2-Butyloct-2-en-1-ol (66) [%]
6.0	75.2	3.5	95.5	0.6
6.5	95.5	1.2	98.0	0.8
7.0	96.5	1.0	97.2	1.8
7.5	87.7	5.6	93.1	1.3
8.0	27.2	4.8	94.6	0.6

7.10.3.4 Substratscreening

Analog zur AAV11 wurden die Biotransformationen mit 20 mM Substrat (0.10 mmol) in KPi-Puffer (pH 7, 200 mM) mit 20 mg mL⁻¹ GZK2 für 48 h durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 59 zusammengefasst.

Tab. 59: Substratscreening von GZK2.

Substrat	Umsatz [%]	Intermediat [%]	Produkt [%]	Nebenprodukt [%]
 16	>99.9	<0.1	98.3	1.7
 51	>99.9	<0.1	99.7	0.3
 54	87.3	18.1	72.7	9.2
 55	11.9	47.9	42.9	9.2

7.10.3.5 Erhöhung der Substratkonzentration und Verwendung von organischem Cosolvens

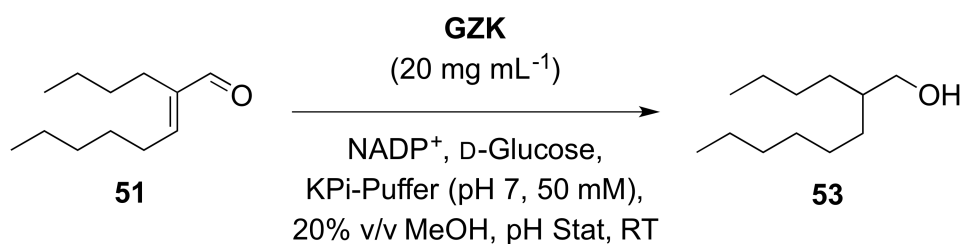
Analog zur AAV11 wurden die Biotransformationen mit 20-100 mM 2-Butyl-2-octenal (**51**, 22 - 110 μL , 0.10 - 0.50 mmol) in KPi-Puffer (pH 7, 500 mM) mit 20 mg mL^{-1} GZK2 für 48 h durchgeführt. Reaktionsbedingungen und Ergebnisse sind in Tab. 60 dargestellt.

Tab. 60: Erhöhung der Substratkonzentration.

Eintrag	Substrat [mM]	Cosolvens ^b	Umsatz [%]	2-Butyl-octenal (52) [%]	2-Butyl-1-octanol (53) [%]	2-Butyloct-2-en-1-ol (66) [%]
1 ^a	20	-	>99.9	0.0	98.5	1.5
2	20	-	84.2	16.4	82.5	1.1
3	50	-	53.5	11.2	88.0	0.8
4	100	-	33.5	3.3	95.2	1.5
5	50	+	92.7	3.3	95.5	1.2
6	100	+	76.9	1.8	96.9	1.3

^a KPi-Puffer (200 mM, pH 7) verwendet. ^b in mit "+" gekennzeichneten Experimenten wurde 20% v/v Methanol als Cosolvens verwendet.

7.10.4 Allgemeine Arbeitsvorschrift 12 (AAV12): Hochskalierte Ganzzell-Biotransformationen



In einem Dreihals-Rundkolben wurden NADP^+ (2 mol%) und D-Glucose (4 Äq) in entgastem KPi-Puffer (50 mM, pH 7, 60% des Gesamtreaktionsvolumens) gelöst. Eine 10% w/v Suspension des Ganzzellkatalysators in KPi-Puffer (20% des Gesamtreaktionsvolumens, 20 g L^{-1} Endzellkonzentration) und 2-Butyl-2-octenal (**51**, 100 - 500 mM), gelöst in Methanol (20% des Gesamtreaktionsvolumens), wurden hinzugegeben. Der Kolben, bestückt mit Titrationskopf, pH-Elektrode und Argonzufuhr wurde gasdicht verschlossen und die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur gerührt. Der pH-Wert wurde mithilfe einer pH-Stat-Apparatur mithilfe von NaOH konstant gehalten. Die Konzentration der NaOH lag bei 1 - 5 M (max. 20% des Reaktionsvolumens bei vollständigem Umsatz). Es wurde mit MTBE (3 x Reaktionsvolumen) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

7.10.4.1 Ganzzell-Biotransformationen im 25 mL-Maßstab

Analog zur AAV12 wurden die Biotransformationen mit 94 - 513 mM 2-Butyl-2-octenal (**51**, 17.2 - 93.6 g L⁻¹) in KPi-Puffer (pH 7, 50 mM) mit GZK2 und 4 bei einem Reaktionsvolumen von 25 mL durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 61 zusammengefasst.

Tab. 61: Erhöhung der Substratkonzentration und Vergleich von Biotransformationen mit GZK2 und 4 im 25 mL-Maßstab.

Eintrag	GZK	Substrat [g L ⁻¹]	Zeit [h]	Ausbeute [%]
1	2	17.2	16	80 ^a
2	2	37.2	48	89
3	2	93.6	68	86
4	4	18.2	22	85 ^b

2-Butyloct-2-en-1-ol (**66**): ^a 2.4%, ^b 4.4%

7.10.4.2 Aufarbeitungssimulation von Ganzzell-Biotransformationen im 25 mL-Maßstab

Analog zur AAV12, wurde statt 2-Butyl-2-octenal (**51**) des Produkt 2-Butyl-1-octanol (**53**) verwendet und 24 h in Anwesenheit aller beteiligten Reaktionskomponenten gerührt. Es wurde mit EtOAc bzw. MTBE extrahiert. Die Ein- und Auswaagen, sowie die draus resultierenden Wiederfindungen sind in Tab. 62 dargestellt.

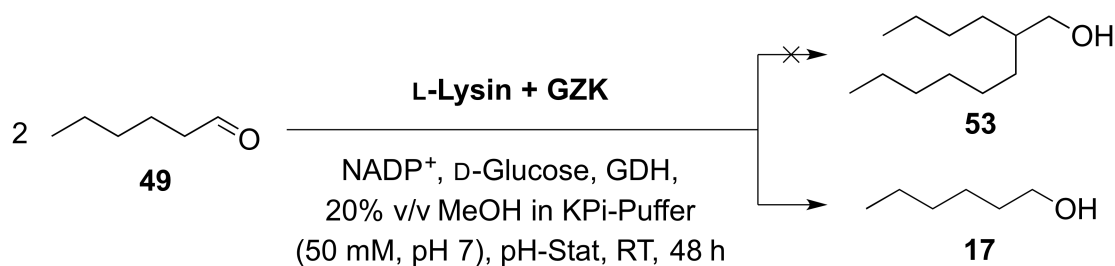
Tab. 62: Aufarbeitungssimulation von Ganzzell-Biotransformationen.

Eintrag	Extraktions- mittel	Einwaage [mg]	Auswaage [mg]	Wiederfindung [%]
1	EtOAc	439	349	79
2	MTBE	445	392	88

7.10.4.3 Ganzzell-Biotransformation im 500 mL-Maßstab

Analog zur AAV12 wurde die Biotransformation mit 101 mM 2-Butyl-2-octenal (**51**, 18.5 g L⁻¹) in KPi-Puffer (pH 7, 50 mM) mit GZK2 für 48 h durchgeführt. Die Reaktionszeit betrug 22 h und es wurde 2-Butyl-1-octanol (**53**, 9.20 g, 49.3 mmol, 97% Ausbeute, 88% Reinheit, 1.8% 2-Butyloct-2-en-1-ol (**14**)) als farblose Flüssigkeit erhalten.

7.11 Kombination von Aldolkondensation und Ganzzellkatalyse



In einem Dreihals-Rundkolben wurden NADP⁺ (38.3 mg, 0.05 mmol, 2 mol% bzgl. Enal), D-Glucose (1.8 g, 10 mmol, 4 Äq bzgl. Enal) und L-Lysin (146 mg, 1.00 mmol, 20 mol% bzgl. Hexanal) in 15 mL entgastem KPi-Puffer (50 mM, pH 7) gelöst. Eine 10% w/v Suspension des Ganzzellkatalysators in 5 mL entgastem KPi-Puffer (50 mM, pH 7, 20 g L⁻¹ Endzellkonzentration) und Hexanal (**49**, 618 µL, 5.00 mmol), gelöst in 5 mL Methanol wurden hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Kolben, bestückt mit Titrationskopf, pH-Elektrode und Argonzufuhr wurde gasdicht verschlossen und die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur gerührt. Der pH-Wert wurde mithilfe einer pH-Stat-Apparatur mithilfe von 1 M NaOH konstant gehalten. Es wurde mit MTBE (3 x 25 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über einen Phasentrennfilter filtriert und gaschromatographisch untersucht. Es wurde ein Gesamtumsatz von 80% mit einer Selektivität von 90% für 1-Hexanol (**17**), 4% für 2-Butyl-2-octanol (**51**) und 6% Säuren festgestellt.

8 Anhang - Thioester-vermittelte Amidbildung

8.1 Einleitung

Die atomeffiziente Bildung von Amidbindungen wurde vom *American Chemical Society Green Chemistry Institute* als eines der industriell relevantesten Forschungsgebiete der präparativen organischen Chemie eingestuft.^[249–251] Durch den Einsatz Lipase-katalysierter Verfahren konnte die Notwendigkeit von Kupplungsreagenzien in vielen Fällen bereits umgangen werden.^[252–257] Neben den vielen Vorteilen des Einsatzes von Biokatalysatoren (z.B. Selektivität und milde Reaktionsbedingungen) bringen sie jedoch auch den Nachteil mit sich, in der Regel sterisch anspruchsvolle Substrate weniger gut zu akzeptieren. Für Lipasen trifft dies vor allem auf die nucleophile Komponente (z.B. Amin oder Thiol) zu. Um dies zu Umgehen wurde ein Verfahren entwickelt, welches als Intermediat zunächst enzymatisch einen aktivierten Thioester generiert.^[258] Dieser reagiert mit einem Amin nicht enzymkatalysiert zum gewünschten Amid. Dieses Vorgehen erlaubt die Entkopplung der Carbonsäure-Aktivierung von der Amidbildung und somit den Einsatz sterisch anspruchsvoller Amine.

In Vorarbeiten zeigte sich jedoch, dass die mittels Lipasen-Katalyse hergestellten Phenoxyacetyl-Thioester (Decyl, Butyl, Benzyl) nicht mit komplexen primären Aminen, wie 7-Aminomethylcephalosporansäure (7-ACA, **70**), zum entsprechenden Amid reagierten. Lediglich S-Phenyl-2-phenoxyethanthioat (**71**) konnte zu 20% mit 7-ACA (**70**) zu Phenoxyethylcephalosporin (PMC, **72**) umgesetzt werden (Abb. 45).^[258]

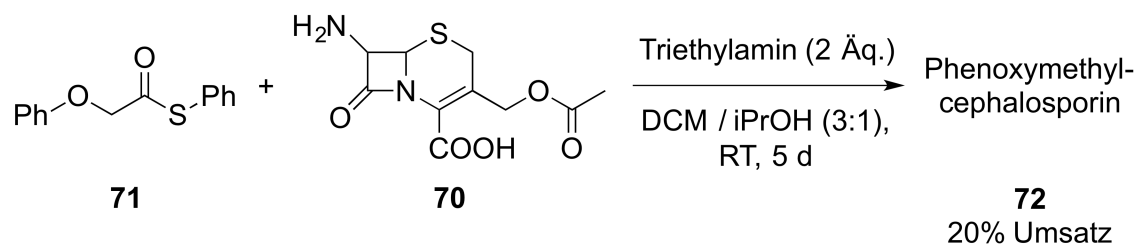


Abb. 45: Synthese von Phenoxyethylcephalosporin (**72**) aus S-Phenyl-2-phenoxyethanthioat (**71**) und 7-Aminocephalosporansäure (**70**).

Ein bereits in der nativen chemischen Ligation erfolgreich eingesetztes Prinzip ist die Transesterifizierung.^[259–261] Es beruht auf der Tatsache, dass ein Thioester bei Anwesenheit eines weiteren Thiols mit dem aus seiner Säure-Komponente und dem zusätzlichen Thiol gebildeten Thioester im Gleichgewicht steht. So kann ein schwach aktivierter

Thioester intermediär in eine stärker aktivierte Form überführt werden, welche die gewünschte Reaktion durchführt. Als Katalysatoren für die Transthioesterifizierung kommen Harnstoff-Derivate in Frage (Abb. 46).^[262]

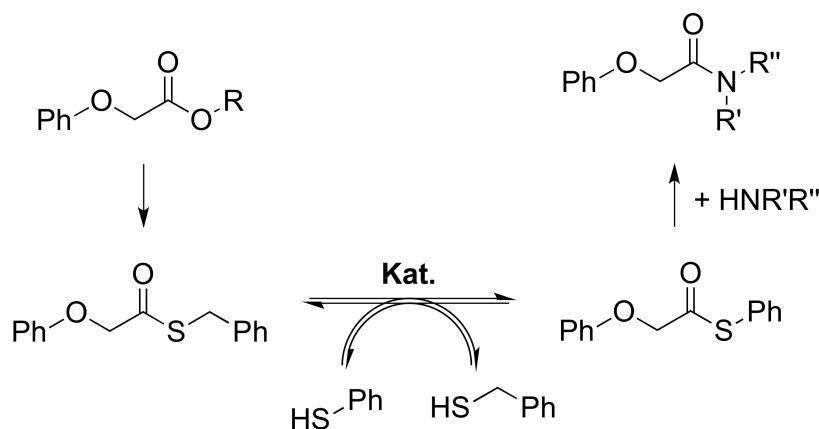


Abb. 46: Prinzip der Thioester-vermittelten Amidbildung mit Transthioesterifizierung.

8.2 Ergebnisse und Diskussion

8.2.1 Aminolyse von Thioestern mit Piperidin-Derivaten

In Erweiterung der Vorarbeiten mit primären Aminen wurden drei Piperidinderivate hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, unkatalysiert mit S-Benzyl-2-phenoxyethanthioat (**73**) zum korrespondierenden Amid zu reagieren. Dabei stellt 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin (**74**) mit je zwei Methylgruppen an beiden α -Positionen das am stärksten sterisch gehinderte Derivat dar. 2-Methylpiperidin (**75**) besitzt lediglich eine Methylgruppe an einer der beiden α -Positionen. Es wurde das Racemat dieser Verbindung eingesetzt. Unsubstituiertes Piperidin (**76**) ist sterisch am wenigsten anspruchsvoll. Die sekundären Amine **74** und **75** wurden von PIERENKEMPER^[263] als schlechte Substrate für die CAL-B-katalysierte Amidsynthese identifiziert. Daher sind sie gute Kandidaten für die Untersuchungen zur Thioester-vermittelten Amidsynthese, bei der der Thioester als Intermediat CAL-B-katalysiert erzeugt wird und sukzessive mit einem Amin zum korrespondierenden Amid reagiert. Das Amin und der Thioester **73** wurden im Verhältnis 1:1 in MTBE gelöst und für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die sterisch gehinderten Verbindungen 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin (**74**) und 2-Methylpiperidin (**75**) zeigen keinen Umsatz. Dagegen ist der Umsatz mit Piperidin (**76**) quantitativ.

Weiterhin wurden verschiedene Katalysatoren und Lösungsmittelsysteme für die Aminolyse von S-Benzyl-2-phenoxyethanthioat (**73**) mit 2-Methylpiperidin (**75**) getestet. Verwendet wurde Triethylamin (TEA, 1.5 Äq.) als basischer, Benzoesäure (0.2 Äq.) und

Amberlyst 15 (100 mg) als saure und Scandiumtriflat (0.2 Äq.) als Lewis-saurer Katalysator. Keines der Experimente zeigte Umsatz zu *rac*-2-Methyl-*N*-phenoxyacetylpiiperidin (**77**). Auch in einem Screening von neun organischen Solvenzien zeigte keiner der Ansätze Umsatz zum Amid **77**. In den meisten Fällen konnte lediglich der Thioester **73** zurückerhalten werden. In Methanol wurde Phenoxyessigsäuremethylester (**78**) nachgewiesen.

Als weiterer Parameter wurde der Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Aminolyse untersucht. Erhitzen zum Rückfluss in MTBE und *n*-Heptan bei 55 bzw. 98 °C, ergab keinen Umsatz zum korrespondierenden Amid **77**. Erst die lösungsmittelfreie Reaktion mit einem Siedepunkt von 120 °C zeigte quantitativen Umsatz, wovon jedoch nur 23 % produktbezogen waren. Der restliche Thioester **73** reagierte zu einem unbekanntem Nebenprodukt mit ¹H-NMR-Signalen (CDCl₃) bei 3.59 und 4.64 ppm.

Von OSZCZAPOWIC^[264] wurde die Aminolyse eines Thioesters aus 2-(2-Aminothiazol-4-yl)-2-methoxyiminoessigsäure (ATMO, **79**) und Mercaptoessigsäureethylester (**80**) mit 7-ACA (**70**) beschrieben. Der entsprechende Thioester mit Phenoxyessigsäure (**81**), S-Phenoxyacetylmercaptoessigsäureethylester (**82**), wurde mit einer Ausbeute von 87% über das etablierte T3P[®]-Verfahren hergestellt. Es wurde versucht den erhaltenen Thioester **82** einer Aminolyse mit 2-Methylpiperidin (**75**) zu unterziehen. Es konnte jedoch kein Produkt nachgewiesen werden.

