

Prozessentwicklung
zur enzymatischen Synthese chiraler Alkohole
unter elektrochemischer Cofaktorregenerierung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

Vorgelegt von

Falk Hildebrand

Bonn, 2008

Angefertigt mit Genehmigung

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. C. Wandrey

2. Referent: Prof. Dr. S. Waldvogel

Tag der Promotion: 24. Februar 2009

Jahr der Veröffentlichung: 2009

Für Judith und Jan

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2005 bis November 2008 am Lehrstuhl für Technische Chemie der Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. C. Wandrey angefertigt. Die praktischen Arbeiten wurden am Institut für Biotechnologie der Forschungszentrum Jülich GmbH durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt

- Prof. Dr. C. Wandrey für die interessante Themenstellung, das Interesse an der Arbeit, die hilfreichen Diskussionen und die hervorragenden Arbeitsbedingungen,
- Prof. Dr. S. Waldvogel vom Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn für die freundliche Übernahme des Koreferats,
- Dr. Stephan Lütz für die gute Betreuung meiner Arbeit, viele wertvolle Anregungen und die gewährte Freiheit bei der Bearbeitung des Themas,
- Prof. Dr. M. Ansorge–Schumacher für meine Betreuung innerhalb des Graduiertenkollegs und viele gute Vorschläge und Anregungen bei der Immobilisierung von Enzymen,
- Heike Offermann für die unschätzbare Hilfe bei den täglichen Arbeiten, viele wertvolle Ideen, und konstruktive Rückfragen,
- Sebastian Grefen für seinen großen Einsatz und Enthusiasmus, die wertvolle Hilfe bei allen Arbeiten und unzählige Stabilitätsmessungen,
- Marzena Poraj-Kobielska für ihre engagierte Hilfe bei ihrer Diplomarbeit über die gel-immobilisierten Enzyme und ihre Anwendung,
- Tina Kubitzki und Brigitte Osterath für die angenehme Büroatmosphäre, das Interesse am Fortgang der Arbeiten und aufmunternde Worte, sowie die kritische Durchsicht der Arbeit,
- Dr. Christina Kohlmann für die Starthilfe in der Elektrochemie, die vielen konstruktiven Beiträge und die gemeinsame Arbeit im Graduiertenkolleg,
- Doris Hahn, Lilia Härter und Ursula Mackfeld für die Hilfe bei den kleinen Problemen im täglichen Laboralltag,
- Dr. Sven Kühl für die Hilfe bei der Einarbeitung und die Betreuung meiner Diplomarbeit,
- allen Mitgliedern der Enzymgruppe, beziehungsweise Technischen Biokatalyse, für die entspannte und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft,
- Prof. Dr. M. Pohl für wertvolle Beiträge zum Mechanismus der Enzyminaktivierung,
- Marianne Hess für ihre hilfsbereite Art bei Fragen aller Art,
- Albert Paparo für seine engagierte Hilfe bei der Enzymcharakterisierung,

Danksagungen

- allen Mitgliedern und Betreuern des Graduiertenkollegs "Biokatalyse in nicht-konventionellen Lösemitteln" für die zahlreichen Diskussionen und hilfreichen Anmerkungen zu meinem Forschungsthema,
- Ulrich Giesecke und der Firma Resindion für die Spende der Sepabeads[®] und die wertvollen Anmerkungen zu Immobilisierungsprozeduren,
- den Mitarbeitern der mechanischen Werkstätten des Instituts, der IT-Abteilung und der Glasbläserei für die hervorragende und zügige Hilfe bei allen technischen Problemen,
- allen anderen Mitarbeitern des Instituts für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Chirale Alkohole als wertvolle Synthesebausteine	1
1.2	Klassische chemische Methoden.....	2
1.2.1	Racematspaltung und Chromatographie	2
1.2.2	Chiral Pool und chirale Auxiliare	3
1.2.3	Stereoselektive Synthese durch Metall-Katalyse	5
1.3	Biokatalytische Synthesen	7
1.4	Alkoholdehydrogenasen und Cofaktorregenerierung	9
1.4.1	Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung	10
1.4.2	Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung	10
1.4.3	Elektrochemische Cofaktorregenerierung.....	11
1.4.4	Weitere Methoden der Cofaktorregenerierung.....	11
1.4.5	ADH aus <i>Lactobacillus brevis</i>	11
1.5	Elektroenzymatische Synthesen	13
1.5.1	Oxidationsreaktionen mit NAD(P) ⁺	13
1.5.2	Reduktionsreaktionen mit NAD(P)H.....	15
1.5.3	Flavin-abhängige Oxidationen: oxidative Regenerierung	16
1.5.4	Flavin-abhängige Oxidationen: reduktive Regenerierung	17
1.5.5	Elektrochemische Herstellung von Cosubstraten	18
1.6	Immobilisierung	20
1.6.1	Adsorption und Deposition	20
1.6.2	Kovalente Anbindung	21
1.6.3	Einkapselung	22
1.6.4	Quervernetzung.....	23
2	Ziel der Arbeit.....	24
3	Charakterisierung des Reaktionssystems.....	26
3.1	Reaktionssystem	26
3.2	Beschleunigung des elektrochemischen Schritts	27
3.2.1	Synthese neuer Rhodiumkomplexe	27

3.2.2	Elektrochemische Untersuchungen.....	29
3.2.3	Untersuchungen unter Reaktionsbedingungen.....	35
3.3	Erste Elektrolysen.....	38
3.3.1	Enzymstabilität	39
3.3.2	Nebenreaktion	39
3.4	Zusammenfassung	41
4	Erhöhung der Enzymstabilität	42
4.1	Variation der Reaktionsbedingungen	42
4.1.1	Temperatur.....	42
4.1.2	pH-Wert	44
4.1.3	Puffer	46
4.2	Ionische Flüssigkeiten als Additive	47
4.3	Immobilisierung	49
4.3.1	Kovalente Anbindung	49
4.3.2	Einkapselung	54
4.4	Zusammenfassung	56
5	Mechanistische Untersuchung der Inaktivierung	57
5.1	Zyklovoltammetrische Untersuchungen	57
5.2	Mediatorinaktivierung durch hohe Proteinkonzentrationen.....	61
5.3	Der Mechanismus der Inaktivierung.....	63
5.4	Zusammenfassung	66
6	Polymermediatoren	67
6.1	Methoden der Polymerisation	67
6.2	Polyacrylsäure	68
6.3	Polyethylenglykol.....	70
6.4	Aktivität.....	73
6.4.1	Elektrochemische Aktivität	73
6.4.2	Aktivität mit Formiat.....	75

6.5	Retentionsverhalten und maximale Löslichkeit	76
6.6	Aktivitätsverlust durch Ausspülen von Rhodium.....	78
6.7	Zusammenfassung	80
7	Reaktoren	81
7.1	3D-Zelle.....	81
7.2	NADPH-Bildung durch Polymermediator	83
7.3	Kontinuierliche NADPH-Bildung durch Polymermediator	84
7.4	Enzymankopplung	86
7.5	Abschätzung der maximalen Produktivität	88
7.6	Zusammenfassung	90
8	Diskussion und Ausblick	92
9	Zusammenfassung	96
9.1	Charakterisierung des Reaktionssystems	96
9.2	Synthese und Charakterisierung eines Polymermediators	96
9.3	Optimiertes Reaktorkonzept	97
10	Material und Methoden.....	98
10.1	Verwendete Geräte und Chemikalien	98
10.2	Arbeitsvorschriften	98
10.2.1	Aktivitätsassay.....	98
10.2.2	Proteinbestimmung	99
10.2.3	Immobilisierung auf Amino-Epoxy Sepabeads®	99
10.2.4	Stabilitätsmessungen	99
10.2.5	Flussbettreaktor Sepabeads®	99
10.2.6	Immobilisierung durch Einkapselung in ein Polyvinylalkohol-Gel	99
10.3	Synthesen.....	100
10.3.1	Di- μ -chloro-bis[(chloro)(pentamethylcyclopentadienyl)rhodium(III)].....	100
10.3.2	Synthese der Rhodium-Komplexe.....	100
10.3.3	Niedermolekulare 2,2'-Bipyridine	101

10.3.4	Polymervergrößerte Komplexe.....	105
10.4	Analytik.....	106
10.4.1	Gaschromatographie.....	106
10.4.2	NMR-Spektren der Komplexe	106
11	Anhang: Weitere Anwendungen der Immobilisate	109
11.1	Sepabeads®	110
11.2	Gel-Einkapselung	112
11.2.1	Stabilität des gel-stabilisierten Enzyms	112
11.2.2	Einsatz des gel-stabilisierten Enzyms in einem Stripping-Reaktor	113
11.3	Vergleich der Prozesse.....	115
12	Literatur	117

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Enantiomere chiraler Substanzen mit unterschiedlichen physiologischen Wirkungen;.....	1
Abbildung 2: chirale Derivatisierungsreagenzien für a) Gaschromatographie und b) Flüssigchromatographie; modifizierte Cyclodextrine für chirale GC-Säulen (nach (Carell 2008)) ..	2
Abbildung 3: chirale Bausteine aus dem chiral pool, Synthese eines Tetraols aus Mannit.....	3
Abbildung 4: Synthese von SAMP aus (L)-Prolin.....	4
Abbildung 5: Aldol-Reaktion mit RAMP-Derivat als chiraalem Auxiliar (nach (McGlacken und Breeden 2005)) ..	4
Abbildung 6: Struktur von Bor-Reagenzien.....	4
Abbildung 7: Corey-Itsuno-Reduktion mit dem S-CBS-Reagenz.....	5
Abbildung 8: Hydrierung mit BINAP (nach (Muniz 2006)).....	5
Abbildung 9: dynamische kinetische Racematspaltung bei metallkatalysierter Hydrierung	6
Abbildung 10: Metall-katalysierte Dihydroxylierung von Stilben.....	6
Abbildung 11: Per-Dihydroxylierung von Squalen.....	7
Abbildung 12: Synthese chiraler Alkohole durch verschiedene Enzymklassen (nach (Goldberg <i>et al.</i> 2007)) ..	7
Abbildung 13: Synthese chiraler Alkohole durch kinetische Racematspaltung von Estern	8
Abbildung 14: Synthese chiraler Hydroxyketone durch Pyruvatdecarboxylase (PDC) und Benzaldehydlyase (BAL).....	8
Abbildung 15: Synthese chiraler Alkohole durch Alkoholdehydrogenasen; Struktur von NADPH.....	9
Abbildung 16: Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung	10
Abbildung 17: Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung, am Beispiel von <i>iso</i> -Propanol	11
Abbildung 18: Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i> (Niefind <i>et al.</i> 2000).....	12
Abbildung 19: großtechnische Produktion von (<i>R</i>)-MHB; ausgewählte Reaktionsbedingungen (Dausmann 2006).....	12
Abbildung 20: elektrochemische Regeneration von NAD(P) ⁺	14
Abbildung 21: Synthese von Cyclohexanon unter elektrochemischer Cofaktorregenerierung mit Phenantrolin-Komplexen.....	14
Abbildung 22: Synthese von chiralen Lactonen durch Pferdeleber-ADH unter elektrochemischer Cofaktorregenerierung mit ABTS	15

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 23: Synthese von Ribulose-5-Phosphat aus 6-Phosphogluconat durch 6-Phosphogluconatdehydrogenase.....	15
Abbildung 24: Synthese von (<i>R</i>)-Mandelat auf Benzoylformiat durch Benzoylformiatreduktase.....	16
Abbildung 25: p-Hydroxybenzaldehyd aus p-Methylphenol (Brielbeck et al. 1994).....	17
Abbildung 26: stereoselektive Epoxidierung von Styren unter direkter elektrochemischer Regenerierung.....	18
Abbildung 27: Ortho-Hydroxylierung von Phenolen unter enzym-gekoppelter elektrochemischer Regenerierung.....	18
Abbildung 28: Synthese von chiralen Sulfoxiden mit elektrochemischer Cosubstrat-Generierung.....	19
Abbildung 29: elektrostatische und Säure-Base Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren des Proteins und funktionellen Gruppen auf der Oberfläche des Trägermaterials (aus (Macario et al. 2007))	21
Abbildung 30: verschiedene Arten der Quervernetzung von Enzymen (aus(Cao et al. 2003))	23
Abbildung 31: Reaktionssystem der indirekten elektrochemischen Cofaktorregenerierung.....	24
Abbildung 32: Reaktionssystem indirekte elektrochemische Cofaktorregenerierung.....	26
Abbildung 33: Übersicht über die Synthese von Liganden und kommerziell erhältliche Liganden.....	28
Abbildung 34: Komplexierung des Liganden mit dem Rhodium-Vorkomplex	29
Abbildung 35: Zyklisches Voltammogramm Rh(bpy) in Gegenwart von NADP ⁺ ;	30
Abbildung 36: Zyklische Voltammogramme von 5b mit verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten; Peaks bei -600 mV resultieren aus Sauerstoffverunreinigungen.....	31
Abbildung 37: Peak-Reduktionsströme der Mediatoren 1b, 8b, 13b, 15b und 16b bei verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten und in An- und Abwesenheit von einem Äquivalent NADP ⁺	34
Abbildung 38: elektrochemischer Satzreaktor.....	36
Abbildung 39: Elektrolysen zur Bildung von NADPH mit verschiedenen Mediatoren.....	36
Abbildung 40: elektrochemischer Satzreaktor zur Produktion von (<i>R</i>)-Phenylethanol	38
Abbildung 41: Enzymstabilität in Gegenwart von Mediator.....	39
Abbildung 42: Elektrochemischer Satzreaktor ohne Enzym	40
Abbildung 43: Reaktionsschema unter Berücksichtigung der Nebenreaktion	41
Abbildung 44: Enzymstabilität von <i>Lb</i> -ADH mit 0,05 mmol L ⁻¹ Rh(bpy) bei verschiedenen Temperaturen.....	43
Abbildung 45: Satzreaktor mit elektrochemischer Cofaktorregenerierung bei 4 °C.....	43
Abbildung 46: Protonierungsgrad basischer Aminosäuren in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	44

Abbildung 47: Enzymstabilitäten bei verschiedenen pH-Werten und in An- und Abwesenheit von Rh(bpy).....	45
Abbildung 48: elektrochemischer Satzreaktor bei pH = 4,6	46
Abbildung 49: Enzymstabilität von <i>Lb</i> -ADH in Bis-Tris-Puffer in An- und Abwesenheit von Mediator .	46
Abbildung 50: Enzymstabilität unter Zusatz von Rh(bpy) und EMIM Cl	48
Abbildung 51: Satzreaktor mit elektrochemischer Cofaktorregenerierung unter Zusatz von EMIM Cl.	48
Abbildung 52: Enzymstabilität und Restaktivität nach Absättigung der übrigen funktionellen Gruppen	51
Abbildung 53: Enzymstabilität und Restaktivität nach Quervernetzung.....	52
Abbildung 54: Enzymstabilität und Restaktivität nach Absättigung und Quervernetzung	53
Abbildung 55: Stabilität von <i>Lb</i> -ADH auf Sepabeads® in An- und Abwesenheit von Rh(bpy)	54
Abbildung 56: Stabilität von gelstabilisierter ADH-T in Pufferlösung	55
Abbildung 57: Reaktionssystem der indirekten elektrochemischen Cofaktorregenerierung.....	57
Abbildung 58: Mediatoraktivität in Gegenwart von Aminosäuren	58
Abbildung 59: Zyklische Voltammogramme Mediator in Gegenwart von ausgewählten Aminosäuren	60
Abbildung 60: elektrochemischer Satzreaktor mit BSA.....	61
Abbildung 61: elektrochemischer Satzreaktor mit ADH CDX010.....	62
Abbildung 62: Reaktionsabbruch der Elektrolysen durch (a) fehlende Enzymaktivität, unselektive Nebenreaktion	64
Abbildung 63: Reaktionsabbruch der Elektrolysen durch (b) fehlende Mediatoraktivität, vollständiger Reaktionsabbruch	64
Abbildung 64: Anbindungsstrategien für polymerangebundene Katalysatoren	67
Abbildung 65: Syntheseweg für die Anbindung des Mediators an Poylacrylsäure	69
Abbildung 66: Absorptionsspektren verschieden stark belegter Polyacrylsäuren	69
Abbildung 67: frühere Arbeiten zur Polymeranbindung von Rh(bpy) (Spika 1994)	70
Abbildung 68: Syntheseroute der Mediatoranbindung an Polyethylenglykol	72
Abbildung 69: Zyklische Voltammogramme der Polymermediatoren im Vergleich zu Rh(bpy).....	73
Abbildung 70: elektrochemische Aktivität der Polymermediatoren im Vergleich zu Rh(bpy)	74
Abbildung 71: Mediatoraktivierung und Cofaktorreduktion durch Formiat	75
Abbildung 72: Aktivitäten der Polymermediatoren im Vergleich zu Rh(bpy) bei der Aktivierung durch Formiat	75
Abbildung 73: Retentionsmessung im Membranreaktor	76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 74: maximale Löslichkeit der Polymermediatoren in Wasser	77
Abbildung 75: Hydrierung von N-Acetylacetamido-zimtsäure zu N-Acetyl-Phenylalanin durch polymergebundenen Rhodium-Katalysator.....	78
Abbildung 76: Sharpless-Dihydroxylierung durch polymerangebundenen Katalysator	79
Abbildung 77: Ausspülen von Rhodium; Verlauf der Restaktivität im kontinuierlich betriebenen Membranreaktor	79
Abbildung 78: 3D-Zelle (nach (Vuorilehto et al. 2004))	81
Abbildung 79: Flussbettreaktor zur kontinuierlichen Reduktion von NADP	82
Abbildung 80: NADPH-Bildung mit Polymermediator im optimierten Reaktor	84
Abbildung 81: kontinuierliche Produktion von NADPH im modifizierten optimierten Reaktor.....	84
Abbildung 82: Konzentrationsverlauf bei der kontinuierlichen Produktion von NADPH	85
Abbildung 83: Reaktorschema des optimierten Reaktors mit Ankopplung der Enzymreaktion.....	86
Abbildung 84: Konzentrationsverläufe im optimierten Reaktor zur Synthese von para-Chlor-(<i>R</i>)-Phenylethanol unter elektrochemischer Cofaktorregenerierung.....	87
Abbildung 85: geringe Enzymstabilität in Gegenwart von Mediator (siehe 3.3.1) und Mediatorinaktivierung durch Aminosäuren (siehe 5.1).....	92
Abbildung 86: Synthese des PEG-angebundenen Mediators.....	93
Abbildung 87: Fließschema optimierter Reaktor	94
Abbildung 88: optimierter Reaktor.....	94
Abbildung 89: substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung mit <i>iso</i> -Propanol, am Beispiel ADH-T.....	109
Abbildung 90: Retention des Immobilisats durch einen Spritzenfilter, Schema des Flussbettreaktors	110
Abbildung 91: Flussbettreaktor.....	111
Abbildung 92: Struktur der Ionischen Flüssigkeit BMIM BTA.....	112
Abbildung 93: Stabilität ADH-T unter verschiedenen Bedingungen	113
Abbildung 94: Einsatz gel-stabilsierter ADH-T in einem Stripping-Reaktor mit BMIM BTA	114

Abkürzungsverzeichnis

(Abkürzungen, die sich in der Einleitung lediglich auf eine Grafik beziehen, sind in diesem Verzeichnis nicht aufgeführt.)

