

# **Prozessentwicklung der elektroenzymatischen Sulfoxidation mit Chlorperoxidase**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Stephan Lütz

aus

Hannover

Bonn 2004

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. C. Wandrey

2. Referent: Prof. Dr. K. Wandelt

Tag der Promotion: 25.10.2004

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

*“We shall not cease from exploration  
And the end of all our exploring  
Will be to arrive where we started  
And know the place for the first time.”*

T.S. Elliot (1888-1965)

*„This area is wide open for further  
creative research and only the tip  
of the iceberg has surfaced.“*

Prof. Dr. E. Steckhan (1943-2000)

*Für meine Familie*

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2000 bis Juli 2004 am Lehrstuhl für Biotechnologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. C. Wandrey angefertigt. Die praktischen Arbeiten wurden am Institut für Biotechnologie der Forschungszentrum Jülich GmbH durchgeführt.

Mein Dank gilt:

- Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. C. Wandrey für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung der Arbeitsmittel, für seine unerschöpfliche Diskussionsbereitschaft, seine Begeisterungsfähigkeit, die stets positive Sicht der Dinge und die lehrreiche Zeit bis jetzt und darüber hinaus.
- Herrn Prof. Dr. K. Wandelt, Institut für Physikalische Chemie der Universität Bonn, für die freundliche Übernahme des Korreferates.
- Herrn Prof. Dr. E. Steckhan († 10.02.2000) für die Inspiration.
- Herrn Prof. Dr. A. Liese, Institut für Biochemie, Universität Münster, für die hilfreichen Diskussionen, die praktischen Tipps und die persönliche Unterstützung sowie die kritische und zügige Durchsicht der Arbeit.
- Frau U. Mackfeld für ihre engagierte Unterstützung bei den Experimenten, ohne die diese Arbeit in diesem Umfang nicht möglich gewesen wäre.
- Frau Prof. Dr. D. Vasic-Racki, Universität Zagreb, für die hilfreichen Diskussionen und die Hilfe bei der Enzymkinetik.
- Herrn Prof. P.N. Bartlett und Dr. G. Denuault für die lehrreiche und angenehme Zeit in Southampton sowie zahlreiche Diskussionen.
- Herrn Dr. H. Pütter, Herrn Dr. T. Habicher und Herrn Prof. Dr. B. Hauer von der BASF AG für finanzielle Unterstützung und viele hilfreiche Diskussionen.
- Herrn Dr. K. Vuorilehto für die Anleitung in der dritten Dimension und die richtigen Fragen.
- Herrn M. Lièvre, Frau H. Franke, Herrn C. Reimers und Frau R. Lawrenz für die Unterstützung bei den praktischen Arbeiten.
- Herrn C. La Rotta Hernandez für die gute Kooperation zur chemischen Enzymmodifikation.
- Herrn Dr. J. Haberland, Frau Dipl.-Chem. R. Mertens und Frau Ai Wei Tan, M.Phil. für die gute Büroatmosphäre, Diskussionen und die Geduld mit mir.

- Herrn Dr. M. Schuster für das Durchlesen und Korrigieren.
- Frau C. Kohlmann dafür, mich anzutreiben, und ihren Einsatz.
- Allen Mitgliedern des Arbeitskreises, insbesondere denen der 'Enzymgruppe', für die vielen Hilfestellungen und die gute Arbeitsatmosphäre.
- Den Damen und Herren der Werkstätten, des Elektronik- und des Photolabors für die immer wieder gewährte, teilweise sehr kurzfristige, Unterstützung.
- Dem Evangelischen Studienwerk Villigst e.V. für die nicht nur finanzielle Unterstützung.
- Meinen Eltern für die Unterstützung des Studiums sowie ihr reges Interesse an meiner Arbeit.
- Melanie für Alles.

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Energie in biologischen Systemen.....	1
1.2	Energie in chemischen Systemen .....	7
1.3	Elektroenzymatik.....	10
1.3.1	Elektroenzymatische Regenerationszyklen .....	10
1.3.2	Elektroenzymatische Reaktionssequenzen .....	11
2	Aufgabenstellung.....	21
2.1	Zielsetzung .....	21
3	Elektrochemie unter biokatalytischen Aspekten .....	23
3.1	Einleitung .....	23
3.2	Systemuntersuchungen .....	25
3.2.1	Pufferkapazität und pH-Wert.....	25
3.2.2	Leitfähigkeit.....	27
3.2.3	Stromausbeute .....	30
3.2.4	Bestimmung der Sauerstoffkonzentration .....	32
3.2.5	Diffusion und Viskosität.....	34
3.3	Zusammenfassung .....	39
4	Biokatalyse unter elektrochemischen Aspekten .....	41
4.1	Einleitung .....	41
4.1.1	Chloroperoxidase.....	41
4.1.2	Sulfoxide.....	46
4.2	Systemuntersuchungen .....	53
4.2.1	Enzymstabilität .....	53
4.2.2	Enzymaktivität.....	55
4.3	Chemische Modifikation der Chloroperoxidase.....	72
4.4	Zusammenfassung .....	82
5	Elektroenzymatische Reaktionstechnik.....	85
5.1	Einleitung .....	85
5.1.1	Grundtypen chemischer Reaktoren .....	86
5.1.2	Limitierung durch Wasserstoffperoxid.....	87
5.1.3	Reaktionstechnische Kenngrößen .....	88
5.2	Versuche mit der rotierenden Ring-Scheiben-Elektrode (RRDE).....	90
5.3	Reaktoren und Begasung.....	97
5.3.1	2D-Zelle.....	97
5.3.2	3D-Zelle.....	98
5.4	Batch-Umsetzungen.....	103
5.4.1	Batch-Umsetzungen in der 2D-Zelle .....	103
5.4.2	Batch-Umsetzungen mit modifizierter CPO .....	106
5.4.3	Regulierung der Reaktionsrate .....	110
5.4.4	Veränderung der <i>tert</i> -Butanol-Konzentration .....	114

---

5.4.5	Zusammenfassung der Batch-Reaktionen .....	115
5.5	Produktion .....	117
5.5.1	Satzreaktor-Versuch mit optimierter Produktivität .....	122
5.5.2	Fed-Batch-Elektrolyse zur Sulfoxid-Produktion .....	123
5.5.3	Aufarbeitung .....	127
5.5.4	Isoliertes Produkt .....	129
5.6	Zusammenfassung .....	130
6	Diskussion und Ausblick .....	131
6.1	Einfluss des Oxidationsmittels .....	131
6.2	Elektrochemische H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Dosierung .....	134
6.3	Verfahrensoptimierung .....	137
6.4	Verknüpfung .....	141
7	Zusammenfassung .....	143
8	Material und Methoden .....	145
8.1	Geräte .....	145
8.2	Chemikalien .....	146
8.3	Analytik .....	147
8.3.1	UV-Analytik .....	147
8.3.2	GC-Analytik .....	150
8.3.3	elektrochemische Analytik .....	151
8.3.4	Proteinanalytik .....	151
8.4	Messungen in der 3D-Zelle .....	152
8.4.1	Messung der Stromausbeute .....	152
8.4.2	Batch-Reaktionen .....	152
8.4.3	Verwendung der chemisch modifizierten CPO .....	153
8.4.4	Fed-Batch .....	153
8.5	Messungen in der 2D-Zelle .....	154
8.6	Produktaufarbeitung .....	154
8.7	Enzymmodifikation .....	155
8.7.1	CPO-Modifikationsreaktion .....	155
8.7.2	Bestimmung der freien Aminogruppen .....	155
8.7.3	Änderung der Hydrophobizität .....	155
8.7.4	Bestimmung der Temperaturstabilität .....	155
8.7.5	Einfluss des organischen Mediums auf die Enzymaktivität .....	155
8.8	Enzymkinetik .....	156
8.8.1	Peroxidase-Kinetik .....	156
8.8.2	Halogenase-Kinetik .....	156
8.9	Chemische Sulfoxidation .....	157
9	Anhang .....	158
9.1	Scientist-Modelle .....	158
9.1.1	Nicht-Lineare Regression für die Enzymkinetik .....	158
9.1.2	Simulation der Batch-Reaktionen .....	159

9.2	Eine kleine Einführung in die RRDE .....	160
9.2.1	Stofftransport an Elektrodenoberflächen.....	160
9.2.2	Die rotierende Elektrode.....	161
9.2.3	Strom-Spannungs-Kurven .....	163
9.2.4	Das Übertragungsverhältnis .....	166
9.2.5	Kinetische Untersuchungen mit der RRDE.....	166
9.3	Literaturverzeichnis .....	169
	Lebenslauf .....	179

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.1: Energieübertragung durch Photosynthese. ....	1
Abbildung 1.1.2: Reduzierte (unten, NADH) und oxidierte Form (oben, NAD <sup>+</sup> ) des Nicotinamidadenindinucleotid.....	2
Abbildung 1.1.3: Anordnung der Redoxsysteme der Atmungskette nach Redoxpotentialen. ....	4
Abbildung 1.1.4: Anordnung der Redoxsysteme der Atmungskette in der Mitochondrienmembran. ....	5
Abbildung 1.1.5: Protonenflüsse und Redoxkomplexe in der Mitochondrien-Membran	6
Abbildung 1.2.1: Chemische und elektrochemische Oxidationsreaktion.....	7
Abbildung 1.2.2: Änderung der Freien Energie G im Verlauf eines Elektronentransfers a und in Abhängigkeit vom angelegten Potential b.....	8
Abbildung 1.2.3: Produktion von Adiponitril nach dem Monsanto-Verfahren. ....	9
Abbildung 1.2.4: Gepaarte Elektrolyse in einer "200% Zelle". ....	9
Abbildung 1.3.1: Schematische Darstellung der direkten (links) und indirekten Elektrolyse (rechts).....	10
Abbildung 1.3.2: Elektroenzymatisch Synthese von (S)-4-Phenyl-2-butanol mit polymeervergrößertem (P) Mediator im EEMR.....	11
Abbildung 1.3.3: Funktionsweise eines Glucose-Sensors der ersten Generation. ....	12
Abbildung 1.3.4: Darstellung eines chiralen Sulfoxids in einer elektroenzymatischen Sequenz.....	12
Abbildung 2.1.1: Einfluss des Reaktionsmediums auf elektrochemische und biokatalytische Größen. ....	22
Abbildung 3.1.1: Cyclovoltammogramm der Sauerstoffreduktion. ....	24
Abbildung 3.1.2: Genereller Ablauf einer elektrochemischen Reaktion.....	25
Abbildung 3.2.1: Pufferkapazität aus den Titrationskurven von Phosphor-, Essig- und Citronensäure.....	26
Abbildung 3.2.2: <i>t</i> -BuOH-Zusatz zu Acetat- und Phosphatpuffer. ....	27
Abbildung 3.2.3: Abnahme der Leitfähigkeit durch Zusatz von <i>t</i> -BuOH. ....	29
Abbildung 3.2.4: Stromausbeute als Funktion der Zellspannung in unterschiedlichen Puffern. ....	30
Abbildung 3.2.5: Stromausbeute als Funktion des Elektrodenmaterials.....	31
Abbildung 3.2.6: Sauerstoffkonzentration in Acetat-Puffer in Abhängigkeit von der <i>tert</i> -Butanolkonzentration. ....	33
Abbildung 3.2.7: Potential-Schritt-Experiment (Chronoamperometrie).....	34
Abbildung 3.2.8: Strom-Zeit-Verlauf des Potential-Schritt-Experiments.....	35
Abbildung 3.2.9: Diffusionskoeffizient und Viskosität in Abhängigkeit von der <i>tert</i> -Butanol-Konzentration .....	37
Abbildung 3.2.10: Cyclovoltammogramme mit unterschiedlichem <i>tert</i> -Butanol-Zusatz .....	38
Abbildung 4.1.1: Enantioselektive Oxidation von Thioanisol zu ( <i>R</i> )-Methylphenylsulfoxid.....	41

---

Abbildung 4.1.2: Bild der Strukturhelices der CPO ohne Zuckerbausteine.....	42
Abbildung 4.1.3: Ferriprotoporphyrin IX.....	43
Abbildung 4.1.4: Mechanismen der Halogenase- und Peroxidase-Reaktion (Die Häm-Gruppe ist schematisch als Raute dargestellt).....	44
Abbildung 4.1.5: Nicht selektive Oxidationsreaktionen in Gegenwart von Halogenid-Ionen.....	45
Abbildung 4.1.6: Selektive Oxidationsreaktionen in Abwesenheit von Halogenid-Ionen.....	45
Abbildung 4.1.7: Allgemeine Strukturformeln chiraler Sulfoxide.....	46
Abbildung 4.1.8: Beispiele für Sulfoxide als Medikamente.....	48
Abbildung 4.1.9: Chiralitätstransfer bei einer [2,3]-sigmatropen Umlagerung.....	49
Abbildung 4.1.10: (+)-Compactin (R=H), (+)-Mevilonin (R=CH <sub>3</sub> ) und (+)-Provastatin (R=OH).....	49
Abbildung 4.1.11: Aliphatische und Cyclische $\beta$ -Ketosulfide (n=1,2) als Substrate für die CPO.....	51
Abbildung 4.1.12: Cyclische Sulfide (n=1,2) als Substrate für die CPO.....	51
Abbildung 4.1.13: Methionin-Derivate als Substrate für die CPO.....	51
Abbildung 4.2.1: Lagerstabilität der CPO.....	54
Abbildung 4.2.2: Desaktivierung der CPO durch Zusatz von <i>t</i> -BuOH.....	55
Abbildung 4.2.3: Photometrische Assays zur Messung der Peroxidase-Aktivität.....	56
Abbildung 4.2.4: Enzymaktivität in unterschiedlichen Puffern und Cosolvens-Anteilen.....	57
Abbildung 4.2.5: pH- und Temperatur-Abhängigkeit der CPO-Aktivität.....	58
Abbildung 4.2.6: Enzymaktivität als Funktion der Thioanisolkonzentration.....	59
Abbildung 4.2.7: Variation der Wasserstoffperoxid-Konzentration im Thioanisol-Assay.....	61
Abbildung 4.2.8: Einfluss der Ionenstärke auf $k_{cat}$ und $K_M$ nach [Buchholz, Kasche 1997].....	62
Abbildung 4.2.9: Einfluss der Thioanisol-Konzentration auf die Peroxidase-Aktivität.....	64
Abbildung 4.2.10: Einfluß der Wasserstoffperoxid-Konzentration auf die Peroxidase-Aktivität.....	65
Abbildung 4.2.11: MCD-Assay für die Halogenase-Aktivität.....	66
Abbildung 4.2.12: Einfluß des Kations auf die Halogenase-Aktivität.....	67
Abbildung 4.2.13: pH und Temperatur-Optima der Halogenase-Reaktion.....	67
Abbildung 4.2.14: Halogenase-Aktivität in unterschiedlichen Puffern.....	68
Abbildung 4.2.15: Einfluss der MCD-Konzentration auf die CPO-Aktivität.....	69
Abbildung 4.2.16: Kinetische Untersuchungen zur Halogenase-Aktivität.....	70
Abbildung 4.3.1: Aktivierung von Carboxylgruppen durch Carbodiimide.....	72
Abbildung 4.3.2: Reduktive Arylierung von Proteinen mit 9-Anthraldehyd.....	74
Abbildung 4.3.3: Anzahl der modifizierten Aminogruppen in Abhängigkeit des eingesetzten Reagenz-Überschusses.....	76

---

Abbildung 4.3.4: Relative Aktivität der modifizierten CPO in Abhängigkeit des eingesetzten Reagenz-Überschusses.....	77
Abbildung 4.3.5: Erniedrigung der CPO-Löslichkeit in der wässrigen Phase in Abhängigkeit des eingesetzten Reagenz-Überschusses. ....	78
Abbildung 4.3.6: Veränderung der Hydrophobizität durch die chemische Modifikation. ....	79
Abbildung 4.3.7: Erhöhung der Temperaturstabilität der modifizierten CPO .....	80
Abbildung 4.3.8: Veränderung der Cosolvens-Stabilität durch Modifikation .....	81
Abbildung 5.1.1: Charakteristika chemischer Reaktoren.....	85
Abbildung 5.1.2 : Desaktivierungsmechanismus von Häm-Peroxidasen. ....	87
Abbildung 5.1.3: Ziele einer Prozessentwicklung für eine Biotransformation. ....	88
Abbildung 5.2.1: Das an der RRDE untersuchte Reaktionssystem.....	90
Abbildung 5.2.2 : Kinetikbestimmung einer Reaktion erster Ordnung mit RRDE.....	92
Abbildung 5.2.3 : Kinetikbestimmung einer Reaktion zweiter Ordnung mit RRDE.....	93
Abbildung 5.2.4: Scheibenstrom ( $I_D$ ) und Ringstrom ( $I_R$ ) bei unterschiedlichen Rotationsgeschwindigkeiten.....	94
Abbildung 5.3.1: Ungeteilte und Geteilte elektrochemische Zelle. ....	97
Abbildung 5.3.2: Schemazeichnung und Foto des 2D-Reaktors.....	97
Abbildung 5.3.3: Foto der 3D-Zelle. ....	99
Abbildung 5.3.4: Technische Zeichnung der 3D-Zelle (Anodenteil links, Kathodenteil rechts). ....	99
Abbildung 5.3.5: Kreislaufreaktor.....	100
Abbildung 5.3.6: Begasung der Reaktionslösung im Kreislaufreaktor im Kopfraum (links) und durch eine Glasfritte (rechts).....	101
Abbildung 5.4.1: Batch in Citrat-Puffer im 2D-Reaktor.....	103
Abbildung 5.4.2: Batch in Acetat-Puffer im 2D-Reaktor.....	105
Abbildung 5.4.3: Batch mit EDAC-CPO in 2D-Zelle.....	106
Abbildung 5.4.4: Batch mit Glut-CPO in 2D-Zelle.....	107
Abbildung 5.4.5: Batch mit 9A-CPO in 2D-Zelle.....	108
Abbildung 5.4.6: Batch-Reaktionen mit Glut-CPO und EDAC-CPO im 3D-Reaktor. ....	109
Abbildung 5.4.7: Regulierung der Reaktionsrate in 2D-Zelle. ....	110
Abbildung 5.4.8: Regulierung der Reaktionsrate in 3D-Zelle. ....	111
Abbildung 5.4.9: Schematische (links) und mechanistische (rechts) Darstellung der Desaktivierung während der Reaktion. ....	113
Abbildung 5.4.10: Verlauf der Wasserstoffperoxid-Konzentration während der Reaktion.....	114
Abbildung 5.4.11: $t_{90}$ bei Elektrolysen mit unterschiedlichem <i>t</i> -BuOH Gehalt. ....	115
Abbildung 5.5.1: Strömungsrohrreaktor mit nicht immobilisierter CPO.....	117
Abbildung 5.5.2: Simulation verschiedener Batch-Reaktionen zur Sulfoxidation unter Vernachlässigung der Grunddesaktivierung.....	120
Abbildung 5.5.3: Simulation verschiedener Batch-Reaktionen zur Sulfoxidation unter Berücksichtigung der Grunddesaktivierung.....	121

---

---

Abbildung 5.5.4: Batch mit optimierter Produktivität im 3D-Reaktor.....	123
Abbildung 5.5.5: Löslichkeiten von Produkt und Substrat in Abhängigkeit vom Cosolvens-Anteil. ....	124
Abbildung 5.5.6: Fed-Batch im 3D-Reaktor. ....	125
Abbildung 5.5.7: Enzymdosierung und Aktivitätsverlauf während des Fed-Batch. ....	126
Abbildung 5.5.8: Schematische Darstellung der Produktaufarbeitung. ....	127
Abbildung 5.5.9: Extraktion des Produktes mit EtOAc aus der wässrigen Phase.....	128
Abbildung 5.5.10: 1,2g ( <i>R</i> )-Methylphenylsulfoxid aus der elektroenzymatischen Synthese.....	129
Abbildung 6.1.1: Schematische Darstellung der Substratabhängigkeit der Desaktivierung.....	132
Abbildung 6.1.2: Schematische Darstellung der Desaktivierung der CPO durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	133
Abbildung 6.2.1: Vergleich der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Dosiersysteme.....	134
Abbildung 6.2.2: Brutto-Reaktionsgleichung der elektroenzymatischen Sulfoxidation. .....	135
Abbildung 6.2.3: Monooxygenase-katalysierte Epoxidierung ('shunt' Reaktionsweg)	135
Abbildung 6.3.1: Erzielte Produktivitäten in unterschiedlichen Reaktoren als Funktion der Stromstärke.....	137
Abbildung 6.3.2: Beispielrechnung zu den Herstellkosten für 1 kg Sulfoxid mit rekombinanter CPO .....	139
Abbildung 6.3.3: Simulation eines Fed-Batch zur Sulfoxid-Produktion .....	139
Abbildung 6.4.1: Kleblattknoten .....	141
Abbildung 8.3.1 UV-Spektren von Thioanisol und ( <i>R</i> )-Methylphenylsulfoxid.....	148
Abbildung 8.3.2 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von Thioanisol.....	149
Abbildung 8.3.3 Kalibriergerade .....	150
Abbildung 9.2.1 Konzentrationsprofil an einer Elektrode .....	160
Abbildung 9.2.2 : Aufbau und hydrodynamische Profile einer rotierenden Elektrode.	161
Abbildung 9.2.3 : Schematische Strömungslinien und Geschwindigkeitskomponenten in der Elektrodenumgebung.....	162
Abbildung 9.2.4 : Aufbau einer rotierenden Ring-Scheiben Elektrode. ....	162
Abbildung 9.2.5 : Schematischer Aufbau eines RRDE – Experimentes.....	163
Abbildung 9.2.6 : Steady-State-Voltammogramm an einer rotierenden Elektrode mit Konzentrationsprofilen an charakteristischen Punkten. ....	165
Abbildung 9.2.7 : Kinetikbestimmung einer Reaktion erster Ordnung mit RRDE.....	167
Abbildung 9.2.8 : Kinetikbestimmung einer Reaktion zweiter Ordnung mit RRDE...	168

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.3.1 Elektroenzymatische Synthesen .....	14
Tabelle 2.1.1 Literaturbeschriebene Reaktionsbedingungen für CPO-katalysierte Sulfoxidation .....	21
Tabelle 3.2.1 Leitfähigkeit verschiedener Pufferlösungen .....	28
Tabelle 3.2.2 Diffusionskoeffizienten D bei unterschiedlichem <i>tert</i> -Butanol-Gehalt....	36
Tabelle 3.2.3 Viskosität von Acetat-Puffer bei unterschiedlichem <i>tert</i> -Butanol-Gehalt. .....	36
Tabelle 4.1.1 Katalysatoren für die enantioselektive Synthese von Sulfoxiden. ....	47
Tabelle 4.1.2 Substrate vom Typ R <sub>1</sub> -S-R <sub>2</sub> für die CPO-katalysierte Oxidation.....	50
Tabelle 4.2.1 Parameter für eine Ein-Substrat-Kinetik zur Thioanisol-Oxidation.....	59
Tabelle 4.2.2 Nicht-Lineare Regression der Messwerte durch Inhibierungsmodelle. ...	60
Tabelle 4.2.3 Zusammensetzung von 1 L Puffermedium.....	63
Tabelle 4.2.4 Ergebnisse der nicht-linearen Regression zum Peroxidase-Modell. ....	65
Tabelle 4.2.5 Ergebnis der nicht-linearen Regression zum Halogenase-Modell .....	71
Tabelle 4.3.1 Reagentien zur chemischen Modifikation von Enzymen.....	73
Tabelle 4.3.2 Anzahl der modifizierbaren Aminosäuren der CPO.....	75
Tabelle 5.1.1 Desaktivierung von CPO in Gegenwart von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	87
Tabelle 5.2.1 Übertragungsverhältnisse bei unterschiedlichen Rotationsgeschwindigkeiten.....	95
Tabelle 5.4.1 Parameter zur Simulation der regulierten Batch-Reaktion.....	112
Tabelle 5.4.2 Ergebnisse der Batch-Reaktionen im 2D- und 3D-Reaktor .....	116
Tabelle 6.3.1 Oberfläche / Volumen – Verhältnis A <sub>v</sub> im 2D- und 3D-Reaktor.....	138
Tabelle 8.3.1 Kalibrierungen für Thioanisol und ( <i>R</i> )-Methylphenylsulfoxid .....	151
Tabelle 8.8.1 Ergebnisse der nicht-linearen Regression zum ausführlichen Peroxidase- Modell.....	156

## Abkürzungen und Symbole

*„Die Fachsprache des Wissenschaftlers ist aus der Not geboren [...].  
Daß wir uns dabei aber tatsächlich uns sonst unerkennbar bleibenden  
objektive Eigenschaften der Welt annähern, wird durch überprüfbare  
Resultate am Ende derartiger Formelketten bewiesen.“*

Hoimar von Ditfurth (1921-1989)

<b>Abk.</b>	<b>Bedeutung</b>
(aq)	in wässriger Lösung
AAP	4-Aminoantipyrin
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonsäure)
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$	Energiebarrierefaktor
bpy	Bipyridyl
Brig	Polyoxyethylenlaurylether
Bu	Butyl
Compound I	oxidierte Form von Häm-Enzymen
cp <sup>*</sup>	Pentamethylcyclopentadienyl-Anion
CPO	Chlorperoxidase
cyt	Cytochrom
DCD	Dichlordimedon
DCP	Dichlorphenol
DET	Diethyltartrat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ee	Enantiomerenüberschuss, engl.
EEMR	elektrochemischer EMR
EMR	Enzym-Membran-Reaktor
EPMH	Ethylphenolmethylen-Hydroxylase
Et	Ethyl
FAD	Flavinadenindinucleotid

Fd	Ferredoxin
FeS	Eisen-Schwefel-Cluster
FMN	Flavinmononukleotid
FNR	Fd-NADP-Reductase
GDH	Glucosedehydrogenase
GPDH	Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase
HbpA	Hydroxybiphenyl-Monooxygenase
HLADH	ADH aus Pferdeleber, engl.
HRP	Merretich Peroxidase
HSDH	Testosteron-17- $\beta$ -Dehydrogenase
<i>i</i>	<i>iso</i>
ICDH	<i>iso</i> -Citronensäure Dehydrogenase
K	Gleichgewichtskonstante
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MCD	Monochlordimedon
ME	Malat-Enzym
Me	Methyl
MMS	Quecksilber Quecksilbersulfat-Referenz-Elektrode
MV	Methylviologen
<i>n</i>	unverzweigt, bei Alkanen
n.b.	nicht bestimmt
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotid
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
O	oxidierte Spezies
Ox	Oxidiert
PCMH	p-Cresolmethyl-Hydroxylase
PD	1,10-Phenanthrolin-Dion
PDMe	1-Methyl-1,2-Phenanthrolin-5,6-omium
PEG	Polyethylenglykol
POD	Peroxidase
Pr	Propyl
R	reduzierte Spezies
RDE	rotierende Scheiben-Elektrode, engl. rotating disc electrode
Red	Reduziert
RRDE	rotierende Ring-Scheiben-Elektrode, engl. rotating ring disc electrode
StyA	Styrol-Monooxygenase
<i>t, tert</i>	Tertiär
tmphen	(3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthrolin
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
ttn	maximale Zykluszahl, engl. total turnover number
Tween	Polyoxyethylensorbitantristearat
UV	Ultraviolett

---

vol%	Volumenprozent, %(v/v)
Y	Hefe, engl. yeast
z	Anzahl Elementarladungen, Anzahl Elektronen

---

<b>Symbol</b>	<b>übliche Einheit</b>	<b>Bedeutung</b>
A	cm <sup>2</sup>	Fläche
A <sub>Enzym</sub>	U mL <sup>-1</sup>	Enzymaktivität bezogen auf das Reaktorvolumen
C <sub>X</sub>	Verschiedene	Konzentration der Komponente X
D	cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>	Diffusionskoeffizient
E	V	Potential
E <sup>0</sup>	V	Standardpotential
E <sup>0'</sup>	V	formales Elektrodenpotential
E <sub>D</sub>	V	Scheibenpotential
E <sub>R</sub>	V	Ringpotential
F	C mol <sup>-1</sup>	<i>Faraday</i> 'sche Konstante
ΔG	kJ mol <sup>-1</sup>	<i>Gibbs</i> freie Standardenthalpie
G	S (Ω <sup>-1</sup> )	Leitwert
I	A	Stromstärke
I	mol	Ionenstärke
κ	mS cm <sup>-1</sup>	(spezifische) Leitfähigkeit
k <sub>cat</sub>		katalytische Effizienz, Geschwindigkeitskonstante pseudo-zweiter Ordnung
K <sub>des</sub>	% min <sup>-1</sup>	Desaktivierungskonstante
K <sub>i,X</sub>	mM	Inhibierungskonstante von X
K <sub>M,X</sub>	mM	Michaelis-Menten Konstante von X
λ	nm	Wellenlänge
M	g mol <sup>-1</sup>	Molgewicht
μ	mPa s	dynamische Viskosität
n	mol	Stoffmenge
ν	cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>	kinematische Viskosität
Q	C	Ladung
ρ	g mL <sup>-1</sup>	Dichte
R	Z	Widerstand
ρ	cm mS <sup>-1</sup>	(spezifischer) Widerstand
T	Verschiedene	Zeit
T	°C	Temperatur
tof	min <sup>-1</sup>	Wechselzahl, engl.
u	cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> V <sup>-1</sup>	Ionenbeweglichkeit
V	mL, L	Volumen
v <sub>fl</sub>	mL min <sup>-1</sup>	Fliessgeschwindigkeit
v <sub>max</sub>	U mg <sup>-1</sup> ; U mL <sup>-1</sup>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit





# 1 Einleitung

## 1.1 Energie in biologischen Systemen

In lebenden Systemen, wie Mikroorganismen, Pflanzen, Tieren und Menschen laufen stets Kaskaden biochemischer Reaktionen ab, die von Energieumsatz begleitet bzw. durch Energiezufuhr am Laufen gehalten werden. Die meisten dieser Reaktionen sind Teil eines metabolischen Weges, d.h. einer Sequenz von Reaktionen, die ein oder mehrere spezifische Produkte bildet.

Der Metabolismus kann in zwei Kategorien unterteilt werden:

- Katabolismus: Abbaureaktionen, bei denen Verbindungen zur Energiegewinnung in kleinere Komponenten zerlegt werden
- Anabolismus: Aufbaureaktionen von komplexen Biomolekülen aus einfacheren Bausteinen (meist unter Energieverbrauch)

Die biochemischen Reaktionen in Zellen sind eng mit dem Energiehaushalt der Zelle verbunden [Karlson, *et al.* 1994]. Ein Großteil der Energie, die den Prozessen in lebenden Zellen zugrunde liegt, lässt sich auf die Energieumwandlung durch die Photosynthese in Pflanzen und Mikroorganismen zurückführen.

Pflanzen wandeln die Energie der elektromagnetischen Wellen des Sonnenlichts in chemische Energie um, indem sie aus Kohlendioxid und Wasser Kohlenhydrate synthetisieren. Wird Energie für andere biologische Funktionen, z.B. für Muskelbewegung benötigt, werden diese energiereichen Verbindungen wieder abgebaut. Schematisch ist der Zusammenhang der Energieumwandlung in Abbildung 1.1.1 am Beispiel der Reduktion von Kohlendioxid zu Kohlenhydraten und deren Reoxidation dargestellt.

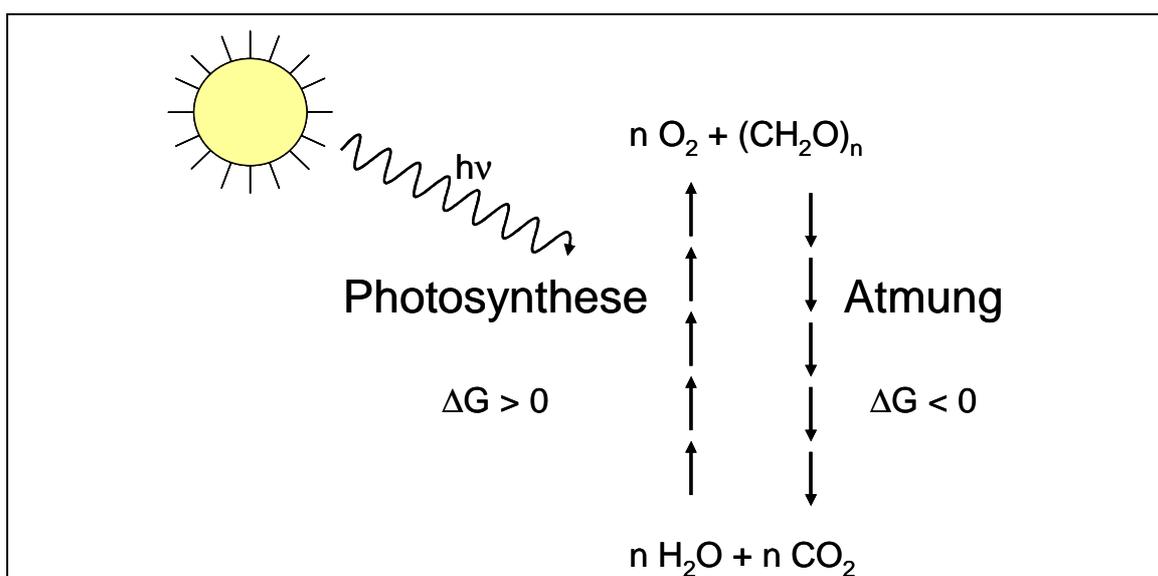
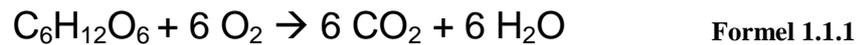


Abbildung 1.1.1: Energieübertragung durch Photosynthese.

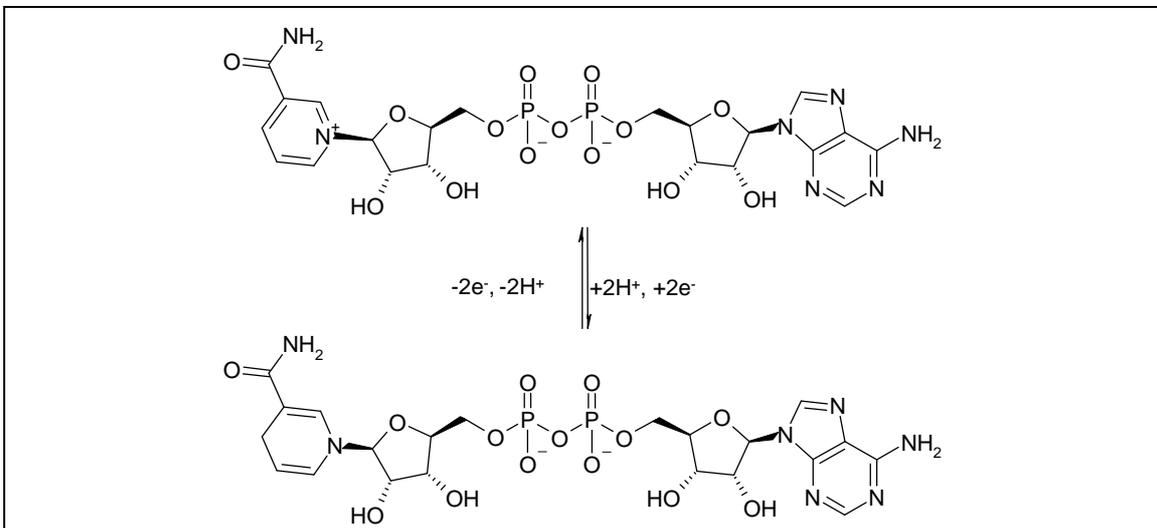
Hieraus wird schnell deutlich, dass in biologischen Systemen Energietransport und Massentransport immer gekoppelt ablaufen. Dies ist eines der grundlegenden biologischen Prinzipien [Liese 2003].

Ein wesentliches Energiemolekül in dieser Kopplung ist Glucose, deren "Verbrennung" durch die Atmung den Organismen Energie liefert. Die Oxidation der Glucose mit Luftsauerstoff verläuft gemäß Formel 1.1.1 sehr stark exergonisch. Die große auftretende Energiemenge ist nicht mit einem biologischen System kompatibel [Fritsche 2002].



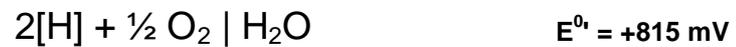
$$\Delta G^0 = -2869 \text{ kJ mol}^{-1}$$

Daher ist die Glucose-Oxidation in den Zellen, wie die Biosynthese und der Abbau anderer Kohlehydrate, in eine Kaskade von Reaktionen zerlegt. Die Reaktionen dieser Kaskade werden von vielen verschiedenen Enzymen katalysiert. Für die Energieübertragung in den Ab- und Aufbaureaktionen benötigen die Enzyme Hilfsstoffe, die Coenzyme oder Kofaktoren, deren wichtigster Vertreter das Nicotinamidadenindinucleotid ( $\text{NAD}^+$ ) ist (Abbildung 1.1.2). In der Kaskade werden durch Oxidation der Glucose viele Moleküle  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  reduziert und somit die chemische Energie in biokompatiblere Energieportionen aufgeteilt.



**Abbildung 1.1.2: Reduzierte (unten,  $\text{NADH}$ ) und oxidierte Form (oben,  $\text{NAD}^+$ ) des Nicotinamidadenindinucleotid.**

Durch Oxidation mit Sauerstoff bei der Atmung (Abbildung 1.1.1, rechte Seite) wird  $\text{NADH}$  gemäß Formel 1.1.2 wieder in  $\text{NAD}^+$  überführt; als Nebenprodukt entsteht Wasser.



$$\Delta E = 1135 \text{ mV}$$

Die freie Energie dieser Reaktion ergibt sich aus der Differenz der Redoxpotentiale. Gemäß der elektrochemischen Gleichgewichtsbedingung (Formel 1.1.3, [Atkins 2000]) kann aus der Potentialdifferenz die freie Enthalpie der Reaktion berechnet werden.

$$\Delta G = -z \cdot F \cdot E^0 \quad \text{Formel 1.1.3}$$

Mit  $z = \text{Anzahl der Elektronen}$

$F = \text{Faraday-Konstante (96.485 C mol}^{-1}\text{)}$

Die Differenz von 1135 mV entspricht einer freien Enthalpie von  $-219 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Für eine biochemische Reaktion ist der Betrag immer noch ungewöhnlich hoch und für die Zelle so nicht nutzbar. Er wird daher ebenfalls in einer Reaktionssequenz freigesetzt, in welcher der Wasserstoff und die Elektronen über die Hilfssubstrate Coenzym Q und Cytochrom *c* sowie redoxaktive Proteinkomplexe zum Sauerstoff geleitet werden. Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 1.1.3 gezeigt. Die Pfeile zeigen den Elektronenfluß an.

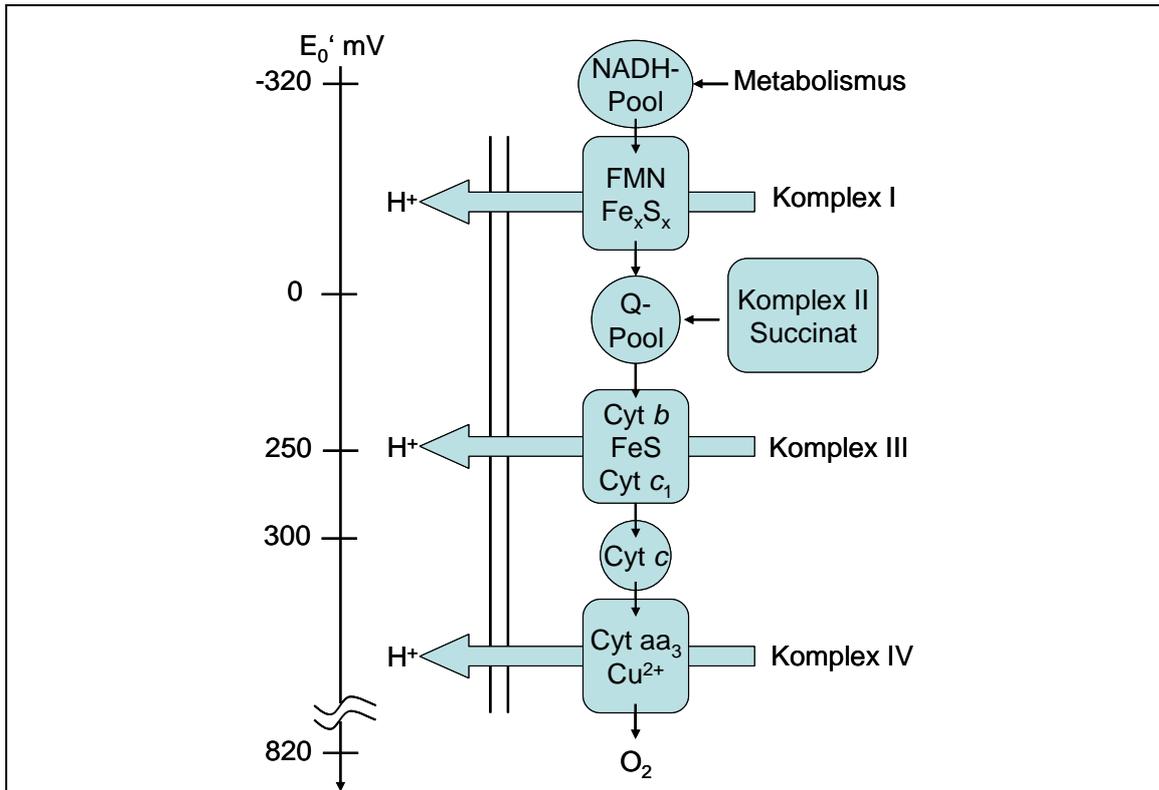


Abbildung 1.1.3: Anordnung der Redoxsysteme der Atmungskette nach Redoxpotentialen.

Die dargestellten Redoxsysteme liegen in der inneren Mitochondrienmembran (Abbildung 1.1.4). Die einzelnen Redoxschritte entsprechen Elektronenübertragungen von einem Protein auf ein anderes. Eine wesentliche Einflussgröße für den Elektronenübergang ist gemäß der Theorie des Tunnelns<sup>1</sup> (Formel 1.1.4) der Abstand zwischen den redoxaktiven Spezies [Bard, Faulkner 2001].

$$\text{Tunnelwahrscheinlichkeit} \propto \exp(-\beta x) \quad \text{Formel 1.1.4}$$

Mit  $\beta$  = Energiebarrierenfaktor  
 $x$  = Abstand

Die redoxaktiven Proteinzentren müssen sich für einen effektiven Elektronenübergang in enger Nachbarschaft befinden, da die Tunnelwahrscheinlichkeit mit der Entfernung exponentiell abnimmt. Die Anordnung der Membranproteine ist so optimiert, dass ein rascher Elektronenfluß gewährleistet ist. Der Elektronenfluß von NADH zum Sauerstoff ist in Abbildung 1.1.4 mit Hilfe einer durchgezogene Linie angedeutet.

<sup>1</sup> Der Elektronentransfer wird üblicherweise als Tunnelvorgang des Elektrons zwischen den Redoxpartnern angesehen.

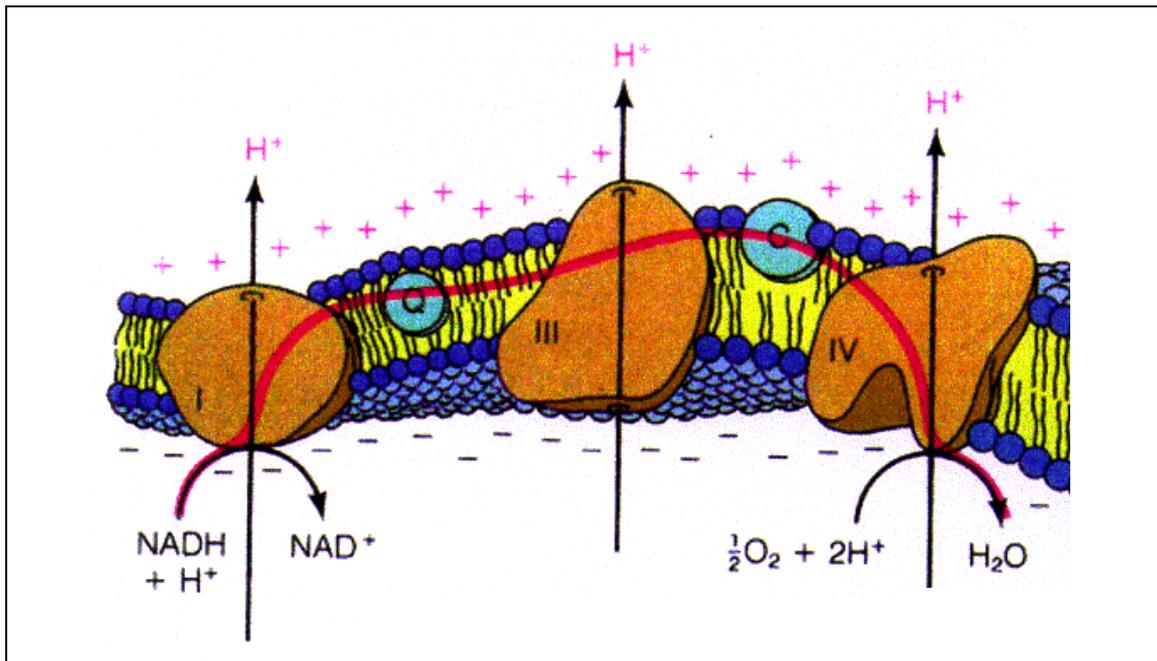


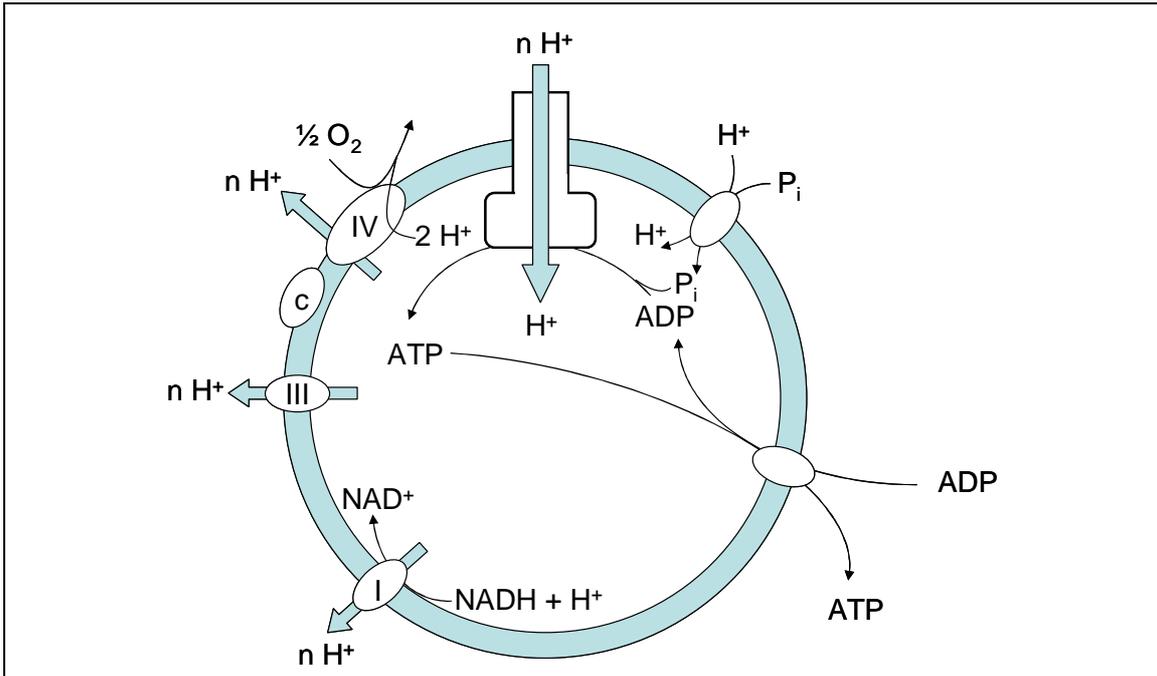
Abbildung 1.1.4: Anordnung der Redoxsysteme der Atmungskette in der Mitochondrienmembran<sup>2</sup>.

Für die Energieübertragung im engeren Sinne ist folglich das fast massefreie Elektron<sup>3</sup> verantwortlich. Die Formulierung des oben genannten biologischen Prinzips ist davon abhängig, was man als geschlossenes biologisches System betrachtet, die Membran, das Mitochondrium, die ganze Zelle oder den Organismus.

Die freie Energie des Elektronenflusses wird dazu benutzt, Protonen durch die Mitochondrienmembran zu transportieren. Hierdurch wird ein Konzentrationsgradient über die Membran aufgebaut, in welchem die Redoxenergie sozusagen zwischengespeichert wird; letztendlich wird sie dazu genutzt, Adenosintriphosphat (ATP) zu synthetisieren (Abbildung 1.1.5).

<sup>2</sup> [archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z1999/0061/einleit.html](http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z1999/0061/einleit.html)

<sup>3</sup> Die Masse des Elektron ist ca. 2.000 mal kleiner als die eines Protons.



**Abbildung 1.1.5: Protonenflüsse und Redoxkomplexe in der Mitochondrien-Membran**

Die Bildung von ATP aus ADP und Phosphat ist unter physiologischen Bedingungen mit etwa  $45 \text{ kJ mol}^{-1}$  endergonisch; die Gleichgewichtskonstante liegt im wässrigen Medium bei  $3,3 \cdot 10^{-5}$ . Durch Bindung der Substrate im aktiven Zentrum der ATP-Synthase wird die Gleichgewichtskonstante auf 0,5 verschoben, und es bedarf nur noch geringer Energiezufuhr (ca.  $4 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) um ADP und Phosphat unter Wasserabspaltung zu kondensieren.

Auf diese Weise synthetisiert der menschliche Körper pro Tag im Fließgleichgewicht ungefähr sein eigenes Gewicht an ATP. Bei Leistungssportlern kann die täglich synthetisierte ATP-Menge sogar über 200 kg liegen.

Der Energiefluss in biologischen Systemen ist also zurückzuführen auf den Elektronenfluss (und daran gekoppelt den Protonenfluss) durch eine Membran.

## 1.2 Energie in chemischen Systemen

Die für chemische Reaktionen notwendige Energie wird üblicherweise durch energiereiche Edukte und die Reaktionstemperatur bereitgestellt. So wird für Oxidationsreaktionen ein stöchiometrisches, energiereiches Reagenz benötigt, das die Redoxäquivalente auf das Edukt überträgt (Abbildung 1.2.1, linke Seite). Als Alternative hierzu kann ein Edukt auch – quasi massiefrei – elektrochemisch oxidiert werden (Abbildung 1.2.1, rechte Seite). So kann man die Elektrochemie nutzen, um evtl. bedenkliche Abfälle in der chemischen Produktion zu vermeiden.

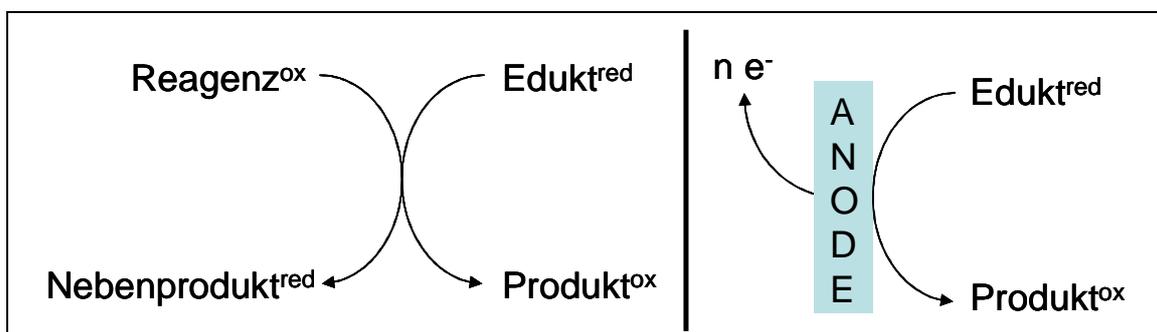


Abbildung 1.2.1: Chemische und elektrochemische Oxidationsreaktion

Dies ist jedoch nicht immer einwandfrei möglich, da eine elektrochemische Reaktion aus zwei Halbzellreaktionen besteht, und somit auch immer ein Koppelprodukt entsteht, auch wenn es wesentlich unbedenklicher oder einfacher zu entsorgen sein mag (z.B. Sauerstoff, Wasserstoff oder  $\text{CO}_2$ ). In Analogie zu den biologischen Systemen werden häufig auch hier die Reaktionsräume durch Membranen getrennt, durch die zum Ladungsausgleich Ionen wandern müssen.

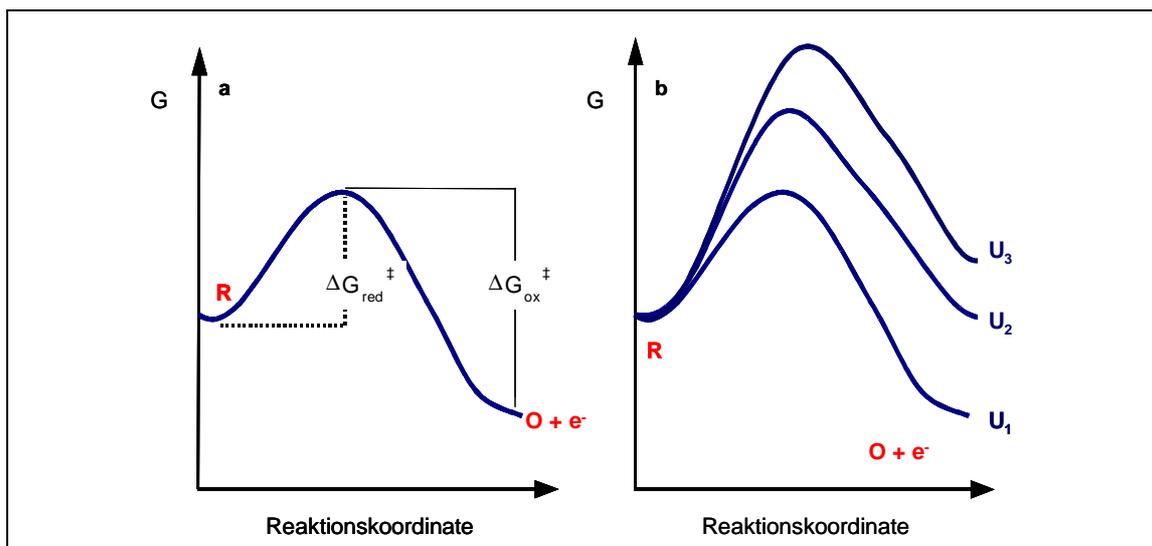


Abbildung 1.2.2: Änderung der Freien Energie  $G$  im Verlauf eines Elektronentransfers a und in Abhängigkeit vom angelegten Potential b [Schröder 2003].

Einer der Vorzüge der Elektrochemie ist es, dass in Abhängigkeit vom angelegten Potential der "Energiegehalt" der Elektrode, also die Triebkraft für eine Reaktion, über einen großen Bereich variiert werden kann.<sup>4</sup> Im Unterschied zur chemischen Reaktionskinetik kann man das Energieprofil einer elektrochemischen Reaktion durch Anlegen einer Spannung beeinflussen (Abbildung 1.2.2). Dabei bleibt die freie Energie des Edukts ( $R$ ) konstant, wohingegen die freie Energie auf der Seite der Produkte ( $O + e^-$ ) mit der Spannung variiert. Die Reaktion kann bei einer angelegten Spannung  $U_1$  in Oxidationsrichtung verlaufen, während sie bei Anlegen einer Spannung  $U_3$  in die Gegenrichtung verläuft. Die Elektrode ist folglich mit der Spannung "durchstimmbar" in ihrer Oxidations- bzw. Reduktionswirkung. Die Zellspannung bestimmt dabei die Energie (1 V entspricht 96 kJ pro Mol Elektronen), die Stromstärke die Reaktionsgeschwindigkeit (1 A entspricht 10  $\mu$ mol Elektronen pro Sekunde).

Elektrochemische Prozesse zur Darstellung von organischen Verbindungen sind in der Industrie inzwischen weit verbreitet. So wird Adiponitril durch Hydrodimerisierung von Acrylnitril an der Kathode elektrochemisch hergestellt (Abbildung 1.2.3). Das von Baizer entwickelte Verfahren wurde von der Firma Monsanto industriell umgesetzt und deckt heute ca. 30% des Weltmarktes an Adiponitril ab [Steckhan 2000]. Die Jahresproduktion von Adiponitril nach dem elektrochemischen Verfahren beträgt ca. 100.000 t. Nicht nur im Bereich der so genannten "bulk"- Chemikalien, sondern auch bei Spezialchemikalien, z.B. chiralen Bausteinen für die Pharmaindustrie, gewinnt die elektroorganische Synthese an Bedeutung [Weinberg 1997; Pütter 2000; Lund 2002; Shen, et al. 2003]

<sup>4</sup> Eine allgemeine Einführung in die Elektrochemie findet sich bei Schröder I (2003) .

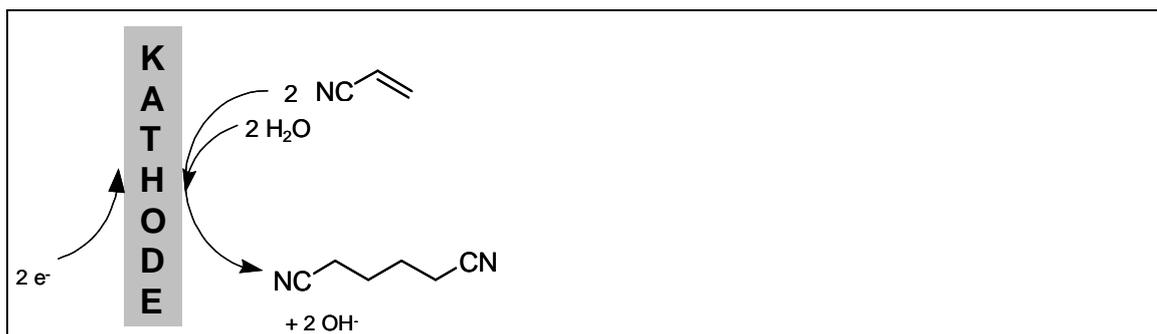


Abbildung 1.2.3: Produktion von Adiponitril nach dem Monsanto-Verfahren.

Eine besonders interessante Anwendung der Elektrochemie ist die gepaarte Elektrolyse [Li, Nonaka 1997, 1999a, 1999b; Li, et al. 1999; Shen, et al. 2003], bei der beide Elektrodenreaktionen zur Wertstoffproduktion genutzt werden. Seit 1999 wird bei der BASF AG die kathodische Reduktion von Methylphthalat zu Phtalid in Kombination mit der anodischen Darstellung von 4-*tert*-Butylbenzaldehyddimethylacetal [Pütter, Hannebaum 1997; Pütter 2000; Steckhan, et al. 2001] (Abbildung 1.2.4) durchgeführt. Durch Kopplung der beiden Reaktionen kann die elektrische Energie effizient genutzt und ein Beitrag zur Ressourcenschonung geleistet werden.

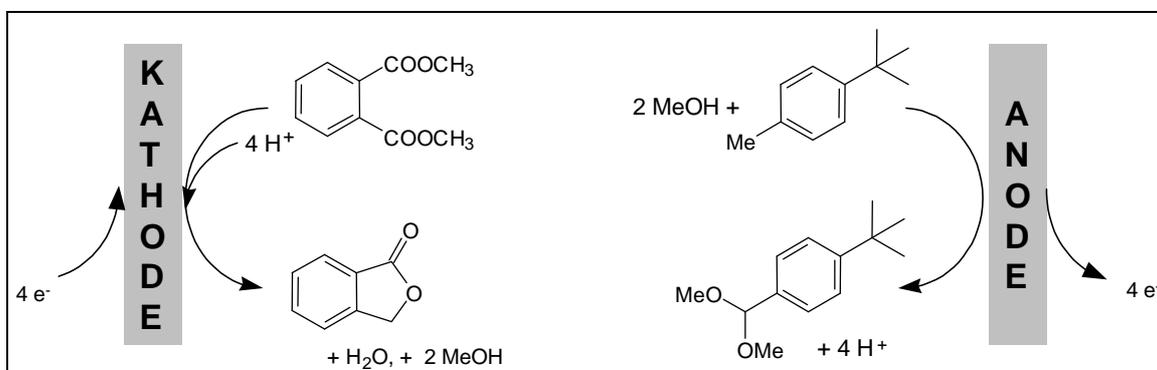


Abbildung 1.2.4: Gepaarte Elektrolyse in einer "200% Zelle".

## 1.3 Elektroenzymatik

Für die Synthese von Fein- und Spezialchemikalien haben sich Biokatalysatoren wegen ihrer Selektivität oftmals als vorteilhaft herausgestellt [Drauz, Waldmann 1995; Straathof, et al. 2002] und werden inzwischen in der ganzen Bandbreite vom Labormaßstab [Roberts 2000; Koeller, Wong 2001] bis in den industriellen Maßstab [Liese, et al. 2000; Schmid, et al. 2001] eingesetzt.

Die Kombination eines elektrochemischen Schrittes mit einer biokatalytischen Reaktion gehört zum Bereich der Bioelektrochemie. Steckhan et al. haben die Nutzung dieser Kombination zur Herstellung von Feinchemikalien als elektroenzymatische Synthese oder Elektroenzymatik bezeichnet [Steckhan 1994; Steckhan, et al. 2001].

### 1.3.1 Elektroenzymatische Regenerationszyklen

Elektroenzymatische Reaktionen können in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. In Regenerationszyklen wird ein Redox-Cofaktor oder eine prosthetische Gruppe für eine enzymkatalysierte Reaktion regeneriert. Obwohl es Beispiele für die direkte Regenerierung von Cofaktoren (z.B.  $\text{NAD}^+$ , vgl. Abbildung 1.1.2) durch direkte Elektrolysen gibt, geschieht die Regenerierung meist indirekt unter Verwendung eines Mediators [Steckhan 1986, 1992]. Den Unterschied zeigt Abbildung 1.3.1 am Beispiel einer Oxidationsreaktion.

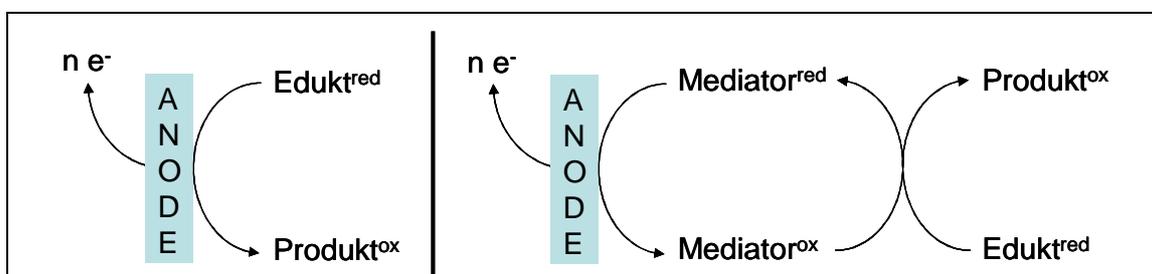


Abbildung 1.3.1: Schematische Darstellung der direkten (links) und indirekten Elektrolyse (rechts).

In der mediatisierten Bioelektrokatalyse [Kano, Ikeda 2000; Hollmann, Schmid 2004] haben sich insbesondere zwei Systeme bewährt:

- Ferrocen und Derivate für die Regenerierung von Flavinadenindinucleotid (FAD)
- Pentamethylcyclopentadienyl-2,2'-bipyridinchloro-rhodium(III)  $[(\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{Cl}))^{2+}]$  [Hollmann, et al. 2002] für die Regenerierung von NAD(P)H

Ein Beispiel für einen Regenerierungszyklus zeigt Abbildung 1.3.2. Der mit einem homogen-löslichen Polymer (P) modifizierte Rhodium-Komplex wird an der Kathode reduziert. Der Komplex reduziert PEG-gebundenes  $\text{NAD}^+$  zu NADH, wobei er selber

reoxidiert wird. Der reduzierte Cofaktor kann nun von einer Alkoholdehydrogenase für die Reduktion des Substrates benutzt werden. Die Molgewichtsvergrößerung von Cofaktor und Mediator ermöglicht darüber hinaus eine kontinuierliche Prozessführung durch Ultrafiltration im elektrochemischen Enzym-Membran-Reaktor (EEMR).

Die reaktionstechnische Untersuchung solcher gekoppelten Systeme ist jedoch schwierig, da z.B. die Gleichgewichtslage der homogen-chemischen Reaktion sowohl von der elektrochemischen als auch von der enzymatischen Reaktion abhängig ist. Entsprechend ist der Einfluss eines Parameters auf einen Teilprozess nicht immer leicht zu ermitteln.

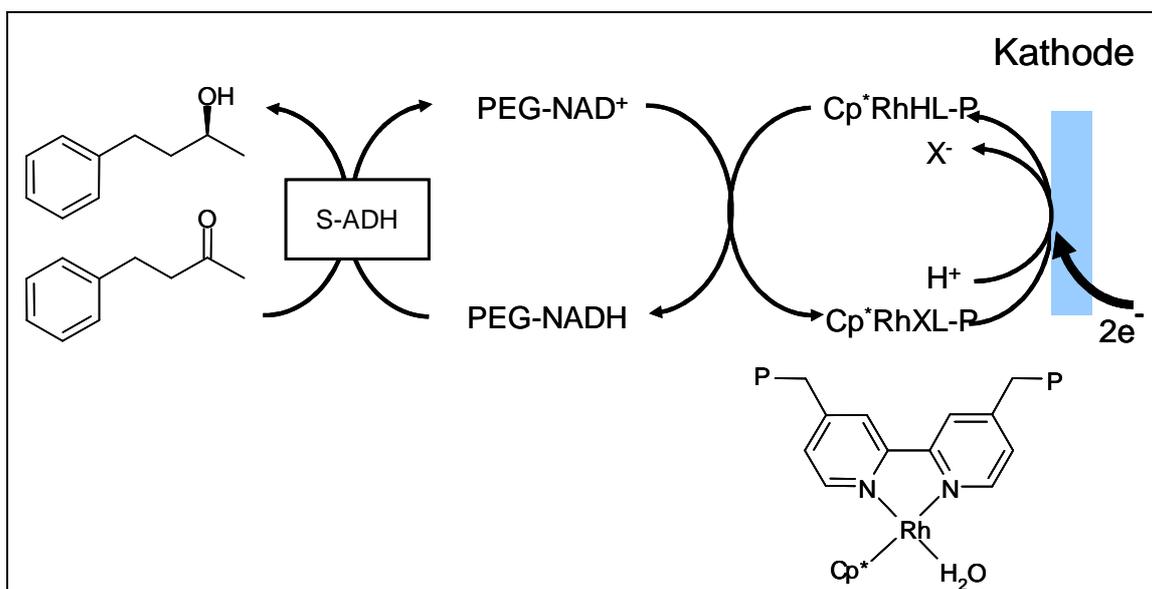


Abbildung 1.3.2: Elektroenzymatische Synthese von (S)-4-Phenyl-2-butanol mit polymervergrößertem (P) Mediator im EEMR.

### 1.3.2 Elektroenzymatische Reaktionssequenzen

In das Gebiet der elektroenzymatischen Reaktionssequenzen fallen große Teile der Biosensoren-Forschung [Tarasevich, et al. 1993; Bogdanovskaya, Tarasevich 1996; Calvo, Danilowicz 1997; Habermuller, et al. 2000]. In einem Biosensor wird durch eine hochselektive enzymatische Reaktion ein Analyt umgesetzt und die Reaktionsprodukte werden elektrochemisch detektiert. Der wichtigste Biosensor ist der Glucose-Sensor [Alkasrawi, et al. 1999; Xu, Chen 2000; Yang, et al. 2000], der medizinisch zur Messung des Blutzuckergehaltes bei Diabetes-Patienten eingesetzt wird (Abbildung 1.3.3). Glucose wird in Gegenwart von Sauerstoff durch Glucose-Oxidase zu Gluconolacton oxidiert. Das entstehende Wasserstoffperoxid wird elektrochemisch zu Sauerstoff reoxidiert. Aus dem Stromfluss lässt sich schließlich die umgesetzte Stoffmenge Glucose errechnen. Neuere Sensoren benutzen ebenfalls Mediatoren um

den  $\text{FAD}^+$ -Cofaktor der Glucose-Oxidase zu regenerieren. Es wird dann der Stromfluss der Mediatorreaktion zur Konzentrationsbestimmung genutzt.

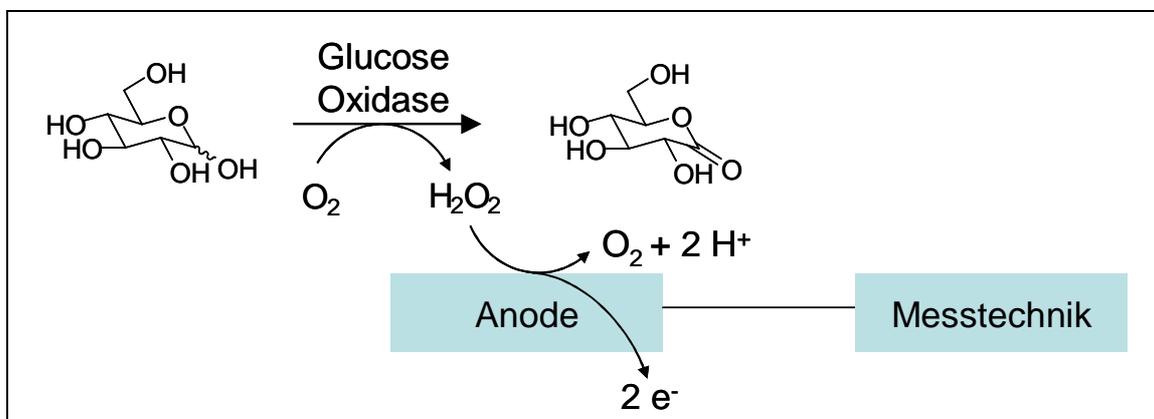


Abbildung 1.3.3: Funktionsweise eines Glucose-Sensors der ersten Generation.

Für die elektroenzymatische Synthese lässt sich dieses Prinzip nutzen, indem ein Reagenz für eine enzymatische Reaktion *in situ* erzeugt wird. In mehreren Beispielen wurde die elektrochemische Herstellung von Wasserstoffperoxid mit einer Peroxidase-Reaktion kombiniert, so zur Herstellung von Chlorbarbitursäure [Laane, et al. 1984; Tramper, et al. 1985; Laane, et al. 1986] oder Veratraldehyd [Lee, Moon 2003]. Mit dieser Reaktionssequenz gelingt aber auch die Darstellung chiraler Verbindungen, z.B. von Sulfoxiden [Lütz, et al. 2004] (Abbildung 1.3.4). Die Reaktionssequenzen eignen sich besonders für eine Untersuchung der Schnittstelle zwischen Elektrochemie und Biokatalyse, da in ihnen die beiden Schritte im Gegensatz zur Cofaktorregenerierung nicht durch Zyklen gekoppelt sind. Sie können folglich besser getrennt untersucht werden.

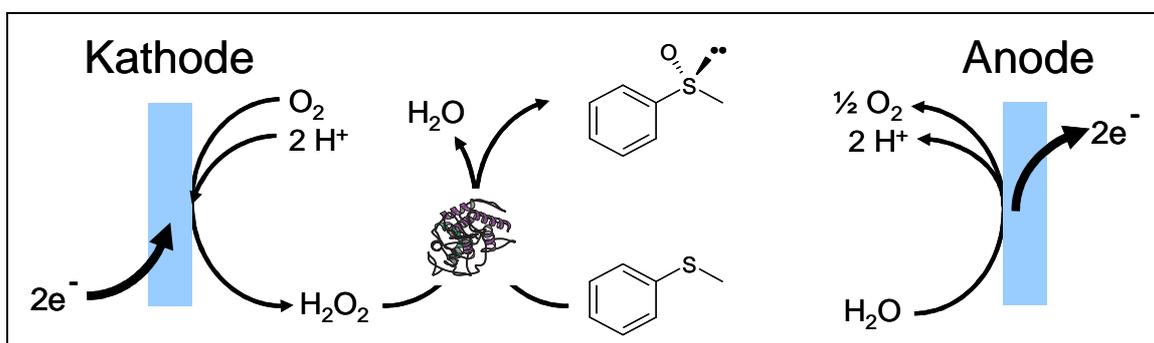
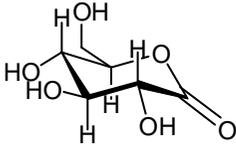
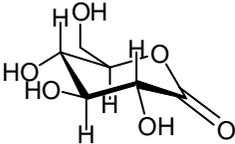
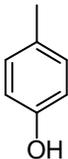
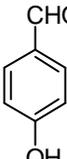
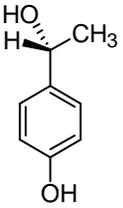
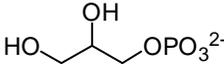
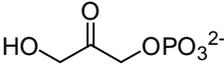


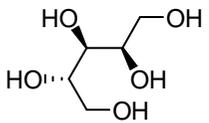
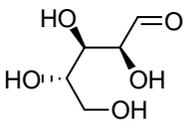
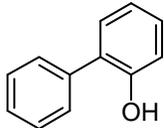
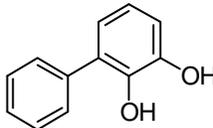
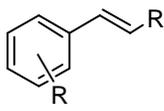
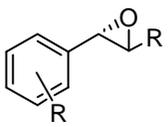
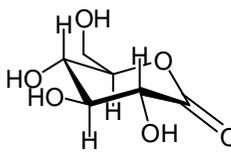
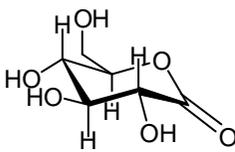
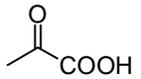
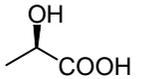
Abbildung 1.3.4: Darstellung eines chiralen Sulfoxids in einer elektroenzymatischen Sequenz.<sup>5</sup>

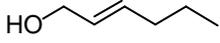
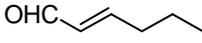
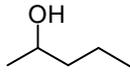
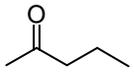
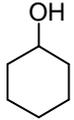
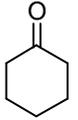
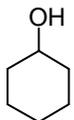
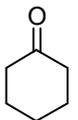
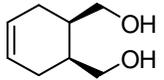
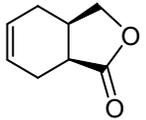
<sup>5</sup> Die elektrochemischen Reaktionen sind komplexer und pH-Wert abhängig, so kann die anodische Sauerstoffbildung z.B. auch aus Hydroxyl-Ionen formuliert werden. Die gezeigten Reaktionen wurden der Stöchiometrie wegen vereinfacht gewählt.