8.2.2 Gleichgewicht der Transthoesterifizierung

Mithilfe von 1,3-Bis(3,5-bis(trifluormethyl)phenyl)harnstoff (**83**), einem Urea-basierten Katalysator und Diisopropylethylamin (DIPEA) wurde der Benzyl-Thioester **73** mit Thiophenol (**84**) zum Phenyl-Thioester **71** zu 17% umgesetzt. Die Rückreaktion, ausgehend vom Phenyl-Thioester zum Benzyl-Thioester **73** mit Benzylmercaptan (**85**) lieferte einen Umsatz von 87%. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich das thermodynamische Gleichgewicht bei etwa 13-17% Phenyl-Thioester **71** und 83-87% Benzyl-Thioester **73** einstellt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Transthoesterifizierung grundsätzlich möglich ist und intermediär auch dem Benzyl-Thioester **73** der Phenyl-Thioester **71** gebildet werden kann.

8.2.3 Aminolyse von Thioestern mit 7-Aminocephalosporansäure

Es wurde die zuvor durchgeführte Untersuchung^[258] zur Aminolyse der Phenoxy-Thioester mit 7-ACA (**70**) in verschiedenen Lösungsmittelsystemen fortgesetzt und um die

Kombination mit der Urea-katalysierten Transthoesterifizierung erweitert. Es stellte sich heraus, dass die Thioester in wasserhaltigen Systemen in Kombination mit langer Reaktionszeit (5 Tage) stark zur Hydrolyse tendieren. Auch in vermeintlich wasserfreien Systemen tritt die Hydrolyse auf, was vermutlich auf restliches Wasser in Lösungsmitteln und Basen zurückzuführen ist.

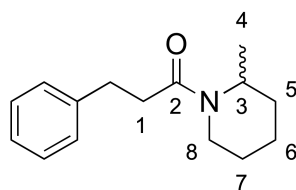
Mit 35% den größten Umsatz ausgehend vom Phenyl-Thioester **71** zu PMC (**72**), konnte in Dichlormethan/Isopropanol (3:1) erhalten werden. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur führte nicht zu einer Produktbildung, stattdessen wurde eine Reihe nicht identifizierbarer Signale gefunden. In diesem Lösungsmittelsystem findet auch mit dem Benzyl-Thioester **73** geringer Umsatz (6%) statt. Ein *Proof-of-Concept* für die erfolgreiche Transthoesterifizierung konnte in Acetonitril/Wasser (3:1) erbracht werden. Auch in Dichlormethan/Isopropanol (3:1) wurde bei der Transthoesterifizierung ein geringer Umsatz erhalten, allerdings ist dieser vermutlich auf die direkte Aminolyse des Benzyl-Thioesters **73** zurückzuführen.

Als Substrat kommt nur der Benzyl-Thioester **73** in Frage, da er als einziger enzymatisch hergestellt werden kann. Durch die direkte Aminolyse von Phenyl-Thioester **71** wurde zwar der bisher höchste Umsatz zu PMC (**72**) erhalten, jedoch konnte dieser nicht in der gleichen Größenordnung auch über die Transthoesterifizierung aus Benzyl-Thioester **73** erreicht werden. Das beste Ergebnis ausgehend vom Benzyl-Thioester **73** liefert die direkte Aminolyse in Dichlormethan/Isopropanol (3:1) mit lediglich 6% Umsatz.

8.3 Experimenteller Teil

8.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift 13 (AAV13): Synthese von Amidien und Thioestern mit T3P[®]

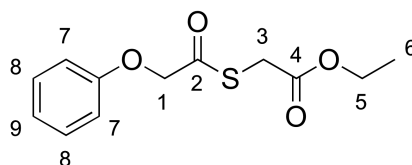
Die Carbonsäure (1 Äq.) und das Amin (1 Äq.) wurden in EtOAc (5 mL mmol⁻¹) gelöst und Triethylamin (3 Äq.) zugegeben. Die Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt und T3P[®]-Lösung in EtOAc (50 % w/w, 1.2 Äq.) binnen 5 min zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde eine Stunde bei Eiskühlung und anschließend zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit 1 M NaOH (2 mL mL⁻¹ EtOAc) und gesättigter NaCl-Lsg. (2 mL mL⁻¹ EtOAc) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

8.3.1.1 Synthese von *rac*-2-Methyl-*N*-phenoxyacetyl-piperidin (**77**)**77**
 $C_{14}H_{19}NO_2$
 233.31 g mol⁻¹

Die Synthese erfolgte analog zur AAV13 mit Phenoxyessigsäure (**81**, 0.913 g, 6 mmol) und *rac*-2-Methylpiperidin (**75**, 0.705 mL, 6 mmol). *rac*-2-Methyl-*N*-phenoxyacetyl-piperidin (**77**, 1.081 g, 4.6 mmol, 77 %) wurde als orange-gelbe, ölige Flüssigkeit erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ (ppm) = 1.15 (3H, s, H-**C4**_{E/Z}), 1.28 (3H, s, H-**C4**_{E/Z}), 1.41 (2H, s, H-**C6**_{E/Z}), 1.50 - 1.73 (10H, m, H-**C5**_{E+Z}/**C5**_{E/Z}/**C7**_{E+Z}), 2.69 - 2.81, 3.10 - 3.22, 3.70 - 3.82, 4.20 - 4.33, 4.40 - 4.51 (5H, m, H-**C3**_{E/Z}/**C8**_{E+Z}), 4.67 (4H, s, H-**C1**_{E+Z}), 4.79 - 4.92 (1H, m, H-**C3**_{E/Z}), 6.92 - 7.01 (5H, m, H-aromat.), 7.24 - 7.31 (5H, m, H-aromat.).

MS (ESI): *m/z* = 234.1 [M+H]⁺, 256.1 [M+Na]⁺, 489.3 [2M+Na]⁺.

8.3.1.2 Synthese von *S*-Phenoxyacetylmercaptoessigsäureethylester (**82**)**82**
 $C_{12}H_{14}O_4S$
 254.30 g mol⁻¹

Die Synthese erfolgte analog zur AAV13 mit Phenoxyessigsäure (**81**, 0.913 g, 6 mmol) und Mercaptoessigsäureethylester (**80**, 0.548 mL, 5 mmol). *S*-Phenoxyacetylmercaptoessigsäureethylester (**82**, 1.100 g, 4.3 mmol, 87 %) wurde als orange, ölige Flüssigkeit erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ (ppm) = 1.28 (3H, t, ³J = 7.1 Hz, H-**C6**), 4.20 (2H, q, ³J = 7.1 Hz, H-**C5**), 3.73 (2H, s, H-**C3**), 4.73 (2H, s, H-**C1**), 6.94 - 6.96 (2H, m, H-**C7**), 7.02 - 7.05 (1H, m, H-**C8**), 7.30 - 7.34 (2H, m, H-**C9**).

8.3.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift 14 (AAV14): Aminolyse von Thioestern

Der Thioester (0.1 mmol, 1 Äq.) und das Piperidin-Derivat (0.2 mmol, 2 Äq.) wurden in 0.5 mL organischem Solvens gelöst und die angegebene Zeit bei entsprechender Temperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Produkt mittels $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 untersucht.

8.3.2.1 Screening sekundärer Amine

Analog zur AAV14 wurde *S*-Benzyl-2-phenoxyethanthioat (**73**, 25.8 mg) mit 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin (**74**, 33.8 μL), *rac*-2-Methylpiperidin (**75**, 23.5 μL) oder Piperidin (**76**, 19.8 μL) in MTBE für 18 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Ergebnisse sind in Tab. **63** dargestellt.

Tab. 63: Screening sekundärer Amine in der Aminolyse von *S*-Butyl-2-phenoxyethanthioat (**73**).

Amin	Umsatz [%]
2,2,6,6-Tetramethylpiperidin (74)	0
<i>rac</i> -2-Methylpiperidin (75)	0
Piperidin (76)	> 95 %

8.3.2.2 Screening von Additiven

Analog zur AAV14 wurde *S*-Benzyl-2-phenoxyethanthioat (**73**, 25.8 mg) mit *rac*-2-Methylpiperidin (**75**, 23.5 μL) in MTBE für 18 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Als Additive kamen Triethylamin (20.9 μL , 0.15 mmol, 1.5 Äq.), Benzoesäure (2.4 mg, 0.02 mmol, 0.2 Äq.), Amberlyst 15 (100 mg) oder Scandiumtriflat (9.8 mg, 0.02 mmol, 0.2 Äq.) zum Einsatz. Es konnte kein Umsatz festgestellt werden.

8.3.2.3 Lösungsmittelscreening

Analog zur AAV14 wurde *S*-Benzyl-2-phenoxyethanthioat (**73**, 25.8 mg) mit *rac*-2-Methylpiperidin (**75**, 23.5 μL) in MeOH, EtOAc, *n*-Heptan, Aceton, THF, ACN, DMSO oder CHCl_3 für 18 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Es konnte kein Umsatz festgestellt werden.

8.3.2.4 Einfluss der Temperatur

Analog zur AAV14 wurde *S*-Benzyl-2-phenoxyethanthioat (**73**, 25.8 mg) mit *rac*-2-Methylpiperidin (**75**, 23.5 μL , 0.2 mmol, 2 Äq.) in MTBE oder *n*-Heptan gelöst. Abweichend

von der AAV14 wurden für einen Versuch ohne Lösungsmittel 100 Äq. *rac*-2-Methylpiperidin (**75**) eingesetzt. Die Reaktionen wurden 4 h zum Sieden erhitzt. Die Ergebnisse sind in Tab. 64 dargestellt.

Tab. 64: Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Aminolyse von *S*-Benzyl-2-phenoxyethanthioat (**73**).

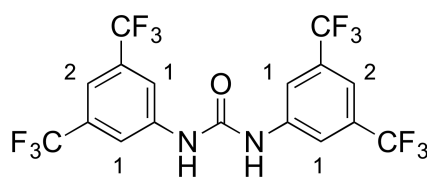
Solvens	Temperatur [°C]	Umsatz [%]
MTBE	55	0
n-Heptan	98	0
-	120	> 95 % ^a

^a Gesamtumsatz, davon ca. 23 % produktbezogen, Rest ist unbekanntes Nebenprodukt

8.3.3 Aminolyse von *S*-Phenoxyacetylmercaptoessigsäureethylester (**82**)

Analog zur AAV14 wurde *S*-Phenoxyacetylmercaptoessigsäureethylester (**82**, 25.4 mg) mit *rac*-2-Methylpiperidin (**75**, 23.5 µL) in MTBE für 18 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Es konnte kein Umsatz festgestellt werden.

8.3.4 Synthese von 1,3-Bis(3,5-bis(trifluormethyl)phenyl)harnstoff (**83**)



83

$C_{17}H_8F_{12}N_2O$
484.24 g mol⁻¹

Die Synthese erfolgte analog zu einer Vorschrift von PROCURANTI^[265]. 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI, 1.00 g, 6.17 mmol, 1 eq) wurde in 4 mL CH₂Cl₂ suspendiert. Unter Argon wurde 3,5-Bi(trifluormethyl)anilin (2.87 g, 12.96 mmol, 2.1 eq) in 2 mL CH₂Cl₂ zugegeben und die Reaktionsmischung 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Feststoff wurde unter vermindertem Druck filtriert und wurde sukzessive mit CH₂Cl₂ (10 mL), 0.1 M HCl (3 x 10 mL), gesättigter NaHCO₃-Lösung (3 x 10 mL) und Wasser (10 mL) gewaschen und kurz im Hochvakuum getrocknet. Es wurde 1,3-Bis(3,5-bis(trifluormethyl)phenyl)harnstoff (**83**, 2.00 g, 4.13 mmol, 67%) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.53 (s, 2H, H-C₂), 7.90 (s, 4H, H-C₁), 8.67 (bs, 2H, NH).

8.3.5 Aminolyse von Thioestern mit 7-ACA

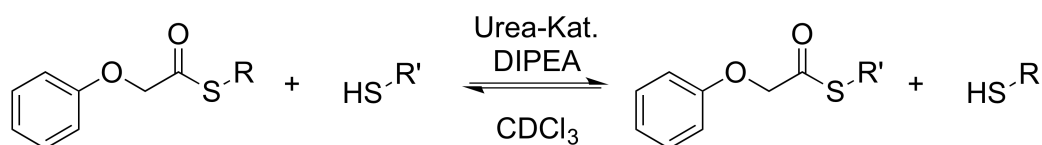
7-Aminocephalosporansäure (**70**, 27.2 mg, 0.1 mmol, 1 Äq.) und der Thioester (0.105 mmol, 1.05 Äq.) wurden in organischem Solvens suspendiert und Triethylamin (27.9 µL, 0.2 mmol, 2 Äq.) hinzugegeben. Es wurde fünf Tage gerührt, das organische Solvens bei vermindertem Druck entfernt und der Rückstand NMR-spektroskopisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 65 dargestellt.

Tab. 65: Ergebnisse der Aminolyse verschiedener Thioester mit 7-ACA (**70**).

Eintrag	Thioester	Solvens	Temperatur [°C]	Umsatz zu PMC (72) [%] ^a	Umsatz zu PhOAc (81) [%] ^b
1	Ph (71)	ACN/D ₂ O (3:1)	RT	6	77
2	Bz (73)	ACN/D ₂ O (3:1)	RT	0	32
3	Ph (71)	DCM/IPA/D ₂ O (75:23:2)	RT	0	30
4 ^c	Ph (71)	DCM/IPA (3:1)	RT	25	14
5	Ph (71)	DCM/IPA (3:1)	40	0	n.b. ^d
6	Bz (73)	DCM/IPA (3:1)	RT	6	12

^a Zur Bestimmung wurde das ¹H-NMR-Signal (in d₆-DMSO) des α-Protons des Phenoxyacetyl-Rests des Thioesters (Phenyl-Thioester **71**: 5.04 ppm, Benzyl-Thioester **73**: 4.94 ppm) mit dem des Protons am chiralen C7 des PMC (Phenoxymethylcephalosporin, 5.74 ppm) verglichen. ^b analog wurde mit den Methylen-Protonen des Phenoxyessigsäure (**81**, 4.66 ppm) verglichen. ^c wurde analog zur PMC-Synthese aufgearbeitet (siehe Masterarbeit). Es wurde PMC (**72**), verunreinigt mit 38 mol% **81** erhalten. ^d sehr viele, nicht identifizierbare Signale.

8.3.6 Harnstoff-katalysierte Transthoesterifizierung



Der Phenoxyacetyl-Thioester (0.3 mmol, 1 Äq.) und das Thiol (0.3 mmol, 1 Äq.) wurden in 1 mL CDCl₃ gelöst. 1,3-Bis(3,5-bis(trifluormethyl)phenyl)harnstoff (**83**, 7.26 mg,

0.015 mmol, 5 mol%) und Diisopropylethylamin (DIPEA, 10.2 μ L, 0.06 mmol, 20 mol%) wurden hinzugegeben und die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 50 μ L entnommen, mit 650 μ L CDCl₃ verdünnt und NMR-spektroskopisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 66 dargestellt.

Tab. 66: Thioester-Verhältnisse nach der Transesterifizierung.

Eintrag	Substrat	Thiol	Zeit [h]	Umsatz zum Ph-Thioester (71) [%] ^a	Umsatz zum Bz-Thioester (73) [%] ^a
1	Bz (73)	Ph (84)	24	17	83
2	Ph (71)	Bz (85)	24	13	87
3	Ph (71)	Bz (85)	72	14	86

^a entspricht dem Verhältnis der α -Protonen der Phenoxyacetyl-Reste der beiden Thioester

8.3.7 Aminolyse von Thioestern mit 7-ACA über Harnstoff-katalysierte Transthoesterifizierung

7-Aminocephalosporansäure (**70**, 27.2 mg, 0.1 mmol, 1 Äq.), S-Benzyl-2-phenoxyethanthioat (**73**, 0.105 mmol, 1.05 Äq.), Triethylamin (27.9 μ L, 0.2 mmol, 2 Äq.), Thiophenol (**84**, 10.2 μ L, 0.1 mmol, 1 Äq.), 1,3-Bis(3,5-bis(trifluormethyl)phenyl)harnstoff (**83**, 2.4 mg, 0.005 mmol, 5 mol%) und DIPEA (3.4 μ L, 0.02 mmol, 20 mol%) wurden in organischem Solvens gelöst. Es wurde fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt, das organische Solvens bei vermindertem Druck entfernt und der Rückstand NMR-spektroskopisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 67 dargestellt.

Tab. 67: Ergebnisse der Aminolyse von S-Phenyl-2-phenoxyethanthioat (**71**) mit 7-ACA (**70**) über Urea-katalysierte Transthoesterifizierung von S-Benzyl-2-phenoxyethanthioat (**73**).