ADH	Alkoholdehydrogenase
ADH-T	(S)-selektive Alkoholdehydrogenase aus einem thermophilen Organismus
Ag AgCl	Silber-Silberchlorid-Referenz
BMIM BTA	1-Butyl-3-methyl-imidazolium bis-((trifluoromethyl)sulfonyl)amid (IL)
BSA	Rinderalbumin
CDX010	(R)-selektive Alkoholdehydrogenase
CPCR	Carbonylreduktase aus <i>Candida parapsilosis</i>
CV	Zyklisches Voltammogramm (vom Englischen: <i>cyclic voltammogram</i>)
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMTMM	4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium-chlorid
EMIM Cl	1-Ethyl-3-methyl-imidazolium chlorid (IL)
GDA	Glutardialdehyd
IL	Ionische Flüssigkeit
<i>Lb</i> -ADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i>
NAD(H)	β -1,4-Nikotinamid-adeninucleotid
NADP(H)	β -1,4-Nikotinamid-adeninucleotid-phosphat
PAA	Polyacrylsäure (vom Englischen: <i>poly(acrylic acid)</i>)
PEG	Polyethylenglykol
Rh(bpy)	niedermolekularer Rhodium-Mediator
<i>ttn</i>	Katalysatoreffizienz; Quotient aus mol Produkt durch mol Katalysator
YM3 / YM10	Ultrafiltrationsmembranen der Firma Millipore; <i>cut-off</i> 3 und 10 kDa

Einheiten- und Symbolverzeichnis

(in Klammern jeweils die verwendete Einheit sowie die entsprechende SI-Einheit)

A	Elektrodenoberfläche (m^2)
c	Konzentration (mol L^{-1} ; mol m^{-3})
D	Diffusionskoeffizient (m^2s^{-1})
E_P	Peakpotential (mV; V)
$E_{P/2}$	Halbpeakpotential (Strom beträgt die Hälfte des Maximalwertes) (mV; V)
ΔE	Potentialdifferenz (mV; V)
F	Faraday-Konstante ($96.485 \text{ C mol}^{-1}$; A s mol^{-1})
i_P	Peakstrom (μA ; A)
m	Masse (g)
n	Anzahl der übertragenen Elektronen (-)
R	allgemeine Gaskonstante ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$; $\text{V A s mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
R	Retentionsfaktor (-)
T	Temperatur (K)
t	Zeit (s)
τ	Verweilzeit (s)
U	katalytische Einheit ($\mu\text{mol min}^{-1}$; $10^{-6} \text{ mol (60s)}^{-1}$)
v	Vorschubgeschwindigkeit (V s^{-1})

1 Einleitung

1.1 Chirale Alkohole als wertvolle Synthesebausteine

Chirale Alkohole sind Verbindungen, bei denen eine Hydroxylgruppe an ein Kohlenstoffatom mit vier verschiedenen Substituenten gebunden ist. Dieser Kohlenstoff stellt ein Stereozentrum dar, das heißt die Substituenten können auf zwei zueinander spiegelbildliche Weisen angeordnet sein. Diese spiegelbildlichen Moleküle, die sich bis auf die optische Drehung in allen physikalischen Eigenschaften gleichen, nennt man Enantiomere einer Substanz (siehe Abbildung 1).

Chirale Alkohole stellen zentrale Grundbausteine für die synthetische organische Chemie dar, weil sie als Strukturelement in einer Vielzahl von pharmazeutisch oder agrochemisch wichtigen Verbindungen vorkommen (Ager 1999; Dausmann 2006; Hummel und Kula 1989; Rosen und Dausmann 2004). Darüber hinaus können sie leicht in andere chirale Substanzen überführt werden. Durch die unterschiedliche Wechselwirkung mit chiralen Komponenten in Lebewesen, etwa den Geruchsnerve, bewirken die Enantiomere in vielen Fällen verschiedene sensorische, pharmakologische oder toxikologische Effekte (Ariens 1986). Deshalb besteht ein großes Interesse daran, diese Enantiomere einzeln handhaben zu können.

Es existieren unterschiedliche Methoden und Reaktionen, um die enantiomerenreinen Verbindungen zu isolieren oder zu synthetisieren. Diese sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

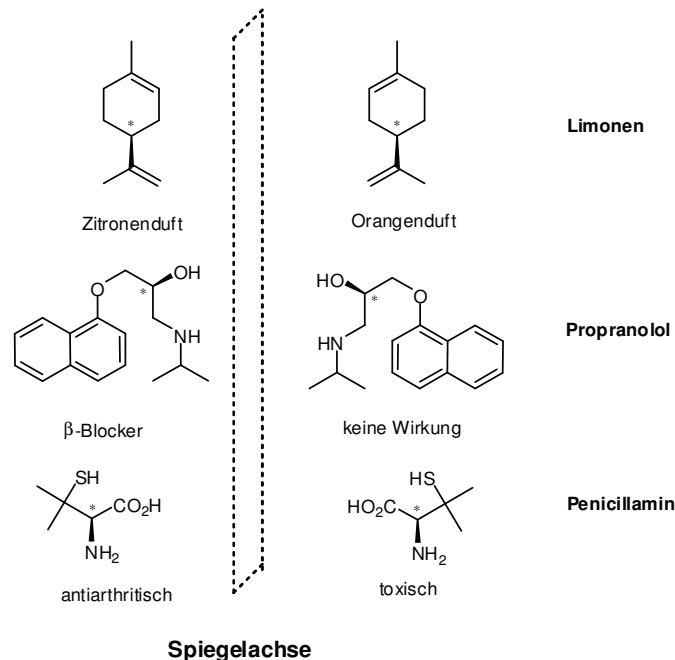


Abbildung 1: Enantiomere chiraler Substanzen mit unterschiedlichen physiologischen Wirkungen;

* bezeichnet das Stereozentrum

1.2 Klassische chemische Methoden

1.2.1 Racematspaltung und Chromatographie

Bei der Racematspaltung wird das racemische Gemisch in die beiden Enantiomere aufgetrennt. Seinen Ursprung hat die Racematspaltung 1844 in der Enantiomerentrennung der Natrium-Ammoniumsalze von Traubensäure durch Pasteur, der beobachtete, dass sich unter bestimmten Bedingungen enantiomerenreine Kristalle bildeten, die manuell voneinander getrennt werden konnten und optische Aktivität zeigten (Coquerel 2007; Wang und Chen 2008).

Heutzutage werden die Enantiomere bevorzugt zu Diastereomeren derivatisiert. Diese Diastereomere zeigen immer noch verschiedene Konfigurationen, verhalten sich aber nicht mehr wie Objekt und Spiegelbild, was eine Differenzierung ihrer physikalischen Eigenschaften bewirkt. Dies kann dazu genutzt werden, die derivatisierten Enantiomere leichter selektiv auszukristallisieren oder das Gemisch chromatographisch aufzutrennen. Eine Vielzahl an Derivatisierungsreagenzien ist entwickelt worden, die den Einsatz von Gaschromatographie oder Flüssigkeitschromatographie ermöglichen (siehe Abbildung 2).

Durch die Entwicklung chiraler Säulen ist es aber auch möglich, das Racemat ohne vorherige Derivatisierung aufzutrennen. Als chirale Säulenreagenzien werden beispielsweise modifizierte Cyclodextrine verwendet (zum Beispiel Lipodex™). Die Auftrennung erfolgt hier über die verschiedenen Wechselwirkungen der chiralen Substanzen mit den chiralen Strukturen auf der Säulenoberfläche.

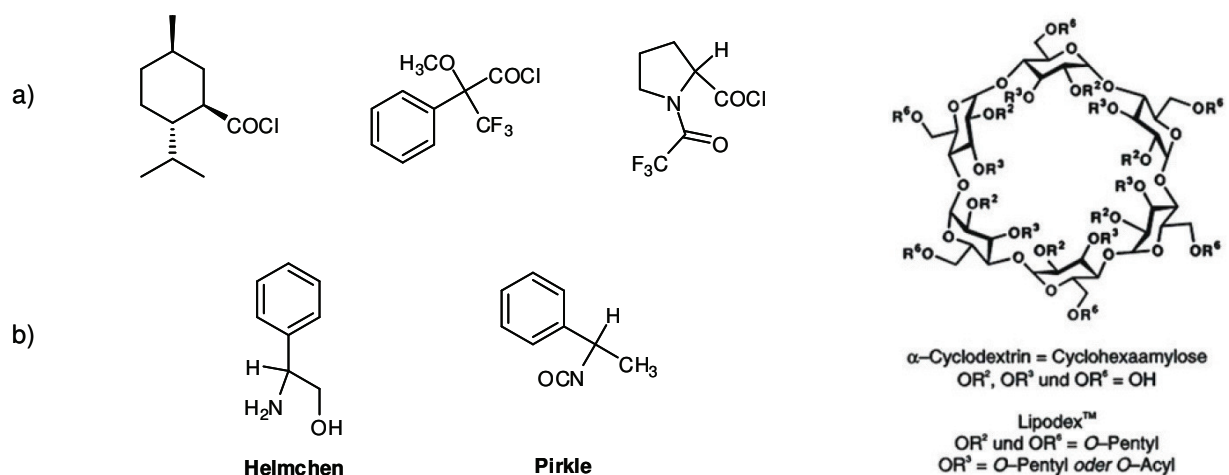


Abbildung 2: chirale Derivatisierungsreagenzien für a) Gaschromatographie und b) Flüssigkeitschromatographie; modifizierte Cyclodextrine für chirale GC-Säulen (nach (Carell 2008))

Die selektive chemische Reaktion eines Enantiomers mit einem chiralen Reagenz wird kinetische Racematspaltung genannt. Dabei macht man sich die unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten der beiden Enantiomere mit dem chiralen Reaktionspartner zunutze, wodurch ein Enantiomer unverändert zurückbleibt, während das andere in eine neue chirale Verbindung überführt wird und leicht abgetrennt werden kann. Diese Methode kann sowohl durch den stöchiometrischen Einsatz

eines chiralen Reagenzes erfolgen, als auch durch die Verwendung eines Katalysators. Besonders bewährt haben sich in diesem Zusammenhang Enzyme, die durch ihre hervorragende Selektivität hohe Enantiomerenüberschüsse ermöglichen (siehe 1.3). Ein Nachteil dieser Methode ist die Tatsache, dass nur ein Enantiomer gewonnen wird, während das andere durch einen weiteren Reaktionsschritt wiedergewonnen werden muss. Gelingt die fortwährende Racemisierung des ungewünschten Enantiomers, während das andere kontinuierlich abreagiert, so ist die vollständige Umwandlung in ein Enantiomer möglich. Diesen Fall nennt man dynamische kinetische Racematspaltung.

1.2.2 Chiral Pool und chirale Auxiliare

In der Natur kommt eine Vielzahl von chiralen Substanzen in großen Mengen vor, etwa Kohlenhydrate, Aminosäuren oder Terpene. Da oft nur ein Enantiomer biologisch produziert wird, etwa die in der Natur fast ausschließlich vorkommenden L-Formen der Aminosäuren, können viele chirale Substanzen kostengünstig als enantiomerenreine Produkte aus Naturstoffen gewonnen werden ("chiral pool")(Blaser 1992). Diese Tatsache bedeutet aber auf der anderen Seite auch, dass oft nur ein Enantiomer zugänglich ist.

In vielen Fällen werden diese Substanzen direkt zur Synthese chiraler Bausteine genutzt. Als Beispiel kann hier die Synthese eines chiralen Tetraols aus kostengünstigem Mannit genannt werden (Atkinson 1995). Durch selektives Einführen von Schutzgruppen an den äußeren vier Hydroxygruppen kann das entstandene Diacetonid durch Eliminierung des Mesylats in das entsprechende Alken überführt werden. Anschließende Hydrierung und Entschützung ergibt das chirale Tetraol (Bozó *et al.* 1999; Holz *et al.* 1999; Holz *et al.* 2001; Marzi und Misiti 1989)

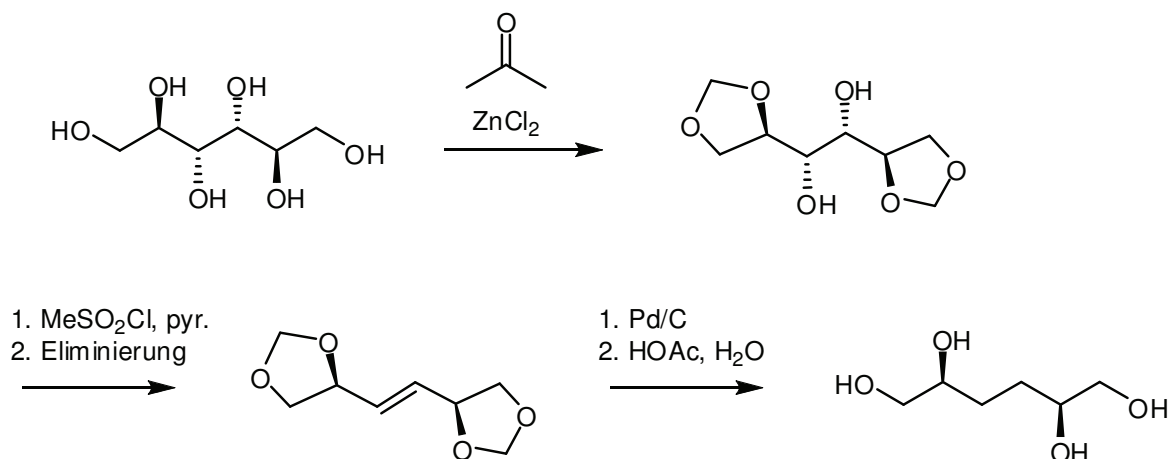


Abbildung 3: chirale Bausteine aus dem chiral pool, Synthese eines Tetraols aus Mannit

Zusätzlich zu der direkten Verwendung der Naturstoffe als Reaktionsedukte liegt es aber auch nahe, diese Verfügbarkeit an chiraler Information für stereoselektive Synthesen zu nutzen, in dem durch die Anwesenheit von chiralen Substanzen diese Information auf das Produkt übertragen wird (Job *et al.* 2002). Man spricht hier von chiralen Auxiliaren. Ein prominentes Beispiel zur stereoselektiven Alkylierung ist SAMP ((*S*)-(-)-1-Amino-2-Methoxymethylpyrrolidin), das 1976 von Enders an der

RWTH Aachen entwickelt wurde und sich von (L)-Prolin ableitet (Eichenauer *et al.* 1978; Enders und Eichenauer 1976). Durch die Anbindung des sterisch anspruchsvollen Auxiliars findet eine Diskriminierung der enantiotopen Seiten des Ketons statt und der Angriff von einer Seite wird begünstigt, was zu einer vermehrten Bildung eines Enantiomers führt. Abbildung 5 zeigt im rechten Teil den Übergangszustand einer solchen Reaktion.

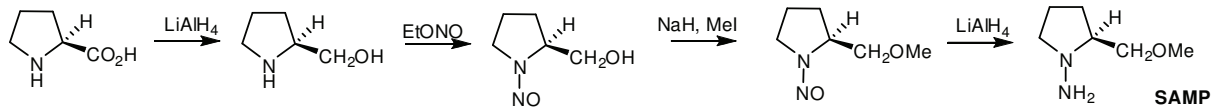


Abbildung 4: Synthese von SAMP aus (L)-Prolin

Auch das (*R*)-Enantiomer RAMP ist in zwei zusätzlichen Schritten durch Ringschluss aus Glutaminsäure zugänglich.

Stellt die C-C-Bindungsknüpfung eine Aldol-Reaktion dar, ist die Verwendung von SAMP als chiraleten Auxiliars auch eine elegante Methode zur Synthese chiraler Alkohole (McGlacken und Breeden 2005).

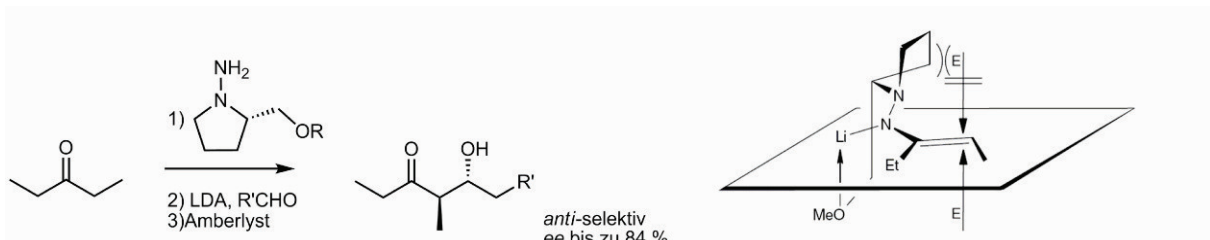


Abbildung 5: Aldol-Reaktion mit RAMP-Derivat als chiraleten Auxiliars (nach (McGlacken und Breeden 2005))

Neben Aminosäuren spielen auch Terpene eine bedeutende Rolle als chirale Auxiliars. Für die enantioselektive Reduktion von prochiralen Ketonen sind vor allem Bor-Verbindungen von (+)- α -Pinen von Bedeutung, insbesondere Alpine-Boran[®] und Browns Chlorboran. Durch den sterisch sehr anspruchsvollen Rest wird dabei der elektrophile Angriff des Boratoms von einer Seite des Ketons begünstigt, sodass es vermehrt zur Bildung eines Alkohol-Enantiomers kommt. Das Pinen kann nach der Reaktion wiedergewonnen werden.

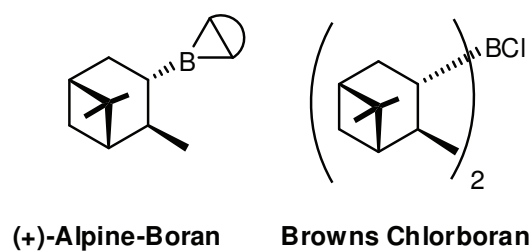


Abbildung 6: Struktur von Bor-Reagenzien

Ebenfalls aus (L)-Prolin ist das CBS-Reagenz zugänglich, benannt nach Corey, Bakshi und Shibata. Dabei handelt es sich ebenfalls um ein Bor-Reagenz zur Reduktion prochiraler Ketone, das aber im Unterschied zu dem gerade beschriebenen Syntheseweg nur in katalytischen Mengen eingesetzt werden muss. Das CBS-Reagenz wirkt dabei reaktionsbeschleunigend, indem es sich an das Keton

anlagert und seine Nucleophilie erhöht. Zusätzlich generiert es eine chirale Umgebung und bewirkt so die Selektivität der Reaktion.

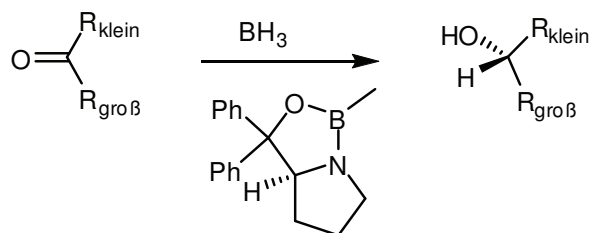


Abbildung 7: Corey-Itsuno-Reduktion mit dem S-CBS-Reagenz

1.2.3 Stereoselektive Synthese durch Metall-Katalyse

Eine weitere Möglichkeit der Gewinnung enantiomerenreiner Alkohole ist die asymmetrische Katalyse durch Metallkomplexe. Für die Synthese chiraler Alkohole haben dabei zwei Verfahren große Bedeutung, die enantioselektive Hydrierung und die Dihydroxylierung.

Ein für die Übergangsmetallkatalyse entscheidender Ligand ist BINAP, ein peraryliertes C₂-symmetrisches Bisphosphin, das 1980 von Noyori beschrieben wurde (Miyashita *et al.* 1980; Noyori und Takaya 1990). Dieser Ligand hat aufgrund seiner hohen Selektivität eine Vielzahl an Anwendungen gefunden (Burk 1991; Miyashita *et al.* 1980; Noyori 2002; Wolfe und Buchwald 2000). Der Einsatz als Ligand für Ruthenium-Komplexe ermöglicht die Hydrierung von Ketonen und Ketoestern mit Enantiomerenüberschüssen über 99 %.