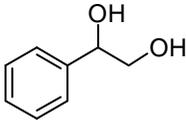
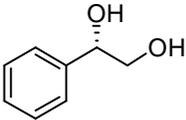
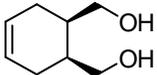
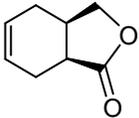
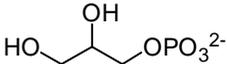
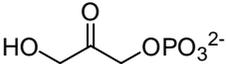
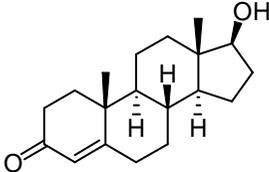
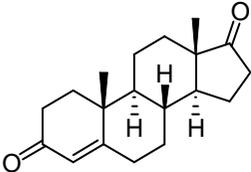
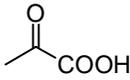
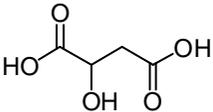
Eine Auswahl von bisher erfolgten elektroenzymatischen Synthesen gibt die folgende Tabelle 1.3.1.

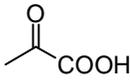
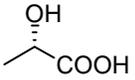
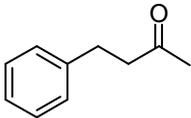
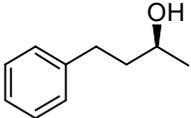
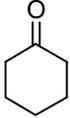
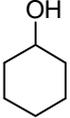
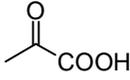
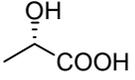
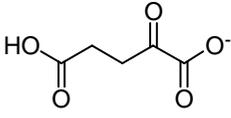
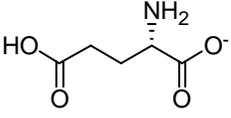
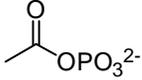
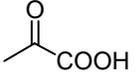
**Tabelle 1.3.1 Elektroenzymatische Synthesen**

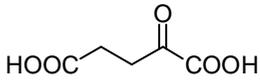
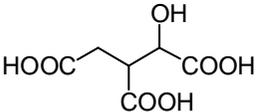
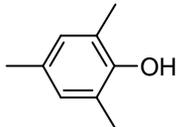
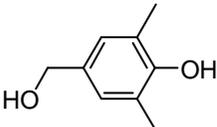
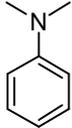
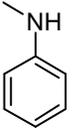
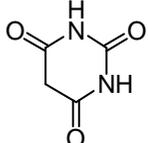
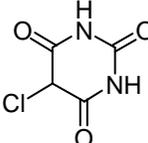
Substrat	Produkt	Biokatalysator	Cofaktor/ Cosubstrat	Mediator	Literatur
 D-Glucose	 D-Gluconolactone	Glucose-Oxidase	FAD <sup>+</sup> /H <sub>2</sub>	MV	[Delecouls-Servat, et al. 2002b]
 p-Methylphenol	 p-Hydroxybenzaldehyd	p-Cresolmethyl-Hydroxylase (PCMH) aus <i>Pseudomonas putida</i>	FAD <sup>+</sup> /H <sub>2</sub>	PEG-Ferrocen	[Steckhan 1994]
 p-Methylphenol	 (R)-4-(1-Hydroxy-ethyl)phenol	Ethylphenolmethylen-Hydroxylase (EPMH) aus <i>Pseudomonas putida</i>	FAD <sup>+</sup> /H <sub>2</sub>	PEG-Ferrocen	[Steckhan 1994]
 Glycerin-3-phosphat	 Dihydroxyacetonphosphat	Glycerin-3-phosphat-Oxidase aus <i>Pediococcus sp.</i>	FAD <sup>+</sup> /H <sub>2</sub>	PEG-Ferrocen	[Steckhan 1994] [Steckhan, et al. 2000]

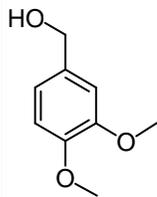
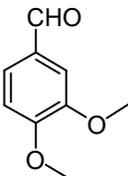
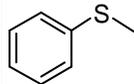
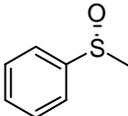
Substrat	Produkt	Biokatalysator	Cofaktor/ Cosubstrat	Mediator	Literatur
 L-Xylitol	 L-Xylose	Glucose-Oxidase	FAD <sup>+</sup> /H <sub>2</sub>	PEG-Ferrocen	[Steckhan, et al. 2000] [Petersen, Steckhan 1999]
 2-Hydroxybiphenyl	 Biphenyl-2,3-diol	2-Hydroxybiphenyl-3-monooxygenase (HbpA) aus <i>Pseudomonas azelaica</i>	FAD <sup>+</sup> /H <sub>2</sub> NADP <sup>+</sup> /H	Cp <sup>*</sup> Rh(bpy)L	[Hollmann, et al. 2001]
 Styren-Derivat	 Styreneoxid-Derivat	Styrene monooxygenase (StyA) aus <i>Pseudomonas</i> sp.VLB120	FAD <sup>+</sup> /H <sub>2</sub>	Cp <sup>*</sup> Rh(bpy)L	[Hollmann, et al. 2003]
 D-Glucose	 D-Gluconolactone	Glucose-Dehydrogenase (GDH)	NAD <sup>+</sup> /H	-	[Steckhan 1994]
 Pyruvat	 D-Lactat	L-Lactatdehydrogenase (L-LDH)	NAD <sup>+</sup> /H	-	[Steckhan 1994]

Substrat	Produkt	Biokatalysator	Cofaktor/ Cosubstrat	Mediator	Literatur
 2-Hexen-1-ol	 2-Hexenal	Hefe-Alkoholdehydrogenase (YADH)	NAD <sup>+</sup> /H	Fe(tmphen) <sub>3</sub>	[Steckhan 1994]
 2- Butanol	 2- Butanon	<i>Thermoanaerobium brockii</i> - Alkoholdehydrogenase ( <i>Tb</i> ADH)	NADP <sup>+</sup> /H	Fe(tmphen) <sub>3</sub>	[Steckhan 1994]
 Cyclohexanol	 Cyclohexanon	Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase (HLADH)	NAD <sup>+</sup> /H	Ferrocen Diaphorase	[Steckhan 1994]
 Cyclohexanol	 Cyclohexanon	HLADH	NAD <sup>+</sup> /H	Ru(PD) <sub>3</sub> BF <sub>4</sub>	[Hilt, et al. 1997]
 <i>meso</i> -3,4- Dihydroxymethylcyclohexen	 3a,4,7,7a-Tetrahydro-3H-isobenzofuran-1-on	HLADH	NAD <sup>+</sup> /H	Ru(PD) <sub>3</sub> BF <sub>4</sub>	[Hilt, et al. 1997]

Substrat	Produkt	Biokatalysator	Cofaktor/ Cosubstrat	Mediator	Literatur
 <i>rac</i> -Phenylethan-1,2-diol	 (S)-Phenylethan-1,2-diol	Glycerin-Dehydrogenase	NAD <sup>+</sup> /H	ABTS	[Schröder, et al. 2003]
 <i>meso</i> -3,4-Dihydroxymethylcyclohexen	 3a,4,7,7a-Tetrahydro-3H-isobenzofuran-1-on	HLADH	NAD <sup>+</sup> /H	ABTS	[Schröder, et al. 2003]
 Glycerin-3-phosphat	 Dihydroxyacetonphosphat	Glycerin-3-phosphat Dehydrogenase (GPDH)	NAD <sup>+</sup> /H	Ru(PD) <sub>3</sub> BF <sub>4</sub> PDMeBF <sub>4</sub>	[Steckhan, et al. 2000]
 Testosteron	 4-Androsten-3,17-dion	Testosteron-17-β-Dehydrogenase (HSDH) aus <i>Cylindrocarpon radiciola</i>	NAD <sup>+</sup> /H	Ru(PD) <sub>3</sub> BF <sub>4</sub> PDMeBF <sub>4</sub> ABTS	[Steckhan, et al. 2000]
 Pyruvat + CO <sub>2</sub>	 Äpfelsäure	Malat-Enzym (ME)	NADP <sup>+</sup> /H	Fd/FNR	[Steckhan 1994]

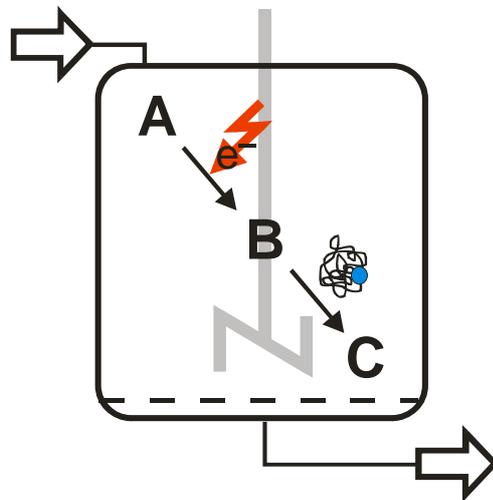
Substrat	Produkt	Biokatalysator	Cofaktor/ Cosubstrat	Mediator	Literatur
 Pyruvat	 L-Lactat	L-LDH	NAD <sup>+</sup> /H	Cp <sup>*</sup> Rh(bpy)L	[Steckhan 1994]
 4-Phenyl-2-butanon	 (S)-4-Phenyl-2-butanol	HLADH <i>S-ADH aus Rhodococcus sp.</i>	NAD <sup>+</sup> /H	Cp <sup>*</sup> Rh(bpy)L	[Steckhan 1994]
 Cyclohexanon	 Cyclohexanol	HLADH	NAD <sup>+</sup> /H	Cp <sup>*</sup> Rh(bpy)L	[Delecouls-Servat, et al. 2002a]
 Pyruvat	 L-Lactat	LDH	NAD <sup>+</sup> /H	MV/LipDH	[Fisher, et al. 2000]
 $\alpha$ -Ketoglutarat + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	 L-Glutamat	L-Glutamat-Dehydrogenase	NAD <sup>+</sup> /H	Hydrogenase	[Cantet, et al. 1996]
 Acetylphosphat+CO <sub>2</sub>	 Pyruvat + HS-CoA	Pyruvate Dehydrogenase Complex (PDC)	Acetyl-S-CoA	MV	[Steckhan 1994]

Substrat	Produkt	Biokatalysator	Cofaktor/ Cosubstrat	Mediator	Literatur
 $\alpha$ -Ketoglutarinsäure + CO <sub>2</sub>	 <i>iso</i> -Citronensäure	<i>iso</i> -Citronensäure Dehydrogenase (ICDH)		Fd	[Steckhan 1994]
 2,4,6-Trimethylphenol	 3,5-Dimethyl-4-hydroxybenzylalkohol	Merretich-Peroxidase (HRP)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	[Bartlett, et al. 1999]
 N,N-Dimethylanilin	 N-Methylanilin	HRP	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	[Chen, Nobe 1993]
 Barbitursäure + Cl <sup>-</sup>	 5-Chlorbarbitursäure	Chlorperoxidase (CPO) aus <i>Caldariomyces fumago</i>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	[Laane, et al. 1986]

Substrat	Produkt	Biokatalysator	Cofaktor/ Cosubstrat	Mediator	Literatur
 <p>Veratrylalkohol</p>	 <p>Veratraldehyd</p>	Lignin Peroxidase (LiP)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	[Lee, Moon 2003]
 <p>Thioanisol</p>	 <p>(R)-Methylphenylsulfoxid</p>	CPO	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	[Lütz, et al. 2004]

## 2 Aufgabenstellung

Im Rahmen der Dissertation sollen am Beispiel einer elektroenzymatischen Reaktions-Sequenz ( $A \rightarrow B \rightarrow C$ , vgl. Schema links) relevante Parameter für die Reaktionstechnik elektroenzymatischer Synthesen ermittelt und optimiert werden. Wie bereits in Kapitel 1.3 dargelegt, stellt die Elektroenzymatik mit Peroxidasen ein geeignetes Gebiet für eine reaktionstechnische Bearbeitung dar. Für die vorliegende Arbeit soll daher am Beispiel der enantioselektiven Sulfoxidation von Methylphenylsulfid (Thioanisol) zu (*R*)-Methylphenylsulfoxid dienen ( $B \rightarrow C$ , zweiter Schritt im Schema) eine Prozessentwicklung einer elektroenzymatischen Reaktionssequenz durchgeführt werden. Als Biokatalysator dient Chlorperoxidase (CPO) aus *Caldariomyces fumago*. Das Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid soll elektrochemisch durch kathodische Reduktion von gelöstem Sauerstoff erfolgen ( $A \rightarrow B$ , erster Schritt im Schema), vgl. Abbildung 1.3.4.



### 2.1 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll daher:

- Der elektrochemische Schritt ausgehend von den literaturbeschriebenen Reaktionsbedingungen der Biotransformation [van Deurzen, et al. 1997c] (vgl. Tabelle 2.1.1) her charakterisiert und optimiert werden.
- Der enzymatische Schritt unter Verwendung der optimierten Reaktionsbedingungen erneut betrachtet werden. Insbesondere sind hier die Enzymaktivität und Stabilität neu zu ermitteln.

**Tabelle 2.1.1 Literaturbeschriebene Reaktionsbedingungen für CPO-katalysierte Sulfoxidation**

Parameter	Wert
Puffer	100 mM Kaliumphosphat
pH	5
T	20 °C
Cosolvens	30 vol% <i>t</i> -BuOH
Substratkonzentration	20 mM

- Durch Reaktionstechnik eine Kombination der beiden Schritte zu einer effizienten elektroenzymatischen Reaktionssequenz erfolgen.

Da die Sulfide schwer in Wasser lösliche Substrate sind, wird in aller Regel ein wasser-mischbares Cosolvens in der Biotransformation zugesetzt [van Deurzen, et al. 1997a; van de Velde, et al. 2001b]. Häufig wird *tert*-Butanol verwendet, je nach Löslichkeit des Sulfids in Mengen bis zu 60 vol%; für Thioanisol ist 30 vol% angegeben.

Das wichtigste Kriterium für die effiziente Verbindung der beiden Teilschritte ist das Reaktionsmedium. So hat die Art und Zusammensetzung des Puffers Auswirkungen auf die Effizienz der elektrochemischen Reaktion (Stromausbeute<sup>6</sup>), da der Puffer als Leitsalz dient und somit die ionische Leitfähigkeit bestimmt. Andererseits beeinflusst die Zusammensetzung des Reaktionsmediums auch die Stabilität und Aktivität des Biokatalysators (Abbildung 2.1.1).

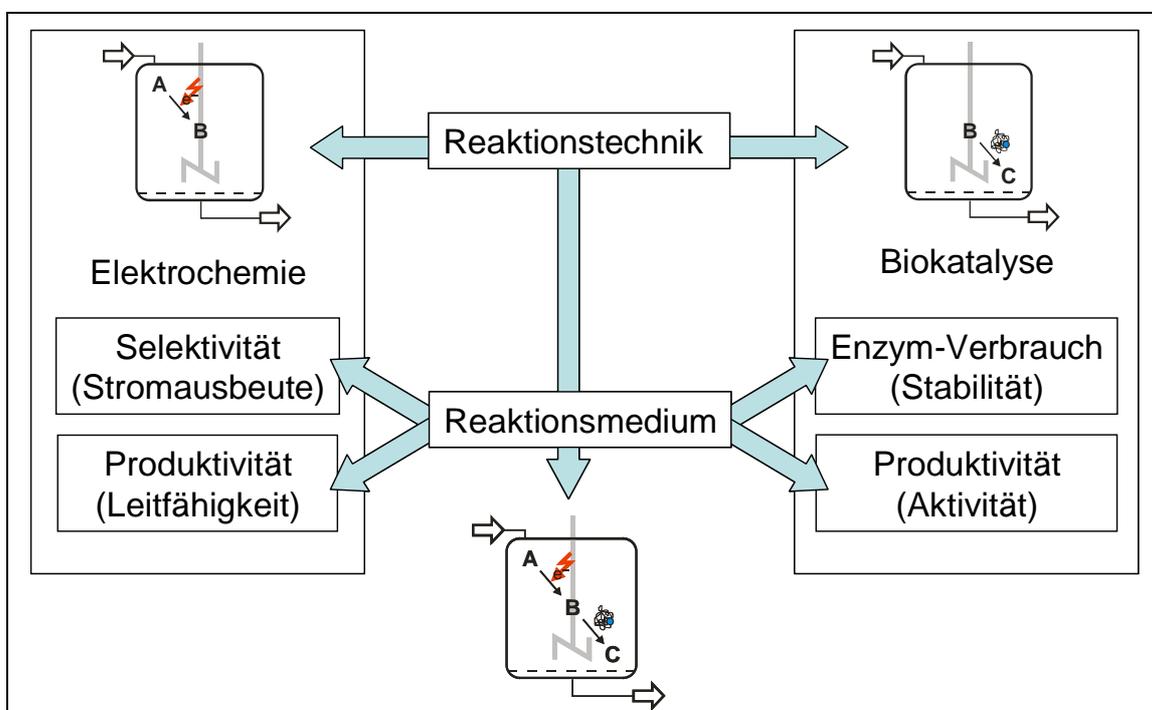


Abbildung 2.1.1: Einfluss des Reaktionsmediums auf elektrochemische und biokatalytische Größen.

Es stehen reaktionstechnische Gesichtspunkte, insbesondere die effiziente Kopplung der Teilschritte im Vordergrund. Mechanistische Untersuchungen sind nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

<sup>6</sup> Stromausbeute =  $\frac{Q_{\text{theoret.}}}{Q_{\text{real}}}$

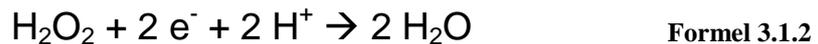
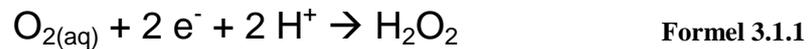
### 3 Elektrochemie unter biokatalytischen Aspekten

#### 3.1 Einleitung

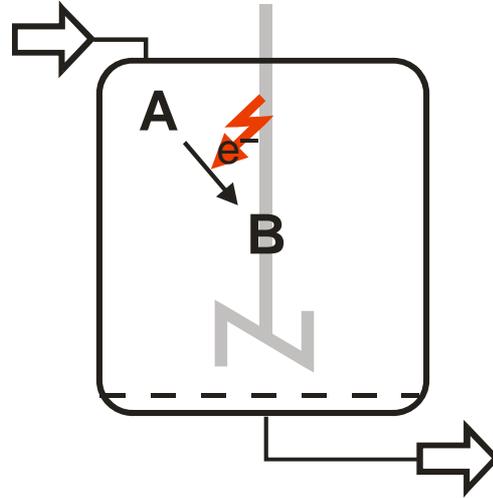
Der erste Schritt der elektroenzymatischen Reaktionssequenz besteht aus der Reduktion von gelöstem Sauerstoff zur Produktion von Wasserstoffperoxid (Formel 3.1.1). In einem zweiten Reaktionsschritt kann Wasserstoffperoxid weiter zu Wasser reduziert werden (Formel 3.1.2).

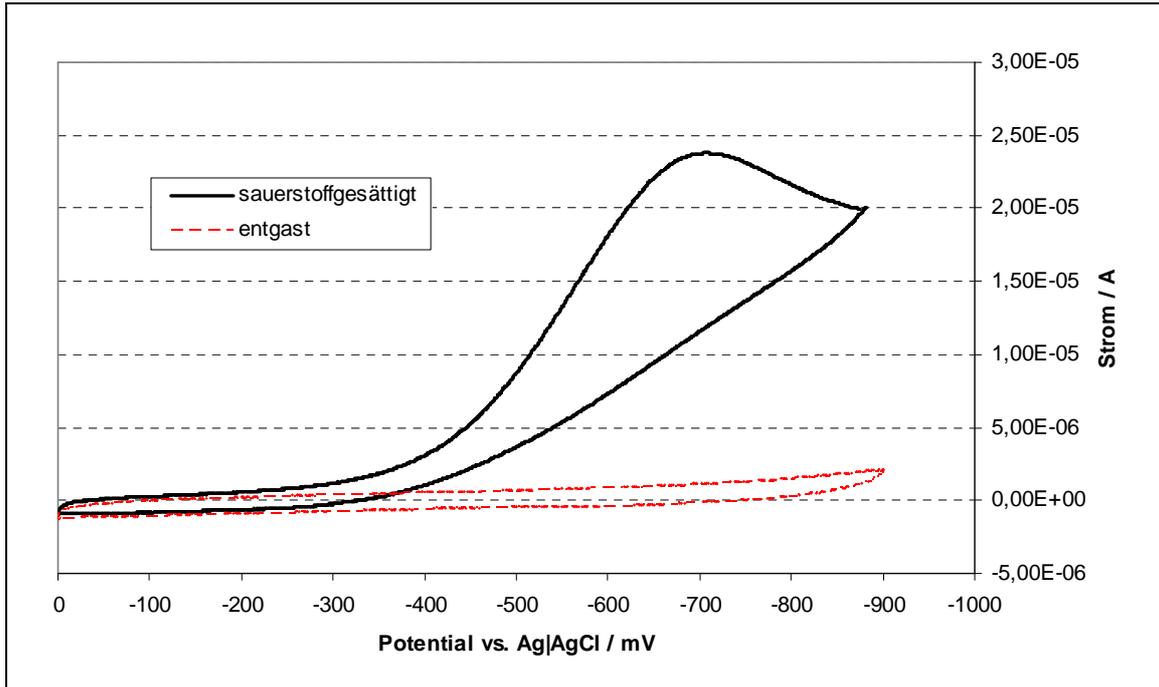
Wasserstoffperoxid ist ein breit eingesetztes Reagenz in Labor und Industrie [Jones 1999]. Daher ist die Produktion, zum Beispiel durch die elektrochemische Reduktion von Sauerstoff gut charakterisiert [Antoine, Durand 2000; Drogui, et al. 2001]. Diese Reaktion kann auch bioelektrochemisch durchgeführt werde, z.B. durch Laccasen [Tarasevich, et al. 2001]. Die Reaktion ist für Brennstoffzellen von hohem Interesse [Palmore, Kim 1999; Tsujimura, et al. 2001; Kano, Ikeda 2003; Mano, et al. 2003].

Da für die kathodische Reaktion des Sauerstoffs Protonen benötigt werden, sind Art, Konzentration und Pufferkapazität des verwendeten Reaktionsmediums für die Effizienz der Reaktion entscheidend. Neben dem Puffermedium ist für eine elektrochemische Reaktion das Elektrodenmaterial von großer Bedeutung.



Als Elektrodenmaterial für die Wasserstoffperoxidproduktion aus gelöstem Sauerstoff kommen im wesentlichen Graphit, Quecksilber und Gold in Frage [Pletcher 1999]. An den meisten Elektrodenoberflächen wird das gebildete  $\text{H}_2\text{O}_2$  weiter zu Wasser reduziert. Quecksilber ist wegen der Toxizität und Gold wegen der Kosten unattraktiv. Folglich werden in dieser Arbeit Kohlenstoffelektroden verwendet. Ein Cyclovoltammogramm der Sauerstoffreduktion an einer Kohlenstoffelektrode zeigt Abbildung 3.1.1. Man findet die typische Form einer irreversiblen Redox-Reaktion.





**Abbildung 3.1.1: Cyclovoltammogramm der Sauerstoffreduktion.**

Vorschubgeschwindigkeit  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , Empfindlichkeit  $10 \mu\text{A V}^{-1}$ ,  $100 \text{ mM}$  Kaliumphosphat,  $30 \text{ vol\% } t\text{-BuOH}$

Die Untersuchungen sollen zu optimierten Reaktionsbedingungen führen. Mit diesen neuen Bedingungen soll der elektrochemische Schritt detaillierter charakterisiert werden. Die zu untersuchenden Einzelschritte einer elektrochemischen Reaktion sind in Abbildung 3.1.2 am Beispiel einer Reduktion schematisch dargestellt.

Für eine detailliertere Charakterisierung soll insbesondere die Konzentration des gelösten Sauerstoffs und dessen Diffusion zur Elektrode betrachtet werden.

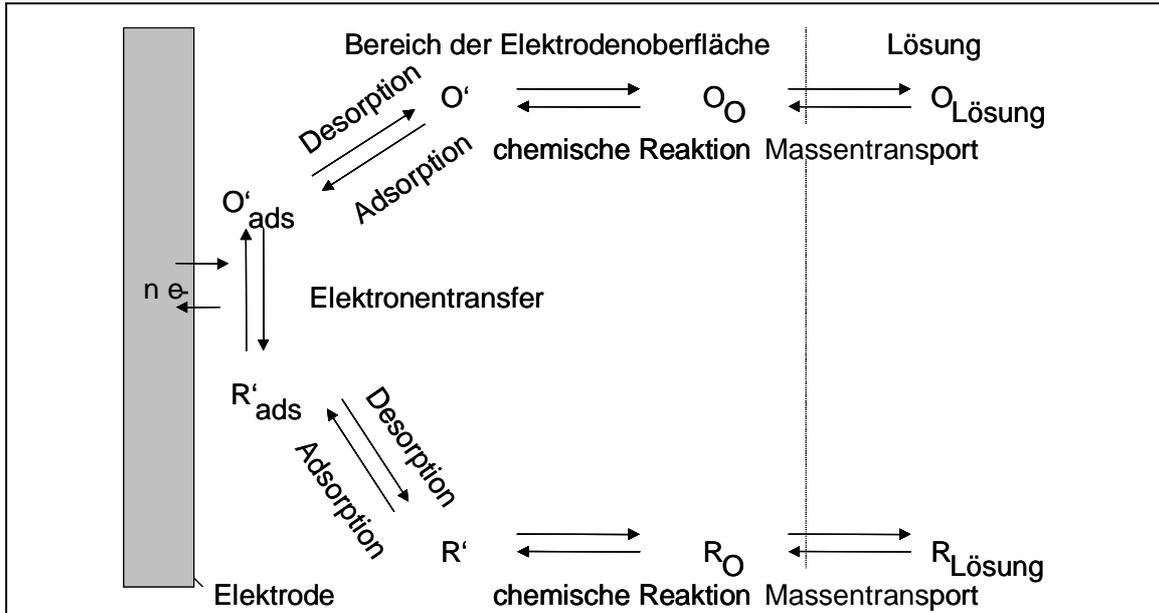


Abbildung 3.1.2: Genereller Ablauf einer elektrochemischen Reaktion [Bard, Faulkner 2001]

## 3.2 Systemuntersuchungen

### 3.2.1 Pufferkapazität und pH-Wert

Da die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert bereits untersucht wurde [Seelbach 1997], wird davon ausgegangen, dass das Reaktionsmedium eine optimale Pufferkapazität  $\beta$  (Formel 3.2.1) im Bereich zwischen pH 4 und pH 5 haben soll.

$$\beta = \frac{d(n_{\text{Base}})}{d(\text{pH})} \quad \text{Formel 3.2.1}$$

Bei biokatalytischen Sulfoxidationen mit Dosierung verdünnter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösungen ist nicht mit einer pH-Änderung zu rechnen, bei Kombination mit einem elektrochemischen Schritt ist er jedoch von großer Bedeutung. Nimmt man eine gewünschte Produktivität des Prozesses von  $100 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  Produkt an (bezogen auf (R)-Methylphenylsulfoxid,  $M=140 \text{ g mol}^{-1}$ ), so müssen durch die Elektrolyse  $1,65 \cdot 10^{-5} \text{ mol H}^+$  Ionen pro Sekunde an der Kathode verbraucht und an der Anode erzeugt werden. Das entspricht z.B. einer Verschiebung von pH 4 zu pH 4,8 innerhalb einer Sekunde. Die entstehenden Spitzen des pH-Wertes an den Elektroden werden zwar letztendlich durch die Vermischung des Reaktionsmediums und durch Migration der Ionen zwischen den Halbzellen abgebaut, dennoch muss eine starke pH-Veränderung im Kathodenraum möglichst schnell kompensiert werden, um das Enzym nicht zu zerstören.

Es wird also ein Puffer mit möglichst großer Pufferkapazität im pH-Bereich 4-5 benötigt. Wie in Abbildung 3.2.1 gezeigt, ist der für die Dosierverfahren verwendete Phosphatpuffer [van Deurzen, et al. 1997b] für diesen pH-Bereich nicht geeignet, sondern hat seine maximale Pufferkapazität bei pH 7.

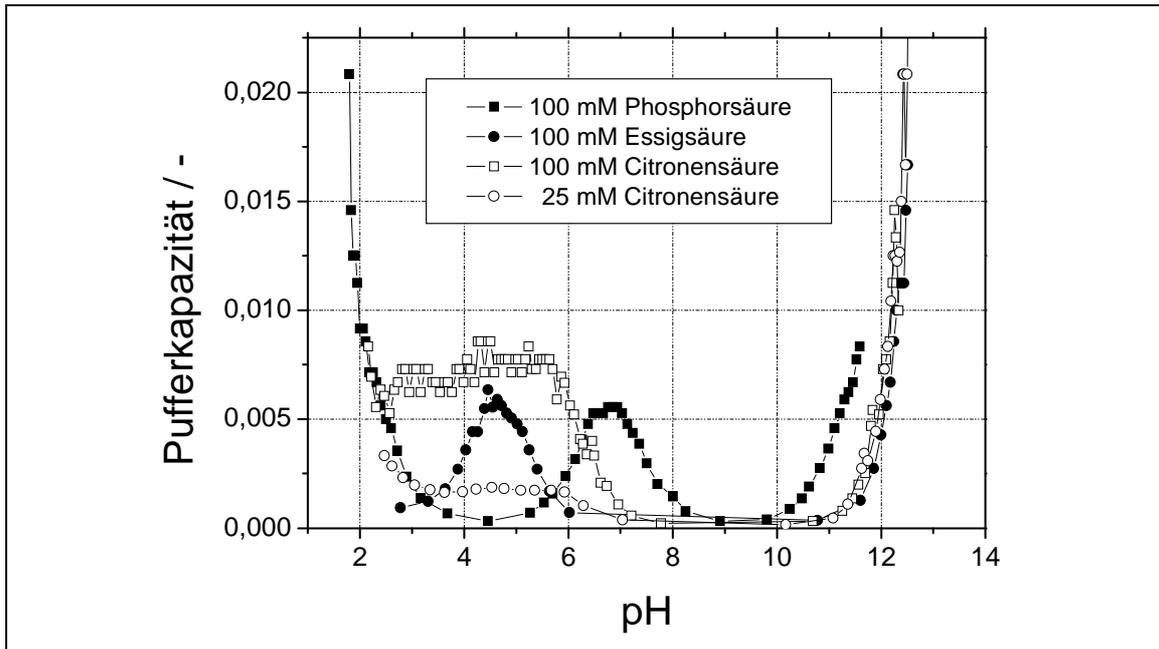


Abbildung 3.2.1: Pufferkapazität aus den Titrationskurven von Phosphor-, Essig- und Citronensäure.

Citratpuffer wäre wegen seiner Mehrprotonigkeit ideal, da er eine hohe Pufferkapazität über einen breiten pH-Bereich aufweist. Im pH-Bereich zwischen 4-5 ist Acetat-Puffer eine gute Alternative.

Einen deutlichen Einfluß auf den pH hat auch der Zusatz des Cosolvens *tert*-Butanol. Welche Konsequenzen der Zusatz auf einen Puffer ohne ausreichende Pufferkapazität hat, zeigt Abbildung 3.2.2. Während der pH im Acetatpuffer konstant bei pH = 5 bleibt, steigt der pH bei Zusatz von *tert*-Butanol zu Phosphatpuffer von 3 auf ca. 5. Ein Grund dafür ist nicht bekannt. Mögliche Gründe sind basische Verunreinigungen im Cosolvens oder eine Veränderung der Ionenaktivität.

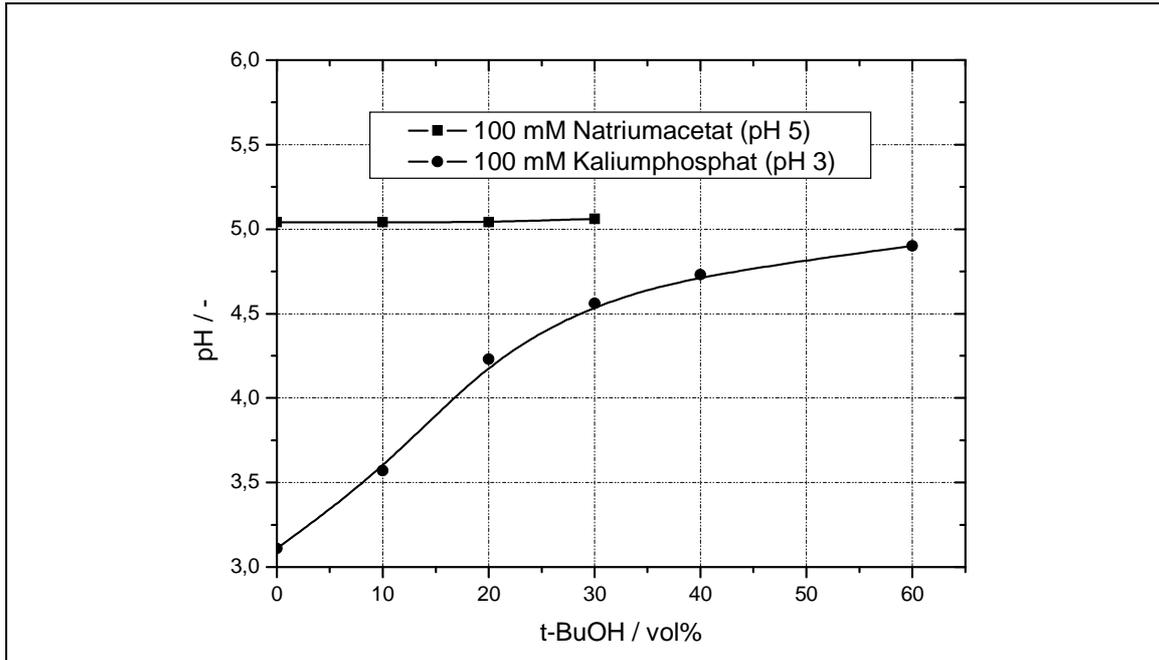


Abbildung 3.2.2: *t*-BuOH-Zusatz zu Acetat- und Phosphatpuffer.

Als Konsequenz dieser Beobachtung sind alle Puffer für die folgenden Untersuchungen (vgl. auch Kapitel 4) nach Zugabe von *tert*-Butanol erneut auf den gewünschten pH-Wert eingestellt worden.

### 3.2.2 Leitfähigkeit

Jeder Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit liegt eine Widerstandsmessung zugrunde [Jander 1989; Atkins 2000]. Die Leitfähigkeit  $G$  und der Widerstand  $R$  sind umgekehrt proportional zueinander (Formel 3.2.3)

$$R = \frac{1}{G} = \rho \cdot \frac{l}{q} = \frac{1}{\kappa} \cdot \frac{l}{q} \quad \text{Formel 3.2.2}$$

mit

$R$  = Widerstand /  $\Omega$

$G$  = Leitwert /  $S = \Omega^{-1}$

$\rho$  = spezifischer Widerstand /  $\Omega \text{ cm}^{-1}$

$l$  = Abstand der Elektroden /  $\text{cm}$

$q$  = Querschnitt der Fläche des Leiters /  $\text{cm}^2$

$\kappa$  = spezifischer Leitfähigkeit /  $S \text{ cm}^{-1}$

Wie die Messgröße Widerstand der Kehrwert der Leitfähigkeit ist, so ist der vom Messaufbau unabhängige spezifische Widerstand der Kehrwert der spezifischen Leitfähigkeit. Da man in einer verdünnten Lösung in erster Näherung die Bewegung jeder Ionensorte als unabhängig von allen anderen betrachtet setzt sich die spezifische

Leitfähigkeit eines (verdünnten) Elektrolyten additiv aus den einzelnen Ionenanteilen zusammen (Formel 3.2.3).

$$\kappa = \text{const} \cdot \sum u_i \cdot z_i \cdot c_i \quad \text{Formel 3.2.3}$$

Mit  $u$  = Ionenbeweglichkeit /  $\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$   
 $z$  = Anzahl der Elementarladungen

Jede Ionensorte transportiert einen bestimmten Anteil der Elektrizitätsmenge, und die Summe aller Anteile bestimmt die insgesamt gemessene Leitfähigkeit. Die Leitfähigkeit eines vollständig dissoziierten Elektrolyten ist, da ja die Wertigkeit und in verdünnter wässriger Lösung auch die Beweglichkeit seiner Ionen die gleiche bleiben, in erster Näherung eine lineare Funktion seiner Konzentration bei konstanter Temperatur. Für eine effiziente elektrochemische Teilreaktion ist es daher von Vorteil, eine hohe Salzkonzentration zu verwenden.

In Tabelle 3.2.1 sind die Leitfähigkeiten geeigneter Elektrolytlösungen für die Sauerstoffreduktion angegeben. Neben den Konzentrationen ist der Salzgehalt zum Vergleich der Elektrolyten angegeben. Die Leitfähigkeit von Acetatpuffer ist so gering, dass man, um eine Leitfähigkeit in der Größenordnung von  $10 \text{ mS cm}^{-1}$  zu erreichen, Pufferkonzentrationen von 200 mM oder höher verwenden müsste. Da für die Pufferkapazität allerdings bereits eine Konzentration von 100 mM ausreichend ist, wurde zur Erhöhung der Leitfähigkeit Natriumsulfat zugesetzt. Wegen des zweiwertigen Anions wird so eine höhere Leitfähigkeit bei geringerem Salzgehalt erreicht.

**Tabelle 3.2.1 Leitfähigkeit verschiedener Pufferlösungen**

Puffer	c / mM	c(Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) / mM	Salzgehalt / g L <sup>-1</sup>	Leitfähigkeit / mS cm <sup>-1</sup>
Acetat	25	0	2,05	1,4
Acetat	25	50	9,2	10,1
Acetat	100	0	8,2	5,6
Acetat	100	50	15,3	13,4
Citrat	25	0	5,35	3
Citrat	25	50	12,45	13,1
Citrat	100	0	21,4	12,2
Phosphat	100	0	13,6	n.b.

Um Leitfähigkeiten höher als  $10 \text{ mS cm}^{-1}$  zu erreichen, kommen also nur die folgenden Medien in Betracht:

- 100 mM Citrat
- 25 mM Citrat + 50 mM Natriumsulfat
- 100 mM Acetat + 50 mM Natriumsulfat

Die hohe Leitfähigkeit ist umso wichtiger, da die Leitfähigkeit durch den Zusatz des Cosolvens wieder deutlich herabgesetzt wird (Abbildung 3.2.3), da die Ionenkonzentration durch den Cosolvenszusatz abnimmt.

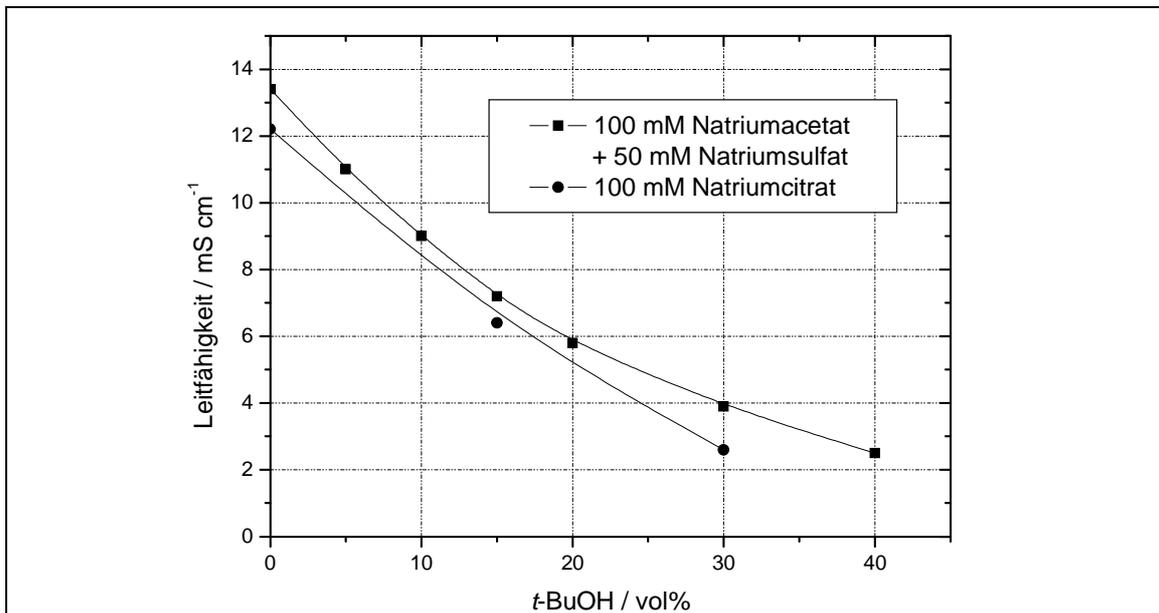


Abbildung 3.2.3: Abnahme der Leitfähigkeit durch Zusatz von *t*-BuOH.

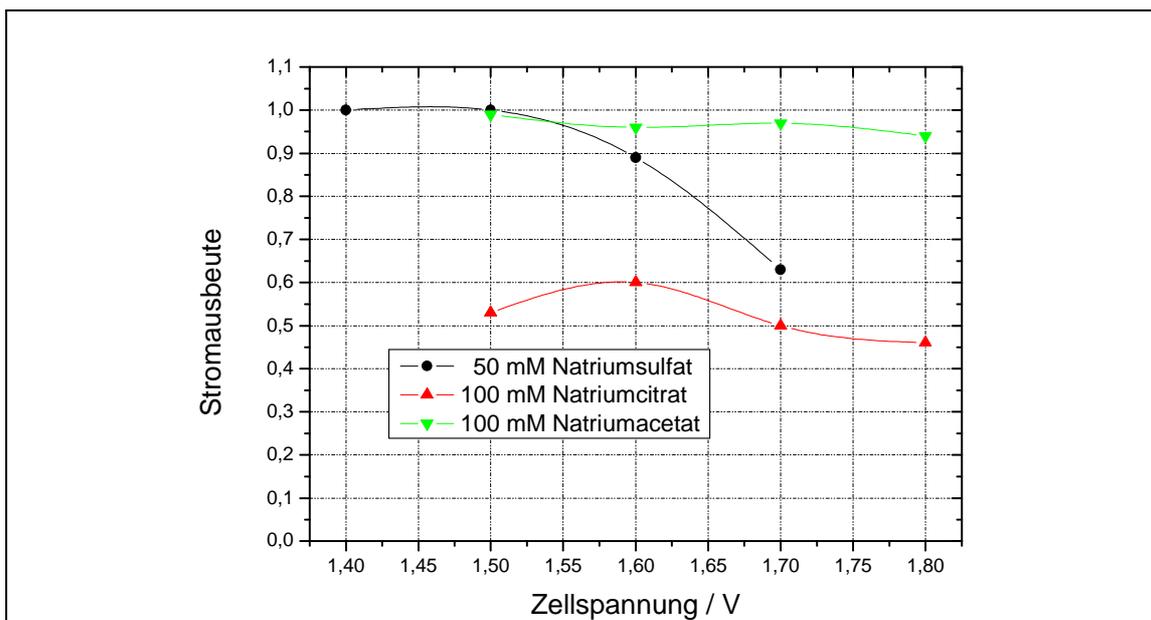
Die Leitfähigkeit nimmt pro 10 vol% *tert*-Butanol-Zusatz um ca. ein Drittel ab. Bereits nach einer Zugabe von 10 vol% *tert*-Butanol liegt die Leitfähigkeit unter  $10 \text{ mS cm}^{-1}$ . Die Ausgangsleitfähigkeit von nur 25 mM Citratpuffer mit Natriumsulfatzusatz ist ähnlich hoch wie die von 100 mM Citratpuffer, daher wurde er nicht gesondert untersucht.

Aus diesen Untersuchungen kann geschlossen werden, dass der Zusatz an Cosolvens so gering wie möglich sein sollte.

### 3.2.3 Stromausbeute<sup>7</sup>

Die Stromausbeute bezeichnet die Selektivität einer elektrochemischen Reaktion und wird bestimmt aus der geflossenen Ladungsmenge im Verhältnis zur theoretisch für die Reaktion nötigen Ladung (vgl. Abschnitt 2.1). Eine 100%ige Stromausbeute wird aus mehreren Gründen so gut wie nie erreicht. Da in einer Elektrolyse evtl. mehrere redoxaktive Spezies vorliegen können Nebenreaktionen auftreten. Auch wenn die Nebenreaktion bei einem bestimmten Potential noch nicht ablaufen sollten, kann eine ungleichmäßige Elektrodenoberfläche zu abweichenden Überspannungen führen. Besonders die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Graphitelektroden sind bezüglich Ihrer Oberfläche schwer zu charakterisieren [Kato, et al. 2000].

In den bisher als relevant identifizierten Puffern wird die Stromausbeute für die Produktion von Wasserstoffperoxid aus gelöstem Sauerstoff bestimmt (Abbildung 3.2.4, [Vuorilehto 2003]). Natriumsulfat wird als Referenzelektrolyt benutzt, da es bereits für die Sauerstoffreduktion in wässrigen Medien eingesetzt wurde [Vuorilehto, et al. 1995; Tamminen, et al. 1996].



**Abbildung 3.2.4: Stromausbeute als Funktion der Zellspannung in unterschiedlichen Puffern.**

3D-Zelle<sup>8</sup>,  $v_{\text{fl}} 100 \text{ mL min}^{-1}$ , 50 mM Natriumsulfat, 100 mM Citratpuffer, 100 mM Acetat-Puffer mit 50 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , Graphitkugeln (Durchmesser 1,0 – 1,4 mm,  $900 \text{ cm}^2$  geometrische Oberfläche)

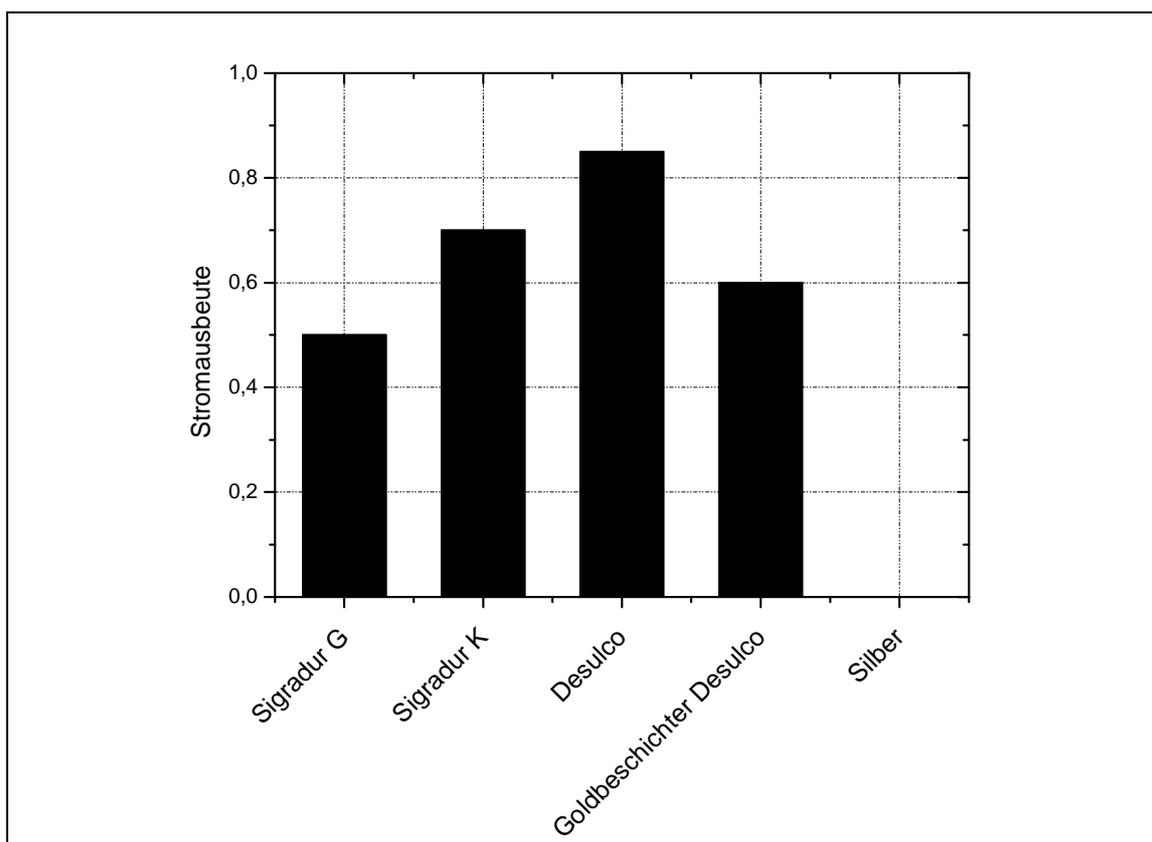
<sup>7</sup> Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse wurden im Rahmen eines gemeinsamen BASF-Projektes mit Herrn Dr. K. Vuorilehto erzielt.

<sup>8</sup> Zur 3D-Zelle siehe auch Abschnitt 5.3.

Bei den Puffersystemen muss im Gegensatz zu reinem Natriumsulfat eine höhere Überspannung aufgewendet werden, um den Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid zu reduzieren. Eine Zellspannung von 1,9V oder höher führt jedoch zur kathodischen Wasserstoffproduktion. Über einen Bereich von 1,5 – 1,8V liegt die Stromausbeute in Acetat-Puffer nahe 95 %, während sie in Citrat-Puffer nur bei 50 % liegt. Dies kann eventuell auf Koordinierungseffekte des Citrat-Ions an der Elektrodenoberfläche zurückgeführt werden. Für ein Verfahren mit hoher Produktivität ist es also unerlässlich Acetat-Puffer zu verwenden, um nicht Strom in Nebenreaktionen zu verlieren.

Anhand der Voruntersuchungen ist als am besten geeignetes Reaktionsmedium Natriumacetatpuffer mit Natriumsulfatzusatz identifiziert worden. Der Gehalt an Cosolvenz sollte so gering wie möglich gehalten werden.

Mit Acetat als Elektrolyt wurde daraufhin ein optimales Elektrodenmaterial für die Wasserstoffperoxid-Produktion gesucht. Untersucht wurden sphärischer glasartiger Kohlenstoff (SIGRADUR ®), Graphit (Desulco), Goldbeschichteter Graphit (Desulco, Beschichtung RRR-Labs, Indien) und Silberpulver (Abbildung 3.2.5).



**Abbildung 3.2.5: Stromausbeute als Funktion des Elektrodenmaterials**

3D-Zelle<sup>9</sup>,  $v_H$  100 mL min<sup>-1</sup>, 100 mM Acetat-Puffer mit 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

<sup>9</sup> Zur 3D-Zelle siehe auch 5.3 ab S.97

Die glasartigen Kohlenstoffe Sigradur® G und K liefern ähnliche Stromausbeuten wie der goldbeschichtete Graphit. An Silberelektroden wird der Sauerstoff komplett zu Wasser reduziert, so dass die Stromausbeute bezüglich der Wasserstoffperoxid-Produktion bei 0 liegt. Für einen effizienten Prozess wird folglich Desulco-Graphit verwendet. Für eine Elektrolyse im Becherglass steht Kohlefilz zur Verfügung. Da nur eine Sorte verwendet wird (SGL Carbon, 2mm) entfällt ein Vergleich von Elektrodenmaterialien. Die Stromausbeuten sind in Abschnitt 5.4.5 angegeben.

### 3.2.4 Bestimmung der Sauerstoffkonzentration

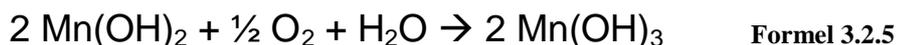
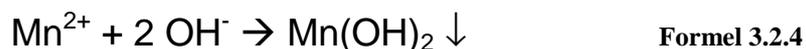
Einfluss auf die Löslichkeit von Sauerstoff in wässrigen Lösungen haben u.a. Salzkonzentration und Temperatur [Schumpe, et al. 1978], u.U. auch das Cosolvens. Daher soll die gelöste Menge Sauerstoffs im Reaktionsmedium bestimmt werden.

Die Bestimmung des Sauerstoffgehaltes einer Lösung ist eine standardisierte analytische Fragestellung. Insbesondere in der Biotechnologie ist sie zur Überwachung von Fermentationen technisch weit entwickelt. Die meisten Verfahren waren jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht anzuwenden, da sie

- nur die relative Sättigung messen,
- nur für wässrige Lösungen anzuwenden sind.

Für die dargestellten Ergebnisse wurde eine quantitative Titration des gelösten Sauerstoffs nach Winkler durchgeführt [Wasserwesen 1992]. Das Titrationsverfahren geht zurück auf Lajois Winkler (1863-1939), der 1888 als erster den in Wasser gelösten Sauerstoff über die Oxidation von Mangan(II) in alkalischer Lösung durch iodometrische Titration bestimmte. Durch die Fällung und Titration wird die gesamte gelöste Stoffmenge erfasst und eine Eichung oder Relativmessung vermieden.

Das Probengefäß wird komplett mit der Probenlösung randvoll aufgefüllt. Zuerst wird die Probe mit einer entsprechenden Menge Mangan(II)chlorid und Kaliumiodid versetzt. Der gelöste Sauerstoff oxidiert die  $Mn^{2+}$ -Ionen zu Mangan(III), welches als unlösliches Manganoxyhydroxyd ausfällt (Formel 3.2.4).



Hier liegt die entscheidende Fehlerquelle des Verfahrens. Der gebildete Niederschlag muss sich erst absetzen, bevor man die weiteren Reagentien zugibt. Da ein *tert*-Butanol Zusatz die Viskosität ändert, dauert das Absetzen deutlich länger als im reinen Wasser. Die Gefäße werden luftdicht verschlossen, damit kein Sauerstoff in die Lösung nachdiffundiert.

Beim anschließenden Ansäuern lösen sich die gebildeten Hydroxyde auf, und eine der gelösten Sauerstoffmenge äquivalente Menge Iod wird gebildet (Formel 3.2.6).

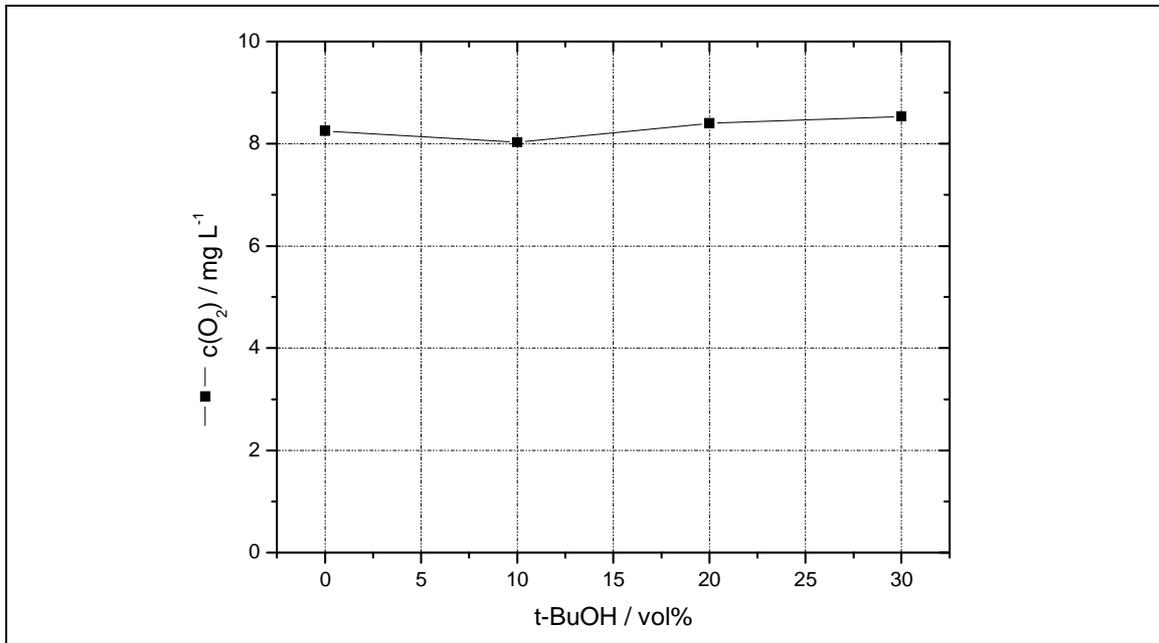


Das gebildete Iod wird mit Thiosulfatlösung zurücktitriert unter Verwendung von Stärke als Indikator (Formel 3.2.7).



Über die verbrauchte Menge Thiosulfatlösung wird dann die Menge gelösten Sauerstoffs berechnet.

Da dieses Verfahren nur bis zu einer Sauerstoffsättigung von  $20 \text{ mg L}^{-1}$  angewendet wird, wurden die jeweiligen Proben nur mit Luft gesättigt und mittels des Henry'schen Gesetzes die Werte für die vollständige Sauerstoffsättigung bestimmt.



**Abbildung 3.2.6: Sauerstoffkonzentration in Acetat-Puffer in Abhängigkeit von der *tert*-Butanolkonzentration.**

100 mM Acetat-Puffer mit 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH5), *t*-BuOH wie angegeben, T = 20 °C

Wie in Abbildung 3.2.6 belegt, ändert der Zusatz von *tert*-Butanol die Löslichkeit des Sauerstoffs im Reaktionsmedium praktisch nicht.

### 3.2.5 Diffusion und Viskosität<sup>10</sup>

Der Transport eines Reaktanden durch die elektrochemische Doppelschicht ist diffusionskontrolliert. Zur Charakterisierung der Elektrodenprozesse ist daher der Diffusionskoeffizient ein wichtiger Parameter. Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten wird ein Potential-Schritt-Experiment [Pletcher 1992] durchgeführt. Das Prinzip zeigt Abbildung 3.2.7.

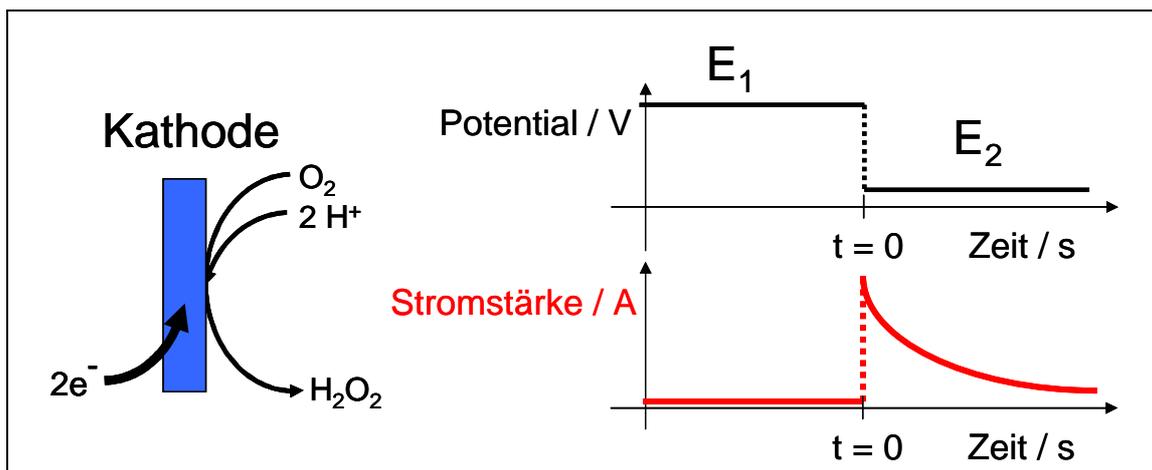


Abbildung 3.2.7: Potential-Schritt-Experiment (Chronoamperometrie)

Zu Beginn des Experimentes wird die Elektrode bei einem Potential  $E_1$  gehalten, bei der noch keine Reaktion stattfindet und daher auch kein Strom fließt. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  wird das Potential auf  $E = E_2$  geändert. Der Wert ist so weit negativ gewählt, dass aller Sauerstoff, der die Elektrode erreicht, reduziert wird. Durch das Einsetzen der Reaktion wird ein Strom gemessen. Die zeitliche Stromänderung nach dem Potentialschritt wird aufgezeichnet. Der Strom ändert sich, da die Lösung an der Elektrodenoberfläche rasch an Sauerstoff verarmt; er fällt mit der Zeit exponentiell ab. Die Geschwindigkeit dieses Abfalls ist nur bestimmt von der Diffusion des Sauerstoffs aus der Lösung zur Elektrodenoberfläche. Die Berechnung des diffusionskontrollierten Stromes erfordert die Lösung der Diffusionsgleichung (Formel 3.2.8). [Hamann, Vielstich 1998; Bard, Faulkner 2001]

$$\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c(x,t)}{\partial x^2} \quad \text{Formel 3.2.8}$$

Mit  $D = \text{Diffusionskoeffizient} / \text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$

<sup>10</sup> Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse zur Chronoamperometrie wurden im Rahmen eines vom Evangelischen Studienwerk Villigst e.V. geförderten Aufenthaltes im Arbeitskreis von Dr. Denuault in Southampton(UK) erzielt.

Als Randbedingung zur Lösung wird eingeführt, dass der Strom an der Elektrodenoberfläche proportional zum Fluss des Reaktanden ist (Formel 3.2.9).

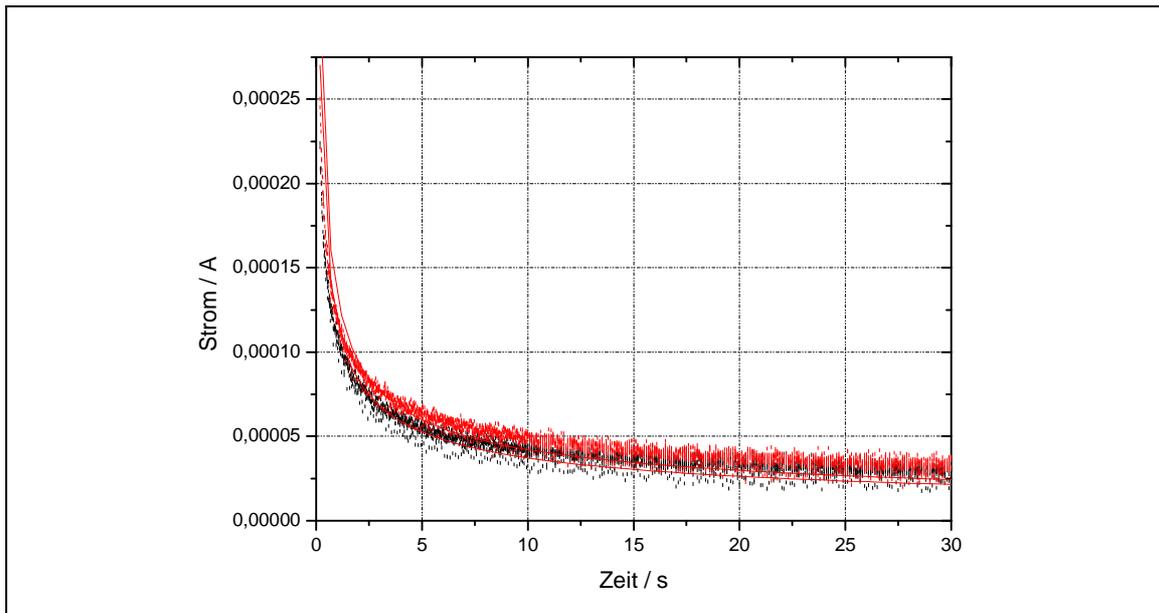
$$I(t) = z \cdot F \cdot A \cdot D \left( \frac{\partial c(x, t)}{\partial x} \right)_{x=0} \quad \text{Formel 3.2.9}$$

Mit  $z$  = Anzahl Elektronen  
 $F$  = Faraday-Konstante (96.485 C mol<sup>-1</sup>)  
 $A$  = Elektrodenfläche / cm<sup>2</sup>

Hieraus ergibt sich dann die Cottrell-Gleichung (Formel 3.2.10).

$$I(t) = z \cdot F \cdot A \cdot \pi^{-1/2} \cdot D^{1/2} \cdot c \cdot t^{1/2} \quad \text{Formel 3.2.10}$$

Daher kann aus Formel 3.2.10 unter Kenntnis der Sauerstoffkonzentration (vgl. Abschnitt 3.2.4) der Diffusionskoeffizient bestimmt werden. Die Messung wird mit sauerstoffgesättigten Lösungen durchgeführt. Eine typische Messung zeigt Abbildung 3.2.8.



**Abbildung 3.2.8: Strom-Zeit-Verlauf des Potential-Schritt-Experiments.**

100 mM Acetat-Puffer mit 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH5), 0 vol% t-BuOH, E<sub>1</sub> = 0 mV vs. MMS, E<sub>2</sub> = -1300 mV vs. SCE, Glaskohlenstoffelektrode 0,053 cm<sup>2</sup>

Aus den Doppelbestimmungen werden Mittelwerte gebildet und die Diffusionskoeffizienten mittels nichtlinearer Regression bestimmt. Hierbei wird Formel 3.2.10 benutzt unter Verwendung berechneter Sauerstoffkonzentrationen. Eine Übersicht der bestimmten Parameter gibt Tabelle 3.2.2.

**Tabelle 3.2.2 Diffusionskoeffizienten D bei unterschiedlichem *tert*-Butanol-Gehalt.**

<i>t</i> -BuOH / vol%	Thioanisol / mM	O <sub>2, gemessen</sub> / mM (luftgesättigt)	O <sub>2, berechnet</sub> / mM (O <sub>2</sub> -gesättigt)	D / 10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
0	0	0,258	1,23	3,20±0,40
10	0	0,251	1,19	2,81±0,56
20	0	0,262	1,25	2,14±0,15
30	0	0,267	1,27	1,88±0,09
0	20	0,258	1,23	3,82±0,23
10	20	0,251	1,19	2,75±0,06
20	20	0,262	1,25	1,81±0,11
30	20	0,267	1,27	2,17±0,04

In der Tendenz sinkt der Diffusionskoeffizient mit der zugesetzten Menge *tert*-Butanol. Dies lässt sich mit den veränderten hydrodynamischen Eigenschaften des Reaktionsmediums erklären. Mittels eines Rotationsviskosimeters wurde die dynamische Viskosität ermittelt.

$$\nu = \frac{\mu}{\rho} \quad \text{Formel 3.2.11}$$

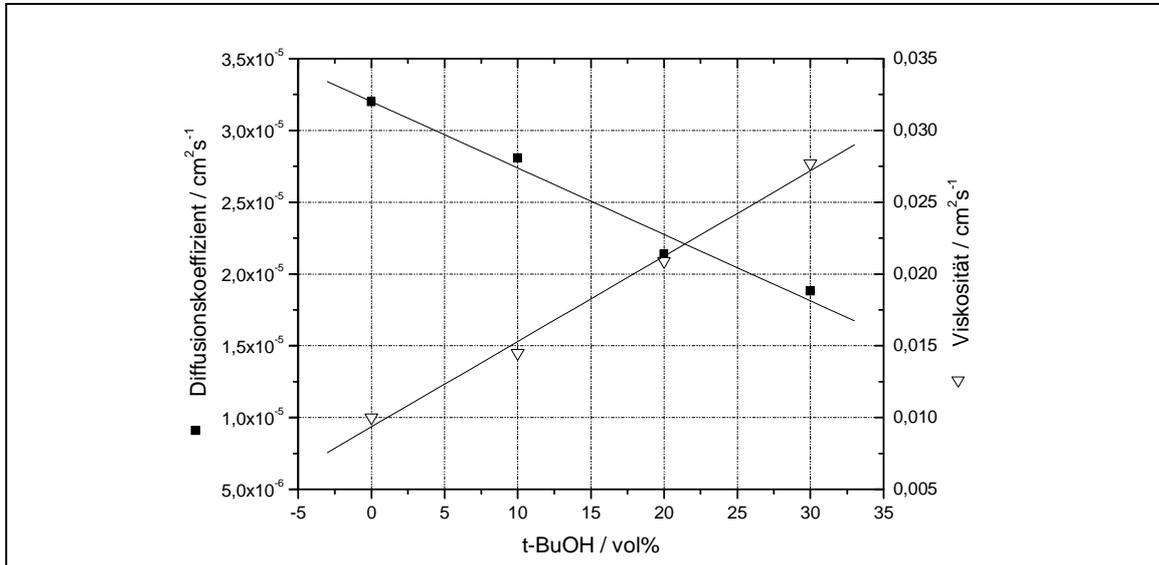
mit  $\nu$  = kinematische Viskosität / m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>  
 $\mu$  = dynamische Viskosität / kg m s<sup>-1</sup>  
 $\rho$  = Dichte / kg m<sup>3</sup>

Die dynamische Viskosität lässt sich gemäß Formel 3.2.11 in die kinematische Viskosität überführen. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 3.2.3 zusammengefasst.

**Tabelle 3.2.3 Viskosität von Acetat-Puffer bei unterschiedlichem *tert*-Butanol-Gehalt.**

<i>t</i> -BuOH / vol%	$\rho$ / g mL <sup>-1</sup>	$\mu$ / mPa s	$\nu$ / cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
0	1,008	1,008	0,0100
10	0,993	1,441	0,0145
20	0,980	2,049	0,0209
30	0,960	2,660	0,0277

Es zeigt sich hier ein der Diffusion entgegen gesetzter Trend. Die Viskosität des Mediums steigt mit dem Zusatz von *tert*-Butanol an. Die gegenläufige Entwicklung ist in Abbildung 3.2.9 dargestellt.

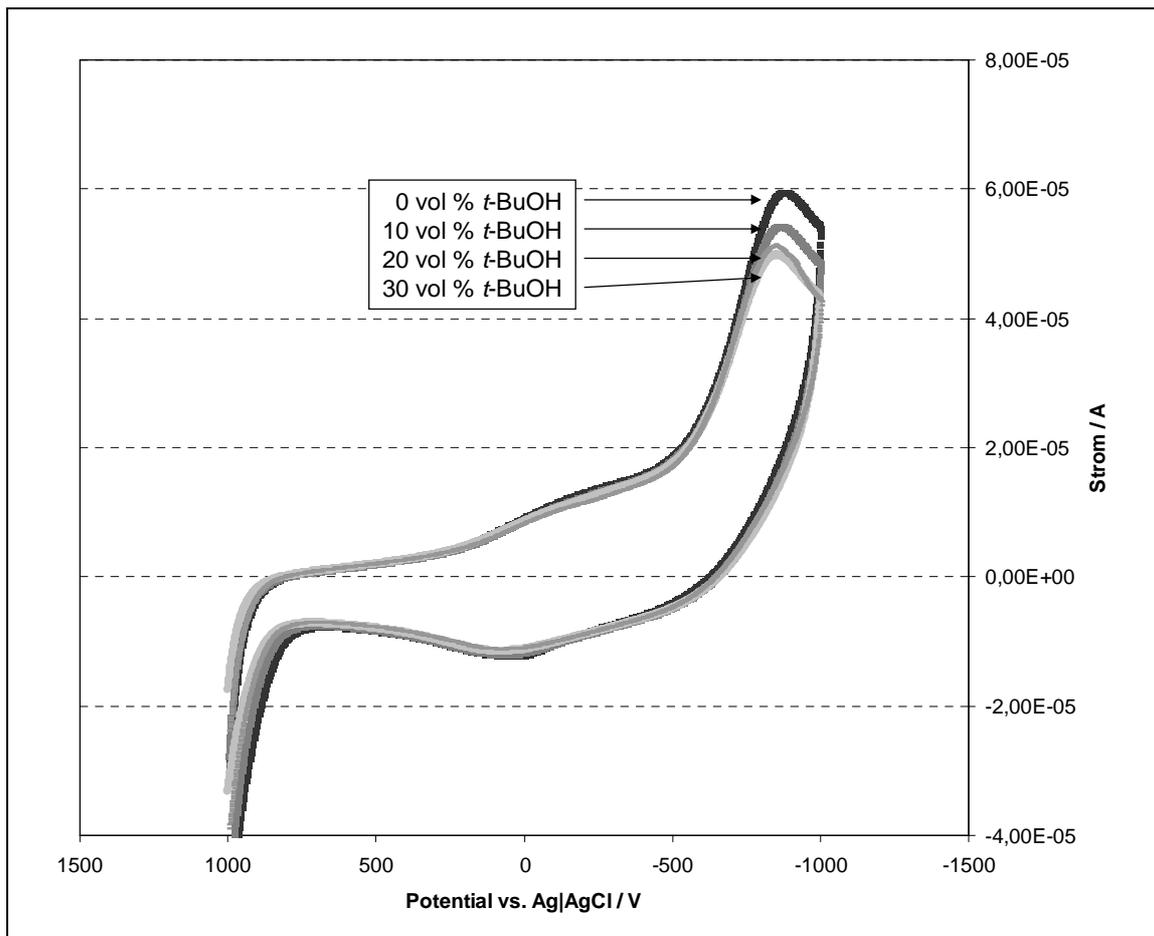


**Abbildung 3.2.9: Diffusionskoeffizient und Viskosität in Abhängigkeit von der *tert*-Butanol-Konzentration**

100 mM Acetat-Puffer mit 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH5), t-BuOH wie angegeben, Viskositätsmessung: Rotovisco RV30, CV100 (Haake)

Durch Zusatz von *tert*-Butanol nimmt also die Sauerstoffverfügbarkeit an der Kathode ab, da der Diffusionskoeffizient abnimmt. Mit anderen Worten wird der Massentransport wegen der veränderten Hydrodynamik schlechter. Dies lässt sich auch im Cyclovoltammogramm belegen.

Nimmt man cyclische Voltammogramme unter den optimierten Reaktionsbedingungen auf, so sieht man, dass der irreversible Peakstrom mit steigendem Anteil an *tert*-Butanol abnimmt (Abbildung 3.2.10).



**Abbildung 3.2.10: Cyclovoltammogramme mit unterschiedlichem *tert*-Butanol-Zusatz**

100 mM Acetat-Puffer mit 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH5), t-BuOH wie angegeben, -1000 bis +1000 mV vs. Ag|AgCl, 100 mV s<sup>-1</sup>, Arbeitselektrode glasartiger Kohlenstoff, Gegenelektrode Platin, beide BAS

### 3.3 Zusammenfassung

Der elektrochemische Schritt wurde im Hinblick auf die biokatalytische Anwendung charakterisiert und optimiert.