Solvens	Umsatz zu PMC (72) [%] ^a	Umsatz zum Ph-Thioester (71) [%] ^a	Umsatz zu PhOAc (81) [%] ^b
ACN/D ₂ O (3:1)	2	8	43
DCM/IPA (3:1)	4	4	30

^a Zur Bestimmung wurde das ¹H-NMR-Signal (in d₆-DMSO) des α -Protons des Phenoxyacetyl-Rests des Thioesters (Phenyl-Thioester **71**: 5.04 ppm, Benzyl-Thioester **73**: 4.94 ppm) mit dem des Protons am chiralen C7 des PMC (**72**, 5.74 ppm) verglichen. ^b analog wurde mit den Methylen-Protonen des Phenoxyessigsäure (**81**, 4.66 ppm) verglichen.

9 Anhang - Gen- und Proteinsequenzen

9.1 En-Reduktasen

NfsA: Nitroreduktase aus *E. coli* K12 (723 bp)

ATGACGCCAACCATTTGAACTTATTTGTGGCCATCGCTCCATTCGCCATTTCACTGATGAACCCATTTCCG
AAGCGCAGCGTGAGGCGATTATTAACAGCGCCCGTGCGACGTCCAGTTCAGTTTTTTTGCAGTGCAGTAG
CATTATTCGCATTACCGACAAAAGCGTTACGTGAAGAACTGGTGACGCTGACCGGCGGGCAAAAACACGTA
GCGCAAGCGGCGGAGTTCTGGGTGTTCTGTGCCGACTTTAACCGCCATTTACAGATCTGTCCGGATGCTC
AGCTCGGCCTGGCGGAACAACACTGTTGCTCGGTGTCGTTGATACGGCAATGATGGCGCAGAATGCATTAAT
CGCAGCGGAATCGCTGGGATTGGGCGGGGTATATATCGGCGGCCGTCGCAATAATATTGAAGCGGTGACG
AAACTGCTTAAATACCGCAGCATGTTCTGCCGCTGTTGGGCTGTGCCCTGGCTGGCCTGCGGATAATC
CGGATCTTAAGCCGCTTTACCGGCCATTTTGGTGCATGAAAACAGCTATCAACCGCTGGATAAAGG
CGACTGGCGCAGTATGACGAGCAACTGGCGGAATATTACCTCACCCGTGGCAGCAATAATCGCCGGGAT
ACCTGGAGCGATCATATCCGCCGAACAATCATTAAGAAAAGCCGCCATTTATCTGGATTATTTGCACA
AACAGGGTTGGGCGACGCGCTAA

Uniprot: P17117, 240 AS, 26.80 kDa

MTPTIELICGHR SIRHFTDEPISEAQREAIINSARATSSSSFLQCSSIIRITDKALREELVTLTGQKHV
AQAAEFWVFCADFNRLHQICPDAQGLGLAEQLLLGVVDTAMMAQNALIAAESLGLGGVYIGGLRNNIEAVT
KLLKLPQHVLPFLGLCLGWPADNPDLPRLPASILVHENSYQPLDKGALAQYDEQLAEYYLTRGSNNRRD
TWSDHIRRTI IKESRPFILDY LHKQGWATR

NfsB: Nitroreduktase aus *E. coli* K12 (654 bp)

ATGGATATCATTTCTGTGCGCTTAAAGCGTCATTCCACTAAGGCATTTGATGCCAGCAAAAACTTACCC
CGGAACAGGCCGAGCAGATCAAAAACGCTACTGCAATACAGCCCATCCAGCACCAACTCCCAGCCGTGGCA
TTTTATTGTTGCCAGCACGGAAGAAGGTAAAGCGCGTGTGCCAAATCCGCTGCCGGTAATTACGTGTTT
AACGAGCGTAAAATGCTTGATGCCTCGCACGTCGTGGTGTCTGTGCAAAAACCGCGATGGACGATGTCT
GGCTGAAGCTGGTGTGACCAGGAAGATGCCGATGGCCGCTTTGCCACGCCGGAAGCGAAAGCCGCGAA
CGATAAAGGTCGCAAGTCTTCGCTGATATGCACCGTAAAGATCTGCATGATGATGCAGAGTGGATGGCA
AAACAGGTTTATCTCAACGTCGGTAACTTCTGCTCGGCGTGGCGGCTCTGGGTCTGGACGCGGTACCCA
TCGAAGGTTTTGACGCCCATCCTCGATGCAGAATTTGGTCTGAAAGAGAAAGGCTACACCAGTCTGGT
GGTTGTTCCGGTAGGTCATCACAGCGTTGAAGATTTTAACGCTACGCTGCCGAAATCTCGTCTGCCGCA
AACATCACCTTAACCGAAGTGTA

Uniprot: P38489, 240 AS, 23.91 kDa

MDIISVALKRHSTKAFDASKKLTPEQAEQIKTLLQYSPSSSTNSQPWHFIVASTEEGKARVAKSAAGNYVF
NERKMLDASHVVVCAKTAMDDVWLKLVVDQEDADGRFATPEAKAANDKGRKFFADMHRKDLHDDAEWMA
KQVYLNNGNFFLLGVAALGLDAVPIEGFDAAILD AEFGLKEKGYTSLVVVPVGHHSVEDFNATLPKSRLPQ
NITLTEV

ECNemA: Enoatreduktase aus *E. coli* K12 (1.098 bp)

ATGTCATCTGAAAAACTGTATTCCCCACTGAAAGTGGGCGCGATCACGGCGGCAAACCGTATTTTTATGG
CACCGCTGACGCGTCTGCGCAGTATTGAACCGGGTGACATTCCTACCCCGTTGATGGCGGAATACTATCG
CCAACGTGCCAGTGCCGTTTGTATTATTAGTGAAGCCACGCAAATTTCTGCCAGGCAAAAGGATATGCA
GGTGCGCCTGGCATCCATAGTCCGGAGCAAATGCCCGCATGGAAAAAATCACCGCTGGCGTTCATGCTG
AAAATGGTTCATATGGCCGTGCAGCTGTGGCACACCGGACGCATTTCTCACGCCAGCCTGCAACCTGGCGG
TCAGGCACCGGTAGCGCCTTCAGCACTTAGCGCGGGAACACGTACTTCTCTGCGCGATGAAAATGGTCAG
GCGATCCGTGTTGAAAACATCCATGCCGCGTGGCCTTGAACCTGGAAGAGATTCCAGGTATCGTCAATGATT
TCCGTACAGGCCATTGCTAACGCGCGTGAAGCCGTTTTTGTATCTGGTAGAGCTCCACTCTGCTCACGGTTA
TTTTGCTGCATCAGTTCTTTCTCTTCTTCAAACCATCGTACCGATCAGTACGGCGGCAGCGTGGAAAAT
CGCGCACGCTGGTACTGGAAGTGGTCGATGCCGGGATTGAAGAATGGGGTGCCGATCGCATTTGGCATT

CGGTTTCGCCAATCGGTACTTTCCAGAACACGGATAACGGCCCGAATGAAGAAGCCGATGCACTGTATCT
 GATTGAACAACACTGGGTAAACCGCGCATGCTTATCTGCATATGTCAGAACCAGATTGGGCGGGGGGTGAA
 CCGTATACTGATGCGTTCCGCGAAAAAGTACGCGCCCGTTTCCACGGTCCGATTATCGGGCGCAGGTGCAT
 ACACAGTAGAAAAAGCTGAAACGCTGATCGGCAAAGGGTTAATTGATGCGGTGGCATTGGTTCGTGACTG
 GATTGCGAACCCGGATCTGGTCGCCCCGTTGCAGCGCAAAGCTGAGCTTAACCCACAGCGTGCCGAAAGT
 TTCTACGGTGGCGGCGCGGAAGGCTATACCGATTACCCGACGTTGTAA

Uniprot: P77258, 366 AS, 39.52 kDa

MSSEKLYSPLKVGAITAANRIFMAPLTRLRSEIEPGDIPTPLMAEYRQRASAGLI I SEATQISAQAKGYA
 GAPGIHSPEQIAAWKKITAGVHAENGHMAVQLWHTGRISHASLQPGGQAPVAPSALSAGTRTSLRDENGQ
 AIRVETSMFRALELEEIPGIVNDFRQAIANAREAGFDLVELHSAHGYLLHQFLSPSSNHRTDQYGGSVEN
 RARLVLEVVDAGIEEWGADRIGIRVSPIGTFQNTDNGPNEEADALYLIEQLGKRGIAYLHMSEPDWAGGE
 PYTDAFREKVRARFHPGPIIGAGAYTVEKAETLIGKGLIDAVAFGRDWIANPDLVARLQRKAELNPQRAES
 FYGGGAEGYTDYPTL

PPNemA: Enoat-Reduktase aus *Pseudomonas putida* KT2440 mit N-terminalem 6xHis-tag (1.098 bp)

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGAAACTCT
 TGCAACCGCTGCAAATCGGCCCACTCACCTGCCCCAACCGCGTATTCATGGCCCCCTCACCCGCTGCG
 CAGCCTGGAGCCGGGTGATGTACCCACCGCGTGATGGCCGAGTACTACCGTCAGCGTGCCAGTGCTGGC
 CTGATCATCACTGAAGCCACACAAATCTCCTTCCAGGCCAAGGGCTATTCGGGCTCGCCCGGCATTACA
 GCGCCGAACAGATCGCTGCTGGAAGCACATCAACGAAGGCATCCATGCCGAGGGCGGCCACAGCGCCGT
 GCAGGTGTGGCACACCGGGCGTGTGTCGCATACCTCCCTGCAACCTGGCGGCAAGGCACCCGTGGCCCCCT
 TCGGCACTGCCGCGAGATGCACGCACCACCTGCGTGACGCGCAAGGCAACCTGACACGCGTGGAACCT
 CCGCCCCCGGGCGCTCAGCGAAGCGGAGATCGTGGCATCGTCGCCGACTTTGGCCAGGCCGCGATCAA
 TGCTGTGAAGCCGGCTTCGACTTCATCGAGTTGCACGCCGCCACGGTTACCTGCTGCACCAGTTCCTC
 ACCCCCAGTGCCAACAGCGCGAAGACCGCTACGGCGGCAGCGTTGAAAACCGTGCGCGCATTGTGCTGG
 AGGCGGTGGATGCGGCCATTGCCAACTGGAGCGCCGACCGGGTTCGGTATTCGCGTGTTCCTGTTGGGTGG
 TTTCAATGGTGTGGACAATGGCGAAGACCAGGAGGCCGCCGGCCTGTACCTGATCCGCGAACTGGCCAAG
 CGCAACCTCGCTACCTGCACCTGTCCGAGCCGGACTGGGCGGTGGCAAGCCACTGCGTGACGAGTTC
 GCCAGGCCATTGCGCCGCTACCCCGGGGTGATCATCGCGCCGGTGCCTATACCGCCGAGAAAGGCGA
 AGACCTCATCGGGCGGGTTTGATCGATGCCGTGGCGTTCGGGCGCGCTACATTGCCAACCCTGACCTG
 GTGGAGCGTTCGCGCTGCAAGCGCCGCTGAATGAGCACCGGGCGAAGTTCGATTACGCCAATGGGCTG
 AAGGGTATACGGATTATCCGTTCTGAAGCAGGCTTAA

basierend auf Uniprot: Q88129, 365 AS, 39.42 kDa

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMKLLQPLQIGPLTLNPRVFMAPLTRLRSLIEPGDVPTALMAEYRQRASAG
 LIITEATQISFQAKGYSGSPGIHSAEQIAAWKHINEGIHAEGGHSVAVQVWHTGRVSHTSLQPGGKAPVAP
 SALPADARTTLRDAQNLTRVETSAPRALSEAEIAGIVADFGQAAINACEAGFDFIELHAAHGYLLHQFL
 TPSANQREDRYGGSVENRARIIVLEAVDAAIANWSADRVGIRVFPPLGGFNGVDNGEDQEAAGLYLIRELAK
 RNLAYLHLSEPDWAGGKPLRDEFRQAIRAAYPGVIAAGAYTAEKGEDLIGRGLIDAVAFGRAYIANPDL
 VERLRLQAPLNEHRAKFDYANGPEGYTDYPFLKQA

AAOYE: OYE aus *Acetobacter aceti* NBRC 14818 mit C-terminalem 6xHis-tag (1.098 bp)

ATGGCCAGCCTGTTTGAGCCGATTGAACTGGGAAGCATTTACGCCAAAAACAGAATTCTCATGGCGCCAC
 TGACACGCGCCCGTGGCACCCGTGAGCATGTGCCACCCCATCATGGCCGAATATTACGCCAACGGGC
 CGGAGCCGGTCTGATCATCTCGGAAGCAACCGGTATCAGCCCGAAGGTCTTGGCTGGCCGTATGCGCCG
 GGCCTGTGGTTCGAGGAACAGGTGGAAGCCTGGAAGCCATCACTGCCGAGTTCACGCCAAGGGCGGAA
 AGATCGTGGCCAGCTCTGGCACATGGGGCGGATGGTGCATTCAGCGTGACGGGCCAGCAGCCTGTGTC
 CTGCTCGGCGACAAAAGCGCCTGAAGCCCTCCATACGTATGACGGCAAGCAGGCTCCCGAAGTCGCCCCG
 CCTCTCACCAAAGAGGATATTGCCCGTATCCTGAACGACTACGAAAATGCCGCCGCAATGCCCTCAGG
 CAGGCTTTGACGGTGTGCAGATTTCATGCCGCCAACGGTTATCTGATCGACGAATTCCTACGTGACGGCAC
 CAATCATCGTTCCGATGAATATGGCGGTTCGCCGAAAACCGCATCCGCTTCCTGCGTGAAGTCACGGAG
 CGCGTATCGCGACGATCGGCGCGGACAAAACGTCAGTACGGCTGTCCCCAATGGCGATACGCAGGGCT
 GCATCGACAGCCATCCCGAGCAGGTTTTTGTGCCAGCCGCAAAGCTGCTGAACGACCTCGATATCGCCTT
 CCTAGAAGTGGCGAGCCCGGACCAAATGGCACGTTCCGCCAAGACCGATCAGCCCAAGCTGCACGGCCCC

ATCCGCAAGGTTTTTCAGGAAGCCACTGGTTCTGAATCAGGACTACACACGGGAAGAAGCGATCGAGACAG
 TCGCAACCCGGTGTTCGCGGACGCCATTGCGTTTTGGTCGGCCTTTCCTCGCCAATCCGGACCTCGTGCATCG
 TCTGGAAGACAATCTGCCCTGAACAAGGACGATATCCGCACCTGGTACTCGCAGGGCGCAGAAGGCTAT
 ACGGATTATCCACTCGCCAGCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

basierend auf Uniprot: A0A0D6MYY7, 365 AS, 40.35 kDa

MASLFEPFIELGSIYAKNRILMAPLTRARGTREHVPTPIMAEYYAQRAGAGLIISEATGISREGLGWPYAP
 GLWSQEQVEAWKPI TAAVHAKGGKIVAQLWHMGRMVHSSVTGQQPVSCSATKAPEALHTYDQKQAPEVAR
 PLTKEDIARILNDYENARNALQAGFDGVQIHAANGYLIDEFLRDGTNHRSEYGGSPENRIRFLREVTE
 RVIATIGADKTSVRLSPNGDTQGCIDSHPEQVFPAAKLLNLDLIAFLELREPGPNGTFGKTDQPKLHGP
 IRKVFVRKPLVLNQDYTREEAIEETVATGVADAI AFGRPFLANPDLVHRLEDNLP LNKDDIRTWYSQGAEGY
 TDYPLAQLLEHHHHHH

PPOYE: OYE aus *Pseudomonas putida* KT2440 mit N-terminalem 6xHis-tag (1.110 bp)

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGACCACGC
 TTTTCGATCCGATCAAACCTGGCGACCTGCAACTGCCCAACCGTATCATCATGGCCCCGCTCACCCGCTG
 CCGCGCCGATGAAGGCCGCTGCCAATGCGCTGATGGCCGAATACTACGTACAACGTGCCAGCGCCGGG
 CTGATCCTCAGCGAGGCGACTTCGGTCAGCCCCATGGGCGTCGGCTACCCAGATACCCCCGGCATCTGGA
 ACGATGAACAGGTACGTGGCTGGAACAACGTGACAAAGGCCGTGCATGCTGCGGGCGGTGCGATCTTCTT
 GCAGCTGTGGCACGTGGGTGCTATCTCCACCCCCAGCTATCTGAATGGCGAATTGCCTGTGGCCCCCAGC
 GCGATCCAGCCCAAGGGCCATGTGAGCCTGGTGCGCCACTGAGTGACTACCCTACCCCGCGGGCGCTGG
 AAACCGAAGAAATCAACGACATCGTCGAGGCCCTACCGCAGTGGCGCCGAAAATGCCAAGGCTGCCGGTTT
 CGATGGTGTGGAGATCCATGGCGCAACGGTTACCTGCTCGACCAGTTCTTGC AAAGCAGCACC AACCAG
 CGCACCGACCGTTACGGTGGCTCGCTGGAAAACCGCGCGCGCTGTTGCTGGAGGTGACCGATGCGGCCA
 TTGAAGTGTGGGGCGCGCAGCGCTAGGTGTGCACCTGGCACCGCGAGCCGACGCCACGACATGGGCGA
 CGCCGACCGCGCCGAGACCTTACCTATGTGGCCCGAGAGCTGGGCAAGCGCGGCATCGCCTTCATCTGC
 TCGCGGGAGCGGGAGGCCGACGACAGCATCGGGCCGCTGATCAAAGAGGCATTCGGTGGCCCCGTACATCG
 TCAACGAGCGGTTTCGACAAGGCCAGTGCCAATGCGGCCCTGGCCAGTGGCAAAGCGGATGCCGTGGCGTT
 TGGTGTGCCGTTTCATCGCCAACCCGACCTGCCGGCACGGCTGGCAGCGGATGCGCCGTTGAACGAGGCA
 CATCCCGAAACCTTCTATGGCAAGGGGCCGGTGGGTTACATCGATTATCCGCGGTTGTGA

basierend auf Uniprot: Q88K07, 369 AS, 39.97 kDa

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMTTLFDPIKLGDLQLPNRIIMAPLTRCRADEGRVPNALMAEYYVQRASAG
 LILSEATSVSPMGVGYPDTPGIWNDEQVRGWNNVTKAVHAAGGRIFLQLWHVGRISHPSYLNGLLPVAPS
 AIQPKGHVSLVRPLSDYPTPRALETEEINDIVEAYRSGAENAKAAGFDGVEIHGANGYLLDQFLQSSTNQ
 RTDRYGGSLNRLLEVTDAAEVWGAQRVGVHLAPRADAHMDGADRAETFTYVARELKGRIAFIC
 SREREADDSIGPLIKEAFGGPYIVNERFDKASANAALASGKADAVAFGVPIANPDLPARLAADAPLNEA
 HPETFYGKGPVGYIDYPRL