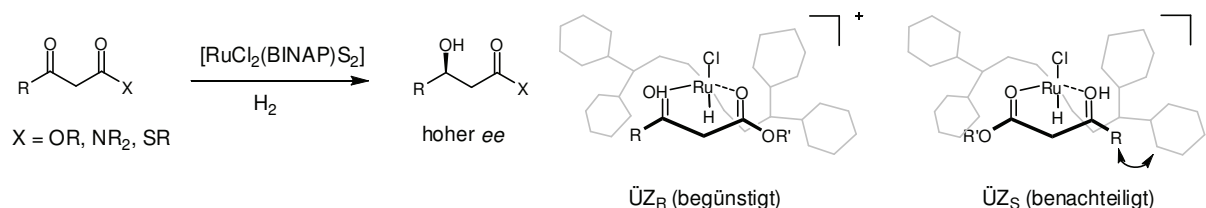


Abbildung 8: Hydrierung mit BINAP (nach (Muniz 2006))

Eine bemerkenswerte Kombination aus Metallkatalyse und kinetischer Racematspaltung ergibt sich, falls die Ketoester in 2-Position substituiert sind. Ergäbe eine konventionelle Hydrierung unter Metallkatalyse nur ein Gemisch beider Diastereomere, so kann durch geschickte Reaktionsführung selektiv nur eines der Diastereomere gebildet werden. Durch ihre unterschiedlichen Übergangszustände ist die Bildung der Diastereomere mit unterschiedlichen Aktivierungsenthalpien verknüpft. Wählt man die Reaktionsbedingungen derart, dass das Edukt schnell racemisieren kann, wird im Sinne einer dynamischen kinetischen Racematspaltung selektiv dasjenige Enantiomer gebildet, das über den energieärmeren Übergangszustand verläuft (Noyori *et al.* 1995).

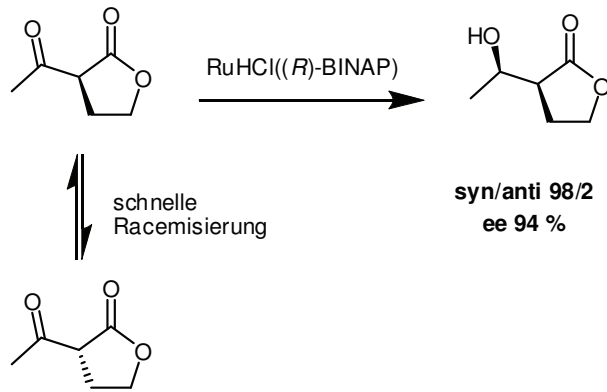


Abbildung 9: dynamische kinetische Racematspaltung bei metallkatalysierter Hydrierung

Komplementär zur Hydrierung kann auch die metallkatalysierte Dihydroxylierung von Doppelbindungen zu chiralen Alkoholen führen. In Erweiterung der Sharpless-Epoxidierung, die weitestgehend auf Allylalkohole beschränkt ist, wurden Osmiumtetroxid-Komplexe entwickelt, die trotz der höheren Kosten zu den wichtigsten Oxidationskatalysatoren geworden sind (Bolm *et al.* 2000; Kolb *et al.* 1994) (vergleiche auch 6.6). So kann etwa die Verwendung der Alkaloide Chinidin und Chinin als chirale Liganden für den Osmiumkatalysator die Dihydroxylierung von Stilben mit fast vollständiger Enantioselektivität ermöglichen (Mandoli *et al.* 2005).

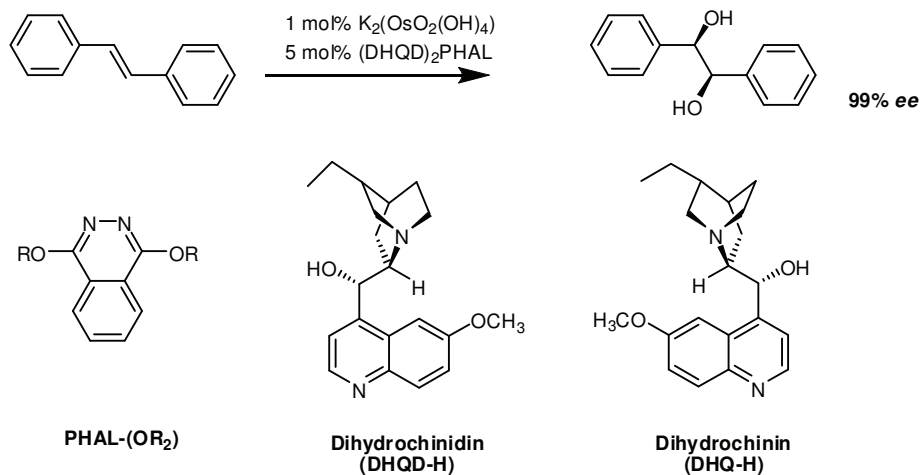


Abbildung 10: Metall-katalysierte Dihydroxylierung von Stilben

Einen weiteren eindrucksvollen Beweis für die hohe Stereoselektivität dieser Osmiumkatalysatoren zeigt Abbildung 11 mit der Dihydroxylierung von Squalen. Durch die sechsfache Reaktion wären bei fehlender Selektivität 36 Stereoisomere denkbar, durch die Metallkatalyse kann jedoch das angegebene Produkt mit 100 % ee und in 79 % Ausbeute erlangt werden (Crispino *et al.* 1993).

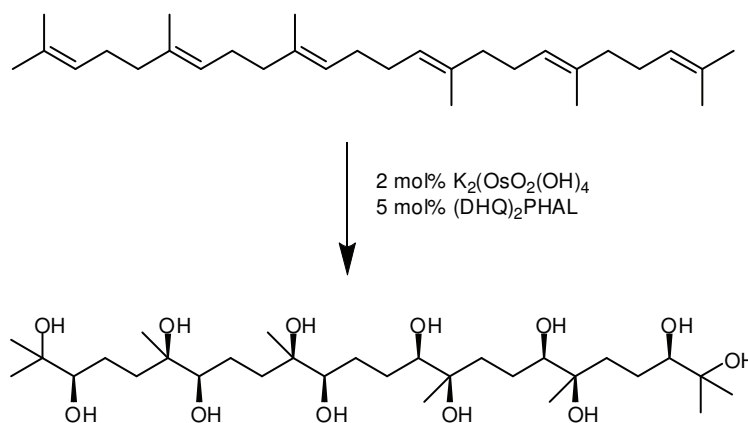
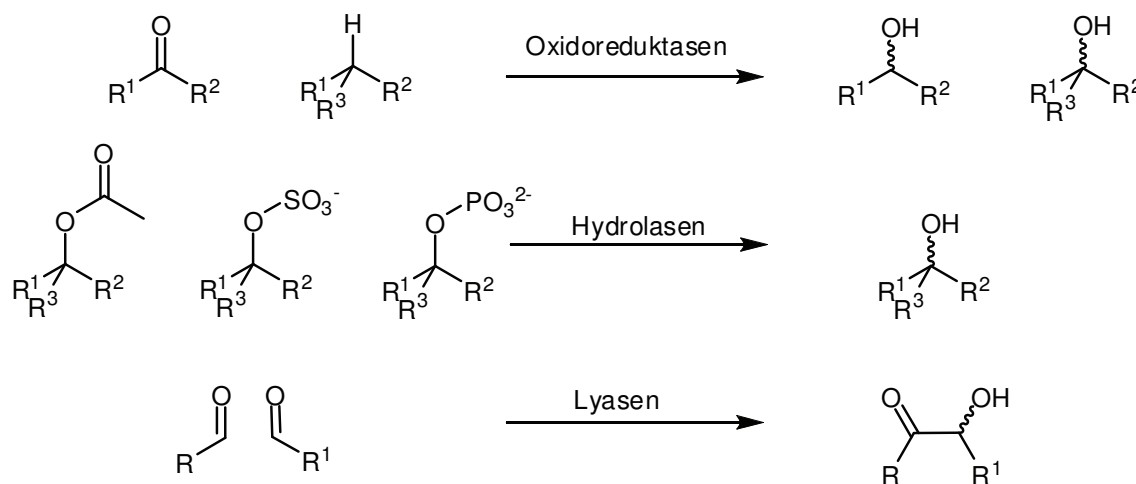


Abbildung 11: Per-Dihydroxylierung von Squalen

1.3 Biokatalytische Synthesen

Es gibt drei verschiedene Enzymklassen, durch die chirale Alkohole dargestellt werden können. Aus der Gruppe der Oxidoreduktasen, die Elektronentransferreaktionen katalysieren, kann der Einsatz von Alkoholdehydrogenasen die Reduktion von Ketonen zu Alkoholen ermöglichen (Bradshaw 1992; Fang *et al.* 1995; Goldberg *et al.* 2007; Gröger *et al.* 2004; Keinan *et al.* 1987). Dies wird in 1.4 detailliert erläutert. Außerdem können Monooxygenasen eingesetzt werden, die die Oxidation von C-H-Bindungen katalysieren (Andrade *et al.* 2004; Hollmann 2003; Hollmann *et al.* 2001).

Abbildung 12: Synthese chiraler Alkohole durch verschiedene Enzymklassen (nach (Goldberg *et al.* 2007))

Lipasen aus der Gruppe der Hydrolasen können dazu eingesetzt werden, Ester hydrolytisch zu spalten, wodurch ein Alkohol und eine freie Säure entstehen. Durch die Selektivität der Enzyme wird nur ein Enantiomer umgesetzt und es kommt zur kinetischen Racematspaltung (Jaeger und Eggert 2002; Jaeger *et al.* 1997; Kazlauskas *et al.* 1991; Santaniello *et al.* 1993). Die Spaltung von Phosphat- und Sulfatestern hat nur eine geringe Bedeutung für die Synthese chiraler Alkohole.

Abbildung 13 zeigt beispielhaft die Synthese von enantiomerenreinem (*R*)-1-Phenylprop-2-en-1-ol aus 1-Phenylallylacetat durch kinetische Racematspaltung mit Lipase aus *Candida antarctica* (CALB) (Kadnikova und Thakor 2008).

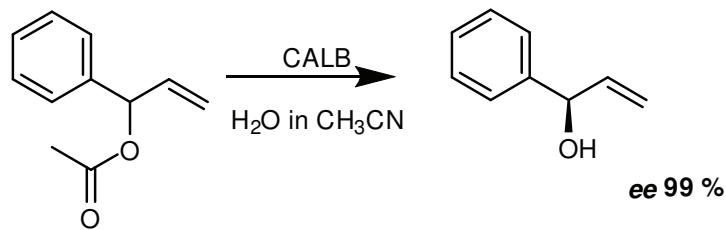


Abbildung 13: Synthese chiraler Alkohole durch kinetische Racematspaltung von Estern

Als dritte Enzymgruppe können Lyasen dazu eingesetzt werden, durch Kondensation zweier Aldehyde die Bildung von Hydroxyketonen zu katalysieren. Prominente Beispiele sind hier die Thiamindiphosphat-abhängigen Enzyme Pyruvatdecarboxylase (PDC) und Benzaldehydlyase (BAL), die durch die Kondensation von Acetaldehyd und Benzaldehyd die Hydroxyketone Phenylacetylcarbinol (Leksawasdi *et al.* 2003; Leksawasdi *et al.* 2004) beziehungsweise Hydroxyphenylpropanon (de Maria *et al.* 2007; Hildebrand *et al.* 2007; Kihumbu *et al.* 2002; Kühl *et al.* 2007; Stillger *et al.* 2006) ergeben.

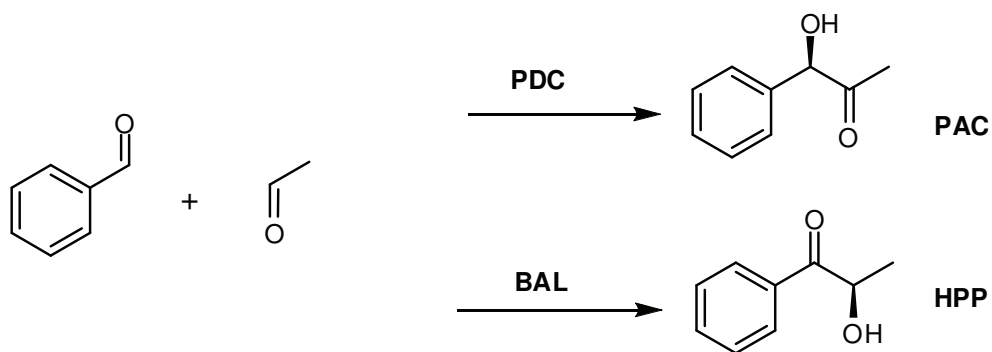


Abbildung 14: Synthese chiraler Hydroxyketone durch Pyruvatdecarboxylase (PDC) und Benzaldehydlyase (BAL)

1.4 Alkoholdehydrogenasen und Cofaktorregenerierung

Alkoholdehydrogenasen (ADHs) sind die Enzyme der Wahl, wenn es um die Synthese chiraler Alkohole geht. Sie ermöglichen im Unterschied zu Racematspaltungen hohe Ausbeuten und ein breites Substratspektrum an prochiralen Ketonen oder Aldehyden. Allerdings benötigen Alkoholdehydrogenasen für ihre katalytische Wirkung die Nicotinamid-Cofaktoren β -1,4-Nicotinamid-adeninucleotid (NADH) oder β -1,4-Nicotinamid-adeninucleotid-phosphat (NADPH), die als Redoxäquivalente fungieren und während der Reaktion in stöchiometrischen Mengen verbraucht werden.

Abbildung 15 verdeutlicht die von Alkoholdehydrogenasen katalysierte Reduktion am Beispiel von Acetophenon. Aus der ebenfalls angegebenen Struktur des Cofaktors wird deutlich, dass es sich dabei um komplexe Moleküle handelt und somit um einen wichtigen Kostenfaktor der Reaktion (Kragl *et al.* 1996).

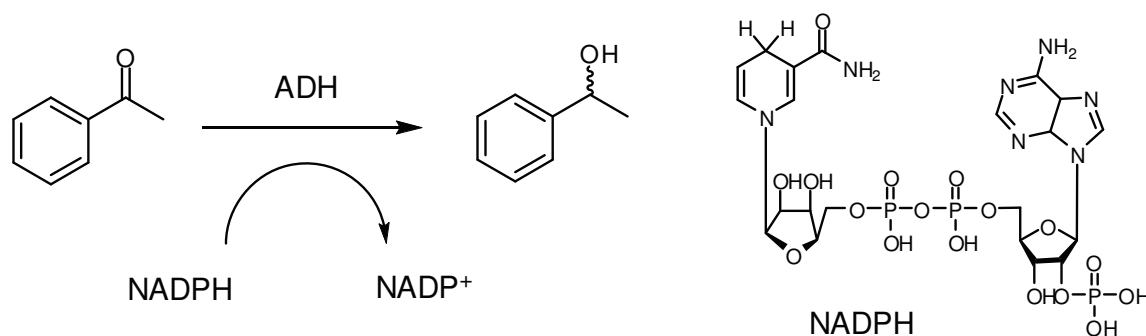


Abbildung 15: Synthese chiraler Alkohole durch Alkoholdehydrogenasen; Struktur von NADPH

Um eine ausreichende Verfügbarkeit an Cofaktor bereitzustellen und die eingesetzte Cofaktormenge gering zu halten, werden diese Cofaktoren *in situ* regeneriert (Chenault und Whitesides 1987; Eckstein *et al.* 2004a; Kragl *et al.* 1996; van der Donk 2003; Wichmann 2005; Zhao und van der Donk 2003). Eine Vielzahl an Methoden zur Cofaktorregenerierung ist entwickelt worden; die wichtigsten sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

1.4.1 Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung

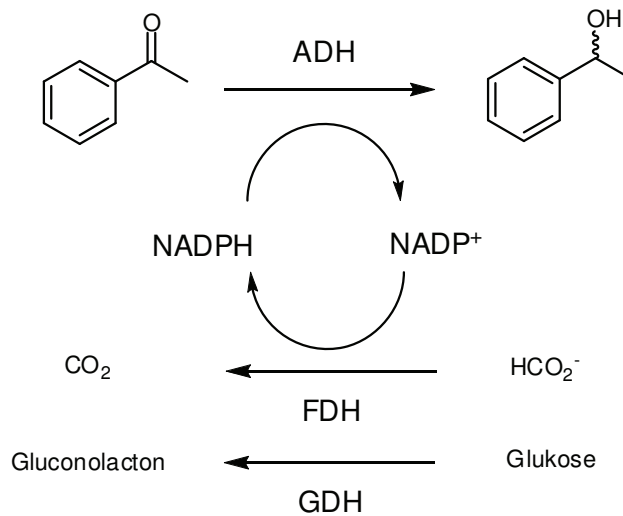


Abbildung 16: Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung

In der in Abbildung 16 beschriebenen Reaktion wird die Alkoholdehydrogenase zur enantioselektiven Reduktion eines prochiralen Ketons eingesetzt. Um hohe Umsätze zu erzielen, muss nun der verbrauchte Cofaktor NAD(P)^+ erneut in die reduzierte Form überführt werden.

Bei der enzymgekoppelten Regenerierung wird der oxidierte Cofaktor durch Katalyse einer Oxidationsreaktion mittels eines weiteren Enzyms wieder in seine reduzierte Form NADPH überführt. Für diese Anwendung haben sich Formiatdehydrogenasen (FDH) bewährt, durch die Formiat zu Kohlendioxid oxidiert wird, das aus der Lösung ausgast oder zu Kohlensäure abreagiert (Ansorge-Schumacher *et al.* 2006; Bolivar *et al.* 2006; Gröger *et al.* 2003; Kihumbu *et al.* 2002; Manjon *et al.* 2002; Obon *et al.* 1997; Seelbach *et al.* 1996). Durch diese Entfernung des Coproduktes wird das thermodynamische Gleichgewicht zur Produktseite verschoben, wodurch hohe Umsätze erzielt werden. Ein vergleichbarer Ansatz verwendet Glukosedehydrogenase (GDH) als zweites Enzym, das Glukose zu Gluconolacton umsetzt, welches durch Ringöffnung ebenfalls der Rückreaktion entzogen wird (Manjon *et al.* 2002; Obon *et al.* 1997). Titration der entstehenden Säure kann das Gleichgewicht ebenfalls zur Produktseite verschieben.

Vorteilhaft ist bei diesem Regenerationsansatz die thermodynamische Triebkraft, die hohe Umsätze erlaubt; allerdings gewinnt das System durch die Verwendung eines zweiten Enzyms deutlich an Komplexität.

1.4.2 Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung

Bei der substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung wird dem Reaktionssystem ein Cosubstrat zugefügt, das von der Alkoholdehydrogenase in einer oxidativen Reaktion umgesetzt wird und so NAD(P)H generiert. Bei diesem Cosubstrat handelt es sich um einen kostengünstigen Alkohol, der vom Enzym zur entsprechenden Carbonylverbindung umgesetzt wird, in der Praxis meist Ethanol oder

iso-Propanol (Schubert *et al.* 2001; Stillger *et al.* 2002; Wolberg *et al.* 2001) Damit das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion zur Produktseite getrieben wird, wird das Cosubstrat in großem Überschuss eingesetzt. Dabei ist zu beachten, dass sowohl die hohe Konzentration des Cosubstrates als auch das entstehende Coprodukt, zum Beispiel Aceton, einen schädigenden Einfluss auf das Enzym haben oder die Reaktion inhibieren kann. Es sind deshalb Ansätze zur Entfernung dieses Coproduktes entwickelt worden, etwa das Austreiben von Aceton durch einen Inertgasstrom oder der Einsatz von Membranen bei einer Pervaporation (Goldberg *et al.* 2006; Schroer *et al.* 2007; Stillger *et al.* 2002)(siehe dazu auch 11.2.2).