- Phosphat-Puffer kann wegen der Pufferkapazität nicht benutzt werden.
- Citrat- und Acetat-Puffer sind geeignete Medien.
- Natriumsulfat dient als Zusatz zur Erhöhung der Leitfähigkeit.
- Ein Zusatz von *tert*-Butanol soll möglichst vermieden werden, da
  - die Leitfähigkeit gesenkt.
  - die Viskosität erhöht, bzw. die Diffusion erniedrigt wird.
- Desulco-Graphit ist das effizienteste Elektrodenmaterial.
- Unter optimierten Reaktionsbedingungen
  - 100 mM Acetat-Puffer, 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH5

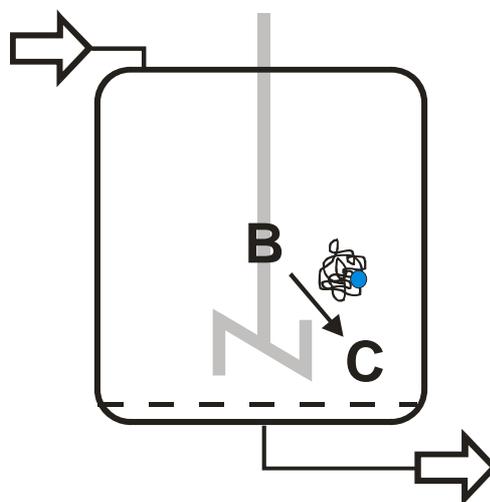
werden an Desulco-Graphit Stromausbeuten von  $95 \pm 5$  % erreicht.



## 4 Biokatalyse unter elektrochemischen Aspekten

### 4.1 Einleitung

Zur Prozessentwicklung einer Biotransformation gehören Untersuchungen zur Aktivität und Stabilität des Biokatalysators. Diese Untersuchungen sollen hier die im vorherigen Kapitel erarbeiteten Bedingungen des elektrochemischen Schrittes mit den literaturbeschriebenen Reaktionsbedingungen vergleichen. Der peroxidase-katalysierte zweite Schritt der elektroenzymatischen Kaskade, die Oxidation von Thioanisol zu (*R*)-Methylphenylsulfoxid (Abbildung 4.1.1) wird daher in Acetatpuffer, Citratpuffer und im



Vergleich dazu unter den Ausgangsbedingungen untersucht, zusätzlich soll die Funktion des Cosolvens *tert*-Butanol hinterfragt werden. Die gesamten Untersuchungen sollen optimale Reaktionsbedingungen für die enzymatische Reaktion im Hinblick auf die elektroenzymatische Reaktionsführung liefern, also den Katalysatorverbrauch möglichst minimieren und das Verfahren trotzdem bei guter Produktivität (=Aktivität) durchführen. Auf die reaktionstechnische Umsetzung wird im nächsten Kapitel eingegangen.

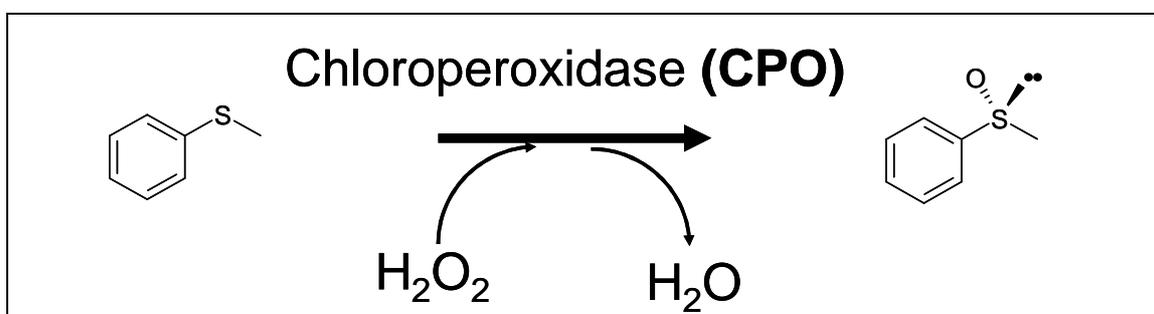


Abbildung 4.1.1: Enantioselektive Oxidation von Thioanisol zu (*R*)-Methylphenylsulfoxid.

#### 4.1.1 Chloroperoxidase

Das Enzym Chloroperoxidase (E.C. 1.11.1.10.) ist ein hämhaltiges Protein. Es kann durch Fermentation des marinen filamentösen Pilzes *Caldariomyces fumago* (auch *Leptoxyphium fumago*) gewonnen werden [Pickard 1981; Pickard, Hashimoto 1982; Carmichael, et al. 1986]. Das Protein wird dabei vom Organismus in das Medium sekretiert. Der Wildtyp-Organismus ist bisher das beste Expressionssystem für das native System, so kann der Pilz in  $\kappa$ -Carrageenan immobilisiert werden und CPO durch kontinuierliche Fermentation gewonnen werden [Carmichael, et al. 1986]. Die

Fermentationsbedingungen sind ausführlich studiert und es kann ein definiertes Mineralmedium verwendet werden [Pickard 1981].

Das Enzym konnte bereits 1965 von Hager et al. isoliert und aufgereinigt werden [Morris, Hager 1965]. Die Molmasse des Proteins liegt bei ca. 42 kDa, die je nach dem Glykosilierungs-Grad schwankt. In der Regel liegt der Anteil der Zuckerbausteine bei 25 %. Die räumliche Struktur ist in Abbildung 4.1.2 gezeigt, die erst dreißig Jahre nach der Isolierung mit hinreichender Auflösung aufgeklärt werden konnte [Sundaramoorthy, et al. 1995]. Erst vor einigen Jahren konnte eine rekombinante Chloroperoxidase in Aspergillen exprimiert werden [Zong, et al. 1997]. Die Ergebnisse belegen die Möglichkeit, die erhaltene Aktivität liegt jedoch unter der homolog exprimierten des Wildtypenzym. Nach diesem Schritt konnten dann auch mit molekularbiologischen Methoden optimierte Mutanten erhalten werden, die hinsichtlich ihrer Peroxidase-Aktivität und Stabilität optimiert wurden [Rai, et al. 2000; Rai, et al. 2001; van de Velde, et al. 2001a]. Die Enzymexpression dieser Mutanten erfolgte jedoch bisher ebenso nur homolog. Hier liegt also noch ein großes Potential zur Verbesserung des biologischen Systems, da *Caldariomyces fumago* nicht optimal für molekularbiologische Methoden ist und die heterologe Expression bisher zu nicht befriedigenden Ergebnissen führte.

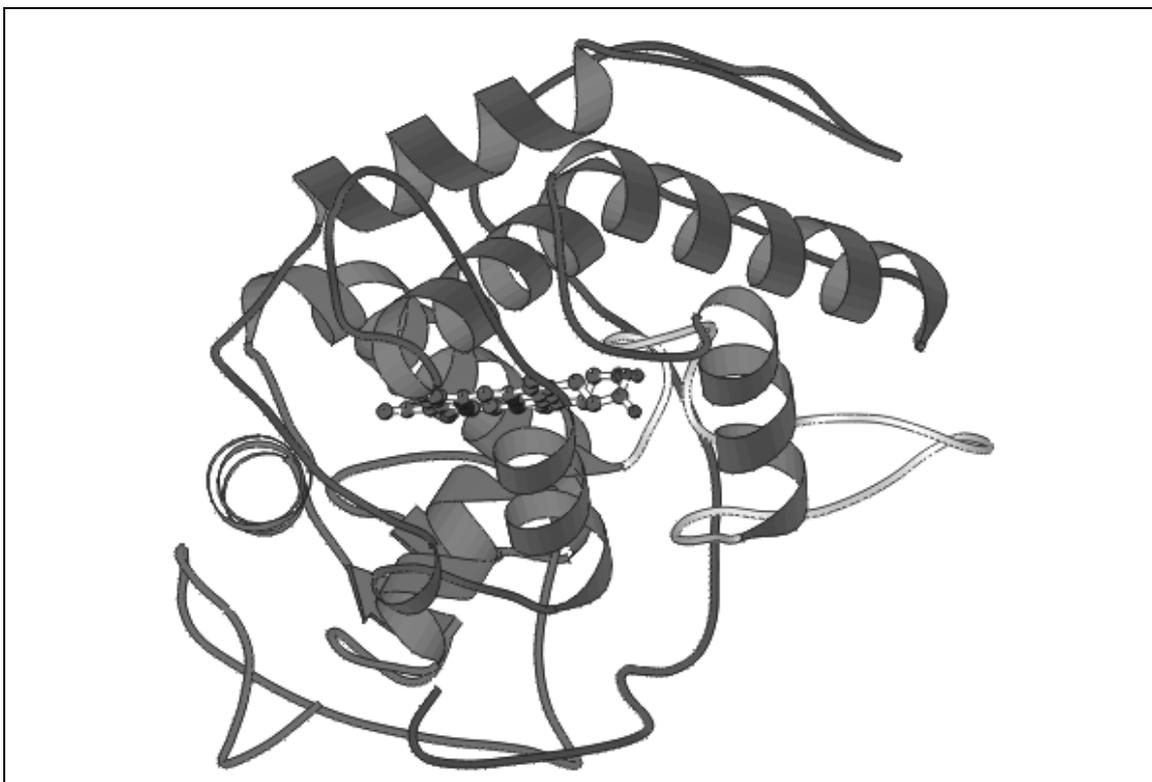


Abbildung 4.1.2: Bild der Strukturhelices der CPO ohne Zuckerbausteine<sup>11</sup>.

<sup>11</sup> <http://metallo.scripps.edu/PROMISE>

Das Enzym fällt durch sein breites Reaktions- und Substratspektrum auf. Es hat eine ungewöhnliche zweifache Reaktivität, abhängig vom pH-Wert und der Anwesenheit von Halogenid-Ionen. Alle Reaktionen laufen an der Häm-Einheit als prosthetische Gruppe ab (Abbildung 4.1.3) [Demontellano 1992; van Rantwijk, Sheldon 2000]. Das Eisen ist, ähnlich wie bei P450-Enzymen durch einen Cystein-Liganden komplexiert.

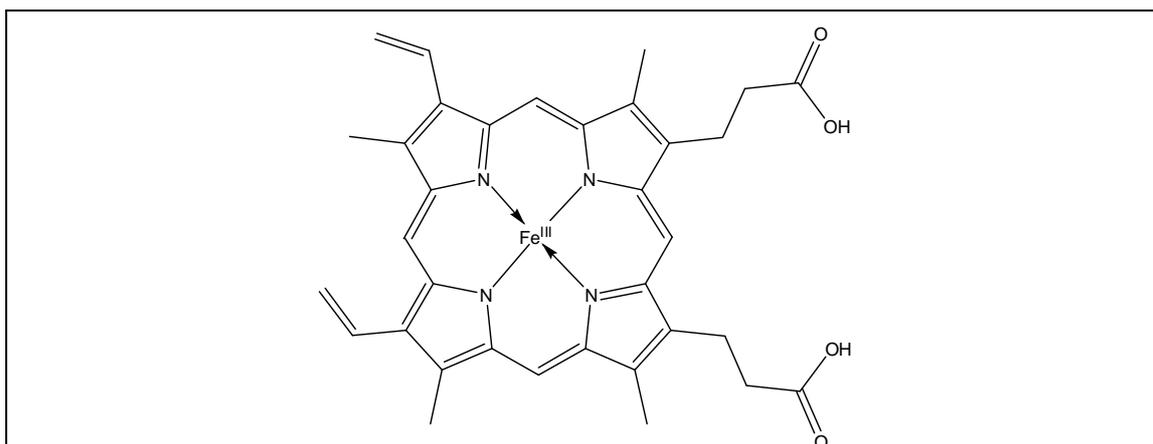


Abbildung 4.1.3: Ferriprotoporphyrin IX.

Peroxidase-Reaktionen verlaufen über eine Verdrängung des sechsten Liganden (Wasser) durch Wasserstoffperoxid, wodurch zuerst ein Eisen(III)hydroperoxid-Intermediat gebildet wird, welches durch Eliminierung von Wasser eine Eisen(V)oxo-Spezies bildet, die spektroskopisch detektiert werden kann und als Compound I bezeichnet wird. Diese aktive Spezies ist instabil und anfällig für Selbstdesaktivierung durch Oxidation der Porphyrin-Stickstoffe. Diese sind schon aktiviert für einen reaktiven Angriff, da in den mesomeren Grenzformen die Ladung über das Gerüst verteilt wird (Abbildung 4.1.4, rechte Seite). Eine Besonderheit der CPO unter den Peroxidasen ist es, dass Compound I erneut mit Wasserstoffperoxid in einer Katalase-Reaktion [Sun, et al. 1994] zum Ruhezustand zurückreagieren kann.

In den unselektiven Peroxidase-Reaktionen entzieht Compound I dem Substrat ein Elektron (Abbildung 4.1.4, oberer Reaktionsweg), wobei das Intermediat Compound II entsteht. Ein zweiter Ein-Elektronen-Transfer überführt das Enzym wieder in den Ruhezustand.

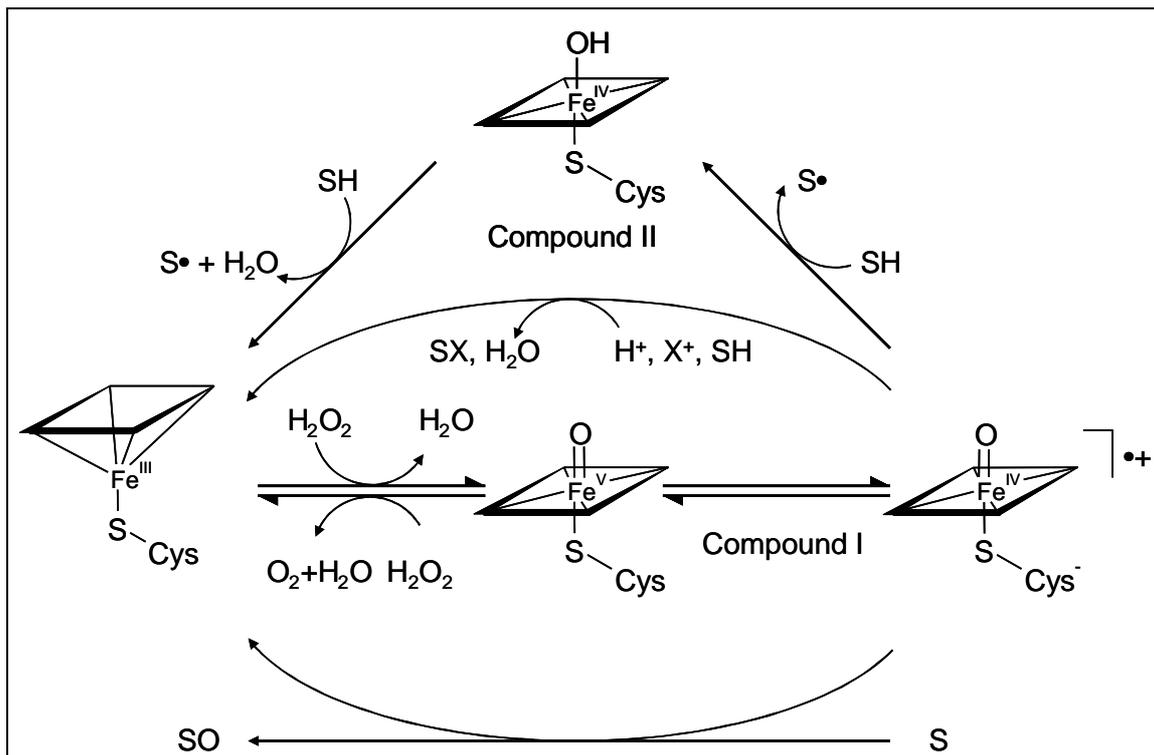
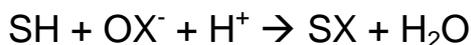


Abbildung 4.1.4: Mechanismen der Halogenase- und Peroxidase-Reaktion (Die Häm-Gruppe ist schematisch als Raute dargestellt).

Ein weiterer Reaktionsweg der unselektiven Oxidation verläuft in Gegenwart von Halogenid-Ionen, weswegen das Enzym auch der Klasse der Haloperoxidasen zugeordnet wird [Franssen, Vanderplas 1992; Franssen 1994]. Hierbei oxidiert Compound I zuerst das Halogenid-Ion  $X^-$  zu Hypohalogenit  $OX^-$ , welches dann als Oxidationsmittel weiterreagiert (Formel 4.1.1).



Dieser Reaktionsweg wird als Halogenase-Aktivität [Geigert, Neidleman 1983; Neidleman, Geigert 1987] des Enzyms bezeichnet, obwohl der genaue Weg immer noch nicht geklärt ist. Unbestritten ist, dass das Halogenid-Ion in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid enzymatisch katalysiert zu Hypohalogenit oxidiert wird [Dunford 2000]. Bei der anschließenden Chlorierung des organischen Substrates durch das gebildete Hypohalogenit kann nicht festgelegt werden, ob die Reaktion katalysiert oder unkatalysiert, im aktiven Zentrum des Enzyms oder außerhalb abläuft. Das Chlorid ist also definitiv als Substrat der enzymatischen Reaktion zu betrachten, die organischen Verbindungen S-H nach gängiger Meinung nicht [van Pee, et al. 2000; van Pee 2001].

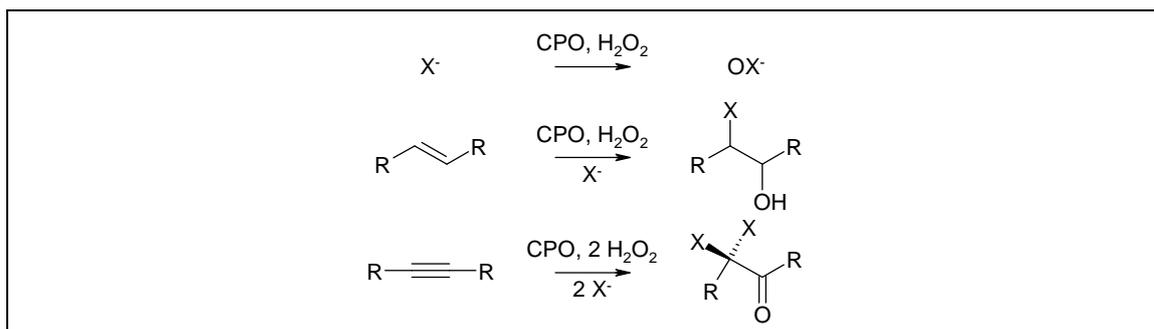


Abbildung 4.1.5: Nicht selektive Oxidationsreaktionen in Gegenwart von Halogenid-Ionen.

Alkene können zu  $\alpha$ -Halogenalkoholen [Geigert, et al. 1983b, 1983c] und Alkine zu  $\alpha$ -Dihalogenketonen [Geigert, et al. 1983a] oxidiert werden (Abbildung 4.1.5). Hierbei wird, obwohl stereogene Zentren entstehen, kein Enantiomerenüberschuss erzielt.

In den selektiven Peroxidase-Reaktionen (Abbildung 4.1.4, unterer Reaktionsweg) wird direkt das Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen. Durch den nicht radikalischen Reaktionsverlauf können über diesen Reaktionsweg stereogene Zentren erhalten werden [van Deurzen, et al. 1997c]. Substrate für diese Reaktionen sind insbesondere Sulfide, die zu chiralen Sulfoxiden oxidiert werden; außerdem können Alkene zu chiralen Epoxiden umgesetzt werden [Dembitsky 2003]. Zuletzt wurde die Möglichkeit entdeckt, vergleichbar mit Monooxygenase-Reaktionen, Alkane zu hydroxylieren [Zaks, Dodds 1995] (Abbildung 4.1.6).

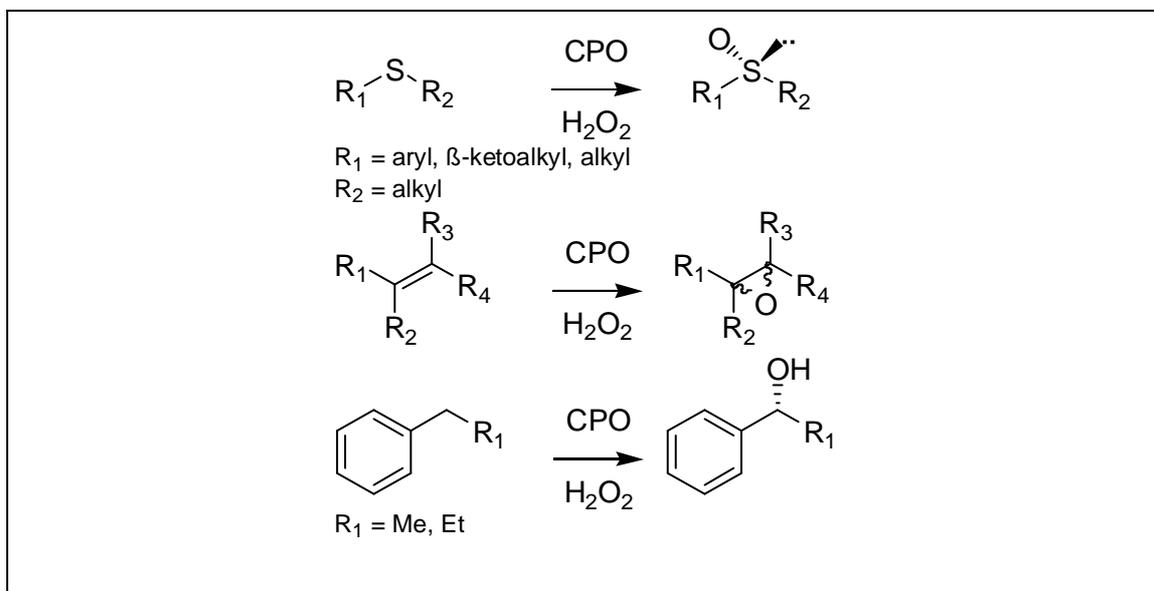


Abbildung 4.1.6: Selektive Oxidationsreaktionen in Abwesenheit von Halogenid-Ionen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird nur die Prozessentwicklung der elektroenzymatischen Sulfoxidation betrachtet. Daher sollen die entstehenden Produkte im Folgenden näher erläutert werden.

#### 4.1.2 Sulfoxide

„Der wahre Zweck der Chemie besteht nicht darin,  
Gold zu machen, sondern Medizin herzustellen.“

Philippus Aureolus Theophrastus Paracelsus (1493 – 1541)

Durch die pyramidale Struktur sind unsymmetrisch substituierte Sulfoxide chiral, mit dem Schwefelatom als chiralem Zentrum. Als ein "Bindungspartner" im Tetraedermodell wird hierbei das freie Elektronenpaar des Schwefels betrachtet. Einige benutzte Strukturformeln zeigt Abbildung 4.1.7.

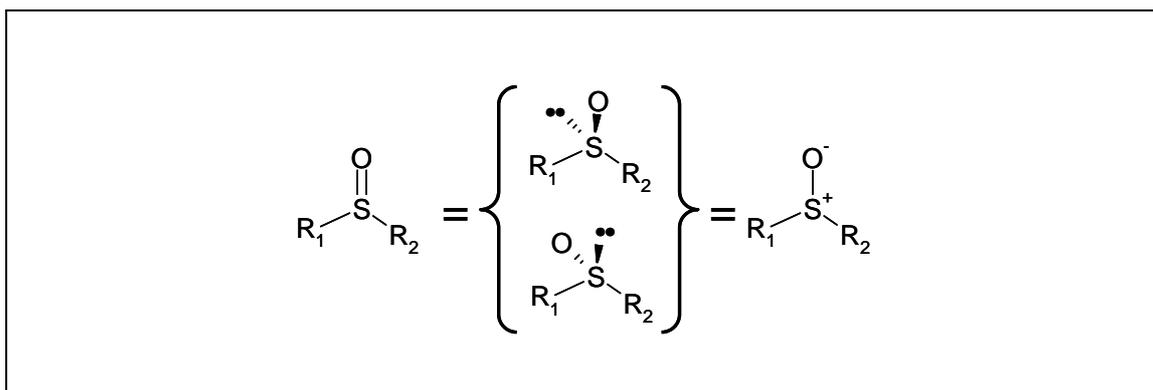


Abbildung 4.1.7: Allgemeine Strukturformeln chiraler Sulfoxide.

Die älteste und am häufigsten benutzte Syntheseroute geht von Sulfiden aus, die mit unterschiedlichen Oxidationsmitteln in Sulfoxide überführt werden [Roy 2002]. Als Oxidationsmittel werden häufig Peroxide eingesetzt, unter anderem auch Wasserstoffperoxid [Heaney 1993; Sheldon 1993] und *tert*-Butanolhydroperoxid (*t*-BuOOH) [Sharpless, Verhoeven 1979].

Es gibt eine Vielzahl von Katalysatoren, welche die in dieser Arbeit behandelte enantioselektive Sulfoxidierung von schwefelhaltigen Verbindungen katalysieren. Beispiele für chemische Verbindungen [Roy 2002] und Enzyme [Holland 2001] sind in Tabelle 4.1.1 aufgeführt. Für die Biotransformation werden jedoch nicht nur isolierte Enzyme eingesetzt, sondern auch Bakterien, Pilze und Hefen [Holland 2001].

Tabelle 4.1.1 Katalysatoren für die enantioselektive Synthese von Sulfoxiden.

Chemische Katalysatoren	Literatur
Selen- und Tellurdioxid	[Roy 2002]
Vanadiumpentoxid	[Roy 2002]
Mn(III)Salen-Komplexe	[Palucki, et al. 1992]
Ti(O <sup>i</sup> Pr) <sub>4</sub> /DET nach Sharpless	[Katsuki, Sharpless 1980]
Ti(O <sup>i</sup> Pr) <sub>4</sub> /DET/H <sub>2</sub> O nach Kagan	[Pitchen, et al. 1984]
Enzyme	
Vanadiumhaloperoxidasen	[ten Brink, et al. 1998; Littlechild 1999]
Horseradisch Peroxidase	[Ozaki, Demontellano 1994; Ozaki, Demontellano 1995]
Lactoperoxidase	[Tuynman, et al. 1998]
Myeloperoxidase	[Tuynman, et al. 2000a; Tuynman, et al. 2000b]
Toluen- und Naphtalendioxygenase	[Lee, et al. 1995]
Cytochrom P-450-Monooxygenasen	[Baciocchi, et al. 1997; Cashman 1998]
DMSO-Reduktase	[Abo, et al. 2000]

Eine potente chemische Synthesemethode ist die Oxidation mit *t*-BuOOH in Gegenwart des Sharpless-Epoxidierungskatalysators (Titan(IV)isopropylat / D-/L-Diethyltartrat) und geringen Mengen Wasser [Pitchen, et al. 1984; Kagan, Rebiere 1990; Kagan, et al. 1991; Brunel, et al. 1995; Brunel, Kagan 1996a, 1996b].

Die chiralen Sulfoxide sind aus mehreren Gründen von Bedeutung für die organische Chemie und Biochemie. Als natürliche Produkte treten sie bei verschiedenen funktionalisierten Aminosäuren auf, deren biologische Aktivität von Duftstoffen und deren Vorläufern über die Regulierung des Cholesteroll-Katabolismus bis zu antibiotischen Wirkungen reicht. Ebenso gibt es zahlreiche schwefelhaltige Arzneimittel, bei deren Synthese Sulfoxide als Intermediate oder sogar als pharmazeutisch aktive Zielverbindung auftreten. Sie zeigen je nach stereochemischer Konfiguration einen unterschiedlichen Metabolismus und Enzym-Inhibierungen [Patchett, Wyvratt 1984; Firestone 1985].

Als Wirkstoffe in der Agro- und Pharmaindustrie werden sie z.B. eingesetzt als:

- Insektizide [Biber, et al. 1990]
- Fungizide [Pommer, et al. 1983]
- Arzneistoffe
  - bei allergischen Krankheiten [Friebe, et al. 1987]
  - Hautverbrennungen durch die Sonne [Bryce, Shapiro 1990]
  - Beschwerden des Gastrointestinal-Traktes [Lang, et al. 1988]
  - als Antidots bei Alkoholvergiftungen [Plapp, Chadha 1984].

Einige der wichtigsten Medikamente, die ein Sulfoxid als funktionelle Gruppe enthalten sind in Abbildung 4.1.8 gezeigt. Einer der weltweit umsatzstärksten Wirkstoffe, der allein in den USA im Jahr 2000 im Umfang von 6,3 Mrd. US\$ verkauft wurde [Rao 2002], ist Omeprazole. Der Wirkstoff dient der Behandlung der *Helicobacter pylori*-Infektion (eine der Ursachen für Magengeschwüre) [Anagnostopoulos, et al. 2004] und wird als Medikament unter den Namen LOSEC® und PRILOSEC® vertrieben.

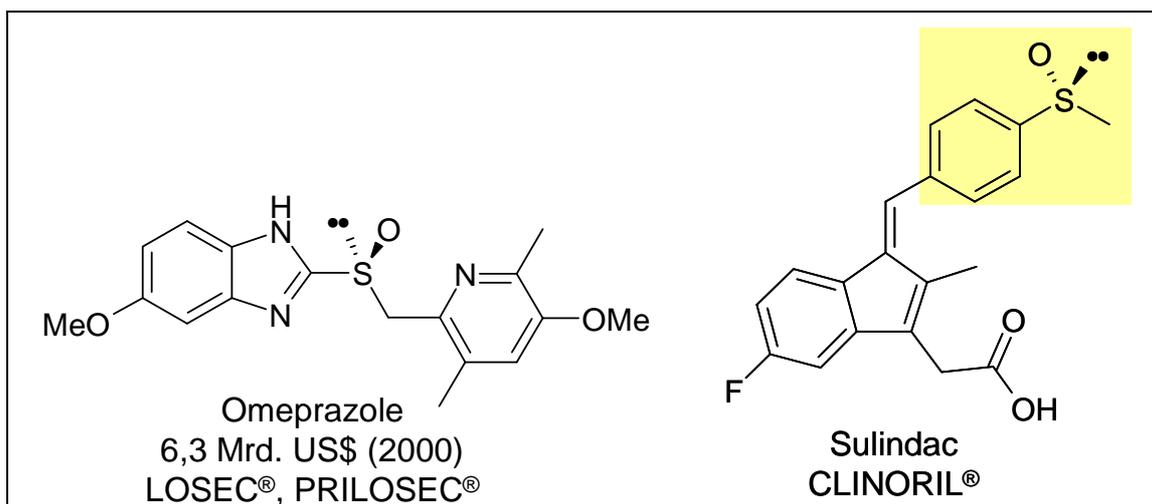


Abbildung 4.1.8: Beispiele für Sulfoxide als Medikamente [Maguire, et al. 2001; Rao 2002; Anagnostopoulos, et al. 2004].

Ein weitere Wirkstoffklasse sind die gegen Entzündung, Schmerz, Rheuma und Arthritis eingesetzten nicht-steroiden anti-inflammatorischen Arzneistoffe (NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug). Zu dieser Substanzklasse gehört der Wirkstoff Sulindac, der z.B. unter dem Markennamen CLINORIL® vertrieben wird [Maguire, et al. 2001]. In diesem Wirkstoff lässt sich gut ein dem Thioanisol ähnliches Strukturelement erkennen, so dass bei entsprechender Syntheseroute die Integration einer Biotransformation in die Wirkstoffsynthese möglich sein könnte.

Neben der pharmakologischen Verwendung sind chirale Sulfoxide von Interesse in der organischen Synthese als wertvolle asymmetrische Ausgangsverbindungen und chirale Hilfsreagentien. Als ein Beispiel ist in Abbildung 4.1.9 die Umwandlung eines chiralen

Sulfoxids in einen chiralen Alkohol gezeigt [Hoffmann 1979]. So kann die asymmetrische Substitution am Schwefel genutzt werden, um Kohlenstoff-Atome in chirale Zentren umzuwandeln.

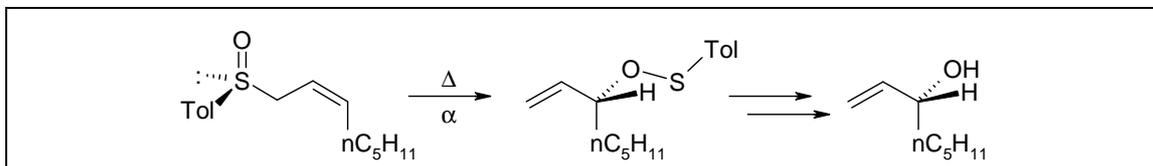


Abbildung 4.1.9: Chiralitätstransfer bei einer [2,3]-sigmatropen Umlagerung [Hoffmann 1979].

Ein weiteres Beispiel für die Verwendung chiraler Sulfoxide ist die Synthese von Stoffen wie Compactin, Mevinolin und Provastatin (Abbildung 4.1.10) bei denen (*R*)-Methyl-*p*-tolylsulfoxid als chirales Auxiliar agiert [Tang, et al. 1995]. Diese Verbindungen gehören zur Gruppe der Statine, die dafür bekannt sind, HMG-CoA-Reduktase – ein Enzym der Biosynthese von Cholesterol – zu hemmen und so den Anteil an Cholesterol im Blutplasma zu reduzieren.

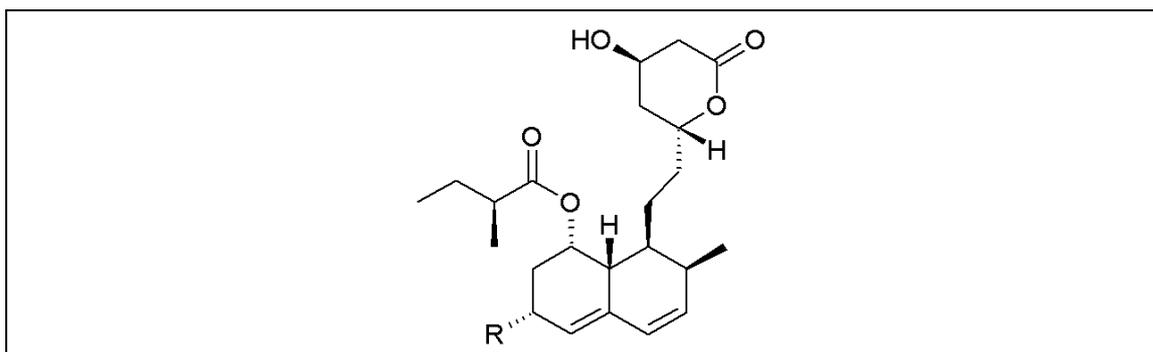


Abbildung 4.1.10: (+)-Compactin (R=H), (+)-Mevilonin (R=CH<sub>3</sub>) und (+)-Provastatin (R=OH).

Dies illustriert, dass chirale Sulfoxide von hohem Nutzen als Wirkstoffe und Reagentien sind. Daher wurden zahlreiche Untersuchungen zu den Substratspektren der unterschiedlichen Katalysatoren durchgeführt. Besonders gut studiert ist das Substratspektrum der CPO, zum einen da es äußerst breit ist, zum anderen werden im Gegensatz zu vielen Biokatalysatoren vorwiegend Sulfoxide der (*R*)-Konfiguration gebildet. Das Substratspektrum umfasst eine große Zahl von Aryl-Alkyl-Sulfiden und Dialkylsulfiden (siehe Abbildung 4.1.6, oberste Reaktion), die in Tabelle 4.1.2 zusammengefasst sind [Holland 2001].

Tabelle 4.1.2 Substrate vom Typ R<sub>1</sub>-S-R<sub>2</sub> für die CPO-katalysierte Oxidation [Holland 2001]

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	ee / %
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Me	99
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Et	99
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<i>n</i> -Pr	27
<i>p</i> -Me-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	99
<i>p</i> -MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	99
<i>m</i> -MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	99
<i>o</i> -MeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	99
<i>p</i> -NO <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	99
<i>p</i> -Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	99
<i>m</i> -Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	99
<i>p</i> -Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Me	99
<i>m</i> -Br-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Et	99
<i>p</i> -Cl-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Et	99
<i>p</i> -Me-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Et	99
2-Thiophenyl	Me	99
2-(1,3-Thiazolindinyl)	Me	99
Allyl	Me	>98
<i>i</i> -Pr	Me	>98
<i>t</i> -Bu	Me	85
<i>t</i> -Bu	Et	35
<i>n</i> -Pentyl	Me	>98
<i>n</i> -Octyl	Me	54
Cyclopentyl	Me	>98
Cyclohexyl	Me	85

Es zeigt sich, dass CPO sterisch hohe Ansprüche an den Substituenten R<sub>2</sub> stellt. Es werden nur Methyl- und Ethylreste akzeptiert. Schon mit *n*-Propyl-Resten substituierte Sulfide werden nur noch mit geringem ee umgesetzt. Dies liegt vermutlich nicht an

einer mangelnden Selektivität des Enzyms, das ja bei den meisten Substraten einen ee > 98% erreicht, sondern daran, dass die Substrate nicht schnell genug umgesetzt werden und daher die unkatalysierte, racemische direkte Oxidation des Sulfids durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder *t*-BuOOH als Hintergrundreaktion abläuft. Dies gilt ebenso für die Diälylsulfide mit *t*-Bu als einem Substituenten und das für *n*-Octyl-Sulfide.

In einer der Seitenketten der Sulfide werden auch reaktive funktionelle Gruppen akzeptiert. Es werden z.B. aliphatische und cyclische β-Ketosulfide (Abbildung 4.1.11) zu den entsprechenden Sulfoxiden umgesetzt [Vargas, et al. 1999].

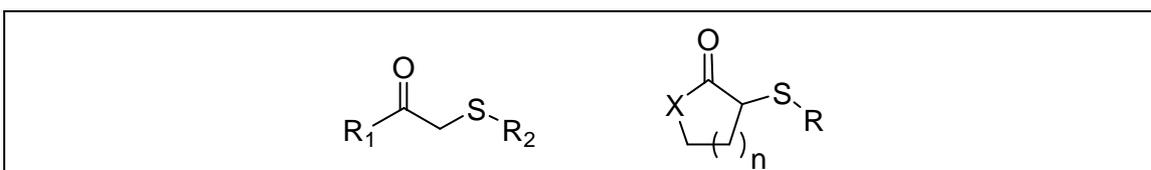


Abbildung 4.1.11: Aliphatische und Cyclische β-Ketosulfide (n=1,2) als Substrate für die CPO.

Neben diesen cyclischen β-Ketosulfiden werden auch unsubstituierte cyclische Sulfide als Substrate akzeptiert (Abbildung 4.1.12) [Holland 2001; Dembitsky 2003].

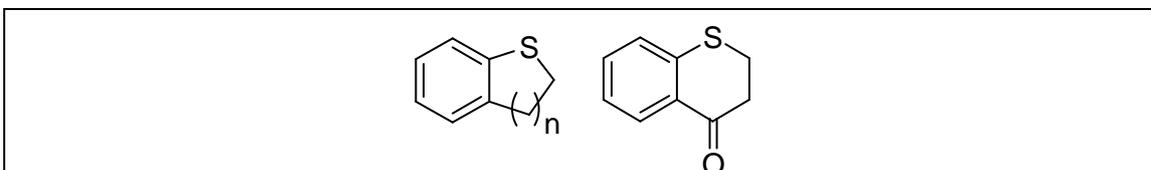


Abbildung 4.1.12: Cyclische Sulfide (n=1,2) als Substrate für die CPO.

Schließlich kann mit CPO eine Reihe von Methionin-Derivaten zu den entsprechenden Sulfoxiden umgesetzt.

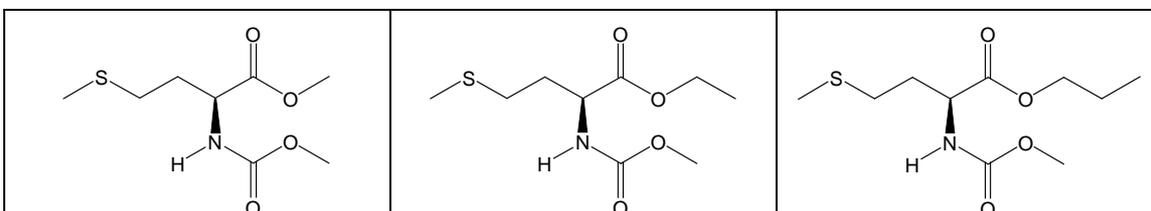


Abbildung 4.1.13: Methionin-Derivate als Substrate für die CPO.

Hierbei werden nur die an der Carboxyl- und Aminogruppe geschützten Derivate eingesetzt, um eine Reaktion der Aminosäure mit dem Enzym zu vermeiden. Ausgehend von enantiomerenreinem Methionin erhält man das entsprechende Sulfoxid

in einer Reinheit von  $\text{de} = 72\text{-}84\%$ , je nach eingesetzter Schutzgruppe [*Holland, Brown 1998; Holland, et al. 1999; Holland, et al. 2002*].

## 4.2 Systemuntersuchungen

*„Tert-butyl alcohol is known to prevent [..]  
deactivation for the CPO catalyzed oxidation“*

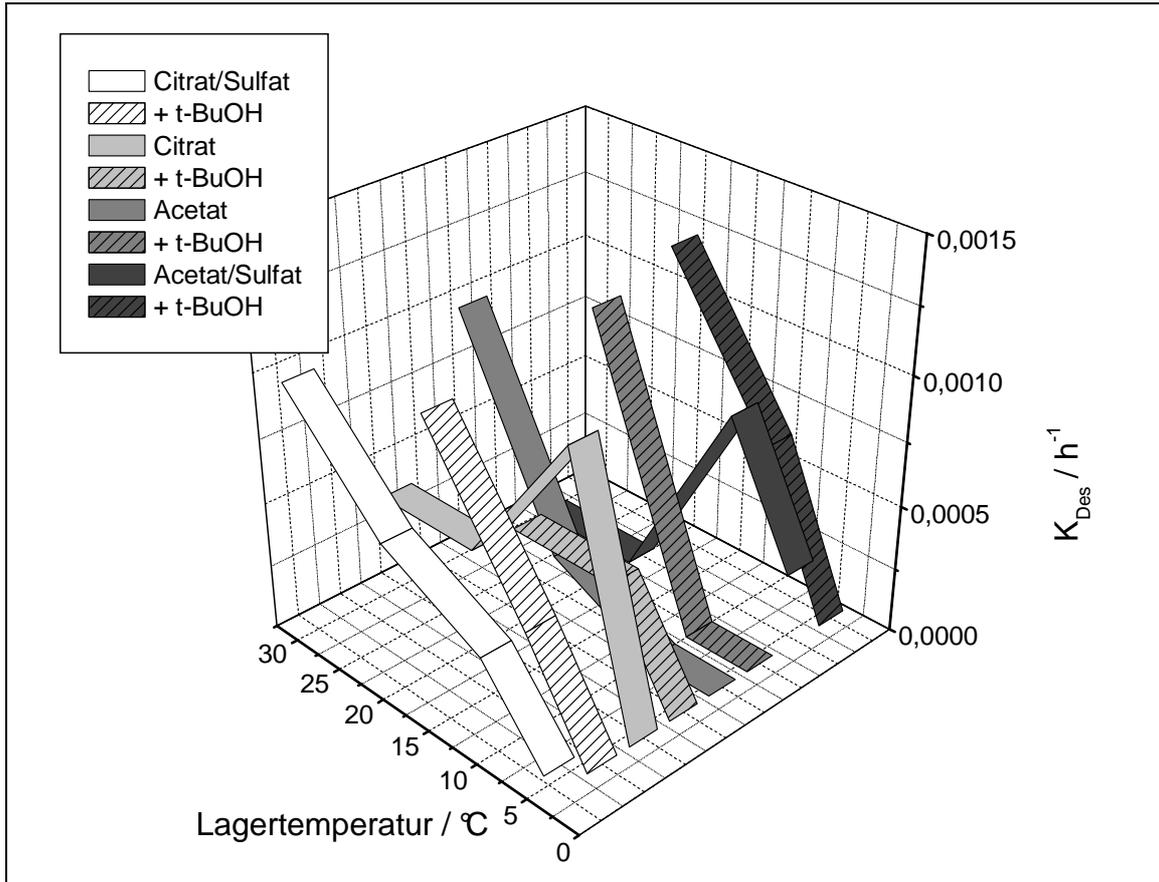
M. van Veurzen et al., Tetrahedron, **1997**, 53, 13183-13220

### 4.2.1 Enzymstabilität

Die Enzymstabilität ist für eine effiziente Prozessentwicklung ein wichtiger Parameter. Insbesondere in der ökonomische Betrachtung ist der Katalysatorverbrauch häufig limitierend. Es gibt mehrere Kriterien, um den Katalysatorverbrauch zu messen. Zu unterscheiden ist zwischen der Lagerstabilität und der Reaktionsstabilität. Für die CPO ist ein großer Unterschied zwischen beiden zu erwarten, da bei der Reaktion das desaktivierende Cosubstrat  $H_2O_2$  zugegen ist.

Im Folgenden wird für die Systemuntersuchungen zunächst die Lagerstabilität getestet. Auf die Enzymdesaktivierung während der Reaktion wird in Kapitel 5 eingegangen. Zur Ermittlung der Enzymstabilität wurden Enzymproben in den vier Puffersystemen mit und ohne Zusatz von *tert*-Butanol bei vier Temperaturen gelagert. Es wurde in Intervallen die Restaktivität bestimmt. Die Lagerdauer betrug insgesamt 500 h. In Abbildung 4.2.1 ist die Desaktivierungskonstante angegeben.

Im Wesentlichen zeigt sich in allen untersuchten Puffermedien eine erstaunlich hohe Lagerstabilität, sie liegt auf jeden Fall um Größenordnungen über der Reaktionsstabilität. So findet man bei 20 °C Lagertemperatur Desaktivierungskonstanten im Bereich  $K_{Des} = 0,0006 - 0,0012 h^{-1}$ . Die Stabilität liegt im 100 mM Citratpuffer und im Acetat/Sulfat-Medium höher als im 25 mM Citratpuffer mit Sulfat oder im reinen Acetatpuffer. Eine höhere Salzkonzentration scheint also die Stabilität zu fördern, was positiv für die elektroenzymatische Kombination ist.



**Abbildung 4.2.1: Lagerstabilität der CPO.**

T = 4, 10, 20, 30 °C; Inkubationszeit 500 h, Puffer wie angegeben (alle pH 5), jeweils ohne und mit 30 vol% *t*-BuOH-Zusatz, Aktivitätsmessung mit Monochlordimedon(MCD)-Methode (vgl. Abbildung 4.2.11 und Abschnitt 8.3.1.1)

Alle Proben, die 30 vol% *tert*-Butanol enthielten und bei 30 °C gelagert wurden wiesen schon nach der ersten Zwischenmessung bei 6 Stunden keine Restaktivität mehr auf. Daher ist für diese Proben in Abbildung 4.2.1 kein  $K_{Des}$  angegeben. Der Einfluss der *tert*-Butanol-Konzentration auf die Desaktivierung des Enzyms bei 30 °C wurde ausführlicher untersucht.

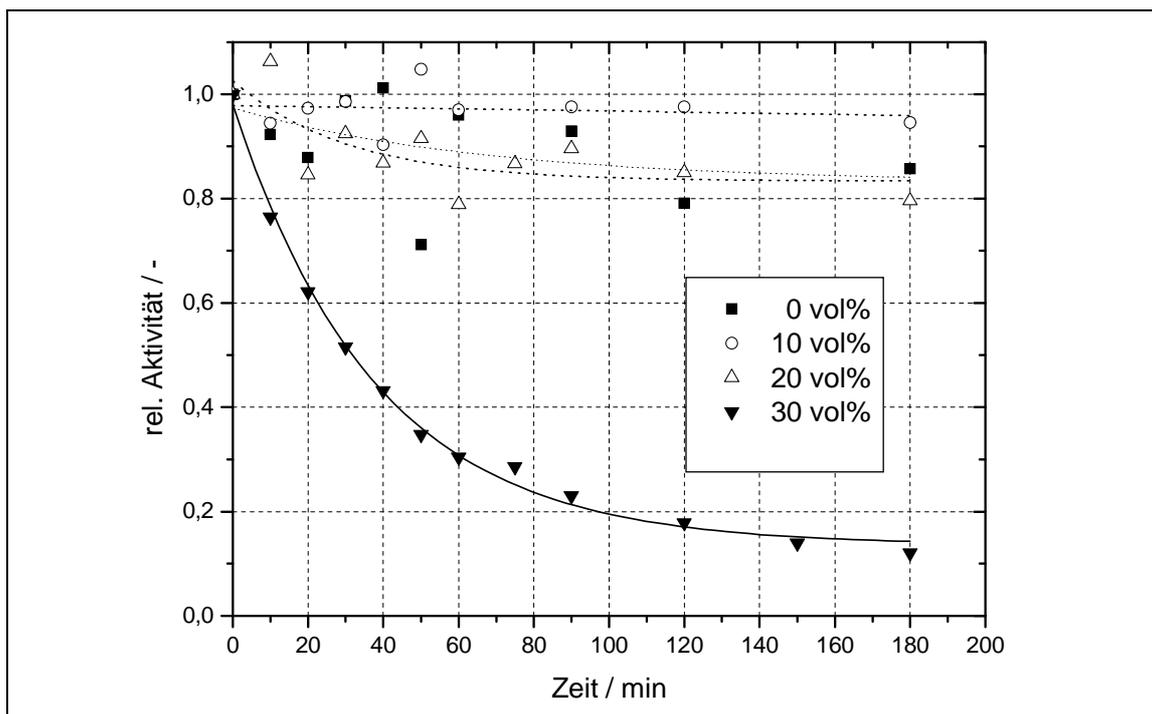


Abbildung 4.2.2: Desaktivierung der CPO durch Zusatz von *t*-BuOH.

100 mM Natriumacetat (pH 5), 50 mM Natriumsulfat,  $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , *t*-BuOH wie angegeben, Aktivitätsmessung mit Thioanisol-Methode (vgl. 8.3.1.3)

Erstaunlicherweise macht sich die Desaktivierung erst bei einem Zusatz von 30 vol% deutlich bemerkbar. Dann allerdings ist bereits nach 3 Stunden Lagerung kaum noch Restaktivität vorhanden. Die Desaktivierung kann gut durch eine Zerfallsreaktion erster Ordnung beschrieben werden, aus den gemessenen Werten ergibt sich die Deaktivierungskonstante zu  $K_{\text{Des}} = 0,0265\text{ \% min}^{-1}$ . Zumindest für die Lagerstabilität kann also ein stabilisierender Einfluss des Cosolvens nicht gefunden werden.

## 4.2.2 Enzymaktivität

Die Aktivitäten werden getrennt für die Halogenase- und die Peroxidase-Reaktion untersucht. Im Vordergrund steht hierbei die Peroxidase-Aktivität, da sie für die gewünschte Reaktion ausschlaggebend ist.

### 4.2.2.1 Peroxidase-Aktivität

Zur Untersuchung der Peroxidase-Aktivität gibt es mehrere etablierte Assay-Systeme (Abbildung 4.2.3). Am weitesten verbreitet sind die Messungen mit 2,4-Dichlorphenol (2,4-DCP) [Metelitz, et al. 1991; Apitz, van Pee 2001] und 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonsäure) (ABTS) [Arnao, et al. 1990] als Substrat für die Peroxidase-Reaktion. Diese Methoden werden bei konstanter Enzymmenge auch zur

Quantifizierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in verschiedenen analytischen Verfahren eingesetzt [Saito, et al. 1987; Woo, et al. 2003].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein UV-photometrischer Assay basierend auf dem Substrat Thioanisol entwickelt. Die zugrunde liegenden chemischen Reaktionen der verschiedenen Aktivitätsmessungen zeigt Abbildung 4.2.3, die Substanzen, deren Entstehung oder Abnahme im Photometer verfolgt werden, sind mit der entsprechenden Wellenlänge gekennzeichnet. Die erste Methode basiert auf der peroxidase-katalysierten Phenolkupplung. Hierbei werden Phenole (Phenol oder halogen-substituierte Derivate) mit 4-Aminoantipyrin (AAP) zu einem roten Farbstoff gekuppelt, der photometrisch detektiert wird.

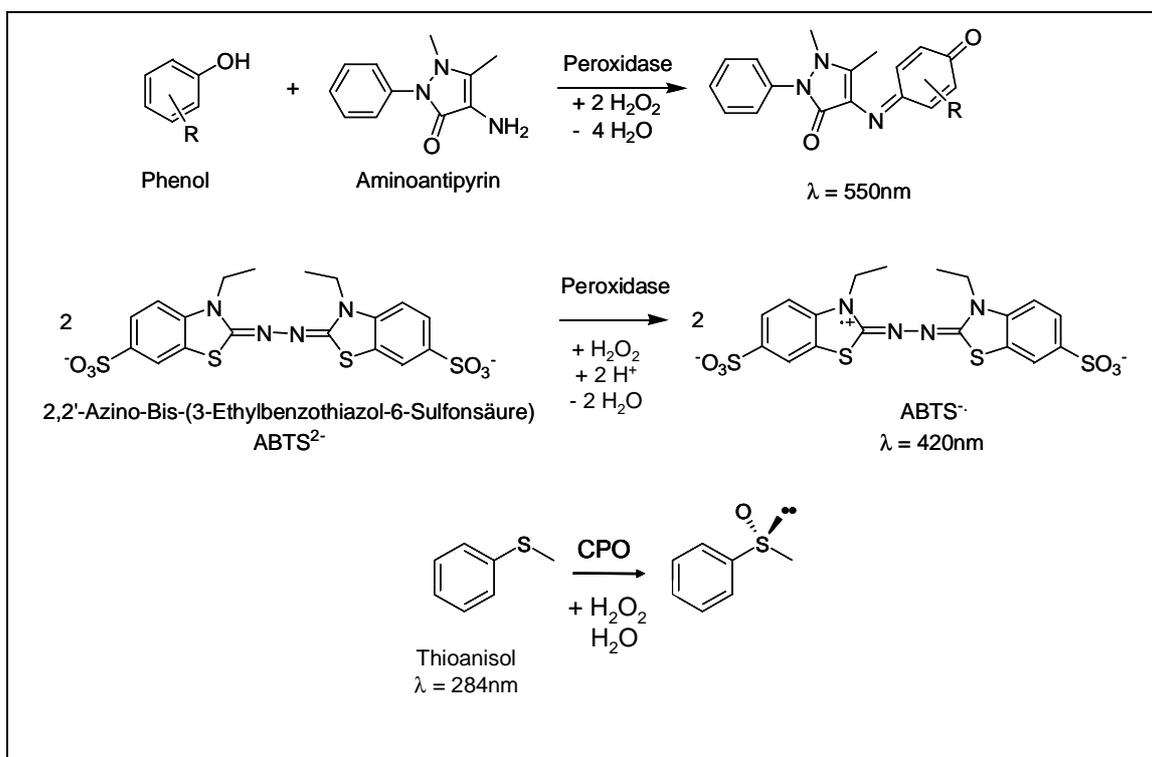


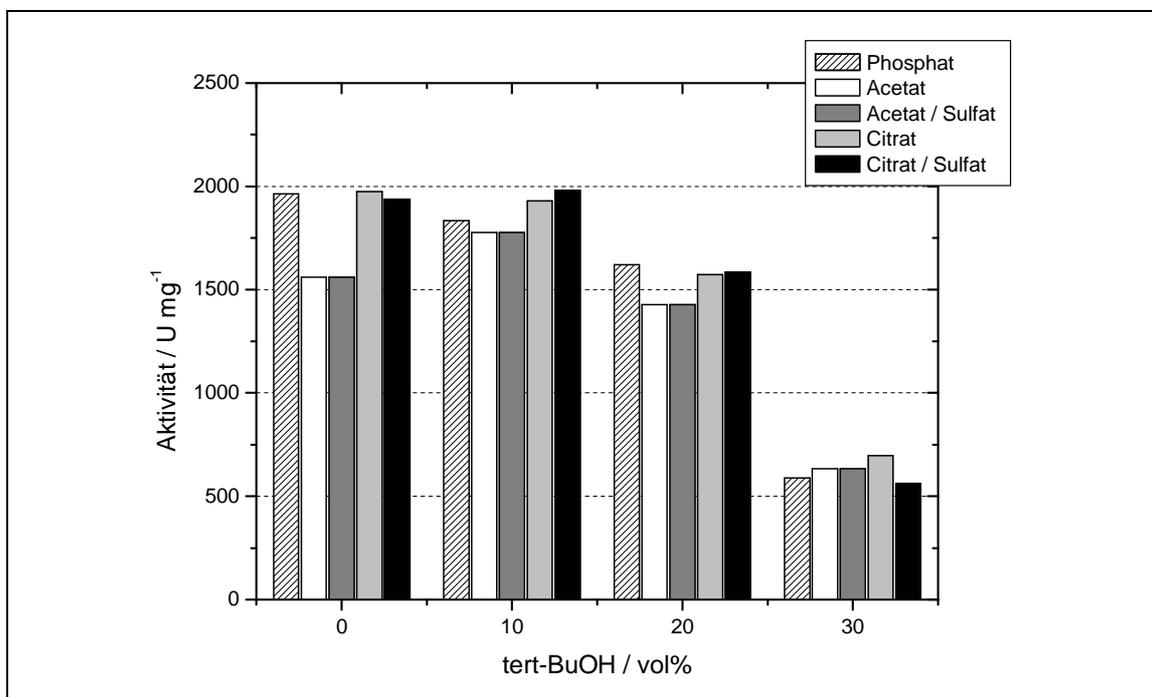
Abbildung 4.2.3: Photometrische Assays zur Messung der Peroxidase-Aktivität.

Ebenso kann die Peroxidase-Aktivität photometrisch verfolgt werden durch die Bildung des grün gefärbten ABTS-Radikalkations ( $\text{ABTS}^{\cdot+}$ )<sup>12</sup> durch Oxidation von  $\text{ABTS}^{2-}$  mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Zunächst wird der Einfluss des Cosolvens auf die Enzymaktivität mit dem neu entwickelten Thioanisol-Assay untersucht. Hierzu werden die in Kapitel 3 identifizierten Puffermedien eingesetzt (Abbildung 4.2.4). In den Acetatpuffern liegt die

<sup>12</sup> Das Ion wird als Radikalkation bezeichnet, da die negative Ladung ausschließlich an den Sulfonsäureresten lokalisiert ist.

gemessene Aktivität geringfügig unter der Aktivität in den anderen Puffermedien. Insgesamt sinkt die Enzymaktivität deutlich mit zunehmendem Zusatz von *tert*-Butanol.

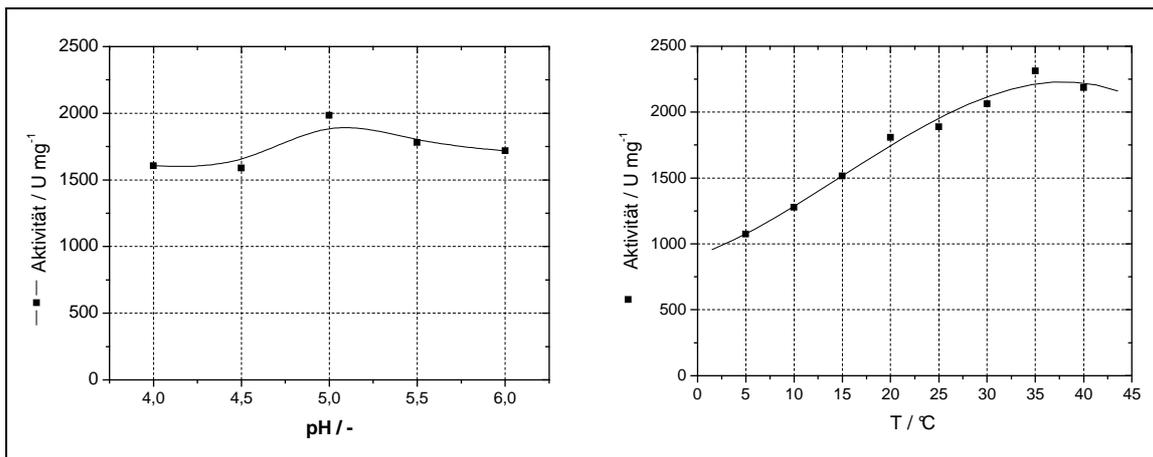


**Abbildung 4.2.4: Enzymaktivität in unterschiedlichen Puffern und Cosolvens-Anteilen.**

Puffer wie angegeben (alle pH5), *t*-BuOH wie angegeben, Aktivitätsmessung mit Thioanisol-Methode, Units bezügl. Thioanisol ( $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ ),  $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ , 2 mM Thioanisol, 0,5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $0,085 \mu\text{g mL}^{-1}$  CPO

Der elektrochemisch gut geeignete Acetat-Puffer ist also aus Sicht der Enzymaktivität nicht optimal, der Unterschied in der Aktivität ist jedoch nicht so groß, dass das Puffermedium für die Biokatalyse ausgeschlossen werden müsste. Die Vorteile des Acetat-Puffers für den elektrochemischen Schritt (Stromausbeute, vgl. Abbildung 3.2.4) führen im Gegenteil dazu, die detaillierten Untersuchungen der Peroxidase-Aktivität ausschließlich in Acetat-Puffer durchzuführen.

Mit dem neu entwickelten Thioanisol-Assay wurde die pH- und Temperaturabhängigkeit der CPO-Aktivität untersucht (Abbildung 4.2.5).

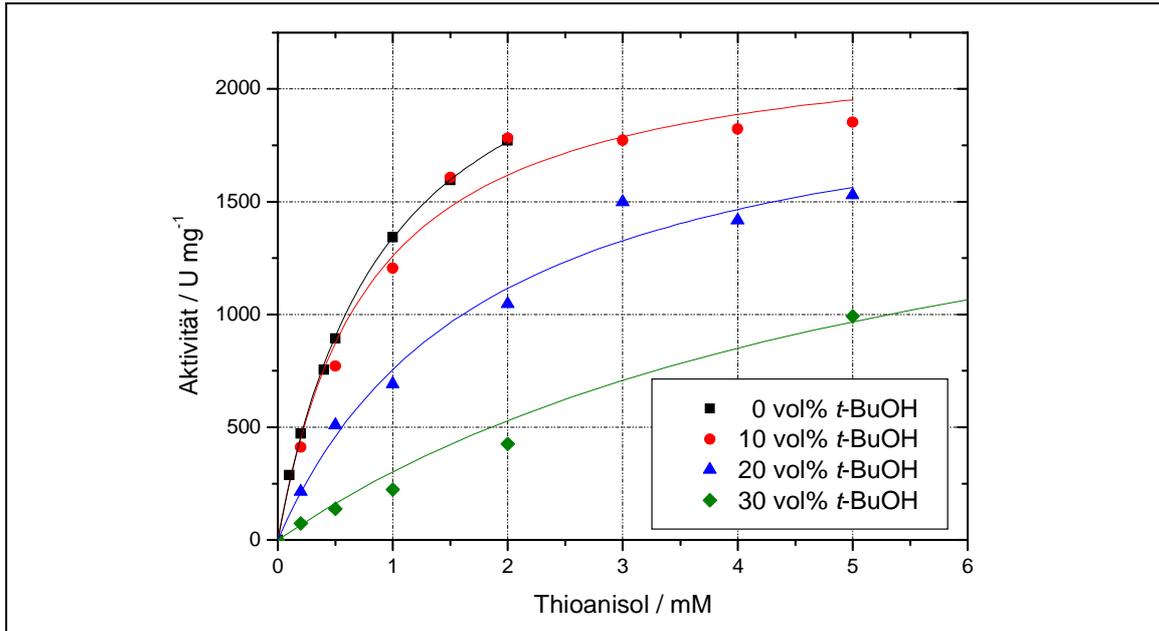


**Abbildung 4.2.5: pH- und Temperatur-Abhängigkeit der CPO-Aktivität.**

100 mM Natriumacetat (pH5), 50 mM Natriumsulfat, 10 vol% *t*-BuOH, Units bezügl. Thioanisol, T = 20 °C, 2mM Thioanisol, 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Der Temperaturverlauf macht deutlich, dass das Enzym aus einem marinen Organismus stammt, der auf niedrige Umgebungstemperaturen angepasst ist. Die Aktivität steigt bis 25 °C fast linear, was nahe legt, dass hier eine thermische Desaktivierung überlagert ist. Die Lagerstabilität ist zwar bei 20 °C und 30 °C noch sehr hoch, in der Reaktion scheint die Temperatur jedoch einen kritischeren Einfluss zu haben. Die weiteren kinetischen Untersuchungen wurden daher bei 20 °C durchgeführt. Als pH-Wert für die kinetischen Untersuchungen und die Reaktion wird pH = 5 gewählt, dies ist das Maximum der Aktivität, das auch in Phosphatpuffern gefunden wurde und daher für die biokatalytische Sulfoxidation mit CPO standardmäßig verwendet wird (vgl. Kapitel 2).

Mit diesen Reaktionsbedingungen wird in Acetat-Puffer die Thioanisol-Konzentration und der Cosolvens-Anteil im Photometer-Assay variiert (Abbildung 4.2.6). Hierbei handelt es sich um Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit. Die Messung bei 0 vol% *tert*-Butanol ist durch die Löslichkeit des Substrates nur bis 2 mM möglich.



**Abbildung 4.2.6: Enzymaktivität als Funktion der Thioanisolkonzentration.**

100 mM Natriumacetat (pH 5), 50 mM Natriumsulfat, *t*-BuOH wie angegeben, Thioanisol wie angegeben, 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, T = 20°C, 0,085 µg mL<sup>-1</sup> CPO, Units bezügl. Thioanisol

Die Linien stellen die Simulation der Formel 4.2.1 mit den Parametern aus Tabelle 4.2.1 dar.

Die Daten lassen sich in erster Näherung und mit geringen Abweichungen sehr gut durch eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik mit einem Substrat [Drauz, Waldmann 1995; Buchholz, Kasche 1997; Liese, et al. 2000] gemäß Formel 4.2.1 beschreiben.

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[\text{Thioanisol}]}{K_{M,\text{Thioanisol}} + [\text{Thioanisol}]} \quad \text{Formel 4.2.1}$$

Die nicht-lineare Regression liefert die in der folgenden Tabelle aufgelisteten Parameter:

**Tabelle 4.2.1 Parameter für eine Ein-Substrat-Kinetik zur Thioanisol-Oxidation**

t-BuOH / vol%	$v_{\max} / \text{U mg}^{-1}$	$K_{M,\text{Thioanisol}} / \text{mM}$
0	$2590 \pm 56$	$0,93 \pm 0,04$
10	$2262 \pm 111$	$0,80 \pm 0,13$
20	$2134 \pm 212$	$1,83 \pm 0,46$
30	$2157 \pm 260$	$6,14 \pm 2,21$

Dies ermöglicht zwar eine recht einfache Beschreibung der Messwerte, ist jedoch in mehrerer Hinsicht problematisch. Zum einen ist die Sulfoxidation eine Zwei-Substrat-Reaktion, das Cosubstrat  $H_2O_2$  ist für die Reaktion nötig und hat sicherlich einen Einfluss auf die Enzymaktivität. Zum anderen sieht man, sowohl in Abbildung 4.2.4 als auch in Abbildung 4.2.6, dass *tert*-Butanol ein Stoff mit inhibierender Wirkung ist. Diese Inhibierung lässt sich nicht mit den bekannten Inhibierungsmodellen (kompetitiv, nicht-kompetitiv, unkompetitiv) [Bisswanger 1979; Cornish-Bowden 1995; Buchholz, Kasche 1997] fassen.

Zum einen ist im engeren Sinne ein Inhibitor auch immer ein Molekül, dass mit dem Enzym, wie ein Substrat, eine Wechselwirkung zu einem Enzym-Inhibitor-Komplex eingeht und kein Lösungsmittel [Vasic-Racki 2003]. Obwohl *tert*-Butanol nicht direkt an der Reaktion beteiligt ist, ist es immerhin noch vorstellbar, dass es an den aktivierten Enzym-Substrat-Komplex bindet. Es ist beschrieben, dass anstelle von  $H_2O_2$  auch *tert*-Butanolhydroperoxid als Oxidationsmittel in CPO-katalysierten Reaktionen verwendet werden kann [Sanfilippo, et al. 2000; van de Velde, et al. 2001a]. Insofern ist es nicht auszuschließen, dass *tert*-Butanol im aktiven Zentrum koordiniert wird und somit als Inhibitor bezeichnet werden kann.

Zum anderen sieht man aber, dass sich mit steigendem *tert*-Butanol-Gehalt sowohl der  $v_{max}$ - als auch der  $K_M$ -Wert ändern. Tendenziell sinkt der  $v_{max}$ , während der  $K_M$  ansteigt. Auftragung in linearisierten Darstellungen (Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee) [Bisswanger 1979; Cornish-Bowden 1995] ergeben keine charakteristischen Schnittpunkte oder Parallelverschiebungen, die als Kriterien für die Anwendung der Inhibierungsmodelle gefordert sind. Die Anpassung der Messwerte an die drei Inhibierungsmodelle ergibt nur mäßige Güten von  $R^2 = 0,963 - 0,975$  (Tabelle 4.2.2)

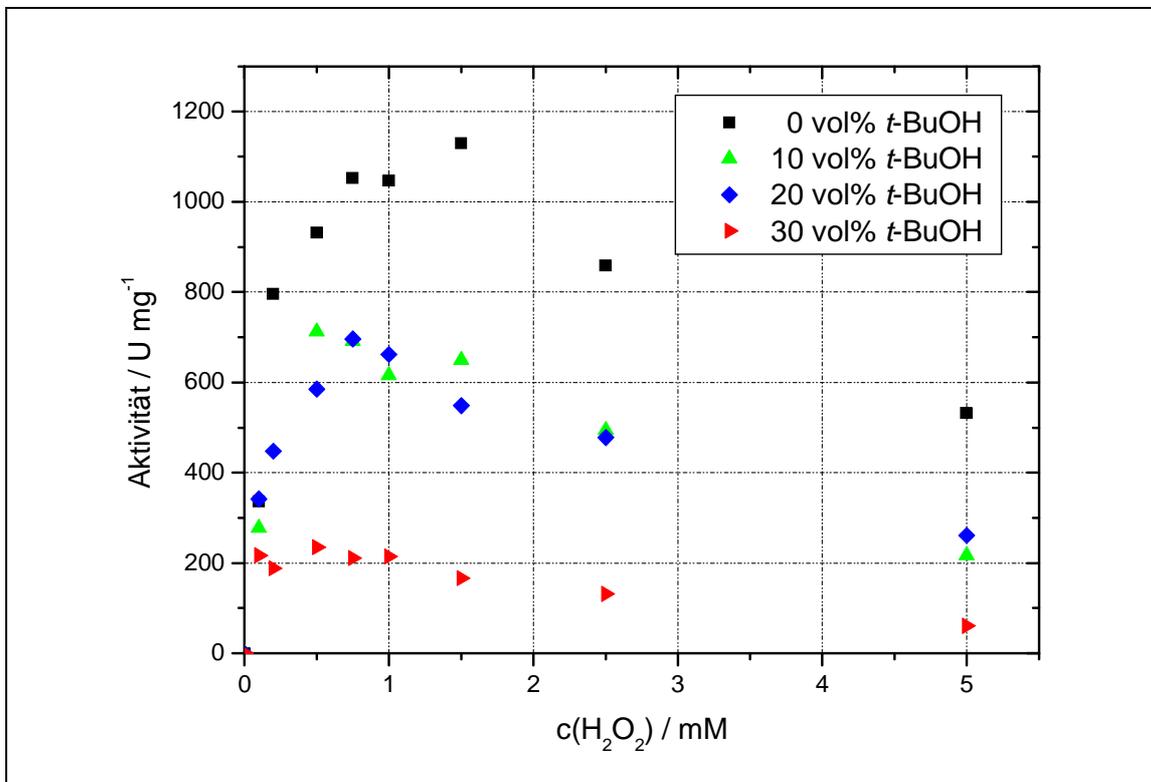
**Tabelle 4.2.2 Nicht-Lineare Regression der Messwerte durch Inhibierungsmodelle.**

Messwerte aus Abbildung 4.2.6, 0-30 vol% t-BuOH als Inhibitor

Modell	$v_{max} / U \text{ mg}^{-1}$	$K_{M, \text{Thioanisol}} / \text{mM}$	$K_{i, t\text{-BuOH}} / \text{mM}$	$R^2 / -$
Kompetitive Inhibierung	$2055 \pm 144$	$0,46 \pm 0,12$	$736 \pm 238$	96,4
Nicht-Kompetitive Inhibierung	$3682 \pm 461$	$1,69 \pm 0,34$	$2634 \pm 509$	97,5
Unkompetitive Inhibierung	$4638 \pm 1358$	$2,83 \pm 1,22$	$1460 \pm 646$	96,3

Die Fehlerbereiche sind relativ groß. Für eine Beurteilung der einzelnen Modelle müssten die einzelnen Fehlerquellen genauer analysiert werden. Aufgrund der vorliegenden Messwerte kann nicht ausreichend zwischen den Modellen diskriminiert werden [Brik-Ternbach 2003].

Zusätzlich zur Variation der Thioanisol-Konzentration (Abbildung 4.2.6) wird daher bei konstanter Thioanisol-Konzentration die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration variiert (Abbildung 4.2.7).



**Abbildung 4.2.7: Variation der Wasserstoffperoxid-Konzentration im Thioanisol-Assay.**

100 mM Natriumacetat (pH 5), 50 mM Natriumsulfat, t-BuOH wie angegeben,  $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1,8 mM Thioanisol,  $0,085 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  CPO, Units bezüglich Thioanisol

Die Enzymaktivität durchläuft ein Maximum und sinkt schließlich bei steigender  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration, dies entspricht einer Substrat-Überschuss-Inhibierung. Die Messwerte werden anschließend mittels einer Zwei-Substrat-Kinetik gemäß Formel 4.2.2 angepasst. Hierbei wird die Substrat-Überschuss-Inhibierung durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  berücksichtigt.

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]}{K_{\text{M,H}_2\text{O}_2} + [\text{H}_2\text{O}_2] + \left(\frac{[\text{H}_2\text{O}_2]^2}{K_{\text{i,H}_2\text{O}_2}}\right)} \cdot \frac{[\text{Thioanisol}]}{K_{\text{M,Thioanisol}} + [\text{Thioanisol}]} \quad \text{Formel 4.2.2}$$

In diesem Modell ist die inhibierende Wirkung von *tert*-Butanol noch nicht erfasst. Um den Einfluss des Cosolvens zu beschreiben werden zusätzliche Gleichungen eingeführt.