OYE2 aus *Saccharomyces cerevisiae* S288c (ATCC 204508) (1.209 bp)

ATGGGAATGCCATTTGTTAAGGACTTTAAGCCACAAGCTTTGGGTGACACCAACTTATTCAAACCAATCA
 AAATTGGTAACAATGAACTTCTACACCGTGCTGTCAATTCCTCCATTGACTAGAATGAGAGCCCAACATCC
 AGGTAATATTCAAAACAGAGACTGGGCCGTTGAATACTACGCTCAACGTGCTCAAAGACCAGGAACCTTG
 ATTATCACTGAAGGTACCTTTCCTCTCCACAATCTGGGGGTTACGACAATGCTCCAGGTATCTGGTCCG
 AAGAACAAATTAAGAATGGACCAAGATTTTCAAGGCTATTCATGAGAAGAAATCGTTTCGCATGGGTCCA
 ATTATGGGTTCTAGGTTGGGCTGCTTTCCAGACACCTTGCTAGGGATGGTTTTCGTTACGACTCCGCT
 TCTGACAACGTGTATATGAATGCAGAACAAGAAGAAAAGGCTAAGAAGGCTAACAACCCACAACACAGTA
 TAACAAAGGATGAAATTAAGCAATACGTCAAAGAATACGTCCAAGCTGCCAAAACCTCCATTGCTGCTGG
 TGCCGATGGTGTGAAATCCACAGCGCTAACGGTTACTTGTGTAACCAGTTCTTGGACCCACACTCCAAT
 AACAGAACCGATGAGTATGGTGGATCCATCGAAAACAGAGCCCGTTTTCACCTTGGAAAGTGGTTGATGCAG
 TTGTTCGATGCTATTGGCCCTGAAAAAGTCCGGTTTGAGATTGTCTCCATATGGTGTCTTCAACAGTATGTC
 TGGTGGTGTGTAACCGGTTATGTTGCTCAATATGCTTATGCTTAGGTGAAGTAAAGAGAGCTAAA
 GCTGGCAAGCGTTTGGCTTTCGTCATCTAGTTGAACCTCGTGTACCAACCCATTTTAACTGAAGGTG
 AAGGTGAATACAATGGAGGTAGCAACAAATTTGCTTATTCATCTGGAAGGGCCCAATTTATAGAGCTGG
 TAACTTTGCTCTGCACCCAGAAGTTGTCAGAGAAGAGGTGAAGGATCCTAGAACATTTGATCGGTTACGGT
 AGATTTTTTATCTCTAATCCAGATTTGGTTGATCGTTTGGAAAAAGGGTTACCATTAAACAAATATGACA

GAGACACTTTCTACAAAATGTCAGCTGAGGGATACATTGACTACCCCTACGTACGAAGAAGCTCTAAAAC
CGGTTGGGACAAAATTA

basierend auf Uniprot: Q03558, 402 AS, 45.20 kDa

MGMFPVKDFKQPQALGDTNLFKPIKIGNNELLHRAVIPPPLTRMRAQHPGNI PNRDWAWEYYAQRAPRPTL
IITEGTFPSPQSGGYDNAPGIWSEEQIKEWTKIFKAIHEKKSFAWVQLWVLGWAAPDPTLARDGLRYDSA
SDNVYMNAEQEEKAKKANNPQHSITKDEIKQYVKEYVQAAKNSIAAGADGVEIHSANGYLLNQFLDPHSN
NRTDEYGGSIENRARFTLEVVDVDAIGPEKVGLRLSPYGVFNMSGGAEITGIVAQYAYVLGELERRAK
AGKRLAFVHLVEPRVTNPFLETEGEYNGGSNKFAYSIWKGPIIRAGNFALHPEVVREEVKDPRTLIGYG
RFFISNPDLVDRLEKGLPLNKYDRDTFYKMSAEGYIDYPTYEEALKLGDKN

OYE3 aus *Saccharomyces cerevisiae* YJM470 mit N-terminalem 6xHis-tag (1.263 bp)

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCCATTTG
TAAAAGGTTTTGAGCCGATCTCCCTAAGAGACACAAACCTTTTTGAACCAATTAAGATTGGTAACACTCA
GCTGGCACATCGTGCAGTTATGCCCCATGACCAGAATGAGGGCCACTCACCCGGAAATATCCAAAT
AAGGAGTGGGCTGCTGATTATGTCAGCTGCTCAAAGACCTGGTACCATGATCATCAGGAAGGTA
CGTTTATTTCCCTCAAGCCGGCGCTATGACAACGCCCTGGGATTTGGTCTGATGAGCAGGTCGCTGA
GTGGAAGAATATCTTTTAGCCATCCATGATTGTCAGTCGTTTCGCGTGGGTACAACCTTTGGTCTTTAGGC
TGGGCATCCTTCCAGACGTATTGGCAAGAGACGGGTACGCTATGACTGTGCATCTGACAGAGTGTATA
TGAATGCTACGTTACAAGAAAAGGCCAAAGATGCGAATAATCTCGAACATAGTTTGACTAAAGACGACAT
TAAACAGTATATCAAGGATTACATCCATGCCGCTAAGAATCTATCGCGGCTGGCGCCGATGGTGTAGAA
ATTCATAGCGCAATGGGTAATGTTGAATCAGTCTTGGATCCACATCTAATAAGAGGACCGACGAAT
ACGGCGGAACGATCGAAAACAGGGCCGCTTTACACTGGAGGTTGTCGATGCTCTTATCGAAACTATCGG
TCCTGAACGGGTGGGTTTGAGGTTGTCGCCATACGGCACTTTTAAACAGTATGCTCTGGAGGTGCTGAACCA
GGTATTATCGCTCAATATGCTTATGCTTGGGTGAATTAGAGAAGAGGGCAAAGGCTGGTAAGCGTTTGG
CCTTTGTGCACCTTGTGTAACCACGTGTCACGGACCCATCGTTGGTGGAGGGCGAAGGAGAATATCCGA
GGGTACTAACGATTTTGCCTACTCTATATGGAAGGGTTCAATCATCAGAGCTGGTAATTACGCTCTTCAT
CCAGAAGTGGTTAGAGAACAAGTAAAGGATCCAGAACCTTGATAGGCTATGGTAGATTCTTCATCTCCA
ACCCAGATTTAGTCTACCGTTTAGAAGAGGGCCGTCATGAAACAAGTATGACAGAAGTACCTTCTACAC
CATGTCCGCGAAGGTTATACCGACTACCCAACATATGAAGAGGCAGTAGATTTAGGTTGGAACAAGAAC
TAA

basierend auf Uniprot: P41816, 420 AS, 47.06 kDa

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMPFVKGFEPISLRDNLFEPIKIGNTQLAHRAVMPPLTRMRATHPGNIPN
KEWAAVYYGQRAQRPTMIITEGTFISPQAGYDNAPGIWSDEQVAEWKNI FLAIHDCQSFAWVQLWSLG
WASFPDVLARDGLRYDCASDRVYMNATLQEKAKDANNLEHSLTKDDIKQYIKDYIHAANKNSIAAGADGVE
IHSANGYLLNQFLDPHSNKRTDEYGGTIENRARFTLEVVDALIEITIGPERVGLRLSPYGTFNMSGGAE
P GIIAQYAYVLGELEKRAKAGKRLAFVHLVEPRVTDPSLVEGEGEYSEGTNDFAYS IWKGSII RAGNYALH
PEVVREQVKDPRTLIGYGRFFISNPDLVYRLEEGLPLNKYDRSTFYTMSAEGYTDYPTYEEAVDLGWNKN

KYE1 aus *Kluyveromyces lactis* ATCC 8585 (1.197 bp)

ATGTCGTTTATGAACTTTGAACCAAAGCCATTGGCTGATACTGATATCTTCAAACCAATCAAGATTGGTA
ACACTGAATTGAAGCACAGGGTTGTCATGCCTGCATTGACAAGAATGAGAGCGTTGCATCCAGGCAACGT
TCCAAACCCTGACTGGGCTGTTGAATATTACAGACAACGTTCCCAATATCCAGGTACTATGATTATCACT
GAAGGTGCTTTCCATCAGTCTAGTCTAGGTTACGATAACGCACCAGGTGTTTGGAGCGAAGAACAAC
TGGCTCAATGGAGAAAGATCTTCAAGGCAATTCAGACAACAAGTCTTTTGTGGGTACAATTGTGGGT
TCTAGGTAGACAAGCTTTTGTGATAACTTGGCAAGAGATGGATTGCGTTATGATAGTGTCTCCGATGAA
GTGTACATGGGTGAAGATGAAAAGGAACGTGCCATCAGATCTAACAACCCCTCAGCATGGTATCACCAGG
ATGAAATTAAGCAGTATATCAGGGACTATGTTGATGCTGCTAAGAAGTGTATCGATGCTGGTGCAGATGG
TGTTGAAATCCATTCCGCTAACGGTTATTTGTTGAATCAATTCCTAGACCCAATCTCCAACAAAAGAACT
GATGAATACGGTGGATCCATTGAGAACCGTGTAGATTGCTCTTGGAAAGTGTGATGCGGTTGTGATG
CCGTTGGTGGCGAAAAGAACAGTATCAGATTCTCACCATAACGGTGTATTTGGTACCATGTCAGGTGTTT
AGACCCTGTCTTGGTGGCTCAATTCGCCATATGACTTGTGTAATTGAAAAGAGGGCAAAGGCTGGTAAG
AGATTAGCATACGTCGATTTAGTCGAACCTCGTGTACATCGCCATTTCAACCGGAATTTGAAGGCTGGT
ATAAAGGTGGTACCAATGAATTCGTATACTCTGTTTGGAAAGGTAACGTGCTAAGAGTTGGTAACCTACGC
TTTGGACCCAGATGCTGCCATTACGGACTCAAAGAATCCAAACACTTTGATCGGTTACGGTAGAGCCTTC

ATTGCCAACCCAGATCTTGTGTAACGTCTCGAAAAGGGTTTGCATTGAATCAATACGATAGACCCCTCTT
TCTACAAAATGTCTGCGGAAGGGTATATCGACTACCCAACATACGAGGAAGCTGTTGCCAAGGGTTACAA
GAAATAG

Uniprot: P40952, 398 AS, 44.82 kDa

MSFMNFEPKPLADTDIFKPIKIGNTELKHRVMPALTRMRALHPGNVNPNDWAVEYYRQRSQYPGTMIIT
EGAFPSAQSGGYDNAPGVWSEEQLAQWRKIFKAIHDNKSFWVWQLWVLGRQAFADNLARDGLRYSASDE
VYMGEDEKERAIRSNNPQHGITKDEIKQYIRDYVDAKKCIDAGADGVEIHSANGYLLNQFLDPI SNKRT
DEYGGSIENRARFVLEVVDVAVDAVGAERTSIRFSPYGVFGTMSGVSDPVLVAQFAYVLAELEKRAKAGK
RLAYVDLVEPRVTSFQPEFEGWYKGGTNEFVYSVWKGNVLRVGNALDPDAAITDSKNPNTLIGYGRAF
IANPDLVERLEKGLPLNQYDRPSFYKMSAEGYIDYPTYEEAVAKGYKK

YqjM aus *Bacillus subtilis* (strain 168) (1017 bp)

ATGGCCAGAAAAATTATTTACACCTATTACAATTAAGATATGACGTTAAAAAACCGCATTGTTCATGTCGC
CAATGTGCATGTATTCTTCTCATGAAAAGGACGAAAAATTAACACCGTCCACATGGCACATTACATATC
GCGCGCAATCGGCCAGGTCGGACTGATTATTGTAGAGGCGTCAGCGGTTAACCCCTCAAGGACGAATCACT
GACCAAGACTTAGGCATTTGGAGCGACGAGCATAATTGAAGGCTTTGCAAACTGACTGAGCAGGTCAAAG
AACAAGGTTCAAAAAATCGGCATTCAGCTTGCCCATGCCGGACGTAAAGCTGAGCTTGAAGGAGATATCTT
CGCTCCATCGGCGATTGCGTTTTCAGCAACAATCAGCAACACCTGTAGAAATGTCAGCAGAAAAAGTAAAA
GAAACGGTCCAGGAGTTCAAGCAAGCGGCTGCCCGCGAAAAGAAGCCGGCTTTGATGTGATTGAAATTC
ATGCGGCGCACGGATATTTAATTCATGAATTTTTGTCTCCGCTTTCCAACCATCGAACAGATGAATATGG
CGGCTCACCTGAAAACCGCTATCGTTTCTTGAGAGAGATCATTTGATGAAGTCAAACAAGTATGGGACGGT
CCTTTATTTGTCCGTGTATCTGCTTCTGACTACACTGATAAAGGCTTAGACATTGCCGATCACATCGGTT
TTGCAAAATGGATGAAGGAGCAGGTTGTTGACTTAATTGACTGCAGCTCAGGCGCCCTTGTTCACGCAGA
CATTAACTGATTCCCTGGCTATCAGGTCAGCTTCGCTGAGAAAATCCGTGAACAGGCGGACATGGCTACT
GGTGCCGTCGGCATGATTACAGACGGTTCAATGGCTGAAGAAATCTGCAAAACGGACGTGCCGACCTCA
TCTTTATCGGCAGAGAGCTTTTTCGGGATCCATTTTTTTCGAAGAAGCTGCTGCGAAACAGCTCAATACAGA
GATTCCGGCCCTGTTCAATACGAAAAGAGGCTGGTAA

Uniprot: P54550, 338 AS, 37.59 kDa

MARKLFTPIITIKDMLKNRIVMSPMCMYSSHEKDGKLTTPFHMAHYISRAIGQVGLIIVEASAVNPQGRIT
DQDLGIWSDEHIEGFAKLTEQVKEQGSKIGIQLAHAGRKAIELEGDIFAPSAIAFDEQSATPVEMSAEKVK
ETVQEFKQAAARAKEAGFDVIEIHAAHGYLIHEFLSPLSNHRTDEYGGSPENRYRFLREIIDEVKQVWDG
PLFVRVSASDYTDKGLDIADHIGFAKWMKEQGVLDICSSGALVHADINVFPGYQVSFAEKIREQADMAT
GAVGMITDGSMAEELIQNGRADLIFIGRELLRDPFFARTAAKQLNTEIPAPVQYERGW

GoxER: Enoat-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* (1086 bp)

ATGCCAACCCCTGTTTCGATCCCATTTGATTTTCGGTCCCATTCACGCGAAAAACCGGATCGTGATGTCCCCGC
TGACGCGCGGACGTGCTGACAAGGAGGCGGTTCCGACCCCATCATGGCGGAATACACTACGCCAGCGCGC
CAGTGCCGGGCTGATCATCACGGAAGCCACGGGTATCTCCCGCAAGGCTCTGGGCTGGCCGTTTCGCACCG
GGAATCTGGTCCGATGCGCAGGTCGAAGCCTGGAAGCCGATCGTGGCCGGTGTGCATGCAAAGGGCGGAA
AGATCGTCTGCCAGCTCTGGCACATGGGCCGATGGTCCACTCGTCCGTGACCGGAACGCAGCCCCGTCTC
GTCCTCCGCCACCACGGCCCCCGGCGAGGTCCATACCTATGAAGGCAAGAAGCCGTTTCGAGCAGGCCCGC
GCAATCGATGCCCGGATATCAGCCGTATTCTGAACGACTATGAGAACGCCGCCCGCAATGCGATCCGCG
CCGGCTTCGACGGGGTGCAGATCCACGCCCAATGGCTACCTCATCGACGAGTTCTTGCGAAACGGTAC
GAATCACCGCACAGATGAATACGGCGGCTCCCCGAAAACCGCATCCGTTTCTTGAAGGAAGTCCACCGAG
CGCGTGATCGCTGCCATCGGTGCGACCGCACAGGCGTGCGCCGTGCCCCAACGGCGATACGCAGGGCT
GCATCGACAGCGCACCTGAGACGGTCTTTGTCCCGGCGGCAAGCTGCTTTCAGGATCTGGGCGTGGCCTG
GCTCGAACTGCGCGAACCCGGCCCCGAACGGCACCTTCGGCAAGACGGACCGCCAAACTGTCCCCGCGAG
ATCCGCAAGGTGTTCTTTCGCGCCGCTGGTGCTCAATCAGGACTATACGTTTCGAGGCAGCACAGACCGCGC
TGGCAGAAGGGAAGGCTGATGCGATCGCCTTCGGTCGCAAGTTCATCTCGAACCCCGACCTGCCGGAGCG
CTTCCGCCGCGGCATCGCCCTGCAGCCGGATGATATGAAAACCTGGTACAGTCAGGGCCCCGAAGGATAC
ACGGACTACCCGTCCGCCACCTCCGGCCCCAACTAA