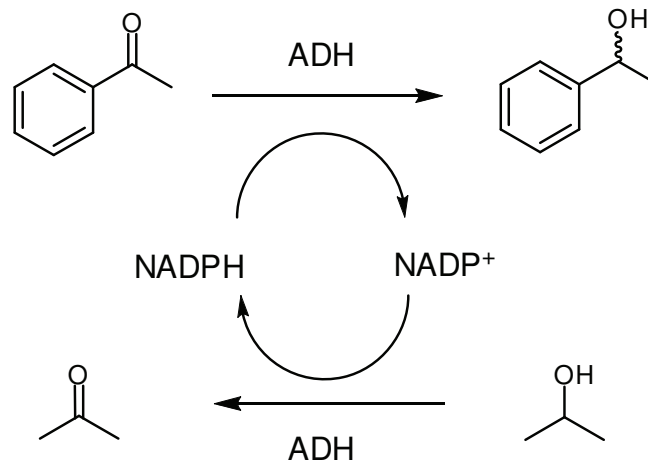


Abbildung 17: Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung, am Beispiel von *iso*-Propanol

Durch die Regenerierung des Cofaktors durch das selbe Enzym können die Kosten reduziert werden, weiterhin kann das Cosubstrat bei hydrophoben Substraten als Lösungsvermittler dienen und so höhere Substratkonzentrationen erlauben. Ohne zusätzliche reaktionstechnische Maßnahmen fehlt aber eine thermodynamische Triebkraft, die die Reaktion zu vollem Umsatz treibt.

1.4.3 Elektrochemische Cofaktorregenerierung

Die elektrochemische Cofaktorregenerierung nutzt elektrischen Strom als Redoxäquivalent. Diese Methode ist Thema dieser Arbeit und wird in den Kapiteln 2 und 3 eingehend beschrieben.

1.4.4 Weitere Methoden der Cofaktorregenerierung

Weitere Methoden der Cofaktorregenerierung wurden entwickelt, denen bisher aber weniger Aufmerksamkeit beschieden war. So ist es möglich, den Cofaktor durch chemische Redoxäquivalente zu reduzieren, etwa durch Dithionit (Jones *et al.* 1972) oder übergangsmetallkatalysierte Reduktion mit Wasserstoff (Wagenknecht *et al.* 2003). Auch photochemische Methoden wurden berichtet (Rickus *et al.* 2004; Willner *et al.* 1989).

1.4.5 ADH aus *Lactobacillus brevis*

Der Großteil der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurde mit der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (*Lb*-ADH) durchgeführt. Die erstmals von Hummel beschriebene *Lb*-ADH (Liese

et al. 2005) ist eine NADPH- und Mg^{2+} -abhängige Alkoholdehydrogenase mit (*R*)-spezifischer Aktivität (Niefind *et al.* 2003; Niefind *et al.* 2000). Sie zeichnet sich durch hohe Selektivität (meist >99 %) und hohe Stabilität gegenüber thermischer Inaktivierung und organischen Lösemitteln aus. Ihr Substratspektrum umfasst aliphatische und aromatische Ketone sowie β -Ketoester (Dausmann 2006).

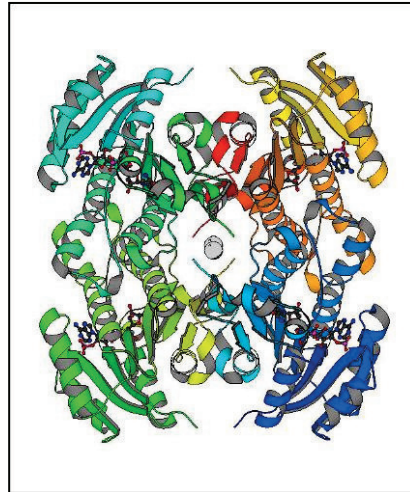
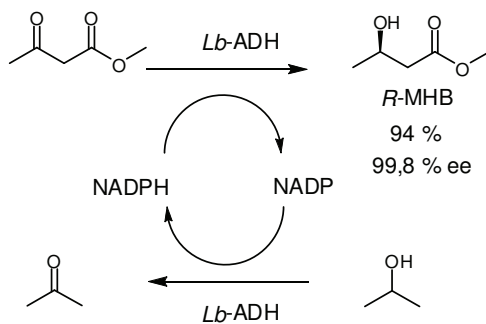


Abbildung 18: Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (Niefind *et al.* 2000)

Die herausragenden katalytischen Eigenschaften dieses Enzyms und die kommerzielle Verfügbarkeit führten bereits zur Entwicklung industrieller Prozesse zur Produktion von chiralen Alkoholen, Diolen und Hydroxyestern (Dausmann *et al.* 2006). Stellvertretend für diese Prozesse soll hier die Produktion von (*R*)-3-Hydroxy-Buttersäure-methylester ((*R*)-MHB) beschrieben werden, die von Wacker Fine Chemicals im Großmaßstab betrieben wird (Dausmann *et al.* 2006))



Substratkonzentration	430 g L ⁻¹ 3-Oxo-buttersäuremethylester
pH	6,5
Temperatur	30 ° C
Cosolvens / Cosubstrat	40 % <i>iso</i> -Propanol
Cofaktor	40 mg L ⁻¹

Abbildung 19: großtechnische Produktion von (*R*)-MHB; ausgewählte Reaktionsbedingungen (Dausmann 2006)

1.5 Elektroenzymatische Synthesen

Für den Bau von Sensoren hat sich die Kopplung einer Enzymreaktion an eine elektrochemische Reaktion längst etabliert. Sie stellt eine gelungene Kombination aus der hervorragenden Selektivität von Enzymen mit der einfachen und empfindlichen Messtechnik einer Elektrodenreaktion dar. Prominentestes Beispiel ist der Glucosesensor, bei dem immobilisierte Glucoseoxidase Glucose unter Verbrauch von Sauerstoff zu Gluconolacton oxidiert. Als Nebenprodukt entsteht Wasserstoffperoxid, das an der Platinanode erneut zu Sauerstoff oxidiert wird. Der gemessene Strom ist dabei proportional zur Glucosekonzentration.

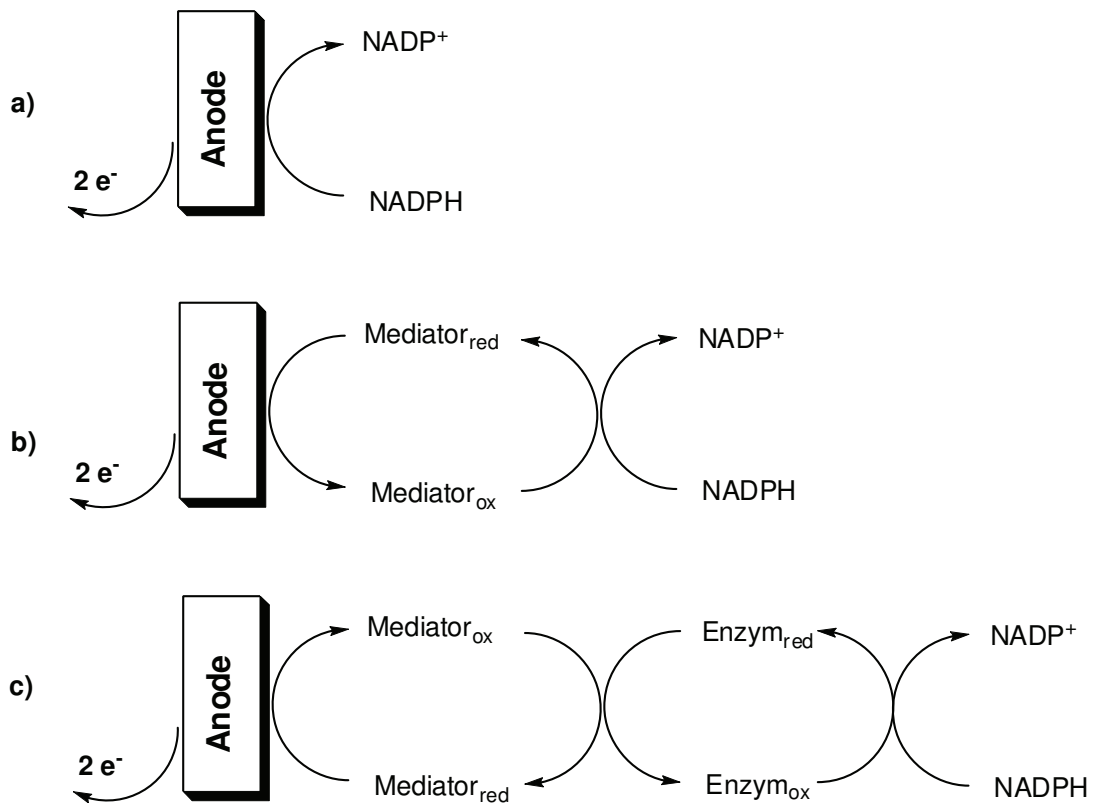
Im Gegensatz dazu gibt es erst wenige Prozesse, bei denen eine enzymkatalysierte Synthesereaktion durch Elektrochemie ergänzt wird (Kohlmann *et al.* 2007; Vuorilehto 2008). Bei allen Redoxreaktionen findet neben der Synthesereaktion eine weitere Redoxreaktion in umgekehrter Richtung statt, die die Redoxäquivalente bereitstellt und so die Redoxbilanz schließt. Elektroenzymatik kann dazu genutzt werden, diese Redoxäquivalente bereitzustellen. Dies ist vorteilhaft, weil durch die Nutzung von elektrischem Strom als kostengünstiger Quelle oder Senke für Elektronen zusätzliche Enzyme oder Cosubstrate obsolet werden. Weiterhin bleibt die Reaktionsmischung durch die massefreien Elektronen in ihrem Volumen unverändert. Oxidoreduktasen verwenden Cofaktoren als Redoxäquivalente, entweder frei dissoziierbare Moleküle wie Nicotinamid-Cofaktoren (NAD(P)(H)) oder Cofaktoren, die kovalent an das Enzym gebunden sind wie Flavin-adenin-dinucleotid (FAD).

In allen diesen Fällen können die Cofaktoren durch eine elektrochemische Reaktion regeneriert werden. Die jeweiligen Anforderungen an einen elektroenzymatischen Prozess sollen anhand einiger Beispiele erläutert werden. Dabei sind die Beispiele nach reduktiver und oxidativer Regenerierung und nach frei dissoziierten und kovalent gebundenen Cofaktoren unterteilt. Weiterhin gibt es auch die Möglichkeit, labile oder für das Enzym schädliche Substrate elektrochemisch *in situ* herzustellen.

1.5.1 Oxidationsreaktionen mit NAD(P)⁺

Die elektrochemische Regeneration von NAD(P)⁺ kann auf verschiedene Weise erfolgen (siehe Abbildung 20). Direkte Oxidation des Cofaktors an der Elektrode erfordert hohe Überpotentiale und ist deshalb nur für ansonsten oxidationsstabile Reaktionssysteme geeignet (Bonney *et al.* 1988; Steckhan 1994).

Zur Absenkung des benötigten Potentials kann ein Mediator eingesetzt werden (Abbildung 20; b)), der den Elektronentransfer zwischen Cofaktor und Elektrode vermittelt. Für die Oxidation von NAD(P)H sind dies etwa Phenanthrolin-Komplexe (Hilt *et al.* 1997; Hilt und Steckhan 1993; Steckhan *et al.* 2001).

Abbildung 20: elektrochemische Regeneration von NAD(P)⁺

So berichten Hilt und Steckhan von der durch Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (HLADH) katalysierten Synthese von Cyclohexanon, bei der der verbrauchte Cofaktor NADP⁺ durch einen Ruthenium-Phenanthrolin-Komplex elektrochemisch regeneriert wird (Hilt und Steckhan 1993).

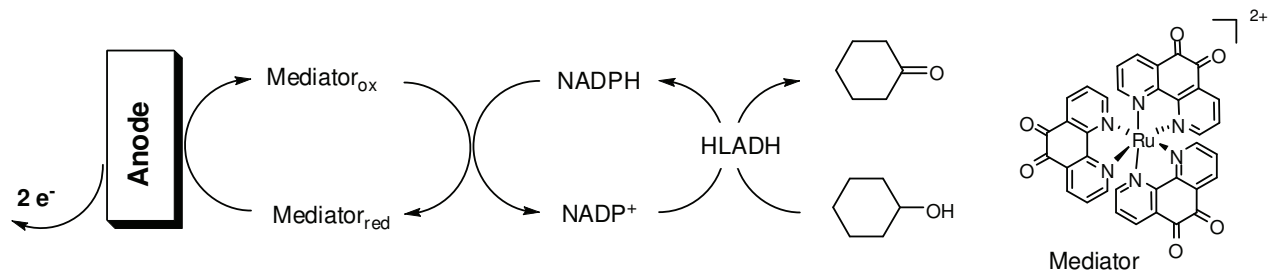


Abbildung 21: Synthese von Cyclohexanon unter elektrochemischer Cofaktorregenerierung mit Phenanthrolin-Komplexen

Ein weiterer Mediator zur Oxidation von NADPH ist 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonat (ABTS) (Schröder *et al.* 2003), das zur Cofaktorregenerierung bei der Synthese von chiralen Lactonen durch HLADH verwendet wurde.

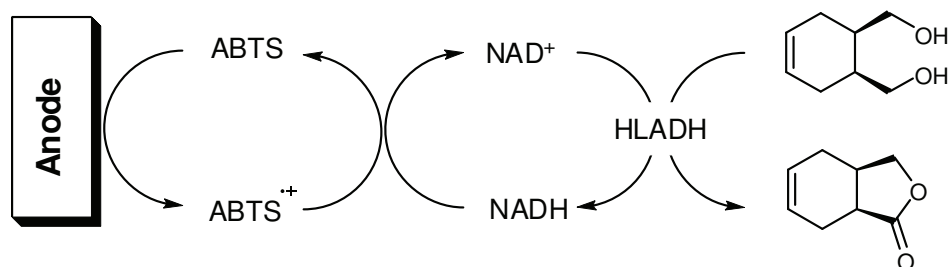


Abbildung 22: Synthese von chiralen Lactonen durch Pferdeleber-ADH unter elektrochemischer Cofaktorregenerierung mit ABTS

Die dritte Möglichkeit zur Regenerierung von NADP⁺ (Abbildung 20; c)) ist die Verwendung eines Mediators, der ein Enzym regeneriert, das den Cofaktor oxidiert (enzym-gekoppelte elektrochemische Cofaktorregenerierung). Hier kann die Synthese von Ribulose-5-Phosphat aus 6-Phosphogluconat durch 6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGD) genannt werden, bei der als Mediator Carboxamidomethyl-viologen (CAV) eingesetzt wurde. Enzyme, die diesen Mediator als Redoxäquivalent akzeptieren, nennt man AMAPOR ("artificial mediator accepting pyridine nucleotide oxidoreductase"). Nach Abgabe der Elektronen an den Mediator wird AMAPOR durch Oxidation des Cofaktors regeneriert (Schulz *et al.* 1995).

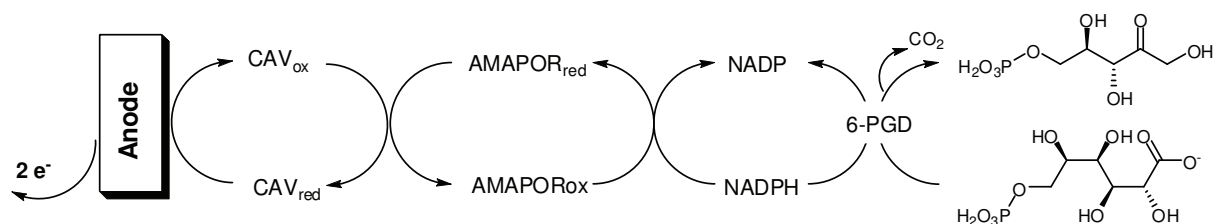


Abbildung 23: Synthese von Ribulose-5-Phosphat aus 6-Phosphogluconat durch 6-Phosphogluconatdehydrogenase

1.5.2 Reduktionsreaktionen mit NAD(P)H

Auch für die *in situ* Regenerierung von NADPH gibt es drei unterschiedliche Ansätze, die weitestgehend analog zu den in Abbildung 20 vorgestellten sind.

Die direkte Reduktion von NADP⁺ an der Elektrodenoberfläche ist zwar möglich, aber es werden nicht nur sehr hohe Potentiale benötigt, sondern durch die Übertragung einzelner Elektronen kommt es zur Ausbildung radikalischer Zwischenstufen, welche dimerisieren können und so dem System entzogen werden (Steckhan 1994). Auch die an die Reduktion anschließende Protonierung verläuft unselektiv und ergibt außer dem enzymatisch aktiven 1,4-NADPH auch das enzymatisch nicht verwertbare 1,6-NADPH. Versuche, den Einfluss der Dimerisierung durch stark verdünnte Lösungen zu vermindern, waren nur von geringem Erfolg (Baik *et al.* 1999; Siu *et al.* 2007).

Durch mediatorvermittelte Reduktion des Cofaktors ist eine selektive Regenerierung möglich, wenn der Mediator vier Kriterien erfüllt (Steckhan 1994):

- Um Radikalbildung zu verhindern, müssen die zwei Elektronen in einem Schritt übertragen werden, etwa als Hydridion.
- Die Aktivierung des Mediators muss bei einem Potential erfolgen, das unter dem der direkten Reduktion von NAD(P)^+ liegt (-900 mV vs. Ag|AgCl).
- Die Redoxäquivalente müssen selektiv auf den Cofaktor, nicht auf das Substrat der Enzymreaktion, übertragen werden.
- Die Reduktion muss enzymatisch aktives 1,4-NADPH ergeben.

Diese Anforderungen erfüllt der Komplex ((2,2'-bipyridyl)(pentamethylcyclopentadienyl)-rhodium ($\text{Rh}(\text{bpy})$))(Steckhan 1987) und es wurde schon über präparative Anwendungen berichtet. Da dieser Komplex ein zentraler Aspekt dieser Arbeit ist, soll er an anderer Stelle beschrieben werden (Kapitel 3.2, 3.3.2 und 5).

Es ist ebenso möglich, den Cofaktor durch eine Kombination aus Mediator und zweitem Enzym zu regenerieren. Obwohl dies den Einsatz eines zweiten Enzyms nötig macht, wie es auch in der enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung der Fall ist (siehe 1.4.1), wurde dieser Ansatz bereits in einigen Synthesen eingesetzt (Delecouls-Servat *et al.* 2002a; Dicosimo *et al.* 1981; Kang *et al.* 2001; Kim und Yun 2004; Schulz *et al.* 1995).

Beispielhaft für diesen Reaktionsansatz wird die Synthese von (*R*)-Mandelat aus Benzoylformiat durch Benzoylformiatreduktase (BFR) gezeigt (Kim und Yun 2004). Als Mediator wird Methylviologen (MV) eingesetzt, als zweites Enzym Diaphorase (DPase).