Die Herabsetzung der Enzymaktivität durch das organische Lösungsmittel kann in einem Ansatz beschrieben werden, wie er auch benutzt wird um die Herabsetzung der Enzymaktivität durch Veränderungen der Ionenstärke zu beschreiben [Buchholz, Kasche 1997]. Die Ionenstärke ist wie folgt definiert:

$$I = 0,5 \cdot \sum c_x Z_x^2 \quad \text{Formel 4.2.3}$$

Mit  $I = \text{Ionenstärke} / \text{mol L}^{-1}$   
 $Z_x = \text{Ionenladung} / -$

Durch einen Exponentialterm, in dem über die Ionenstärke neben der Ladung auch die Konzentration der Ionen und die Ladung von Enzym und Substrat zusammengefasst sind, wird der Einfluss der Ionenstärke auf die katalytische Effizienz  $k_{\text{cat}}$  (Formel 4.2.4) und die Substrataffinität  $K_M$  (Formel 4.2.5) ausgedrückt.

$$k_{\text{cat}} = k_{\text{cat},0} \cdot e^{\frac{Z_S \cdot Z_E \cdot \sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}}} \quad \text{Formel 4.2.4}$$

$$K_M = K_{M,0} \cdot e^{-\frac{Z_S \cdot Z_E \cdot \sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}}} \quad \text{Formel 4.2.5}$$

Mit  $Z_S = \text{Ladung des/der Substrate} / -$   
 $Z_E = \text{Ladung des Enzyms} / -$

Die Art des Exponentialterms führt dazu, dass sich der apparente  $K_M$  und  $k_{\text{cat}}$  zu kleinen Ionenstärken dem tatsächlichen  $K_{M,0}$  und  $k_{\text{cat},0}$  asymptotisch annähern (Abbildung 4.2.8).

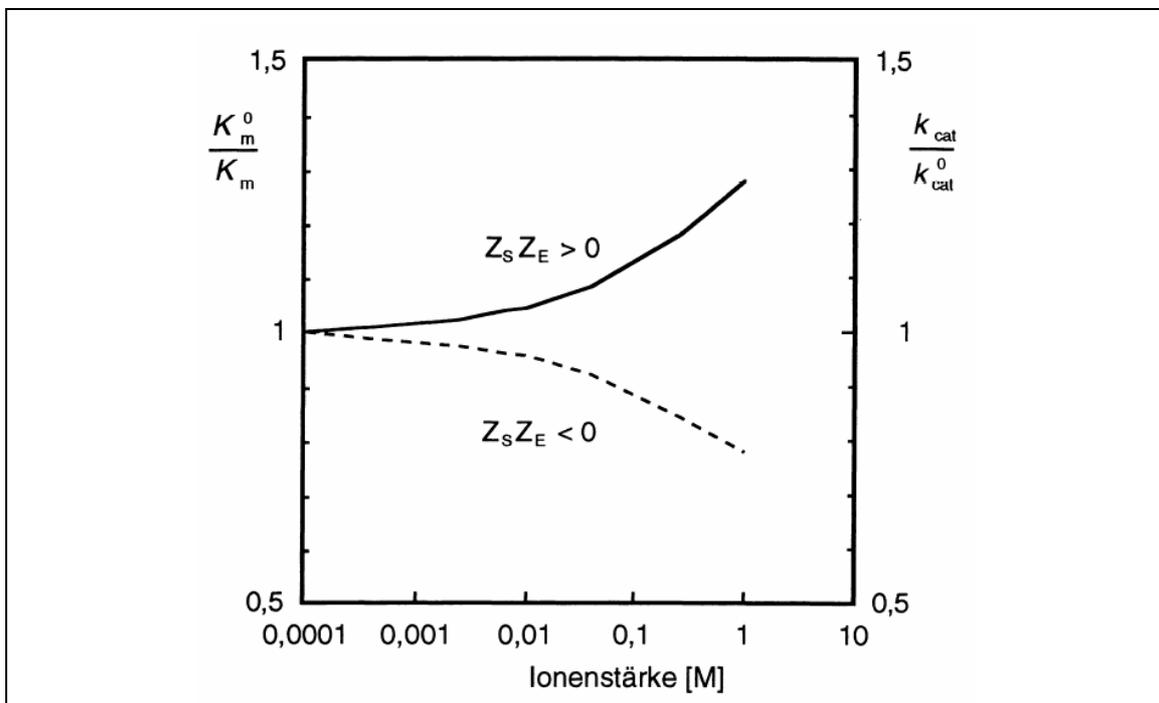


Abbildung 4.2.8: Einfluss der Ionenstärke auf  $k_{\text{cat}}$  und  $K_M$  nach [Buchholz, Kasche 1997].

Dieses Modell bezieht sich im engeren Sinne auf die Umsetzung von geladenen Substraten oder allgemein auf Reaktionen bei denen geladene Substanzen eine Rolle

spielen, z.B. bei der Esterspaltung. Auf die CPO-Kinetik wird es durch eine Vereinfachung übertragen, da hier alle beteiligten Reaktanden (Thioanisol, (*R*)-Methylphenylsulfoxid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nicht ionisch sind und die Ladung des Enzyms nicht bekannt ist. Das einzige Salz ist das Puffersalz, dessen Konzentration und damit Ionenstärke durch den *tert*-Butanol Zusatz gesenkt wird. Die Salzkonzentration ist jedoch nicht einfach zu ermitteln, da Puffer und *tert*-Butanol nicht ideale Mischungen ergeben und der eingesetzte Cosolvens-Anteil lediglich mit Puffer zum Endvolumen aufgefüllt wird. Die Zusammensetzung der Puffermedien ist in Tabelle 4.2.3 gezeigt.

**Tabelle 4.2.3 Zusammensetzung von 1 L Puffermedium.**

Cosolvens / vol%	Volumen Puffer / mL	Salzkonzentration / mM	t-BuOH / M
0	1000	100	0
10	ca. 910	ca. 91	1,1
20	ca. 820	ca. 82	2,2
30	ca. 730	ca. 73	3,3

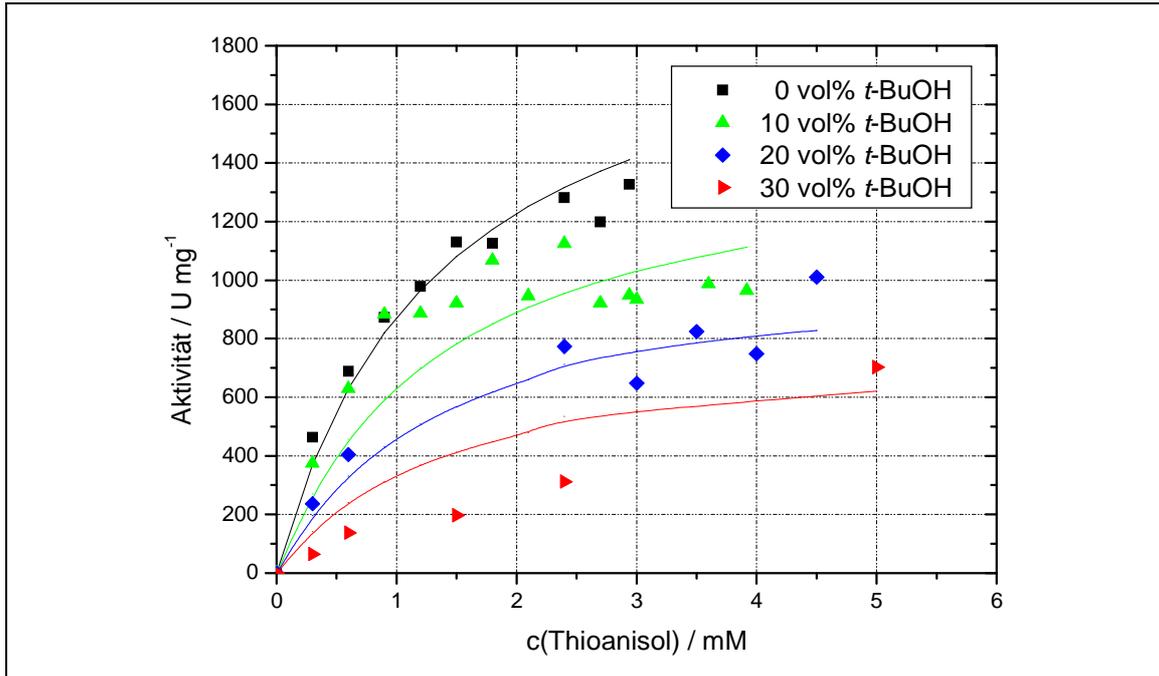
Im Prinzip steht in Formel 4.2.4 und Formel 4.2.5 die Konzentration der Ionen im Exponenten. Statt dieser wird nun die direkt zugängliche *tert*-Butanol-Konzentration eingesetzt. Alle anderen Einflüsse, wie die Ladung des Enzyms oder die Änderung der Ionenaktivität durch den organischen Zusatz, werden in einer Konstanten  $k_{\text{kor}}$  zusammengefasst. Zunächst wird angenommen, dass das Cosolvens sowohl einen Einfluss auf die beiden  $K_M$ - (Formel 4.2.6 und Formel 4.2.7) und den  $v_{\text{max}}$ -Wert (Formel 4.2.8) hat.

$$K_{M, H_2O_2} = K_{M, H_2O_2, 0} \cdot e^{k_{\text{kor}, H_2O_2} \cdot [BuOH]} \quad \text{Formel 4.2.6}$$

$$K_{M, TA} = K_{M, TA, 0} \cdot e^{k_{\text{kor}, TA} \cdot [BuOH]} \quad \text{Formel 4.2.7}$$

$$v_{\text{max}} = v_{\text{max}, 0} \cdot e^{k_{\text{kor}, v_{\text{max}}} \cdot [BuOH]} \quad \text{Formel 4.2.8}$$

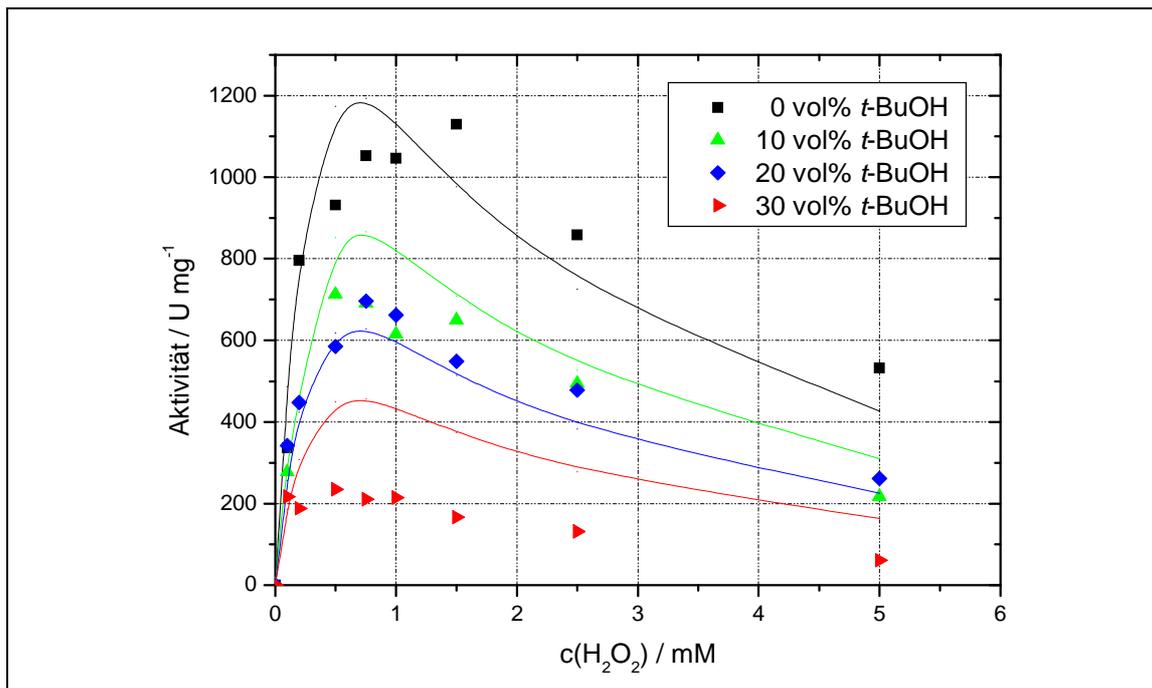
Mit diesem Modell bestehend aus Formel 4.2.2 und Formel 4.2.6 bis Formel 4.2.8 lassen sich die Messwerte für die sehr gut bestimmen. Die Ergebnisse finden sich im Abschnitt 8.8.1. Die Modellierung ergibt, dass der Einfluss des Cosolvens auf die beiden  $K_M$ -Werte nicht signifikant ist. Im Folgenden wird daher ausschließlich der Korrekturterm für den  $v_{\text{max}}$ -Wert (Formel 4.2.8) verwendet. Sowohl die Messwerte für die Variation der Thioanisol-Konzentration (Abbildung 4.2.9) als auch zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Abhängigkeit (Abbildung 4.2.10) können mit diesem Modell beschrieben werden.



**Abbildung 4.2.9: Einfluss der Thioanisol-Konzentration auf die Peroxidase-Aktivität.**

Die Linien stellen die Simulation mit den in Tabelle 4.2.4 angegebenen Parametern dar. 100 mM Natriumacetat (pH 5), 50 mM Natriumsulfat, T = 20 °C, 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,085 µg mL<sup>-1</sup> CPO, Units bezügl. Thioanisol

Eine sehr gute Übereinstimmung ergibt sich für *tert*-Butanol-Konzentrationen von 0 vol% bis 20 vol%. Für 30 vol% ergeben sich insbesondere im niedrigen millimolaren Bereich höhere Abweichungen, der  $v_{\max}$  wird aber recht gut wieder erreicht.



**Abbildung 4.2.10: Einfluß der Wasserstoffperoxid-Konzentration auf die Peroxidase-Aktivität.**

Die Linien stellen die Simulation mit den in Tabelle 4.2.4 angegebenen Parametern dar. 100 mM Natriumacetat (pH 5), 50 mM Natriumsulfat, T = 20 °C, 1,8 mM Thioanisol, 0,085  $\mu\text{g mL}^{-1}$  CPO, Units bezügl. Thioanisol

Insgesamt zeigen die Messwerte deutlich den Verlauf einer Substratüberschussinhibierung. Dies ist ein tatsächlicher Inhibierungs- und kein Desaktivierungseffekt. Alle Photometermessungen liefern strikt lineare Verläufe für den Messzeitraum.

Die Ergebnisse der nicht-linearen Regression sind in der folgenden Tabelle angegeben.

**Tabelle 4.2.4 Ergebnisse der nicht-linearen Regression zum Peroxidase-Modell.**

$v_{\max,0} / \text{U mg}^{-1}$	$K_{M,\text{H}_2\text{O}_2} / \text{mM}$	$K_{i,\text{H}_2\text{O}_2} / \text{mM}$	$K_{M,\text{Thioanisol},0} / \text{mM}$
$5655 \pm 1167$	$0,55 \pm 0,17$	$0,78 \pm 0,25$	$1,37 \pm 0,23$
$k_{\text{kor},v_{\max}}$			
$-0,291 \pm 0,017$			

Alle kinetischen Konstanten ergeben sich mit relativ kleinem Fehler. Auch der  $k_{\text{kor},v_{\max}}$  hat noch einen geringen Fehler. Dieser Wert ist negativ, da dann insgesamt der Exponent in Formel 4.2.8 negativ wird, und sich somit die geringeren apparenten  $v_{\max}$ -Werte ergeben. Hierdurch wird der inhibierende Einfluß des Cosolvens dargestellt.

Das Modell ermöglicht eine hinreichende formalkinetische Beschreibung der Peroxidase-Aktivität und gibt zum ersten Mal die Möglichkeit einen  $K_M$ -Wert für  $H_2O_2$  zu ermitteln. Zudem kann mit dem vorliegenden Modell den Verlauf von Batchreaktionen beschrieben werden (vgl. Abbildung 5.4.8).

#### 4.2.2.2 Halogenase-Aktivität

Für die Bestimmung der Halogenase-Aktivität wird als Standard-Assay der Photometer-Test von Hager *et al.* verwendet, bei dem Monochlordimethylcyclohexandion (Monochlordimedon, MCD) in Gegenwart von Chlorid-Ionen und Wasserstoffperoxid zur dichlorierten Verbindung umgesetzt wird [Hager, *et al.* 1966].

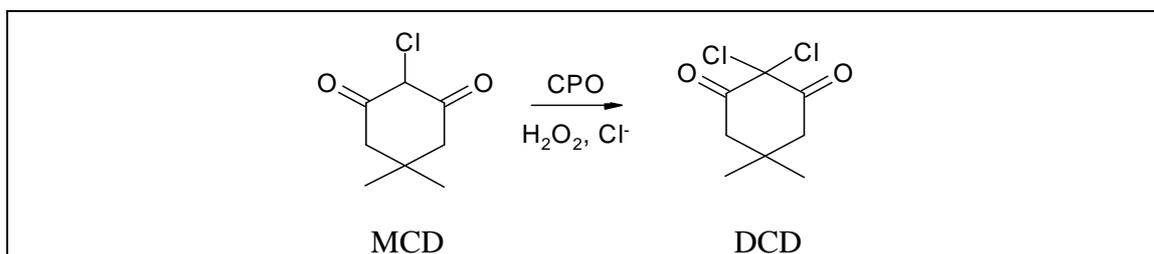
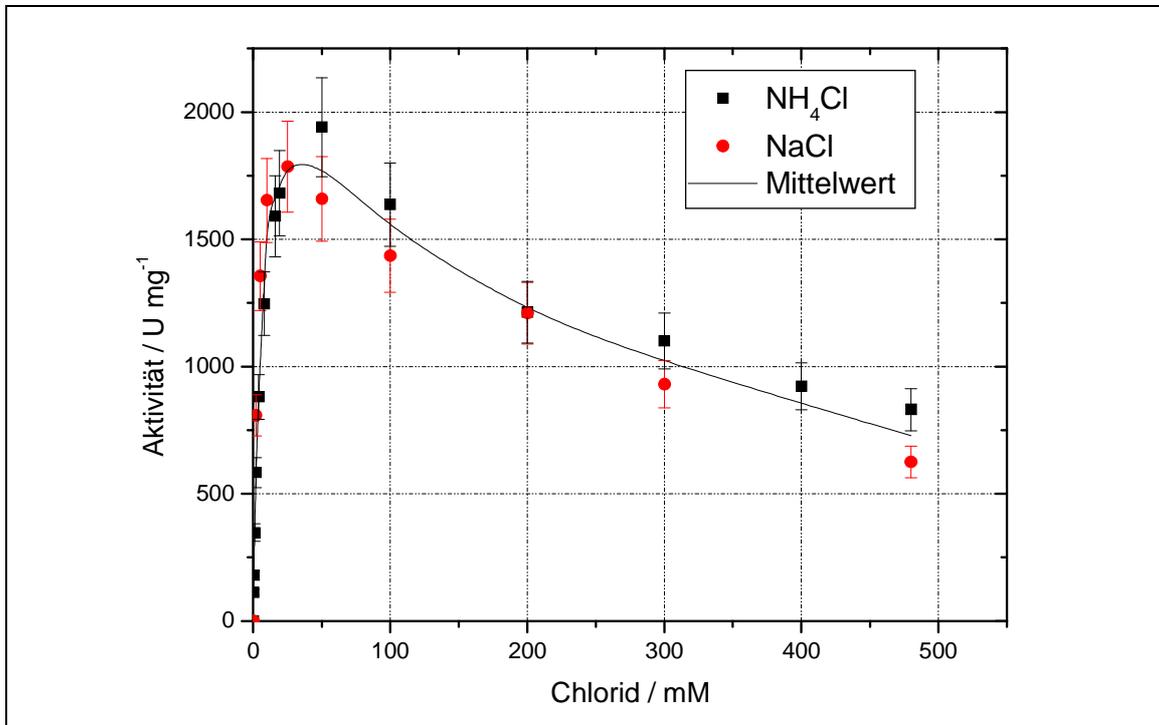


Abbildung 4.2.11: MCD-Assay für die Halogenase-Aktivität.

Das Substrat MCD hat wegen des delokalisierten Elektronensystems zwischen den beiden Ketogruppen ein Absorptionsmaximum im UV-Bereich ( $\lambda = 278 \text{ nm}$ ). Durch die weitere Chlorierung entfällt das C-H-azide Proton in  $\alpha$ -Position zu den beiden Ketogruppen und eine Delokalisierung der Elektronen ist nicht mehr möglich. Dies führt zu einer Veränderung im UV-Spektrum. Somit ist der MCD-Assay ein einfach durchzuführender Aktivitätstest, der jedoch zum einen nur die Halogenase-Aktivität erfasst und zum anderen die Bildung von Hypohalogenit nur indirekt anzeigt.

Mit diesem Assay-System wird die Halogenase-Aktivität untersucht hinsichtlich des Einflusses der Art des Salzes, des pH-Wertes und der Temperatur. Bei enzymkatalysierten Reaktionen können bestimmte Kationen einen Einfluß auf die Aktivität haben [Vasic-Racki 2003], daher ist neben der Art des Puffers auch das Gegenion des Puffers und des Chloridsalzes von Interesse. Für den MCD-Assay werden üblicherweise Kaliumphosphatpuffer in einer Konzentration von 100 mM und Kalium- oder Natriumchlorid in einer Konzentration von 16-20 mM als Substrat eingesetzt [Hager, *et al.* 1966; Seelbach 1997]. Zunächst wird daher über einen breiten Bereich die Natriumchlorid-Konzentration variiert und als alternatives Kation Ammoniumchlorid ebenfalls im Kaliumphosphatpuffer eingesetzt (Abbildung 4.2.12). Scheinbar liegt die Aktivität bei Verwendung von Natriumchlorid zuerst höher (bis 50 mM) und dann konstant unter der Aktivität mit Ammoniumchlorid. Nur bei 200 mM sind die beiden Aktivitäten fast identisch. Im Rahmen der Messfehler lässt sich jedoch aus den beiden Messreihen kein signifikanter Unterschied ableiten. Die Art des Kations

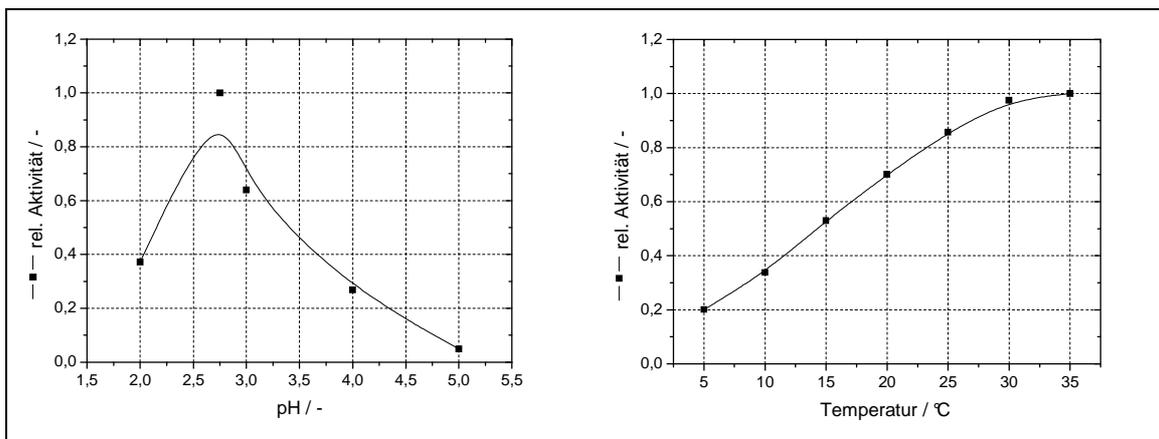
ist für die Aktivität nicht ausschlaggebend. Dafür ist aber in beiden Fällen eine deutliche Inhibierung des Enzyms durch das Substrat zu erkennen.



**Abbildung 4.2.12: Einfluß des Kations auf die Halogenase-Aktivität.**

100 mM Kaliumphosphat (pH 2,75), T = 25°C, 0,1 mM MCD, 0,0085 µg mL<sup>-1</sup> CPO, Units bezügl. MCD

Ebenso wie für die Peroxidase-Aktivität wird der Einfluss von Temperatur und pH-Wert auf die Halogenase-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 4.2.13.

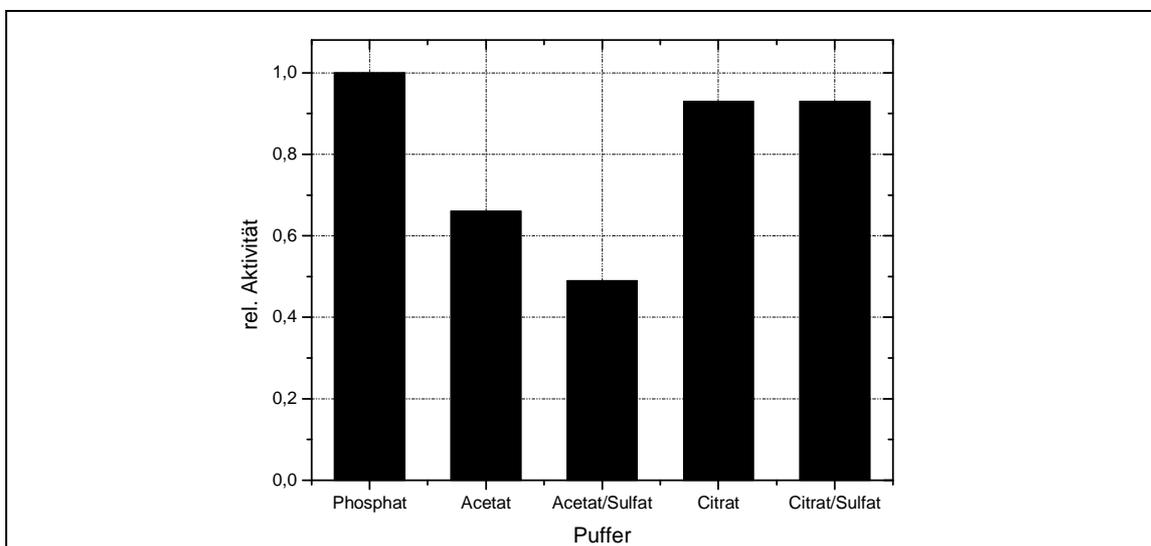


**Abbildung 4.2.13: pH und Temperatur-Optima der Halogenase-Reaktion.**

100 mM Kaliumphosphat, 0,0085 µg mL<sup>-1</sup> CPO, 20 mM Kaliumchlorid, 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,1 mM MCD

Die maximale Aktivität liegt bei pH 2,75, dies ist auch nicht unerwartet, da der MCD-Assay standardmäßig bei diesem pH-Wert durchgeführt wird.

Die Art des Puffersalzes hat ebenso Einfluss auf die Halogenase-Aktivität. Der standardmäßig verwendete Phosphatpuffer dient hier als Referenz (Abbildung 4.2.14). Verwendet man Acetatpuffer oder Acetatpuffer mit Natriumsulfat-Zusatz findet man nur ungefähr die Hälfte der Halogenase-Aktivität im Phosphatpuffer. In den Citratpuffern findet man fast nur geringfügig niedrigere Aktivitäten als im Phosphatpuffer. Da der Aktivitätstest bei pH = 2,75 durchgeführt wird, kann man eigentlich nicht mehr von Puffern sprechen (vgl. Abbildung 3.2.1), die pH-Werte werden durch Titration eingestellt. Da hier aber keine elektrochemischen Untersuchungen durchgeführt werden, ist die Pufferkapazität nicht entscheidend.

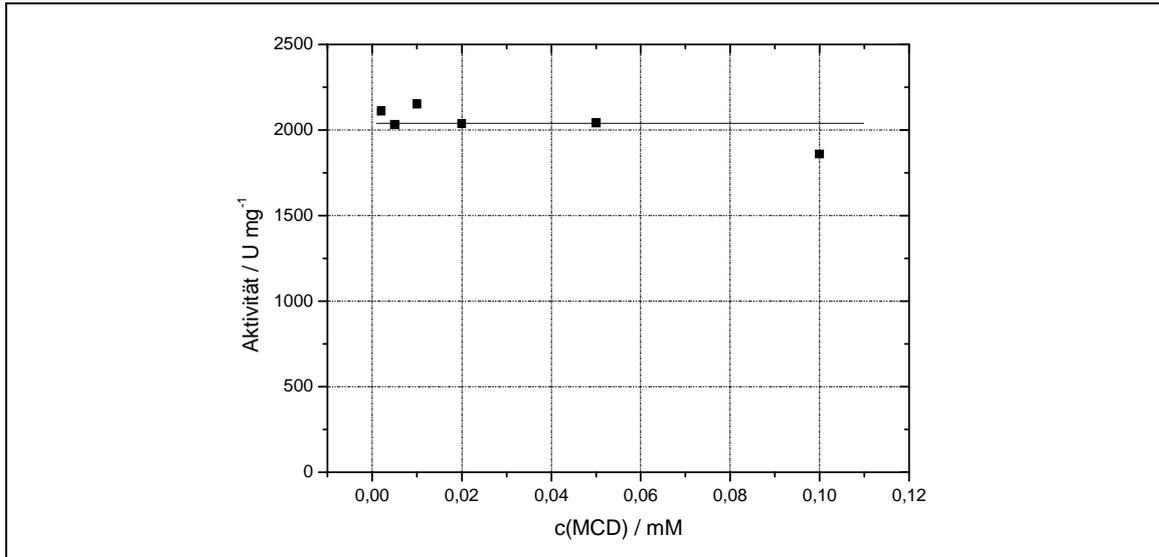


**Abbildung 4.2.14: Halogenase-Aktivität in unterschiedlichen Puffern.**

Aktivitätstest nach MCD-Methode (vergleiche 8.3.1.1), 100 mM Puffersalz (alle pH 2,75)

Für eine formalkinetische Betrachtung der Halogenase-Aktivität muss noch geklärt werden, ob und wie groß der Einfluss der MCD-Konzentration auf die Enzymaktivität ist. In Abbildung 4.2.15 ist gezeigt, dass sich die CPO-Aktivität nur geringfügig ändert, wenn man die MCD-Konzentration variiert. Man könnte eine geringfügige Inhibierung des Enzyms bei hohen Konzentrationen vermuten. Auch lässt sich nicht völlig ausschließen, dass sich bei sehr kleinen MCD-Konzentrationen (die im Rahmen der Methode nicht mehr messbar sind) die Aktivität doch noch verringert und einen Michaelis-Menten Verlauf annimmt.

Anhand der gemessenen Werte kann nicht bewiesen werden, dass MCD ein Substrat für das Enzym ist. Die These kann auch nicht völlig widerlegt werden; die Daten deuten jedenfalls darauf hin, dass MCD kein Substrat der CPO ist.



**Abbildung 4.2.15: Einfluss der MCD-Konzentration auf die CPO-Aktivität.**

100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 2,75), 0085  $\mu\text{g mL}^{-1}$  CPO, 20 mM Kaliumchlorid, 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$

Die Chlorierung ist also vermutlich die Folgereaktion der Biokatalyse und wird daher im Modell zur Halogenase-Kinetik nicht berücksichtigt. Zur Beschreibung der kinetischen Daten wird wieder eine Doppelsubstratkinetik gewählt, die zusätzlich eine Inhibierung durch die beiden Substrate beinhaltet. Das eine Substrat ist das Chlorid-Ion, das andere das Oxidationsmittel  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die entsprechende Gleichung gibt Formel 4.2.9 wieder.

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]}{K_{\text{M,H}_2\text{O}_2} + [\text{H}_2\text{O}_2] + \left(\frac{[\text{H}_2\text{O}_2]^2}{K_{\text{i,H}_2\text{O}_2}}\right)} \cdot \frac{[\text{Cl}^-]}{K_{\text{M,Cl}^-} + [\text{Cl}^-] + \left(\frac{[\text{Cl}^-]^2}{K_{\text{i,Cl}^-}}\right)} \quad \text{Formel 4.2.9}$$

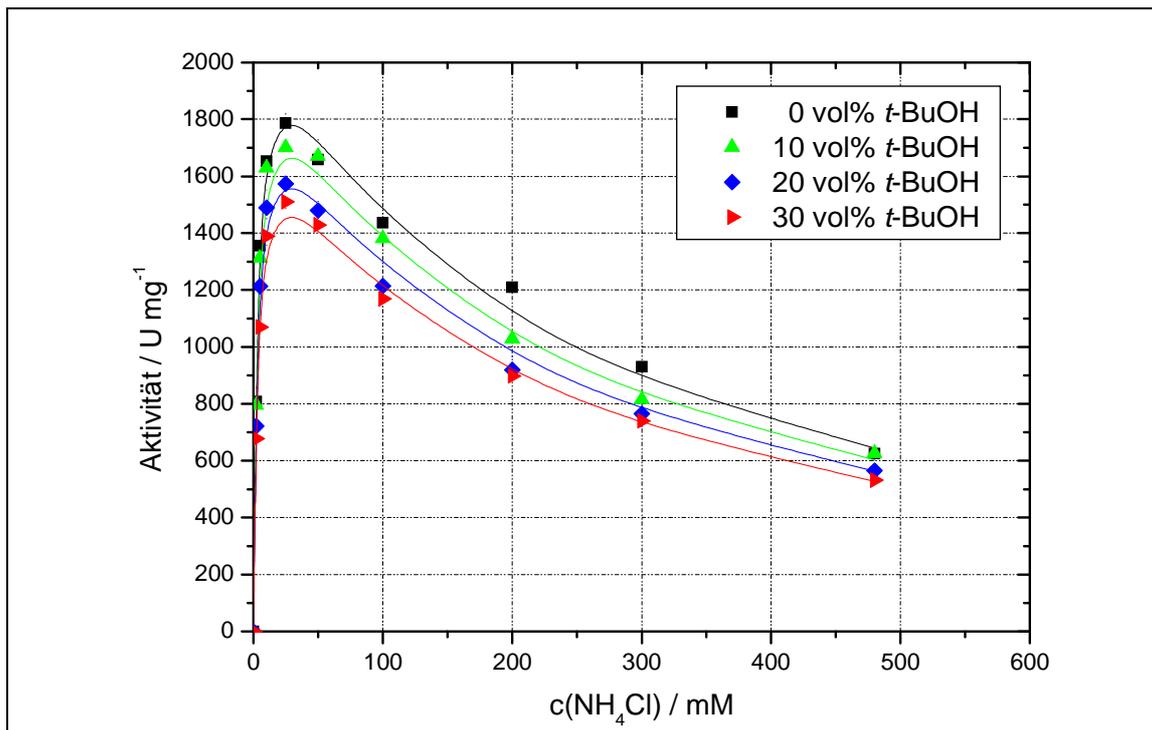


Abbildung 4.2.16: Kinetische Untersuchungen zur Halogenase-Aktivität.

100 mM Kaliumphosphat (pH 2,75), 0085  $\mu\text{g mL}^{-1}$  CPO, Units bezügl. MCD, 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0,1 mM MCD, Die Linien stellen die Simulation der Formel 4.2.9 mit den Parametern aus Tabelle 4.2.5 dar.

Die Inhibierung der CPO durch einen Überschuss an Chlorid ist in Abbildung 4.2.16 deutlich zu erkennen. Da die Aktivitäten mit Ammonium- und Natrium-Kationen gleich sind (vgl. Abbildung 4.2.12) kann ein inhibierender Einfluss des Kations ausgeschlossen werden. Die Herabsetzung der Aktivität durch den Cosolvens-Zusatz lässt sich ebenfalls deutlich ablesen, wenn Sie hier auch nicht so stark ausfällt wie bei der Peroxidase-Reaktion. Wenn man tatsächlich die Ionenstärke als physikalische Erklärung der Aktivitätsminderung annimmt, dann lässt sich dieser Unterschied qualitativ deuten. Durch den Salzcharakter des Substrates Ammoniumchlorid, das in derselben Größenordnung wie das Puffersalz im Reaktionsansatz vorhanden ist, wird eine eventuelle Herabsetzung der Ionenstärke durch *tert*-Butanol in gewissem Umfang kompensiert. So liegen die Kurven beim Wert höchster Aktivität (ca. 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) noch deutlich weiter auseinander als bei 480 mM. Diese Deutung ist jedoch nur eine Hypothese, die Modelle sollten als formalkinetische Beschreibung der beiden Reaktionen gesehen werden. Die errechneten Parameter gibt die folgende Tabelle wieder.

**Tabelle 4.2.5 Ergebnis der nicht-linearen Regression zum Halogenase-Modell**

$v_{\max,0} / \text{U mg}^{-1}$	$K_{M,\text{H}_2\text{O}_2} / \text{mM}$	$K_{i,\text{H}_2\text{O}_2} / \text{mM}$	$K_{M,\text{Chlorid}} / \text{mM}$	$K_{i,\text{Chlorid}} / \text{mM}$
$17.345 \pm 267$	0,55	0,78	$3,36 \pm 0,15$	$186,6 \pm 7,0$
$k_{\text{kor},v_{\max}}$				
$-0,0608 \pm 0,0042$				

Hierbei wurden die Parameter  $K_M$  und  $K_i$  für  $\text{H}_2\text{O}_2$  aus dem Peroxidase-Modell übernommen, da davon ausgegangen werden kann, dass die Affinität für  $\text{H}_2\text{O}_2$  in beiden Reaktionen gleich ist (Bildung von Compound I, vgl. Abbildung 4.1.4). Diese Parameter wurden fixiert und haben daher keine Standardabweichung. Alle Experimente wurden bei konstanter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Ausgangskonzentration durchgeführt, die Abhängigkeit der Halogenase-Aktivität von der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration wurde nicht separat untersucht. Die Messwerte lassen sich also gut mit einem Zwei-Substratmodell beschreiben, ohne MCD als Substrat zu berücksichtigen.

### 4.3 Chemische Modifikation der Chlorperoxidase<sup>13</sup>

Die aktive Konformation eines Biokatalysators kann durch chemische Modifikation stabilisiert werden. Die chemische Modifikation kann z. B. durch Quervernetzung, Amidierung, reduktive Alkylierung und Immobilisierung erfolgen. Im Rahmen der hier gezeigten Untersuchungen sollen ausschließlich chemische Modifikationen untersucht werden, die zu homogen löslichen Enzympräparationen führen.

Quervernetzungsreaktionen nutzen bifunktionelle Reagentien, wie z.B. Glutardialdehyd, die mit nukleophilen Seitenketten der Aminosäuren reagieren, so mit der Aminogruppe von Lysin, der N-terminalen Aminosäure oder der Sulphydrylgruppe von Cystein [Ayala, et al. 2002]. Die chemische Modifikation mit Carbodiimiden und Diaminen greift die Carboxylgruppen von Aspartat und Glutamat, die Imidazolgruppe von Histidin und die Thioether-Funktion des Methionin an [Wong, Wong 1992]. Die Reaktion zwischen zwei Proteinketten (inter- oder intramolekular) mit Carbodiimiden zeigt Abbildung 4.3.1. Im Rahmen dieser Arbeit wurde als ein Reagenz 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC) verwendet.

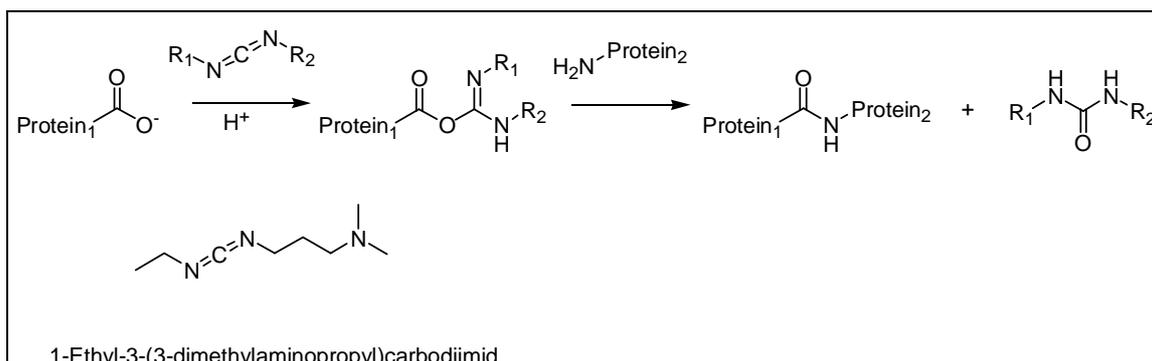


Abbildung 4.3.1: Aktivierung von Carboxylgruppen durch Carbodiimide.

Bifunktionelle Reagentien lassen sich unterteilen in homo- und heterobifunktionelle, sowie "zero length"-Linker. Die Reagentien variieren in Struktur, Reaktivität und Spezifität. Die "zero length"-Quervernetzer, wie Carbodiimide, Isazolium-Derivate, Chloroformiate und Carbonyldiimidazole, welche zu einer direkten Verbindung von zwei Aminosäuren führen, können alleine oder in Kombination mit anderen bifunktionellen Reagentien wie Glutaraldehyd verwendet werden.

Die Reaktivität der Aminosäure-Seitenkette und die relative Reaktivität des Nucleophils variiert mit der elektronischen Struktur, dem pK der relevanten funktionellen Gruppe

<sup>13</sup> Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Camilo La Rotta Hernandez (Universität Rio de Janeiro, Brasilien) im Rahmen eines vom Internationalen Büros des BMBF geförderten Projektes erzielt.

und der chemischen Umgebung. Daher reagieren manche Aminosäuren nur mit bestimmten Reagentien. Eine Übersicht über die verschiedenen Reagentien und der koppelnden funktionellen Gruppe der Aminosäure gibt Tabelle 4.3.1.

**Tabelle 4.3.1 Reagentien zur chemischen Modifikation von Enzymen [Friedman, et al. 1974; Vazquez-Duhalt, et al. 1992; Wong, Wong 1992].**

Art des Reagenzes	Beispiele	Koppelnde funktionelle Gruppe
"zero length"	Carbodiimide	Carboxyl
	Isoxazolium-Derivative	Carboxyl
	Chloroformiate	Amino
	Carbonyldiimidazole	Carboxyl
	Kupfer-di(1,10-phenanthrolin)	Sulphydryl, thiol
	2,2'-Dipyridylsulfide	Sulphydryl, thiol
Homo-bifunktional	Glutardialdehyd	Amino
	Hexamethylendiamin	Carboxyl
	Hexandiamin	Carboxyl
	Dissuccinimidylsuberat	Amino
	Dimethylmalonimidat	Amino
	1,4-Dicyanatobenzol	Amino
	<i>p</i> -Phenylene-diisocyanat	Amino
	<i>N,N'</i> -Methylenebismaleimid	Amino
	$\alpha,\alpha'$ -Diiodo- <i>p</i> -xylolsulfonsäure	Amino, Sulfid und Thiol
	Di-(2-chloroethyl)sulfon	Amino, Sulfid und Thiol
Bis-(3-nitro-4-fluophenyl)sulfon	Amino, Sulfid und Thiol	
Hetero-bifunktional	<i>N</i> -Succinimidyl-3-maleimidopropionat	Amino
	<i>N</i> -Succinimidyl-iodoacetat	Amino, Sulfid und Thiol
	4-Maleimidobenzoylchlorid	Amino, Sulfid und Thiol
	Ethylidoacetimidat	Sulfide
Reduktive Alkylierung	Brig	Amino
	Tween	
	PEG-Aldehyde und Reduktionsmittel (z.B. Natriumcyanoborhydrid)	
Reduktive Arylierung	Nitrobenzaldehyd	Amino
	5-Hydroxy-2-nitrobenzaldehyd	
	2-Naphtaldehyd	
	9-Anthraldehyd und Reduktionsmittel (z.B. Natriumcyanoborhydrid)	

Einige Peroxidasen wurden schon chemisch modifiziert. So konnte eine in Benzol lösliche und aktive HRP-Modifikation hergestellt werden [Takahashi, et al. 1984]. CPO wurde schon mit zahlreichen Quervernetzern modifiziert, allerdings führte nur die Modifizierung mit Glutaraldehyd zu katalytisch aktiver, löslicher CPO und unlöslicher Kristalle [Tisher, Kasche 1999]. CPO-Modifikationen mit höherer Stabilität könnten also auch mit anderen Quervernetzern erhalten werden. Da CPO eine große Zahl von Asparagin- und Glutaminsäuren besitzt, sollte eine Quervernetzung mittels der Carboxylgruppen möglich sein.

Eine Veränderung der Oberflächenstruktur wurde durch selektive Entfernung der Kohlenhydrat-Einheiten erreicht. Die Deglykosylierung wurde mit N-Glycosidase-F (Peptid N4-[N-acetyl]- $\beta$ -glucosaminy) durchgeführt [Vazquez-Duhalt, et al. 1992]. Die Deglykosylierung erhöht die Hydrophobizität des Enzyms, ebenso wie die reduktive Alkylierung oder Arylierung. Diese Reaktion reduziert die Zahl freier Aminogruppen durch Kupplung an hydrophobe Aryl- oder Alkylaldehyde und direkter Reduktion des entstehenden Imins durch ein Reduktionsmittel wie Natriumcyanoborhydrid. Da die Reagentien in hohem Überschuss eingesetzt werden, auf der anderen Seite aber der weitere Angriff des Aldehyds auf das sekundäre Amin sterisch stark gehindert ist, lässt sich die Stöchiometrie der Reaktion nicht exakt angeben. Eine Reaktionsgleichung, die von vollständigem Umsatz ausgeht, ist in Abbildung 4.3.2 gezeigt.

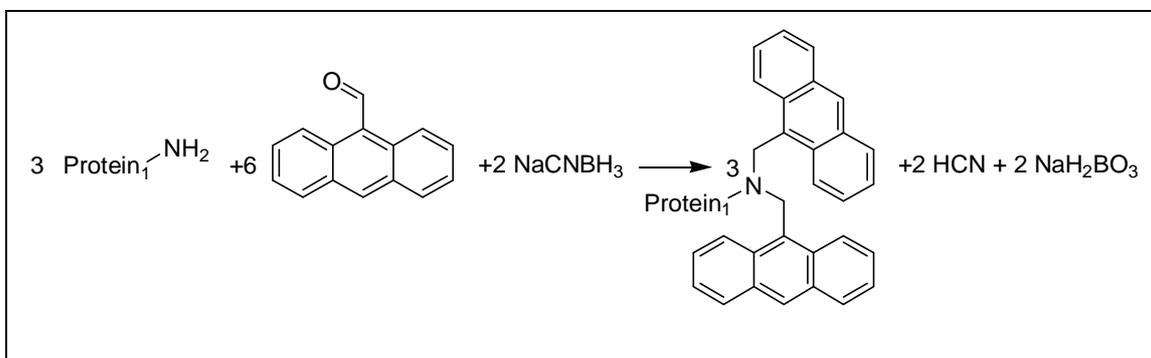


Abbildung 4.3.2: Reduktive Arylierung von Proteinen mit 9-Anthraldehyd.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Enzympräparationen mit Glutaraldehyd, EDAC und 9-Anthraldehyd/ $\text{NaCNBH}_3$  modifiziert. Dabei wurde der molare Überschuss der Reagentien variiert und die modifizierte CPO hinsichtlich Temperatur und Gegenwart organischer Lösungsmittel charakterisiert.

Im Folgenden werden für die modifizierten Enzyme Abkürzungen zur Unterscheidung verwendet:

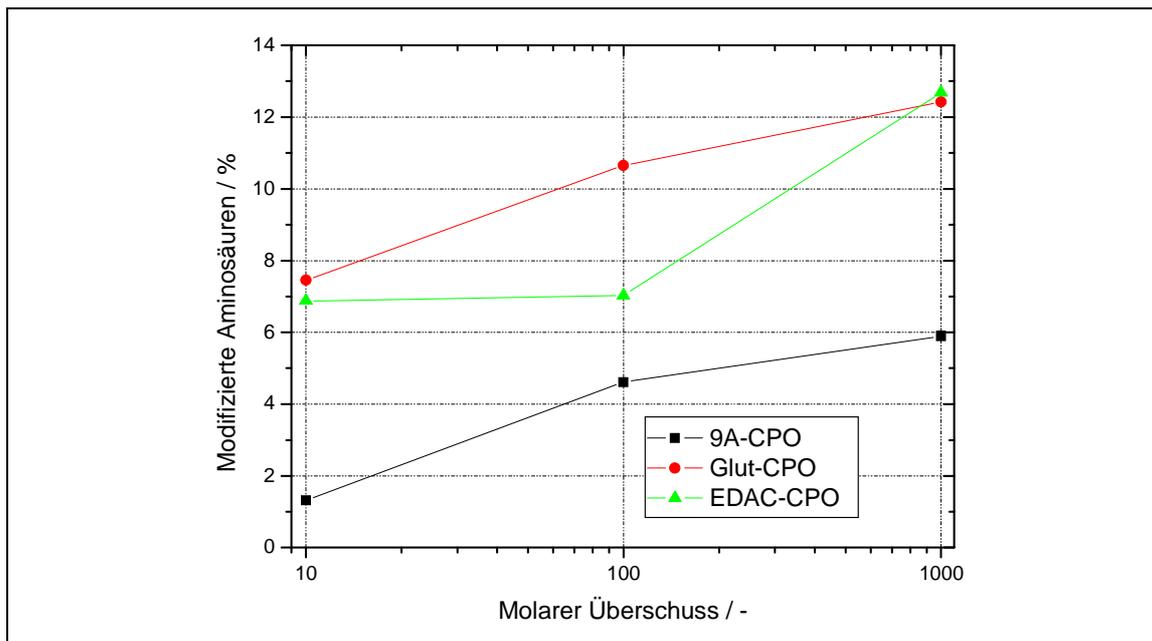
- 9A-CPO, für die reaktiv mit 9-Anthraldehyd modifizierte,
- Glut-CPO, für die mit Glutardialdehyd modifizierte,
- EDAC-CPO, für die mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid modifizierte,
- nat-CPO, für die unveränderte, native CPO.

Der molare Überschuss des Reagenzes wurde bezogen auf die an der Oberfläche des Enzyms für die jeweilige Reaktion zugänglichen Aminosäuren gemäß der folgenden Tabelle 4.3.2 ermittelt. Die Berechnung basiert auf der Kenntnis der Enzymstruktur [Sundaramoorthy, et al. 1995] und der Aminosäuresequenz [Conesa, et al. 2001].

**Tabelle 4.3.2 Anzahl der modifizierbaren Aminosäuren der CPO**

<b>Reagenz</b>	<b>9-A</b>	<b>Glut</b>	<b>EDAC</b>
Cys	2	2	2
Trp		4	
Lys	4	4	4
Arg		6	
His		7	
Tyr		10	
Glu			26
Asp			39
<b>Summe</b>	<b>6</b>	<b>33</b>	<b>71</b>

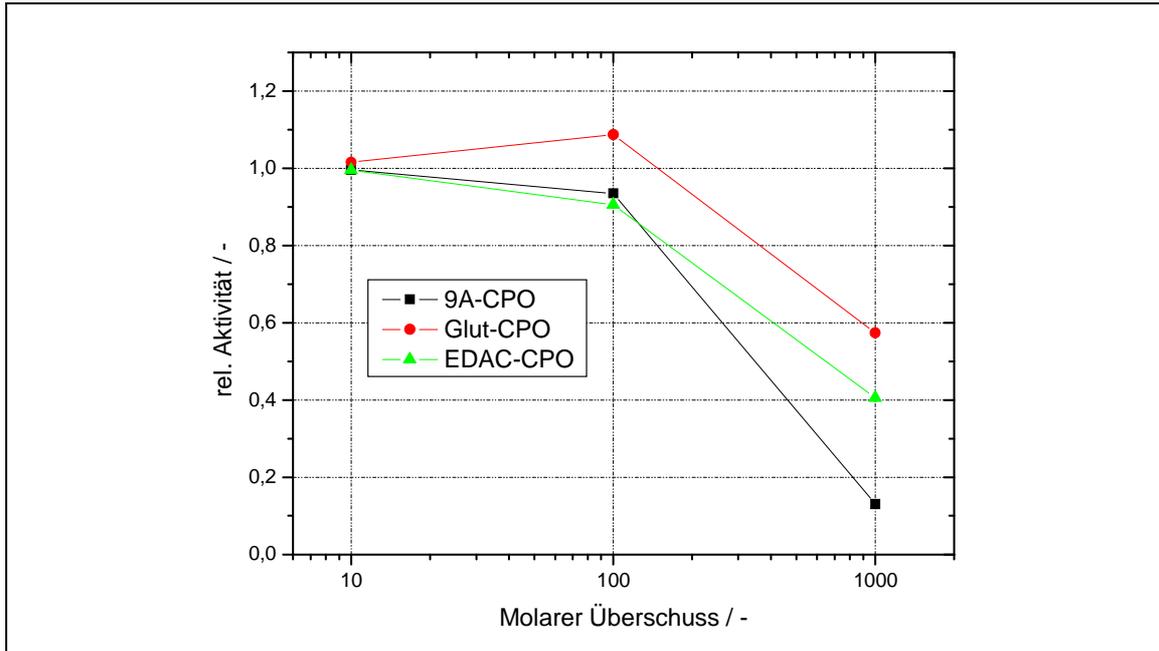
Zunächst wurden die Enzyme hinsichtlich des Grades der Modifizierung untersucht. Hierzu wurde mittels der Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) - Methode (vgl. Abschnitt 8.7.2) [Habeeb 1966] die Anzahl der freien Aminogruppen bestimmt (Abbildung 4.3.3). Sofort ersichtlich ist, dass mit steigendem Überschuss der Modifikationsreagentien die Anzahl der modifizierten Aminosäuren zunimmt.



**Abbildung 4.3.3: Anzahl der modifizierten Aminogruppen in Abhängigkeit des eingesetzten Reagenz-Überschusses.**

Auch ersichtlich ist, dass nur 1 bis maximal 13% der möglichen Aminosäuren überhaupt modifiziert werden. Allerdings führt die Modifikationsreaktion, die Gegenwart aggressiver Reagentien, zu einer Desaktivierung des Enzyms. Diese Desaktivierung ist abhängig von dem eingesetzten molaren Überschuss der Reagentien (Abbildung 4.3.4). Bei Verwendung eines 10-fachen Überschusses findet man fast genau die ursprüngliche Aktivität wieder. Ein 100-facher Reagentienüberschuss führt mit 9-Anthraldehyd und EDAC zu einem 5-10%igen Aktivitätsverlust.

Die Verwendung eines 1000-fachen Überschusses führt zu einer starken Desaktivierung. Für die Quervernetzungen mit EDAC und Glutardialdehyd findet man ca. die Hälfte der eingesetzten Aktivität wieder, die reduktive Alkylierung, die mit dem komplexen Borhydrid die chemisch aggressivsten Reaktionsbedingungen aufweist, führt zu einer fast 90%igen Desaktivierung des eingesetzten Enzyms.



**Abbildung 4.3.4: Relative Aktivität der modifizierten CPO in Abhängigkeit des eingesetzten Reagenz-Überschusses.**

Aktivitätsmessung mit der AAP-Methode (vgl. Abschnitt 8.3.1.2)

Durch die Funktionalisierung polarer Gruppen an der Protein-Oberfläche werden dessen Löslichkeitseigenschaften variiert. Um diesen Effekt zu überprüfen wurde die Verteilung der CPO in einem binären System aus einer Phenylsepharose-Suspension als hydrophober Phase und 1,7 M Ammoniumsulfat-Lösung als hochpolarer hydrophiler Phase gemessen. Die angegebene verbleibende Löslichkeit in der wässrigen Phase (Abbildung 4.3.5) bezieht sich nicht auf Proteinlöslichkeit, sondern auf die nach Mischen und Phasentrennung wiedergefundene CPO-Aktivität in der wässrigen Phase.

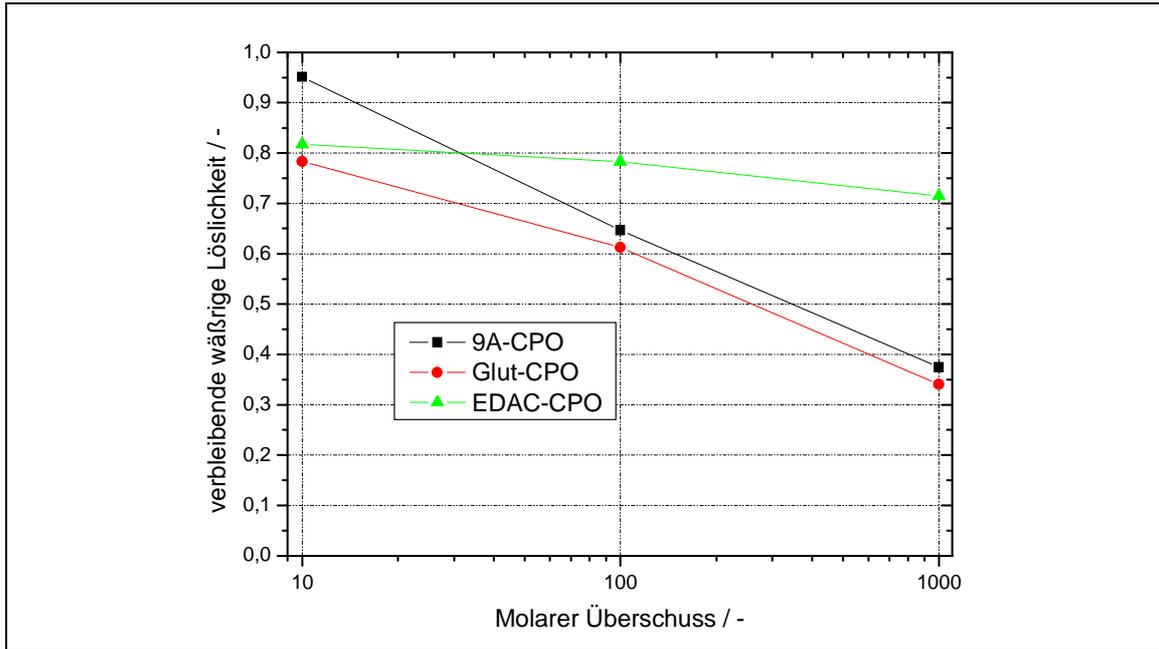


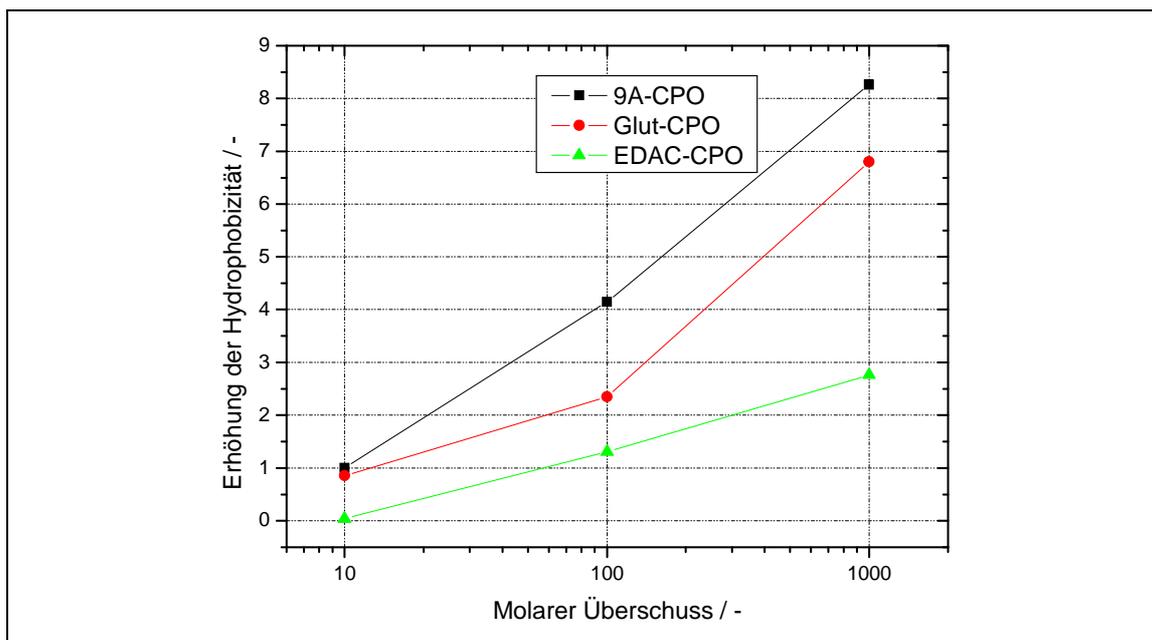
Abbildung 4.3.5: Erniedrigung der CPO-Löslichkeit in der wässrigen Phase in Abhängigkeit des eingesetzten Reagenz-Überschusses.

Bei einem hohen Grad der Modifikation (1:1000, Glut-CPO) findet man nur noch 40 % der Enzym-Aktivität in der wässrigen Phase wieder. Da der 9A-Rest deutlich hydrophober ist, reicht hier auch ein geringerer Grad der Modifikation um einen ebenfalls sehr hohen Grad an Hydrophobizität zu erzielen. In dem die Aktivität der CPO in der wässrigen und der Sepharose-Phase bestimmt wird, kann man einen Verteilungsfaktor errechnen. Dieser ist kein exakter Parameter wie der Verteilungskoeffizient in der Thermodynamik. Ins Verhältnis gesetzt zum Verteilungsfaktor der nat-CPO im selben System gibt er jedoch eine Größenordnung für die Erhöhung der Hydrophobizität gemäß Formel 4.3.1 wieder.

Erhöhung der Hydrophobizität = Formel 4.3.1

$$\left( \frac{A(\text{CPO}_{\text{mod}})_{\text{organisch}}}{A(\text{CPO}_{\text{mod}})_{\text{wässrig}}} \div \frac{A(\text{CPO}_{\text{nat}})_{\text{organisch}}}{A(\text{CPO}_{\text{nat}})_{\text{wässrig}}} \right) - \frac{A(\text{CPO}_{\text{nat}})_{\text{organisch}}}{A(\text{CPO}_{\text{nat}})_{\text{wässrig}}}$$

Für die native CPO ergibt sich somit 0 für die Erhöhung, Eine Erhöhung von 1 entspricht der doppelten Menge an Enzymaktivität in der organischen Phase im Vergleich zum nativen Enzym. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.3.6 gezeigt.



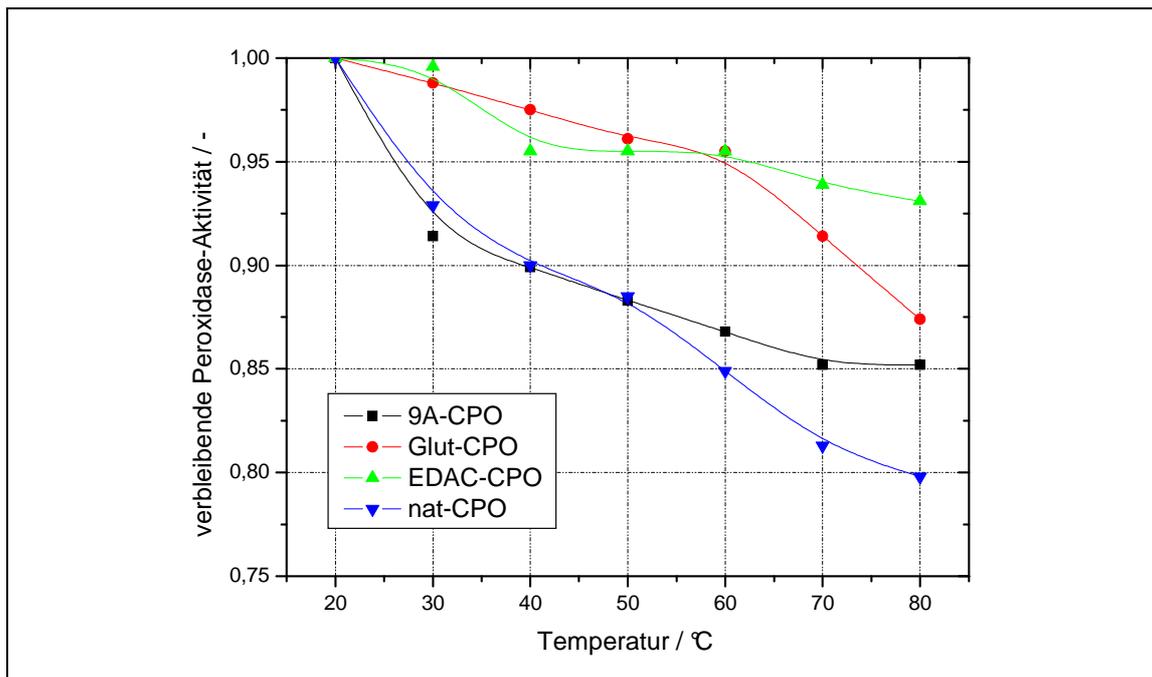
**Abbildung 4.3.6: Veränderung der Hydrophobizität durch die chemische Modifikation.**

Details zur Messung vgl. Abschnitt 8.7.3

Durch die Verwendung des großen, hydrophoben Anthracen-Restes wird die höchste Hydrophobisierung des Enzyms erreicht. In allen Fällen steigt die Hydrophobizität mit dem Modifizierungsgrad, bzw. dem verwendeten Reagenzüberschuss.

Mit einem 1:100 Verhältnis von zur Kopplung verfügbarer funktioneller Gruppen zum Modifikationsreagenz wird für alle drei Fälle zwar nur ein mittlerer Modifizierungsgrad erreicht, jedoch durch die chemische Reaktion kaum etwas an Enzymaktivität eingebüßt. Ein 1.000-facher Überschuss erhöht zwar den Modifizierungsgrad leicht, ist aber mit einer extrem hohen Enzymdesaktivierung verbunden.

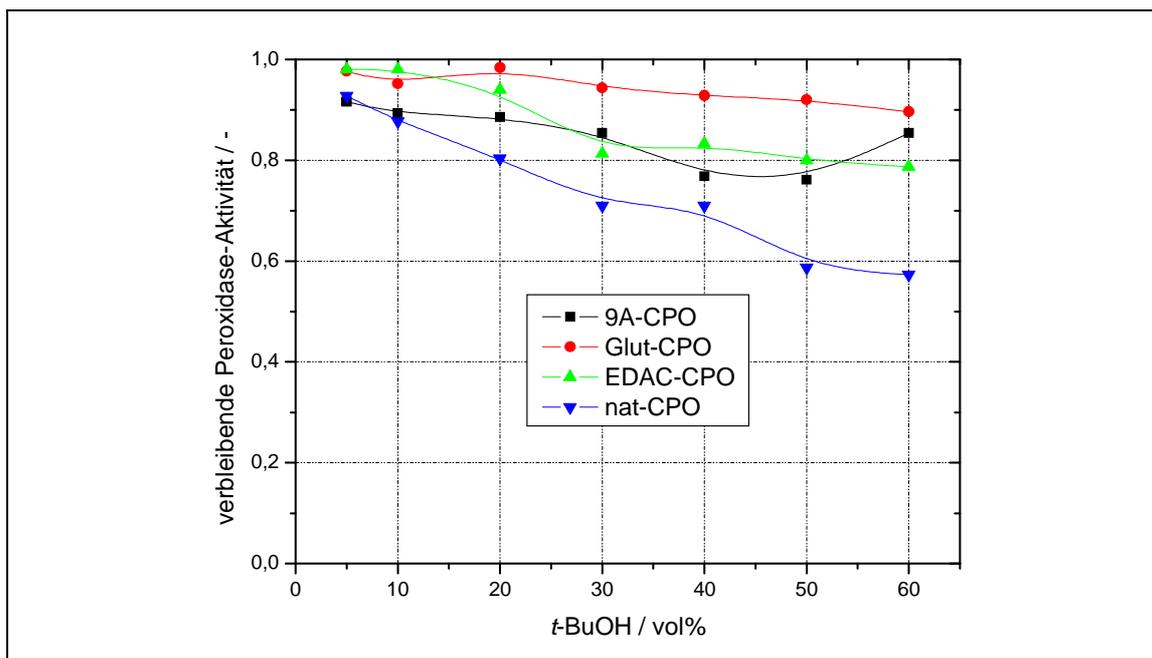
Somit wird für die präparative Anwendung der chemischen Modifikation das Verhältnis 1:100 gewählt, und die erhaltenen Enzympräparationen hinsichtlich ihrer Eigenschaften charakterisiert.



**Abbildung 4.3.7: Erhöhung der Temperaturstabilität der modifizierten CPO**

100 mM Natriumphosphat-Puffer, Inkubation = 60 min, T wie angegeben, Aktivitätstest mit AAP-Methode (vgl. 8.3.1.2)

Der Einfluss der Quervernetzung auf die Temperaturstabilität der CPO ist in Abbildung 4.3.7 gezeigt. Die Inkubationszeit von 60 Minuten entspricht keiner ausführlichen Untersuchung der Lagerstabilität (vgl. Abschnitt 4.2.1) der modifizierten CPO, zeigt jedoch schon deutlich den Einfluss der Modifikationen auf das Enzym auf. Für die native CPO findet man nach Inkubation bei 80°C für 60 min noch 80 % der Ausgangsaktivität. Über einen breiten Bereich von 30 – 80°C jedoch findet man durchweg höhere Restaktivitäten für 9A-CPO und Glut-CPO als für die native CPO. Die reduktiv alkylierte CPO zeigt zunächst bis 50°C die gleiche Restaktivität wie die unmodifizierte, zwischen 60 und 80°C scheint aber auch diese Modifizierung stabilisierend zu wirken. Dies ist insofern unerwartet, als die Funktionalisierung mit Anthraldehyd nicht zu einer Fixierung der Quartärstruktur führt. Insgesamt zeigt sich, dass die Quervernetzung die thermische Desaktivierung deutlich verzögern kann. Auch die reduktive Alkylierung führt zu einer Stabilisierung der CPO.



**Abbildung 4.3.8: Veränderung der Cosolvens-Stabilität durch Modifikation**

100 mM Natriumphosphat-Puffer, Inkubation = 4 h, T = 25 °C, Aktivitätstest mit AAP-Methode (vgl. 8.3.1.2)

Deutlicher fällt der Stabilisierungseffekt der chemischen Modifikation bei der Stabilität gegenüber dem Cosolvens *tert*-Butanol aus. Wird das unmodifizierte Enzym mit 5 – 60 vol% des Cosolvens für 4 Stunden inkubiert, findet man eine fast lineare Abnahme der verbleibenden Peroxidaseaktivität (Abbildung 4.3.8). Die Restaktivitäten der modifizierten Enzyme liegen durchweg über der des nativen. Die höchste Restaktivität wird hierbei für Glut-CPO gefunden. Selbst bei Verwendung von 60 vol% *tert*-Butanol findet man nach Inkubation noch 90 % der Aktivität wieder. Zwar führt die 9A-Modifikation wie gezeigt (vgl. Abbildung 4.3.6) zu einer erhöhten Hydrophobizität, die Stabilität gegenüber dem Cosolvens ist jedoch geringer als bei den quervernetzten Modifikationen.

Da bereits in Kapitel 3 auf die Notwendigkeit der Verringerung des Cosolvensanteils im Elektrolyt hingewiesen wurde, steht für die reaktionstechnische Anwendung der modifizierten Enzyme sicherlich die Reaktionsstabilität im Vordergrund. Die Erhöhung der Hydrophobizität wird für das elektroenzymatische Verfahren nicht benötigt, sondern tritt als Nebeneffekt der chemischen Modifikation auf. Inwieweit die chemische Modifikation zu einer Verbesserung der Enzymausnutzung in Verfahren beitragen kann, wird in Kapitel 5 untersucht.

## 4.4 Zusammenfassung

Der biokatalytische Schritt wurde im Hinblick auf die Kombination mit einer elektrochemischen Anwendung charakterisiert.

- Die Lagerstabilität ist in allen Puffermedien (Acetat und Citrat, mit und ohne Sulfatzusatz) vergleichbar.
- 30 vol% *tert*-Butanol führt zur raschen Desaktivierung des Enzyms bei 30 °C ( $K_{\text{des}} = 0,0265 \text{ min}^{-1}$ ).
- Ein neues Assay-System für die Peroxidaseaktivitäten auf Thioanisol-Basis wurde etabliert.
- Die Enzymaktivität in Acetatpuffern ist niedriger als in den anderen Puffersystemen.
- Für die Peroxidase- und Halogenase-Aktivität wurden Zwei-Substratkinetiken ermittelt,  $\text{H}_2\text{O}_2$  als im Überschuss inhibierendes Substrat identifiziert.

Peroxidase-Kinetik:

---

$v_{\text{max},0} / \text{U mg}^{-1}$	$K_{\text{M,H}_2\text{O}_2} / \text{mM}$	$K_{\text{i,H}_2\text{O}_2} / \text{mM}$	$K_{\text{M,Thioanisol},0} / \text{mM}$
$5655 \pm 1167$	$0,55 \pm 0,17$	$0,78 \pm 0,25$	$1,37 \pm 0,23$
$k_{\text{korr},v_{\text{max}}}$			
$-0,291 \pm 0,017$			

---

Halogenase-Kinetik:

---

$v_{\text{max},0} / \text{U mg}^{-1}$	$K_{\text{M,H}_2\text{O}_2} / \text{mM}$	$K_{\text{i,H}_2\text{O}_2} / \text{mM}$	$K_{\text{M,Chlorid}} / \text{mM}$	$K_{\text{i,Chlorid}} / \text{mM}$
$17.345 \pm 267$	0,55	0,78	$3,36 \pm 0,15$	$186,6 \pm 7,0$
$k_{\text{korr},v_{\text{max}}}$				
$-0,0608 \pm 0,0042$				

---

- Die apparenten und tatsächlichen kinetischen Konstanten wurden für beide Reaktionstypen ermittelt.
- Für die Halogenase-Aktivität konnte gezeigt werden, dass das Chlorid-Ion sicher ein Substrat der enzymatischen Reaktion ist, MCD wahrscheinlich nicht.

- Drei chemisch modifizierte Enzympräparationen (9 A-CPO, Glut-CPO, EDAC-CPO) wurden unter optimierten Reaktionsbedingungen hergestellt und charakterisiert.

Somit konnte gezeigt werden, dass der elektrochemische Blickwinkel neue Fragen in der Biokatalyse aufwirft. Die genaue Aufklärung des Einflusses von *tert*-Butanol auf die Enzymaktivität und Stabilität wäre ohne das Leitfähigkeitsproblem (vgl. Abbildung 3.2.3) nicht erfolgt.