Uniprot: A1E8I9, 361 AS, 39.24 kDa

MPTLFDPIDFGPIHAKNRIVMSPLTRGRADKEAVPTPIMA EYYAQRASAGLIITEATGISREGLGWPFAP
GIWSDAQVEAWKPIVAGVHAKGGKIVCQLWHMGRMVHSSVTGTQPVSSATTAPGEVHTYEGKKPFQAR
AIDAADISRIILNDYENAARNAIRAGFDGVQIHAANGYLIDEFLRNGTNHRTDEYGGVPENRIRFLKEVTE
RVIAAIGADRTGVRLSPNGDTQGCIDSAPETVVFVPAKLLQDLGVAWLELREPGPNGTFGKTDQPKLSPQ
IRKVFLRPLVLNQDYTFEAAQTALAE GKADAIAFGRKFISNPDLPERFARGIALQPDDMKTWYSQGPEGY
TDYPSATS GPN

GoxER: Enoat-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* mit N-terminalem 6xHis-tag (1143 bp)

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCCAACCC
TGTTTCGATCCCATTTGATTTCCGGTCCCATTACGCGAAAAACCGGATCGTGATGTCCCCGCTGACGCGCGG
ACGTGCTGACAAGGAGGCCGTTCCGACCCCCATCATGGCGGAATACTACGCCAGCGCGCCAGTGCCGGG
CTGATCATCACGGAAGCCACGGGTATCTCCCGCAAGGCTGGGGCTGGCCGTTCCGACCCGGAAATCTGTT
CCGATGCGCAGGTCGAAGCCTGGAAGCCGATCGTGGCCGGTGTGCATGCAAAGGGCGAAAGATCGTCTG
CCAGTCTGGCACATGGGCGCATGGTCCACTCGTCCGTGACCCGGAACGCAGCCCGTCTCGTCTCCGCGC
ACCACGGCCCCCGCGAGGTCCATACCTATGAAGGCAAGAAGCCGTTTCGAGCAGGCCCGCGCAATCGATG
CCGCGGATATCAGCCGTATTCTGAACGACTATGAGAACGCCGCCGCAATGCGATCCGCGCCGGCTTCGA
CGGGGTGCAGATCCACGCCGCAATGGCTACCTCATCGACGAGTTCCTGCGAAACGGTACGAATCACCGC
ACAGATGAATACGGCGCGCTCCCCGAAAACCGCATCCGTTTCTGAAGGAAGTCACCGAGCGCGTGATCG
CTGCCATCGGTGCCGACCGCACAGGCGTGCGCCTGTCCCCAACGGCGATACGCAGGGCTGCATCGACAG
CGCACCTGAGACGGTCTTTGTCCCGCGGCAAAGCTGCTTCAGGATCTGGGCGTGGCCTGGCTCGAACTG
CGCGAACCCGGCCGAAACGGCACCTTCGGCAAGACGGACCAGCCAAACTGTCCCCGAGATCCGCAAGG
TGTTCTCGCGCCGCTGGTGCTCAATCAGGACTATACGTTTCGAGGCAGCACAGACCCGCGCTGGCAGAAGG
GAAGGCTGATGCGATCGCCTTCGGTTCGCAAGTTCATCTCGAACCCCGACCTGCCGGAGCGCTTCGCCCCG
GGCATCGCCCTGCAGCCGGATGATATGAAAACCTGGTACAGTCAGGGCCCCGAAGGATACACGGACTACC
CGTCCGCCACCTCCGGCCCCAACTAA

basierend auf Uniprot: A1E8I9, 381 AS, 41.41 kDa

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMPTLFDPIDFGPIHAKNRIVMSPLTRGRADKEAVPTPIMA EYYAQRASAG
LIITEATGISREGLGWPFAPGIWSDAQVEAWKPIVAGVHAKGGKIVCQLWHMGRMVHSSVTGTQPVSSA
TTAPGEVHTYEGKKPFQARAIDAADISRIILNDYENAARNAIRAGFDGVQIHAANGYLIDEFLRNGTNHR
TDEYGGVPENRIRFLKEVTERVIAAIGADRTGVRLSPNGDTQGCIDSAPETVVFVPAKLLQDLGVAWLEL
REPGPNGTFGKTDQPKLSPQIRKVFLRPLVLNQDYTFEAAQTALAE GKADAIAFGRKFISNPDLPERFAR
GIALQPDDMKTWYSQGPEGYTDYPSATS GPN

MeOYE: Enoat-Reduktase aus *Methylobacterium extorquens* mit N-terminalem 6xHis-tag (1143 bp)

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCCCTCAA
TCTTTGACCCGATCACGCTCGGCGCGTTGAAGCTGCCGAACCGAATTCATGCCCCGCTGACCCGCGC
CCGCGCGACCCCGACCCACGTTCCGACGCCGTTGATGGCCGAGTATTACGCTCAGCGCGCGACGGCCGCG
CTTATCATCTCCGAGGCCACCGGCATCAGCCAGGAAGGGCTTGGTTGGCCCTACGCACCCGGTATCTGGT
CCGATGAGCAGACGGAGGCCCTGGAAGCCGGTGGTGAAGGCCGTCACGAGGCGGGCGGGCGCATCGTCTG
CCAGCTCTGGCACATGGGCTACCTCGTCCATTCCGACTTCTCGGCGGCGAGCCGCCGGTTCGCCCCCTCG
GTCGCCACGGCGCCGACGAGGCGCATACCTACGACGGCAAGAAGCCCTACAGCCAGGCGCGGGCCCTGC
GCGAGGACGAGATCCCGCGGCTCATCGCCGATTACGAGCGGGCCGCGCGCAACGCCGTCGCGGCGGGCTT
CGACGGCGTGCAGATCCACGCGGCGAACGGCTACTTGCTCGACGAGTTCATCCGCGACGGCAGCAACAAG
CGCAGCGACCGCTACGGCGGTTCCGGTCGAGAACC GGTTCCGGCTGGTGACCAAGGTGGCGCAGGCGGTGG
CCGGCGTCTCGGCGCGGACCCGACCCGGCATCCGCTTCTCGCCAACGGCCGATCCAGGGCGTGGACGA
TTCTAACCCGACGAGGTCTTCGGGCTTGCCGCCGAGATGATGGAGCGCGTTGGCCTCGCCTTCATCGAG
ATGCGCGAGCCGGGCCCCGACGGCACCTTCGGCAAGGCGACGGTGGCGCCGGTGGCACCCGTCATCAAGG
AGCGCTTCGGCGGTCCGGTCATCTGAACTGCGACTATGACGGCGAGCGCGCAAGCAAGCGGTGGCCTC
GGGCGAAGCGGATGCCATCGCCTTCGGCCGGCCCTACATCGCGAACCCCGATCTGGTTCGACCGCATCGCC
AAGGGCCTGCCCTTCGCCAAGGACGACATGAAGACCTGGTACAGCCAGGGGCCGGAAGGCTACGTCGATT
ACCCGGCGCTGACGCAGAAGGCGGCGTAA

basierend auf Uniprot: C5B2H7, 381 AS, 41.14 kDa

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMPSIFDPIITLGALKLPNRI LMAPLTRARATRTHVPTPVMAEYYAQRATAG
LII SEATGISQEGLGWPYAPGIWSDEQTEAWKPVVKAVHEAGGRIVCQLWHMGYLVHSDFLGGEPVAPS
VATAPDEAHTYDGKKPYSQARALREDEI PRLIADYERAARNAVAAGFDGVQI HAANGYLLDEFIRDGSNK
RSDRYGGSVENRVLVTKVAQAVAGVVGADRTGIRFSPNGPIQGVDDSNPHEVFGLAAEMMERVGLAFIE
MREPGPDGTFGKATVAPVAPVIKERFGGPVILNCDYDGERAKQAVASGEADAI AFGRPYIANPDLVDRIA
KGLPFAKDDMKTWYSQGPEGYVDYPAL TQKAA

9.2 Dehydrogenasen

TbADH: Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter brockii* subsp. *finnii* Ako-1 (ATCC 43586) (1.059 bp)

ATGAAAGGTTTTGCAATGCTCAGTATCGGTAAAGTTGGCTGGATTGAGAAGGAAAAGCCTGCTCCTGGCC
CATTTGATGCTATTGTAAGACCTCTAGCTGTGGCCCCCTTGCACTTCGGACATTCATACCGTTTTTGAAGG
CGCCATTGGCGAAAGACATAACATGATACTCGGTACGAAGCTGTAGGTGAAGTAGTTGAAGTAGGTAGT
GAGGTAAAAGATTTTAAACCTGGTGATCGCGTTGTTGTGCCAGCTATTACCCCTGATTGGCGGACCTCTG
AAGTACAAAAGAGGATATCACCAGCACTCCGGTGGAAATGCTGGCAGGCTGGAAATTTTCGAATGTAAAAGA
TGGTGTTTTTGGTGAATTTTTTCATGTGAATGATGCTGATATGAATTTAGCACATCTGCCTAAAGAAATT
CCATTGGAAGCTGCAGTTATGATTCCCGATATGATGACCACTGGTTTTTACGGAGCTGAACTGGCAGATA
TAGAATTAGGTGCGACGGTAGCAGTTTTGGGTATTGGCCAGTAGGTCTTATGGCAGTCGCTGGTGCCAA
ATTGCGTGGAGCCGGAAGAAATTATGCCGTAGGCAGTAGACCAGTTTGTGTAGATGCTGCAAATACTAT
GGAGCTACTGATATTGTAACCTATAAAGATGGTCTATCGAAAGTCAGATTATGAATCTAACTGAAGGCA
AAGGTGTCGATGCTGCCATCATCGCTGGAGGAAATGCTGACATTATGGCTACAGCAGTTAAGATTGTTAA
ACCTGGTGGCACCATCGCTAATGTAAATTAATTTGGCGAAGGAGAGGTTTTGCCTGTTCCCTCGTCTTGAA
TGGGGTTGCGGCATGGCTCATAAACTATAAAAGGCGGGCTATGCCCCGGTGGACGCTAAGAATGGAAA
GACTGATTGACCTTGTTTTTTATAAGCGTGTGATCCTTCTAAGCTCGTCACTCACGTTTTCCGGGGATT
TGACAATATTGAAAAAGCCTTTATGTTGATGAAAGACAAACCAAAGACCTAATCAAACCTGTTGTAATA
TTAGCATAA

Uniprot: P14941, 352 AS, 37.65 kDa

MKGFAMLSIGKVGWIEKEKPAPGPFDAIVRPLAVAPCTSDIHTVFEAGAIGERHNMILGHEAVGEVVEVGS
EVKDFKPGDRVVVPAITPDWRTSEVQRGYHQHSGGMLAGWKFSNVKDGVFGEFFHVNDADMNLAHLPKEI
PLEAAVMI PDMMTTGFHGAELADIELGATVAVLGIGPVGLMAVAGAKLRGAGRI IAVGSRPVCVDAAKYY
GATDIVNYKDGPIESQIMNLTEGKGVDAAI IAGGNADIMATAVKIVKPGGTIANVNYFGEGEVLPVPRLE
WCGMAHKTIKGGLCPGGRLRMERLIDL VFYKRVDPSKLVTHVFRGFDNIEKAFMLMKDKPKDLIKPVVI
LA

LkADH: (R)-Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* DSM 20587 (759 bp)

ATGACTGACCGTTTTGAAAGGTAAGGTAGCAATTGTAACCTGGCGGTACCTTGGGAATTGGCTTGGAATCG
CTGATAAGTTTGTGTAAGAAGGCGCAAAGGTTGTTATTACCGGCCGTCACGCTGATGTAGGTGAAAAGC
TGCCAAATCAATCGGCGGCACAGACGTTATCCGTTTTGTCCAACACGATGCTTCTGATGAAGCCGGCTGG
ACTAAGTTGTTTGATACGACTGAAGAAGCATTTGGCCAGTTACCACGGTTGTCAACAATGCCGGAATTG
CGGTCAGCAAGAGTGTTGAAGATACCACAACCTGAAGAATGGCGCAAGCTGCTCTCAGTTAACTTGGATGG
TGTCTTCTCGGTACCGTCTTGGAAATCCAACGTATGAAGAATAAAGGACTCGGAGCATCAATCATCAAT
ATGTCATCTATCGAAGGTTTTGTTGGTGATCCAACCTCTGGGTGCATACAACGTTCAAAGGTGCTGTCA
GAATTATGTCTAAATCAGCTGCCTTGGATTGCGCTTTGAAGGACTACGATGTTCCGGGTTAACACTGTTCA
TCCAGGTTATATCAAGACACCATTGGTTGACGATCTTGAAGGGCAGAAGAAATGATGTCACAGCGGACC
AAGACACCAATGGGTCATATCGGTGAACCTAACGATATCGCTTGGATCTGTGTTTACCTGGCATCTGACG
AATCTAAATTTGCCACTGGTGCAGAAATTCGTTGTGACGGTGGCTACACTGCTCAATAG

Uniprot: A0A0R1Z9F9, 252 AS; 26.78 kDa

MTDRLKKGKVAIVTGGTLGIGLAIADKFVEEGAKVVITGRHADVGEKAAKSIGGTDVIRFVQHDASDEAGW
TKLFDTEEFAGFPVTTVVNNAGIAVSKSVEDTTTEWRKLLSVNLDGVFFGTRLGIQRMKNKGLGASIIIN
MSSIEGFVGDPTLGAYNASKGAVRIMSKSAALDCALKDYDVRVNTVHPGYIKTPLVDDLEGAEEEMMSQRT
KTPMGHIGEPNDIAWICVYLASDESDFATGAEFVVDGGYTAQ

LbADH: Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 = DSM 20054 (759 bp)

ATGTCTAACCGTTTTGGATGGTAAGGTAGCAATCATTACAGGTGGTACGTTGGGTATCGGTTTAGCTATCG
CCACGAAGTTCGTTGAAGAAGGGGCTAAGGTCATGATTACCGGCCGGCACAGCGATGTTGGTGA AAAAGC
AGCTAAGAGTGTCCGCACTCCTGATCAGATTCAATTTTTTCCAACATGATTCTTCCGATGAAGACGGCTGG
ACGAAATTATTTCGATGCAACGGAAAAAGCCTTTGGCCAGTTTCTACATTAGTTAATAACGCTGGGATCG
CGGTTAACAAGAGTGTGCAAGAAACCACGACTGCTGAATGGCGTAAATTTATTAGCCGTC AACCTTGATGG
TGTCTTCTTCGGTACCCGATTAGGGATTCAACGGATGAAGAACAAGGCTTAGGGGCTTCCATCATCAAC
ATGTCTTCGATCGAAGGCTTTGTGGGTGATCCTAGCTTAGGGCTTACAACGCATCTAAAGGGGCCGTAC
GGATTATGTCCAAGTCAGCTGCCTTAGATTGTGCCCTAAAGGACTACGATGTTCCGGTAAACACTGTTCA
CCCTGGCTACATCAAGACACCATTGGTTGATGACCTACCAGGGGCCGAAGAAGCGATGTCACAACGGACC
AAGACGCCAATGGGCCATATCGGTGAACCTAACGATATTGCCTACATCTGTGTTTACTTGGCTTCTAACG
AATCTAAATTTGCAACGGGTTCTGAATTCGTTAGCTTACGGTGGCTACACTGCTCAATAG

Uniprot: Q84EX5, 252 AS, 26.76 kDa

MSNRLDGKVAIITGGTLGIGLAIATKFVEEGAKVMITGRHSDVGEKAAKSVGTPDQIQFFQHDSSDEDGW
TKLFDTEEFAGFPVSTLVNNAGIAVNKSVEETTTAEWRKLLAVNLDGVFFGTRLGIQRMKNKGLGASIIIN
MSSIEGFVGDPSLGAYNASKGAVRIMSKSAALDCALKDYDVRVNTVHPGYIKTPLVDDLPGAEEMSQRT
KTPMGHIGEPNDIAYICVYLASNESKFATGSEFVVDGGYTAQ

TeADH: Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E (1.062 bp)