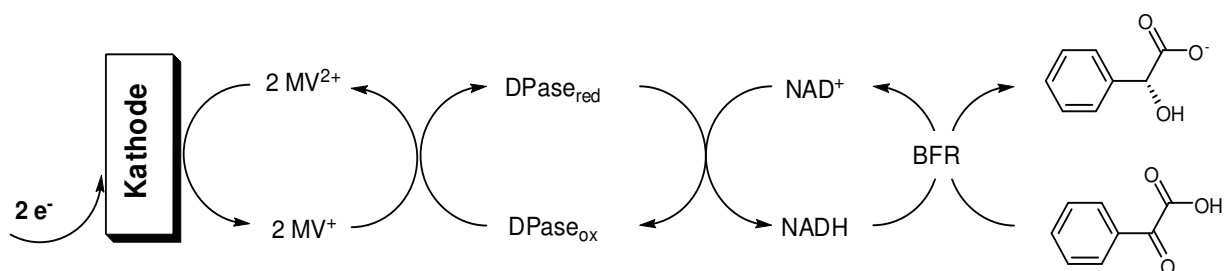


Abbildung 24: Synthese von (*R*)-Mandelat auf Benzoylformiat durch Benzoylformiatreduktase

1.5.3 Flavin-abhängige Oxidationen: oxidative Regenerierung

Im Gegensatz zu NAD(P)(H) -abhängigen Enzymen, bei denen der Cofaktor als eigenes Molekül vorliegt, ist bei Flavoenzymen der Cofaktor als prosthetische Gruppe fest an das Molekül gebunden. Dies hat den Vorteil, dass der Cofaktor immer in der Nähe des aktiven Zentrums vorliegt und er beispielsweise in kontinuierlichen Synthesen nicht aus der Reaktionslösung ausgewaschen wird. Andererseits kann es sein, dass tief in der Proteinhülle liegende Cofaktoren nur schwer von Redoxäquivalenten zu erreichen sind und dass Enzyme mit inaktiviertem Cofaktor nicht wieder durch

Zugabe neuen Cofaktors aktiviert werden können. Weiterhin im Gegensatz zu NAD(P)(H)-abhängigen Enzymen kann der Cofaktor für oxidative Reaktionen durch molekularen Sauerstoff regeneriert werden. Dies hat allerdings den Nachteil einer gleichzeitigen Bildung von Wasserstoffperoxid, das sich negativ auf die Enzymstabilität auswirken kann. In der Praxis wird meist das Enzym Katalase hinzugegeben, welches das H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff disproportioniert. (Pollegioni *et al.* 1994; Trost und Fischer 2002). Auf Katalase kann verzichtet werden, wenn statt Sauerstoff ein elektrochemischer Ansatz verwendet wird. Wie bereits erwähnt, liegt das aktive Zentrum des Enzyms aber oft so tief in der Proteinhülle, dass der direkte Kontakt mit der Elektrodenoberfläche unmöglich ist. Hier bietet sich ein Mediator an, der als Elektronenträger zwischen Enzym und Elektrode fungiert.

Eine Molekulargewichtsvergrößerung durch Polymeranbindung dieser Mediatoren ermöglicht sogar kontinuierliche Prozesse. So wurden zum Beispiel polymerangebundene Ferrocenderivate zur Regenerierung von p-Cresol-Methylenhydroxylase (CHM) aus *Pseudomonas putida* eingesetzt, die die Bildung von p-Hydroxybenzaldehyd aus p-Methylphenol katalysiert (Brielbeck *et al.* 1994).

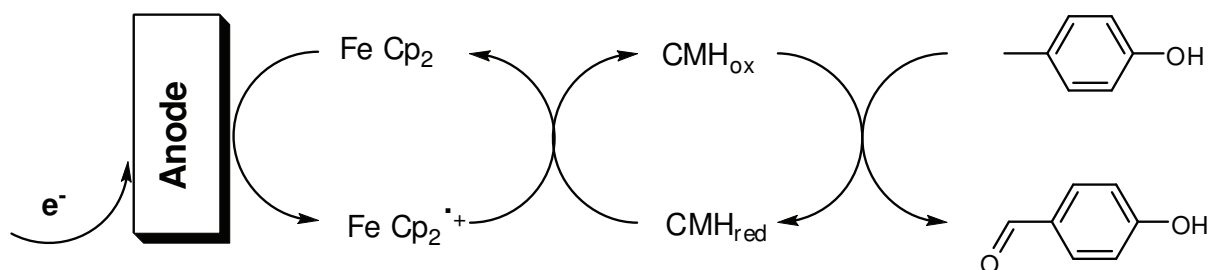


Abbildung 25: p-Hydroxybenzaldehyd aus p-Methylphenol (Brielbeck *et al.* 1994)

1.5.4 Flavin-abhängige Oxidationen: reduktive Regenerierung

Monooxygenasen sind Flavin-abhängige Enzyme, die eine Vielzahl synthetisch interessanter Oxidationsreaktionen, darunter Hydroxylierungen, Baeyer-Villiger Oxidationen und Epoxidierungen, katalysieren. Wie der Name andeutet, übertragen Monooxygenasen ein Sauerstoffatom auf das Substrat. Da als Cosubstrat molekularer Sauerstoff verwendet wird, reagiert das zweite Sauerstoffatom mit dem Cofaktor des Enzyms durch Reduktion zu Wasser. Eine elektrochemische Regenerierung des an das Enzym gebundenen Cofaktors kann auch hier über drei mögliche Wege ablaufen, direkte Reduktion an der Elektrode, mediatorvermittelte Reduktion und enzym-gekoppelte elektrochemische Regenerierung. Im dritten Fall wird durch den Mediator ein frei dissoziierter Cofaktor wie NAD(P)H reduziert, der mit dem Enzym reagiert (vergleiche 1.5.2).

Ein Beispiel für den direkten Elektronentransfer zu FAD wird von Hollmann *et al.* berichtet (Hollmann *et al.* 2005). Dabei konnte durch den elektroenzymatischen Ansatz die Komplexität des Reaktionssystems einer stereospezifischen Epoxidierung von Styrenen durch eine Styrenmonooxygenase (StyA) deutlich verringert werden. Die Produktivitäten blieben aber bisher gering, vermutlich durch die Tatsache, dass der enzymgebundene Cofaktor durch sterische Abschirmung nur schwer die Elektrodenoberfläche erreichen kann.

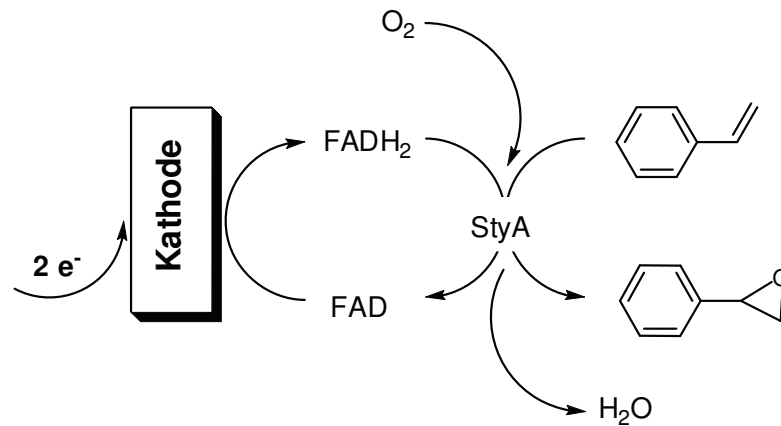


Abbildung 26: stereoselektive Epoxidierung von Styren unter direkter elektrochemischer Regenerierung

Bei der ortho-Hydroxylierung von Phenolen durch 2-Hydroxybiphenyl-3-monoxygenase (HbpA) aus *P. azelaica* wurde das Enzym durch NADH regeneriert, das wiederum elektrochemisch durch den in 1.5.2 vorgestellten Mediator Rh(bpy) reduziert wurde (Hollmann *et al.* 2001).

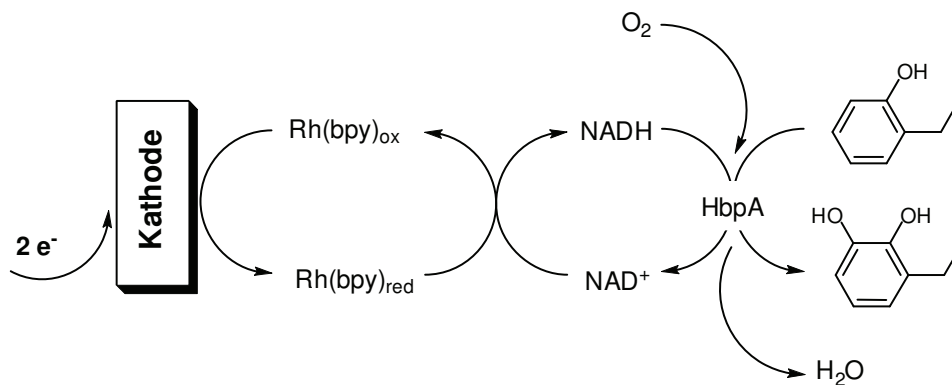


Abbildung 27: Ortho-Hydroxylierung von Phenolen unter enzym-gekoppelter elektrochemischer Regenerierung

1.5.5 Elektrochemische Herstellung von Cosubstraten

Ein elektrochemischer Ansatz kann auch sinnvoll sein, um Enzymsubstrate *in situ* zu erzeugen, die andernfalls in zu hohen Konzentrationen auftreten würden oder unter Prozessbedingungen von geringer Stabilität wären. Prominentestes Beispiel ist die elektrochemische Produktion von Wasserstoffperoxid. Die Gruppe der Peroxidasen verwendet anstelle von NADP(H) oder FAD prosthetische Gruppen wie Vanadat oder Häm. Obwohl diese Gruppen zur Aktivierung Wasserstoffperoxid benötigen, stellt dieses Cosubstrat gleichzeitig auch eine Möglichkeit zur Inaktivierung des Enzyms dar, etwa über die oxidationslabile Porphyrin-Einheit des Häms (Kohlmann und Lütz 2006). Im Vergleich zu reaktionstechnischen Ansätzen, in denen die Zugabe des Wasserstoffperoxids optimiert wird, um hohe Konzentrationen zu vermeiden, ist der elektrochemische Ansatz effizienter und eleganter. Durch die Regelung des Potentials kann die Bildungsrate an Wasserstoffperoxid exakt dosiert und eine maximale Enzymeffizienz erzielt werden. Ein eindrucksvolles Beispiel für eine solche Reaktion ist die Produktion von chiralen Sulfoxiden wie (*R*)-Methylphenylsulfoxid durch Chlorperoxidase aus *Caldariomyces fumago* (CPO), bei denen

Produktivitäten von bis zu $104 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und hervorragende Enzymeffizienzen erzielt werden konnten (Kohlmann und Lütz 2006; Lütz *et al.* 2007).

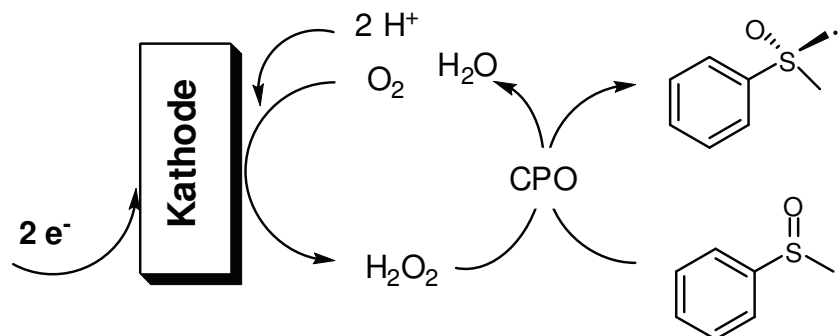


Abbildung 28: Synthese von chiralen Sulfoxiden mit elektrochemischer Cosubstrat-Generierung

1.6 Immobilisierung

Bei vielen Enzymen wird die synthetische Bedeutung durch eine geringe Stabilität unter Prozessbedingungen oder sehr hohe Kosten des Enzyms begrenzt. Durch eine geeignete Methode der Immobilisierung können eine Reihe von Vorteilen erzielt werden. Immobilisierte Enzyme sind dabei definiert als "Enzyme, die physikalisch abgegrenzt oder an einem bestimmten Ort lokalisiert sind, wobei sie ihre katalytische Aktivität behalten und wiederholt oder kontinuierlich genutzt werden können" (Katchalski-Katsir, E. 1971 First enzyme engineering conference, Henniker, New Hampshire, USA).

Durch die Immobilisierung wird ein Enzym in seiner Verformbarkeit eingeschränkt, was oft zu einer deutlich gesteigerten Stabilität führt (Bolivar et al. 2006; Mozhaev 1993). Weiterhin kann ein immobilisiertes Enzym leichter von der Reaktionsmischung abgetrennt werden, was auf der einen Seite ein Katalysatorrecycling ermöglicht und auf der anderen Seite ein proteinfreies Produkt ergibt. Eine Immobilisierung kann auch eine kontinuierliche Arbeitsweise beispielsweise im Strömungsrohr ermöglichen, ohne dabei auf Membranen zurückgreifen zu müssen (Hildebrand und Lütz 2006). In der Sensortechnik hat sich der Einsatz von immobilisierten Enzymen auf Grund der hohen Lagerstabilität längst etabliert. Ein Beispiel dafür ist die Verwendung von Glucoseoxidase zur Messung von Blutzucker.

Eine Vielzahl von Immobilisierungstechniken ist entwickelt worden, die in vier Kategorien eingeteilt werden kann:

- Adsorption oder Deposition des Enzyms auf einem Trägermaterial
- kovalente Anbindung des Enzyms an ein Trägermaterial
- Einkapselung des Enzyms in ein Polymergel oder in eine Membran
- Quervernetzung des Enzyms ohne Trägermaterial (CLEC, CLEA)

Die spezifischen Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden sollen im Folgenden kurz besprochen werden. Abgesehen von den genannten Vorteilen muss generell auch beachtet werden, dass es bei der Immobilisierung teilweise zu drastischen Aktivitätseinbußen kommen kann. Das liegt zum einen daran, dass das Enzym durch die Immobilisierung in seiner räumlichen Struktur verändert wird, zum anderen findet durch den Einsatz eines Trägermaterials, das bis zu 99 % des Immobilisats darstellt, eine "Verdünnung" der katalytischen Dichte statt. Auch die Prozesskosten steigen durch die zusätzlich notwendigen Reagenzien.

1.6.1 Adsorption und Deposition

Das Enzym kann auf verschiedene Art und Weise mit dem Trägermaterial wechselwirken, ohne kovalente Bindungen auszubilden. Dazu gehören elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen Gruppen des Enzyms (Mateo *et al.* 2000) und des Trägers ebenso wie Säure-Base-Wechselwirkungen (Macario *et al.* 2007) (siehe Abbildung 29). Für eine adsorptive Immobilisierung

sind Materialien mit großer Oberfläche, etwa Silicagele und modifizierte Dextrane, günstig. Weiterhin kann es besonders bei Lipasen zu einer Adsorption auf Materialien mit hydrophober Oberfläche kommen, was teils sogar zu einer zusätzlichen Aktivierung des Enzyms führt (Wilson *et al.* 2006).

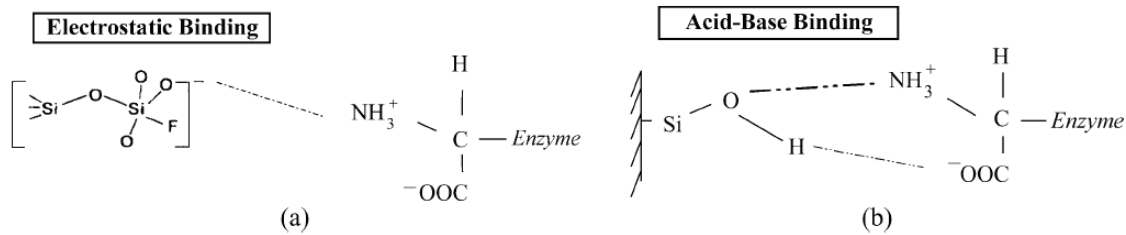


Abbildung 29: elektrostatische und Säure-Base Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren des Proteins und funktionellen Gruppen auf der Oberfläche des Trägermaterials (aus (Macario *et al.* 2007))

Manchmal kann aber auch eine einfache Deposition des Enzyms auf ein Trägermaterial für eine Anwendung ausreichend sein. So können Enzymlösungen durch Verdunstung des Wasser auf Glaskugeln aufgetragen und in Prozessen verwendet werden, bei denen keine wässrige Phase existiert, etwa in einem Gasphasenreaktor bei der Umsetzung leichtflüchtiger Substrate (Trivedi *et al.* 2005).

Diese Methode der Immobilisierung ermöglicht hohe Restaktivitäten, weil durch die vergleichsweise schwachen Wechselwirkungen die Tertiärstruktur des Enzyms wenig beeinflusst wird. Andererseits stellt diese Tatsache aber auch nur einen geringen Stabilisierungsfaktor dar und beschränkt die Retention des Enzyms unter kontinuierlichen, wässrigen Bedingungen.

1.6.2 Kovalente Anbindung

Durch kovalente Anbindung des Enzyms an ein Trägermaterial ist eine maximale Retention des Enzyms möglich; im Fall einer Anbindung durch mehrere Bindungen ("multi-point covalent attachment") kann die eingeschränkte Beweglichkeit des Enzyms weiterhin zu einer deutlich erhöhten Stabilität führen. Allerdings können kovalente Bindungen durch ihren großen Einfluss auf die räumliche Struktur des Enzyms zu drastischen Aktivitätseinbußen führen.

Generell kann das Enzym über verschiedene Bindungsarten an den Träger gebunden werden, allerdings sollten solche Aminosäuren von der Reaktion ausgenommen sein, die für die katalytische Aktivität verantwortlich sind.

Die wichtigsten Anbindungsreaktionen sind die folgenden (Kennedy und Cabral 1987):

- Bei der Diazo-Kupplung wird das Enzym über die Imidazol-Seitenkette des Histidins oder die Phenol-Gruppe des Tyrosins an die Aryldiazonium-Gruppe des Trägers gebunden. Die Aktivierung des Trägermaterials geschieht gewöhnlich über die Reaktion von Amino-Gruppen mit Nitrit in saurem Milieu (Xi *et al.* 2005).
- Bei einer Peptid-Bindung findet eine Reaktion zwischen einer nucleophilen Gruppe des Enzyms, wie Amino-, Hydroxy-, oder Thiol-Gruppen, und der aktivierten funktionellen Gruppe

des Trägermaterials statt. Dabei kann entweder eine Säure-Funktion auf dem Träger in eine reaktive Form überführt werden (Säurechloride, Säureanhydride, Isocyanate u.a.), die mit dem Protein reagiert. Es ist aber auch möglich, die Amidbindung durch ein zusätzliches Reagenz wie Carbodiimid zu knüpfen.

- Eine weitere Methode zur Ausbildung von kovalenten Bindungen ist die Alkylierung beziehungsweise Arylierung. Amino-Gruppen, Phenol- oder Thiol-Gruppen des Enzyms können mit Halogenen, Epoxid-Gruppen oder Vinylsulfonyl-Gruppen reagieren, Hydroxy-Gruppen auf dem Träger können durch Behandlung mit Zyanurchlorid aktiviert werden.
- Andere Möglichkeiten der Anbindung beinhalten Schiff-Basen, Ugi-Reaktionen (Ugi 1962; Vrbova und Marek 1990) und Thiol-Disulfid-Reaktionen.

1.6.3 Einkapselung

Bei der Einkapselung wird das Enzym in eine polymere Matrix eingehüllt und so vor schädigenden Einflüssen wie Kontakt mit Phasengrenzflächen und mechanischer Belastung geschützt (Lozinsky *et al.* 2001).