## 5 Elektroenzymatische Reaktionstechnik

### 5.1 Einleitung

"Die Aufgabe der Reaktionstechnik ist es, eine Reaktion sicher und wirtschaftlich vom Labor über den Technikumsmaßstab bis in den Produktionsmaßstab zu übertragen. Dabei kann es sich um chemische oder biologische Reaktionen handeln. Auf der Grundlage von Thermodynamik, Kinetik und Reaktordesign sollen die Rohstoffe mit hohem Umsatz und hoher Selektivität in die Zielprodukte überführt werden. Dabei sollen gleichzeitig hohe Raum-Zeit-Ausbeuten und geringe produktmengenspezifische Katalysatorkosten realisiert werden." [Wandrey 2003]

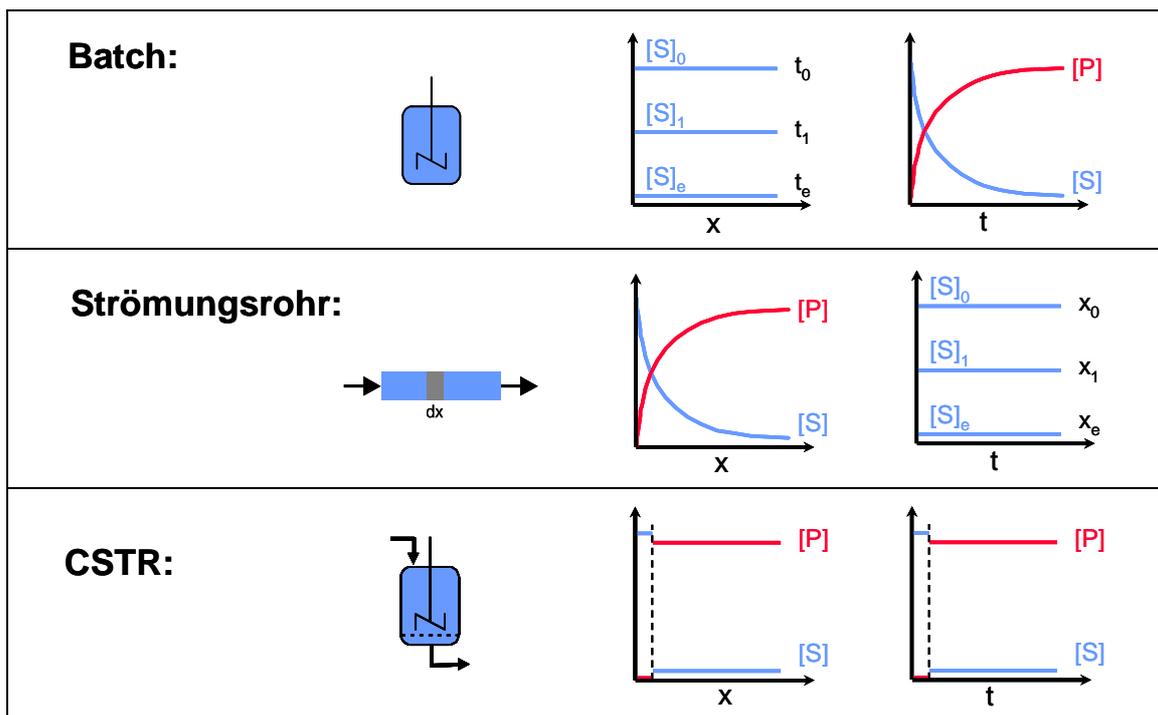
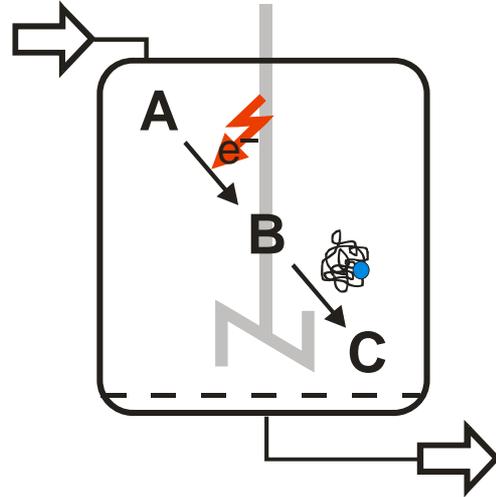


Abbildung 5.1.1: Charakteristika chemischer Reaktoren.

In diesem Kapitel sollen die in Kapitel 3 gewonnenen Erkenntnisse über den elektrochemischen Schritt und die in Kapitel 4 gewonnenen Erkenntnisse über den Biokatalysator zusammengeführt und für einen effizienten Produktionsprozess in einem elektroenzymatischen Reaktor genutzt werden. Für die cofaktorabhängigen Enzyme gibt es schon einige Beispiele für eine Reaktorentwicklung [Bergel, et al. 1985; Bergel, Comtat 1986; Bergel, DevauxBasseguy 1996; Delecouls, et al. 1998; Delecouls-Servat,

*et al. 2002b; Degenring, et al. 2004; Hollmann, Schmid 2004*], für die Cosubstrat-Generierung, wie sie im Rahmen dieser Arbeit untersucht wird, ist dies noch nicht geschehen.

### **5.1.1 Grundtypen chemischer Reaktoren**

Für eine chemische oder biokatalytische Reaktion stehen verschiedene Typen von Reaktoren zur Verfügung (Abbildung 5.1.1) [*Levenspiel 1999*]. Im Satzreaktor (Batch) nimmt die Substratkonzentration nach dem Geschwindigkeitsgesetz der Reaktion mit der Zeit ab und die Produktkonzentration entsprechend zu, während in einem ideal vermischten Reaktor die Konzentration zu einem bestimmten Zeitpunkt an jedem Ort identisch ist. Als Variante des Satzreaktors kann der Fed-Batch betrachtet werden, bei dem ein Reaktand kontinuierlich zugeführt wird. Somit ist die Reaktion immer in einem Reaktanden limitiert und die Produktbildung mit der Zeit entspricht der Zugabegeschwindigkeit des Edukts. Alle elektroenzymatischen Synthesen in dieser Arbeit sind also reaktionstechnisch gesehen Fed-Batch-Reaktionen bezüglich des Substrates  $H_2O_2$ . Der Einfachheit halber werden sie im Folgenden trotzdem als Batch-Reaktionen bezeichnet und nur wenn auch das eigentliche Substrat Thioanisol zudosiert wird von einem Fed-Batch gesprochen.

Prinzipiell unterschieden von den Satzreaktoren sind die Strömungsrohr-Reaktoren (Plug Flow). Hier sind die Orts- und Zeitcharakteristika gegenüber dem Satzreaktor vertauscht. Ändert sich die Konzentration über die Länge des Reaktors, so bleibt sie an einer bestimmten Stelle zeitlich konstant. Zur Verwendung eines Strömungsrohrreaktors werden in der Regel immobilisierte Katalysatoren eingesetzt. Da im Rahmen dieser Arbeit nur homogen-lösliche CPO verwendet wird, kommen für die elektroenzymatische Synthese Strömungsrohr-Reaktoren bezüglich des Biokatalysators nicht in Frage.

Die vierte Variante sind die kontinuierlich betriebenen Rührkesselreaktoren (CSTR), in der Biotechnologie z.B. realisiert durch die Enzym-Membran-Reaktoren (EMR) [*Wandrey, et al. 1977; Wandrey 1990*]. Hierbei wird der Katalysator im Reaktionsraum zurückgehalten, während das Substrat kontinuierlich zugeführt und mit dem Volumenstrom Produkt aus dem Reaktor entfernt wird. CSTR's arbeiten unter Auslaufbedingungen, d.h. an jedem Ort und zu jedem Zeitpunkt findet man im Reaktor dieselben Konzentrationen der Reaktanden wie im Auslauf vor. Kontinuierliche Reaktoren werden unter anderem eingesetzt, um die Katalysatorausnutzung zu verbessern.

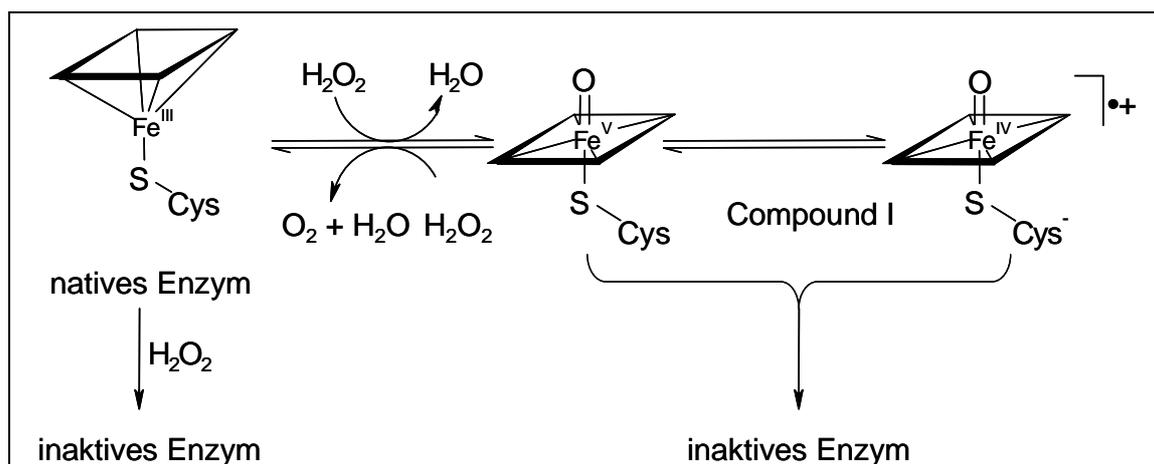
### 5.1.2 Limitierung durch Wasserstoffperoxid

In Peroxidase-katalysierten Biotransformationen wird häufig die Reaktionsgeschwindigkeit über eine Limitierung der Reaktion an Wasserstoffperoxid reguliert [Colonna, et al. 1999; Conesa, et al. 2002]. Die Notwendigkeit ergibt sich aus der raschen Desaktivierung der Enzyme durch das Oxidationsmittel. Diese Grunddesaktivierung der Peroxidasen in Gegenwart von Wasserstoffperoxid aber Abwesenheit von Substrat ist sehr viel höher als die thermische Desaktivierung (vgl. Abschnitt 4.2.1). Für die verwendete CPO liegt diese Desaktivierung in der Größenordnung von 3-8 % min<sup>-1</sup> in Phosphatpuffer (Tabelle 5.1.1).

**Tabelle 5.1.1** Desaktivierung von CPO in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Seelbach 1997].

C(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) / μM	K <sub>Des</sub> / min <sup>-1</sup>
50	0,03
1000	0,074

Diese Grunddesaktivierung von Peroxidasen kann über zwei Wege verlaufen (Abbildung 5.1.2). Zum einen kann das native Enzym im Grundzustand direkt durch die Einwirkung von Wasserstoffperoxid zerstört werden (Abbildung 5.1.2, linke Seite). Ebenso kann das aktivierte Enzym (Compound I) durch oxidativen Abbau des Porphyrinsystems [van Deurzen, et al. 1997c] zerstört werden (Abbildung 5.1.2, rechte Seite). Die Mechanismen sind nicht vollständig geklärt, in jedem Fall verläuft die Desaktivierung jedoch irreversibel.



**Abbildung 5.1.2** : Desaktivierungsmechanismus von Häm-Peroxidasen.

Reaktionstechnisch kann diese Desaktivierung durch die Limitierung mit mehreren Systemen umgangen werden. So wird das Oxidationsmittel in der Regel per

Dosierpumpe in aliquoten Anteilen oder sensor kontrolliert zudosiert [van Deurzen, et al. 1997b] oder *in situ* generiert, z.B. durch Oxidation von Glucose mit Glucose Oxidase [van de Velde, et al. 2000] oder in Gegenwart von Sauerstoff und einem chemischen Reduktionsmittel [van de Velde, et al. 1999]. Während die erste Methode stets das Reaktionsvolumen erhöht, erzeugen die letzten beiden stöchiometrische Mengen von Nebenprodukten. Die elektrochemische *in situ* Produktion von Wasserstoffperoxid verläuft dagegen ohne Volumenvergrößerung und quasi nebenproduktfrei<sup>14</sup>.

### 5.1.3 Reaktionstechnische Kenngrößen

Für die Prozessentwicklung sind eine Reihe von Kenngrößen interessant und können als Ziele für den Prozess relevant sein. Dies ist schematisch in Abbildung 5.1.3 dargestellt.

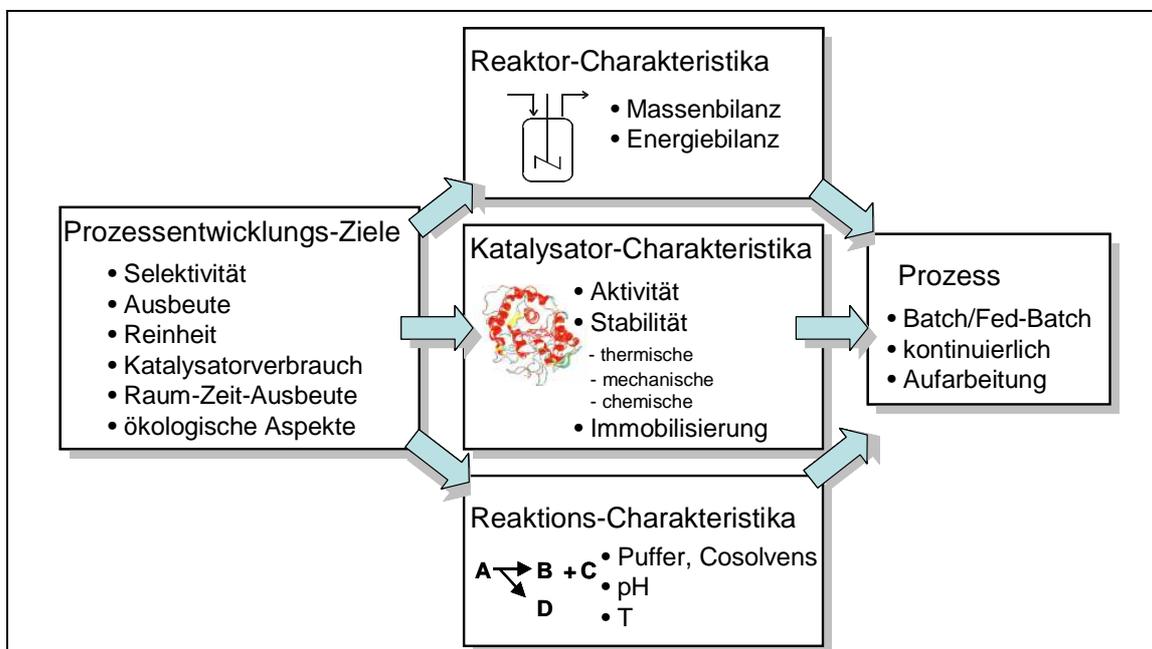


Abbildung 5.1.3: Ziele einer Prozessentwicklung für eine Biotransformation.

Die Selektivität (Stromausbeute) der elektrochemischen Reaktion wurde hinsichtlich Puffer, Cosolvens und Reaktormaterial optimiert (vgl. Kapitel 3). Der Biokatalysator wurde auf seine Aktivität und Stabilität in den unterschiedlichen Puffern und bei unterschiedlichen Cosolvens-Anteilen untersucht (vgl. Kapitel 4). Ebenso kann aber die Massenbilanz des Reaktors und die gewählten Konzentrationen einen Einfluss auf die Produktivität haben. Daher wird im Folgenden ausgehend von den ersten Batch-Versuchen ein optimaler Reaktor identifiziert werden. Schließlich haben die gewählten Prozessparameter Einfluss auf die Produktaufarbeitung.

<sup>14</sup> Das Nebenprodukt ist im Kathodenraum Wasser und im Anodenraum Sauerstoff. Beide sind für den Prozess nicht kritisch.

Als Kenngrößen im Rahmen dieser Untersuchungen sollen nur zwei im Fokus stehen. Nach wie vor sind in vielen Fällen die Kosten für den Biokatalysator hoch im Vergleich zu chemischen Katalysatoren. Insbesondere wegen der Instabilität der CPO soll also Augenmerk auf den Katalysatorverbrauch gelegt werden. Dieser bezieht sich auf die gebildete Stoffmenge Produkt pro verbrauchter Stoffmenge Katalysator und wird ausgedrückt als maximale Zykluszahl ( $ttn^{15}$ ) gemäß Formel 5.1.1.

$$ttn = \frac{n_{\text{Produkt}}}{n_{\text{Katalysator}}} = \frac{\text{tof}}{K_{\text{Des}}} \quad \text{Formel 5.1.1}$$

mit  $\text{tof} = \text{turnover frequency (Wechselzahl)} / \text{min}^{-1}$

$K_{\text{Des}} = \text{Desaktivierungskonstante} / \text{min}^{-1}$

Die höchste  $ttn$ , die mit homogen-löslicher CPO erzielt wurde, beträgt 145.000 (Sensor-kontrolliertes Dosierverfahren) [Seelbach, et al. 1997]. Für immobilisierte CPO, bei der  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch coimmobilisierte Glucose-Oxidase produziert wurde, wird eine  $ttn$  von 250.000 berichtet [van de Velde, et al. 2000].

Als weiteres Kriterium wird die Produktivität des Verfahrens gewählt, da die bisherigen elektroenzymatischen Synthesen gerade hier noch Optimierungspotential haben. Produktivität wird hier angegeben als Raum-Zeit Ausbeute (RZA, Formel 5.1.2), üblicherweise in der Einheit  $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$  angegeben.

$$\text{RZA} = \frac{m_{\text{Produkt}}}{V_{\text{Reaktion}} \cdot t_{\text{Reaktion}}} \quad \text{Formel 5.1.2}$$

In den bisher betriebenen elektroenzymatischen Reaktoren lag die Produktivität in der Größenordnung von  $5 \text{ g L}^{-1} \text{d}^{-1}$  [Brielbeck, et al. 1994]. Für die elektroenzymatische Sulfoxidation wurde eine Produktivität von  $2 \text{ g L}^{-1} \text{d}^{-1}$  erreicht [Lütz 2000]. Für eine erfolgreiche technische Umsetzung eines neuen Verfahrens in der chemischen Industrie wird eine Untergrenze von ca.  $20 \text{ g L}^{-1} \text{d}^{-1}$  angesehen, ab der Firmen eigene Forschung und Entwicklung beginnen [Hauer 2002]. Die Produktivität ist in elektroenzymatischen Synthesen bisher nicht in dem angegebenen Bereich.

<sup>15</sup>  $ttn$ , engl. total turnover number

## 5.2 Versuche mit der rotierenden Ring-Scheiben-Elektrode (RRDE)<sup>16,17</sup>

In einem ersten Versuch der Kombination des elektrochemischen mit dem biokatalytischen Schritt wurden Experimente mit der RRDE durchgeführt. Eine kurze Einführung zur RRDE findet sich in Abschnitt 9.2. Die Rotation der Elektrode führt zu einem hohen konvektiven Transport von Elektrolyt zur Elektrodenoberfläche, daher kann eine Limitierung des Systems durch Diffusion weitgehend ausgeschlossen werden. Zusätzlich ist die RRDE eine gute Methode um kinetische Untersuchungen einer homogenen chemischen Reaktion durchzuführen, da eines der entstehenden Produkte oder unverbrauchten Substrate an der Ring-Elektrode detektiert und über die Variation der Rotationsgeschwindigkeit die Restkonzentration zeitaufgelöst ermittelt werden kann [Albery, Hitchman 1971]. Das untersuchte Reaktionssystem zeigt Abbildung 5.2.1.

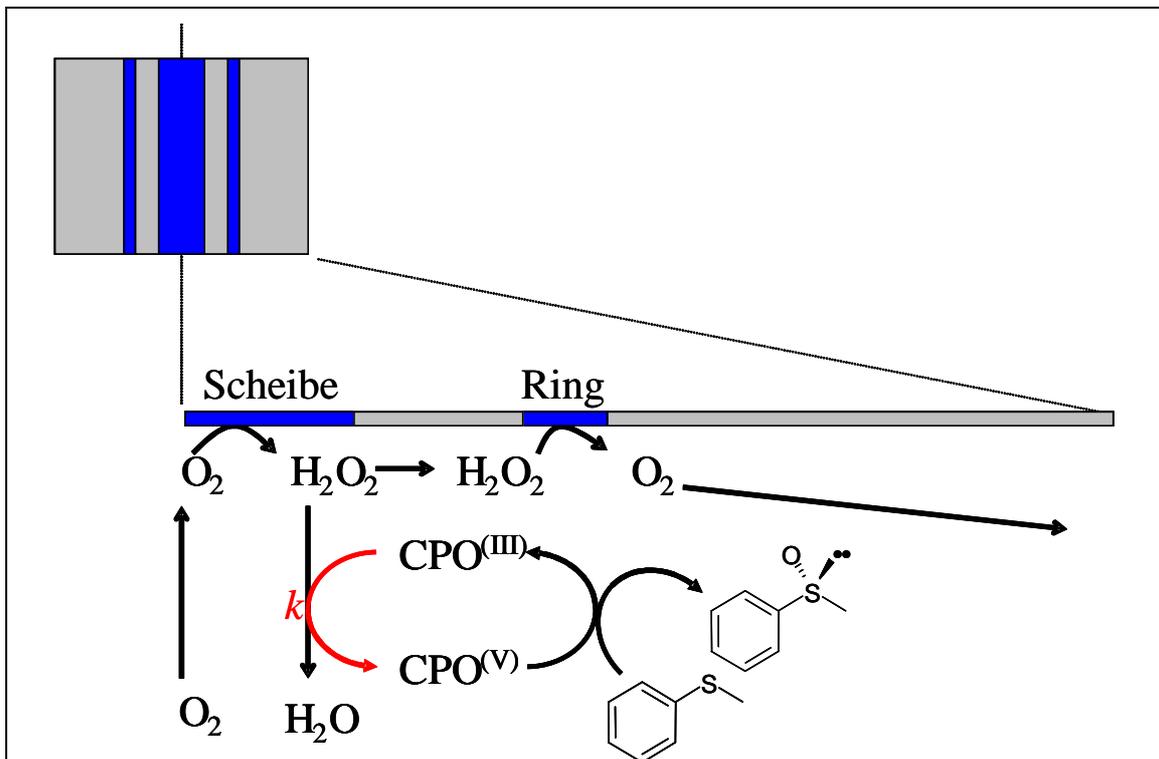


Abbildung 5.2.1: Das an der RRDE untersuchte Reaktionssystem.

<sup>16</sup> RRDE für engl. rotating ring-disc electrode

<sup>17</sup> Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse wurden im Rahmen eines vom Evangelischen Studienwerk Villigst e.V. geförderten Aufenthaltes im Arbeitskreis von Dr. Denuault in Southampton (UK) erzielt.

Eine sauerstoffgesättigte Lösung mit CPO und Thioanisol wird durch Rotation an die Scheibenelektrode (Arbeitselektrode 1) transportiert. Hier wird der Sauerstoff zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduziert und kann nun mit der CPO reagieren. Der nicht reagierte Restanteil wird an der Ringelektrode (Arbeitselektrode 2) detektiert, indem  $\text{H}_2\text{O}_2$  wieder zu  $\text{O}_2$  oxidiert wird (zum detaillierten experimentellen Aufbau vgl. auch Abschnitt 9.2).

Die RRDE stellt eine Methode dar, um die Kinetik einer folgenden homogen-chemischen Reaktion zu untersuchen. Für die kinetische Analyse wird das Verhältnis von Ring- zu Scheibenstrom analysiert, das sogenannte Übertragungsverhältnis  $N_0$  (Formel 5.2.1), analysiert.

$$N_0 = \frac{-i_R}{i_D} \qquad \text{Formel 5.2.1}$$

$i_R$                       Strom an der Ringelektrode / A  
 $i_D$                       Strom an der Scheibenelektrode / A

Das theoretische Übertragungsverhältnis ergibt sich aus dem Verhältnis der Radien der verwendeten Elektrode [Albery, Hitchman 1971] und beträgt 0,226. Wenn sich die Elektrode also nicht dreht, findet man am Ring maximal ca. 23% des gebildeten Wasserstoffperoxids wieder, der Rest geht durch Diffusion in die Lösung für die Messung verloren.

Der Teil an Wasserstoffperoxid, der die Elektrode erreicht ist abhängig von der Rotationsgeschwindigkeit und der ablaufenden Reaktion. Folgt die ablaufende Reaktion einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung, zeigt das  $i_R$  vs.  $i_D$ -Diagramm Geraden, deren Steigung mit steigender Rotationsgeschwindigkeit zunimmt, um sich dem theoretischen  $N_0$ -Wert anzunähern (Abbildung 5.2.2). Aus den Steigungen kann die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion bestimmt werden.

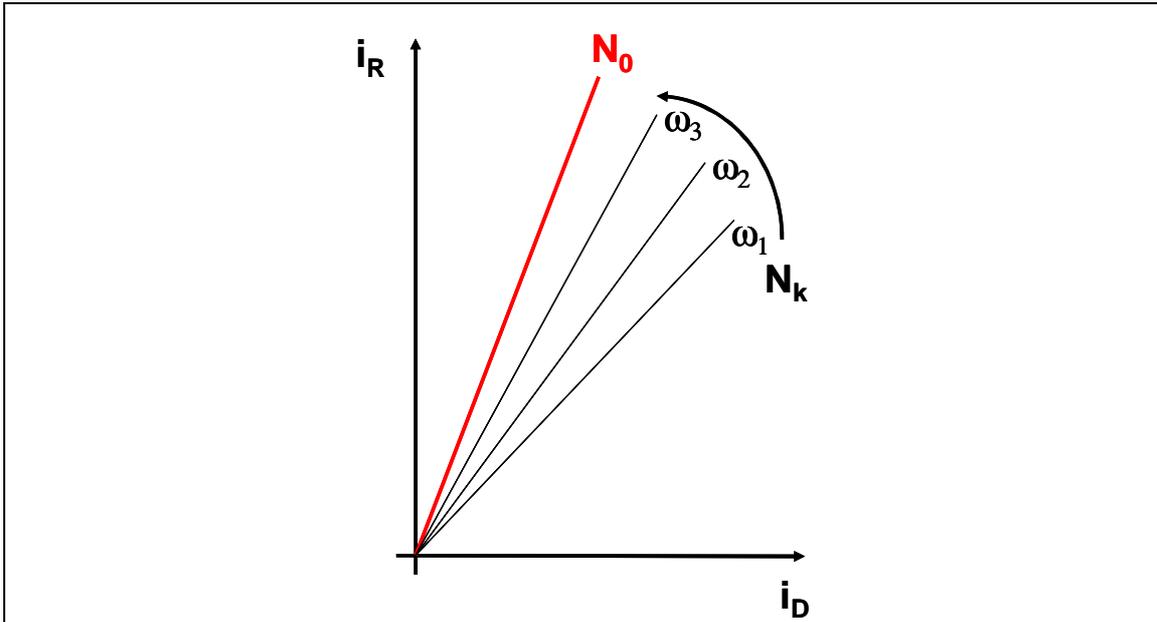


Abbildung 5.2.2 : Kinetikbestimmung einer Reaktion erster Ordnung mit RRDE.

Durch die erhöhte Rotationsgeschwindigkeit verringert sich die Zeit, in der ein Volumenelement der Lösung von der Scheibe zum Ring transportiert wird. Dadurch hat die homogen-chemische Reaktion weniger Zeit das gebildete Reagens zu verbrauchen, ein höherer Ringstrom resultiert.

Verläuft die Folgereaktion nach einem Geschwindigkeitsgesetz zweiter Ordnung, steigt der Ringstrom bei einer bestimmten Rotationsgeschwindigkeit erst an, wenn an der Scheibe mehr Reagens produziert, als durch die Folgereaktion verbraucht wird (Abbildung 5.2.3). Dieser Punkt verschiebt sich mit höheren Rotationsgeschwindigkeiten zu höheren Ringströmen.

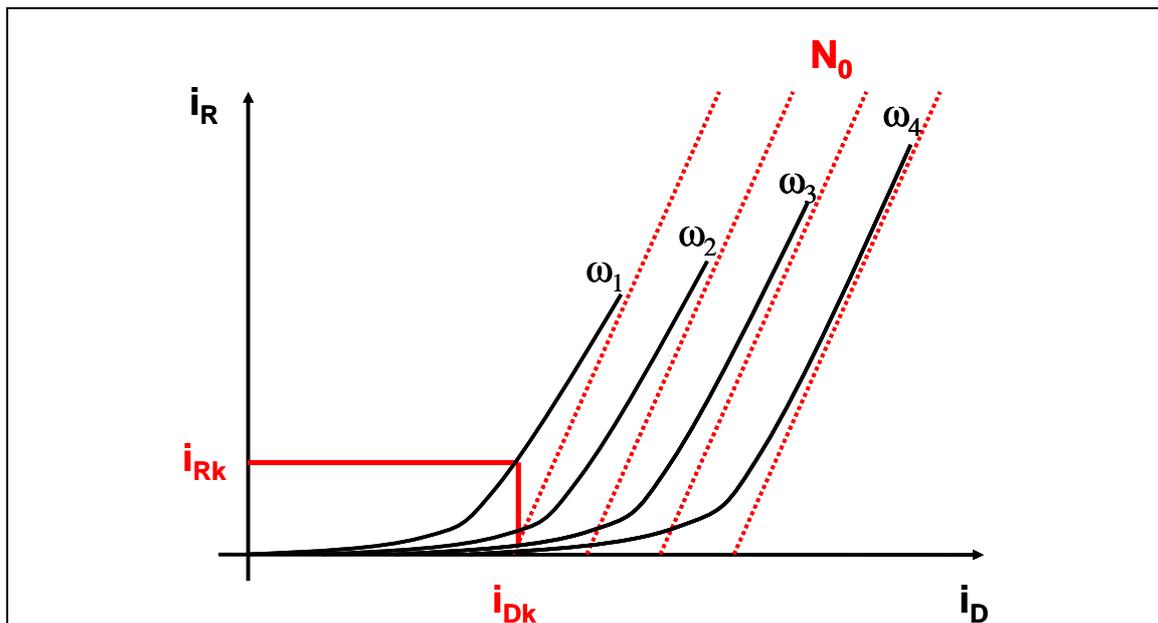


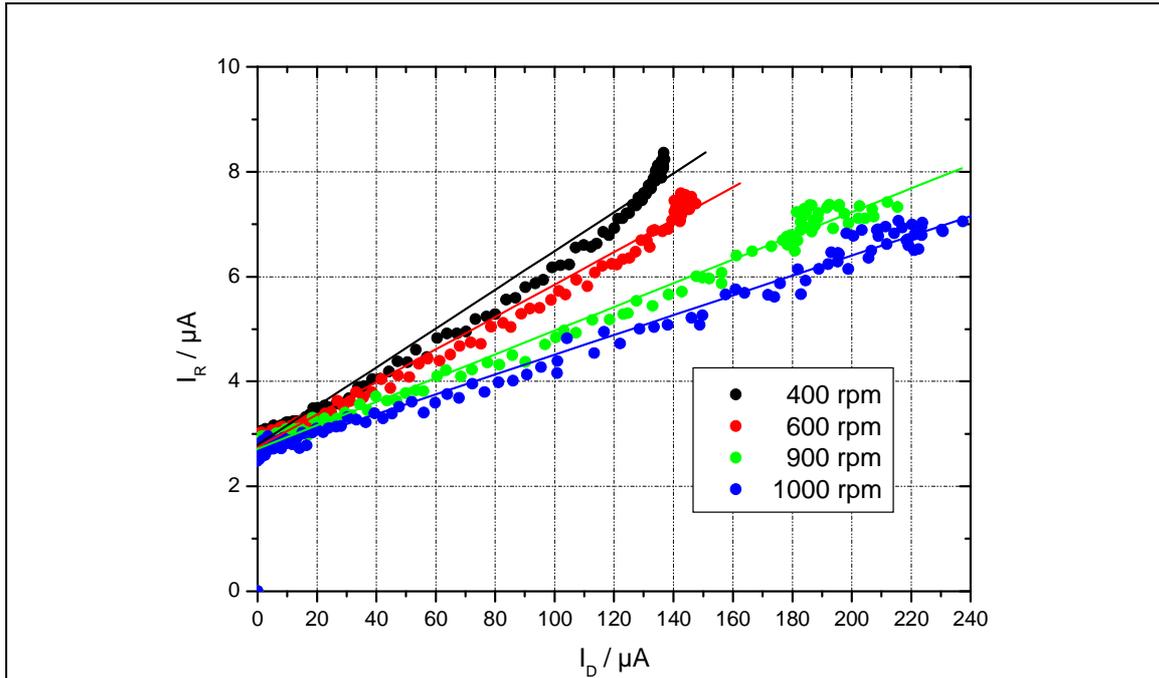
Abbildung 5.2.3 : Kinetikbestimmung einer Reaktion zweiter Ordnung mit RRDE.

$i_{Rk}$  kinetischer Ringstrom

$i_{Dk}$  kinetischer Scheibenstrom

Legt man an die Verläufe Tangenten mit der Steigung  $N_0$  an, kann aus den Schnittpunkten der kinetische Scheibenstrom  $i_{Dk}$  und aus der Messung der dazugehörige kinetische Ringstrom  $i_{Rk}$  ermittelt werden. Aus diesen Wertepaaren kann die Geschwindigkeitskonstante ermittelt werden.

Einzelheiten zur Auswertung finden sich in Abschnitt 9.2 und bei [Albery, Hitchman 1971]. Beide Methoden zur Kinetikmessung basieren auf der Auswertung der  $i_R/i_D$ -Diagramme. Ein solches Diagramm für das Thioanisol/CPO-System zeigt Abbildung 5.2.4.



**Abbildung 5.2.4: Scheibenstrom ( $I_D$ ) und Ringstrom ( $I_R$ ) bei unterschiedlichen Rotationsgeschwindigkeiten.**

Die Geraden entsprechen einem linearen Fit der Daten und sind nur als optische Hilfe eingezeichnet.

100 mM Natriumacetat (pH 5), 50 mM Natriumsulfat, 10 vol% *t*-BuOH, 1 U(MCD) mL<sup>-1</sup> CPO, 20 mM Thioanisol,  $E_D = 0$  bis  $-1500$  mV vs. MMS,  $E_R = +600$  mV vs. MMS, Scheibe glasartiger Kohlenstoff, Ring Gold

Die aufgezeichneten Scheiben- und Ringströme zeigen ein ungewöhnliches Verhalten und stimmen mit den beiden oben beschriebenen Fällen für eine Reaktion erster oder zweiter Ordnung nicht überein. Darüber hinaus sind die absoluten Ströme sehr gering und am Ring wird immer ein Hintergrundstrom gemessen. Dies liegt entweder an Oberflächenreaktionen der Goldelektrode mit dem gelösten Sauerstoff oder dem Thioanisol, da Goldoberflächen eine hohe Affinität zu Schwefelverbindungen haben [Ruan, et al. 1998].

Interessanter ist das Übertragungsverhältnis.  $N_0$  sinkt in der dargestellten Messung mit steigender Rotationsgeschwindigkeit (Tabelle 5.2.1). Hierfür gibt es bislang in der Literatur keine theoretische Erklärung.

Tabelle 5.2.1 Übertragungsverhältnisse bei unterschiedlichen Rotationsgeschwindigkeiten.

Rotationsgeschwindigkeit / rpm	$N_0$
0	0,226
400	0,032
600	0,028
900	0,021
1000	0,017

Eine Reaktion erster oder zweiter Ordnung liegt nicht vor, dies kann aus dem Verlauf der Ströme schon ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung für die Messwerte kann die Annahme einer Reaktion nullter Ordnung sein.

Hierbei kann das sinkende Übertragungsverhältnis durch die "konvektive Verdünnung" erklärt werden. Arbeitet der Katalysator in Sättigung bei maximaler Geschwindigkeit, so steigt bei steigender Rotationsgeschwindigkeit lediglich der Volumenstrom und somit wird der detektierbare  $H_2O_2$ -Anteil weniger. Diese Erklärung kann nicht mathematisch belegt werden, ist aber qualitativ richtig [Bartlett, Denuault 2002].

Zudem wird die Annahme einer gesättigten Katalysators durch die unabhängig bestimmte Enzymkinetik unterstützt (vgl. Abschnitt 4.2.2). Die RRDE-Messung wurde mit 20 mM Thioanisol durchgeführt, dass im verwendeten Puffermedium bis 5 mM gelöst ist. Der  $K_M$ -Wert für Thioanisol liegt bei 1,37 mM, die gelöste Thioanisol-Konzentration also bei ca.  $3,7 K_M$ , dies entspricht ca. 80%  $v_{max}$ . In diesem Bereich hat die Thioanisol-Konzentration kaum noch Einfluß auf die Aktivität. Zudem ändert sich die Thioanisol-Konzentration durch die Messung nur geringfügig. Die Scheibenströme sind im Bereich bis 0,2 mA und die Messung dauert nur wenige Minuten, so dass die produzierte Menge Wasserstoffperoxid in der Größenordnung von  $1 \mu\text{mol}$  liegt.

Der  $K_M$ -Wert bezüglich Wasserstoffperoxid liegt mit 0,55 mM deutlich über der gebildeten Produktmenge, doch kann auch bezüglich des zweiten Substrates von Sättigung ausgegangen werden. An der Scheibe treten lokal hohe Konzentrationen an Wasserstoffperoxid auf<sup>18</sup>, da das Volumen das hier betrachtet wird sehr gering ist. Nimmt man eine Produktion in der Größenordnung von  $1 \mu\text{mol}$  an, entspräche das einer Konzentration an Wasserstoffperoxid von 20 M. In dieser Region müssten sich längst Desaktivierung und Inhibierung bemerkbar machen. Die tatsächliche Produktionsrate und Lokalkonzentration liegt wohl etwas niedriger, aber vermutlich noch über  $K_M$ . Somit ist das Enzym an beiden Substraten gesättigt und arbeitet mit maximaler

<sup>18</sup> Das Volumen der Diffusionschicht über der Scheibe beträgt nur ca.  $0,05 \mu\text{L}$ .

Geschwindigkeit. Durch eine Erhöhung der Rotation wird nur der konvektive Volumenstrom erhöht und die betrachtete Reaktionslösung "verdünnt".

Für eine solche Reaktion nullter Ordnung liefert die Literatur noch keine gelösten Gleichungen, daher können die Messwerte nicht bezüglich der Geschwindigkeitskonstanten der biokatalytischen Folgereaktion ausgewertet werden. Es wird jedoch deutlich, dass das enzymatische System selbst bei der optimalen Versorgung der Elektrode mit "frischer" Elektrolytlösung nicht limitierend ist.

### 5.3 Reaktoren und Begasung

Im Rahmen der Arbeit wurden zwei Arten von Bioreaktoren verwendet. Es wurde eine thermostatisierbare Elektrolysezelle mit Doppelglaswand und eine dreidimensionale Elektrolysezelle entwickelt. Beide Zellen sind geteilte Zellen, der Anolyt und Katholyt sind durch eine Membran getrennt (Abbildung 5.3.1).

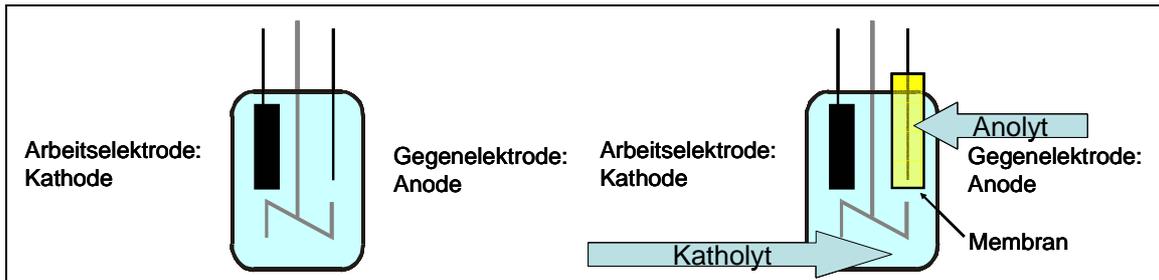


Abbildung 5.3.1: Ungeteilte und Geteilte elektrochemische Zelle.

Die enzymatische Reaktion läuft nur in der Kathoden-Halbzelle ab, hier sind Enzym, Substrat und Produkt gelöst. Damit sind Nebenreaktionen der Komponenten an der Anode ausgeschlossen.

#### 5.3.1 2D-Zelle

Der Batch-Reaktor (Abbildung 5.3.2) besteht aus einem doppelwandigen Glasgefäß und einer Elektrodenhalterung aus Edelstahl.

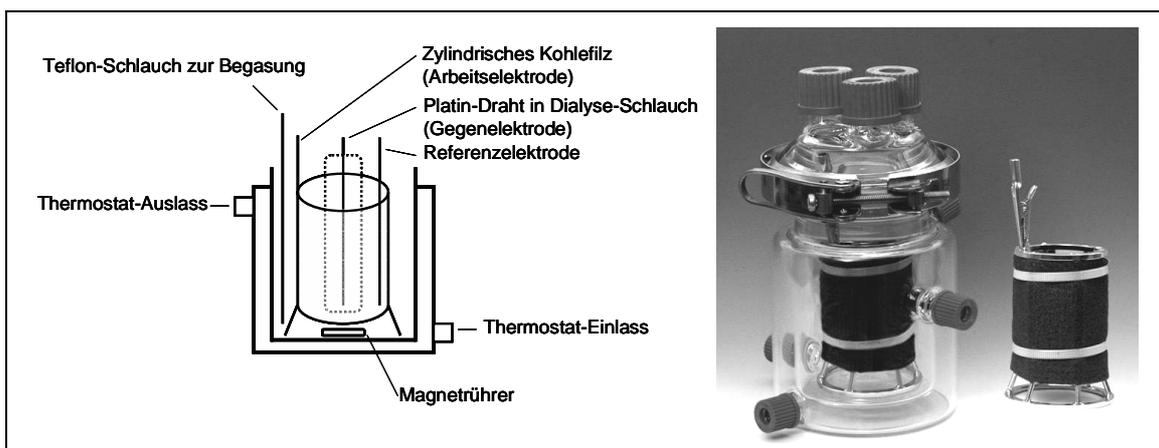


Abbildung 5.3.2: Schemazeichnung und Foto des 2D-Reaktors.

Die doppelte Glaswand ermöglicht eine gute Thermostatisierung. Die Kohlefilz-Elektrode wird auf dem Edelstahl-Gestell fixiert und ist daher gleichmäßig kontaktiert.

Da der Kohlefilz in erster Näherung als flach angesehen wird und nur die oberste Schicht elektrochemisch aktiv ist, wird die Elektrode als 2-dimensional betrachtet und die Zelle als 2D-Reaktor bezeichnet. Kohlefilz-Elektroden werden auch in 3-dimensionalen-Elektroden eingesetzt, die Bestimmung des tatsächlichen Elektroden-Volumens und der aktiven Elektroden-Oberfläche ist jedoch sehr aufwändig [Kato, et al. 2000].

Elektrochemisch ist die Zelle nicht optimal, da durch die Elektrodenanordnung der Abstand zwischen Arbeits- und Gegenelektrode, und damit der Widerstand, sehr groß ist. Es muss eine hohe Zellspannung zwischen 3,5 - 8 V angelegt werden, um das gewünschte Potential von -500 bis -600 mV vs. Ag|AgCl zu erreichen. Die Sauerstoffzuführung erfolgt durch einen Teflon-Schlauch, durch den reiner Sauerstoff direkt in die Lösung eingetragen wird. Hierbei ist die Durchmischung sicher nicht optimal, und die Blasenbildung evtl. schädlich für das Enzym.

### 5.3.2 3D-Zelle<sup>19</sup>

Eine effizientere elektrochemische Zelle zur Sauerstoffreduktion besteht aus einer 3-dimensionalen Elektrode [Vuorilehto, et al. 1995; Tamminen, et al. 1996; Tamminen, Vuorilehto 1997; Vuorilehto, Tamminen 1997]. In der 3D-Zelle ist ein Festbett von Graphitpartikeln gepackt, welches vom Elektrolyten durchströmt wird. Reaktionstechnisch betrachtet liegt ein Strömungsrohr bezüglich der elektrochemischen Reaktion vor. In die Elektrode ragen Silberdrähte, die als Stromableiter benutzt und von außen kontaktiert werden (Abbildung 5.3.3).

---

<sup>19</sup> Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse wurden im Rahmen eines gemeinsamen BASF-Projektes mit Herrn Dr. K. Vuorilehto erzielt.

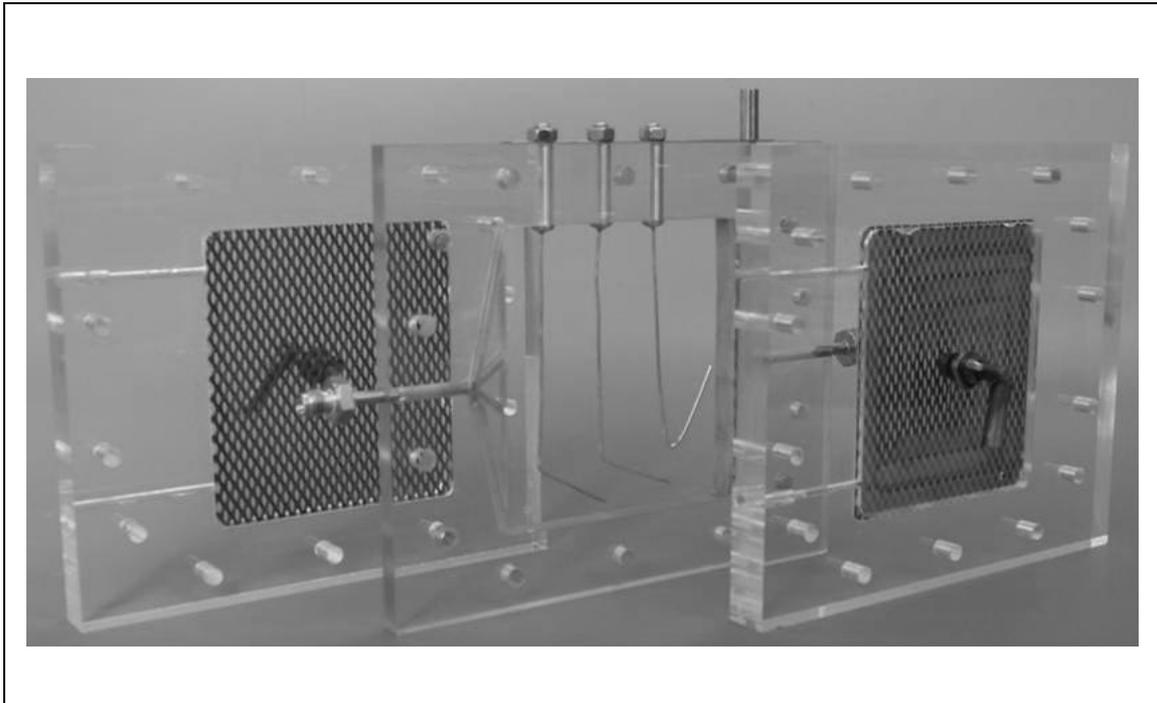


Abbildung 5.3.3: Foto der 3D-Zelle.

Die elektrochemische Zelle im technischen Detail ist in Abbildung 5.3.4 gezeigt.

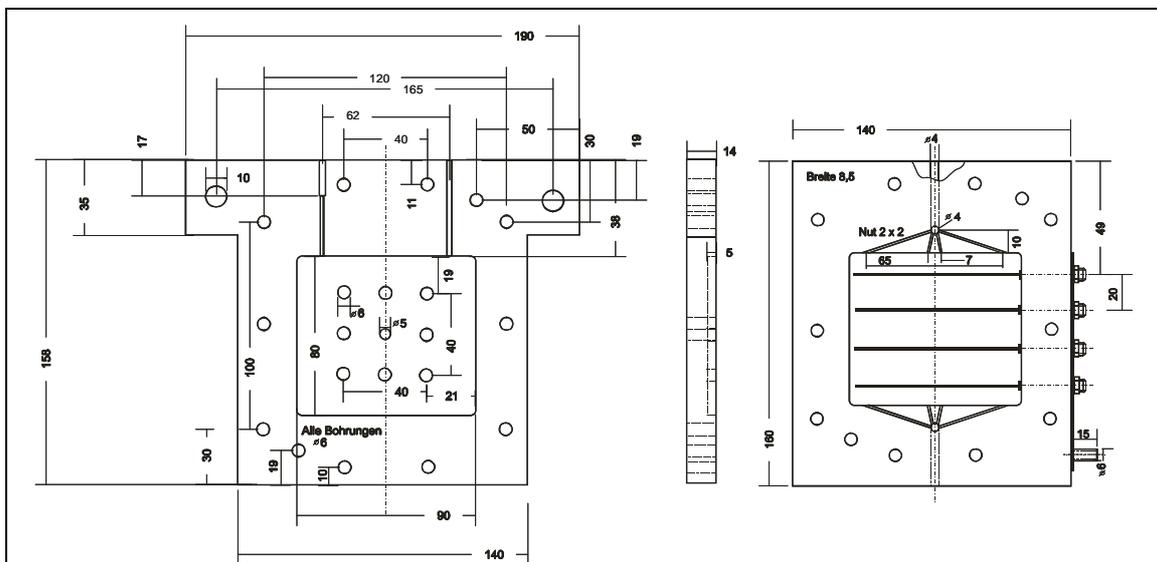


Abbildung 5.3.4: Technische Zeichnung<sup>20</sup> der 3D-Zelle (Anodenteil links, Kathodenteil rechts).

Maßeinheiten in mm

<sup>20</sup> angefertigt von Frau K. Braeker

Die elektrochemische Zelle wird in einen Kreislauf von ca. 100 mL Reaktionsvolumen verwendet, in dem noch ein Rührkessel zur Probenahme, Substratdosierung und Sauerstoffversorgung integriert (Abbildung 5.3.5). Durch diese Anordnung wird je nach Reaktionsführung ein Batch oder Fed-Batch ermöglicht. Die 3-dimensionale Elektrode ist wesentlich effizienter als der Kohlefilz, weil durch die Elektrodenanordnung der Abstand zwischen Kathode und Anode minimal ist, also weniger Spannung durch den Widerstand verloren geht. Trotzdem ergeben sich bei der Einstellung der Zellspannung Schwierigkeiten.

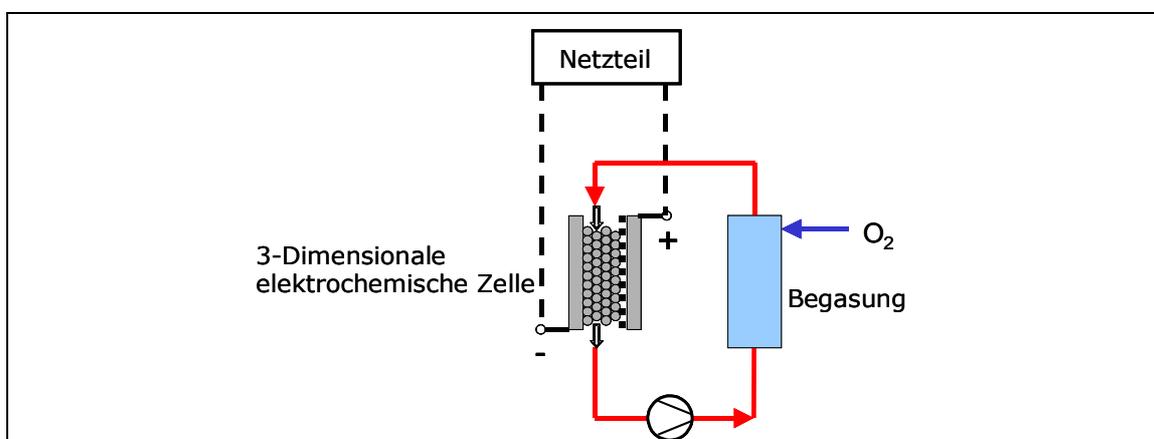


Abbildung 5.3.5: Kreislaufreaktor.

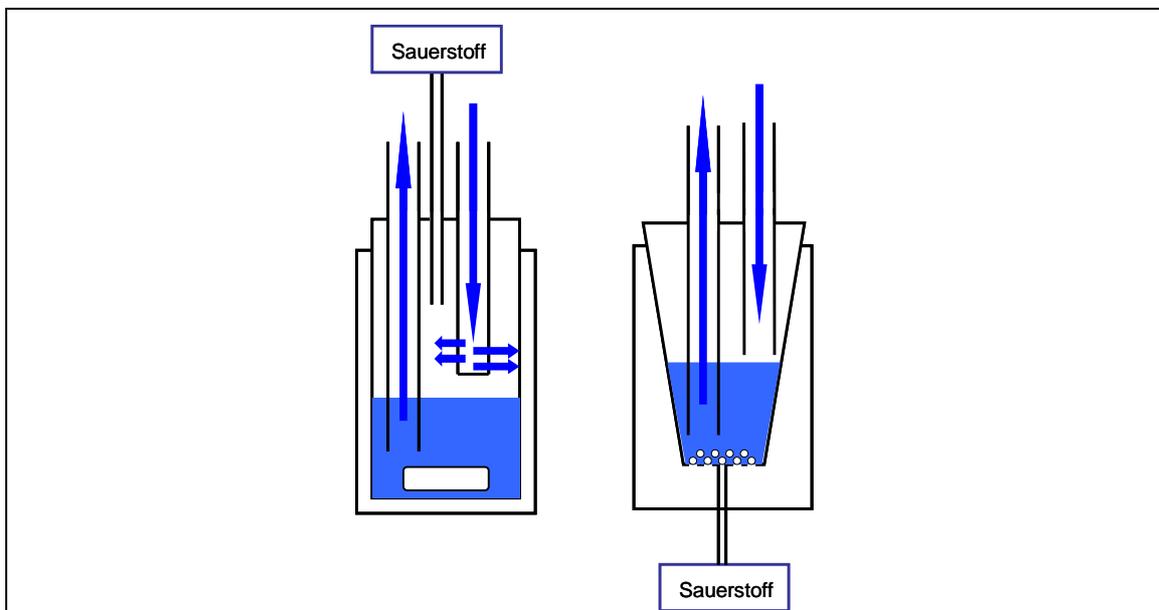
Da in der Zelle keine Referenzelektrode vorgesehen ist, wird nur eine Zwei-Elektroden-Anordnung realisiert. Arbeits- und Gegenelektrode werden an einem Netzgerät angeschlossen und die elektrochemische Reaktion durch die angelegte Spannung (*nicht* Potential) gesteuert.

Ein allgemeines Problem 3-dimensionaler Elektroden ist die nicht gleichmäßige Potentialverteilung, die aus dem IR-Verlust resultiert. Der ionische Strom ( $I$ ) der durch den Elektrolyt (mit dem Widerstand  $R$ ) fließt, verursacht einen Potentialabfall im Elektrolyten und der elektrische Strom, der durch das Elektrodenmaterial fließt, verursacht einen Potentialabfall in der Elektrode. Durch diese Potentialabfälle variiert die Potentialdifferenz zwischen der Elektrode und dem Elektrolyten entlang des Elektrodenbettes [Vuorilehto 1997].

Durch den Strömungsrohr-Charakter der Zelle verarmt die Lösung beim Pumpen durch die Zelle über das Bett an Sauerstoff. Am Eingang der Zelle fließt daher viel Strom und der Potentialabfall ist größer, am Ende des Bettes fließt wenig Strom und der Potentialabfall ist geringer. Diese Differenzen können bis zu einigen 100 mV betragen. Reaktionstechnisch ist die Konsequenz eine möglichst hohe Umpumprate. Die Zelle ist

jedoch nur konstruiert für Volumenströme in der Größenordnung von  $v_{fl} = 100 - 150 \text{ mL min}^{-1}$ . Daher ist es umso wichtiger, dass alle anderen Komponenten im Reaktionsgemisch elektrochemisch inaktiv sind (Kapitel 3), da durch die breite Potentialverteilung elektrochemische Nebenreaktionen nicht ausgeschlossen werden können. Zudem ist es wichtig, die Spannung nicht zu hoch zu wählen, um die kathodische Wasserstoffentwicklung zu vermeiden.

Die Begasung im Kreislaufreaktor kann durch zwei verschiedene Begasungsmodule erfolgen (Abbildung 5.3.6). Der Kopfraum eines Rührkessels wird mit reinem Sauerstoff beaufschlagt. Die Reaktionslösung wird durch einen Schlauch gepumpt, dessen Ende verschlossen, aber zusätzlich mit vielen nadelstichgroßen Löchern versehen ist. Durch diese Löcher wird die Reaktionslösung versprüht und so mit der Gasphase vermischt. Zusätzlich wird die Lösung gerührt, um einen guten Austausch zwischen Gas- und Flüssigphase zu erreichen.



**Abbildung 5.3.6: Begasung der Reaktionslösung im Kreislaufreaktor im Kopfraum (links)<sup>21</sup> und durch eine Glasfritte (rechts).**

Als Alternative kann die Lösung auch direkt durch eine im Boden eines Rührkessels eingelassene Glasfritte mit Sauerstoff begast werden. Der Gasgedruck verhindert dabei, dass Reaktionslösung durch die Fritte tritt. Die Reaktionslösung wird von vielen kleinen Gasblasen durchströmt, und so mit Sauerstoff gesättigt. Die Begasung könnte in beiden Fällen zur Enzymdesaktivierung an der Phasengrenzfläche führen.

<sup>21</sup> Diese Begasung wurde von Herrn Dr. K. Vuorilehto entwickelt und als "Sauerstoff-Dusche" bezeichnet.

Für eine Maßstabsvergrößerung stehen technisch verschiedene Alternativen zur Sauerstoffbegasung zur Verfügung. Neben einem flüsig/gas – Membrankontaktor mit definierter Phasengrenzfläche können auch Gasdiffusionselektroden verwendet werden, die einem Kreuzstrom von Sauerstoff in der elektrochemischen Zelle realisieren.

## 5.4 Batch-Umsetzungen

Mit dem unmodifizierten Enzym und den drei modifizierten Varianten (vgl. 4.3) wird in den beiden beschriebenen elektrochemischen Zellen untersucht, welchen Einfluss die Puffermedien auf die Umsetzung haben.

### 5.4.1 Batch-Umsetzungen in der 2D-Zelle

#### 5.4.1.1 Batch-Elektrolyse mit Citrat-Puffer und 30 vol% tert-Butanol

Da Phosphatpuffer bereits für alle elektrochemischen Versuche ausgeschlossen wurde, wird zunächst eine elektroenzymatische Synthese in Citratpuffer mit hohem *tert*-Butanol Anteil durchgeführt (Abbildung 5.4.1). Dieser Versuch dient als erster Test der 2D-Zelle, und zeigt, dass hier bereits eine RZA von  $30 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  zu erreichen ist.

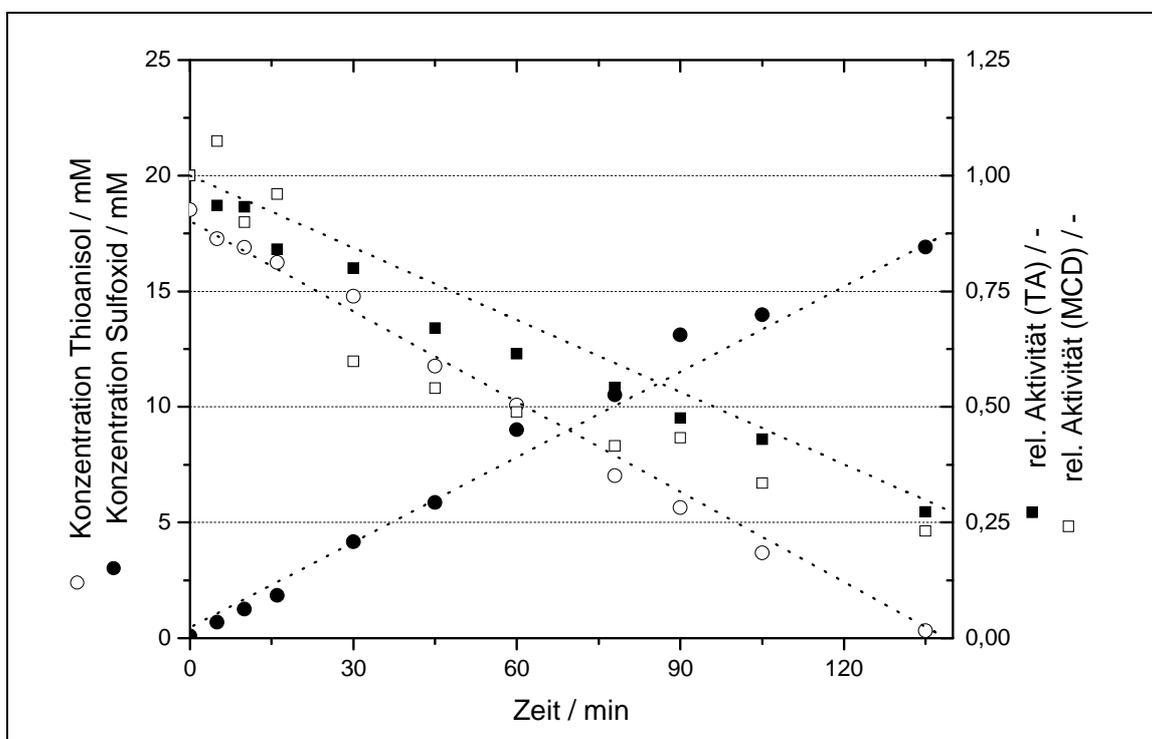


Abbildung 5.4.1: Batch in Citrat-Puffer im 2D-Reaktor.

$V = 300 \text{ mL}$ ,  $100 \text{ mM}$  Natriumcitrat ( $\text{pH } 5$ ),  $30 \text{ vol\% } t\text{-BuOH}$ ,  $74 \text{ cm}^2$  Kohlefilz,  $E = -500 \text{ mV}$  vs.  $\text{Ag|AgCl}$ ,  $\text{CPO } 15 \text{ U(MCD) mL}^{-1}$ ,  $T = 20^\circ\text{C}$ ,  $20 \text{ mM}$  Thioanisol,  $I \sim 180 \text{ mA}$ ,  $\text{RZA } 30 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ,  $ee = 98,6 \%$ ,  $t_{\text{tn}} = 95.000$ ,  $\text{Stromausbeute} = 60 \%$ , Linien nur als optische Hilfe

In einer einfachen gerührten Becherglaszelle wurden bei Entwicklung der elektroenzymatischen Sulfoxidation nur Produktivitäten von  $2 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  erreicht [Lütz 2000]. Die deutlich erhöhte Produktivität im 2D-Reaktor resultiert aus der verbesserten Elektrodenanordnung und der besseren Begasung. Die Lösung wird ständig mit reinem

Sauerstoff durchströmt und gerührt, so dass an jeder Stelle der Elektrode Sauerstoffsättigung herrschen sollte.

Bei Verwendung von Citratpuffer mit 30 vol% *tert*-Butanol-Anteil wird wegen der geringen Leitfähigkeit (vgl. Abschnitt 3.2.2) eine hohe Zellspannung benötigt (5-8 V), um das benötigte Potential an der Arbeitselektrode einzustellen. Außerdem ist das Zellpotential und die erzielbare Stromstärke wegen der suboptimalen elektrochemischen Eigenschaften der elektrochemischen Zelle nicht konstant. Es muss mehrfach am Potentiostaten nachgeregelt werden.

Die Stromausbeute beträgt 60%, was in etwa in der Größenordnung der Vorversuche mit reinem Citrat-Puffer liegt (vgl. Abbildung 3.2.4).

Der Anstieg der Produktkonzentration verläuft linear, da die Reaktion in Wasserstoffperoxid limitiert ist, und die Produktbildungsrate der elektrochemischen Generierungsrate entspricht. Während der Elektrolyse sinkt auch die Enzymaktivität linear und zwar sowohl bezüglich der Halogenase-Aktivität (gemessen mit der MCD-Methode), als auch bezüglich der Peroxidase-Aktivität (gemessen mit dem Thioanisol-Assay). Die Desaktivierung ist irreversibel, auch nach Ende der Elektrolyse wird die Aktivität nicht wieder hergestellt.

### 5.4.1.2 *Batch-Elektrolyse mit Acetat-Puffer und 10 vol% tert-Butanol*

Es wurde gezeigt, dass mit Acetatpuffer höhere Stromausbeuten erzielt werden (vgl. Abbildung 3.2.4) und dass das Cosolvens die Leitfähigkeit senkt (vgl. Abbildung 3.2.3). Unter diesen Reaktionsbedingungen, die Vorteile für den elektrochemischen Schritt bringen, ist es möglich im 2D-Reaktor bei geringerer Zellspannung (~ 4 V) ein stabiles Potential von -600 mV an der Arbeitselektrode zu etablieren. Das Potential schwankt weniger und der Stromfluss liegt relativ konstant bei 200 mA.

Die Produktbildungsrate ist etwas höher verglichen mit dem ersten Batch. Der verringerte Cosolvens-Anteil führt zur Bildung einer Emulsion. Im Reaktor liegen während der ganzen Reaktion Tröpfchen des Substrates vor. Durch sensorische Prüfung kann auch in diesem Fall nach der Reaktion noch deutlich Substrat am Kohlefilz nachgewiesen werden. Auch durch mehrmaliges Waschen mit organischem Lösungsmittel verbleibt der charakteristische Geruch im Kohlefilz. Die Substratkonzentration und deren Verlauf lässt sich nicht exakt bestimmen (Abbildung 5.4.2).

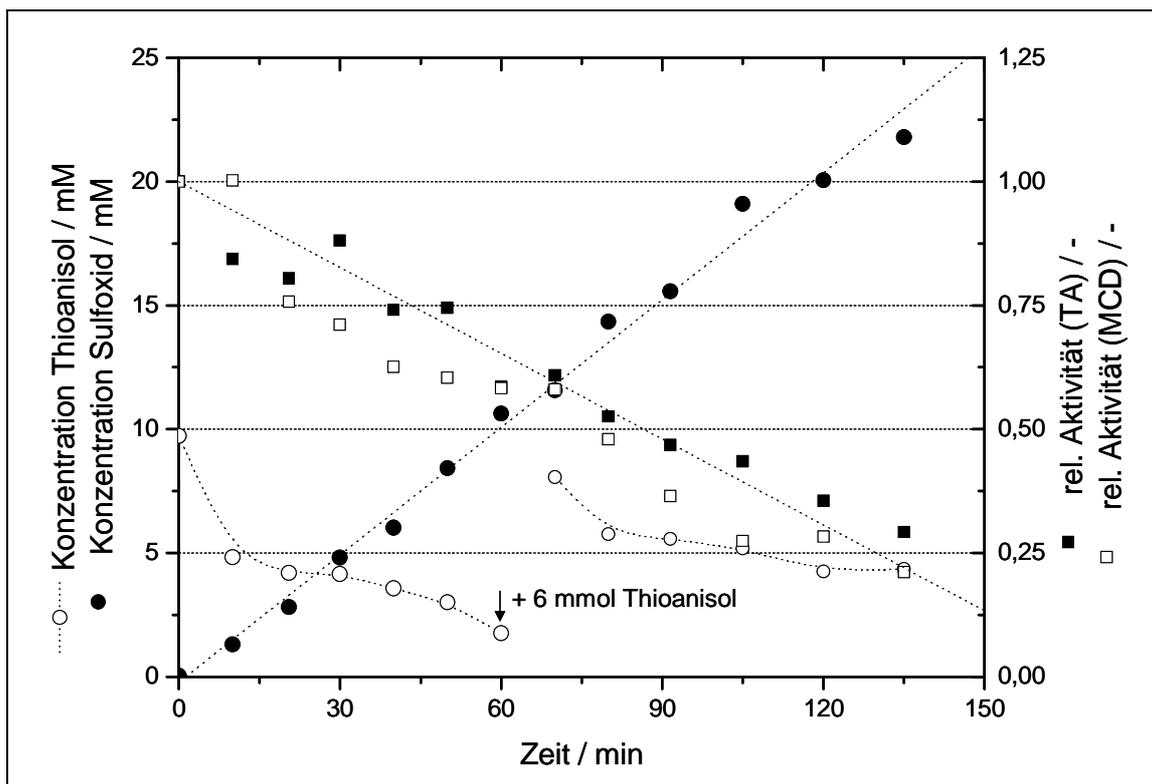


Abbildung 5.4.2: Batch in Acetat-Puffer im 2D-Reaktor.

$V = 300$  mL, 100mM Natriumacetat (pH 5), 50 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 10 vol% *t*-BuOH,  $T = 20^\circ\text{C}$ ,  $74\text{ cm}^2$  Kohlefilz,  $E = -600\text{mV vs. Ag|AgCl}$ ,  $I = \sim 200$  mA, CPO 15 U(MCD)  $\text{mL}^{-1}$ , 20mM Thioanisol Start, 20 mM Thioanisol nachdosiert (60 min.),  $\text{RZA} = 33,6\text{ g L}^{-1}\text{ d}^{-1}$ ,  $ee = 98,7\%$ ,  $ttn = 120.000$ , Stromausbeute = 70%, Linien nur als optische Hilfe

Eigentlich sollte sich die Thioanisol-Konzentration beim Grenzwert der Löslichkeit stabilisieren, da es zugleich verbraucht und aus den Emulsionströpfchen nachgelöst wird. Um jedoch eine Enzymdesaktivierung durch zu geringe Substratverfügbarkeit auszuschließen, wurden nach 60 Minuten noch einmal 6 mmol Substrat dosiert.

Die Stromausbeute liegt bei 70 %. Dies ist unerwartet, weil unter den verwendeten Reaktionsbedingungen deutlich bessere elektrochemische Eigenschaften erreicht werden sollten. Da keine Nebenprodukte auftreten, wird mehr Strom für die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Wasser verwendet. Dies kann an der Verwendung von Kohlefilz statt der Graphitkugeln liegen (die Stromausbeute im reinen Puffer war in der 3D-Zelle gemessen worden), am Zusatz des *tert*-Butanols oder der Veränderung der Elektrodenoberfläche durch das Substrat. Auch nach mehrfachem Waschen mit Reaktionsmedium und organischem Lösungsmittel lassen sich sensorisch noch deutlich Substratreste im Filz feststellen.

Der Enzymverbrauch ( $ttn = 120.000$ ) ist geringer als im Batch mit Citratpuffer, da mehr Produkt mit der gleichen Menge Enzym dargestellt wurde.

## 5.4.2 Batch-Umsetzungen mit modifizierter CPO

### 5.4.2.1 Reaktionen im 2D-Reaktor

Die in Abschnitt 4.3 vorgestellten chemischen Enzymmodifikationen werden zum Test in einer elektroenzymatischen Synthese im 2D-Reaktor eingesetzt.

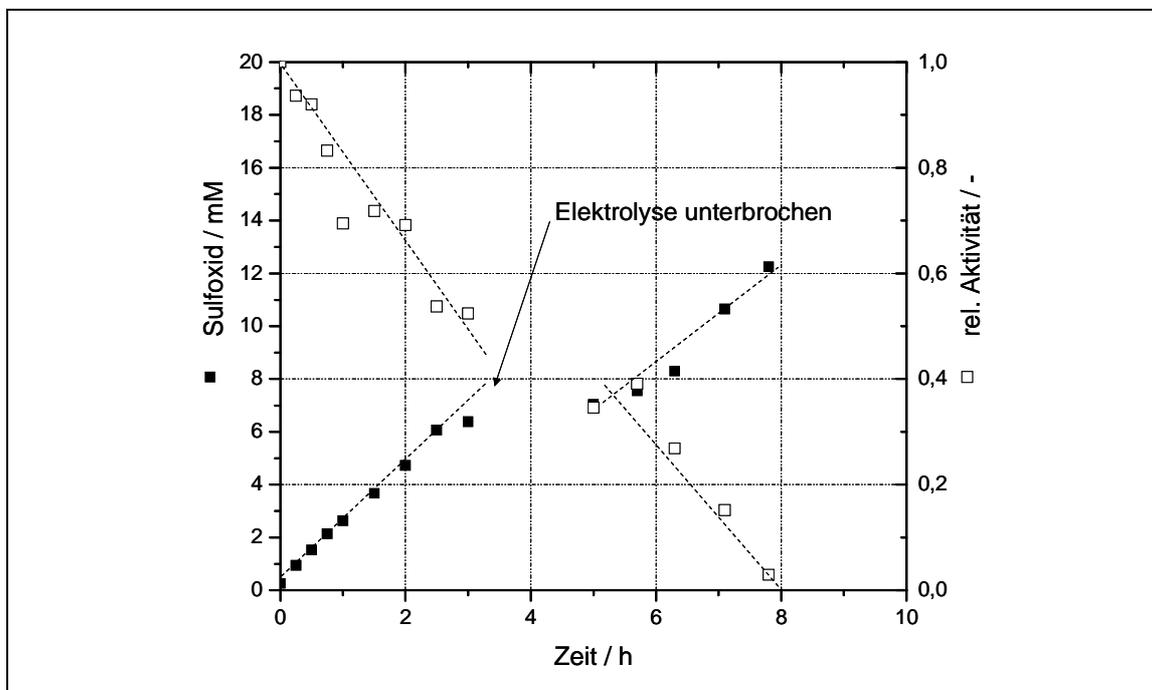


Abbildung 5.4.3: Batch mit EDAC-CPO in 2D-Zelle.

100 mM Natriumacetat (pH5), 50 mM Natriumsulfat, 10 vol% *t*-BuOH, 20 mM Thioanisol-Emulsion, T = 20 °C, 74 cm<sup>2</sup> Kohlefilz, E = -600 mV vs. Ag|AgCl, I ~ 100 mA, 0,34 mg EDAC-CPO, RZA(max) = 10,6 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, ttn (geschätzt) = 44.000, Stromausbeute = 74 %, ee > 98,5 %, Linien als optische Hilfen

Bei Verwendung der EDAC-CPO nimmt die Enzymaktivität während der Elektrolyse wie auch bei der nativen CPO linear mit der Zeit ab (Abbildung 5.4.3). Nach 3,5 Stunden wurde die Elektrolyse durch Abschalten der Zellspannung unterbrochen, um den durch eine defekte Klammer am Dialyseschlauch leer gelaufenen Anodenraum wieder mit Puffer aufzufüllen. Danach setzt sich die Elektrolyse (ab 5,5 h) mit gleicher Produktions- und Desaktivierungsrate fort. Die Stromausbeute liegt mit 74% erneut unter dem theoretisch möglichen Wert für das Puffermedium.

Die chemisch modifizierte CPO hat ihre Enantioselektivität behalten, da vorwiegend (*R*)-Sulfoxid gebildet wird (ee > 98,5 %). Die Reaktionsstabilität kann nur geschätzt werden, da nicht bekannt ist, ob durch die Quervernetzungsreaktion auch höhere Aggregate entstanden sind, durch die sich eventuell das Verhältnis von katalytischen Zentren zur Molmasse verschoben hat. Ausgehend von der Bestimmung des

Proteingehaltes der Enzymlösung und der bekannten Molmasse der CPO berechnet sich die *ttn* zu 44.000. Dies liegt deutlich unter dem Wert für die native CPO.