ATGATGAAAGGTTTTGCAATGCTCAGTATCGGTAAAGTTGGCTGGATTGAGAAGGAAAAGCCTGCTCCTG
GCCATTTGATGCTATTGTAAGACCTCTAGCTGTGGCCCCCTGCACCTCGGACATTCATACCGTTTTTTGA
AGGGCCATTGGCGAAAGACATAACATGATACTCGGTACGAAGCTGTAGGTGAAGTAGTTGGAGTAGGT
AGTGAGGTA AAAAGATTTTAAACCTGGTATCGCGTTGTTGTGCCAGCTATTACCCCTGATTGGCGGACCT
CTGAAGTACAAAGAGGATATCACCAGCACTCCGGTGGAAATGCTGGCAGGCTGGAAATTTTTCGAATGTAAA
AGATGGTGTTTTTGGTGAATTTTTTTCATGTGAATGATGCTGATATGAATTTAGCACATCTGCCTAAAGAA
ATTCCATTGGAAGCTGCAGTTATGATTCCCGATATGATGACCACTGGTTTTTACGGAGCTGAACTGGCAG
ATATAGAATTAGGTGCGACGGTAGCAGTTTTGGGTATTGGCCAGTAGGTCTTATGGCAGTCGCTGGTGC
CAAATTGCGTGGAGCCGGAAGAATTTATGCCGTAGGCAGTAGACCAGTTTGTGTAGATGCTGCAAAATAC
TATGGAGCTACTGATATTGTA AACTATAAAGATGGTCCATCGAAAGTCAGATTATGAATCTAACTGAAG
GCAAAGGTGTCGATGCTGCCATCATCGCTGGAGGAAATGCTGACATTATGGCTACAGCAGTTAAGATTGT
TAAACCTGGTGGCACCATCGCTAATGTA AATTTATTTGGCGAAGGAGAGGTTTTGCCTGTTCCCTCGTCTT
GAATGGGGTTGCGGCATGGCTCATAAAACTATAAAAGGCGGGCTATGCCCGGTGGACGCTAAGAATGG
AAAGACTGATTGACCTTGTTTTTTATAAGCGTGTTCGATCCTTCTAAGCTCGTCACTCACGTTTTCCGGGG
ATTTGACAATATTGAAGAAGCCTTTATGTTGATGAAAGACAAACCAAAGACCTAATCAAACCTGTTGTA
ATATTAGCATAA

basierend auf Uniprot: P77990, 353 AS, 37.71 kDa

MMKGFAMLSIGKVGWIEKEKPAPGPFDAIVRPLAVAPCTSDIHTVFEGAIGERHNMILGHEAVGEVVG
SEVKDFKPGDRVVVPAITPDWRTSEVQRGYHQHSGGMLAGWKFSNVKDGVFGEFFHVNDADMNLAHLPE
I PLEAAVMI PDMMTTFGHGAELADIELGATVAVLGIGPVGLMAVAGAKLRGAGRI IAVGSRPVCVDAKY
YGATDIVNYKDGPIESQIMNLTGKGVDAAI IAGGNADIMATAVKIVKPGGTIANVNYFGEVGLPVPRL
EWGCGMAHKTIKGGLCPPGRLRMERLIDLVFYKRVDP SKLVTHVFRGFDNIEEAFMLMKDKPKDLIKPVV
ILA

CtADH: Steroiddehydrogenase aus *Comamonas testosteroni* ATCC11996 mit C-terminalem 6xHis-tag (798 bp)

ATGTCCATCATCGTGATAAGCGGCTGCGCCACCGGCATTGGTGCCGCTACGCGCAAGGTCTGGAGGCGG
 CCGGTCACCAGATCGTAGGCATCGATATACGCGATGCGGAAGTGATTGCCGATCTCTCGACGGCCGAAGG
 TCGAAAGCAGGCGATTGCCGATGTACTGGCGAAGTGCAGCAAGGGCATGGACGGCCTGGTGTGTGCGCC
 GGCTGGGACCGCAGACCAAGGTGCTTGGCAATGTGGTTTCGGTCAATTATTTTGGCGCGACCGAGCTGA
 TGGATGCCTTTTTGCCAGCGCTGAAAAAAGGCCATCAGCCCGCAGCCGTCGTTCATCTCGTCCGTGGCTTC
 CGCGCATCTGGCTTTTGACAAGAACCCTGGCGCTGGCACTGGAAGCCGGCGAGGAAGCCAAGGCCCGC
 GCCATTGTGCAACATGCGGGAGAGCAGGGCGGAAATCTGGCCATGCGGGCAGCAAGAATGCTTTGACGG
 TGGTGTGCGCAAACGCGCCGCCCTGGGGCGAGGCTGGCGTGCCTGAACACCATCGCCCCGGTGC
 AACCGAGACTCCCTTGCTGCAGGCGGGCCTGCAGGACCCGCGCTATGGCGAATCCATTGCCAAGTTCGTT
 CCTCCATGGGCCGCGTGCAGGCGGCTCCGAGATGGCGTGGTTCATCGCCTTTTTGATGAGCCCGGCCG
 CAAGCTATGTGCATGGCGCGCAGATCGTCAATTGATGGCGGCATTGATGCGGTGATGCGCCCGACACAGTT
CCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

basierend auf Uniprot: P80702, 265 AS, 27.46 kDa

MSIIIVISGCATGIGAAATRKVLEAAGHQIVGIDIRDAEVIADLSTAEGRKQAIADVLAKCSKGMDDLVLCA
 GLGPQTKVLGNVSVNYFGATELMDAFLPALKKGHQPAVVIVISSVASAHLAFDKNPLALALEAGEEAKAR
 AIVEHAGEQGGNLAYAGSKNALTVAVRKRAAAWGEAGVRLNTIAPGATEPPLLQAGLQDPYGESIAKFV
 PPMGRRAEPSEMASVIAFLMSPAASVYVHGAQIVIDGGIDAVMRPTQFLEHHHHHH

SyADH: Alkoholdehydrogenase aus *Sphingobium yanoikuyae* (*Sphingomonas yanoikuyae*) (852 bp)

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGATGACCA
 CCCTGCCGACCGTTCTGATTACCGGTGCAAGCAGCGGTATTGGTGCAACCTATGCAGAACGTTTTGCACG
 TCGTGGTCATGATCTGGTTCTGGTTGCACGTGATAAAGTTCGTCTGGATGCACTGGCAGCACGTCTGCGT
 GATGAAAGCGGTGTTCAGTTGAAGCACTGCAGGCAGATCTGACCCGTCCTGCAGATCTGGCAGCAGTTG
 AAATTCGTCTGCGGAAGATGCACGTATTGGTATTCTGATTAATAACGCAGGTATGGCACAGAGCGGTGG
 TTTTGTTCAGCAGACCGCAGAAGGTATTGAACGCTGATTACCCGTAATACCACCGCACTGACACGTCTG
 GCAGCCGAGTTGCACCGCTTTTGTGCAGAGCGGTACAGGTGCAATTGTTAATATTGGTAGCGTTGTTG
 GTTTTGCACCCGAATTTGGTATGAGCATTATGGTGCCACCAAAGCCTTTGTTCTGTTTCTGAGCCAGGG
 TCTGAATCTGGAAGTGAAGCCGAGCGGTATTTATGTTTCAGGCAGTTCTGCCTGCCGCAACCCGTACCGAA
 ATTTGGGGTTCGTGCAGGTATTGATGTTAATACCCGCGGAAGTTATGGAAGTTGATGAACTGGTTGATG
 CAGCACTGGTGGGTTTTGATCGTCGTGAACTGGTGACCATTCCGCCTCTGCATGTTGCAGCACGTTGGGA
 TGCCCTGGATGGTGCACGTGAGGGCTGATGAGCGATATTCGTCAGGCACAGGCAGCAGATCGTTATCGT
 CCGGAAGCATAA

Uniprot: B9U359, 283 AS, 30.17 kDa

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMMTTLPTVLIITGASSGIGATYAERFARRGHDLVLVARDKVRDLAALARL
 DESGVAVEALQADLTRPADLAAVEIRLREDARIGILINNAGMAQSGGFVQQTAEGIERLITLNTTALTRL
 AAAVAPRFVQSGTGAIVNIIGSVVGFAPFEGMSIYGATKAFVLFVLSQGLNLELSPSGIYVQAVLPAATRTE
 IWGRAGIDVNTLPEVMEVDELVDAAALVGFDRRELVTIPLHVAARWDALDGARQGLMSDIRQAQADRYR
 PEA

PpADH: Alkoholdehydrogenase aus *Pichia pastoris* CBS 7435 (*Komagataella pas- toris* (GS115/ATCC 20864) (1.065 bp)

ATGGTTTCTAAGGTTTTATTGACAGGTGCTTCTGGTTACATCGCCCAACACATCCTAATGAATTACTTT
 CCCACGGCTTTAAGGTCATTGGAACTGTAAGAAGACAGGAGCAGGCAGACCAATTGCATAAGCAATTTTC
 AGAGGAAAAGTTCTGTTTTACAAAAAGATCCCTCCCTTCTGACCTATGTCTTGTCCCAGATATTGGTGCT
 TCGGATGCTTTTGATGAGGTATTGAAGTCAACCCCCGACATCCTTATGTCTTTCACACAGCTTCCCCAT
 TTATTTTCAATGACGACAGAGCTCTTGAGGACGTTTTATTTGAAGCCTGCTGTTGAGGGTACCAGAAACAT
 CTTAAGTGCTATCAAGAAGTTTGCCAATGACAGTGTCAAGAAGCTCGTGGTAACTTCTCTTTGCGACGA
 ATTTTGAACGCTGACAAGTTTGAAGACAAGAGTTTCATTCACACTGAGAAGGTGTGGAATAACAACACCT
 GGGATCAAACCAAGAGTGGAGACAGAGGTGTTGCTTACATCGTTTCCAAGAAGGAGGCTGAGAAAGCTGC
 CTGGGACTTTCGTTGAGAAGGAGAAACCAAACCTTTAAATTGACAACAGTAAACCCCTCTTATGTTTTGGT
 CCTCAGAAAATTCGATGCTTTCGGCTAAGAAGGAATCTTTGAACACCTCAGCTGAGATCGTTGGATCTCTGT

TGCACACAAAGTATCCATCTGATGACAAGTTGTTTGTATGATCCCCCAATTTATCCGTTGATGTTAGAGA
CGTAGCTCTCTACCATGTTCTGCCACTTTTGAATGCTGATTTGGCTTCCAGGAGATTGCTTGTGTTCAA
TCCAAGTTCAGCGCTCAGAGAACTCTGAACATTATCAACGAGAATTTTCTGAATTAAGGGCAAGATCG
CAGTTGGAAAAGCCCGAGGAAACGGCAAGAGTGAAGCTATTAAGGGCCCGGAGTATAACAACAGTGTAC
TGTAGGCCTAACTGGAGTTGACCCCATCCCCTGGAGAAAACGGTTGTGGACTCTGTCAAACAGATATTG
CGTGCTAATAAATAA

Uniprot: C4R4L0, 354 AS, 39.24 kDa

MVSKVLLTGASGYIAQHITNELLSHGFKVIGTVRRQEADQLHKQFSEESSVLQKDPSSLTYVLPDIGA
SDAFDEVKSTPDIYVLTASPFIFNDDRALEDVYLKPAVEGTRNILSAIKKFANDSVKNVVVTSFFAA
ILNADKFEDKSFIFHTEKVVNNNTWDQTKSGDRGVAYIVSKKEAEKAAWDFVEKEKPNFKLTTVNPPYVFG
PQKFDASAKKESLNTSAEIVGSLHHTKYPSDDKLFDDPLNLSVDVRDVALYHVLPLLNLADLASRRLLVVQ
SKFSAQRILNIINENFPELKGKIAVGKPEETARVEAIKGPYNNNSVTVGLTGVDPIPLEKTVVDSVKQIL
RANK

**PpADH: Alkoholdehydrogenase aus *Pichia pastoris* CBS 7435 (*Komagataella pas-
toris* (GS115/ATCC 20864) mit N-terminalem 6xHis-tag (1.098 bp)**

ATGGGCAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGTTTCTAAGGTTTTATTGACAGGTGCTTCTGGTT
ACATCGCCCAACACATCACTAATGAATTACTTTCCACGGCTTTAAGGTCATTGGAACGTGAAGAAGACA
GGAGCAGGCAGACCAATTGCATAAGCAATTTTCAGAGGAAAGTTCTGTTTTACAAAAAGATCCCTCCCTT
CTGACCTATGTCCTTGTCCCAGATATTGGTGCTTCGGATGCTTTTGTATGAGGTATTGAAGTCAACCCCG
ACATCACTTATGTCCTTACACAGCTTCCCCATTTATTTTCAATGACGACAGAGCTCTTGAGGACGTTTA
TTTGAAGCCTGCTGTTGAGGGTACCAGAAAATCTTAAGTGCTATCAAGAAGTTTGCCAATGACAGTGTC
AAGAACGTCGTGGTAACTTCTCTTTGCAGCAATTTGAACGCTGACAAGTTTGAAGACAAGAGTTTCA
TTCACACTGAGAAGGTGTGGAATAACAACACCTGGGATCAAACCAAGAGTGGAGACAGAGGTGTTGCTTA
CATCGTTTTCAAGAAGGAGGCTGAGAAAAGTGCCTGGGACTTCGTTGAGAAGGAGAAACCAAACCTTAAA
TTGACAACAGTAAACCTCTTATGTTTTTGGTCTCAGAAATTCGATGCTTCGGCTAAGAAGGAATCTT
TGAACACCTCAGCTGAGATCGTTGGATCTCTGTTGCACACAAAGTATCCATCTGATGACAAGTTGTTTGA
TGATCCCCCAATTTATCCGTTGATGTTAGAGACGTAGCTCTCTACCATGTTCTGCCACTTTTGAATGCT
GATTTGGCTTCCAGGAGATTGCTTGTGTTCAATCCAAGTTCAGCGCTCAGAGAATCCTGAACATTATCA
ACGAGAATTTTCTGAATTAAGGGCAAGATCGCAGTTGGAAAGCCCGAGGAAACGGCAAGAGTGAAGC
TATTAAGGGCCCGGAGTATAACAACAGTGTACTGTAGGCCTAACTGGAGTTGACCCCATCCCCTGGAG
AAAACGGTTGTGGACTCTGTCAAACAGATATTGCGTGCTAATAAATAA

basierend auf Uniprot: C4R4L0, 365 AS, 40.51 kDa

MGSSHHHHHSQVSKVLLTGASGYIAQHITNELLSHGFKVIGTVRRQEADQLHKQFSEESSVLQKDPSSL
LTYVLPDIGASDAFDEVKSTPDIYVLTASPFIFNDDRALEDVYLKPAVEGTRNILSAIKKFANDSV
KNVVVTSFFAAIILNADKFEDKSFIFHTEKVVNNNTWDQTKSGDRGVAYIVSKKEAEKAAWDFVEKEKPNFK
LTTVNPPYVFGPQKFDASAKKESLNTSAEIVGSLHHTKYPSDDKLFDDPLNLSVDVRDVALYHVLPLLNA
DLASRRLLVVQSKFSAQRILNIINENFPELKGKIAVGKPEETARVEAIKGPYNNNSVTVGLTGVDPIPLE
KTVVDSVKQILRANK

**GDH: Glucosedehydrogenase aus *Bacillus subtilis* 168 (ATCC 23857) mit Hitze-
mutationen E170K und Q252L (786 bp)**

ATGTATCCGGATTTAAAAGGAAAAGTCGTCGCTATTACAGGAGCTGCTTCAGGGCTCGGAAAGGCGATGG
CCATTTCGCTTCGGCAAGGAGCAGGCAAAAGTGGTTATCAACTATTATAGTAATAAACAAGATCCGAACGA
GGTAAAAGAAAGAGGTCAATCAAGGCGGGCGGTGAAGCTGTTGTCGTCCTCAAGGAGATGTCACGAAAGAGGAA
GATGTAAAAAATATCGTGCAAAACGGCAATTAAGGAGTTCGGCACACTCGATATTATGATTAATAATGCCG
GTCTTGAAAAATCCTGTGCCATCTCACGAAATGCCGCTCAAGGATTTGGGATAAAGTCATCGGCACGAACTT
AACGGGTGCCTTTTTAGGAAGCCGTGAAGCGATTAAATATTTTCGTAGAAAACGATATCAAGGGAAATGTC
ATTAACATGTCCAGTGTGCACGAAGTGAATCCTTGGCCGTTATTTGTCCACTATGCGGCAAGTAAAGGCG
GGATAAAGCTGATGACAAAGACATTAGCGTTGGAATACGCGCCGAAGGGCATTCGCGTCAATAATATTGG
GCCAGGTGCGATCAACACGCCAATCAATGCTGAAAAATTCGCTGACCTAAACAGAAAGCTGATGTAGAA
AGCATGATTCCAATGGGATATATCGGCGAACCAGGAGATCGCCGACGATGACAGCTGGCTTGTTCGA
AGGAAGCCAGCTACGTCACAGGCATCACGTTATTTCGCGGACGGCGGTATGACACTCTATCCTTCATTCCA
GGCAGGCCCGGGTTAA

basierend auf Uniprot: P12310, 261 AS, 28.07 kDa

MYPDLKGGVVAITGAASGLGKAMAIRFGKEQAKVVINYYSNKQDPNEVKKEVIKAGGEAVVVQGDVTKEE
DVKNIVQTAIKEFGTLDIMINNAGLENPVPSHEMPLKDWDKVI¹GTNLTGAF²LGSR³EAIKYFVENDIKGNV
INMSSVHEVIPWPLFVHYAASKGGIKLMTKTLALEYAPK⁴GIRVNNIGPGAINTPINA⁵EKFADPKQKADVE
SMIPMGYIGEP⁶EEIAA⁷VAAWLASKEASYVTGITL⁸FADGGMTLYPSFQAGRG