Ein System aus Polymer und immobilisiertem Lösemittel bezeichnet man als Gel. Das Vorhandensein von Lösemittelmolekülen ist entscheidend für die Ausbildung einer porösen dreidimensionalen Struktur anstelle eines kompakten Polymers. Das Polymer umschließt den Biokatalysator, sodass sich Kompartimente ausbilden, in denen einzelne Enzyme oder kleine Agglomerate lokalisiert sind. Die Porosität des restlichen Polymernetzwerkes ist deutlich feinmaschiger, sodass zwar Substrate und Produkte durch das Gel diffundieren können, das Enzym aber durch seine Größe fest lokalisiert vorliegt. Weitere Wechselwirkungen adsorptiver oder ionischer Natur können das Enzym beeinflussen, werden aber für die Retention nicht benötigt. Durch die hydrophile Umgebung in der Polymermatrix befindet sich das Enzym unter geeigneten Bedingungen für maximale Stabilität und Aktivität. Diese eingekapselten Enzyme können deshalb oft auch unter nicht-wässrigen Bedingungen, etwa organischen Lösemitteln, eingesetzt werden, die ansonsten einen stark inaktivierenden Effekt auf das Enzym haben könnten. Dies ermöglicht auch den Einsatz von Enzymen in industriellen, mehrstufigen Synthesen, für die ein Wechsel von organischem Lösemittel auf Puffer und zurück einen zu großen Prozessaufwand bedeuten würde (Hischer *et al.* 2006).

Man unterscheidet eine Reihe von Polymergelen nach der Art ihrer Herstellung (Lozinsky *et al.* 2003). Bekannte Beispiele sind etwa chemotrope Gele aus Polyacrylamid oder quervernetzten Dextranen (zum Beispiel Sephadex), die bereits viele Anwendungen in der Biotechnologie gefunden haben (Ansoerge-Schumacher *et al.* 2006; Khare *et al.* 1991; Lee und Akoh 1998; Nilsson und Mosbach 1980; Torchilin *et al.* 1985; Tumturk *et al.* 2007). Calcium-Alginat-Gele bilden sich durch Ausbildung mehrerer Bindungen an ein stark koordinierendes Metallion, sie werden oft für Zellimmobilisierungen verwendet (de Alteriis *et al.* 2004; Kawaguti und Sato 2007; Laca *et al.* 2000; Scott *et al.* 1989). Auch cryotrope Gele sind vielversprechende Materialien für die Immobilisierung von Biokatalysatoren, hier wird die Gelbildung durch einen Prozess des Einfrierens und Auftauens induziert (Bacheva *et al.*

2005; Busto *et al.* 2007; Hischer *et al.* 2006; Lozinsky und Plieva 1998; Lysogorskaya *et al.* 2008; Szczesna *et al.* 2001).

1.6.4 Quervernetzung

Den drei bisher beschriebenen Immobilisierungsansätzen ist gemein, dass das Enzym an ein Trägermaterial gebunden oder darin eingeschlossen wird. Dadurch findet eine Verdünnung der katalytischen Aktivität statt, da bis zu 99 Prozent des Immobilisats aus unreaktivem Träger bestehen können.

Es ist aber auch möglich, Enzyme ohne Verwendung eines Trägermaterials zu immobilisieren. Dabei nutzt man bifunktionelle Materialien wie etwa Glutardialdehyd, um reaktive Aminosäureseitenketten auf der Oberfläche der Enzyme intermolekular miteinander zu verknüpfen. Dadurch kann in vielen Fällen eine erhöhte Stabilität gegen Hitze, organische Lösemittel und Proteolyse erreicht werden (Cao *et al.* 2003; Sheldon *et al.* 2005).

Man unterscheidet die quervernetzten Enzyme nach der Art ihrer Herstellung in vier Klassen (siehe Abbildung 30). Wird das Enzym aus der Lösung quervernetzt, spricht man von "cross-linked enzymes" oder CLEs. Diese zeigen aber nur moderate Aktivitäten und geringe mechanische Stabilität. Dies führte zur Entwicklung von "cross-linked enzyme crystals" oder CLECs, bei denen eine deutliche Stabilisierung durch die Quervernetzung von kristallisierten Enzymen erzielt werden kann. Vergleichbare Ergebnisse, aber ohne die aufwendige Prozedur des Kristallisierens, konnten durch die Quervernetzung von Enzymen erzielt werden, die als Aggregate aus der Lösung ausgefällt wurden ("cross-linked enzyme aggregates"; CLEAs). Die Quervernetzung von sprühgetrockneten Enzymen ("cross-linked spray-dried enzymes"; CSDE) ist nur von untergeordneter Bedeutung, da hier große Aktivitätsverluste auftreten.

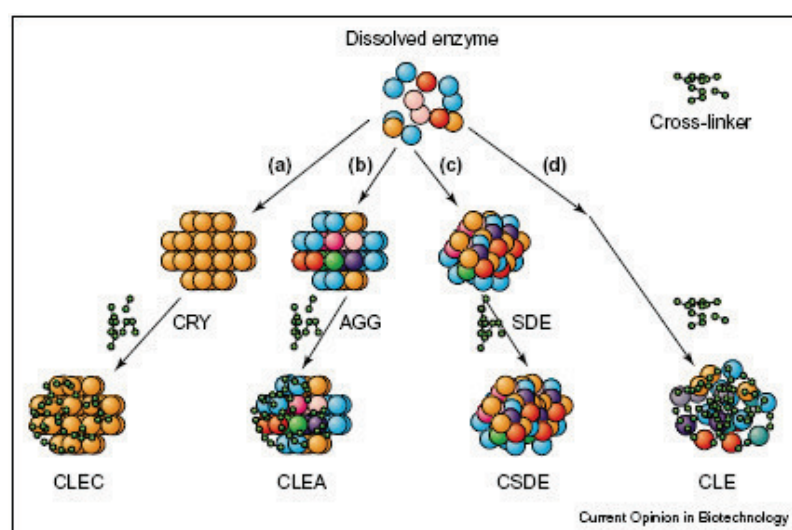


Abbildung 30: verschiedene Arten der Quervernetzung von Enzymen (aus(Cao *et al.* 2003))

2 Ziel der Arbeit

Die indirekte elektrochemische Cofaktorregenerierung stellt eine elegante und kostengünstige Alternative zu den etablierten Methoden der Cofaktorregenerierung dar (Kohlmann *et al.* 2007; Steckhan 1994). Dennoch ist ihre Anwendung bisher auf wenige literaturbekannte Beispiele beschränkt geblieben (siehe Tabelle 1). Diesen Anwendungen ist gemein, dass die erzielten Umsätze und Produktivitäten weit hinter den Möglichkeiten zurückbleiben, die mit einer substrat- oder enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung möglich sind (Goldberg *et al.* 2007).

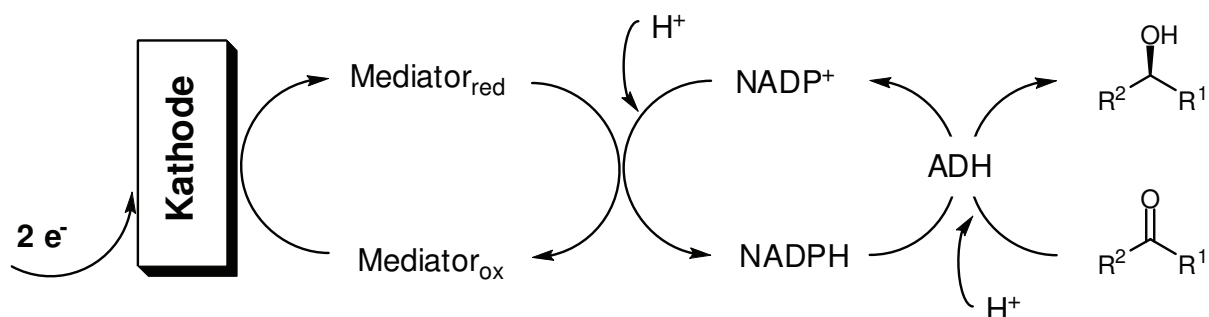


Abbildung 31: Reaktionssystem der indirekten elektrochemischen Cofaktorregenerierung

Weiterhin wird bei Betrachtung dieser Kennzahlen deutlich, dass die Katalysatoreffizienz des Rhodium-Mediators Rh(bpy) sehr gering ist, was eine häufige Nachdosierung von Mediator und damit höhere Kosten bewirkt. Als Maß für die Effizienz des Mediators gibt man die maximale Wechselzahl an (*ttn*, vom Englischen total turnover number), sie ist definiert als das Stoffmengenverhältnis zwischen gebildetem Produkt und verbrauchtem Katalysator. Für einen ökonomisch sinnvollen Prozess müsste diese Effizienz deutlich höher liegen, um die eingesetzte Katalysatormenge gering halten zu können (Vuorilehto *et al.* 2004). Auch die Produktaufarbeitung würde von einer geringeren Katalysatorladung profitieren.

In bisherigen Untersuchungen ist zwar der elektrochemische Reaktionsmechanismus des Mediators an der Elektrodenoberfläche detailliert untersucht worden (Steckhan *et al.* 1991), für die Gesamtreaktion fehlt aber bisher ein solch genaues Verständnis. Auch die Reaktionsparameter wurden bisher nur phänomenologisch optimiert (Hollmann *et al.* 2002; Spika 1994).

Ziel dieser Arbeit soll die detaillierte Charakterisierung des gesamten Reaktionssystems aus elektrochemischer Cofaktorregenerierung und enzymatischer Produktionsreaktion sein. Dabei sollen die Limitierungen des Prozesses identifiziert und Verbesserungen entwickelt werden. In elektroenzymatischen Prozessen ist es dafür erforderlich, die Gesamtreaktion sowohl unter biokatalytischen als auch elektrochemischen Aspekten zu betrachten und die Prozessparameter den Erfordernissen beider Teilreaktionen anzupassen (Kohlmann und Lütz 2006; Lütz 2004). Deshalb ist es für eine vollständige Charakterisierung von entscheidender Bedeutung, auf elektrochemische Analyseverfahren ebenso zuzugreifen wie auf die Methoden der Biokatalyse.

Tabelle 1: bisherige elektroenzymatische Synthesen mit Rh(bpy) (Kohlmann et al. 2007)

Enzym	Produkt	Umsatz	<i>t₉₀</i> (Rh(bpy))	Referenz
D-Laktat-dehydrogenase	D-Laktat	70 % (3 h)	14	(Ruppert <i>et al.</i> 1987)
ADH aus Pferdeleber	(<i>S</i>)-4-Phenyl-2-butanol	70 % (5 h)	14	(Steckhan 1994)
ADH aus <i>Rhodococcus sp.</i>	(<i>S</i>)-4-Phenyl-2-butanol	76 % (5 h)	15	(Steckhan 1994)
ADH aus Pferdeleber	Cyclohexanol	100 % (70 h)	n. b.	(Delecouls-Servat <i>et al.</i> 2002b)
ADH aus <i>Thermus sp.</i>	(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-methylcyclohexanol	8 % (10 h)	51	(Höllrigl <i>et al.</i> 2007)

Zur Stabilisierung des Enzyms und somit besseren Effizienz unter Prozessbedingungen sollen zwei Methoden zur Immobilisierung untersucht werden, einerseits die kovalente Anbindung an ein poröses Trägermaterial und andererseits die Einkapselung in ein Polyvinylalkoholgel. Weiterhin sollte die Immobilisierung zur besseren Handhabbarkeit des Enzyms und zur Vereinfachung des Reaktoraufbaus beitragen.

Mit dem tieferen Verständnis der elektroenzymatischen Reaktion und nach Überwindung der Limitierungen soll ein unter verfahrenstechnischen Aspekten optimiertes Reaktormodell entwickelt werden, bei dem die elektrochemische Cofaktorregenerierung mit der enzymkatalysierten Synthese chiraler Alkohole verknüpft wird.

Vorrangiges Ziel ist dabei die Stabilisierung von Enzym und Mediator, sodass hohe Effizienzen erreicht werden können. Dies sollte darüber hinaus lange Reaktorlaufzeiten und hohe Umsätze ermöglichen. Zum Abschluss soll diskutiert werden, welche Möglichkeiten zur Steigerung der Produktivität das neu entwickelte Reaktorkonzept bietet.

3 Charakterisierung des Reaktionssystems

3.1 Reaktionssystem

Wie bereits in Abschnitt 1.5 beschrieben, stellen elektroenzymatische Synthesen eine Kopplung aus einer enzymatischen Reaktion und einer elektrochemischen Reaktion dar.

In dieser Arbeit soll das Reaktionssystem der indirekten elektrochemischen Cofaktorregenerierung untersucht werden. Cofaktoren sind organische Moleküle oder funktionelle Gruppen, die für die katalytische Aktivität des Enzyms notwendig sind (Chenault und Whitesides 1987; Wichmann 2005; Zhao und van der Donk 2003). Bei der Verwendung von Alkoholdehydrogenasen zur Synthese chiraler Alkohole wird der Cofaktor Nicotinadenin-dinucleotid (NADH), beziehungsweise seine phosphorylierte Form NADPH, zur Übertragung der Redoxäquivalente benötigt. Wie bereits in Kapitel 1.1 beschrieben, können verschiedene Cosubstrate zur Regeneration des Cofaktors eingesetzt werden, die häufigsten darunter *iso*-Propanol und Formiat. Die Verwendung von elektrischem Strom als Redoxäquivalent stellt eine elegante Alternative zu den herkömmlichen chemischen Cosubstraten dar, bei der kostengünstige und massefreie Elektronen zur Regeneration des Cofaktors genutzt werden.

Bei direkter Reduktion des Cofaktors an der Kathodenoberfläche kommt es allerdings zu unselektiven Nebenreaktionen, da durch die Übertragung eines Elektrons radikalische Zwischenstufen entstehen, die dimerisieren und so für die Reaktion nicht mehr zur Verfügung stehen (Damian *et al.* 2007; Steckhan 1994). Der Einsatz eines Rhodium-Komplexes als sogenanntem Mediator ermöglicht die selektive und paarweise Übertragung von Elektronen auf den Cofaktor, und zwar bei einem niedrigeren Potential als für die direkte Reduktion nötig ist. Abbildung 32 fasst das elektroenzymatische Reaktionssystem aus mediatorvermittelter Cofaktorregeneration und enzymatischer Reaktion zusammen.

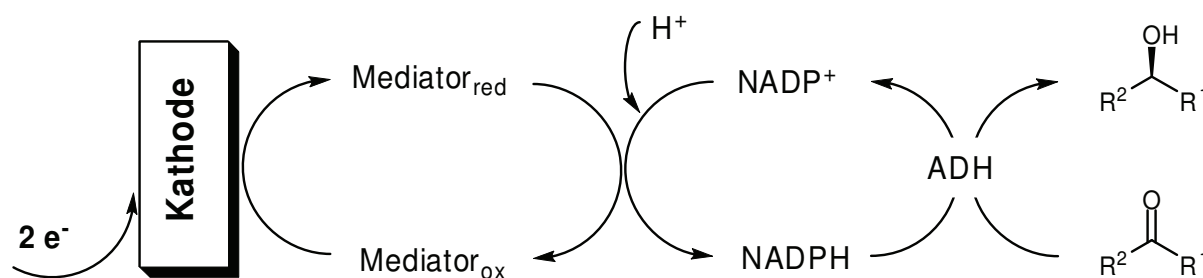


Abbildung 32: Reaktionssystem indirekte elektrochemische Cofaktorregenerierung

Wie bereits in Kapitel 2 beschrieben, ist die Effizienz dieses Regenerationsansatzes bisher recht gering. Im Folgenden sollen mögliche Limitierungen untersucht und Lösungsansätze entwickelt werden.

3.2 Beschleunigung des elektrochemischen Schritts¹

Ein Reaktionssystem aus mehreren Reaktionsschritten wird in seiner Gesamtgeschwindigkeit durch den langsamsten Einzelschritt limitiert. Bei elektroenzymatischen Prozessen ist dies in der Regel die elektrochemische Reaktion. Während für Alkoholdehydrogenasen Wechselzahlen in der Größenordnung von Tausenden berichtet werden (Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* (CPCR) 2300 h⁻¹; (Rissom *et al.* 1999)), liegen die Wechselzahlen für den Mediator Rh(bpy) in einem elektroenzymatischen Prozess im unteren zweistelligen Bereich (41 h⁻¹, Ankopplung an eine S-ADH; (Spika 1994); 11 h⁻¹, Ankopplung an eine Monooxygenase (Hollmann *et al.* 2001)). Dies hat seine Ursache in dem heterogenen Ladungstransfer zwischen der Elektrodenoberfläche und der Lösung, der langsamer abläuft als die Enzymreaktion innerhalb der wässrigen Phase. Um dennoch hohe Produktivitäten zu erzielen, muss also besonderes Augenmerk auf die Beschleunigung der Elektrodenreaktion gelegt werden. Aus reaktionstechnischer Sicht führen etwa die Vergrößerung der Elektrodenoberfläche und die Vermeidung von Toträumen zu höheren Reaktionsraten (Tamminen *et al.* 1996; Vuorilehto *et al.* 2004). Alternativ dazu kann die Reaktion aber auch durch eine chemische Optimierung des Katalysators beschleunigt werden, wenn dadurch die Elektronenaufnahme oder der Hydridtransfer verbessert werden.

In diesem Kapitel wird deshalb die Darstellung und elektrochemische Charakterisierung einer Reihe modifizierter Komplexe beschrieben. Diese Komplexe werden mit Hinblick auf ihr Reduktionspotential und ihre katalytische Aktivität bewertet und diese Eigenschaften unter Reaktionsbedingungen überprüft.

3.2.1 Synthese neuer Rhodiumkomplexe

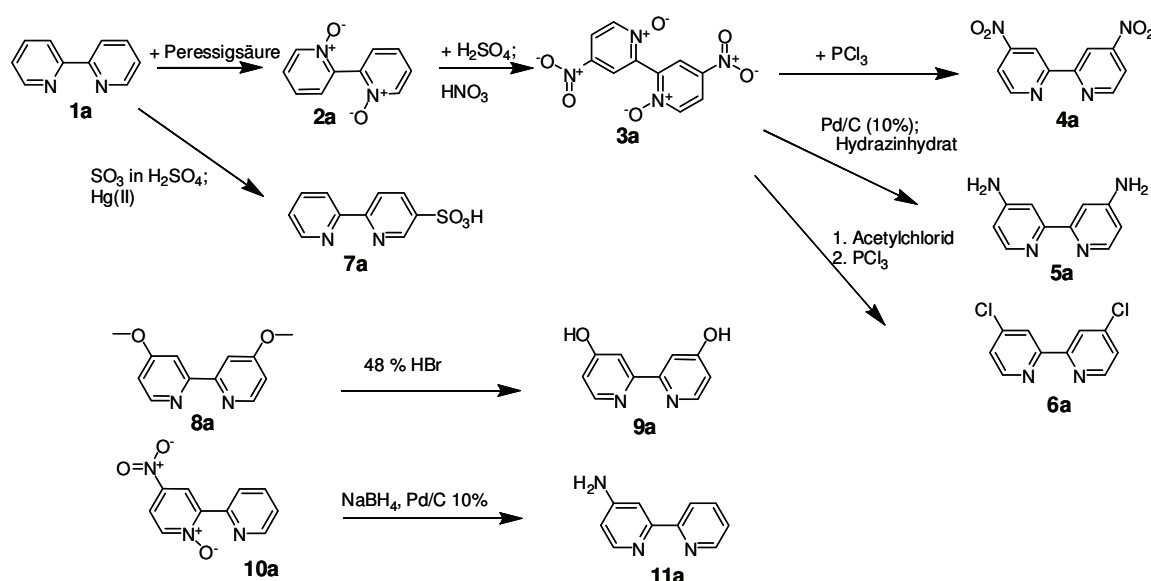
Ein eleganter Weg, neue Mediatoren zu entwickeln, ist die Modifikation des 2,2'-Bipyridin-Liganden. 2,2'-Bipyridin ist ein wichtiger Ligand in der Komplexchemie von Übergangsmetallen und wurde schon mit einer Vielzahl von funktionellen Gruppen modifiziert (Anderson *et al.* 1985; Komoschinski und Steckhan 1988; Sprecher *et al.* 1994). Um eine reibungslose Komplexbildung zu ermöglichen, wurden hauptsächlich Liganden mit funktionellen Gruppen in der 4-Position untersucht, in der die sterischen Wechselwirkungen mit den anderen Liganden, insbesondere dem Pentamethyl-cyclopentadienyl-Liganden (Cp*) am geringsten sind.