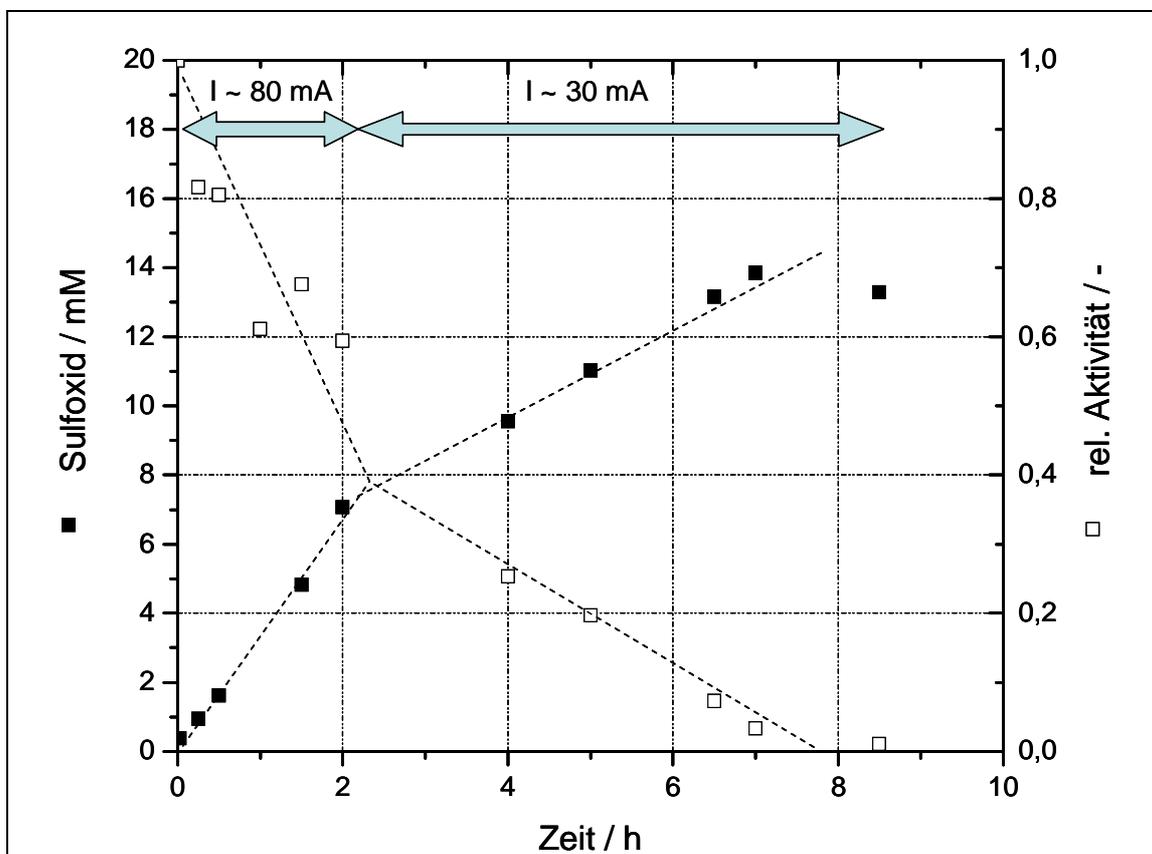


Abbildung 5.4.4: Batch mit Glut-CPO in 2D-Zelle.

100 mM Natriumacetat (pH5), 50 mM Natriumsulfat, 10 vol% *t*-BuOH, 20 mM Thioanisol-Emulsion, T = 20 °C, 74 cm<sup>2</sup> Kohlefilz, E = -600 mV vs. Ag|AgCl, I ~ 80 mA (ab 2 h ~ 30 mA), 0,34 mg Glut-CPO, RZA(max) = 11,9 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, *ttn* (geschätzt) = 49.000, Stromausbeute = 80%, ee > 98,5 %, Linien als optische Hilfen

Die Glut-CPO zeigt ebenso wie die EDAC-CPO eine konstante Desaktivierung während der Elektrolyse (Abbildung 5.4.4). Nach 2 Stunden Elektrolysedauer ändert sich ohne Änderung des Potential die Stromstärke, so dass die Produktionsrate an Wasserstoffperoxid und damit die Sulfoxid-Bildung deutlich abnimmt. Der Grund hierfür liegt in Problemen mit der Sauerstoffversorgung. Mit der Produktbildungsrate sinkt ebenso die Desaktivierungsrate.

Die Abschätzung des Enzymverbrauchs ergibt eine *ttn* von 49.000, die Selektivität ist wie auch bei der EDAC-CPO unverändert gegenüber der nativen CPO.

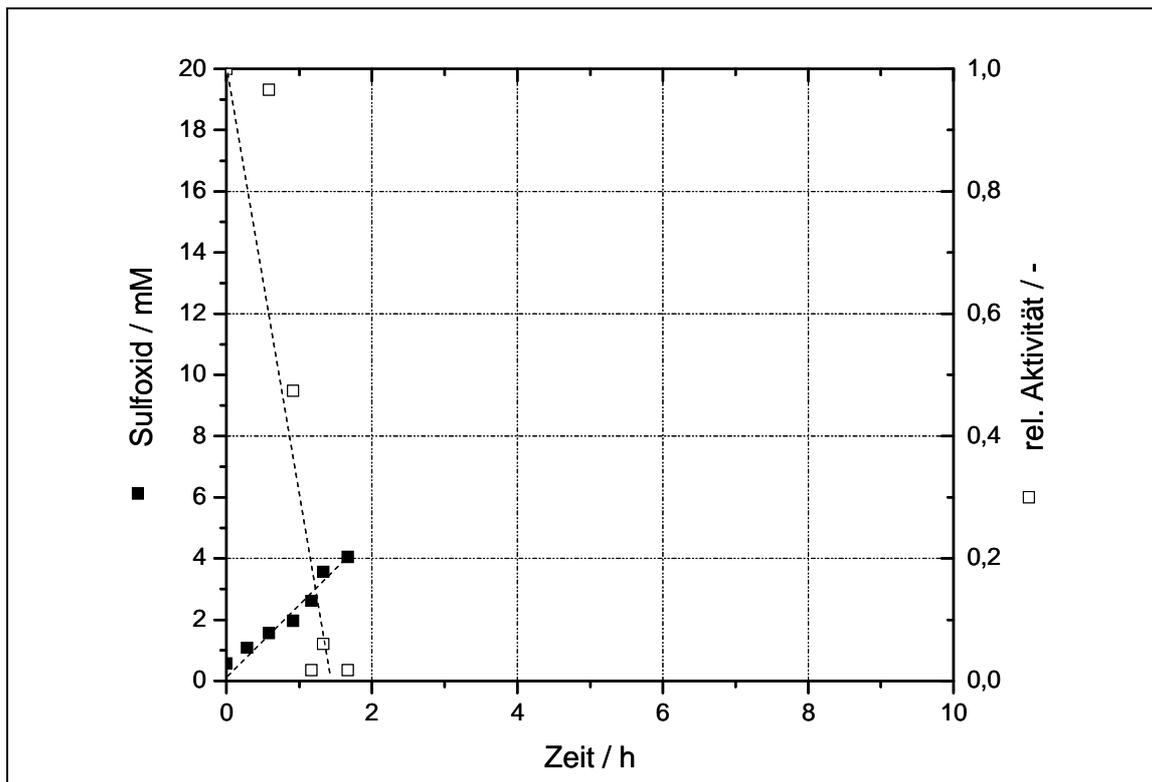


Abbildung 5.4.5: Batch mit 9A-CPO in 2D-Zelle.

100 mM Natriumacetat (pH5), 50 mM Natriumsulfat, 10 vol% *t*-BuOH, 20 mM Thioanisol-Emulsion, T = 20 °C, 74 cm<sup>2</sup> Kohlefilz, E = -600 mV vs. Ag|AgCl, I ~ 80 mA, 0,34 mg 9A-CPO, RZA = 9,0 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, ttn (geschätzt) = 15.000, Stromausbeute = 40%, ee = 77 %, Linien als optische Hilfen

Innerhalb der ersten 2 Stunden ist die 9-Anthraldehyd-modifizierte CPO schon vollständig desaktiviert. Daher ergibt sich eine *ttn* von nur 15.000. Danach wird die Elektrolyse abgebrochen. Schon während der Reaktion findet man neben dem (*R*)-Sulfoxid auch in geringen Mengen (*S*)-Sulfoxid und Sulfon. Dies spricht dafür, dass die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildungsrate höher als die Rate der enzymatischen Reaktion ist und damit unselektive Nebenreaktionen ablaufen. Auch kann das Enzym durch die Modifikationsreaktion an Selektivität eingebüsst haben. Das Produkt nach 2 Stunden hat nur einen ee von 77 %. Die Stromausbeute liegt mit 40 % deutlich niedriger als in den beiden anderen Versuchen mit modifizierter CPO, obwohl die elektrochemischen Parameter identisch sind.

#### 5.4.2.2 Zusammenfassung

Die modifizierten Enzympräparationen zeigen insgesamt geringere Reaktionsstabilitäten als das native Enzym. Insbesondere 9A-CPO desaktiviert sehr schnell unter diesen Reaktionsbedingungen. Die 9A-Modifikation dient einer Hydrophobizitätserhöhung, da jedoch im Elektrolyten geringe Anteile an organischem Lösungsmittel verwendet werden müssen, hat diese Modifikation hier keinen Vorteil. EDAC- und Glut-CPO

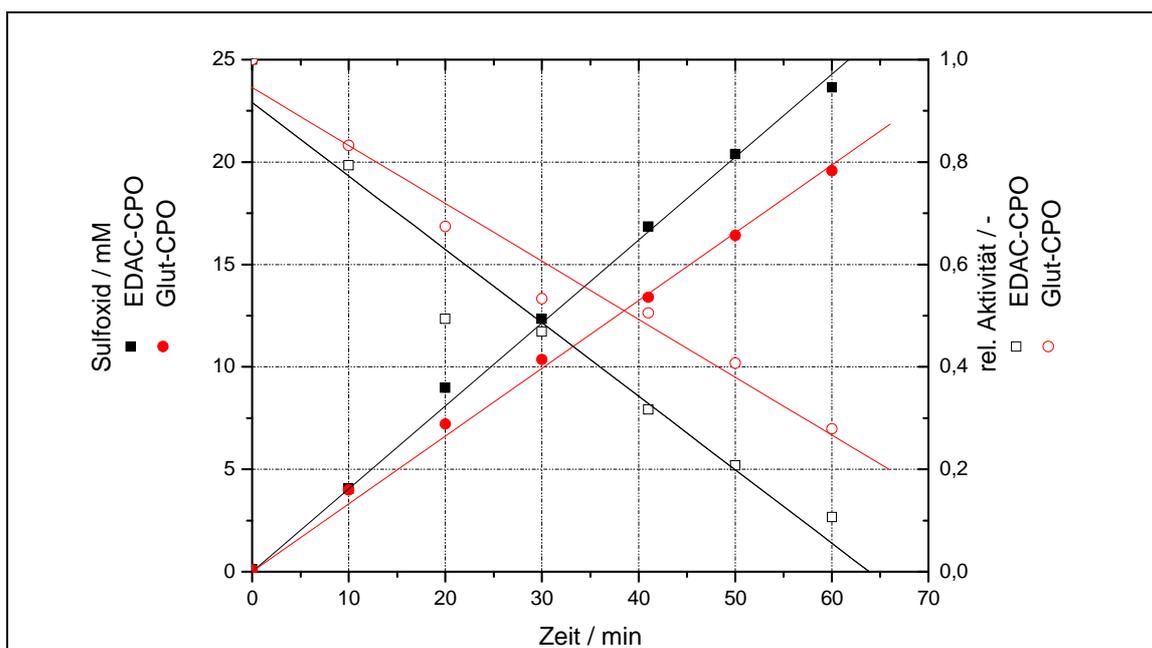
wären erst von Vorteil, wenn Prozesse bei höheren Temperaturen durchgeführt werden. Diese beiden Enzym-Präparationen behalten ihre hohe Enantioselektivität.

In den ersten 2 Stunden ist die Produktionsrate in allen drei Batchreaktionen gleich. Das zeigt, dass die Präparation der Elektrode und Vorbereitung des 2D-Reaktors reproduzierbar möglich ist. In allen Fällen liegt die Stromausbeute unterhalb der für den Puffer möglichen Werte.

Deutlich ist, dass unabhängig vom verwendeten Puffersystem und eingesetzter Enzympräparation immer eine mit der Produktbildung korrelierte Desaktivierung des Enzyms zu beobachten ist. Diese Desaktivierung lässt sich auf den oxidativen Abbau der Porphyrin-Gruppe des Häm-Enzyms durch das Oxidationsmittel zurückführen [van Deurzen, et al. 1997c] (vgl. Abschnitt 5.1.2). Auf diese Desaktivierungsreaktion hat die Quervernetzung anscheinend keinen oder sogar einen negativen Einfluß.

#### 5.4.2.3 Reaktionen im 3D-Reaktor

Da 9A-CPO sich als nicht stabil genug unter den Reaktionsbedingungen gezeigt hat, werden im 3D-Reaktor nur noch EDAC- und Glut-CPO eingesetzt (Abbildung 5.4.6).



**Abbildung 5.4.6: Batch-Reaktionen mit Glut-CPO und EDAC-CPO im 3D-Reaktor.**

100 mM Natriumacetat (pH 5), 50 mM Natriumsulfat, 10 vol% *t*-BuOH, 50 mM Thioanisol-Emulsion, T = 25 °C, 1,9 V Zellspannung, I = 160 mA, O<sub>2</sub>-Begasung durch Fritte, Linien als optische Hilfe

EDAC-CPO: Stromausbeute = 55%, ttn = 23.000, ee = 98,8 %, RZA = 77,4 g L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>

Glut-CPO: Stromausbeute = 46%, ttn = 20.000, ee = 99 % RZA = 66,0 g L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>

Hier zeigt sich ein geringer Unterschied in der Produktivität. Da die Zellspannung in beiden Fällen gleich war kann hierfür keine Begründung angeführt werden. Insgesamt liegt die erzielte Produktivität deutlich über der im 2D-Reaktor.

Die Selektivität ist in beiden Fällen hoch, die Stromausbeute jedoch nur mittelmäßig. Eventuell findet unter diesen Bedingungen schon eine deutliche Wasserstoffproduktion statt. Die Enzymausnutzung ist jedoch in beiden Fällen geringer als im 2D-Reaktor.

### 5.4.3 Regulierung der Reaktionsrate

Da die Batch-Reaktion bezüglich des  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Fed-Batch verlaufen kann durch eine Veränderung der elektrochemischen Bildungsrate die Reaktionsgeschwindigkeit geregelt werden. Ein erster Versuch hierzu wurde im 2D-Reaktor durchgeführt (Abbildung 5.4.7).

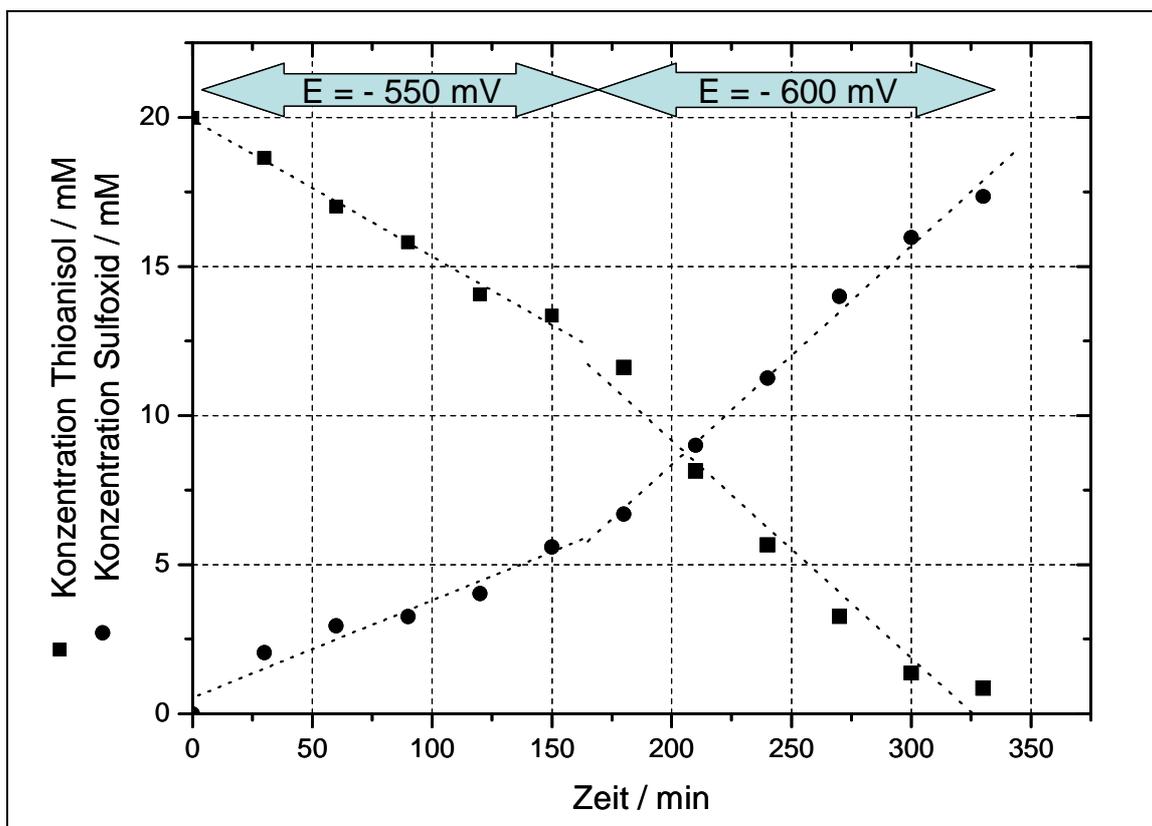


Abbildung 5.4.7: Regulierung der Reaktionsrate in 2D-Zelle.

$V = 190 \text{ mL}$ ,  $100 \text{ mM}$  Natriumcitrat ( $\text{pH } 4$ ),  $30 \%$   $t\text{-BuOH}$ ,  $40 \mu\text{L}$  CPO-Lösung ( $\sim 10 \text{ mg mL}^{-1}$  Protein),  $20 \text{ mM}$  Thioanisol,  $74 \text{ cm}^2$  Kohlefilz,  $E = -550 \text{ mV}$  ( $0\text{-}150 \text{ min}$ ) /  $-600 \text{ mV}$  ( $150\text{-}330 \text{ min}$ ) vs.  $\text{Ag}|\text{AgCl}$ ,  $\text{RZA} = 7,5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1} / 14,4 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ,  $ee = 98,3 \%$ ,  $\text{Stromausbeute} = 80 \%$ ,  $\text{ttn}$  nicht anwendbar, Linien als optische Hilfe

Bei Batch-Reaktionen nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit im Reaktionsverlauf durch Substratverarmung ab. Da in diesem Fall das Enzym im Überschuss vorliegt und die gesamte Reaktion Wasserstoffperoxid-limitiert abläuft, kann im Gegensatz zu unlimitierten Batch-Reaktionen auch bei fortgeschrittener Reaktion die Reaktionsgeschwindigkeit gesteigert werden.

Da bei dieser Reaktion nur die Machbarkeit überprüft wurde, wurde eine aus mehreren Reaktionen gesammelte Restmenge Enzym verwendet. Da in dieser Präparation desaktiviertes und noch aktives Protein gemischt vorliegen, es sich aber nur um eine erste Testreaktion handelt, wurde die Enzymcharge nicht weiter charakterisiert und daher auch kein Enzymverbrauch errechnet.

Die Regulierung kann jedoch auch so gewählt werden, dass im Verlaufe der Reaktion die Reaktionsgeschwindigkeit gesenkt wird. Hierzu wird im 3D-Reaktor die Zellspannung von 1,8 V auf 1,7 V herabgesetzt, wodurch die Stromstärke und damit die Reaktionsgeschwindigkeit halbiert werden (Abbildung 5.4.8).

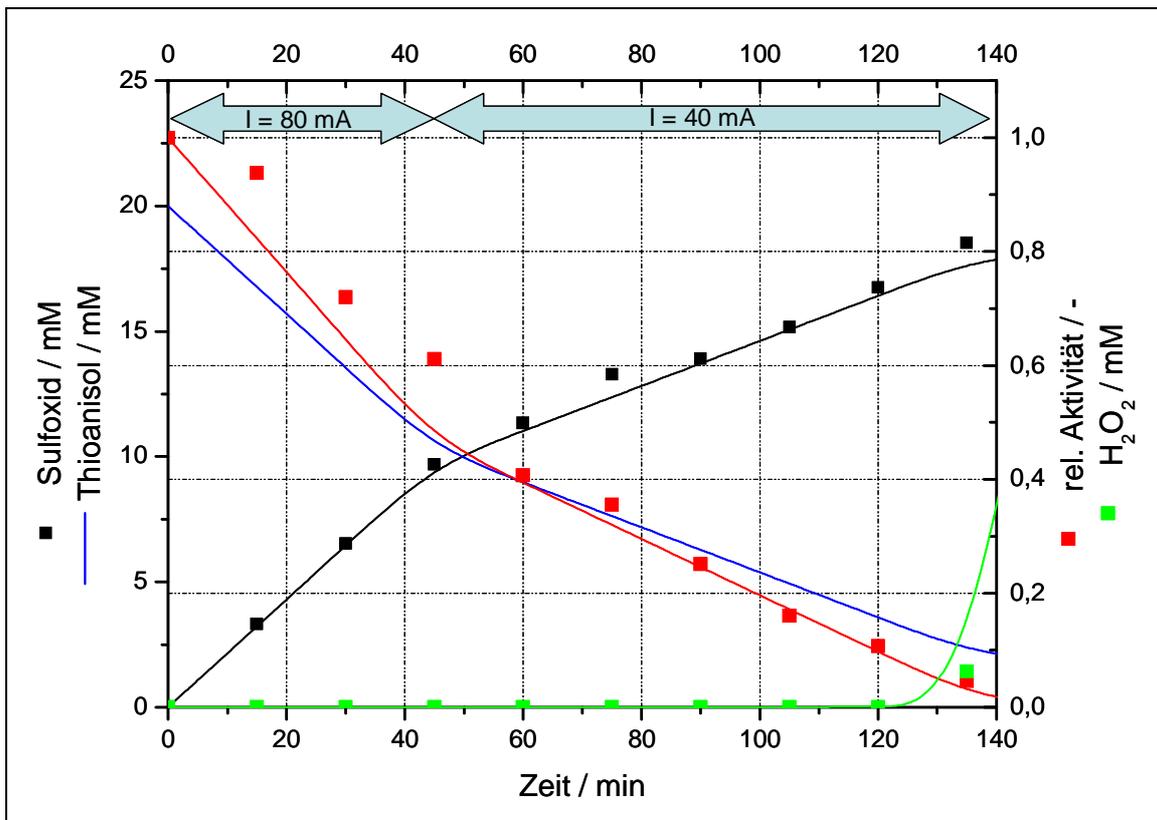


Abbildung 5.4.8: Regulierung der Reaktionsrate in 3D-Zelle.

100 mM Natriumacetat (pH 5), 50 mM Natriumsulfat, 30 vol% *t*-BuOH, 20 mM Thioanisol, 8,5 U (MCD) mL<sup>-1</sup> CPO, Desulco-Graphit (1,0-1,4 mm), ttn = 140.000, ee = 98,2 %, Punkte Messwerte, durchgezogene Linien als Ergebnis der Simulation

0-45 min: 1,8 V Zellspannung, I = 80 mA, RZA = 43 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, Stromausbeute = 86,6 %

45-140 min: 1,7 V Zellspannung, I = 40 mA, RZA = 20 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, Stromausbeute = 79,0 %

Der vorliegende Versuch kann mittels der in Abschnitt 4.2.2.1 beschriebenen kinetischen Gleichungen (vgl. Formel 4.2.2 und Formel 4.2.6 bis Formel 4.2.8) und der Massenbilanz [Levenspiel 1999; Liese, et al. 2000] für einen Fed-Batch (Formel 5.4.1 bis Formel 5.4.3) simuliert werden.

$$-\frac{dc(\text{Thioanisol})}{dt} = v \quad \text{Formel 5.4.1}$$

$$\frac{dc(\text{Sulfoxid})}{dt} = v \quad \text{Formel 5.4.2}$$

$$-\frac{dc(\text{H}_2\text{O}_2)}{dt} = v + f \quad \text{Formel 5.4.3}$$

Mit  $v$  = Reaktionsgeschwindigkeit / mM min<sup>-1</sup>

$f$  = Produktionsrate / mM min<sup>-1</sup>

Das verwendete Modell ist ausführlich in Abschnitt 9.1 wiedergegeben, die Parameter sind in Tabelle 5.4.1 aufgeführt.

**Tabelle 5.4.1 Parameter zur Simulation der regulierten Batch-Reaktion.**

$v_{\max} / \text{U mg}^{-1}$	$K_{M,\text{H}_2\text{O}_2} / \text{mM}$	$K_{i,\text{H}_2\text{O}_2} / \text{mM}$	$K_{M,\text{Thioanisol}} / \text{mM}$
$5655 \pm 1167$	$0,55 \pm 0,17$	$0,78 \pm 0,25$	$1,37 \pm 0,23$
$k_{\text{kor},v_{\max}}$			
$-0,291 \pm 0,017$			
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildungsrate			
0-45 min	$0,2 \text{ mM min}^{-1}$		
45-140 min	$0,1 \text{ mM min}^{-1}$		

Als wesentliches Element wird in das Modell eine konstante Desaktivierung des Enzyms integriert (Formel 5.4.4).

$$\frac{dn(\text{CPO})}{dt} = -\frac{m(\text{Sulfoxid})}{k} \quad \text{Formel 5.4.4}$$

Mit  $k$  = Faktor zwischen Produkt und CPO / mg min mM<sup>-1</sup>

Dies trägt der bisher in allen Batch Reaktionen beobachteten Tatsache Rechnung, dass die CPO-Aktivität immer linear abnimmt. Diese Desaktivierung ist unabhängig vom verwendeten Reaktor, Cosolvens-Zusatz oder Puffer immer proportional zur Produktbildung. Gerade im regulierten Batch sieht man, dass bei Halbierung der Reaktionsrate auch die Desaktivierungsrate halbiert wird.

Die Enzymdesaktivierung muss daher eine mechanistische Ursache haben. Bei der biokatalytischen Reaktion wird pro gebildeter Stoffmenge Produkt unweigerlich eine zu ihr proportionale Menge Enzym desaktiviert.

---

Es besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass Compound I zu einer nicht mehr aktiven Spezies zerfällt (vgl. 5.1.2). Diese Zerfallsreaktion ist in erster Näherung abhängig von der Konzentration an Compound I, also der Menge an aktiviertem Enzym. Die Reaktion des zu oxidierenden Substrates ist gewissermassen die "Rettungsreaktion", die den aktivierten Komplex vor der Desaktivierung bewahrt (Abbildung 5.4.9).

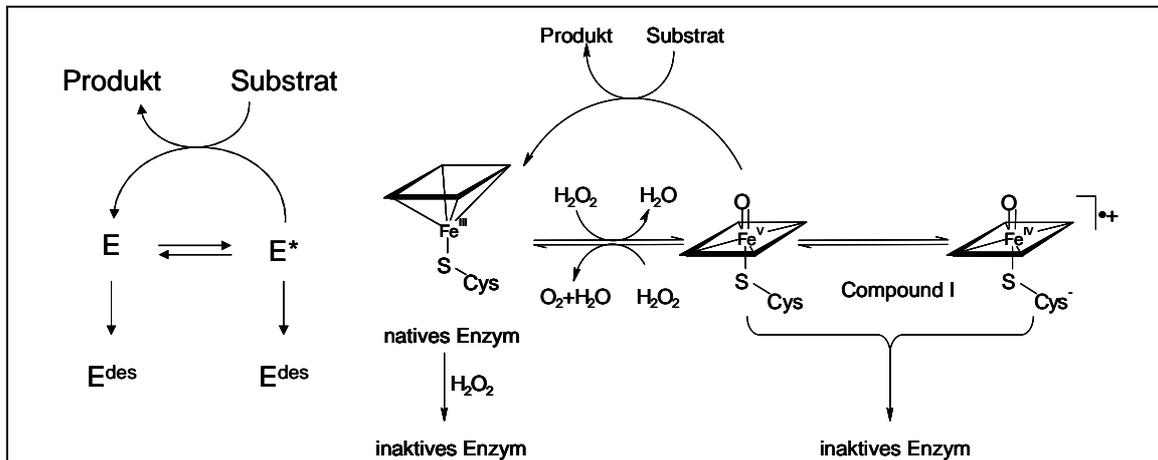
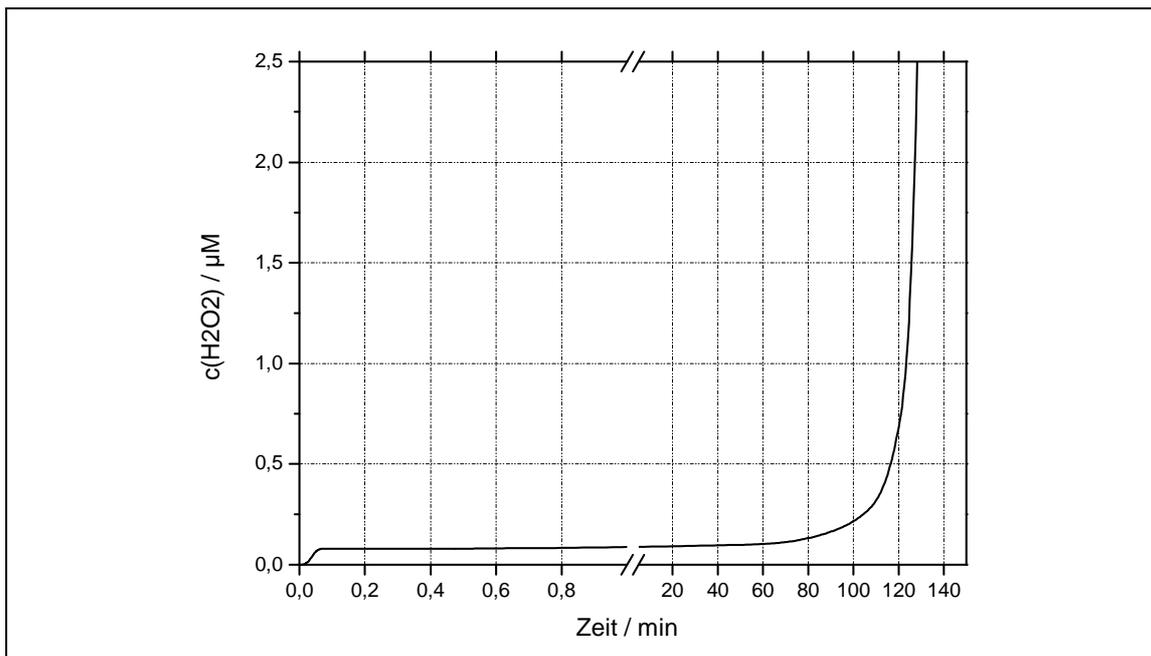


Abbildung 5.4.9: Schematische (links) und mechanistische (rechts) Darstellung der Desaktivierung während der Reaktion.

Abhängig vom eingesetzten Substrat und dessen Fähigkeit mit Compound I abzureagieren wird das aktivierte Enzym wieder in den Grundzustand überführt. Daher gibt es für gelöste CPO einen nicht zu übertreffenden Maximalwert der  $t_{90}$ , der abhängig vom Substrat ist. Mit dieser Desaktivierungsreaktion lassen sich die gemessenen Werte ausgezeichnet simulieren. Für die Simulation wurde eine  $t_{90}$  von 140.000 angenommen, die mit der aus eingesetzter Enzymmenge und gemessener Produktmenge errechneten und dem in der Literatur beschriebenen Maximalwert für Thioanisol übereinstimmt.

Das verwendete Modell gibt neben dem Konzentrationsverlauf für das Produkt und der Enzym-Desaktivierung auch die Wasserstoff-Peroxid-Konzentration richtig wieder. Somit kann aus der unabhängig bestimmten Kinetik die analytisch nicht messbare Stationärkonzentration an Wasserstoffperoxid errechnet werden (Abbildung 5.4.10). Zu Beginn der Reaktion steigt die Wasserstoffperoxidkonzentration zunächst auf einen Wert von ca.  $0,08 \mu M$  an. Dieser Wert ist extrem niedrig, so dass die beschriebene Grunddesaktivierung (vgl. Abschnitt 5.1.2) vollständig vernachlässigt werden kann. Im Verlauf der Reaktion bleibt die Stationärkonzentration im submikromolaren Bereich. Erst bei unterschreiten einer gewissen Restaktivität an Enzym gegen Ende der Reaktion steigt die  $H_2O_2$ -Konzentration schlagartig an und das Enzym "vergiftet" sich selbst.



**Abbildung 5.4.10: Verlauf der Wasserstoffperoxid-Konzentration während der Reaktion.**

Der dargestellte Konzentrationsverlauf gibt die Ergebnisse der Simulation von Abbildung 5.4.8 in anderer Skalierung wieder

Nach 120 Minuten liegt die Konzentration im Bereich von  $1\mu\text{M}$ , bei 140 Minuten beträgt die Konzentration bereits  $350\mu\text{M}$ . Zum Zeitpunkt wo die Wasserstoffperoxid-Akkumulation beginnt ist die komplette Desaktivierung des Enzyms nur durch Nachdosieren frischer Enzymlösung zu überwinden. Dies wird in einem Fed-Batch Experiment (vgl. Abschnitt 5.5.2) durchgeführt.

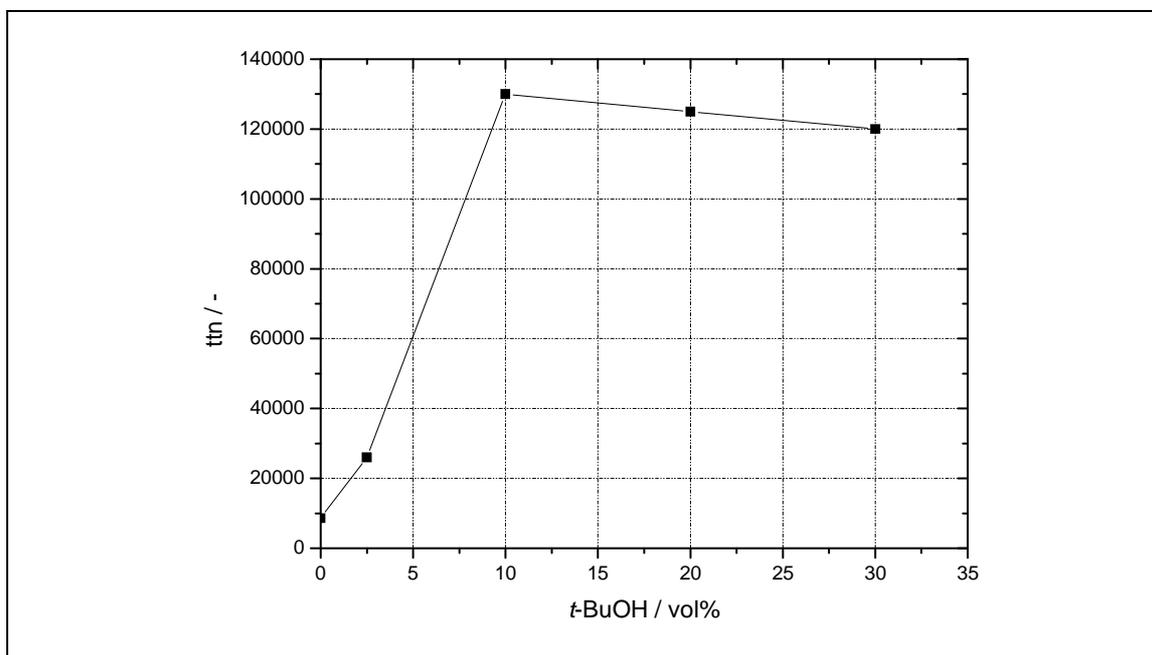
#### 5.4.4 Veränderung der *tert*-Butanol-Konzentration<sup>22</sup>

In Kapitel 4 wurde dargelegt, dass ein Zusatz von *tert*-Butanol als stabilisierend für das Enzym betrachtet wird. Variiert man in den elektroenzymatischen Batch-Reaktionen den *tert*-Butanol Anteil, so findet man, dass ab einem Gehalt von 10 vol% sich die *ttn* nicht mehr steigern lässt (Abbildung 5.4.11, [Vuorilehto 2003]). Bei geringen *tert*-Butanol-Zusätzen ist die Substratverfügbarkeit für das Enzym zu gering und daher findet man höhere Enzymverbräuche.

Auch diese Ergebnisse bestätigen die o.g. Annahme, dass es einen substratspezifischen Maximalwert der *ttn* gibt. Trotz Verwendung unterschiedlicher Puffer, unterschiedlicher *tert*-Butanol-Konzentrationen, unterschiedlicher Dosiersysteme und verschiedener

<sup>22</sup> Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse wurden im Rahmen eines gemeinsamen BASF-Projektes mit Herrn Dr. K. Vuorilehto erzielt.

Reaktoren wird für die Thioanisol-Oxidation mit homogen-löslicher CPO maximal eine  $t_{tn}$  von ca. 140.000 erreicht.



**Abbildung 5.4.11:  $t_{tn}$  bei Elektrolysen mit unterschiedlichem  $t$ -BuOH Gehalt.**

$V = 90$  mL, 100 mM Natriumacetat (pH 5), 50 mM Natriumsulfat, Zellspannung 1,7 - 1,8 V,  $I = 80$  mA, Desulco Graphit (1,0-1,4 mm), 9,5 U(MCD) mL<sup>-1</sup> CPO

In erster Näherung und unter Vernachlässigung der Kinetik lässt sich das Phänomen auch beschreiben als das Verhältnis von Produktbildung und Desaktivierung. Da beide Reaktionen (mit unterschiedlichen Konstanten) von der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration abhängen ist das Verhältnis, wenn beide Reaktionen dieselbe Ordnung haben, konstant.

$$t_{tn} = \frac{\text{Produktbildung}}{\text{Desaktivierung}} \approx \frac{k_1 \cdot c(\text{H}_2\text{O}_2)}{k_2 \cdot c(\text{H}_2\text{O}_2)} = \text{konstant} \quad \text{Formel 5.4.5}$$

Die Ergebnisse sind also mit den Überlegungen zum Desaktivierungsmechanismus konsistent.

Für immobilisierte CPO ist eine  $t_{tn}$  von 250.000 berichtet [van de Velde, et al. 2000]. Ein Grund hierfür kann nicht gefunden werden, zumal die chemische Modifikation im Rahmen dieser Arbeit keine verbesserte Stabilität gezeigt hat.

#### 5.4.5 Zusammenfassung der Batch-Reaktionen

Die bisher durchgeführten Reaktionen sind in Tabelle 5.4.2 zusammengefasst. In den durchgeführten Batch-Reaktionen zeigt sich, dass die modifizierten Enzym-Präparationen nicht so stabil sind wie die native CPO. Die  $t_{tn}$  liegt durchweg niedriger, und zwar unabhängig vom eingesetzten Reaktor. Es zeigt sich hier der Unterschied zwischen Lager- und Reaktionsstabilität. Beim Inkubieren mit Cosolvens oder bei

höheren Temperaturen sind die modifizierten Enzyme stabiler, im Reaktor nicht. Insgesamt liegen die maximalen Zykluszahlen in der Größenordnung der für die sensor kontrollierte Dosierung berichteten 145.000 [Seelbach, et al. 1997].

Die Enantioselektivität ist mit Ausnahme der 9A-CPO ebenso hoch wie bei den Dosiervverfahren. In allen Fällen wird ein *ee* von > 98,2% erreicht. Die leichten Schwankungen sind im Rahmen der Messgenauigkeit.

**Tabelle 5.4.2 Ergebnisse der Batch-Reaktionen im 2D- und 3D-Reaktor**

	RZA / g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	<i>ttn</i> / -	Produkt/ mM	<i>ee</i> / %	Stromausbeute / %
2D, Citrat	30,0	95.000	17	98,6	60
2D, Acetat	33,6	120.000	22	98,7	70
2D, EDAC	10,6	44.000	12	98,5	74
2D, Glut	11,9	49.000	14	98,5	80
2D, 9A	9,0	15.000	4	77	40
3D, EDAC	77,4	23.000	20	98,8	55
3D, Glut	66,0	20.000	23	99	46
2D, Regelung	7,5 / 14,4	n.a.	17	98,3	80
3D, Regelung	20 / 43	140.000	18	98,2	86 / 79

In der 3D-Zelle wird durch die deutlich verbesserten elektrochemischen Eigenschaften eine höhere Produktivität erreicht, maximal 77,4 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

Die Stromausbeute ist im Fall von Citrat ein wenig höher als der Wert für den reinen Puffer, die Abweichung liegt jedoch im Rahmen der Messgenauigkeit. Ansonsten wird maximal eine Stromausbeute von 86% erreicht. Die verringerte Stromausbeute ist eventuell auf eine zu hohe Substratkonzentration an der Elektrodenoberfläche zurückzuführen. Durch Verringerung des Cosolvens-Anteils wird der elektrochemische Schritt effizienter wegen der Leitfähigkeit, jedoch die Reaktion insgesamt wegen der Emulsionsbildung etwas unselektiver. Dies ist jedoch nicht erheblich, da das Nebenprodukt der elektrochemischen Nebenreaktion (Wasser) nicht stört.

Das Cosolvens *tert*-Butanol stabilisiert das Enzym nicht in der Reaktion. Es inhibiert das Enzym (vgl. Abbildung 4.2.7). Durch die erhöhte Substratlöslichkeit wird bei Zusatz des Cosolvens lediglich eine zusätzliche Desaktivierung durch Substratverarmung ausgeschlossen. Die Inhibierung führt bei nicht limitierten Batchreaktionen zu längeren Reaktionszeiten, was den Eindruck erweckt, das Enzym sei länger stabil. Die in der längeren Zeit produzierte Produktmenge ist jedoch gleich der bei kürzeren Reaktionszeiten mit weniger Cosolvens.

## 5.5 Produktion

Aus den Erkenntnissen der Batch-Reaktionen soll das am besten geeignete Verfahren identifiziert werden, um mit hoher Produktivität das Sulfoxid darzustellen. Der wichtigste zu beachtende Punkt ist hierbei der Biokatalysator und dessen intrinsische Desaktivierung während der Reaktion.

Technisch ist es möglich durch Integration eines Membranmoduls sowohl den 2D-Reaktor (zusätzlich wäre hier noch eine Pumpe zur Etablierung eines Kreislaufes nötig) als auch den 3D-Reaktor als EEMR kontinuierlich zu betreiben. Arbeitet man im CSTR bei einem Betriebspunkt hoher Produktivität so resultiert zwangsläufig eine hohe Enzymdesaktivierung. Dann wird es nötig, große Mengen Protein während der Reaktion nachzudosieren, und zwar proportional zur Produktmenge. Dies führt rasch zum Verblocken der Membran und ansteigen des Transmembran-Druckes. Bereits mit dem sensor kontrollierten Dosierverfahren wurde der EMR als nicht gut geeignet dargestellt [Seelbach 1997].

Kinetisch ist ein CSTR sinnvoll, falls eine Substratinhibierung vorliegt. Bezüglich Thioanisol ist dies nicht der Fall und das inhibierende Substrat  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird *in situ* erzeugt und liegt daher nur in geringen Konzentrationen vor. Mögliche Gewinne an Produktivität können aber die erhöhte Desaktivierung und die technischen Probleme nicht aufwiegen. Daher wird ein CSTR nicht in Betracht gezogen.

Ein Strömungsrohr-Reaktor mit einer immobilisierten Enzympräparation wird ebenfalls nicht in Betracht gezogen. Der erhöhte Aufwand zur Heterogenisierung kann technisch nicht gerechtfertigt werden. In den Modifizierungsreaktionen wurde keine erhöhte Reaktionsstabilität gefunden. Selbst bei erhöhter Reaktionsstabilität müsste noch enorm viel Katalysator ausgetauscht werden.

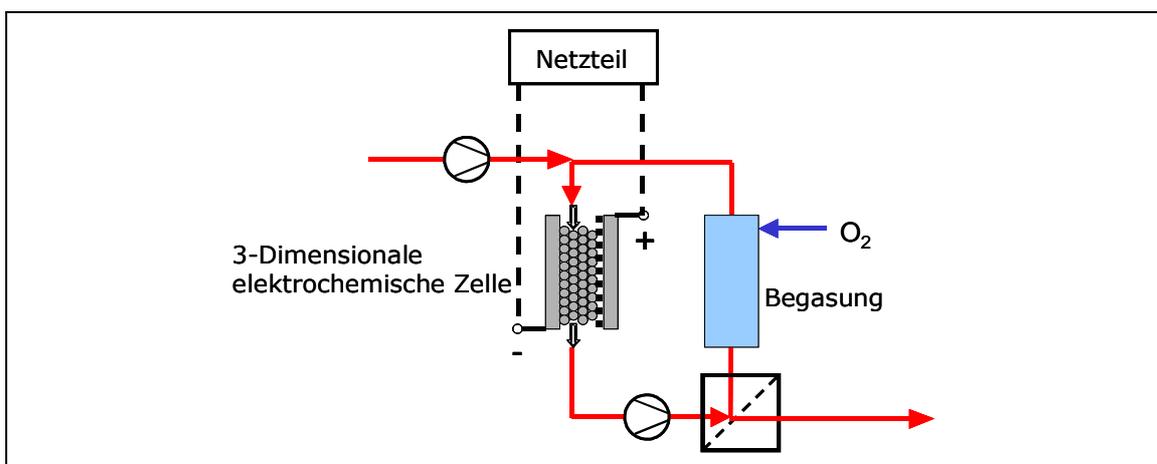


Abbildung 5.5.1: Strömungsrohrreaktor mit nicht immobilisierter CPO.

In einer Umlaufapparatur mit Dosierpumpe und Membranfiltration (Abbildung 5.5.1) kann bei gleichen Pumpraten Strömungsrohr-Charakter erzielt werden. Auch hier würde sich bei längerer Reaktionszeit das Problem der Membranverblockung zeigen. Da auch keine Folgereaktion vorliegt, wo durch ein Strömungsrohr die Selektivität beeinflusst werden kann, wird ebenso ein solcher Reaktor nicht in Betracht gezogen.

Als Reaktor kommt daher nur ein Batch-Reaktor in Frage. Simulationen zeigen den Unterschied zwischen den möglichen Batch-Reaktionen auf (Abbildung 5.5.2 und Abbildung 5.5.3).

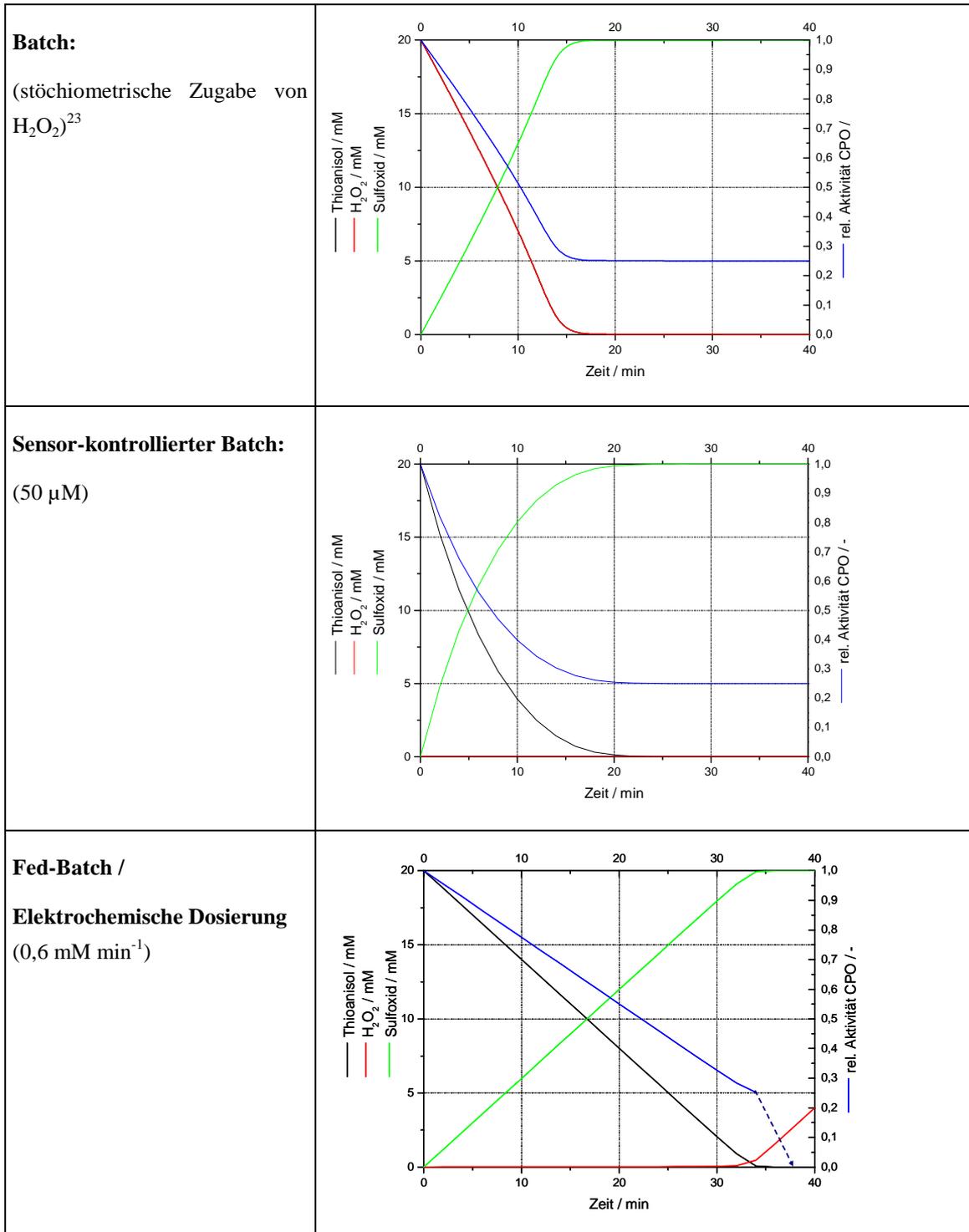
Zunächst werden Simulationen unter Vernachlässigung der Grunddesaktivierung (vgl. Abschnitt 5.1.2) nur mit der mechanismusbedingten Desaktivierung (vgl. Abbildung 5.4.9) betrachtet. Bei stöchiometrischer Zugabe des Oxidationsmittels (Abbildung 5.5.2, oben) wird besonders deutlich, welchen Einfluß die Inhibierung durch Wasserstoffperoxid auf die Reaktion hat. Mit fortschreitender Reaktionsdauer steigt die Reaktionsgeschwindigkeit durch Verringerung der Wasserstoffperoxidkonzentration. Ein stöchiometrischer Batch ist allerdings wegen der Grunddesaktivierung praktisch nicht durchführbar. Nimmt man eine zusätzliche Desaktivierung von  $8\% \text{ min}^{-1}$  an (Abbildung 5.5.3, oben) an, so wird deutlich, dass kein kompletter Umsatz mehr zu erreichen ist.

Handelsübliche  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Sensoren haben einen Messbereich von 1-20 ppm (29 – 588  $\mu\text{M}$ ). Bei CPO-Reaktionen wurde die Konzentration auf 50  $\mu\text{M}$  eingestellt (Abbildung 5.5.2, Mitte). Wegen der geringeren Inhibierung ist die Reaktion bei einer konstanten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration deutlich schneller als im stöchiometrischen Batch. Diese Inhibierung konnte mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten kinetischen Untersuchungen zum ersten Mal gezeigt werden. Berücksichtigt man für den Sensor-kontrollierten Batch eine Grunddesaktivierung von  $3\% \text{ min}^{-1}$  (Abbildung 5.5.3, Mitte) wird trotzdem fast quantitativer Umsatz im angegebenen Zeitraum erreicht.

Wird  $\text{H}_2\text{O}_2$  dem Batch kontinuierlich zudosiert (Abbildung 5.5.2, unten), so ist die Reaktionszeit in etwa so lang wie im stöchiometrischen Batch. Hier zeigt sich deutlich, dass die Reaktionsrate und die Enzym- und Substratnachdosierung aufeinander abgestimmt werden müssen, da sich der Katalysator bei Substratverarmung sofort selbst "vergiftet". Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration steigt rasch an und desaktiviert das Enzym sofort. Dies ist in den gewählten Modellen nicht abzubilden, daher ist die Aktivitätsabnahme nur durch einen Pfeil angedeutet. Bei einer geschätzten Grunddesaktivierungsrate von  $0,5\% \text{ min}^{-1}$  ändert sich der Reaktionsverlauf für die Substrate und das Produkt nicht (Abbildung 5.5.3, unten), da die Reaktion in der Dosierrate für Wasserstoffperoxid limitiert ist.

In allen Fällen in Abbildung 5.5.2 ist, da die produzierte Menge an Sulfoxid gleich ist, auch der Enzymverbrauch (durch den Katalysemechanismus) gleich. Der Endpunkt der Reaktion wird nur auf unterschiedlichem Weg erreicht. Der stöchiometrische Batch ist wegen der zu hohen stationären  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration nicht durchführbar. Die Durchführung der gewünschten Sulfoxidation kann sich daher einzig an den

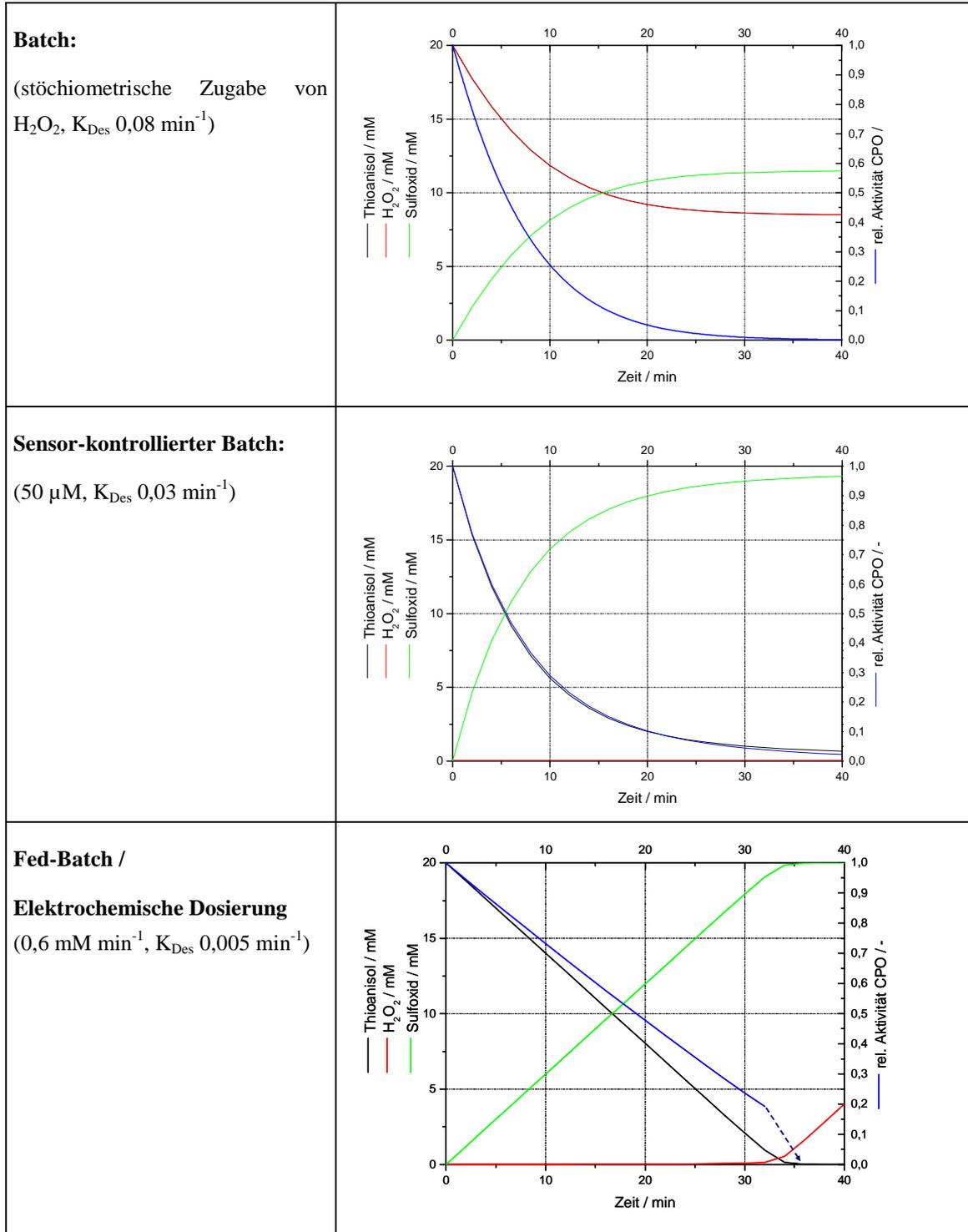
technischen Möglichkeiten orientieren, die Dosierstrategie hat keinen Einfluß auf den Katalysatorverbrauch.



**Abbildung 5.5.2: Simulation verschiedener Batch-Reaktionen zur Sulfoxidation unter Vernachlässigung der Grunddesaktivierung.**

Kinetische Parameter wie in Tabelle 4.2.4, Startwert 20 mM Thioanisol, 8  $\mu\text{g}$  CPO

<sup>23</sup> Die Linien für die beiden Substrate liegen übereinander.



**Abbildung 5.5.3: Simulation verschiedener Batch-Reaktionen zur Sulfoxidation unter Berücksichtigung der Grunddesaktivierung.**

Kinetische Parameter wie in Tabelle 4.2.4, Startwert 20 mM Thioanisol,  $8 \mu\text{g}$  CPO, die Grunddesaktivierungsraten sind aus den in Abschnitt 5.1.2 gezeigten Daten unter Berücksichtigung der Stationärkonzentration  $\text{H}_2\text{O}_2$  geschätzt.

### 5.5.1 Satzreaktor-Versuch mit optimierter Produktivität<sup>24</sup>

Der entscheidende Parameter zur Optimierung der Produktivität ist die mögliche Stromstärke (Formel 5.5.1 bis Formel 5.5.5). Über die Faraday'sche Beziehung (Formel 5.5.2) kann die in der Reaktion produzierte Stoffmenge mit der benötigten Ladung verknüpft werden. Die während der Reaktionszeit geflossene Ladungsmenge ist proportional zur Stromstärke, somit verbleiben als Variablen für die Produktivität des elektroenzymatischen Verfahrens die Stromstärke und das Reaktionsvolumen. Dem Reaktionsvolumen sind technische Grenzen gesetzt (Begasungsgefäß, Schläuche, Pumpe und elektrochemische Zelle umfassen insgesamt ca. 90-100 mL), die mögliche Stromstärke ist abhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit, der Elektrodenfläche pro Reaktionsvolumen und der Leitfähigkeit des Reaktionsmediums.

$$RZA = \frac{m_{\text{Produkt}}}{V_{\text{Reaktion}} \cdot t_{\text{Reaktion}}} \quad \text{Formel 5.5.1}$$

$$n_{\text{Produkt}} = \frac{Q}{z \cdot F} = \frac{I \cdot t_{\text{Reaktion}}}{z \cdot F} \quad \text{Formel 5.5.2}$$

$$m_{\text{Produkt}} = n_{\text{Produkt}} \cdot M_{\text{Produkt}} = \frac{Q \cdot M_{\text{Produkt}}}{z \cdot F} = \frac{I \cdot t_{\text{Reaktion}} \cdot M_{\text{Produkt}}}{z \cdot F} \quad \text{Formel 5.5.3}$$

$$RZA = \frac{I \cdot M_{\text{Produkt}}}{z \cdot F \cdot V_{\text{Reaktion}}} \quad \text{Formel 5.5.4}$$

$$RZA = I \cdot 7,27 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ A}^{-1} = I \cdot 628 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1} \text{ A}^{-1} \quad \text{Formel 5.5.5}$$

mit  $Q = \text{Ladung} / \text{C} (=A \text{ s})$

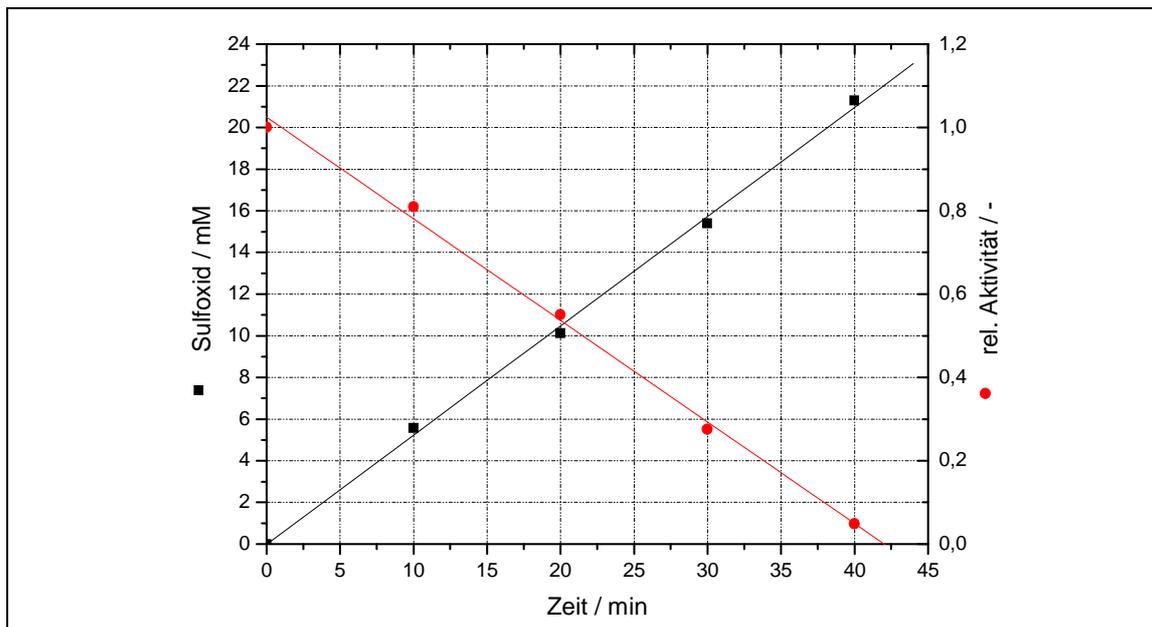
$$M_{\text{Produkt}} = 140 \text{ g mol}^{-1}$$

$z = \text{Anzahl Elektronen} (=2)$

$F = \text{Faraday-Konstante} (96485 \text{ C mol}^{-1})$

Um eine möglichst große Stromstärke zu erreichen wird Acetatpuffer mit nur 10 vol% *tert*-Butanol als Elektrolyt eingesetzt. Zusätzlich werden kleinere Graphitkugeln (0,6 – 1,0 mm) verwendet, um eine höhere Elektrodenfläche (1350 cm<sup>2</sup> anstatt 900 cm<sup>2</sup>) zu realisieren. Bei erhöhter Zellspannung von 1,9 V wird so eine Stromstärke von 220 mA und somit eine Raum-Zeit Ausbeute von 104 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Abbildung 5.5.4, [Vuorilehto 2003]) erreicht. Diese Produktivität ist bisher in elektroenzymatischen Reaktionen nicht erreicht worden und in der gleichen Größenordnung wie für das sensor kontrollierte Dosierverfahren.

<sup>24</sup> Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse wurden im Rahmen eines gemeinsamen BASF-Projektes mit Herrn Dr. K. Vuorilehto erzielt.



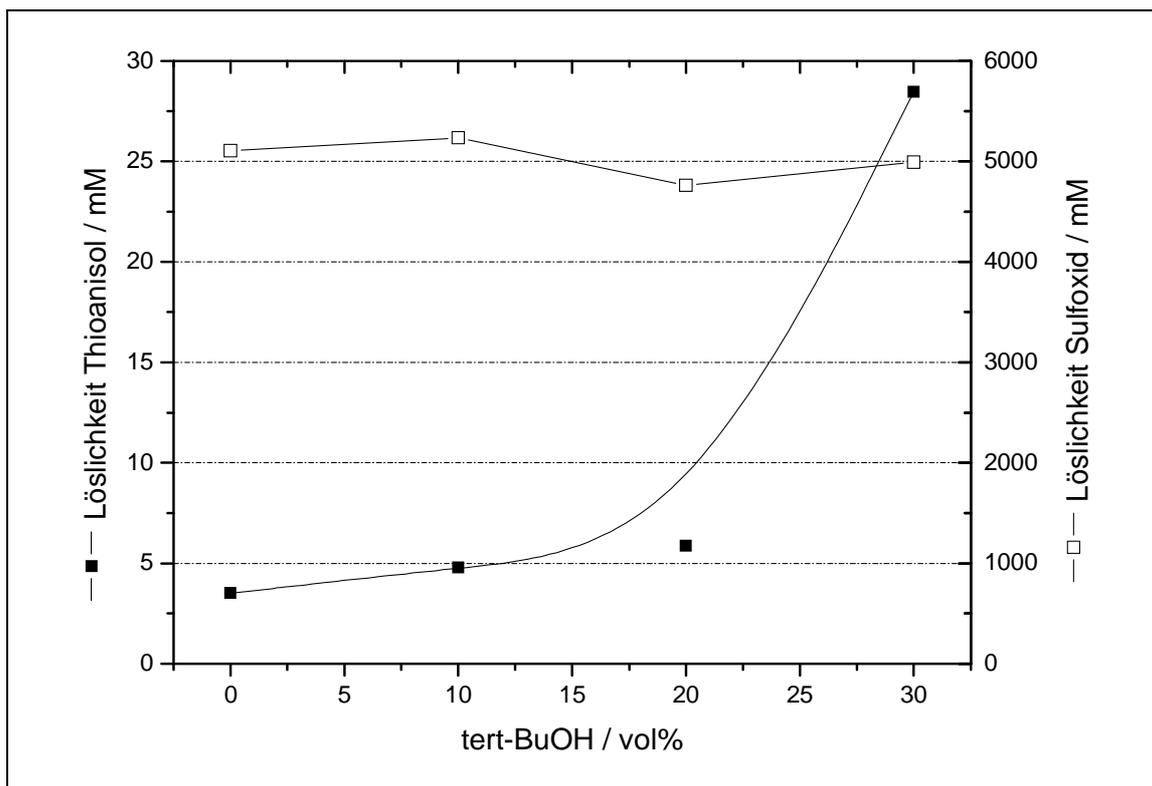
**Abbildung 5.5.4: Batch mit optimierter Produktivität im 3D-Reaktor.**

$V = 90 \text{ mL}$ ,  $100 \text{ mM}$  Natriumacetat (pH 5),  $50 \text{ mM}$  Natriumsulfat,  $10 \text{ vol\% } t\text{-BuOH}$ , Zellspannung  $1.95 \text{ V}$ ,  $I = 220 \text{ mA}$ , Desulco Graphit ( $0,6\text{-}1,0 \text{ mm}$ ),  $11 \text{ U(MCD) mL}^{-1} \text{ CPO}$ ,  $RZA = 104 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ,  $t_{tn} = 145.000$ ,  $ee = 99.4\%$ , Stromausbeute =  $75\%$ , Linien als optische Hilfe

Die  $t_{tn}$  liegt beim Maximalwert von  $145.000$ .

### 5.5.2 Fed-Batch-Elektrolyse zur Sulfoxid-Produktion

Für die Darstellung größerer Mengen des Sulfoxids sollen möglichst hohe Produktkonzentrationen in der Elektrolytlösung erzielt werden. Daher wird zunächst für Edukt und Produkt die maximale Löslichkeit bestimmt (Abbildung 5.5.5).

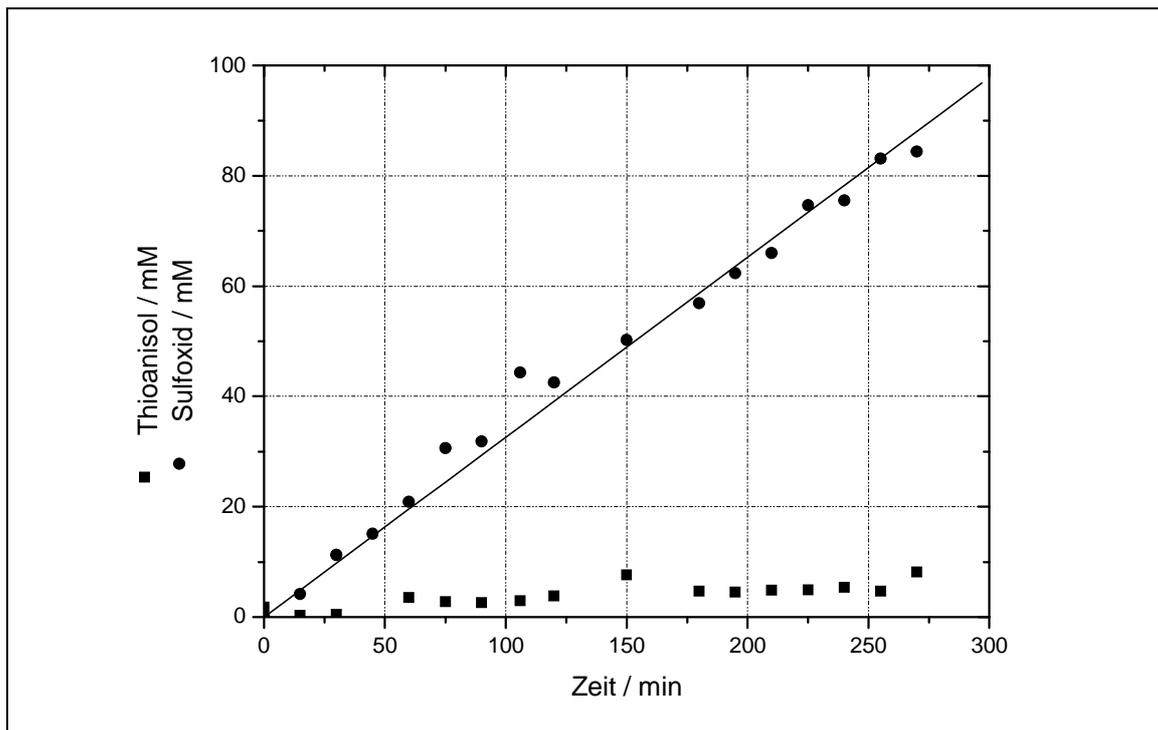


**Abbildung 5.5.5: Löslichkeiten von Produkt und Substrat in Abhängigkeit vom Cosolvens-Anteil.**

100 mM Natriumacetat (pH 5), 50 mM Natriumsulfat, T = 20 °C

Dies verdeutlicht, warum in der CPO-katalysierten Sulfoxidation bisher durchweg 30 vol% *tert*-Butanol eingesetzt wurden. Die Substratverfügbarkeit steigt bei diesem Anteil deutlich an. Die Produktlöslichkeit liegt drei Größenordnungen über der Substratlöslichkeit und ist damit nicht limitierend.

Zur Produktion wird daher ein Fed-Batch durchgeführt, bei dem unter Verwendung des optimierten Elektrolyten zu einer Thioanisol-Emulsion (Absorption auf dem Graphit und ungelöste Restanteile in der Lösung) im Verlauf der Reaktion immer verbrauchtes Thioanisol nachdosiert wird. Ebenso wird die Enzymdesaktivierung durch Nachdosieren von Enzym ausgeglichen. In diesem Sinne ist der Versuch ein multipler Fed-Batch-Prozess. Es werden kontinuierlich Sauerstoff und Elektronen "zudosiert", mit denen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Feed erzeugt wird. Zusätzlich werden Substrat und Enzym nachdosiert.

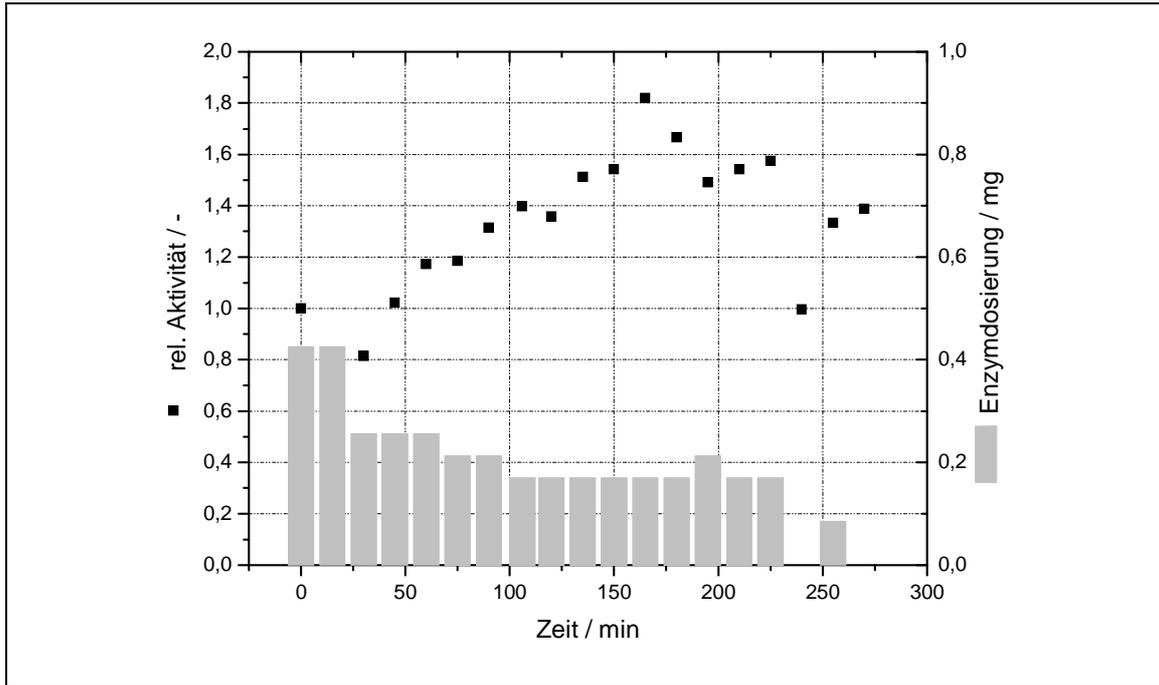


**Abbildung 5.5.6: Fed-Batch im 3D-Reaktor.**

$V = 70$  mL, 100mM NaAcetat (pH 5), 50 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , Zellspannung 1,9 V,  $t_{\text{tn}} = 80.000$ , bei jeder Probenahme 300  $\mu\text{L}$  ( $=0,31$  mmol) Thioanisol nachdosiert, CPO-Dosierung siehe Abbildung 5.5.7, RZA =  $63 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , ee = 98,7 %, Stromausbeute = 44 %, Linie als optische Hilfe

Im Kreislaufreaktor mit 3D-Zelle (Abbildung 5.5.6) konnte so mit der Fed-Batch-Reaktion eine Produktkonzentration von 85 mM erzielt werden (Abbildung 5.5.6). Das Produkt hatte eine optische Reinheit von 98,7% ee. Außerdem konnten  $\sim 14$  mM Produkt in der Anolytlösung nachgewiesen werden, allerdings nur mit 92 % ee. Bereits in früheren Experimenten mit ungeteilten Elektrolysezellen (vgl. Abbildung 5.3.1) wurde immer ein geringerer ee gefunden. Im Anodenraum läuft anscheinend eine unselektive Nebenreaktion ab.