10 Literaturverzeichnis

- [1] F. Seitz, in *Catal. Convers. Biomass Its Deriv.* (Hrsg.: M. Behrens, A.K. Datye), Max Planck Research Library For The History And Development Of Knowledge, Berlin, **2013**, S. 15–42.
- [2] R. Diercks, J.-D. Arndt, S. Freyer, R. Geier, O. Machhammer, J. Schwartze, M. Volland, *Chem. Eng. Technol.* **2008**, *31*, 631–637.
- [3] A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, Hrsg. , *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [4] P. Anastas, *Chem. Eng. News* **2011**, *89*, 62–65.
- [5] Y. Asano, P. Kaul, in *Compr. Chirality*, Elsevier, **2012**, S. 122–142.
- [6] S. Staudt, E. Burda, C. Giese, C. A. Müller, J. Marienhagen, U. Schwaneberg, W. Hummel, K. Drauz, H. Gröger, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52*, 2359–2363.
- [7] A. Reimer, S. Wedde, S. Staudt, S. Schmidt, D. Höffer, W. Hummel, U. Kragl, U. T. Bornscheuer, H. Gröger, *J. Heterocycl. Chem.* **2016**, *49*, 1458–1461.
- [8] S. Schmidt, C. Scherkus, J. Muschiol, U. Menyes, T. Winkler, W. Hummel, H. Gröger, A. Liese, H. G. Herz, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, *54*, 2784–2787.
- [9] A. J. O’Lenick, *J. Surfactants Deterg.* **2001**, *4*, 311–315.
- [10] A. J. O’Lenick, R. E. Bilbo, *Soap* **1987**, 52–55.
- [11] F. D. Gunstone, J. L. Harwood, A. J. Dijkstra, Hrsg. , *The Lipid Handbook*, CRC Press, Boca Raton, **2007**.
- [12] R. Varadaraj, J. Bock, P. Valint, S. Zushma, N. Brons, *J. Phys. Chem* **1991**, *95*, 1677–1679.
- [13] Sasol, „Sasol Olefins & Surfactants“, **2012**.
- [14] S. Veibel, J. I. Nielsen, *Tetrahedron* **1967**, *23*, 1723–1733.
- [15] M. Guerbet, *C. R. Acad. Sci.* **1899**, *128*, 1002–1004.
- [16] M. Guerbet, *C. R. Acad. Sci.* **1909**, *149*, 129–132.
- [17] S. Rebsdatt, D. Mayer, *Ullmann’s Encycl. Ind. Chem.* **2012**, 547–572.
- [18] D. Gabriëls, W. Y. Hernández, B. Sels, P. Van Der Voort, A. Verberckmoes, *Catal. Sci. Technol.* **2015**, *5*, 3876–3902.
- [19] M. Sulzbacher, *J. Appl. Chem.* **1955**, *5*, 637–641.
- [20] S. Cannizzaro, *Ann. der Chemie und Pharm.* **1853**, *88*, 129–130.
- [21] D. R. Tobergte, S. Curtis, *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53*, 1689–1699.
- [22] H. Machemer, *Angew. Chemie* **1952**, *64*, 213–220.
- [23] R. L. Poe, *Greater Selectivity in the Guerbet Reaction*, **1967**, US3328470.
- [24] M. Sulzbacher, *Improvements in and relating to the Condensation of Alcohols*, **1951**, GB655864 A.
- [25] C. Waykole, D. Bhowmick, A. Pratap, *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* **2014**, *91*, 1407–1416.

- [26] P. L. Burk, R. L. Pruet, K. S. Campo, *J. Mol. Catal.* **1985**, *33*, 1–14.
- [27] P. L. Burk, R. L. Pruet, K. S. Campo, *J. Mol. Catal.* **1985**, *33*, 15–21.
- [28] C. Carlini, A. Macinai, M. Marchionna, M. Noviello, A. M. Raspolli Galletti, G. Sbrana, *J. Mol. Catal. A Chem.* **2003**, *206*, 409–418.
- [29] G. R. M. Dowson, M. F. Haddow, J. Lee, R. L. Wingad, D. F. Wass, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52*, 9005–9008.
- [30] R. L. Wingad, P. J. Gates, S. T. G. Street, D. F. Wass, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 5822–5826.
- [31] R. Wingad, E. Bergstrom, M. Everett, K. Pellow, D. Wass, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 6–8.
- [32] K. Taguchi, H. Nakagawa, T. Hirabayashi, S. Sakaguchi, Y. Ishii, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 72–73.
- [33] T. Matsu-Ura, S. Sakaguchi, Y. Obora, Y. Ishii, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8306–8308.
- [34] K. Koda, T. Matsu-Ura, Y. Obora, Y. Ishii, *Chem. Lett.* **2009**, *38*, 838–839.
- [35] S. Chakraborty, P. E. Piszal, C. E. Hayes, R. T. Baker, W. D. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14264–14267.
- [36] G. Xu, T. Lammens, Q. Liu, X. Wang, L. Dong, A. Caiazzo, N. Ashraf, J. Guan, X. Mu, *Green Chem.* **2014**, *16*, 3971.
- [37] C. Carlini, A. Macinai, A. M. Raspolli Galletti, G. Sbrana, *J. Mol. Catal. A Chem.* **2004**, *212*, 65–70.
- [38] C. Carlini, M. Di Girolamo, M. Marchionna, M. Noviello, A. M. R. Galletti, G. Sbrana, *J. Mol. Catal. A Chem.* **2002**, *184*, 273–280.
- [39] C. Carlini, M. Di Girolamo, A. Macinai, M. Marchionna, M. Noviello, A. M. Raspolli Galletti, G. Sbrana, *J. Mol. Catal. A Chem.* **2003**, *200*, 137–146.
- [40] D. F. Wass, G. R. M. Dowson, *Conversion of Alcohols*, **2013**, US2013/0116481 A1.
- [41] G. Gregorio, G. F. Pregaglia, R. Ugo, *J. Organomet. Chem.* **1972**, *37*, 385–387.
- [42] C. Jin, M. Yao, H. Liu, C. F. F. Lee, J. Ji, *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2011**, *15*, 4080–4106.
- [43] J. Furukawa, T. Saegusa, T. Tsuruta, H. Fujii, T. Tatano, *J. Polym. Sci.* **1959**, *36*, 1959.
- [44] E. F. Degering, T. Stoudt, *J. Polym. Sci.* **1951**, *7*, 653–656.
- [45] K. I. Fujita, T. Yoshida, Y. Imori, R. Yamaguchi, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2278–2281.
- [46] E. Scherf, H.-J. Letsch, C. Schröder, A. T. Herrmann, *Verfahren zur Herstellung von metallfreien Guerbetalkoholen*, **1997**, DE19734673A1.
- [47] G. Müller, B. Gutsche, L. Jeromin, U. Steinberner, R. Sedelies, R. Bohlander, R. Ridinger, D. Springer, F. Büttgen, F. Bartschick, *Verfahren zur Herstellung von Guerbetalkoholen*, **1995**, DE19524245C1.
- [48] *Alkoholmischungen und deren Derivate*, **2003**, DE 20303420 U1.
- [49] R. L. Pruet, D. A. Young, C. B. Duncan, E. J. Mozeleski, *Process for the Condensation of Alcohols*, **1988**, EP 0299720 A2.
- [50] A. Wick, E. U. Mahnke, *Method for Producing Guerbet Alcohols*, **2012**, US

- 2012/0220806 A1.
- [51] Q. Liu, G. Xu, X. Wang, X. Mu, *Green Chem.* **2016**, *18*, 2811–2818.
- [52] J. T. Kozlowski, R. J. Davis, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 1588–1600.
- [53] W. Ueda, T. Ohshida, T. Kuwabara, Y. Morikawa, *Catal. Letters* **1992**, *12*, 97–104.
- [54] W. Ueda, T. Kuwabara, T. Ohshida, Y. Morikawa, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1558.
- [55] A. S. Ndou, N. J. Coville, *Appl. Catal. A Gen.* **2004**, *275*, 103–110.
- [56] J. I. Di Cosimo, V. K. Díez, M. Xu, E. Iglesia, C. R. Apesteguía, *J. Catal.* **1998**, *178*, 499–510.
- [57] S. Abelló, F. Medina, D. Tichit, J. Pérez-Ramírez, J. C. Groen, J. E. Sueiras, P. Salagre, Y. Cesteros, *Chem. - A Eur. J.* **2005**, *11*, 728–739.
- [58] P. Kuśtrowski, D. Sułkowska, L. Chmielarz, A. Rafalska-Łasocha, B. Dudek, R. Dziembaj, *Microporous Mesoporous Mater.* **2005**, *78*, 11–22.
- [59] M. León, E. Díaz, S. Ordóñez, *Catal. Today* **2011**, *164*, 436–442.
- [60] S. Ordóñez, E. Díaz, M. León, L. Faba, *Catal. Today* **2011**, *167*, 71–76.
- [61] C. Carlini, C. Flego, M. Marchionna, M. Noviello, A. M. Raspolli Galletti, G. Sbrana, F. Basile, A. Vaccari, *J. Mol. Catal. A Chem.* **2004**, *220*, 215–220.
- [62] S. Ogo, A. Onda, Y. Iwasa, K. Hara, A. Fukuoka, K. Yanagisawa, *J. Catal.* **2012**, *296*, 24–30.
- [63] S. Ogo, A. Onda, K. Yanagisawa, *Appl. Catal. A Gen.* **2011**, *402*, 188–195.
- [64] C. R. Ho, S. Shylesh, A. T. Bell, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 939–948.
- [65] Z. D. Young, S. Hanspal, R. J. Davis, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 3193–3202.
- [66] S. Hanspal, Z. D. Young, H. Shou, R. J. Davis, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 1737–1746.
- [67] L. Silvester, J.-F. Lamonier, J. Faye, M. Capron, R.-N. Vannier, C. Lamonier, J.-L. Dubois, J.-L. Couturier, C. Calais, F. Dumeignil, *Catal. Sci. Technol.* **2015**, *5*, 2994–3006.
- [68] C. Yang, Z. Y. Meng, *J. Catal.* **1993**, *142*, 37–44.
- [69] H. Bahrmann, H.-D. Hahn, D. Mayer, G. D. Frey, *Ullmann's Encycl. Ind. Chem.* **2013**, 1–6.
- [70] L. I. U. Yuan, X. U. E. Hui-feng, *Financ. Res.* **2012**, *1*, 1–7.
- [71] K. Weissermel, H.-J. Arpe, Hrsg., *Industrial Organic Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [72] H.-D. Hahn, G. Dämbkes, N. Rupprich, H. Bahl, G. D. Frey, *Ullmann's Encycl. Ind. Chem.* **2013**, 1–13.
- [73] H. Bahrmann, H. Bach, G. D. Frey, *Ullmann's Encycl. Ind. Chem.* **2009**, 1–8.
- [74] Z. Xia, U. Klöckner, B. Fell, *Lipid/Fett* **1996**, *98*, 313–321.
- [75] E. H. Pryde, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, *61*, 419–425.
- [76] E. N. Frankel, E. H. Pryde, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1977**, *54*, 873–881.
- [77] P. Durre, R. J. Fischer, A. Kuhn, K. Lorenz, W. Schreiber, B. Sturzenhofecker, S. Ullmann, K. Winzer, U. Sauer, *Fems Microbiol. Rev.* **1995**, *17*, 251–262.

- [78] M. Inui, M. Suda, S. Kimura, K. Yasuda, H. Suzuki, H. Toda, S. Yamamoto, S. Okino, N. Suzuki, H. Yukawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *77*, 1305–1316.
- [79] C. R. Shen, E. I. Lan, Y. Dekishima, A. Baez, K. M. Cho, J. C. Liao, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 2905–2915.
- [80] S. Atsumi, A. F. Cann, M. R. Connor, C. R. Shen, K. M. Smith, M. P. Brynildsen, K. J. Y. Chou, T. Hanai, J. C. Liao, *Metab. Eng.* **2008**, *10*, 305–311.
- [81] E. M. Green, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 337–343.
- [82] D. T. Jones, D. R. Woods, *Microbiol. Rev.* **1986**, *50*, 484–524.
- [83] Y. Dekishima, E. I. Lan, C. R. Shen, K. M. Cho, J. C. Liao, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11399–11401.
- [84] X. Sun, X. Shen, R. Jain, Y. Lin, J. Wang, J. Sun, J. Wang, Y. Yan, Q. Yuan, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 3760–85.
- [85] H. B. Machado, Y. Dekishima, H. Luo, E. I. Lan, J. C. Liao, *Metab. Eng.* **2012**, *14*, 504–511.
- [86] V. Menon, M. Rao, *Prog. Energy Combust. Sci.* **2012**, *38*, 522–550.
- [87] W. Higashide, Y. Li, Y. Yang, J. C. Liao, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 2727–2733.
- [88] A. J. A. Van Maris, A. A. Winkler, M. Kuyper, W. T. A. M. De Laat, J. P. Van Dijken, J. T. Pronk, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2007**, *108*, 179–204.
- [89] S.-J. Ha, J. M. Galazka, S. Rin Kim, J.-H. Choi, X. Yang, J.-H. Seo, N. Louise Glass, J. H. D. Cate, Y.-S. Jin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 504–509.
- [90] S. Katahira, M. Ito, H. Takema, Y. Fujita, T. Tanino, T. Tanaka, H. Fukuda, A. Kondo, *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, *43*, 115–119.
- [91] R. J. Marcheschi, H. Li, K. Zhang, E. L. Noey, S. Kim, A. Chaubey, K. N. Houk, J. C. Liao, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 689–697.
- [92] K. Alfonsi, J. Colberg, P. J. Dunn, T. Fevig, S. Jennings, T. A. Johnson, H. P. Kleine, C. Knight, M. A. Nagy, D. A. Perry, u. a., *Green Chem.* **2008**, *10*, 31–36.
- [93] J. P. Adams, C. M. Alder, I. Andrews, A. M. Bullion, M. Campbell-Crawford, M. G. Darcy, J. D. Hayler, R. K. Henderson, C. a. Oare, I. Pendrak, u. a., *Green Chem.* **2013**, *15*, 1542.
- [94] A. J. Mancuso, S.-L. Huang, D. Swern, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2480–2482.
- [95] A. J. Mancuso, D. S. Brownfain, D. Swern, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4148–4150.
- [96] A. J. Mancuso, D. Swern, *Synthesis (Stuttg)*. **1981**, 165–185.
- [97] K. E. Pfitzner, J. G. Moffatt, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3027–3028.
- [98] T. T. Tidwell, in *Org. React.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, **1990**, S. 297–555.
- [99] P. Gamez, I. W. C. E. Arends, J. Reedijk, R. A. Sheldon, *Chem. Commun.* **2003**, 2414–2415.
- [100] I. E. Markó, A. Gautier, R. Dumeunier, K. Doda, F. Philippart, S. M. Brown, C. J. Urch, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2004**, *43*, 1588–1591.
- [101] T. Nishimura, T. Onoue, K. Ohe, S. Uemura, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6011–6014.

- [102] T. Nishimura, T. Onoue, K. Ohe, S. Uemura, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6750–6755.
- [103] R. A. Sheldon, I. W. C. E. Arends, G.-J. ten Brink, A. Dijkman, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 774–781.
- [104] M. F. Semmelhack, C. R. Schmid, D. A. Cortés, C. S. Chou, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3374–3376.
- [105] G. Ragagnin, B. Betzemeier, S. Quici, P. Knochel, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3985–3991.
- [106] J. M. Hoover, S. S. Stahl, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16901–16910.
- [107] M. M. Yallapu, M. Jaggi, S. C. Chauhan, *Drug Discov. Today* **2012**, *17*, 71–80.
- [108] S. Zhang, C. Miao, D. Xu, W. Sun, C. Xia, *Cuihua Xuebao/Chinese J. Catal.* **2014**, *35*, 1864–1873.
- [109] M. Fabbrini, C. Galli, P. Gentili, D. Macchitella, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7551–7553.
- [110] L. Wang, S. Shang, G. Li, L. Ren, Y. Lv, S. Gao, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 2189–2193.
- [111] P. Lucio Anelli, C. Biffi, F. Montanari, S. Quici, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2559–2562.
- [112] R. A. Sheldon, I. W. C. E. Arends, G.-J. ten Brink, A. Dijkman, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 774–781.
- [113] R. A. Sheldon, I. W. C. E. Arends, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 1051–1071.
- [114] G. Tojo, M. Fernández, in *Oxid. Prim. Alcohols to Carboxylic Acids*, Springer, New York, **2007**, S. 79–103.
- [115] A. E. J. de Nooy, A. C. Besemer, H. van Bekkum, *Synthesis (Stuttg.)* **1996**, 1153–1176.
- [116] A. E. J. de Nooy, A. C. Besemer, H. van Bekkum, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8023–8032.
- [117] M. Zhao, J. Li, E. Mano, Z. Song, D. M. Tschaen, E. J. J. Grabowski, P. J. Reider, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2564–2566.
- [118] A. Wu, W. Yang, X. Pan, *Synth. Commun.* **1996**, *26*, 3565–3569.
- [119] R. Ciriminna, M. Pagliaro, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 245–251.
- [120] A. Dijkman, I. W. C. E. Arends, R. A. Sheldon, *Synlett* **2001**, 102–104.
- [121] A. Dijkman, I. W. C. E. Arends, R. A. Sheldon, *Chem. Commun.* **2000**, 271–272.
- [122] J. M. Bobbitt, C. Brückner, N. Merbouh, in *Org. React.* (Hrsg.: S.E. Denmark), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, **2009**, S. 103–424.
- [123] I. W. C. E. Arends, R. A. Sheldon, in *Mod. Oxid. Methods* (Hrsg.: J.-E. Bäckvall), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2010**, S. 147–185.
- [124] Q. Cao, L. M. Dornan, L. Rogan, N. L. Hughes, M. J. Muldoon, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 4524–43.
- [125] B. D. Hewitt, *Conversion of bisnoralcohol to bisnoraldehyde*, **1994**, WO95/16698.
- [126] O. Warburg, W. Christian, *Naturwissenschaften* **1932**, *20*, 688.