¹ Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden veröffentlicht als:

Hildebrand F., Kohlmann C., Franz A., Lütz S. "Synthesis, Characterization and Application of New Rhodium Complexes for Indirect Electrochemical Cofactor Regeneration", *Advanced Synthesis & Catalysis* **2008**; 350(6); 909-918.

Zusätzlich zu einer Vielzahl von kommerziell erhältlichen Liganden (**12a-16a**) wurden Liganden selbst synthetisiert, die meisten davon ausgehend von 2,2'-Bipyridin **1a**. Oxidation mit Peressigsäure ergab 2,2'-Bipyridin-N,N'-dioxid **2a**, das anschließend durch ein Gemisch aus Oleum und Salpetersäure in 4-Position nitriert wurde (**3a**) (ten Brink *et al.* 2003). **3a** war Ausgangsstoff für Bipyridine mit Nitrogruppen **4a** (ten Brink *et al.* 2003), Aminogruppen **5a** (Kavanagh und Leech 2004) und Chlorgruppen **6a** (Cook *et al.* 1984). Das mono-substituierte 4-Amino-bipyridin konnte analog zu **5a** aus dem einfach nitrierten **10a** dargestellt werden (Sprecher *et al.* 1994).

Das in 5-Position sulfonierte **7a** war ebenfalls direkt aus **1a** zugänglich (Herrmann *et al.* 1990). 2,2'-Bipyridin mit Alkoholgruppen in der 4-Position (**9a**) wurde durch Etherspaltung aus dem Methoxy-Derivat **8a** gewonnen (Hong und Gorman 2003).



	R_3	R_3'	R_4	R_4'	R_5	R_5'
12a	$-\text{CO}_2\text{H}$	$-\text{CO}_2\text{H}$				
13a			$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$		
14a			$-\text{C}_4\text{H}_9$	$-\text{C}_4\text{H}_9$		
15a			$-\text{CO}_2\text{H}$	$-\text{CO}_2\text{H}$		
16a					$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$

Abbildung 33: Übersicht über die Synthese von Liganden und kommerziell erhältliche Liganden

Die entsprechenden Rhodium-Komplexe wurden durch Umsetzung mit dem Rhodium-Vorkomplex $(\text{RCp}^+\text{Cl}_2)_2$ gewonnen und mit **b** gekennzeichnet (siehe Abbildung 34 (Kölle und Grätzel 1987)). Bei den meisten dieser Komplexe handelt es sich um bisher unbekannte Verbindungen, lediglich **13b** und **15b** wurden schon im Zusammenhang mit Cofaktorregenerierung untersucht (Steckhan *et al.* 1991). Andere Komplexe spielten eine Rolle bei Hydrierung von Carbonat (**9b** (Himeda *et al.* 2007)), der Photoreduktion von Protonen zu Wasserstoff (**12b** (Kölle *et al.* 1989)) und der Koordination an Cluster (**14b** (Marx *et al.* 2001)).

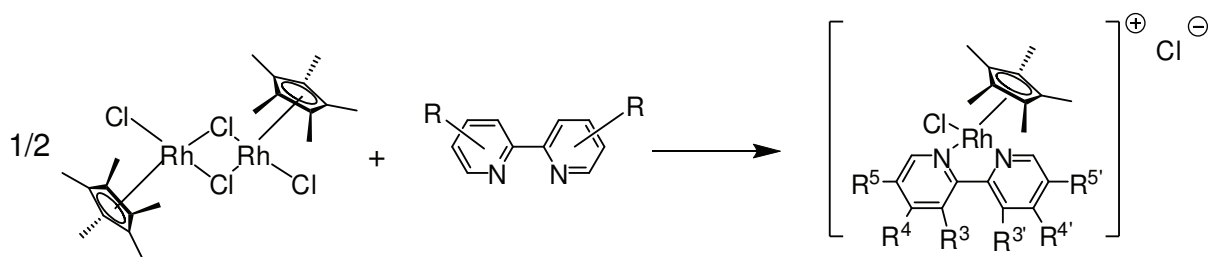


Abbildung 34: Komplexierung des Liganden mit dem Rhodium-Vorkomplex

Insgesamt wurden neben dem Standardmediator **1b** zwölf weitere Mediatoren eingehend elektrochemisch untersucht.

3.2.2 Elektrochemische Untersuchungen

3.2.2.1 Reaktionsmechanismus Rh(bpy)

Weil die elektrochemische Aktivierung von Rh(bpy) aus mehreren Elementarschritten besteht, ist zum Verständnis der Untersuchungen eine genaue Kenntnis des Reaktionsmechanismus vonnöten. Das Reaktionssystem wurde erstmalig von Steckhan detailliert beschrieben (Steckhan *et al.* 1991).

Damit der Mediator ein Hydridion auf den oxidierten Cofaktor übertragen kann, muss er an der Elektrode aktiviert werden, das heißt von einer Rhodium(III)-Spezies zu einer Rhodium(I)-Spezies reduziert werden. Dies geschieht in mehreren Elementarreaktionen. Im ersten Schritt wird ein Elektron an der Kathode aufgenommen und es bildet sich eine Rh(II)-Spezies (3-1). Nach dieser ersten Reduktion verlässt nun ein Ligand L, meist ein Wassermolekül, die Ligandensphäre des Komplexes (3-2). Alternativ dazu kann auch bereits ein zweites Elektron aufgenommen und gleichzeitig der Ligand abgespalten werden (3-3). Im Falle der vorherigen Ligandenabspaltung wird nun ein zweites Elektron aufgenommen (3-4) und es entsteht der Rh(I)-Komplex. Die Unterscheidung zwischen den Reaktionen (3-3) beziehungsweise (3-2) und (3-4) ist aufgrund einer Nebenreaktion von Bedeutung. Die beiden unterschiedlichen Rh(II)-Komplexe $[\text{Cp}^*\text{Rh}^{\text{II}}(\text{bpy})\text{L}]^+$ und $[\text{Cp}^*\text{Rh}^{\text{II}}(\text{bpy})]^+$ können statt der Aufnahme eines weiteren Elektrons auch miteinander unter Disproportionierung reagieren, wobei sich ein Rh(I)- und ein Rh(III)-Komplex bilden (3-5).



Die Rh(I)-Spezies bildet nun unter Aufnahme eines Protons aus der Lösung den aktivierten Komplex, der die zwei Elektronen als Hydridion auf den Cofaktor überträgt (3-6 und 3-7). Durch Aufnahme eines Liganden ergibt sich wieder der Rh(III)-Komplex, der als Katalysator unverändert aus der Reaktion hervorgeht.

Die elektrochemischen Untersuchungen an den Komplexen wurden mit Hilfe der Zyklischen Voltammetrie durchgeführt. Bei dieser Analysenmethode wird ein Potential an einer Arbeitselektrode zeitlich variiert und die entstehenden Ströme gemessen. Dabei entsprechen negative Ströme definitionsgemäß Reduktionsreaktionen und positive Ströme Oxidationsreaktionen (Speiser 1981). In Abbildung 35 ist beispielhaft das Zyklische Voltammogramm (CV vom Englischen "cyclic voltammogramm") von Rh(bpy) dargestellt. In der schwarzen Kurve erkennt man deutlich, dass bei -700 mV ein Reduktionsstrom auftritt, welcher der Reaktion von Rh(III) zu Rh(II) entspricht.

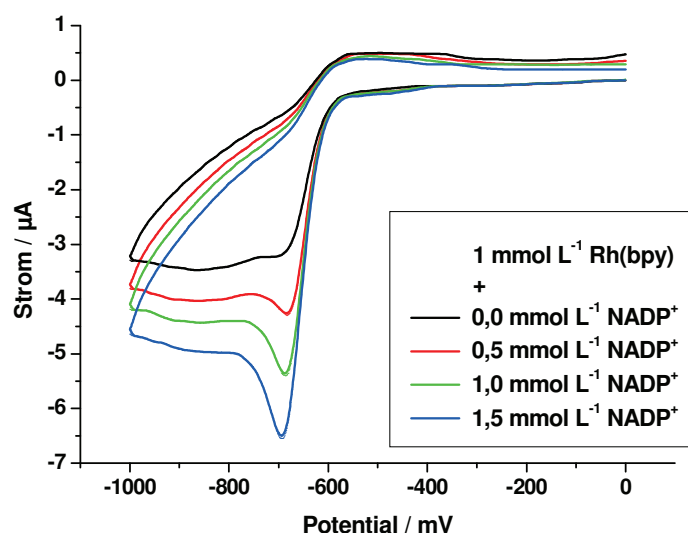


Abbildung 35: Zyklisches Voltammogramm Rh(bpy) in Gegenwart von NADP⁺;

Reaktionsbedingungen: 15 mL 50 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7; 1 mmol L⁻¹ Rh(bpy); 0 – 1,5 mmol L⁻¹ NADP⁺; WE: glassy carbon CE: Platindraht RE: Ag|AgCl; Potential -1000 - 0 mV; Vorschubgeschwindigkeit 100 mV s⁻¹

An der Form des CVs ist auch bereits zu erkennen, dass es sich bei der untersuchten Reaktion um ein vergleichsweise komplexes Reaktionssystem handelt. Bei einfachen reversiblen Elektrodenprozessen kann bei der Umkehrung der Stromrichtung ein Oxidationsstrom gemessen werden, der der Rückreaktion entspricht. Dieser Strom ist bei Rh(bpy) nur sehr schwach zu erkennen, da die elektrochemisch aktive Spezies durch Aufnahme eines Protons aus dem Gleichgewicht entfernt wird. Diese anschließende chemische Reaktion verhindert also eine Reversibilität des Systems (3-6). Weiterhin kommt es nicht wie erwartet zu zwei getrennten Peaks für die zwei Elektronenübertragungen, sondern die Peaks verschmelzen durch die geringen Potentialunterschiede zu einem breiten Peak.

Auch die Geschwindigkeit, mit der das Potential variiert wird, hat einen Einfluss auf die Messung (verschiedene Vorschubgeschwindigkeiten). Findet eine schnelle Variation des Potentials statt, verschiebt sich das Maximum des Reduktionspeaks zu negativeren Potentialen. Dies ist bedingt durch das kleinere Zeitfenster, das für die Disproportionierung bleibt. Da durch die Disproportionierung erneut die Rh(I)-Spezies entsteht, gewinnt der erste Reduktionspeak mit zunehmender Disproportionierung an Bedeutung, während der zweite Schritt durch das gleichzeitig bereits entstandene Rh(I) verringert wird. Findet durch ein kurzes Zeitfenster kaum Disproportionierung statt, verschiebt sich das Maximum hin zur zweiten Reduktion (siehe Abbildung 36).

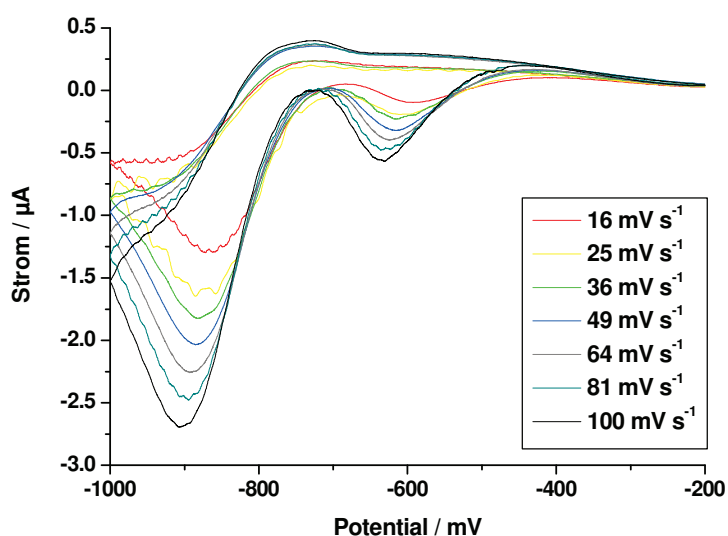


Abbildung 36: Zyklische Voltammogramme von 5b mit verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten; Peaks bei -600 mV resultieren aus Sauerstoffverunreinigungen

Reaktionsbedingungen: 15 mL 50 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7; 0,5 mmol L⁻¹ 5b; WE: glassy carbon CE: Platindraht RE: Ag|AgCl; Vorschubgeschwindigkeiten von 16 bis 100 mV s⁻¹

Gibt man zu der Mediatorlösung oxidierten Cofaktor, so ist ein Anstieg des Reduktionsstromes zu beobachten. Dieses Phänomen wird katalytischer Effekt genannt und ist durch die angeschlossene Reduktion des Cofaktors begründet. Dadurch steht der oxidierte Komplex erneut für die Reduktion zur Verfügung. Die Anwesenheit von Cofaktor erlaubt also jedem Mediator mehrere Zyklen während einer Messung. Das Resultat ist ein höherer gemessener Strom, der die Mediatorkonzentration größer erscheinen lässt. Unter der Annahme vergleichbar hoher Diffusionskoeffizienten kann sich der Reduktionsstrom bei einem Äquivalent an Cofaktor maximal um den Faktor 2 erhöhen, bei zwei Äquivalenten um den Faktor 3. Abhängig von der Qualität des Katalysators sind diese Peakstromerhöhungen in der Praxis oft geringer und können so als Vergleichswert für die katalytische Aktivität mehrerer Katalysatoren dienen (siehe auch 3.2.2.3).

3.2.2.2 Reduktionspotentiale

Die dargestellten Komplexe wurden zunächst in Hinblick auf ihre Reduktionspotentiale elektrochemisch charakterisiert. Da die beiden Reduktionspeaks nicht aufgetrennt werden konnten, wurden die Reduktionspotentiale bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 25 mV s^{-1} bestimmt und zusätzlich das Potential bestimmt, bei dem der halbe Maximalstrom gemessen wurde.

Weiterhin wurde durch Zugabe von Cofaktor bestimmt, mit welcher Geschwindigkeit die Komplexe die aufgenommenen Elektronen auf den Cofaktor übertragen. Komplexe mit Peakstromerhöhungen von mehr als Faktor 1,5 wurden mit "+" gekennzeichnet, bei geringeren Stromerhöhungen mit "o". Bei den mit "-" gekennzeichneten Komplexen fand keine Peakstromerhöhung statt, sie sind als Mediatoren unbrauchbar.

Tabelle 2: Reduktionspotentiale der dargestellten Komplexes und Ausmaß des katalytischen Effekts

Komplex	Ligand	E_p / mV	$E_{p/2} / \text{mV}$	$\Delta E / \text{mV}$	Katalytischer Effekt
1b	bpy	-688	-649	39	+
4b	4,4'-NO ₂	kein Reduktionspeak			-
5b	4,4'-NH ₂	-871	-798	73	+
6b	4,4'-Cl	kein Reduktionspeak			-
7b	5-SO ₃ H	-861	-801	60	o
8b	4,4'-CH ₃ O	-757	-728	29	+
9b	4,4'-OH	-878	-799	79	-
11b	4-NH ₂	-913	-878	35	o
12b	3,3'-CO ₂ H	-799	-752	47	o
13b	4,4'-CH ₃	-721	-676	45	+
14b	4,4'-C ₄ H ₉	-770	-704	66	+
15b	4,4'-CO ₂ H	-683	-645	38	+
16b	5,5'-CH ₃	-756	-714	42	+

Generell ist das Reduktionspotential eine Funktion der Elektronendichte am Rhodium-Zentrum. Je weniger Elektronendichte am Zentralatom vorliegt, desto leichter kann der Komplex reduziert werden. Dabei sind Komplexe mit niedrigen Potentialen zu bevorzugen, da durch ein geringeres Arbeitspotential Nebenreaktionen effektiver unterdrückt werden können.

Die Messungen reflektieren diesen Trend. Komplexe mit elektronenziehenden Substituenten wie Carbonsäuren in 4-Position (**15b**) zeigen sehr niedrige Reduktionspotentiale, Komplexe mit Hydroxygruppen (**9b**) oder Aminogruppen (**5b** und **11b**) als elektronenspendenden Substituenten haben sehr hohe Reduktionspotentiale. Bei Alkylsubstituenten und Methoxygruppen ist der Einfluss geringer. Für die Nitro- und Chloro-Komplexe **4b** und **6b** konnte kein Reduktionspotential bestimmt werden. Damit konnte mit **15b** nur ein Komplex gefunden werden, dessen Reduktionspotential niedriger liegt als beim Standard **1b**.

Auch die Geschwindigkeit, mit der NADPH regeneriert wird, ist mitentscheidend für die Auswahl des besten Mediators. Von den untersuchten Komplexen zeigen sechs eine hohe katalytische Aktivität. Die Carbonsäure **15b** (-683 mV) hat das anodischste Reduktionspotential und hohe katalytische Aktivität. Auch der 4,4'-Methyl-Komplex **13b** (-721 mV), der 4,4'-Methoxy-Komplex **8b** (-757 mV) und der 5,5'-Methyl-Komplex **16b** (-756 mV) zeigen gute katalytische Aktivität.

Diese vier Mediatoren sollen nun eingehender untersucht werden, um ihren katalytischen Nutzen genauer abschätzen zu können. Trotz ihrer katalytischen Aktivität werden der 4,4'-di-*tert*-butyl-Komplex **14b** (-770 mV) und der 4,4'-di-Amino-Komplex **5b** (-871 mV) nicht näher untersucht. Die sehr hohen Reduktionspotentiale sind bereits nah am Potential der direkten elektrochemischen Reduktion von NADP⁺ (-900 mV vs. Ag|AgCl (Steckhan 1994)), sodass ihr katalytischer Nutzen fraglich ist.

3.2.2.3 Katalytische Aktivitäten

Durch die zykl voltammetrischen Untersuchungen mit einer Vorschubgeschwindigkeit von 25 mV s⁻¹ konnte bereits eine Aussage getroffen werden, ob der jeweilige Mediator katalytische Aktivität zeigt. Durch detailliertere Messungen sollen die aktiven Komplexe in ihrer Aktivität miteinander verglichen werden. Dazu werden die Reduktionsströme bei verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten und verschiedenen Cofaktorkonzentrationen gemessen und gegen die Wurzel der Vorschubgeschwindigkeit aufgetragen. Nach der Randles-Sevcik-Gleichung (3-8) ist der Peakstrom i_p proportional abhängig von der Wurzel der Vorschubgeschwindigkeit v (Dalrymple-Alford *et al.* 1977; Randles 1948; Sevcik 1948):

$$i_p = 0,45 \left(\frac{nF}{RT} \right)^{0,5} nFAD^{0,5} cv^{0,5} \quad (3-8)$$

Dabei ist F die Faradaykonstante, n die Anzahl der übertragenen Elektronen, R die allgemeine Gaskonstante, T die Temperatur, A die Elektrodenoberfläche, D der Diffusionskoeffizient und c die Konzentration der elektroaktiven Spezies (Einheiten und Konstanten sind im Symbolverzeichnis angegeben).