Die Substratkonzentration liegt immer an der Löslichkeitsgrenze von  $\sim 5$  mM, exakte Werte sind hier nicht anzugeben, da eigentlich eine Emulsion vorliegt. Die Mengen an Thioanisol, die am Graphit absorbiert sind, können nicht quantifiziert werden.



**Abbildung 5.5.7: Enzymdosierung und Aktivitätsverlauf während des Fed-Batch.**

Die Enzymnachdosierung ist in mg Protein angegeben. Lt. Modell entspricht ein mg CPO 3926 U bezügl. Thioanisol.

Die Enzymdesaktivierung wurde durch manuelle Nachdosierung von frischer Enzymlösung bei der Probenahme überkompensiert. Der Aktivitätsverlauf und das Dosierprofil ist in Abbildung 5.5.7 gezeigt. Durch die zu hohe Nachdosierung wird nur eine *t<sub>tn</sub>* von 80.000 erreicht.

### 5.5.3 Aufarbeitung

Die Aufarbeitung des Produktes erfolgt batchweise durch Extraktion mit organischem Lösungsmittel. Sie ist schematisch in Abbildung 5.5.8 zusammengefasst. Das Produkt wird aus der wässrigen Phase mit Ethylacetat (EtOAc) extrahiert, die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert [Seelbach 1997]. Eventuelle Reste des Substrates werden hier schon teilweise entfernt, da es sehr flüchtig ist.

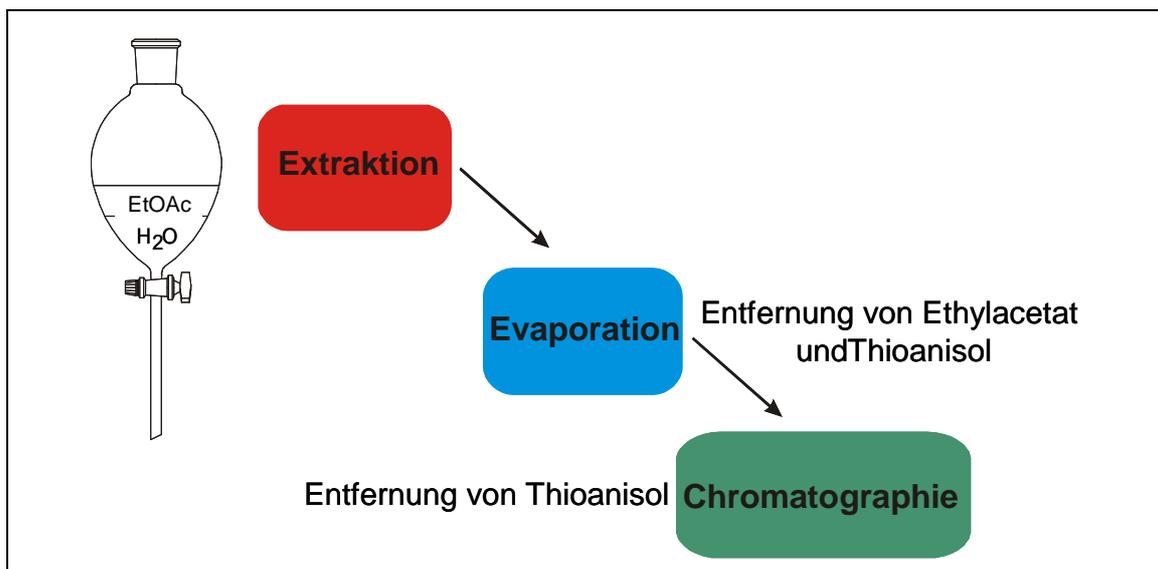


Abbildung 5.5.8: Schematische Darstellung der Produktaufarbeitung.

Je nach Menge des Substrates die noch im Produkt vorhanden ist, kann ein weiterer Evaporationsschritt mit Hochvakuum oder eine säulenchromatographische Abtrennung erfolgen. Da das Enzym in aller Regel deaktiviert ist, lohnt eine Aufarbeitung und Wiederverwendung nicht. Das Protein verbleibt auf jeden Fall in der wässrigen Phase und kann gegebenenfalls um nicht desaktivierte Reste zurückzugewinnen durch Ultrafiltration abgetrennt werden. Ebenso verbleiben die Puffersalze in der wässrigen Phase, so dass der entscheidende Schritt zur Produktisolierung die Extraktion ist.

Mit EtOAc werden mindestens 3 Extraktionsschritte im Scheidetrichter benötigt (Abbildung 5.5.9). Dies ist unanhängig von der Ausgangskonzentration des Sulfoxids, beim gewählten Verhältnis der Phasen ist die Löslichkeit des Produktes in der organischen Phase daher nicht limitierend.

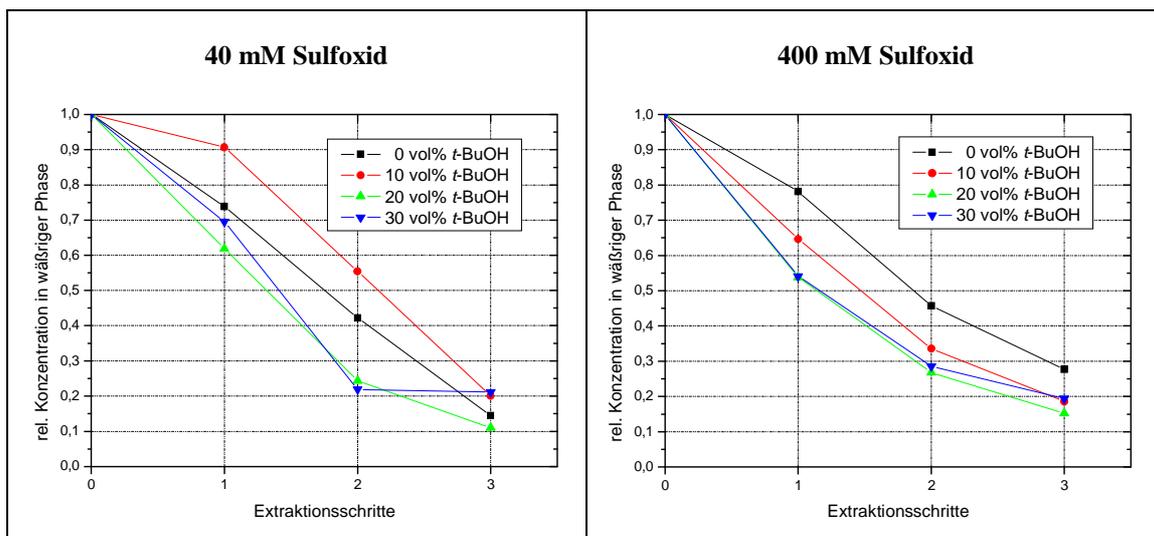


Abbildung 5.5.9: Extraktion des Produktes mit EtOAc aus der wässrigen Phase.

100 mM Natriumacetat (pH 5), 50 mM Natriumsulfat, Verhältnis (v/v) organisch:wässrig = 0,375

Die Extraktion ist wegen der vielen Schritte nicht gut geeignet zur Aufarbeitung großer Produktmengen, im Rahmen dieser Arbeit jedoch im geeigneten Maßstab durchführbar.

### 5.5.4 Isoliertes Produkt

Im 3D-Reaktor mit Natriumacetat-Puffer und Natriumsulfatzusatz sowie 10 vol% *tert*-Butanol als Elektrolyt konnten über 1 g chirales Sulfoxid (Reinheit = 98%, ee = 98%) nach dem Fed-Batch-Verfahren produziert werden (Abbildung 5.5.10).

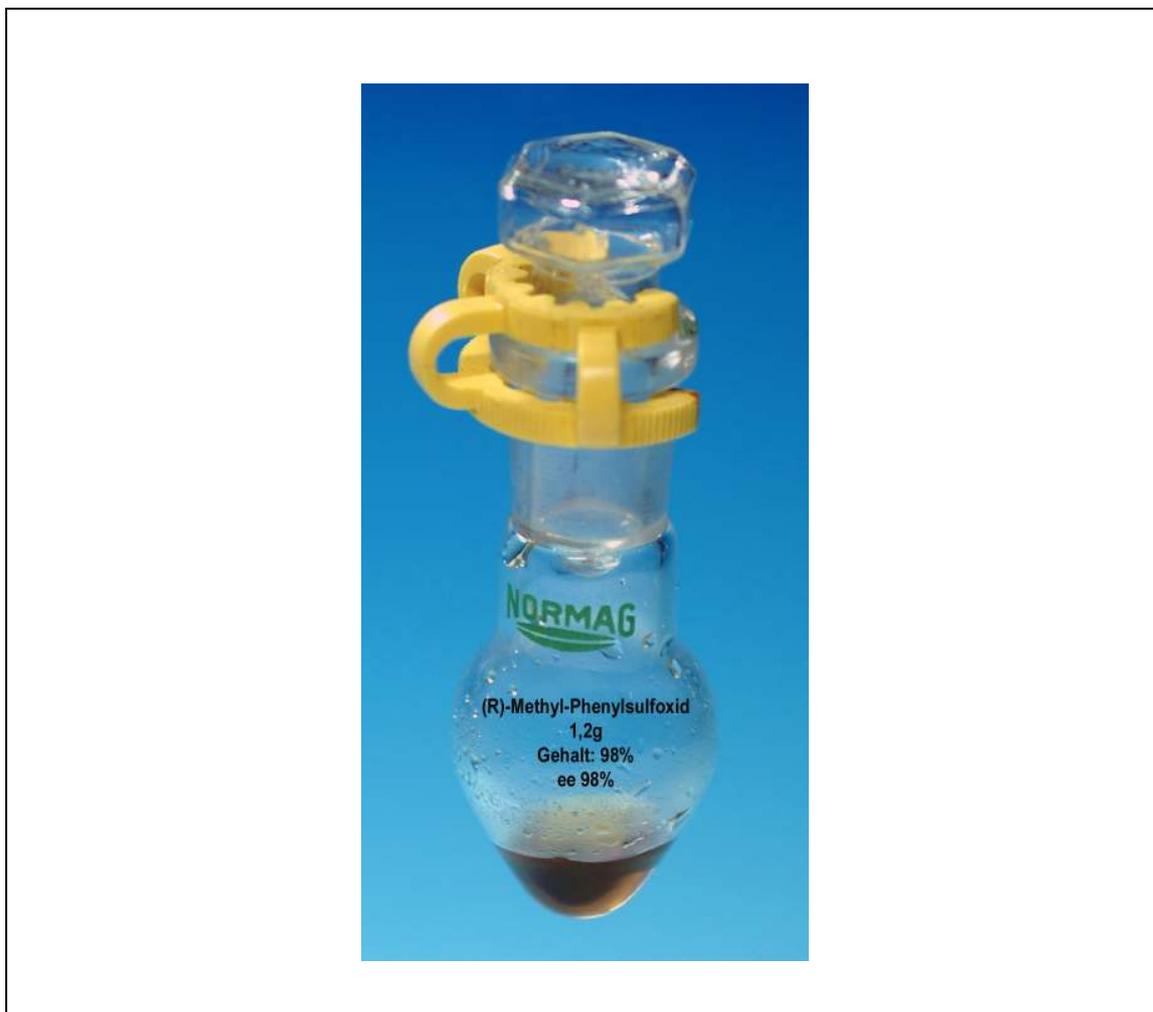


Abbildung 5.5.10: 1,2g (*R*)-Methylphenylsulfoxid aus der elektroenzymatischen Synthese.

## 5.6 Zusammenfassung

Der elektrochemische und biokatalytische Schritt konnten durch Reaktionstechnik zu einer elektroenzymatischen Sequenz verknüpft werden.

- An der RRDE wurde ein ungewöhnliches Verhalten des Übertragungsverhältnisses gefunden, es wurden Hinweise auf eine Kinetik nullter Ordnung diskutiert.
- Es wurden zwei Reaktoren und unterschiedliche Begasungssysteme entwickelt.
- Das beste Reaktionssystem für die CPO-katalysierte Sulfoxidation ist der (Fed)-Batch.
- Mit den optimierten Reaktionsbedingungen wurde die Produktivität im 2D-Reaktor um den Faktor 17 auf  $35 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  gesteigert.
- Im 3D-Reaktor wurde eine RZA von  $104 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  erreicht.
- Die Rolle des Cosolvens *tert*-Butanol in der Reaktion wurde untersucht. Ein Zusatz von 10 vol% reicht aus, eine höhere Konzentration führt nicht zu einer weiteren Stabilisierung.
- Die maximal erzielbare *ttn* ist mechanismusbedingt ca. 140.000 für die Thioanisol-Oxidation
- Es wurden 1,2 g chirales Sulfoxid (Reinheit 98%, ee 98%) elektroenzymatisch dargestellt und isoliert.

## 6 Diskussion und Ausblick

*“It is the curse of a certain order of mind,  
that it can never rest satisfied with the  
consciousness of its ability to do a thing.*

*Still less is it content with doing it.*

*It must both know and show how it was done.”*

E.A.Poe (1809-1849)

### 6.1 Einfluss des Oxidationsmittels

Im Rahmen dieser Arbeit konnte belegt werden, dass der Einfluss des Oxidationsmittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf das Enzym vielschichtig ist. Zum einen ist es ein Substrat, das zur Reaktion nötig ist, zum anderen aber im Überschuss das Enzym kinetisch inhibiert. Außerdem desaktiviert es das Enzym irreversibel.

Die Grunddesaktivierung lässt sich durch eine geeignete Dosierstrategie vermeiden. Schon mit der Detektionsgrenze (1 ppm = 19  $\mu\text{M}$ ) kommerziell erhältlicher  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Sensoren lässt sich auch diese Desaktivierung weitgehend vermeiden. Es verbleibt eine mechanismusbedingte Desaktivierung, die dem enzymatischen System inhärent ist. Durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird die hochreaktive Oxo-Spezies des Häm gebildet (vgl. Abbildung 4.1.4). Diese Spezies kann entweder mit dem Substrat abreagieren oder durch Angriff an den Porphyrin-Stickstoffen zerstört werden. Es handelt sich also um zwei Parallel-Reaktionen, wobei die eine vom Substrat dominiert ist.

Wird ein Substrat umgesetzt, das ein günstiges Verhältnis von  $v_{\text{max}}$  (groß) zu  $K_{\text{M}}$  (klein) hat, also schnell mit der aktiven Spezies abreagiert, wird die Parallel-Reaktion unterdrückt. Diese mechanismusbedingte Desaktivierung ist somit ausschließlich abhängig vom Verhältnis der beiden Geschwindigkeitskonstanten, oder anders ausgedrückt ist die *tn* eine Funktion des eingesetzten Substrates (Abbildung 6.1.1). Zur Verbesserung der Reaktionsstabilität der CPO ist also eine molekularbiologische Optimierung des Enzyms nötig.

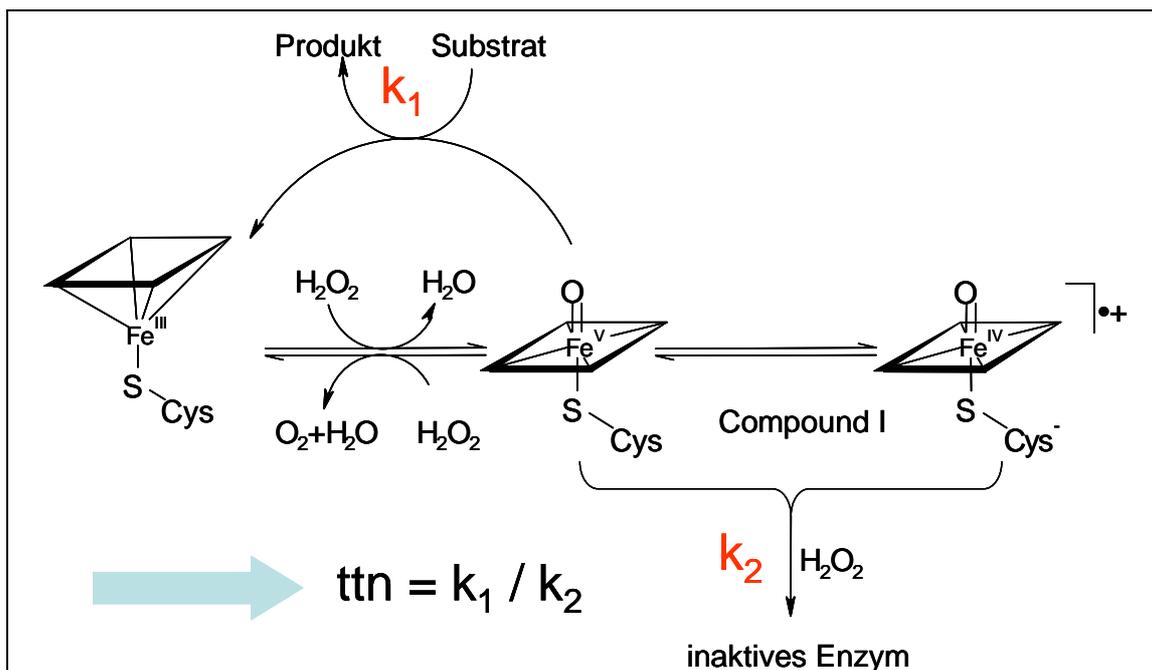


Abbildung 6.1.1: Schematische Darstellung der Substratabhängigkeit der Desaktivierung

Neben dieser Desaktivierung wird CPO auch in hohem Maße in Gegenwart von  $H_2O_2$  aber Abwesenheit anderer Substrate sehr rasch desaktiviert. Diese Grunddesaktivierung ist allen Häm-Enzymen gemeinsam und resultiert aus einem leichten oxidativen Abbau des Porphyrin-Gerüsts [van Deurzen, et al. 1997c]. Dies macht gerade die *in situ* Erzeugung oder Dosierung des Oxidationsmittels nötig (vgl. Abschnitt 5.1.2). Da dieser Effekt schwer zu quantifizieren ist, kann der Verlauf bei Erhöhung der  $H_2O_2$ -Konzentration nur geschätzt werden. Dieser kann linear verlaufen oder auch noch schneller ansteigen (Abbildung 6.1.2, oben).

Die Desaktivierung während der Reaktion geht vermutlich von Compound I aus (Abbildung 6.1.2, Mitte). Zunächst steigt die Desaktivierung, da die gesamte Reaktionsgeschwindigkeit steigt, bis zum Punkt maximaler Aktivität bezüglich  $H_2O_2$  (vgl. Tabelle 4.2.4). Deutet man die Substratüberschussinhibierung als Verringerung der Bildung von Compound I, dann führt dies zur Verringerung sowohl der Desaktivierung als auch der Produktionsreaktion, wobei deren Verhältnis gleich bleibt.

Beide Effekte addieren sich und führen dazu, dass mit Steigerung der  $H_2O_2$ -Konzentration die Desaktivierung immer zunimmt (Abbildung 6.1.2, unten). Bei Verwendung des Sensors oder der elektrochemischen Dosierung ist die Stationärkonzentration jedoch in beiden Fällen so gering, dass die Desaktivierung durch Reaktion dominiert.

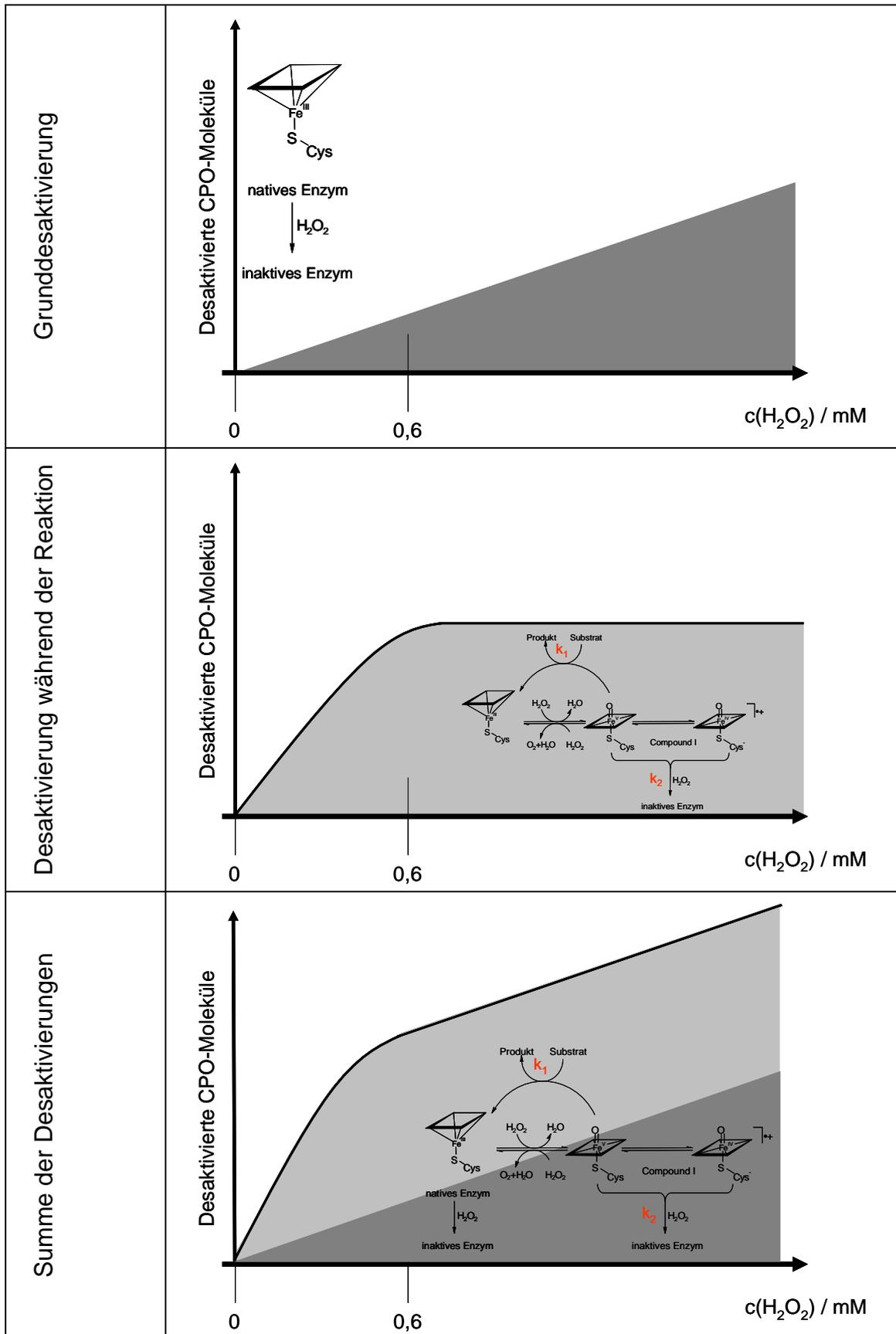


Abbildung 6.1.2: Schematische Darstellung der Desaktivierung der CPO durch  $\text{H}_2\text{O}_2$

## 6.2 Elektrochemische H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Dosierung

Die effiziente 3D-Zelle ist eine generelle Möglichkeit im bench- und lab-scale Wasserstoffperoxid *in situ* zu produzieren. Für alle oxidationsempfindlichen chemischen und vor allem biologischen Katalysatoren stellt dies eine interessante Verfahrensalternative zur klassischen Dosierung dar. Zwar ist H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine vergleichsweise kostengünstige Chemikalie, in vielen biokatalytischen Reaktionen wird allerdings nur eine verdünnte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung eingesetzt. Daher muß in einem gesonderten Behälter die übliche konzentrierte Lösung (30-35%) zunächst mit Pufferlösung verdünnt werden. Dies bedeutet einen zusätzlichen Verfahrensaufwand in der Substratvorbereitung und durch die Volumenzunahme einen erhöhten Material und Kostenaufwand in der Aufarbeitung (Abbildung 6.2.1).

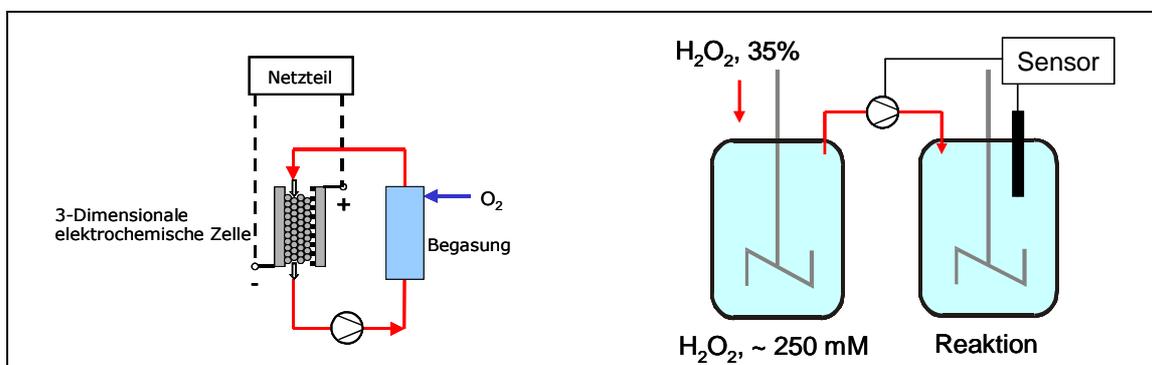


Abbildung 6.2.1: Vergleich der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Dosiersysteme

Obwohl Wasserstoffperoxid eine sehr kostengünstige Chemikalie ist, kann die elektrochemische Erzeugung trotzdem eine interessante Alternative darstellen. Ein handelsüblicher Sensor samt Regeltechnik kostet ca. 5.000 €. Außerdem wird eine teurere ansteuerbare Pumpe benötigt. Für die elektrochemische Darstellung wird nur eine unregulierte Umlaufpumpe benötigt, das Netzteil (kein Potentiostat) kostet ca. 300 € und 1 kg Graphit kostet ca. 150 €<sup>25</sup>. Für Anwendung im Labor- und kleinen Pilotmaßstab ist die elektrochemische Zelle also gut geeignet, um H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu dosieren.

Das System Peroxidase / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stellt eine technische, cofaktorfrem Monooxygenase dar. Für die Biokatalyse wird in Kombination mit der Elektrochemie Sauerstoff als finaler Elektronenakzeptor benutzt, das Substrat wird letztlich mit molekularem Sauerstoff oxidiert (Abbildung 6.2.2).

<sup>25</sup> Alle Preise Stand Juli 2004 lt. Internet-Recherche. Sensor: Prominent AG, Heidelberg, Netzteil: Thandar, Graphit: Desulco.

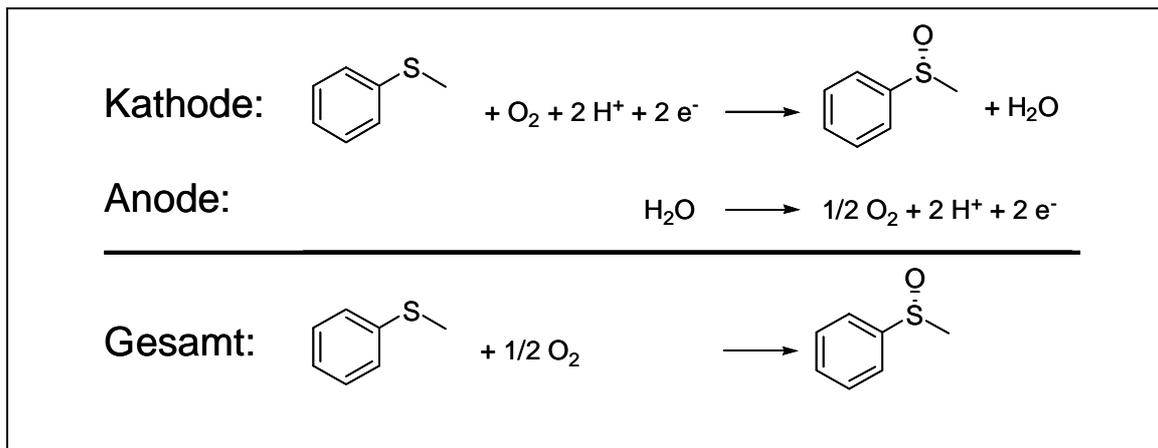


Abbildung 6.2.2: Brutto-Reaktionsgleichung der elektroenzymatischen Sulfoxidation.

Durch gerichtete Evolution von P450-Monooxygenasen [Farinas, et al. 2001; Cirino, Arnold 2002a, 2002b; Peters, et al. 2003] kann deren Aktivität bezüglich des "shunt"-Reaktionsweges erhöht werden. Auf diesem Weg werden Monooxygenase-Reaktionen (z.B. stereoselektive Hydroxylierung oder Epoxidierung) direkt mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Oxidationsmittel möglich [Cirino, Arnold 2003]. Somit kann zwar auf die Cofaktorregenerierung verzichtet werden, jedoch kann nicht mehr Sauerstoff als Oxidationsmittel benutzt werden.

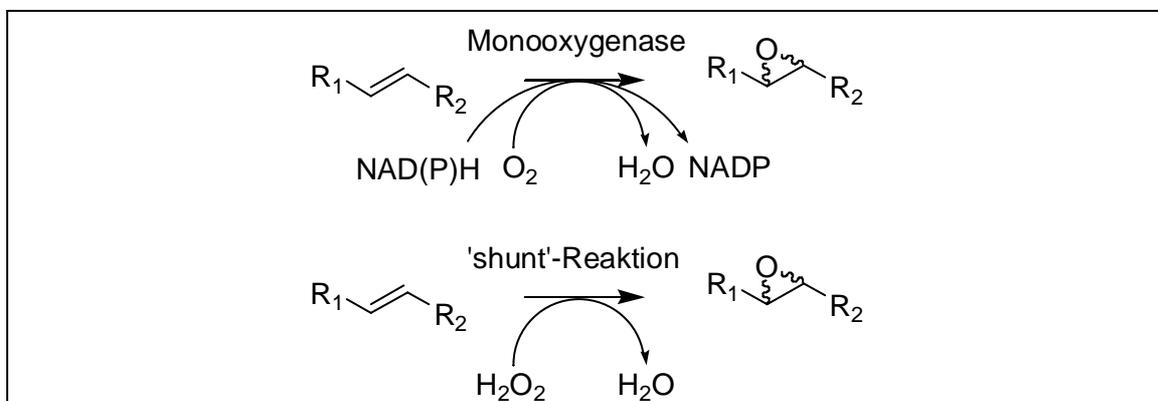


Abbildung 6.2.3: Monooxygenase-katalysierte Epoxidierung ('shunt' Reaktionsweg)

Bei Kombination dieser evolvierten Enzyme mit der elektrochemischen Wasserstoffperoxiderzeugung kann aus der Elektrode und dem evolvierten Enzym wieder ein Sauerstoff benutzendes, cofaktorfreies System gebildet werden. Neben der elektrochemischen Cofaktorregenerierung für Monooxygenasen [Hollmann, et al. 2001] erscheint dieses System zur Kopplung von Elektrochemie mit Monooxygenasen am erfolg versprechendsten. Versuche zur direkten elektrochemischen Aktivierung von

Monoxygenasen [Reipa, et al. 1997] führten nur zu Produktivitäten im Bereich von  $\text{nmol min}^{-1}$ .

### 6.3 Verfahrensoptimierung

Zur Produktion eines chiralen Sulfoxids ist das elektroenzymatische Verfahren nach den gewonnenen Erkenntnissen gut geeignet. Nötig ist eine effiziente elektrochemische Zelle, wie sie mit dem 3D-Reaktor vorgestellt wurde. Es hat sich gezeigt, dass die wichtigste Größe für die Produktivität des Verfahrens die Stromstärke ist. Die in den beiden Reaktoren bei ähnlicher Stromausbeute erzielten Produktivitäten zeigt Abbildung 6.3.1.

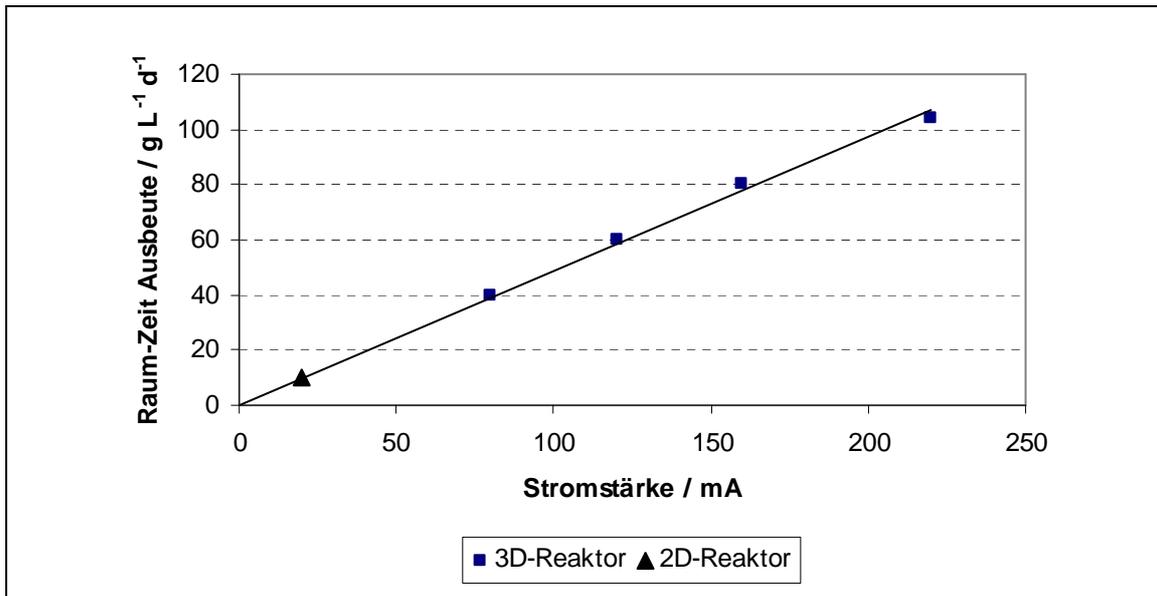


Abbildung 6.3.1: Erzielte Produktivitäten in unterschiedlichen Reaktoren als Funktion der Stromstärke

Die Stromdichte im 3D-Reaktor liegt, unter der Annahme einer idealen Kugelgeometrie für die Graphitpartikel beim Punkt höchster Produktivität bei  $0,17 \text{ mA cm}^{-2}$ . Der tatsächliche Wert wird etwas geringer liegen, da die elektrochemisch aktive Elektrodenoberfläche größer als die geometrische Fläche ist. In der Literatur sind maximale Stromdichten von  $1 \text{ mA cm}^{-2}$  für die kathodische Sauerstoffreduktion berichtet [Pletcher 1999], in der Regel ist sie jedoch geringer. Nach dieser Abschätzung weicht die elektrochemisch aktive Oberfläche der Graphitkugeln nicht zu sehr von der geometrischen Oberfläche ab.

Die Betrachtung der aktiven Elektrodenoberfläche für den Graphitfilz ist wegen dessen Gewebestruktur ungenauer [Kato, et al. 2000]. Die geometrische Oberfläche beträgt nur  $72 \text{ cm}^2$ . Jedoch ist hier sicherlich nicht nur die Oberfläche, sondern auch die darunter liegende Gewebeschicht elektrochemisch aktiv. Legt man eine Stromdichte von  $1 \text{ mA cm}^{-2}$  zugrunde, müsste die aktive Oberfläche bei ca.  $200 \text{ cm}^2$  liegen, bei einer gleichen Stromdichte wie an den Graphitpartikeln läge sie in der Größenordnung von  $1100 \text{ cm}^2$ .

Somit ist die geometrische Oberfläche ungeeignet die aktive Oberfläche des Kohlefilzes zu beschreiben.

Das Verhältnis von Elektrodenoberfläche zu Reaktionsvolumen unter den oben genannten Annahmen ist in Tabelle 6.3.1 gezeigt. Selbst bei Annahme gleicher Stromdichte liegt die Elektrodenfläche im 2D-Reaktor unter der Elektrodenfläche im 3D-Reaktor. Der 3D-Reaktor ist somit besser geeignet hohe definierte Elektrodenflächen pro Reaktorvolumen zu etablieren. Zur Erhöhung der Elektrodenfläche können Partikel mit geringererem Durchmesser verwendet werden, hier liegt die Begrenzung in der technischen Handhabbarkeit.

**Tabelle 6.3.1 Oberfläche / Volumen – Verhältnis  $A_V$  im 2D- und 3D-Reaktor**

	Stromdichte / mA cm <sup>-2</sup>	Elektrodenfläche / cm <sup>2</sup>	Volumen / mL	$A_V$ / m <sup>-1</sup>
2D, geometrisch	2,8	72	300	24
2D	1	200	300	67
2D	0,17	1100	300	367
3D, Graphitpartikel 1,0 - 1,4 mm	0,17	900	90	1000
3D, Graphitpartikel 0,6 - 1,0 mm	0,17	1350	90	1500

Zu einer weiteren Umsetzung der CPO-katalysierten Sulfoxidation, gleich ob mit sensor kontrollierten oder elektrochemischen Dosierung ist der limitierende Faktor derzeit der Enzymverbrauch. Erst wenn eine rekombinante, aktive CPO zur Verfügung steht, die in einem geeigneten Organismus kostengünstig exprimiert werden kann, ist die Biokatalyse attraktiver als die chemische Methode. Nimmt man Kosten für das rekombinante Protein von 2500 € kg<sup>-1</sup> [Hauer 2002] an, dann ergeben sich bei einer *ttm* von 140.000 für die CPO Herstellkosten für 1 kg Sulfoxid von ca. 17 €, wovon 12 € auf das Substrat (812 mL<sup>26</sup>) und 5 € auf das Enzym (5,1·10<sup>-5</sup> Mol = 2,2 g) entfallen. Dies illustriert erneut, wie wichtig eine molekularbiologische Optimierung ist.

---

<sup>26</sup> Ein Zehntel des Preises lt. Fluka-Katalog 2003 als Schätzung der industriellen Kosten.

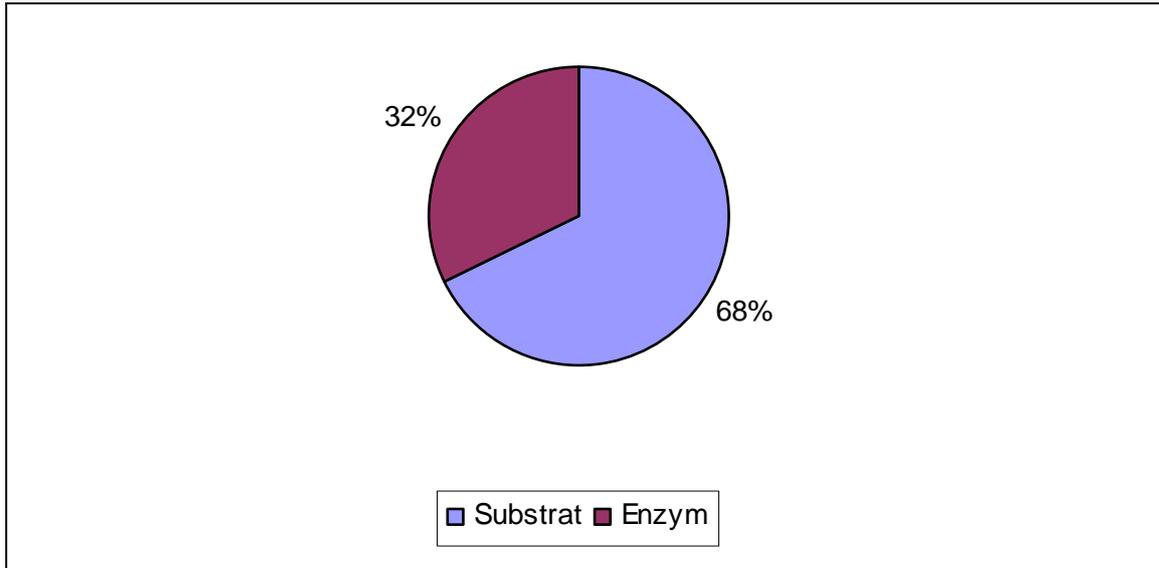


Abbildung 6.3.2: Beispielrechnung zu den Herstellkosten für 1 kg Sulfoxid mit rekombinanter CPO

Im Gegensatz zum sensorkontrollierten Dosierverfahren ermöglicht es die elektrochemische Dosierung, das Reaktionsvolumen annähernd konstant zu halten (Substrat- und Enzymnachdosierung sind vernachlässigbar gegenüber verdünnter  $H_2O_2$ -Lösung). Als Illustration dient eine Simulation des Fed-Batch bis zur Löslichkeitsgrenze des Sulfoxids (5 M) (Abbildung 6.3.3).

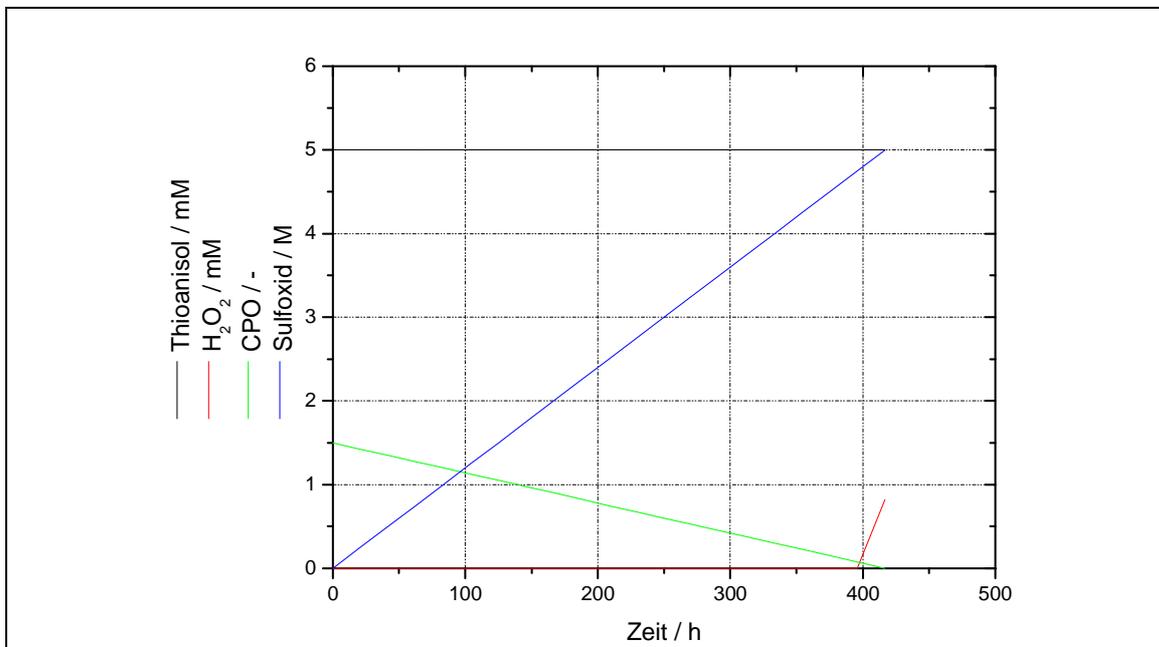


Abbildung 6.3.3: Simulation eines Fed-Batch zur Sulfoxid-Produktion

Die Parameter der Simulation sind in Tabelle 5.4.1 wiedergegeben. Thioanisol wurde bei 5 mM konstant gehalten.

Bei Benutzung der elektrochemischen Zelle mit optimaler Produktivität betrüge die Reaktionszeit ca. 400 Stunden. Bei dieser Zeitdauer muss neben der Reaktionsstabilität auch die Lagerstabilität (vgl. Abbildung 4.2.1) berücksichtigt werden. Das Reaktionsvolumen würde sich durch Substratdosierung von 100 mL auf 170 mL erhöhen<sup>27</sup>. Würde man die gleiche Stoffmenge mit Sensordosierung herstellen, müsste man zum Schluss ca. 2 L Reaktionslösung aufarbeiten.

Die Aufarbeitung ist ein wesentlicher Teil eines effizienten Verfahrens und sollten zur Umsetzung des Verfahrens noch ausführlicher untersucht werden. So kommen neben Ethylacetat andere organische Lösungsmittel in Frage um die Anzahl der Extraktionsschritte zu reduzieren. Für größere Mengen könnte statt des Scheidetrichters eine Gegenstromextraktion [Haberland, et al. 2002] oder ein Mixer-Settler benutzt werden. Zur besseren technischen Handhabbarkeit und zur Enzymschonung kann in den Kreislaufreaktor ein Modul zur blasenfreien Sauerstoffbegasung integriert werden [Rissom, et al. 1997].

Insgesamt ist es nötig, im Fed-Batch-Prozess Enzym- und Substratdosierung gut aufeinander abzustimmen. Bei kurzen Reaktionszeiten ist es sicher einfacher, die gesamte Enzymmenge vorzulegen. Bei langen Reaktionszeiten ist eine Regelung der Enzymdosierung wichtig.

---

<sup>27</sup> Die tatsächliche Konzentration an Sulfoxid beträgt dann 2,9 M. Der Volumeneffekt ist im Modell nicht berücksichtigt.

## 6.4 Verknüpfung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Schlüsselparameter für eine effiziente elektroenzymatische Reaktionssequenz identifiziert. Hierbei könnten gezielt neue Erkenntnisse über die Verknüpfung von elektrochemischen mit biokatalytischen Schritten gewonnen werden.

Für die Produktivität des Gesamtprozesses ist ein effizienter elektrochemischer Schritt wichtig, dieser benötigt:

- eine effiziente elektrochemische Zelle (hohes Elektrodenfläche/Volumen-Verhältnis),
- einen Elektrolyten mit hoher Leitfähigkeit.

Der biokatalytische Schritt erfordert:

- einen Elektrolyten mit ausreichender Pufferkapazität,
- ein Reaktionsmedium, das die Substratverfügbarkeit sicherstellt.

Hilfreich für die Kombination ist die reaktionstechnische Sichtweise bei der Zusammenführung der ansonsten nicht verwandten Disziplinen. So greifen die drei Teilgebiete Reaktionstechnik, Elektrochemie und Biokatalyse wie in Abbildung 6.4.1 gezeigt ineinander.

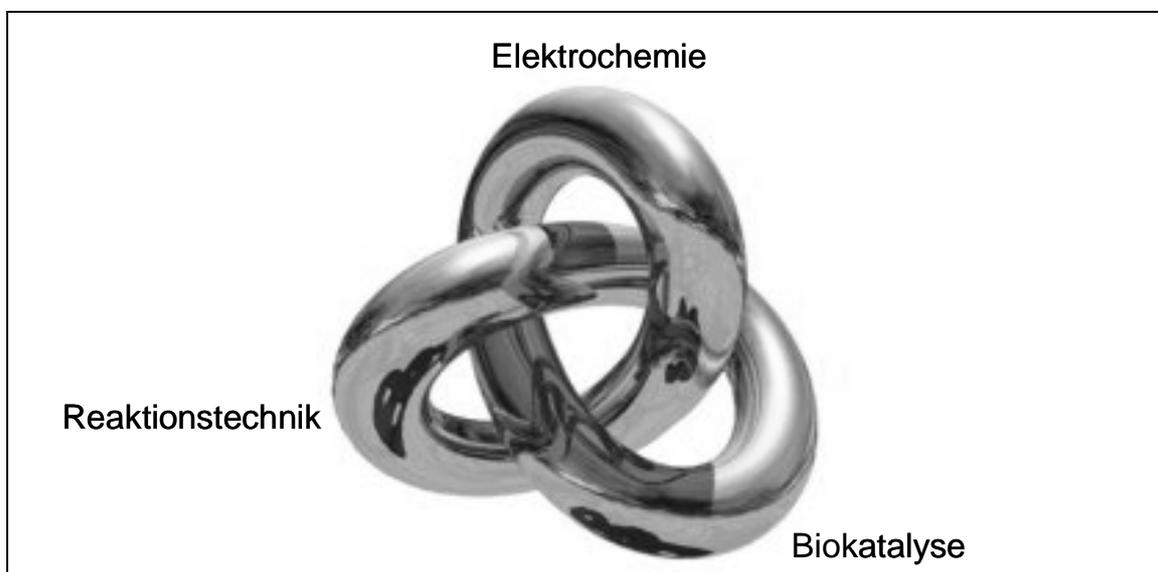


Abbildung 6.4.1: Kleeblattknoten

Das Potential der RRDE-Experimente zur Untersuchung enzymatischer Reaktionen konnte aufgezeigt werden. Dies ist ein Beispiel wo eine analytische Technik aus dem

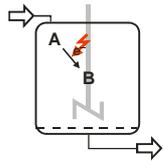
einen Bereich für den anderen nutzbar gemacht werden kann und so Rückwirkungen auf den ursprünglichen Forschungsbereich ermöglicht.

Die Messergebnisse zeigen nicht die erwarteten Verläufe für eine Kinetik erster oder zweiter Ordnung der zu untersuchenden Reaktion. Es wurden Hinweise auf eine Reaktion nullter Ordnung diskutiert, die an der RRDE zum ersten Mal gefunden wurden und in der Literatur noch nicht beschrieben sind. Zur exakten theoretischen Deutung fehlt daher in der Literatur noch die mathematische Basis.

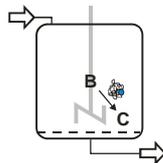
## 7 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine elektroenzymatische Reaktionssequenz untersucht und optimiert.

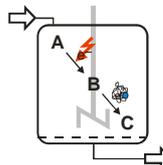
### Prozessentwicklung einer elektroenzymatischen Reaktionssequenz



- *t*-BuOH senkt die Leitfähigkeit und Sauerstoffdiffusion, die Sauerstofflöslichkeit wird nicht beeinflusst
- In Natriumacetat-Puffer wird H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit 95% Stromausbeute aus gelöstem Sauerstoff produziert
- Graphit und Kohlefilz-Elektroden können für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion genutzt werden



- Die Lagerstabilität ist weit höher als die Reaktionsstabilität.
- *t*-BuOH deaktiviert das Enzym bei höheren Temperaturen und inhibiert sowohl die Halogenase- als auch Peroxidase-Aktivität.
- Mit einem Zwei-Substrat-Modell wurden die Halogenase- und Peroxidase-Reaktion beschrieben und die kinetischen Konstanten bestimmt.
- Ein K<sub>M</sub> (0,55 mM) und K<sub>i</sub>-Wert (0,78 mM) für das Substrat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde zum ersten Mal ermittelt.
- Drei chemisch modifizierte Enzympräparationen wurden hergestellt und charakterisiert, die Temperatur- und Lagerstabilität ist erhöht.



- Zwei verschiedene elektroenzymatische Reaktoren konnten für die Produktion eingesetzt werden.
- Die modifizierten Enzyme zeigen eine niedrigere Reaktionsstabilität als das native Enzym.
- Die maximale t<sub>90</sub> ist 145.000, sie lässt sich durch die Dosierstrategie nicht ändern.
- Mit optimierten Reaktionsbedingungen wurde die Produktivität im 2D-Reaktor um das 17-fache auf 35 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> gesteigert.
- Mit der 3D-Zelle konnte eine **RZA** von **104 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>** erzielt werden.
- Ein Fed-Batch-Prozeß liefert 1,2 g aufgereinigtes Sulfoxid aus der elektroenzymatischen Synthese.



Erkenntnisse aus der Verknüpfung:

- Ohne die elektrochemische Fragestellung hätte es keine Notwendigkeit gegeben, die Funktion des Cosolvens zu hinterfragen.
- Ohne die enzymatische Fragestellung wäre das Puffermedium für die Sauerstoffreduktion nicht eingesetzt worden.
- Ohne die Notwendigkeit der Kombination beider Schritte wäre die Weiterentwicklung der Reaktoren nicht erfolgt.



## 8 Material und Methoden

### 8.1 Geräte

Analysenwaage :	BP 211D Sartorius AG
Cyclovoltammetrie :	BAS 100 B/W Electrochemical Analyzer Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette, USA 5 mL Zellvolumen Arbeitselektrode : Glaskohlenstoff Ø 3 mm, Gegenelektrode : Platindraht Referenzelektrode : Ag/AgCl–Schlauchelektrode Cypress Systems EE008 ( $E^\circ = 196 \pm 5$ mV vs. NHE )
Chemets Reader	Digital Chemets Reader I-3004 Kolorimetrische Ampullen R-5510 (Chemetrics, USA)
Elektrolysen :	thermostatisierte Becherglaszelle, FZ Jülich 300 mL Arbeitsvolumen Arbeitselektrode : Graphitfilz (SGL Carbon) Gegenelektrode : Platindraht Referenzelektrode : Ag/AgCl– Schlauchelektrode Cypress Systems EE008 ( $E^\circ = 196 \pm 5$ mV vs. NHE )
Gaschromatographie :	Agilent 6890 Kapillarsäule : Cyclodex $\beta$ -1P (Länge 50 m, $\varnothing = 0,32$ mm), Trägergas: Helium, Injektor: Split, 200 °C, Detektor: FID, 250 °C
Netzgerät	TS3021S, Thurlby Thandar
NMR–Spektroskopie :	Bruker AM 400 400 MHz – $^1\text{H}$ ; 100,6 MHz – $^{13}\text{C}$ breitbandenkoppelt Die in ppm angegebenen Verschiebungen beziehen sich auf TMS als Standard
Pipetten :	Finnpette 20, 200, 1000, 5000 $\mu\text{L}$
pH–Meßgerät :	Metrohm 691
Potentiostat/Galvanostat :	Model 263A (Princeton Applied Research)
Rotationsviskosimeter :	Rotovisco RV30, CV100 (Haake)
Schlauchpumpe :	Watson–Marlow 505 S Watson–Marlow Marprene II Schlauch
UV–Spektroskopie :	Shimadzu UV 160A Quarzglasküvette, $d = 0,1$ und 1cm Thermostat
Waage :	MC1 LC 4200S Sartorius AG, Göttingen

## 8.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in der höchsten Reinheitsstufe erworben und ohne weitere Reinigung direkt eingesetzt.

Bradfordreagenz	BioRad
BSA	Calbiochem
Chloroperoxidase	Fluka
Diethyltartrat	Fluka
Essigsäure	Merck
Essigsäureethylester	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
Monochlordimedon	Aldrich
Natriumacetat	Merck
Natriumdihydrogencitrat	Fluka
Natriumchlorid	Fluka
Natriumhydroxid	Merck
Natriumsulfat	Merck
<i>tert</i> -Butanol	Fluka
<i>tert</i> -Butanolhydroperoxid, 70%	Fluka
Thioanisol	Fluka
Titanisopropylat	Fluka
Wasserstoffperoxid, 35%	Merck

## 8.3 Analytik

### 8.3.1 UV-Analytik

#### 8.3.1.1 CPO-Aktivitätstest (MCD)

Der Aktivitätstest wird wie von Hager beschrieben durchgeführt [Hager, et al. 1966]. Folgende Stammlösungen wurden hergestellt:

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 2,75  
13,609 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  auf 1 L Wasser
- Stammlösung 1:  
19,8  $\mu\text{L}$  35%ige  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung auf 50 mL  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer
- Stammlösung 2:  
1,491 g           KCl  
17,46 mg        MCD                           auf 500 mL  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer

In die Küvette zu pipettierende Volumina:

- 490  $\mu\text{L}$            Stammlösung 1
- 500  $\mu\text{L}$            Stammlösung 2
- 10  $\mu\text{L}$             Probelösung

In der Küvette (1 mL) befinden sich somit:

- 100  $\mu\text{mol}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 2,75
- 20  $\mu\text{mol}$  KCl
- 2  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$
- 0,1  $\mu\text{mol}$  MCD

Die Lösungen werden in der Küvette gemischt und sofort im Photometer vermessen. Die dazu eingestellten Parameter lauten:

- Wellenlänge: 278 nm ( $\epsilon(\text{MCD}) = 1,2768 \cdot 10^6 \cdot \text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ )
- Temperatur: 25°C
- Messzeit: 60 s
- Messintervall: 1s

Die Aktivität wird in Units ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ) bezogen auf MCD angegeben.

#### 8.3.1.2 CPO-Aktivitätstest (AAP-Methode)

Für die Bestimmung der Peroxidaseaktivität wurde 2,4-Dichlorphenol (2,4-DCP) als Substrat in Gegenwart von 4-Aminoantipyrin (AAP) benutzt. Die Adsorptionszunahme des farbigen Produktes wurde bei 510 nm ( $\epsilon = 7.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) bei pH 6,0 verfolgt. Eine

Unit Peroxidaseaktivität ist definiert als Menge ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ) des roten oxidierten Farbstoffes.

### 8.3.1.3 CPO-Aktivitätstest (Thioanisol-Methode)

Thioanisol und (*R*)-Methylphenylsulfoxid unterscheiden sich in ihren Absorptionsspektren (Abbildung 8.3.1).

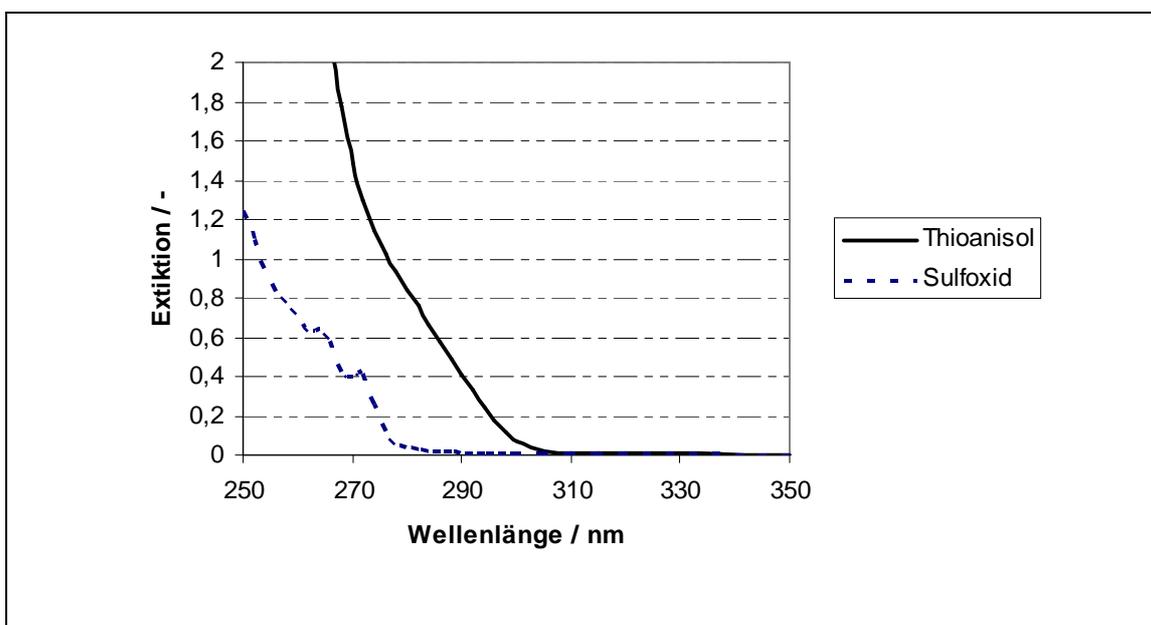
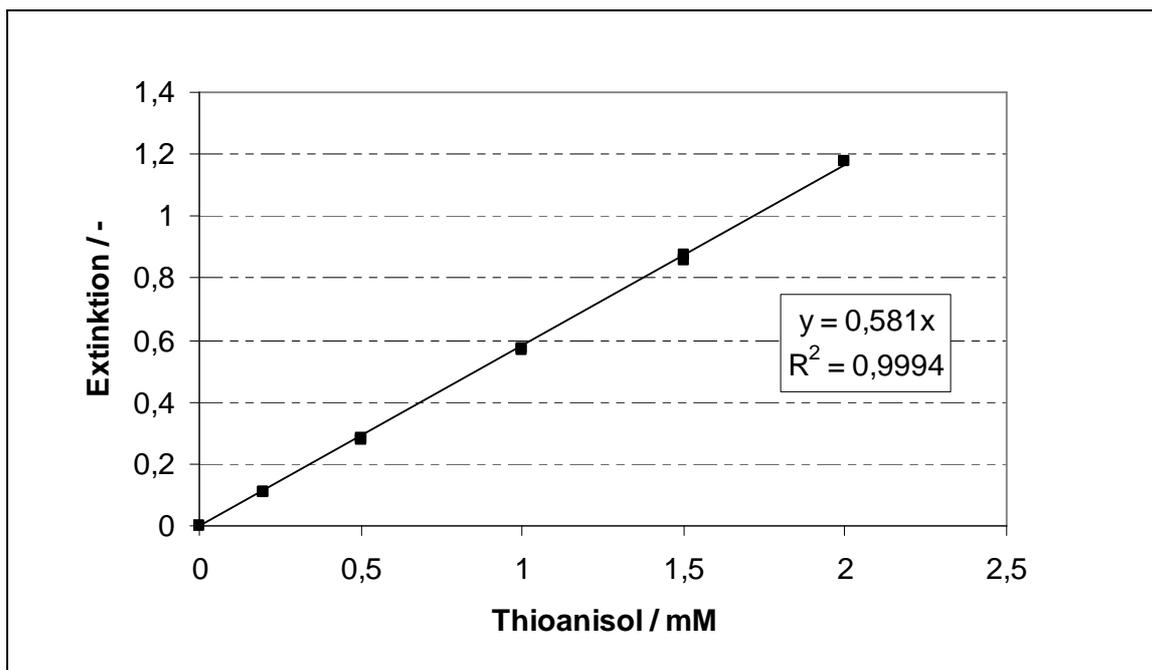


Abbildung 8.3.1 UV-Spektren von Thioanisol und (*R*)-Methylphenylsulfoxid

100 mM Natriumacetat (pH 5), 50 mM Natriumsulfat, 1mM Substanz, T = 20 °C, 1 cm Küvette

Bei  $\lambda = 284 \text{ nm}$  unterscheiden sich die Spektren am deutlichsten. Durch Messen einer Verdünnungsreihe wird der Extinktionskoeffizient von Thioanisol zu  $\epsilon = 581000 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  bestimmt (Abbildung 8.3.2).



**Abbildung 8.3.2 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von Thioanisol**

100 mM Natriumacetat (pH 5), 50 mM Natriumsulfat,  $\lambda = 284 \text{ nm}$ ,  $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1 cm Küvette

Für den Aktivitätstest werden folgende Lösungen verwendet:

- 100 mM Puffer pH 5
- Stammlösung 1: x mM Thioanisol in Puffer
- Stammlösung 2: 50 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$

In die Küvette zu pipettierende Volumina:

- 980  $\mu\text{L}$  Stammlösung 1
- 10  $\mu\text{L}$  Stammlösung 2
- 10  $\mu\text{L}$  Probelösung

Die Lösungen werden in der Küvette gemischt und sofort im Photometer vermessen.

Die dazu eingestellten Parameter lauten:

- Wellenlänge: 284 nm ( $\epsilon(\text{Thioanisol}) = 581000 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ )
- Temperatur:  $20^\circ\text{C}$
- Messzeit: 60 s
- Messintervall: 10 s

Die Aktivität wird in Units ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ ) bezogen auf Thioanisol angegeben.

### 8.3.2 GC-Analytik

Es wird eine Lipodex E Säule (50 m x 0.25 mm ID, 160°C, Machery-Nagel) verwendet. Die Retentionszeiten sind 1,81 min für Thioanisol, 6,80 min für das (*R*)-Sulfoxid und 9,60 min für das (*S*)-Sulfoxid. Das Sulfon wird bei 16,0 min detektiert.

Es werden Verdünnungsreihen in den Puffern angesetzt. 400 µL der Lösung werden mit 150 µL EtOAc extrahiert. 10 µL der organischen Phase werden in das GC injiziert. So kann aus den Peakflächen auf die Konzentrationen der Analyten in der wässrigen Lösung zurückgerechnet werden.

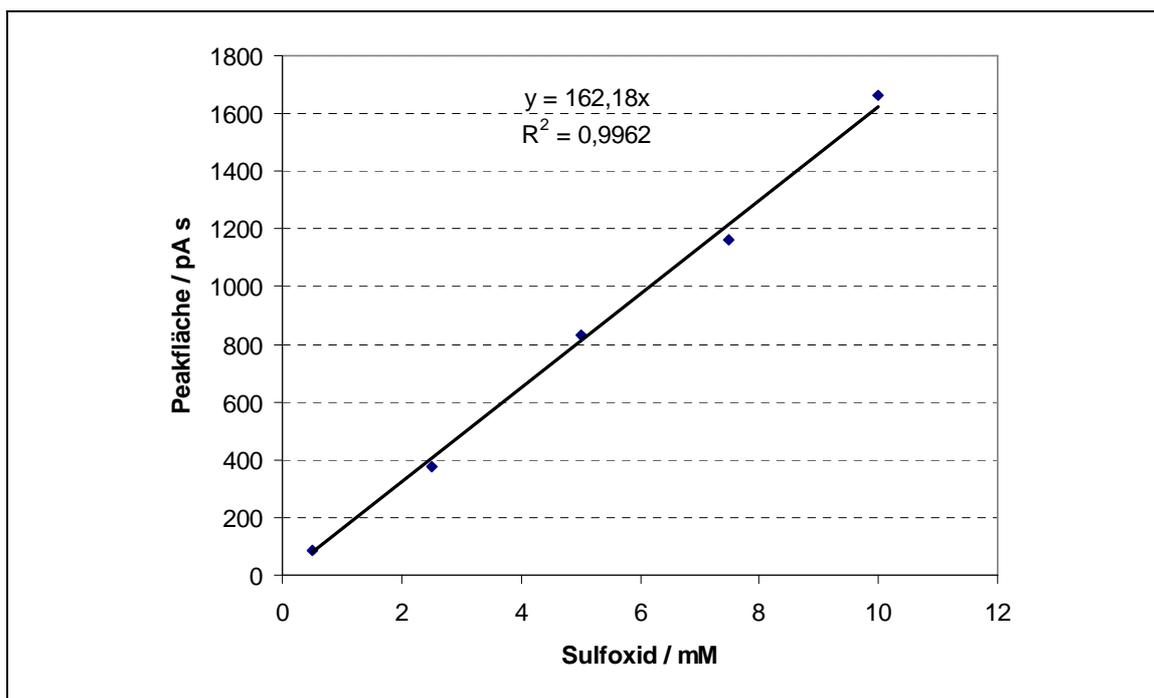


Abbildung 8.3.3 Kalibriergerade

100 mM Natriumacetat (pH 5), 50 mM Natriumsulfat, 10 vol% *t*-BuOH, 400 µL Probe mit 150 µL EtOAc extrahiert

Die Faktoren sind in Tabelle 8.3.1 zusammengefasst.

Tabelle 8.3.1 Kalibrierungen für Thioanisol und (*R*)-Methylphenylsulfoxid

Puffer	Thioanisol / pA s mM <sup>-1</sup>	Sulfoxid / pA s mM <sup>-1</sup>
100 mM Kaliumphosphat, 30 vol% <i>t</i> -BuOH	161	191
100 mM Natriumcitrat, 30 vol% <i>t</i> -BuOH	163	146
100 mM Natriumacetat, 50 mM Natriumsulfat, 0 vol% <i>t</i> -BuOH	-	163
10 vol% <i>t</i> -BuOH	128	177
20 vol% <i>t</i> -BuOH	-	162
30 vol% <i>t</i> -BuOH	-	137

### 8.3.3 elektrochemische Analytik

Alle Cyclovoltammogramme werden mit einer Potentialvorschubgeschwindigkeit von 100 mV·s<sup>-1</sup> und einer Empfindlichkeit von 10 nA·mV<sup>-1</sup> gemessen. Die Messungen beginnen jeweils bei kathodischem Potential in oxidativer Richtung. Es werden 3 Zyklen aufgenommen. Es werden jeweils 5 mL der Lösungen sauerstoffgesättigt und entgast vermessen.

### 8.3.4 Proteinanalytik

Der Proteingehalt wurde mittels der literaturbeschriebenen Methode nach Bradford [Bradford 1976] durchgeführt. Als Kalibrierung wird eine Verdünnungsreihe mit BSA vermessen.

## 8.4 Messungen in der 3D-Zelle

Es werden die folgenden Materialien verwendet:

- Sigradur-G (HTW, Deutschland), 0,4-0,63 mm
- Sigradur-K (HTW, Deutschland), 0,4-0,63 mm
- Desulco (Superior Graphite, Schweden), 0,6-1,0 mm und 1,0-1,4 mm
- Gold-beschichteter Desulco (RRR Labs, Indien)
- Silberspäne (Outokumpu, Finnland)

Die geometrische Oberfläche des Desulco-Graphit beträgt 1350 und 900 cm<sup>2</sup> (Volumen 72 cm<sup>3</sup>, Zwischenkorn-Volumen 50%, Kugelform angenommen)

Der Desulco-Graphit wird mit Laborsieben in die entsprechenden Größenfraktionen unterteilt. Der Graphit wird durch Rühren (> 2h) in 1M NaOH und anschließendem Rühren (> 2h) in Aceton gereinigt. Danach wird er Graphit mit Pufferlösung gewaschen, gesiebt und in den Kathodenraum eingefüllt. Als Membran wird Nafion® 424 verwendet. Die Anodenräume werden mit 0,05M Schwefelsäure befüllt. Die Zelle wird mit 100 – 150 mL min<sup>-1</sup> durchströmt.

Als Anoden werden spezielle Sauerstoffentwicklungs-Elektroden aus Titannetz (80mm x 90 mm, Netz 6mm x 4 mm, Metakem, Deutschland) benutzt.

### 8.4.1 Messung der Stromausbeute

Sauerstoff-gesättigte Pufferlösung wird mit 100 mL min<sup>-1</sup> durch die Zelle gepumpt. Am Ausgang der Zelle werden 1 mL Probe genommen und auf 15 mL verdünnt. In diesen verdünnten Proben wird mit dem Chemets Reader I-3004 (Chemetrics, USA) und den entsprechenden Ampullen (R-5510) die Wasserstoffperoxid-Konzentration bestimmt. Am Netzgerät wird die Stromstärke abgelesen. Hieraus wird gemäß Formel 8.4.1 die Stromausbeute berechnet.

$$\text{Stromausbeute} = \frac{c(\text{H}_2\text{O}_2) \cdot v_f}{(2 \cdot F)} \quad \text{Formel 8.4.1}$$

Diese Messung wird mit unterschiedlichen Elektrodenmaterialien und unter Benutzung von Desulco-Graphit mit unterschiedlichen Puffern durchgeführt.

### 8.4.2 Batch-Reaktionen

Der gereinigte Graphit wird in die Zelle eingefüllt, die Zelle wird verschraubt. Die Elektroden werden am Netzgerät angeschlossen und ein Schutzpotential von 1,5 V angelegt, um die Oxidation der Silberstromableiter zu verhindern. Die Zelle wird zuerst mit 500 mL Puffer gespült. Anschließend wird durch Anbringen des Auslaufes am Begasungsgefäß der Kreislauf hergestellt. Substrat und Enzym wird per Pipette zudosiert, die Reaktion wird durch anlegen einer Spannung von 1,8 – 1,9 V gestartet. Es werden 400 µL Probe genommen, die mit 150 µL EtOAc extrahiert werden. Die

organischen Phase wird im GC vermessen, in der wässrigen Phase wird die Enzymaktivität mittels MCD und/oder Thioanisol-Assay gemessen. Die Stromstärke bleibt während des Versuches konstant. Die Ladung wird aus der abgelesenen Stromstärke und der Reaktionszeit errechnet, die Stromausbeute aus der gemessenen Produktkonzentration und der errechneten Ladung.

#### **8.4.3 Verwendung der chemisch modifizierten CPO**

Es werden Batch-Reaktionen durchgeführt wie unter 8.4.2 beschrieben. Es werden 300  $\mu\text{L}$  Enzymlösung mit  $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$  Proteingehalt dosiert. Aus dem Proteingehalt wird die ttn geschätzt unter Verwendung von  $M(\text{CPO})=42000 \text{ g mol}^{-1}$ .

#### **8.4.4 Fed-Batch**

Es wird eine Batch-Reaktion durchgeführt wie unter 8.4.2 beschrieben. Bei jeder Probenahme werden zusätzlich 300  $\mu\text{L}$  (=0,31 mmol) Thioanisol und unterschiedliche Mengen Enzymlösung nachdosiert.

## 8.5 Messungen in der 2D-Zelle

Der Graphitfilz wird für 2 mal 20 Minuten im Ultraschallbad gereinigt, einmal in Methanol, einmal in Pufferlösung. Der Filz wird auf dem Edelstahl mit Plastikklemmen fixiert und als Arbeitselektrode kontaktiert. Der Platindraht wird in den Dialyseschlauch (gefüllt mit 10 mL Pufferlösung) eingefügt und als Gegenelektrode kontaktiert. Die Referenzelektrode wird in einer Bohrung im Edelstahl befestigt. Es wird der PAR 263A Potentiostat zur Steuerung der Elektrolyse verwendet. Die Sauerstoffbegasung erfolgt durch einen Schlauch mit reinem Sauerstoff bei 1-2 bar.

Es werden Substrat und Enzym dosiert und sofort eine erste Probe genommen um die Startwerte zu bestimmen. Die Elektrolyse wird durch Anlegen des Potentials (zwischen -500 und -600 mV vs. Ag|AgCl) gestartet. Es werden 400 µL Proben entnommen, mit 150 µL EtOAc extrahiert und die organische Phase im GC auf Substrat- und Produktkonzentration getestet. In der wässrigen Phase wird die Enzymaktivität gemessen. Der Potentiostat verfügt über einen automatischen Coulomb-Zähler, aus der hiermit ermittelten Ladungsmenge und der gemessenen Produktkonzentration wird die Stromausbeute berechnet.

## 8.6 Produktaufarbeitung

Nach Beendigung der Reaktion wird die wässrige Phase dreimal mit EtOAc (Verhältnis v/v 0,375) extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das organische Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck abdestilliert. Durch Anlegen von Hochvakuum über Nacht werden Reste von Edukt und Lösungsmittel entfernt.

Eine säulenchromatographische Reinigung wurde nach Bedarf angeschlossen :

Säule: Länge 20 cm, Durchmesser 2,5 cm

Stationäre Phase: Kieselgel (Merck)

Laufmittel: Cyclohexan/Essigsäureethylester = 1:1

## 8.7 Enzymmodifikation

### 8.7.1 CPO-Modifikationsreaktion

Alle Reaktionen wurden mit CPO und dem relevanten Reagenz in 10, 100 oder 1.000 fachen molarem Überschuss durchgeführt. Die Quervernetzung mit Glutardialdehyd wurde in Zinkacetatpuffer (100 mM, pH 6,5), die Quervernetzung mit EDAC wurde in Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 5,5) und die reduktive Alkylierung in Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 6,0) mit 50 % Ethanol durchgeführt. Bei den Quervernetzungsreaktionen war 5 % (W/V) Polyethylenglycol 1.500 zugesetzt. Alle Reaktionen wurden bei 4°C für eine Stunde gerührt. Die Produkte wurden durch Ultrafiltration (10 kDa Membran) aufgereinigt.