- [127] O. Warburg, W. Christian, *Biochem. Z.* **1933**, 266, 377–411.
- [128] R. G. Matthews, V. Massey, C. C. Sweeley, *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 9294–9298.
- [129] A. S. Abramovitz, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 5321–5326.
- [130] A. S. Abramovitz, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 5327–5336.
- [131] C. K. Winkler, G. Tasnádi, D. Clay, M. Hall, K. Faber, *J. Biotechnol.* **2012**, 162, 381–389.
- [132] K. Drauz, H. Gröger, O. May, Hrsg., *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2012**.
- [133] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2014**.
- [134] M. Hall, B. Hauer, R. Stuermer, W. Kroutil, K. Faber, *Tetrahedron Asymmetry* **2006**, 17, 3058–3062.
- [135] A. Müller, B. Hauer, B. Rosche, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2006**, 38, 126–130.
- [136] C. Stueckler, N. J. Mueller, C. K. Winkler, S. M. Glueck, K. Gruber, G. Steinkellner, K. Faber, *Dalton Trans.* **2010**, 39, 8472–8476.
- [137] E. Burda, T. Reiß, T. Winkler, C. Giese, X. Kostrov, T. Huber, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, 52, 9323–9326.
- [138] T. Reiß, W. Hummel, S. P. Hanlon, H. Iding, H. Gröger, *ChemCatChem* **2015**, 7, 1302–1311.
- [139] K. M. Fox, P. A. Karplus, *Structure* **1994**, 2, 1089–1105.
- [140] P. A. Karplus, K. M. Fox, V. Massey, *FASEB J.* **1995**, 9, 1518–26.
- [141] R. M. Kohli, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 32763–32770.
- [142] D. Xu, R. M. Kohli, V. Massey, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96, 3556–3561.
- [143] B. J. Brown, J. W. Hyun, S. Duvvuri, P. Andrew Karplus, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 2138–2145.
- [144] H. L. Messiha, N. C. Bruce, B. M. Sattelle, M. J. Sutcliffe, A. W. Munro, N. S. Scrutton, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 27103–27110.
- [145] H. S. Toogood, J. M. Gardiner, N. S. Scrutton, *ChemCatChem* **2010**, 2, 892–914.
- [146] F. G. Fischer, O. Wiedemann, *Liebigs Ann. Chem.* **1935**, 520, 52–70.
- [147] P. Gramatica, P. Manitto, D. Monti, G. Speranza, *Tetrahedron* **1988**, 44, 1299–1304.
- [148] P. Ferraboschi, P. Grisenti, R. Casati, A. Fiecchi, E. Santaniello, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1987**, 1743–1748.
- [149] P. Ferraboschi, S. Casati, E. Santaniello, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, 5, 19–20.
- [150] P. Gramatica, P. Manitto, D. Monti, G. Speranza, *Tetrahedron* **1987**, 43, 4481–4486.
- [151] A. Fryszkowska, H. Toogood, M. Sakuma, J. M. Gardiner, G. M. Stephens, N. S. Scrutton, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, 351, 2976–2990.

- [152] M. Hall, C. Stueckler, H. Ehammer, E. Pointner, G. Oberdorfer, K. Gruber, B. Hauer, R. Stuermer, W. Kroutil, P. Macheroux, u. a., *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350, 411–418.
- [153] M. Hall, C. Stueckler, B. Hauer, R. Stuermer, T. Friedrich, M. Breuer, W. Kroutil, K. Faber, *European J. Org. Chem.* **2008**, 1511–1516.
- [154] M. Hall, C. Stueckler, W. Kroutil, P. Macheroux, K. Faber, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, 46, 3934–3937.
- [155] D. J. Bougioukou, A. Z. Walton, J. D. Stewart, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 8558.
- [156] A. Müller, B. Hauer, B. Rosche, *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, 98, 22–29.
- [157] I. Thanos, A. Deffner, H. Simon, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1988**, 369, 451–60.
- [158] J. Pietruszka, M. Schölzel, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354, 751–756.
- [159] H. Eklund, B. V Plapp, J. P. Samama, C. I. Brändén, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 14349–58.
- [160] O. Kleifeld, A. Frenkel, J. M. L. Martin, I. Sagi, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 98–103.
- [161] C. Lee, D. L. Bedgar, L. B. Davin, N. G. Lewis, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 1127–34.
- [162] B. Youn, R. Camacho, S. G. a Moinuddin, C. Lee, L. B. Davin, N. G. Lewis, C. Kang, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 1687–97.
- [163] P. S. J. Cheetham, *Trends Biotechnol.* **1993**, 11, 478–488.
- [164] M. L. Fauconnier, A. Mpambara, J. Delcarte, P. Jacques, P. Thonart, M. Marlier, *Biotechnol. Lett.* **1999**, 21, 629–633.
- [165] M. M. W. Etschmann, D. Sell, J. Schrader, *Biotechnol. Lett.* **2003**, 25, 531–536.
- [166] F. Chamouleau, C. Hagedorn, O. May, H. Gröger, *Flavour Fragr. J.* **2007**, 22, 169–172.
- [167] N. Richter, M. Neumann, A. Liese, R. Wohlgemuth, T. Eggert, W. Hummel, *ChemBioChem* **2009**, 10, 1888–1896.
- [168] O. W. Gooding, R. Voladri, A. Bautista, T. Hopkins, G. Huisman, S. Jenne, S. Ma, E. C. Mundorff, M. M. Savile, S. J. Truesdell, u. a., *Org. Process Res. Dev.* **2010**, 14, 119–126.
- [169] D. Giacomini, P. Galletti, A. Quintavalla, G. Gucciardo, F. Paradisi, *Chem. Commun.* **2007**, 4038–40.
- [170] P. Galletti, E. Emer, G. Gucciardo, A. Quintavalla, M. Pori, D. Giacomini, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 4117–23.
- [171] J. A. Friest, Y. Maezato, S. Broussy, P. Blum, D. B. Berkowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 5930–5931.
- [172] A. Díaz-Rodríguez, N. Ríos-Lombardía, J. H. Sattler, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil, V. Gotor, *Catal. Sci. Technol.* **2015**, 5, 1443–1446.
- [173] D. P. Riley, D. P. Getman, G. R. Beck, R. M. Heintz, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 287–290.
- [174] C. S. Fuchs, M. Hollauf, M. Meissner, R. C. Simon, T. Besset, J. N. H. Reek, W. Riethorst, F. Zepeck, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, 356, 2257–2265.
- [175] „Römpp Enzyklopädie Online“, **2016**.

- [176] F. Robert, J. Héritier, J. Quiquerez, H. Simian, I. Blank, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3525–3529.
- [177] N. Shapiro, A. Vigalok, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *47*, 2849–2852.
- [178] J. R. McNesby, C. A. Heller, *Chem. Rev.* **1954**, *54*, 325–346.
- [179] A. Weckbecker, H. Gröger, W. Hummel, *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* **2010**, *120*, 195–242.
- [180] P. G. M. Wuts, Hrsg., *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, **2014**.
- [181] S. Mills, P. Beak, *J. Org. Chem.* **1985**, *15*, 1216–1224.
- [182] *Solvents and Solvent Effects In Organic Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [183] K. A. Ostrowski, D. Lichte, M. Stuck, A. J. Vorholt, *Tetrahedron* **2016**, *72*, 592–598.
- [184] Y. Watanabe, K. Sawada, M. Hayashi, *Green Chem.* **2010**, *12*, 384–386.
- [185] E. Vázquez-Figueroa, J. Chapparro-Riggers, A. S. Bommaris, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2295–2301.
- [186] A. Andreadeli, D. Platis, V. Tishkov, V. Popov, N. E. Labrou, *FEBS J.* **2008**, *275*, 3859–3869.
- [187] V. I. Tishkov, V. O. Popov, *Biomol. Eng.* **2006**, *23*, 89–110.
- [188] H. Größ, Bachelorarbeit, Universität Bielefeld, **2013**.
- [189] R. H. Myers, D. C. Montgomery, C. M. Anderson-Cook, *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, **2016**.
- [190] D. C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, **2004**.
- [191] P. Demarche, C. Junghanns, N. Mazy, S. N. Agathos, *N. Biotechnol.* **2012**, *30*, 96–103.
- [192] H. C. Kazici, E. Bayraktar, Ü. Mehmetoglu, *Green Process. Synth.* **2016**, *5*, DOI 10.1515/gps-2015-0118.
- [193] C. Mandenius, A. Brundin, *Biotechnol Progr* **2008**, *24*, 1191–1203.
- [194] A. Meynier, V. Rampon, M. Dalgalarondo, C. Genot, *Int. Dairy J.* **2004**, *14*, 681–690.
- [195] A. G. Baker, D. Wiesler, M. V. Novotny, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 613–624.
- [196] D. J. Tuma, C. A. Casey, *Alcohol Res. Health* **2003**, *27*, 285–90.
- [197] I. Migneault, C. Dartiguenave, M. J. Bertrand, K. C. Waldron, *Biotechniques* **2004**, *37*, 790–802.
- [198] B. Friguet, E. R. Stadtman, L. I. Szweda, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 21639–21643.
- [199] T. Ishii, E. Tatsuda, S. Kumazawa, T. Nakayama, K. Uchida, *Biochemistry* **2003**, *42*, 3474–3480.
- [200] A. L. Isom, S. Barnes, L. Wilson, M. Kirk, L. Coward, V. Darley-Usmar, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 1136–1147.

- [201] M. C. Reed, A. Lieb, H. F. Nijhout, *BioEssays* **2010**, *32*, 422–429.
- [202] C. Walter, E. Frieden, in *Biotechnol. Adv.*, **2006**, S. 167–274.
- [203] L. Cao, *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [204] D. Brady, J. Jordaan, *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1639–1650.
- [205] S. Cantone, V. Ferrario, L. Corici, C. Ebert, D. Fattor, P. Spizzo, L. Gardossi, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6262–76.
- [206] R. DiCosimo, J. McAuliffe, A. J. Poulouse, G. Bohlmann, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6437.
- [207] A. Liese, L. Hilterhaus, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6236–49.
- [208] C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451–1463.
- [209] R. C. Rodrigues, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernández-Lafuente, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6290–6307.
- [210] R. C. Rodrigues, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2216–2238.
- [211] R. A. Sheldon, S. Van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223–6235.
- [212] R. A. Sheldon, R. Schoevaart, L. M. Van Langen, *Biocatal. Biotransformation* **2005**, *23*, 141–147.
- [213] R. A. Sheldon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92*, 467–477.
- [214] R. A. Sheldon, *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1583–1587.
- [215] R. A. Sheldon, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 213–223.
- [216] R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289–1307.
- [217] L. Cao, L. van Langen, R. A. Sheldon, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 387–394.
- [218] P. Torres-Salas, A. Del Monte-Martinez, B. Cutiño-Avila, B. Rodriguez-Colinas, M. Alcalde, A. O. Ballesteros, F. J. Plou, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 5275–5282.
- [219] „Resindion Relizyme Information“, **2016**.
- [220] V. Stepankova, S. Bidmanova, T. Koudelakova, Z. Prokop, R. Chaloupkova, J. Damborsky, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2823–2836.
- [221] W. Hummel, unveröffentlichte Ergebnisse, Universität Bielefeld, **2016**.
- [222] D. Bulut, N. Duangdee, H. Gröger, A. Berkessel, W. Hummel, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 1349–1358.
- [223] P. Wanner, R. Triessl, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *255*, 271–278.
- [224] J.-L. Luche, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2226–2227.
- [225] A. L. Gemal, J. L. Luche, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5454–5459.
- [226] J. T. Mohr, A. Y. Hong, B. M. Stoltz, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 359–69.
- [227] C. Wittmann, R. Krull, Hrsg. , *Biosystems Engineering I*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2010**.
- [228] J. Davison, *Gene* **1984**, *28*, 1–15.

- [229] G. Selzer, T. Som, T. Itoh, J. Tomizawa, *Cell* **1983**, 32, 119–129.
- [230] N. H. Tolia, L. Joshua-Tor, *Nat. Methods* **2006**, 3, 55–64.
- [231] E. Mavridou, P. Antoniadis, R. Littke, A. Lücke, B. M. Krooss, *Org. Geochem.* **2008**, 39, 977–984.
- [232] W. Hilt, G. Pfeleiderer, P. Fortnagel, *Biochimica Biophys. Acta* **1991**, 1076, 298–304.
- [233] R. Kratzer, J. M. Woodley, B. Nidetzky, *Biotechnol. Adv.* **2015**, 33, 1641–1652.
- [234] D. B. Kell, N. Swainston, P. Pir, S. G. Oliver, *Trends Biotechnol.* **2015**, 33, 237–246.
- [235] J. A. m De Bont, *Trends Biotechnol.* **1998**, 16, 493–499.
- [236] H. Gröger, W. Hummel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 19, 171–179.
- [237] H. Sato, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, 54, 4488–4492.
- [238] H. Gröger, in *Org. Synth. Using Biocatal.* (Hrsg.: A. Goswami, J.D. Stewart), Elsevier, Amsterdam, **2015**, S. 39–66.
- [239] H. Gröger, W. Hummel, in *Green Biocatal.* (Hrsg.: R.N. Patel), John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, **2016**, S. 557–585.
- [240] P. Saling, A. Kicherer, B. Dittrich-Krämer, R. Wittlinger, W. Zombik, I. Schmidt, W. Schrott, S. Schmidt, *Int. J. Life Cycle Assess.* **2002**, 7, 203–218.
- [241] M. Eissen, J. O. Metzger, *Chem. - A Eur. J.* **2002**, 8, 3580.
- [242] M. Eissen, J. O. Metzger, E. Schmidt, U. Schneidewind, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, 41, 414–436.
- [243] I. Chiarotto, M. Feroci, M. Orsini, M. M. M. Feeney, A. Inesi, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, 352, 3287–3292.
- [244] B. Das, J. Banerjee, G. Mahender, A. Majhi, *Org. Lett.* **2004**, 6, 3349–3352.
- [245] A. Erkkilä, P. M. Pihko, *European J. Org. Chem.* **2007**, 4205–4216.
- [246] D. Abanda-Nkpwatt, W. Schwab, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 5939–5942.
- [247] S. C. Price, A. C. Stuart, W. You, *Macromolecules* **2010**, 43, 797–804.
- [248] P. Deng, B. Wu, Y. Lei, H. Cao, B. S. Ong, *Macromolecules* **2016**, 49, 2541–2548.
- [249] D. J. C. Constable, P. J. Dunn, J. D. Hayler, G. R. Humphrey, J. L. Leazer, Jr., R. J. Linderman, K. Lorenz, J. Manley, B. A. Pearlman, A. Wells, u. a., *Green Chem.* **2007**, 9, 411–420.
- [250] V. R. Pattabiraman, J. W. Bode, *Nature* **2011**, 480, 471–479.
- [251] E. Valeur, M. Bradley, *Chem Soc Rev* **2009**, 38, 606–631.
- [252] R. N. Patel, Hrsg. , *Green Biocatalysis*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, **2016**.
- [253] R. Brieva, F. Rebolledo, V. Gotor, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1, 1386.
- [254] V. Gotor, M. J. García, F. Rebolledo, *Tetrahedron: Asymmetry* **1990**, 1, 277–278.
- [255] A. Liljebblad, P. Kallio, M. Vainio, J. Niemi, L. T. Kanerva, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 886–895.

- [256] S. Simon, S. Oßwald, J. Roos, H. Gröger, *Zeitschrift für Naturforsch. B* **2012**, *67*, 1–4.
- [257] K. Yazawa, K. Numata, *Molecules* **2014**, *19*, 13755–13774.
- [258] M. Biermann, Masterarbeit, Universität Bielefeld, **2013**.
- [259] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.
- [260] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923–960.
- [261] E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6640–6646.
- [262] S. Tallon, A. C. Lawlor, S. J. Connon, *Arkivoc* **2011**, *2011*, 115–126.
- [263] L. Pierenkemper, Bachelorarbeit, Universität Bielefeld, **2013**.
- [264] I. Oszczapowicz, J. Mikolajczyk, P. Borowicz, *Pol. J. Chem.* **1990**, *64*, 387–388.
- [265] B. Procuranti, S. J. Connon, *Chem. Commun.* **2007**, 1421–1423.