### 8.7.2 Bestimmung der freien Aminogruppen

Die Bestimmung der freien Aminogruppen wurde analog der TNBS-Methode durchgeführt [Habeeb 1966]. Lösungen der modifizierten CPO mit gleichem Proteingehalt wurden mit einer Lösung von 0,1 % Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) in Carbonatpuffer (100 mM, pH 8,5) gegeben. Das Gemisch wird für 2 Stunden unter Rühren bei 40°C inkubiert.

Anschließend wird 1 ml in einer 10% SDS-Lösung im selben Puffer hinzugegeben, um Proteinausfällung zu vermeiden. Zugabe von 1 ml einer 1 N Salzsäure stoppt die Reaktion. Die Konzentration des sulfonierten Produktes wird bestimmt durch die Adsorption bei 335 nM gegen eine Blindprobe ohne Protein.

### 8.7.3 Änderung der Hydrophobizität

Die native und modifizierte CPO werden zu einem Gemisch von Phenyl-Sepharose CL-4B Suspension und 1,7 M Ammoniumsulfat in Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 6,0) gegeben. Nach 5 Minuten rühren wird das Gemisch bei 3.500 rpm zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Die CPO-Aktivität in jeder Phase wurde mittels AAP-Methode [Metelitzka, et al. 1991] bestimmt. Der Verteilungskoeffizient wurde aus dem Aktivitätsverhältnis der organischen Phase (Phenyl-Sepharose) und der wässrigen Phase (Ammoniumsulfat) bestimmt.

### 8.7.4 Bestimmung der Temperaturstabilität

Native und modifizierte CPO werden in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 6,0) für eine Stunde im Temperaturbereich von 20 – 80°C inkubiert. Die restliche Peroxidaseaktivität wurde mittels AAP-Methode [Metelitzka, et al. 1991] ermittelt.

### 8.7.5 Einfluss des organischen Mediums auf die Enzymaktivität

Binäre Reaktionsgemische aus Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 6,0) und *tert*-Butanol bis zu 80 % (V/V) werden benutzt, um das Enzym für 4 Stunden bei

Raumtemperatur zu inkubieren. Die restliche Peroxidaseaktivität wird per AAP-Methode [Metelitz, et al. 1991] ermittelt.

## 8.8 Enzymkinetik

### 8.8.1 Peroxidase-Kinetik

Alle Messungen werden mit dem Thioanisol-Assay durchgeführt. Im Assay werden die Konzentrationen von Thioanisol (0-20 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0-1,5 mM) und der *tert*-Butanol-Anteil variiert (0-30 vol%). Die Daten werden mittels nicht-linearer Regression ausgewertet (vgl. Abschnitt 9.1.1.1)

Das ausführliche Modell unter Berücksichtigung der Ionenstärke bei  $v_{\max}$  und  $k_M$  liefert die folgenden Ergebnisse:

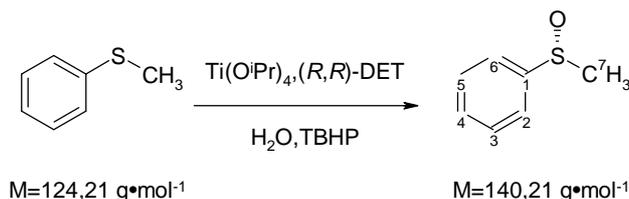
**Tabelle 8.8.1 Ergebnisse der nicht-linearen Regression zum ausführlichen Peroxidase-Modell.**

$v_{\max,0} / \text{U mg}^{-1}$	$K_{M,H_2O_2,0} / \text{mM}$	$K_{i,H_2O_2} / \text{mM}$	$K_{M,Thioanisol,0} / \text{mM}$
$3926 \pm 624$	$0,42 \pm 0,11$	$1,14 \pm 0,29$	$0,89 \pm 0,17$
$k_{\text{korr},v_{\max}}$	$k_{\text{korr},H_2O_2}$	-	$k_{\text{korr},TA}$
$-0,24 \pm 0,06$	$0,0065 \pm 0,085$	-	$0,065 \pm 0,14$

### 8.8.2 Halogenase-Kinetik

Alle Messungen werden mit dem MCD-Assay durchgeführt. Im Assay wird die Natriumchlorid bzw. Ammoniumchloridkonzentration (0-480 mM) variiert. Die Daten werden mittels nicht-linearer Regression ausgewertet (vgl. Abschnitt 9.1.1.2)

## 8.9 Chemische Sulfoxidation



Ansatz :

Ti(O <sup>i</sup> Pr) <sub>4</sub> [M=248,25 g·mol <sup>-1</sup> ]	1,49 mL [5 mmol]
( <i>R,R</i> )-DET [M=206,20 g·mol <sup>-1</sup> ]	1,71 mL [10 mmol]
Thioanisol [M=124,21 g·mol <sup>-1</sup> , d=1,59 g·mol <sup>-1</sup> ]	0,59 mL [5 mmol]
H <sub>2</sub> O [M=18 g·mol <sup>-1</sup> ]	0,1 mL [5 mmol]
TBHP-Lösung	2,35 mL [5,5 mmol]

In einem 100 mL thermostatisiertem Dreihalskolben mit Innenthermometer wird eine Lösung von 1,49 mL Ti(O<sup>i</sup>Pr)<sub>4</sub> und 1,71 mL (*R,R*)-DET in 50 mL Dichlormethan vorgelegt. 0,1 mL Wasser und 0,59 mL Thioanisol werden zugegeben und anschließend wird die Lösung auf -10°C gekühlt. Die wässrige TBHP-Lösung wird mit Dichlormethan extrahiert und die wässrige Phase verworfen. 2,35 mL der TBHP-Dichlormethanolösung werden tropfenweise unter Rühren zugegeben. Es wird für weitere 4 Stunden gerührt. Anschließend wird 1 mL Wasser zugegeben um den Titankomplex zu hydrolysieren. Es bildet sich ein weißer Niederschlag. Man erwärmt auf Raumtemperatur, filtriert über Celite und wäscht den Rückstand mehrmals mit Dichlormethan. Das Filtrat wird mit 5% KOH / ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt, mit NaSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Produkt wird säulenchromatographisch (Kieselgel: Merck, 4–63 μm; Säule: 20 cm, Ø=2,5 cm, Laufmittel: Cyclohexan/Essigsäureethylester = 1:1, R<sub>f</sub>=0,55) gereinigt. Man erhält weiße Kristalle.

Ausbeute : 0,3 g (43%)      Lit.: 80 %

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ [ppm] = 2,66 (s, 3H, H-7), 7,21-7,60 (AA'MM'X-Muster, 5H, H2-H6)

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100,6 MHz): δ [ppm] = 43,99 (C-7), 123,5 (C-2,C-6), 129,38 (C-4), 131,05 (C-3,C-5), 145,71 (C-1)

## 9 Anhang

### 9.1 Scientist-Modelle

Anbei sind die beiden Scientist®-Modelle wiedergegeben, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die Modelle sind die \*.eqn Dateien, mit denen der Fit und die Simulation durchgeführt wurden. Der Einfachheit halber wurde in den Modellen zur Simulation die CPO-Desaktivierung durch eine Verringerung der CPO-Menge (im mg Protein) ausgedrückt. Natürlich verändert sich die Gesamtproteinmenge während der Reaktion nicht, man mag diese Größe als "aktive Protein-Menge" definieren.

#### 9.1.1 Nicht-Lineare Regression für die Enzymkinetik

##### 9.1.1.1 Peroxidase-Modell

```
IndVars: TA, BuOH, HHOO
DepVars: V
Params:KMHHOO0, KMTA0, Vmax0, KkorrVmax, KiHHOO,KkorrHHOO, KkorrTA
KMHHOO=KMHHOO0*EXP(KkorrHHOO*BuOH)
KMTA=KMTA0*EXP(KkorrTA*BuOH)
Vmax=Vmax0*EXP(KkorrVmax*BuOH)
V=Vmax*HHOO/(KMHHOO+HHOO+ (HHOO*HHOO)/KiHHOO)*TA/(KMTA+TA)
```

```
//Parameters
KkorrVmax=0.3
KkorrHHOO=-0.08707
KiHHOO=1.75
KkorrTA=0.02
KMHHOO0=0.379243227
Vmax0=2002.54839
KMTA0=0.0464
***
```

##### 9.1.1.2 Halogenase-Modell

```
IndVars: CL, BuOH, HHOO
DepVars: V
Params:KMHHOO0, KMCL0, Vmax0, KkorrVmax, KiHHOO,KkorrHHOO, KkorrCL, KiCL
KMHHOO=KMHHOO0*EXP(KkorrHHOO*BuOH)
KMCL=KMCL0*EXP(KkorrCL*BuOH)
Vmax=Vmax0*EXP(KkorrVmax*BuOH)
V=Vmax*HHOO/(KMHHOO+HHOO+ (HHOO*HHOO)/KiHHOO)*CL/(KMCL+CL+(CL*CL)/KiCL)
```

```
//Parameters
KkorrVmax=0.3
KkorrHHOO=-0.08707
KiHHOO=1.75
KkorrCL=0.02
KMHHOO0=0.379243227
Vmax0=2002.54839
KMCL0=0.0464
KiCL=1.0
***
```

## 9.1.2 Simulation der Batch-Reaktionen

IndVars: t

DepVars: TA, HHO, CPO, SO

Params: KMHHOO0, KMTA0, Vmax0, KkorrVmax, KiHHOO, KkorrHHOO, KkorrTA, BuOH, KMTA, Vmax

$KMHHOO = KMHHOO0 \cdot \exp(KkorrHHOO \cdot BuOH)$

$KMTA = KMTA0 \cdot \exp(KkorrTA \cdot BuOH)$

$Vmax = Vmax0 \cdot \exp(KkorrVmax \cdot BuOH)$

$V = CPO \cdot Vmax \cdot HHO / (KMHHOO + HHO + (HHO \cdot HHO) / KiHHOO) \cdot TA / (KMTA + TA)$

$TA' = -V$

$HHO' = -V + 0.1$

$SO' = V$

$CPO' = -(V/28)$

//CPO in mg, HHO, TA, SO und BuOH in mM, Parameter wie aus Fit

//Parameters

t=0

CPO=0.65

HHO=0

TA=20

SO=0

BuOH=1.1

KkorrVmax=-0.291

KiHHOO=0.78

KMHHOO=0.55

Vmax0=5655

KMTA=1.37

\*\*\*

## 9.2 Eine kleine Einführung in die RRDE

*Only the more deceitful undergraduates  
ever completed the experiment; the others left  
Oxford convinced that nothing good  
can ever come from electrochemical measurements*

W.J. Albery & M.L. Hitchman

Ring-Disc Electrodes, Oxford University Press

### 9.2.1 Stofftransport an Elektrodenoberflächen

Wenn ein Strom durch eine Elektrode fließt und eine elektrochemische Reaktion hervorruft, ändert sich die Konzentration der elektrochemisch aktiven Spezies in der Lösung. Die Konzentration der Spezies variiert lokal. Die Lösung an der Elektrodenoberfläche ist weitgehend stationär in Bezug auf die Elektrode und die Reaktanden müssen durch diese stationäre Schicht diffundieren. Da Diffusion ein uneffektiver Transportprozess ist, finden die meisten Konzentrationsänderungen in der Diffusionsschicht statt. Ausserhalb der Schicht nähern sich die Werte der Konzentrationen rasch dem Wert der Lösung (Abbildung 9.2.1).

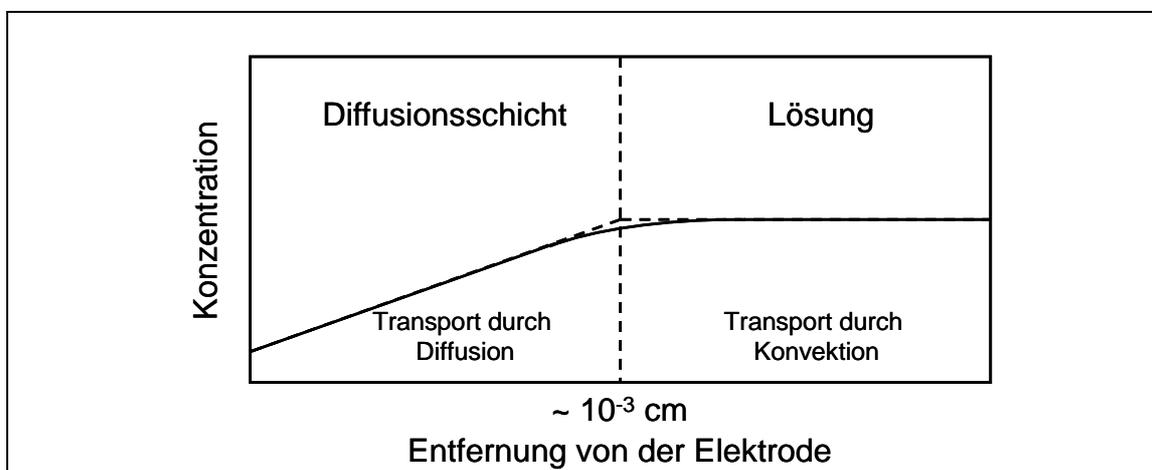


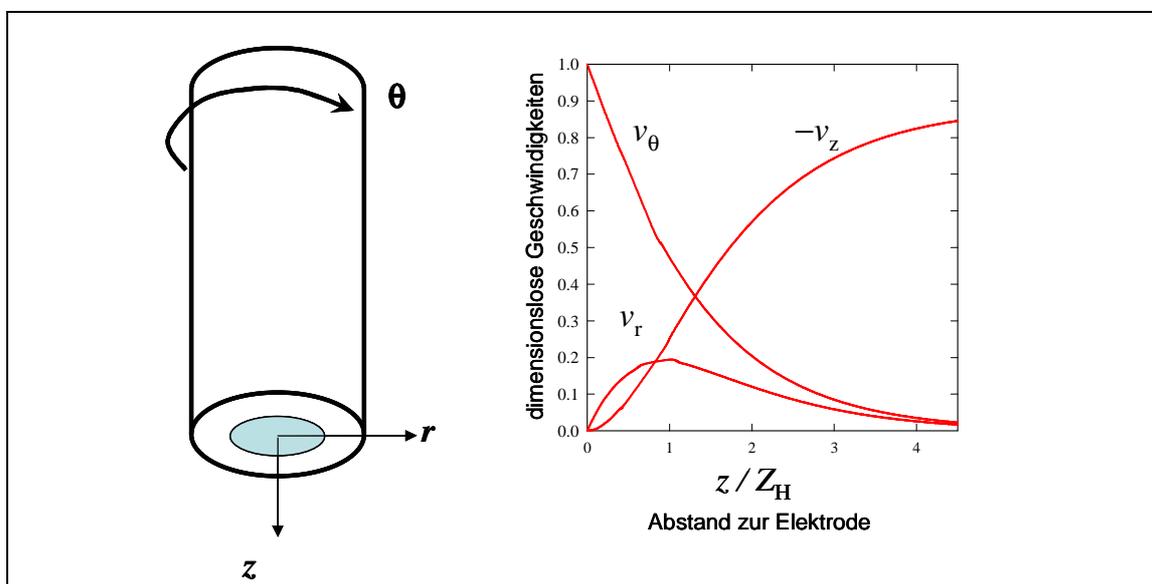
Abbildung 9.2.1 Konzentrationsprofil an einer Elektrode

In einer nicht gerührten Lösung ist die Dicke der Diffusionsschicht nicht genau zu beschreiben. Die Dicke dieser Schicht ist jedoch für den Transport der Spezies zur Elektrode und somit für den messbaren Strom bestimmend. Der Transport muss also gleichmäßig und gut definiert, möglichst auch leicht theoretisch zu beschreiben sein. Eine gute Möglichkeit, einen gleichmäßigen und konstanten Stofftransport zur Elektrode zu realisieren, ist die Rotation der Elektrode.

## 9.2.2 Die rotierende Elektrode

Eine rotierende Elektrode<sup>28</sup> besteht aus einer kreisförmigen Elektrodenfläche, die in einen Zylinder aus elektrisch nicht leitendem Material eingebettet ist. Eine schematische Skizze zeigt Abbildung 9.2.2 (links). An der Oberseite befindet sich die Befestigung für den Rotationsmotor und den Potentiostaten.

Bei rotierenden Elektroden wird der Elektrodenumgebung ein definierter und berechenbarer hydrodynamischer Fluss aufgezwungen. Die Geschwindigkeitskomponenten des Flusses sind in Abbildung 9.2.2 (rechts) als dimensionslose Geschwindigkeiten über dem Elektrodenabstand aufgetragen. Wie bei der theoretischen Behandlung rotierender Elektroden üblich sind hier zylindrische Polarkoordinaten verwendet.



**Abbildung 9.2.2 : Aufbau und hydrodynamische Profile einer rotierenden Elektrode.**

Die Geschwindigkeitsvektoren sind in zylindrischen Koordinaten angegeben und auf den hydrodynamischen Abstand zur Elektrode normiert.

Aus den Geschwindigkeitskomponenten kann man Strömungsprofile in der Elektrodenumgebung ableiten. Die Lösung wird, wie in Abbildung 9.2.3 gezeigt, von unten an die Elektrode transportiert und dann radial entlang der Elektrodenfläche geführt.

<sup>28</sup> Abkürzung RDE : rotating disc electrode

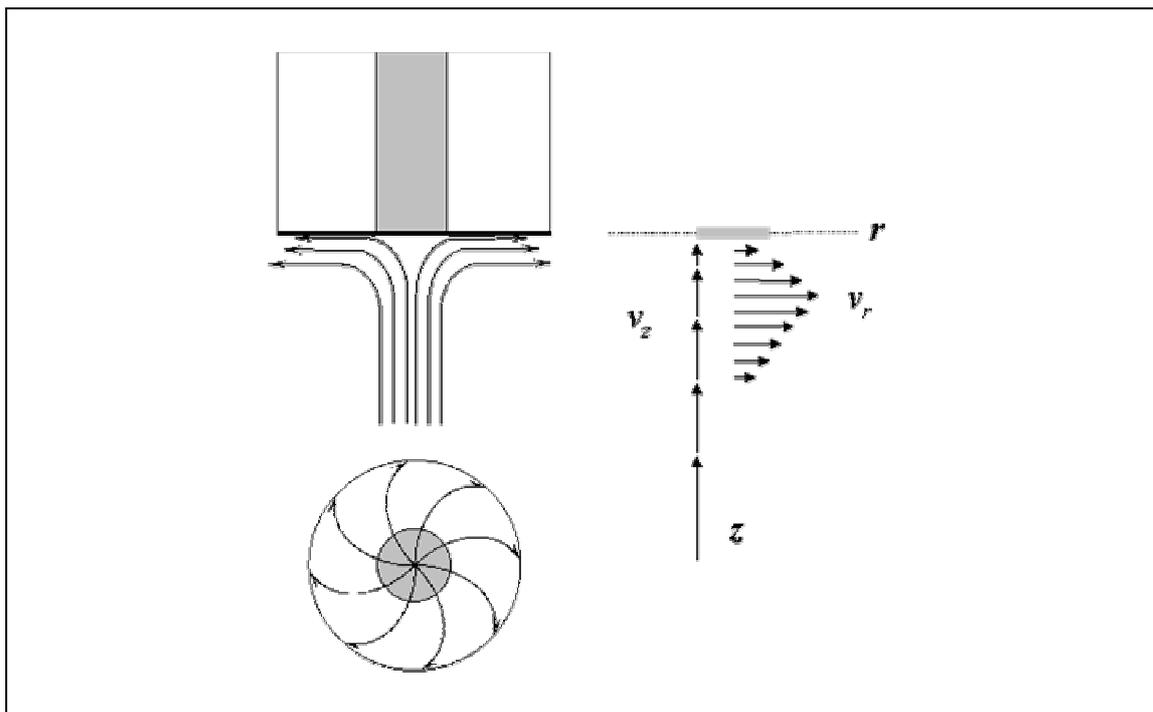


Abbildung 9.2.3 : Schematische Strömungslinien und Geschwindigkeitskomponenten in der Elektrodenumgebung.

Eine Erweiterung der RDE kann durch eine zweite Arbeitselektrode erfolgen, die ringförmig um die Scheibe angeordnet ist (Abbildung 9.2.4). Dieser Aufbau wird als rotierende Ring-Scheiben Elektrode<sup>29</sup> bezeichnet. Durch diese Anordnung können instabile Intermediate oder Folgereaktionen untersucht werden.

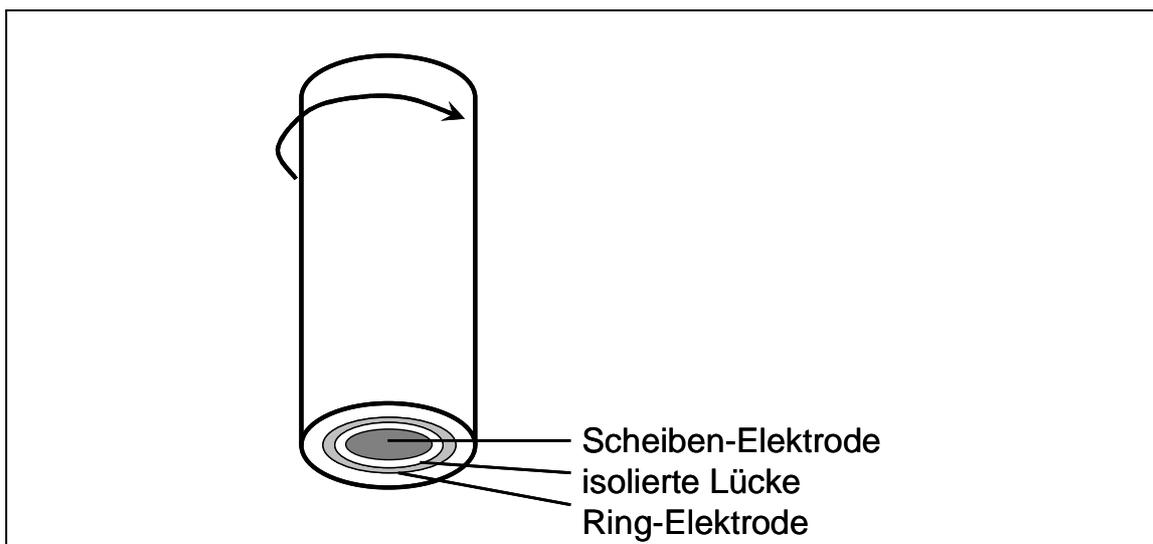


Abbildung 9.2.4 : Aufbau einer rotierenden Ring-Scheiben Elektrode.

<sup>29</sup> Abkürzung RRDE : rotating ring-disc electrode

Die beiden Elektroden sind durch eine Lücke getrennt, die elektrisch nicht leitend ist. An der Kopfseite der Elektrode können beide Elektroden getrennt kontaktiert werden. Somit wird für den Betrieb einer RRDE ein Bipotentiostat benötigt, um beide Elektroden getrennt ansteuern zu können. Das erlaubt es zum Beispiel an der Ring-Elektrode zusätzliche Informationen über die Prozesse an der Scheiben-Elektrode zu erhalten. Den kompletten Aufbau der Apparatur zeigt Abbildung 9.2.5.

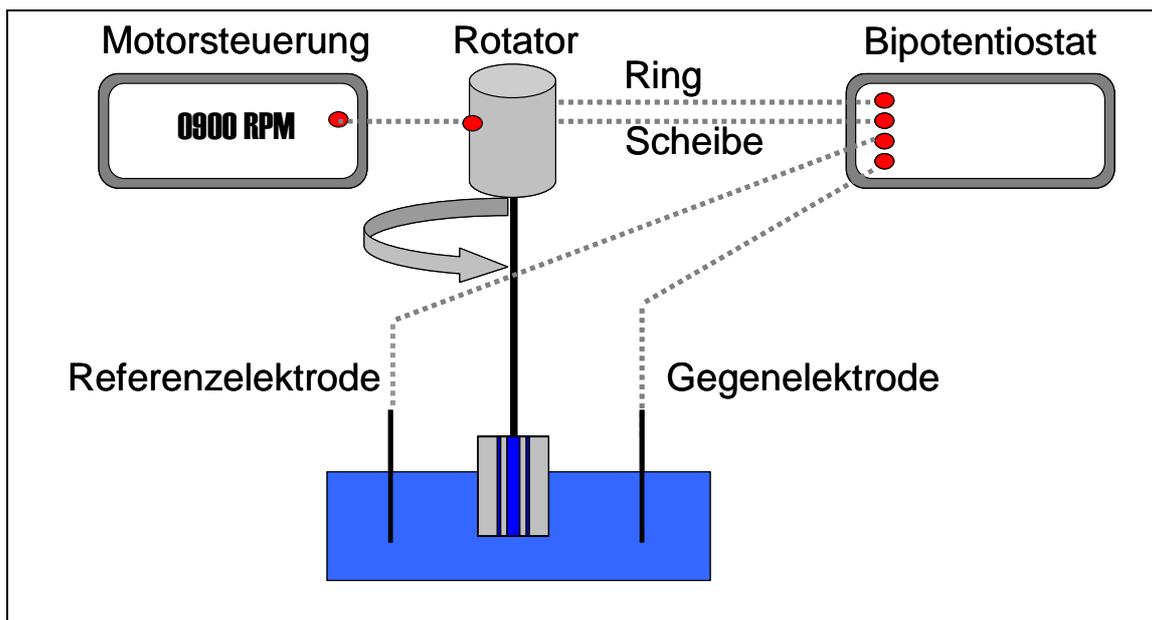


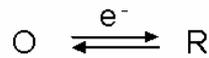
Abbildung 9.2.5 : Schematischer Aufbau eines RRDE – Experimentes.

Referenz-, Gegen- und RRD-Elektrode tauchen gemeinsam in die zu untersuchende Lösung ein. Die RRDE ist als Arbeitselektrode 1 und 2 mit dem Bipotentiostat verbunden. Der Rotator kann extern gesteuert werden, damit die elektrochemischen Prozesse bei unterschiedlichen Rotationsgeschwindigkeiten (d.h. bei unterschiedlichem Massentransport zur Elektrode) untersucht werden können.

### 9.2.3 Strom-Spannungs-Kurven

Wenige Sekunden nach einer Änderung der Parameter an der Elektrode stellt sich wieder ein 'steady state' ein, und Strom und Potential – die sich dann nicht mehr als Funktion der Zeit ändern – können bequem abgelesen werden.

Findet keine homogene chemische Reaktion statt, dann wird der Strom an der Elektrode nur vom Massentransport und/oder der Elektrodenkinetik bestimmt. Für ein einfaches reversibles Redox-System gemäß Formel 9.2.1.



Formel 9.2.1

O            Oxidierte Spezies  
R            Reduzierte Spezies

gilt für den Strom an der Elektrode Formel 9.2.2.

$$i = AF \left( k' e^{\frac{\alpha(E-E^0)F}{RT}} c_0^R - k'' e^{\frac{-(1-\alpha)(E-E^0)F}{RT}} c_0^O \right) \quad \text{Formel 9.2.2}$$

A            Fläche / cm<sup>2</sup>  
F            Faraday-Konstante (96.485 C mol<sup>-1</sup>)  
c<sub>0</sub>        Konzentration an der Elektrodenoberfläche / mol  
k'           Konstante für den heterogenen Elektronentransfer  
E<sup>0</sup>        Standardpotential / V  
α            Transferkoeffizient

Für den Fall, dass  $i = 0$  und die Konzentrationen an der Elektrode gleich denen in der Lösung sind erhält man aus Formel 9.2.2 die bekannte Nernst-Gleichung. Die Potentialdifferenz an der Elektrodenoberfläche beeinflusst die Geschwindigkeiten der Hin- und Rückreaktion unterschiedlich; beim Standardpotential des Redoxpaares sind sie gleich. Durch den exponentiellen Term bedeutet eine kleine Änderung des Potentials eine große Änderung der Rate.

Im Folgenden ist schematisch für den oben genannten Fall ein Steady-State-Voltammogramm gezeigt (für eine konstante Umdrehungsgeschwindigkeit).

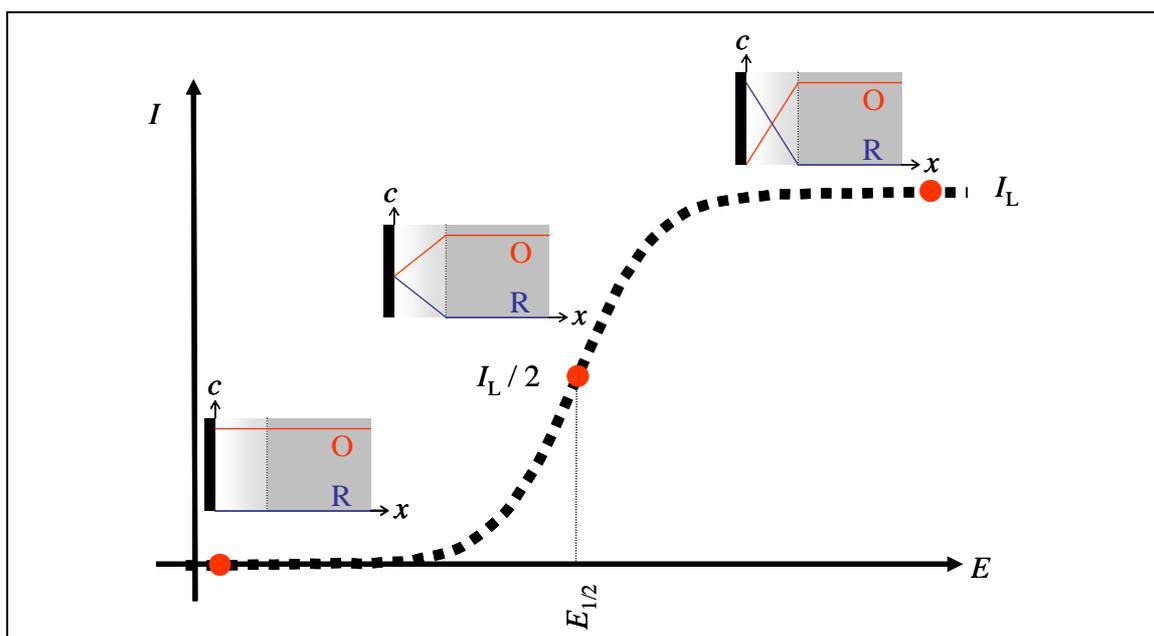


Abbildung 9.2.6 : Steady-State-Voltammogramm an einer rotierenden Elektrode mit Konzentrationsprofilen an charakteristischen Punkten.

Am Anfang ist der Strom 0 und die Konzentrationen sind überall in der Lösung gleichförmig. Mit zunehmendem angelegtem Potential steigen die Gradienten der Spezies in der Diffusionsschicht an. Der Strom läuft in einem Plateau aus ( $I_L$  : limiting current), hier sind die Gradienten maximal. Wenn die Elektrode aktiv genug ist, um die gesamte Menge der Spezies umzusetzen, dann hat das Potential keinen Einfluß mehr auf den transport-kontrollierten Grenzstrom  $I_L$ .

Da dieser Strom nur vom Massentransport zur Elektrode kontrolliert wird, ist die Höhe des Stromflusses an einer gegebenen Elektrode nur eine Funktion der Rotationsgeschwindigkeit. Diesen Zusammenhang zwischen Rotation und  $I_L$  beschreibt die Levich-Gleichung in Formel 9.2.3.

$$I_L = 0,201zFAD^{\frac{2}{3}}\nu^{-\frac{1}{6}}c\omega^{\frac{1}{2}} \quad \text{Formel 9.2.3}$$

$z$	Anzahl der Elektronen
$F$	Faraday-Konstante (96.485 C mol <sup>-1</sup> )
$A$	Fläche / cm <sup>2</sup>
$D$	Diffusionskoeffizient / cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
$\nu$	Kinematische Viskosität / cm <sup>2</sup> s
$c$	Konzentration der Spezies / mol
$\omega$	Rotationsgeschwindigkeit / rpm

Durch unterschiedliche Konstanten kann die Gleichung für Geschwindigkeiten in Hz oder rad·s<sup>-1</sup> leicht umgeformt werden.





Am Ring wird also weniger B detektiert als ohne die Zerfallsreaktion. Das Übertragungsverhältnis wird also kleiner. Eine schematische Auftragung der Ring- und Scheibenströme zeigt Abbildung 9.2.7.

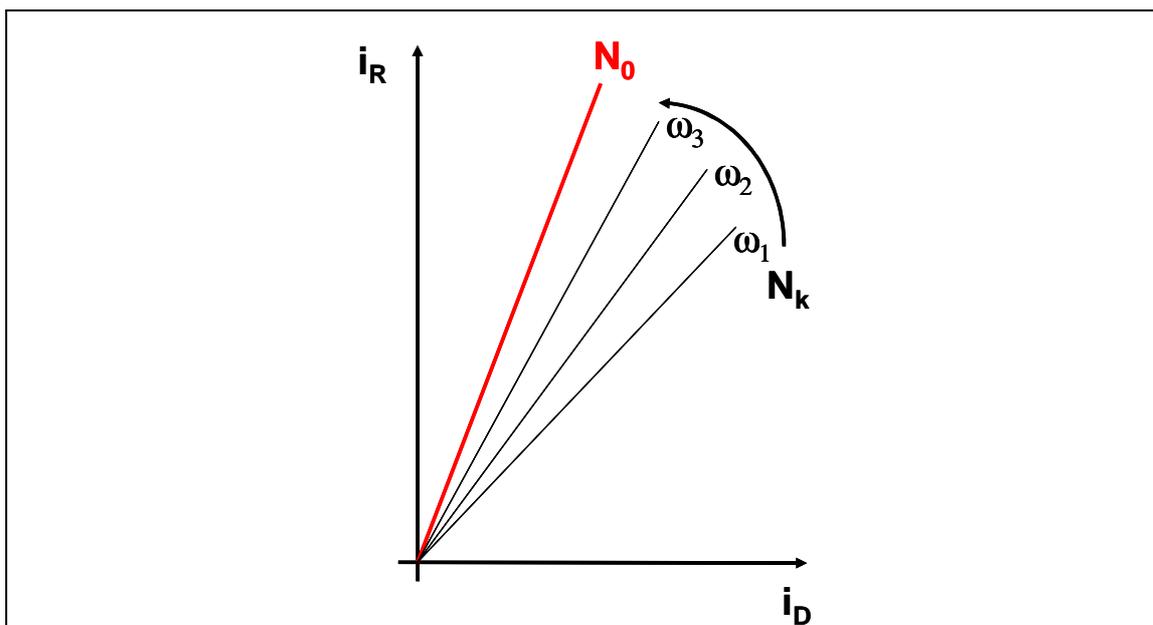


Abbildung 9.2.7 : Kinetikbestimmung einer Reaktion erster Ordnung mit RRDE

Für jede Rotationsgeschwindigkeit erhält man ein individuelles, kinetisches Übertragungsverhältnis  $N_k$ . Erhöht man die Rotationsgeschwindigkeit ( $\omega_1 < \omega_2 < \omega_3$ ) so nähert sich das Übertragungsverhältnis dem theoretischen Wert  $N_0$  an. Anders ausgedrückt, je langsamer die Elektrode rotiert, desto mehr Zeit hat B zu zerfallen, bevor es am Ring detektiert wird. Aus  $N_k$  kann durch mehrere Umformungen  $k_1$  ermittelt werden. Die ausführliche Herleitung dieser Gleichungen findet sich bei Albery und Hitchman [Albery, Hitchman 1971].

### 9.2.5.2 Kinetikbestimmung für Reaktionen zweiter Ordnung

Auch die Geschwindigkeitskonstante einer bimolekularen Reaktion kann durch RRDE-Experimente bestimmt werden. Die betrachtete Reaktion ist:



Formel 9.2.6



Ring:



Die bei einem solchen Experiment resultierenden Ring-/Scheibenstrom-Diagramme zeigen Charakteristika einer Durchbruchs-Kinetik. Wenn die Reaktion zwischen B und C schnell ist, kann kein B in Gegenwart von C existieren. Erst wenn elektrochemisch mehr B gebildet wird, als C durch den Massentransport zur Elektrode gelangt, kann B am Ring detektiert werden. Je höher die Rotation, desto mehr C wird zur Scheibe transportiert und desto später erfolgt der Durchbruch von B zum Ring.

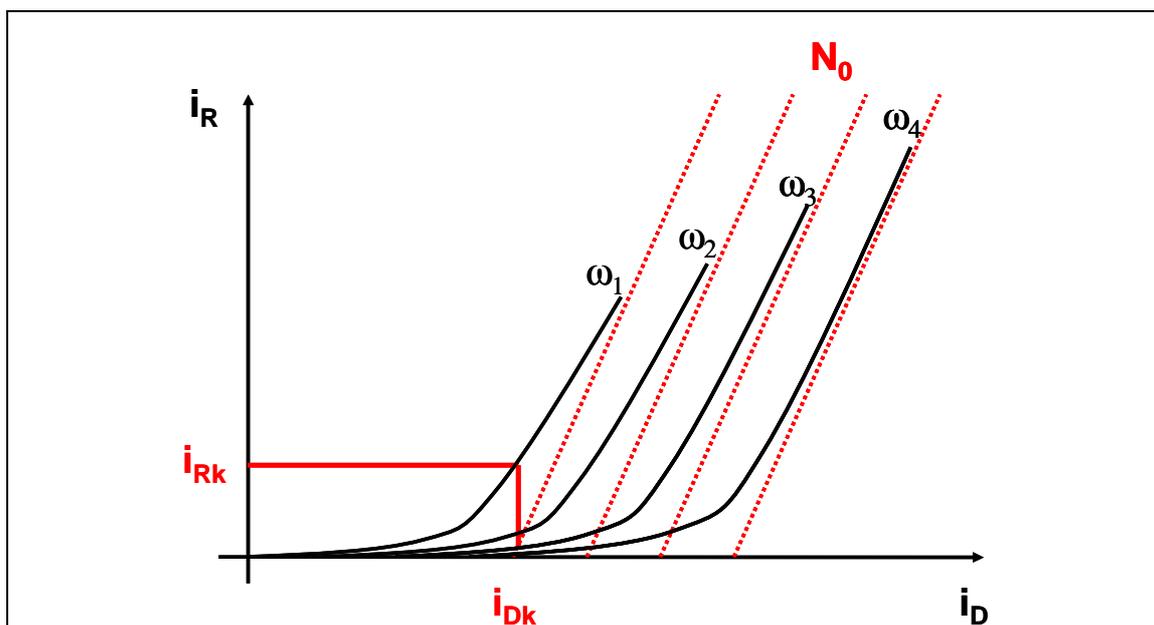


Abbildung 9.2.8 : Kinetikbestimmung einer Reaktion zweiter Ordnung mit RRDE

Alle Stromverläufe enden asymptotisch in einer Geraden, deren Steigung dem theoretischen  $N_0$  entspricht. Aus der Extrapolation dieser Geraden auf die Achse erhält man Werte-Paare kinetischer Ring- und Scheibenströme  $i_{Rk} / i_{Dk}$ , aus denen mit Formel 9.2.7 die kinetische Konstante der Reaktion ermittelt werden kann.

$$i_{Rk} = 0,201\pi^2 zFD\nu^{-\frac{1}{2}}\omega^{\frac{3}{2}}k_2^{-1} \quad \text{Formel 9.2.7}$$

z	Anzahl der Elektronen
F	Faraday-Konstante ( $96.485 \text{ C mol}^{-1}$ )
D	Diffusionskoeffizient / $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$
$\nu$	Kinematische Viskosität / $\text{cm}^2 \text{ s}$
$\omega$	Rotationsgeschwindigkeit / rpm
$k_2$	Kinetische Konstante 2. Ordnung

### 9.3 Literaturverzeichnis

- Abo M, Dejima M, Asano F, Okubo A, Yamazaki S (2000)** Electrochemical enzymatic deoxygenation of chiral sulfoxides utilizing DMSO reductase. *Tetrahedron: Asymmetry* 11: 823-828.
- Albery WJ, Hitchman ML (1971)** Ring-Disc Electrodes. Oxford (UK): Clarendon.
- Alkasrawi M, Popescu IC, Laurinavicius V, Mattiasson B, Csoregi E (1999)** A redox hydrogel integrated PQQ-glucose dehydrogenase based glucose electrode. *Anal. Commun.* 36: 395-398.
- Anagnostopoulos GK, Tsiakos S, Margantinis G, Kostopoulos P, Arvanitidis D (2004)** Esomeprazole versus omeprazole for the eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Clinical Gastroenterology* 38: 503-506.
- Antoine O, Durand R (2000)** RRDE study of oxygen reduction on Pt nanoparticles inside Nafion (R): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in PEMFC cathode conditions. *J. Appl. Electrochem.* 30: 839-844.
- Apitz A, van Pee KH (2001)** Isolation and characterization of a thermostable intracellular enzyme with peroxidase activity from *Bacillus sphaericus*. *Arch. Microbiol.* 175: 405-412.
- Arnao MB, Casas JL, Delrio JA, Canovas FG, Acosta M, Sabater F (1990)** Use of 2,2'-Azino-Bis-(3-Ethylbenzothiazol-6-Sulfonic Acid) (Abts) for the Measurement of Peroxidase-Activity in Tomato Fruit Extracts. *Revista De Agroquimica Y Tecnologia De Alimentos* 30: 333-340.
- Atkins P (2000)** *Physikalische Chemie* 2. Ausgabe. Weinheim: VCH.
- Ayala M, Horjales E, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R (2002)** Cross-linked crystals of chloroperoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295: 828-831.
- Baciacchi E, Lanzalunga O, Pirozzi B (1997)** Oxidations of benzyl and phenethyl phenyl sulfides. Implications for the mechanism of the microsomal and biomimetic oxidation of sulfides. *Tetrahedron* 53: 12287-12298.
- Bard AJ, Faulkner LR (2001)** *Electrochemical Methods : Fundamentals and Application* 2. Ausgabe. New York: John Wiley & Sons.
- Bartlett PN, Pletcher D, Zeng J (1999)** Approaches to the integration of electrochemistry and biotechnology - II. The horseradish peroxidase catalyzed oxidation of 2,4,6-trimethylphenol by electrogenerated hydrogen peroxide. *J. Electrochem. Soc.* 146: 1088-1092.
- Bartlett PN, Denuault G (2002)** persönliche Mitteilung. Southampton.
- Bergel A, Mahenc J, Comtat M (1985)** Electroenzymatic Reactor - a Comparative Theoretical-Study. *Bull. Soc. Chim. Fr.*: 1066-1069.
- Bergel A, Comtat M (1986)** Electroenzymatic Reactors with Coenzyme Regeneration - a Theoretical Approach. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 728-735.
- Bergel A, DevauxBasseguy R (1996)** First attempts in bioelectrochemical engineering. *J. Chim. Phys.-Chim. Biol.* 93: 753-762.
- Biber B, Otte V, Pallas M, Tust U, Walek W (1990)** Synergistic fungicides against *Phytophthora infestans* - contg. halo-substd. 1,2,4-thiadiazole sulphoxide and triphenyl-tin acetate or 2,4-di chloro-6-chloro anilino-1,3,5-triazine., *DE 4 032 414*.
- Bisswanger H (1979)** *Theorie und Methoden der Enzymkinetik*. Weinheim: Verlag Chemie.

- Bogdanovskaya VA, Tarasevich MR (1996)** Electrochemical biosensors for medicine and ecology. *Biosens. Bioelectron.* 11: 853-861.
- Bradford MM (1976)** Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brielbeck B, Frede M, Steckhan E (1994)** Continuous Electroenzymatic Synthesis Employing the Electrochemical Enzyme Membrane Reactor. *Biocatalysis* 10: 49-64.
- Brik-Ternbach M (2003)** persönliche Mitteilung. Jülich.
- Brunel JM, Diter P, Duetsch M, Kagan HB (1995)** Highly Enantioselective Oxidation of Sulfides Mediated By a Chiral Titanium Complex. *J. Org. Chem.* 60: 8086-8088.
- Brunel JM, Kagan HB (1996a)** Catalytic enantioselective oxidation of sulfides with a chiral titanium complex. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 133: 1109-1115.
- Brunel JM, Kagan HB (1996b)** Catalytic asymmetric oxidation of sulfides with high enantioselectivities. *Synlett*: 404-406.
- Bryce GF, Shapiro SS (1990)** Treatment of conditions associated with photo-damaged skin - by topical application of tetra hydro naphthalene- or indane-propenyl phenyl sulfoxide cpds., US 5 061 733.
- Buchholz K, Kasche V (1997)** Biokatalysatoren und Enzymtechnologie. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Calvo EJ, Danilowicz C (1997)** Amperometric enzyme electrodes. *J. Braz. Chem. Soc.* 8: 563-574.
- Cantet J, Bergel A, Comtat M (1996)** Coupling of the electroenzymatic reduction of NAD(+) with a synthesis reaction. *Enzyme Microb. Technol.* 18: 72-79.
- Carmichael RD, Jones A, Pickard MA (1986)** Semicontinuous and Continuous Production of Chloroperoxidase By *Caldariomyces-Fumago* Immobilized in K-Carrageenan. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 276-280.
- Cashman JR (1998)** Stereoselectivity in S- and N-oxygenation by the mammalian flavin-containing and cytochrome P-450 monooxygenases. *Drug Metabolism Reviews* 30: 675-707.
- Chen JK, Nobe K (1993)** Oxidation of Dimethylaniline By Horseradish-Peroxidase and Electrogenerated Peroxide .1. Free Enzyme Studies. *J. Electrochem. Soc.* 140: 299-303.
- Cirino PC, Arnold FH (2002a)** Regioselectivity and activity of cytochrome P450 BM-3 and mutant F87A in reactions driven by hydrogen peroxide. *Adv. Synth. Catal.* 344: 932-937.
- Cirino PC, Arnold FH (2002b)** Protein engineering of oxygenases for biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 130-135.
- Cirino PC, Arnold FH (2003)** A self-sufficient peroxide-driven hydroxylation biocatalyst. *Angew. Chem.-Int. Edit.* 42: 3299-3301.
- Colonna S, Gaggero N, Richelmi C, Pasta P (1999)** Recent biotechnological developments in the use of peroxidases. *Trends Biotechnol.* 17: 163-168.
- Conesa A, Weelink G, van den Hondel C, Punt PJ (2001)** C-terminal propeptide of the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase: an intramolecular chaperone? *FEBS Lett.* 503: 117-120.
- Conesa A, Punt PJ, van den Hondel C (2002)** Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *Journal of Biotechnology* 93: 143-158.

- Cornish-Bowden A (1995)** Fundamentals of enzyme kinetics. London: Portland Press Ltd.
- Degenring D, Schröder I, Wandrey C, Liese A, Greiner L (2004)** Resolution of 1,2-Diols by Enzyme-Catalyzed Oxidation with Anodic, Mediated Cofactor Regeneration in the Extractive Membrane Reactor: Gaining Insight by Adaptive Simulation. OPRD 8: 213-218.
- Delecouls K, Basseguy R, Bergel A (1998)** Some aspects of bioelectrochemistry - Prospects for using electrochemical processes at an industrial scale. Actual Chim.: 91-94.
- Delecouls-Servat K, Basseguy R, Bergel A (2002a)** Membrane electrochemical reactor (MER): application to NADH regeneration for ADH-catalysed synthesis. Chem. Eng. Sci. 57: 4633-4642.
- Delecouls-Servat K, Basseguy R, Bergel A (2002b)** Designing membrane electrochemical reactors for oxidoreductase- catalysed synthesis. Bioelectrochemistry 55: 93-95.
- Dembitsky VM (2003)** Oxidation, epoxidation and sulfoxidation reactions catalysed by haloperoxidases. Tetrahedron 59: 4701-4720.
- Demontellano PRO (1992)** Catalytic Sites of Hemoprotein Peroxidases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 32: 89-107.
- Drauz K, Waldmann H (1995)** Enzyme Catalysis in Organic Synthesis 2. Ausgabe. Weinheim: VCH.
- Drogui P, Elmaleh S, Rumeau M, Bernard C, Rambaud A (2001)** Hydrogen peroxide production by water electrolysis: Application to disinfection. J. Appl. Electrochem. 31: 877-882.
- Dunford HB (2000)** Peroxidase-catalyzed halide ion oxidation. Redox Rep. 5: 169-171.
- Farinas ET, Schwaneberg U, Glieder A, Arnold FH (2001)** Directed evolution of a cytochrome P450 monooxygenase for alkane oxidation. Adv. Synth. Catal. 343: 601-606.
- Firestone RA (1985)** Allylsulfoxide enzyme inhibitors. US 4 670 470.
- Fisher RJ, Fenton JM, Iranmahboob J (2000)** Electro-enzymatic synthesis of lactate using electron transfer chain biomimetic membranes. J. Membr. Sci. 177: 17-24.
- Franssen MCR, Vanderplas HC (1992)** Haloperoxidases - Their Properties and Their Use in Organic- Synthesis. Adv. Appl. Microbiol. 37: 41-99.
- Franssen MCR (1994)** Halogenation and Oxidation Reactions With Haloperoxidases. Biocatalysis 10: 87-111.
- Friebe WG, Kampe W, Mertin J, Reinholz E, Wilhelms OH (1987)** New omega phenoxy-alkyl thioether derivs. - and corresp. sulphoxide and sulphone cpds., useful as antiallergic agents., EP 232 820.
- Friedman M, Williams DL, Masri MS (1974)** Reductive alkylation of proteins with aromatic aldehydes and sodium cyanoborohydride. Int. J. Peptide Protein Res. 6: 183-185.
- Fritsche W (2002)** Mikrobiologie. Heidelberg: Spektrum.
- Geigert J, Neidleman SL (1983)** Rational Selection of Substrates to Be Halogenated by Haloperoxidases. Developments in Industrial Microbiology 24: 385-388.
- Geigert J, Neidleman SL, Dalietos DJ (1983a)** Novel Haloperoxidase Substrates - Alkynes and Cyclopropanes. J. Biol. Chem. 258: 2273-2277.
- Geigert J, Neidleman SL, Dalietos DJ, Dewitt SK (1983b)** Novel Haloperoxidase Reaction - Synthesis of Dihalogenated Products. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1575-1581.

- Geigert J, Neidleman SL, Dalietos DJ, Dewitt SK (1983c)** Haloperoxidases - Enzymatic-Synthesis of Alpha,Beta-Halohydrins from Gaseous Alkenes. Appl. Environ. Microbiol. 45: 366-374.
- Habeeb AFSA (1966)** Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. Anal. Biochem. 14: 328-336.
- Haberland J, Hummel W, Dausmann T, Liese A (2002)** New continuous production process for enantiopure (2R,5R)-hexanediol. OPRD 6: 458-462.
- Habermuller L, Mosbach M, Schuhmann W (2000)** Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. Fresenius J. Anal. Chem. 366: 560-568.
- Hager LP, Morris DR, Brown FS, Eberwein H (1966)** Chloroperoxidase. 2. Utilization of Halogen Anions. J. Biol. Chem. 241: 1769-1777.
- Hamann CH, Vielstich W (1998)** Elektrochemie 3. Ausgabe. Weinheim: Wiley-VCH.
- Hauer B (2002)** persönliche Mitteilung. Ludwigshafen.
- Heaney H (1993)** Novel Organic Peroxygen Reagents For Use in Organic-Synthesis. Top. Curr. Chem. 164: 1-19.
- Hilt G, Lewall B, Montero G, Utley JHP, Steckhan E (1997)** Efficient in-situ redox catalytic NAD(P)(+) regeneration in enzymatic synthesis using transition-metal complexes of 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its N-monomethylated derivative as catalysts. Liebigs Ann.-Recl.: 2289-2296.
- Hoffmann R (1979)** Stereochemie [2,3]-sigmatroper Umlagerungen. Angew. Chem. 91: 625-634.
- Holland HL, Brown FM (1998)** Biocatalytic and chemical preparation of all four diastereomers of methionine sulfoxide. Tetrahedron: Asymmetry 9: 535-538.
- Holland HL, Andreana PR, Brown FM (1999)** Biocatalytic and chemical routes to all the stereoisomers of methionine and ethionine sulfoxides. Tetrahedron: Asymmetry 10: 2833-2843.
- Holland HL (2001)** Biotransformation of organic sulfides. Nat. Prod. Rep. 18: 171-181.
- Holland HL, Brown FM, Lozada D, Mayne B, Szerminski WR, van Vliet AJ (2002)** Chloroperoxidase-catalyzed oxidation of methionine derivatives. Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim. 80: 633-639.
- Hollmann F, Schmid A, Steckhan E (2001)** The first synthetic application of a monooxygenase employing indirect electrochemical NADH regeneration. Angew. Chem.-Int. Edit. 40: 169-171.
- Hollmann F, Witholt B, Schmid A (2002)** [Cp\*Rh(bpy)(H<sub>2</sub>O)](2+): a versatile tool for efficient and non-enzymatic regeneration of nicotinamide and flavin coenzymes. J. Mol. Catal. B-Enzym. 19: 167-176.
- Hollmann F, Lin PC, Witholt B, Schmid A (2003)** Stereospecific biocatalytic epoxidation: The first example of direct regeneration of a FAD-dependent monooxygenase for catalysis. J. Am. Chem. Soc. 125: 8209-8217.
- Hollmann F, Schmid A (2004)** Electrochemical regeneration of oxidoreductases for cell-free biocatalytic redox reactions. Biocatal. Biotransform. 22: 63-88.
- Jander G (1989)** Maßanalyse ; Jander / Jahr 15. Ausgabe. Edited by Schulze G, Simon J. Berlin: de Gruyter.
- Jones CW (1999)** Applications of Hydrogen Peroxide and Derivatives. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Kagan HB, Rebiere F (1990)** Some Routes to Chiral Sulfoxides With Very High Enantiomeric Excesses. Synlett: 643-650.
- Kagan HB, Rebiere F, Samuel O (1991)** New Approaches For Asymmetric-Synthesis of Sulfoxides. Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem. 58: 89-110.
-

- Kano K, Ikeda T (2000)** Fundamentals and practices of mediated bioelectrocatalysis. *Anal. Sci.* 16: 1013-1021.
- Kano K, Ikeda T (2003)** Bioelectrocatalysis, powerful means of connecting electrochemistry to biochemistry and biotechnology. *Electrochemistry* 71: 86-99.
- Karlson P, Doenecke D, Koolman J (1994)** Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler 14. Ausgabe. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Kato K, Kano K, Ikeda T (2000)** Electrochemical characterization of carbon felt electrodes for bulk electrolysis and for biocatalyst-assisted electrolysis. *J. Electrochem. Soc.* 147: 1449-1453.
- Katsuki T, Sharpless KB (1980)** The First Practical Method for Asymmetric Epoxidation. *J. Am. Chem. Soc.* 102: 5974-5976.
- Koeller KM, Wong CH (2001)** Enzymes for chemical synthesis. *Nature* 409: 232-240.
- Laane C, Pronk W, Franssen M, Veeger C (1984)** Use of a Bioelectrochemical Cell for the Synthesis of (Bio)Chemicals. *Enzyme Microb. Technol.* 6: 165-168.
- Laane C, Weyland A, Franssen M (1986)** Bioelectrosynthesis of Halogenated Compounds Using Chloroperoxidase. *Enzyme Microb. Technol.* 8: 345-348.
- Lang HJ, Weidmann K, Herling AW (1988)** New benzimidazole sulphide, sulphoxide or sulphone derivs. - useful for treating gastrointestinal disorders., EP 298 440.
- Lee K, Brand JM, Gibson DT (1995)** Stereospecific Sulfoxidation by Toluene and Naphthalene Dioxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 9-15.
- Lee K, Moon SH (2003)** Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. *Journal of Biotechnology* 102: 261-268.
- Levenspiel O (1999)** Chemical Reaction Engineering 3 Ausgabe. New York: John Wiley & Sons.
- Li W, Nonaka T (1997)** Paired electrosynthesis of a nitron. *Chem. Lett.*: 1271-1272.
- Li W, Nonaka T (1999a)** Paired electrosynthesis of aminoiminomethane-sulfonic acids. *Electrochim. Acta* 44: 2605-2612.
- Li W, Nonaka T (1999b)** Development of a cathodic oxidation system and its application to paired electrosynthesis of sulfones and nitrones. *J. Electrochem. Soc.* 146: 592-599.
- Li W, Nonaka T, Chou TC (1999)** Paired electrosynthesis of organic compounds. *Electrochemistry* 67: 4-10.
- Liese A, Seelbach K, Wandrey C (2000)** Industrial Biotransformations 1. Ausgabe. Weinheim: VCH.
- Liese A (2003)** Biological Principles Applied To Technical Asymmetric Catalysis [Habilitation]. Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität.
- Littlechild J (1999)** Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3: 28-34.
- Lund H (2002)** A century of organic electrochemistry. *J. Electrochem. Soc.* 149: S21-S33.
- Lütz S (2000)** Elektroenzymatische Reaktionen mit Chloroperoxidase aus *Leptoxyphium fumago* [Diplomarbeit]. Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität.
- Lütz S, Steckhan E, Liese A (2004)** First asymmetric electroenzymatic oxidation catalyzed by a peroxidase. *Electrochem. Commun.* 6: 583-587.
- Maguire AR, Papot S, Ford A, Touhey S, O'Connor R, Clynes M (2001)** Enantioselective synthesis of sulindac. *Synlett*: 41-44.

- Mano N, Mao F, Heller A (2003)** Characteristics of a miniature compartment-less glucose-O-2 biofuel cell and its operation in a living plant. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 6588-6594.
- Metelitzka DI, Litvinchuk AV, Savenkova MI (1991)** Peroxidase-Catalyzed Cooxidation of Halogen-Substituted Phenols and 4-Aminoantipyrene. *Journal of Molecular Catalysis* 67: 401-411.
- Morris DR, Hager LP (1965)** Chloroperoxidase. I. Isolation and Properties of the Crystalline Glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 241: 1763-1768.
- Neidleman SL, Geigert J (1987)** Biological Halogenation - Roles in Nature, Potential in Industry. *Endeavour* 11: 5-15.
- Ozaki S, Demontellano PRO (1995)** Molecular Engineering of Horseradish-Peroxidase - Thioether Sulfoxidation and Styrene Epoxidation by Phe-41 Leucine and Threonine Mutants. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 7056-7064.
- Ozaki SI, Demontellano PRO (1994)** Molecular Engineering of Horseradish-Peroxidase - Highly Enantioselective Sulfoxidation of Aryl Alkyl Sulfides by the Phe-41- Leu Mutant. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 4487-4488.
- Palmore GTR, Kim HH (1999)** Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell. *J. Electroanal. Chem.* 464: 110-117.
- Palucki M, Hanson P, Jacobsen EN (1992)** Asymmetric Oxidation of Sulfides with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Catalyzed by (Salen)Mn(III) Complexes. *Tetrahedron Lett.* 33: 7111-7114.
- Patchett AA, Wyvratt MJ (1984)** New sulphoxide and sulphone derivs. of bi cyclic lactam(s) - are converting enzyme inhibitors and antihypertensives., US 4 617 301.
- Peters MW, Meinhold P, Glieder A, Arnold FH (2003)** Regio- and enantioselective alkane hydroxylation with engineered cytochromes P450 BM-3. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 13442-13450.
- Petersen A, Steckhan E (1999)** Continuous indirect electrochemical regeneration of galactose oxidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7: 2203-2208.
- Pickard MA (1981)** A Defined Growth-Medium for the Production of Chloroperoxidase by *Caldariomyces-Fumago*. *Canadian Journal of Microbiology* 27: 1298-1305.
- Pickard MA, Hashimoto A (1982)** Isoenzymes of Chloroperoxidase from *Caldariomyces-Fumago*. *Canadian Journal of Microbiology* 28: 1382-1388.
- Pitchen P, Dunach E, Deshmukh MN, Kagan HB (1984)** An Efficient Asymmetric Oxidation of Sulfides to Sulfoxides. *J. Am. Chem. Soc.* 106: 8188-8193.
- Plapp BV, Chadha VK (1984)** Antidote for toxic alcohol poisoning - consists of tetra hydro thiophene-1-oxide derivs. as liver alcohol dehydrogenase inhibitors. US 4 482 568.
- Pletcher D (1992)** *A First Course in Electrode Processes*. Romsey: The Electrochemical Consultancy.
- Pletcher D (1999)** Indirect oxidations using electrogenerated hydrogen peroxide. *Acta Chem. Scand.* 53: 745-750.
- Pommer E-H, Graf H, Rentzea C, Ammermann E, Fröhlich H, Richarz W (1983)** Pyridazinone derivatives, their preparation and their use as fungicides. DE 3 328 770.
- Pütter H, Hannebaum H (1997)** Production of phtalides by cathodic reduction of phtalic acid or its derivatives. German Patent, 19 618 854.

- 
- Pütter H (2000)** Industrial Electroorganic Chemistry. In: Organic Electrochemistry. An Introduction and a Guide., edn 4. Edited by Lund H, Hammerich O: Marcel Dekker.
- Rai GP, Zong Q, Hager LP (2000)** Isolation of directed evolution mutants of chloroperoxidase resistant to suicide inactivation by primary olefins. *Isr. J. Chem.* 40: 63-70.
- Rai GP, Sakai S, Florez AM, Mogollon L, Hager LP (2001)** Directed evolution of chloroperoxidase for improved epoxidation and chlorination catalysis. *Adv. Synth. Catal.* 343: 638-645.
- Rao N (2002)** persönliche Mitteilung. Jülich.
- Reipa V, Mayhew MP, Vilker VL (1997)** A direct electrode-driven P450 cycle for biocatalysis. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 94: 13554-13558.
- Rissom S, SchwarzLinek U, Vogel M, Tishkov VI, Kragl U (1997)** Synthesis of chiral epsilon-lactones in a two-enzyme system of cyclohexanone mono-oxygenase and formate dehydrogenase with integrated bubble-free aeration. *Tetrahedron: Asymmetry* 8: 2523-2526.
- Roberts SM (2000)** Preparative biotransformations. *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1:* 611-633.
- Roy K-M (2002)** Sulfones and Sulfoxides. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Edited by: Wiley-VCH.
- Ruan C, Yang R, Chen XH, Deng JQ (1998)** A reagentless amperometric hydrogen peroxide biosensor based on covalently binding horseradish peroxidase and thionine using a thiol-modified gold electrode. *J. Electroanal. Chem.* 455: 121-125.
- Saito Y, Mifune M, Nakashima S, Odo J, Tanaka Y, Chikuma M, Tanaka H (1987)** Determination of Hydrogen-Peroxide With N,N-Diethylaniline and 4-Aminoantipyrine By Use of an Anion-Exchange Resin Modified With Manganese Tetrakis(Sulfophenyl)Porphine, As a Substitute For Peroxidase. *Talanta* 34: 667-669.
- Sanfilippo C, Patti A, Nicolosi G (2000)** Asymmetric oxidation of 1,3-cyclohexadiene catalysed by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Tetrahedron: Asymmetry* 11: 3269-3272.
- Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B (2001)** Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409: 258-268.
- Schröder I (2003)** Elektrochemische Oxidation von Nukleotidkofaktoren. Charakterisierung und Prozessentwicklung asymmetrischer enzymatischer Katalysesysteme. [Dissertation]. Bonn: Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität.
- Schröder I, Steckhan E, Liese A (2003)** In situ NAD(+) regeneration using 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) as an electron transfer mediator. *J. Electroanal. Chem.* 541: 109-115.
- Schumpe A, Adler I, Deckwer WD (1978)** Solubility of Oxygen in Electrolyte-Solutions. *Biotechnol. Bioeng.* 20: 145-150.
- Seelbach K (1997)** Chloroperoxidase - Ein industrieller Katalysator ? Regio- und enantioselektive Oxidationen [Ph.D. Thesis]. Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität.
-

- Seelbach K, vanDeurzen MPJ, vanRantwijk F, Sheldon RA, Kragl U (1997)** Improvement of the total turnover number and space-time yield for chloroperoxidase catalyzed oxidation. *Biotechnol. Bioeng.* 55: 283-288.
- Sharpless KB, Verhoeven TR (1979)** Metal-Catalyzed, Highly Selective Oxygenations of Olefins and Acetylenes with tert-Butyl Hydroperoxide. *Practical Considerations and Mechanisms.* *Aldrichimica Acta* 12: 63-74.
- Sheldon RA (1993)** Homogeneous and Heterogeneous Catalytic Oxidations With Peroxide Reagents. *Top. Curr. Chem.* 164: 21-43.
- Shen Y, Atobe M, Li W, Nonaka T (2003)** Paired electrosynthesis of epoxides and dibromides from olefinic compounds. *Electrochim. Acta* 48: 1041-1046.
- Steckhan E (1986)** Indirect Electroorganic Syntheses - a Modern Chapter of Organic Electrochemistry. *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.* 25: 683-701.
- Steckhan E (1992)** Indirekte Elektrochemische Prozesse. In: *Elektrochemische Stoffgewinnung: Grundlagen und Verfahrenstechnik.* Edited by Sandstede N: Dechema; 725-752. Dechema Monographien, vol 125.
- Steckhan E (1994)** Electroenzymatic Synthesis. In: *Electrochemistry V.* Edited by: Springer-Verlag Berlin; 83-111. *Topics in Current Chemistry*, vol 170.
- Steckhan E (2000)** Organic Electrochemistry. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Electronic Release, edn 6th.* Edited by Bailey JE, Bohnet M, Brinder J: Wiley-VCH. vol A9.
- Steckhan E, Dötz K-H, Schröder I, Petersen A, Botzem J, Hollmann F, Lewall B (2000)** Kontinuierliche enzymatische Synthesen enantiomerenreiner organischer Zwischenprodukte durch elektrochemische Aktivierung von Redoxenzymen in elektrochemischen Enzymmembranreaktoren - Schlussbericht zum Forschungsvorhaben 11556 N/1. Bonn: Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AiF) e.V.; 48.
- Steckhan E, Arns T, Heineman WR, Hilt G, Hoormann D, Jorissen J, Kroner L, Lewall B, Pütter H (2001)** Environmental protection and economization of resources by electroorganic and electroenzymatic syntheses. *Chemosphere* 43: 63-73.
- Straathof AJJ, Panke S, Schmid A (2002)** The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 548-556.
- Sun WM, Kadima TA, Pickard MA, Dunford HB (1994)** Catalase Activity of Chloroperoxidase and Its Interaction With Peroxidase-Activity. *Biochem. Cell Biol.* 72: 321-331.
- Sundaramoorthy M, Turner J, Poulos TL (1995)** The crystal structure of chloroperoxidase: A heme peroxidase- cytochrome P450 functional hybrid. *Structure* 3: 1367-1377.
- Takahashi K, Nishimura H, Yoshimoto T, Saito Y, Inada Y (1984)** A Chemical Modification to Make Horseradish-Peroxidase Soluble and Active in Benzene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121: 261-265.
- Tamminen A, Vuorilehto K, Ylasaari S (1996)** Scale-up of an electrochemical cell for oxygen removal from water. *J. Appl. Electrochem.* 26: 113-117.
- Tamminen A, Vuorilehto K (1997)** Application of a three-dimensional ion-exchange electrolyte in the deoxygenation of low-conductivity water. *J. Appl. Electrochem.* 27: 1095-1099.
- Tang J, Brackenridge I, Roberts SM, Beecher J, Willetts AJ (1995)** Bakers-Yeast Oxidation of Methyl Para-Tolylsulfide - Synthesis of a Chiral Intermediate in

- the Preparation of the Mevinic Acid-Type Hypocholesteremic Agents. *Tetrahedron* 51: 13217-13238.
- Tarasevich MR, Bogdanovskaya VA, Zhutaeva GV (1993)** Electrochemical Biosensors. *Russ. J. Electrochem.* 29: 1362-1367.
- Tarasevich MR, Bogdanovskaya VA, Kuznetsova LN (2001)** Bioelectrocatalytic reduction of oxygen in the presence of laccase adsorbed on carbon electrodes. *Russ. J. Electrochem.* 37: 833-837.
- ten Brink HB, Tuynman A, Dekker HL, Hemrika W, Izumi Y, Oshiro T, Schoemaker HE, Wever R (1998)** Enantioselective sulfoxidation catalyzed by vanadium haloperoxidases. *Inorg. Chem.* 37: 6780-6784.
- Tisher W, Kasche V (1999)** Immobilised enzymes: crystals or carriers? *Trends Biotechnol.* 17: 326-335.
- Tramper J, Laane C, Bont JAM (1985)** Electrochemical Chlorination of Barbituric Acid. In *Nato Advanced Research Workshop on Enzymes as Catalysts in Organic Syntheses*; Reizensburg, Edited by Schneider MP: Reidel: 387-388.
- Tsujimura S, Tatsumi B, Ogawa J, Shimizu S, Kano K, Ikeda T (2001)** Bioelectrocatalytic reduction of dioxygen to water at neutral pH using bilirubin oxidase as an enzyme and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonate) as an electron transfer mediator. *J. Electroanal. Chem.* 496: 69-75.
- Tuynman A, Vink KS, Dekker HL, Schoemaker HE, Wever R (1998)** The sulphoxidation of thioanisole catalysed by lactoperoxidase and *Coprinus cinereus* peroxidase: Evidence for an oxygen-rebound mechanism. *Eur. J. Biochem.* 258: 906-913.
- Tuynman A, Schoemaker HE, Wever R (2000a)** Enantioselective sulfoxidations catalyzed by horseradish peroxidase, manganese peroxidase, and myeloperoxidase. *Mon. Chem.* 131: 687-695.
- Tuynman A, Spelberg JL, Kooter IM, Schoemaker HE, Wever R (2000b)** Enantioselective epoxidation and carbon-carbon bond cleavage catalyzed by *Coprinus cinereus* peroxidase and myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 275: 3025-3030.
- van de Velde F, van Rantwijk F, Sheldon RA (1999)** Selective oxidations with molecular oxygen, catalyzed by chloroperoxidase in the presence of a reductant. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 6: 453-461.
- van de Velde F, Lourenco ND, Bakker M, van Rantwijk F, Sheldon RA (2000)** Improved operational stability of peroxidases by coimmobilization with glucose oxidase. *Biotechnol. Bioeng.* 69: 286-291.
- van de Velde F, Bakker M, van Rantwijk F, Rai GP, Hager LP, Sheldon RA (2001a)** Engineering chloroperoxidase for activity and stability. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 11: 765-769.
- van de Velde F, van Rantwijk F, Sheldon RA (2001b)** Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. *Trends Biotechnol.* 19: 73-80.
- van Deurzen MPJ, Remkes IJ, van Rantwijk F, Sheldon RA (1997a)** Chloroperoxidase catalyzed oxidations in t-butyl alcohol/water mixtures. *J. Mol. Catal. A-Chem.* 117: 329-337.
- van Deurzen MPJ, Seelbach K, Van Rantwijk F, Kragl U, Sheldon RA (1997b)** Chloroperoxidase: Use of a hydrogen peroxide-stat for controlling reactions and improving enzyme performance. *Biocatal. Biotransform.* 15: 1-16.
- van Deurzen MPJ, van Rantwijk F, Sheldon RA (1997c)** Selective oxidations catalyzed by peroxidases. *Tetrahedron* 53: 13183-13220.

- van Pee KH, Keller S, Wage T, Wynands I, Schnerr H, Zehner S (2000)** Enzymatic halogenation catalyzed via a catalytic triad and by oxidoreductases. *Biol. Chem.* 381: 1-5.
- van Pee KH (2001)** Microbial biosynthesis of halometabolites. *Arch. Microbiol.* 175: 250-258.
- van Rantwijk F, Sheldon RA (2000)** Selective oxygen transfer catalysed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic aspects. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 554-564.
- Vargas RR, Bechara EJH, Marzorati L, Wladislaw B (1999)** Asymmetric sulfoxidation of a beta-carbonyl sulfide series by chloroperoxidase. *Tetrahedron: Asymmetry* 10: 3219-3227.
- Vasic-Racki D (2003)** persönliche Mitteilung. Jülich.
- Vazquez-Duhalt R, Fedorak PM, Westlake DWS (1992)** Role of the enzyme hydrophobicity in biocatalysis in organic media solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 837-841.
- Vuorilehto K, Tamminen A, Ylasaari S (1995)** Electrochemical Removal of Dissolved-Oxygen from Water. *J. Appl. Electrochem.* 25: 973-977.
- Vuorilehto K (1997)** Application of three-dimensional electrodes and the problem of potential distribution. Helsinki: Helsinki University of Technology.
- Vuorilehto K, Tamminen A (1997)** Application of a solid ion-exchange electrolyte three-dimensional electrodes. *J. Appl. Electrochem.* 27: 749-755.
- Vuorilehto K (2003)** persönliche Mitteilung. Jülich.
- Wandrey C, Flaschel E, Schugerl K (1977)** Continuous Operation Mode of Reactions with Soluble Enzymes Using Hollow-Fiber Membranes. *Chem. Ing. Tech.* 49: 257-257.
- Wandrey C (1990)** Enzymes in Membrane Reactors. *Food Biotechnol.* 4: 353-353.
- Wandrey C (2003)** Reaktionstechnik/Technische Reaktionsführung. Vorlesung.
- Wasserwesen N (1992)** Bestimmung des gelösten Sauerstoffs - Iodometrisches Verfahren (ISO 5813 : 1983) Deutsche Fassung EN 25 813. Berlin: DIN Deutsches Institut für Normung e.V.; 1-10.
- Weinberg NL (1997)** Chiral Electrosynthesis for the Pharmaceutical Industry. *Electrosynthesis* 3.
- Wong SS, Wong LC (1992)** Chemical cross-linking and the stabilisation of proteins and enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 866-874.
- Woo SW, Cho JS, Hur BK, Shin DH, Ryu KG, Kim EK (2003)** Hydrogen peroxide, its measurement and effect during enzymatic decoloring of Congo red. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 13: 773-777.
- Xu JJ, Chen HY (2000)** Amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized in electrochemically generated poly(ethacridine). *Anal. Chim. Acta* 423: 101-106.
- Yang Y, Zhang SF, Kingston MA, Jones G, Wright G, Spencer SA (2000)** Glucose sensor with improved haemocompatibility. *Biosens. Bioelectron.* 15: 221-227.
- Zaks A, Dodds DR (1995)** Chloroperoxidase-Catalyzed Asymmetric Oxidations - Substrate- Specificity and Mechanistic Study. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 10419-10424.
- Zong Q, Allain EJ, Hager LP (1997)** Expression of recombinant chloroperoxidase. *Faseb J.* 11: A1158-A1158.