Trägt man die gemessenen Reduktionsströme gegen die Wurzel der Vorschubgeschwindigkeiten auf, so ergeben sich durch die direkte Proportionalität im idealen Fall Geraden, deren Steigung abhängig von der Konzentration der elektroaktiven Spezies ist. In Anwesenheit von Cofaktor ist die Steigung durch die scheinbar höhere Konzentration an Mediator steiler (katalytischer Effekt). Durch die gleiche Konzentration an Cofaktor und Mediator kann der Strom unter Annahme vergleichbarer Diffusionskoeffizienten maximal auf das Doppelte ansteigen. In diesem idealen Fall wird die gesamte Mediatormenge, die im Zeitrahmen der Messung an die Elektrodenoberfläche diffundieren kann, reduziert. Anschließend transferiert jedes Mediatormolekül die zwei Elektronen auf das verfügbare Äquivalent NADP⁺ und nimmt ein weiteres Mal Elektronen auf, sodass eine scheinbar doppelt so hohe Mediatorkonzentration gemessen wird. In der Praxis liegen die Stromerhöhungen aber meist etwas darunter.

3 Charakterisierung des Reaktionssystems

Abbildung 37 zeigt die Abhängigkeit der Peakströme von der Vorschubgeschwindigkeit. Bei der Messung der Peakströme in Abwesenheit von NADP^+ wird deutlich, dass die Mediatormodifikationen keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Elektronenaufnahme haben. Für alle Mediatoren werden ähnliche Ströme gemessen. Dies steht im Einklang mit der Randles-Sevcik-Gleichung, nach der die Peakströme für Substanzen mit vergleichbaren Diffusionskonstanten und identischen Versuchsbedingungen einzig von der Vorschubgeschwindigkeit abhängen.

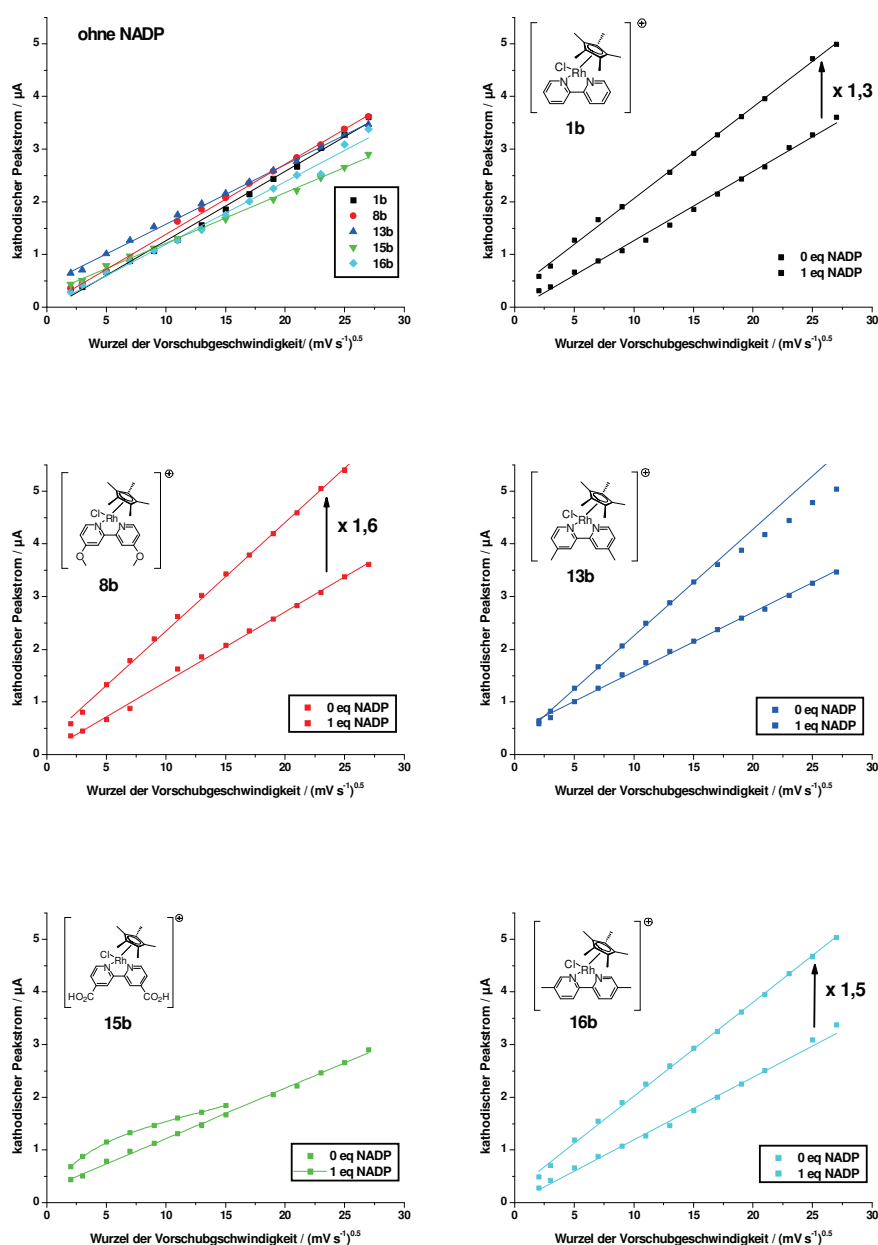


Abbildung 37: Peak-Reduktionsströme der Mediatoren 1b, 8b, 13b, 15b und 16b bei verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten und in An- und Abwesenheit von einem Äquivalent NADP^+

Reaktionsbedingungen: 15 mL 50 mmol L^{-1} Phosphatpuffer $\text{pH} = 7$; $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ Rh(bpy); $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ NADP^+ ; WE: glassy carbon CE: Platindraht RE: Ag|AgCl; Potential -1000 - 0 mV; Vorschubgeschwindigkeit 4 - 729 mV s^{-1}

Ein anderes Bild ergibt sich in Anwesenheit von oxidiertem Cofaktor. Hier ist für den 4,4'-di-Methyl-Komplex **13b** und den 4,4'-di-Carboxy-Komplex **15b** keine lineare Stromzunahme mehr zu beobachten. Mit zunehmender Vorschubgeschwindigkeit findet also nur noch eine geringere Hydridübertragung statt, bis bei hohen Vorschubgeschwindigkeiten fast keine Stromerhöhung mehr gemessen wird. In diesen Fällen wird die Reaktion durch die Hydridübertragung limitiert. Im Gegensatz dazu können beim Standard **1b**, dem 4,4'-Methoxy-Komplex **8b** und dem 5,5-Methyl-Komplex **16b** auch noch für Vorschubgeschwindigkeiten bis 729 mV s^{-1} lineare Zusammenhänge beobachtet werden. Vergleicht man die Steigung der Ausgleichsgeraden in Ab- und Anwesenheit von NADP, so ergeben sich Quotienten, die einen direkten Vergleich der katalytischen Aktivität möglich machen. Für den Standardmediator kann eine Peakstromerhöhung um den Faktor 1,3 beobachtet werden. Die beiden neuen Mediatoren zeigen sogar höhere Aktivitäten, der 5-Methyl-Komplex **16b** bewirkt eine Stromerhöhung um den Faktor 1,5, der Methoxy-Komplex **8b** sogar um den Faktor 1,6. Diese beiden Mediatoren zeigen also die gleiche Reaktionsrate bei der Aufnahme von Elektronen an der Elektrode, transferieren das Hydridion aber signifikant schneller auf den Cofaktor und sollten so auch insgesamt eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit erzielen.

Für das Reduktionspotential der Komplexe ist eine geringe Elektronendichte am Rhodium-Zentrum günstig, weil sie die Elektronenaufnahme erleichtert und so das benötigte Potential absenkt. Im Gegensatz dazu sorgt eine hohe Elektronendichte aber für eine schnellere Protonenaufnahme und auch die Hydridübertragung wird durch höhere Elektronendichte beschleunigt, da sie die Bindung des elektronenreichen Hydrids lockert. Wägt man beide Effekte gegeneinander ab, so wird deutlich, dass Substituenten mit elektronenspendenden Substituenten insgesamt zu bevorzugen sind. Die verringerte Elektronendichte durch elektronenziehende Substituenten führt in den seltensten Fällen zu einem verbesserten Reduktionspotential und nach der Randles-Sevcik-Gleichung ist die Geschwindigkeit der Elektronenaufnahme bei dem jeweiligen Reduktionspotential unverändert, wie auch Abbildung 37 links oben zeigt. Im Gegensatz dazu führt die Verwendung von elektronenspendenden Substituenten wie Methoxy-Gruppen zwar zu einer Erhöhung des Reduktionspotentials, dies wird aber kompensiert durch eine deutlich höhere Hydridübertragungsrate.

3.2.3 Untersuchungen unter Reaktionsbedingungen

Die auf der Basis analytischer Messungen getroffene Bewertung der neuen Mediatoren soll nun unter Reaktionsbedingungen verifiziert werden. Dazu werden Elektrolysen unter identischen Bedingungen durchgeführt, bei denen die verschiedenen Mediatoren zum Einsatz kommen. Um aussagekräftige und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wird auf eine Ankopplung an die Enzymreaktion verzichtet und lediglich die Bildung von NADPH aus NADP^+ untersucht. Dadurch wird eine Störung durch vorhandenes Protein vermieden und der Reaktionsverlauf kann photometrisch verfolgt werden.

Die Elektrolysen wurden in einem elektrochemischen Satzreaktor durchgeführt, wie er in Abbildung 38 gezeigt ist. Es handelt sich dabei um thermostatisierbare Hohlmantelgefäße mit Volumina zwischen 60 und 200 mL, bei dem die Elektroden durch den Deckel kontaktiert werden. Als Arbeitselektrode dient ein auf ein Stahlgerüst aufgezogener Kohlefilz, als Gegenelektrode wird ein Platinnetz in einem

Dialysesack verwendet. Das Potential wird durch eine Silber-Silberchlorid-Referenzelektrode (Ag|AgCl) kontrolliert (Kohlmann und Lütz 2006; Lütz 2004).



Abbildung 38: elektrochemischer Satzreaktor

Wie in Abbildung 39 dargestellt, konnte mit allen untersuchten Mediatoren innerhalb von 40 min voller Umsatz erzielt werden. Außerdem ist allen Versuchen gemein, dass es eine Phase linearer Produktbildung gibt, bei der die Bildungsrate von NADPH einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung folgt, bedingt durch die heterogene Elektrodenreaktion. Dabei unterscheiden sich die Mediatoren erheblich in ihrer Aktivität. Die Mediatoren **13b** und **15b**, die unter analytischen Bedingungen eine geringere Aktivität als der Standard **1b** hatten, haben auch im Satzreaktor eine vergleichbare NADPH-Bildungsgeschwindigkeit (siehe Tabelle 3).

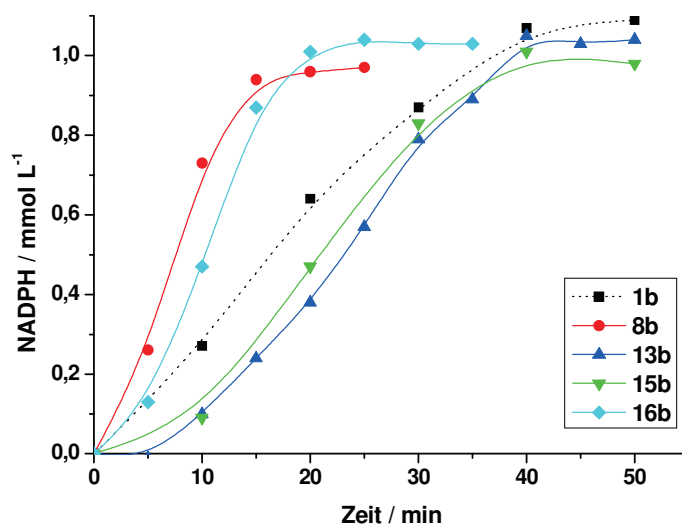


Abbildung 39: Elektrolysen zur Bildung von NADPH mit verschiedenen Mediatoren

Reaktionsbedingungen: 200 mL 50 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7; 0,05 mmol L⁻¹ Rh(bpy); 1 mmol L⁻¹ NADP⁺; WE: Kohlefilz CE: Platinnetz RE: Ag|AgCl; Potentiale entsprechend den Reduktionspotentialen (siehe Tabelle 2)

Auf der anderen Seite konnten bei der Verwendung der 4,4'-Methoxy- und 5,5'-Methyl-Komplexe **8b** und **16b** erheblich höhere Reaktionsgeschwindigkeiten erzielt werden, wie es in der analytischen Charakterisierung bereits angedeutet wurde. Die Produktbildungsrate während der linearen Phase wurde von $40 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ auf 136 (**8b**) beziehungsweise $116 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (**16b**) verdreifacht. Analog dazu steigt die Wechselzahl von 33 h^{-1} auf 113 beziehungsweise 97 h^{-1} . Spika berichtet in ihrer Dissertation von Wechselzahlen bis zu 22 h^{-1} bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (Spika 1994). Beide Werte werden von den neuen optimierten Mediatoren deutlich übertroffen und stellen damit die höchsten bisher berichteten Wechselzahlen dar.

Tabelle 3: Reaktionsgeschwindigkeiten und Wechselzahlen der entwickelten Komplexe unter Satzreaktorbedingungen

Komplex	Ligand	Ep [mV]	Volummetrische Produktivität / $\text{mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$	Wechselzahl / h^{-1}
1b	-	-688	40	33
8b	4,4'-CH ₃ O	-757	136	113
13b	4,4'-CH ₃	-721	48	40
15b	4,4'-CO ₂ H	-683	53	44
16b	5,5'-CH ₃	-756	116	97

Der Einfluss der Substituenten folgt dem durch die Analytik vorhergesagten Trend. Substitution durch Methyl-Gruppen in 4-Position hat keinen großen Einfluss auf das Reduktionspotential und die katalytische Aktivität. Säurefunktionen an gleicher Stelle senken zwar geringfügig das Reduktionspotential, bewirken aber ebenfalls keine Erhöhung der katalytischen Aktivität. Im Gegensatz dazu bewirkt die Substitution mit Methoxy-Gruppen in 4-Position oder Methyl-Gruppen in 5-Position zwar eine Erhöhung des Reduktionspotentials um etwa 70 mV, dies wird aber durch eine Steigerung der katalytischen Aktivität um 300 % mehr als kompensiert. Im Falle der Methylgruppen, deren elektronischer Effekt eher gering ausfallen sollte, spielt eventuell auch ein dirigierender Effekt der sterisch anspruchsvolleren 5-Position eine Rolle, welcher die Übertragung des Hydridions erleichtern könnte.

3.3 Erste Elektrolysen²

Nach Optimierung des Mediators durch chemische Modifikation wird nun die Ankopplung an die Enzymreaktion untersucht. Im Gegensatz zu der elektrochemischen Bildung von NADPH kommt es bei angekoppelter Enzymreaktion schon bei geringen Umsätzen zu einer stetigen Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit. Dies ist unerwartet, da auch bei der mehrstufigen Reaktion weiterhin die Elektrodenreaktion limitierend sein müsste und damit wieder ein linearer Anstieg der Produktkonzentration zu erwarten ist. Außerdem wird vermehrt die Bildung des ungewünschten (S)-Enantiomers beobachtet, was eine Verminderung des Enantiomerenüberschusses zur Folge hat. Diese Phänomene können für alle eingesetzten Mediatorderivate beobachtet werden.

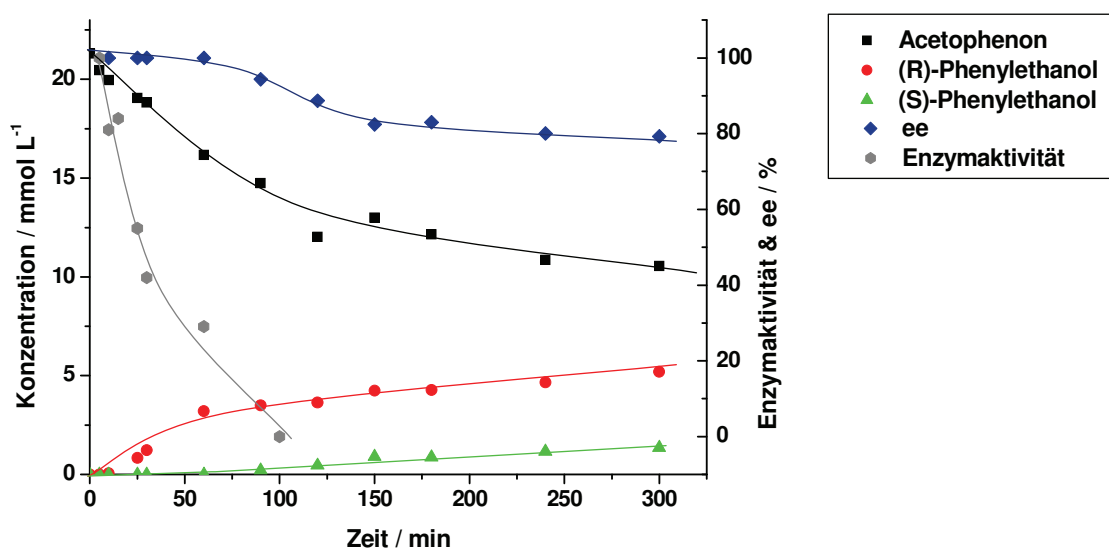


Abbildung 40: elektrochemischer Satzreaktor zur Produktion von (R)-Phenylethanol

Reaktionsbedingungen: 200 mL 100 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7; 1 mmol L⁻¹ MgCl₂; 100 mmol L⁻¹ Na₂SO₄; 20 mmol L⁻¹ Acetophenon; 0,5 mmol L⁻¹ Rh(bpy); 0,5 mmol L⁻¹ NADP⁺; 5 U mL⁻¹ Lb-ADH; -700 mV vs. Ag|AgCl

Abbildung 40 zeigt beispielhaft die Konzentrationsverläufe in einem derartigen Satzreaktor. Nach etwa einer Stunde wurden beide Enantiomere gebildet, anschließend verlief ihre Zunahme parallel, das heißt der Prozess verlief ohne Enantioselektivität.

² Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden veröffentlicht als:

Hildebrand F., Lütz S. "Electroenzymatic synthesis of chiral alcohols in an aqueous-organic two-phase system", *Tetrahedron-Asymmetry* **2007**, 18(10), 1187-1193.

Da diese Phänomene unabhängig vom eingesetzten Mediator auftreten, wurden die folgenden Untersuchungen mit dem Standardmediator durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit mit den in der Literatur gefundenen Hinweisen zu ermöglichen.

3.3.1 Enzymstabilität

Abbildung 40 stellt die relative Enzymaktivität während der Elektrolyse dar. Es wird deutlich, dass nach zwei Stunden Reaktionszeit die gesamte Enzymmenge inaktiviert worden ist, obwohl für *Lb*-ADH sehr viel höhere Stabilitäten berichtet werden (Eckstein *et al.* 2004b; Hildebrand und Lütz 2006; Schumacher 2006). Kontrollexperimente zeigen, dass dies seinen Grund in der geringen Stabilität des Enzyms in Gegenwart des Rhodium-Mediators hat.

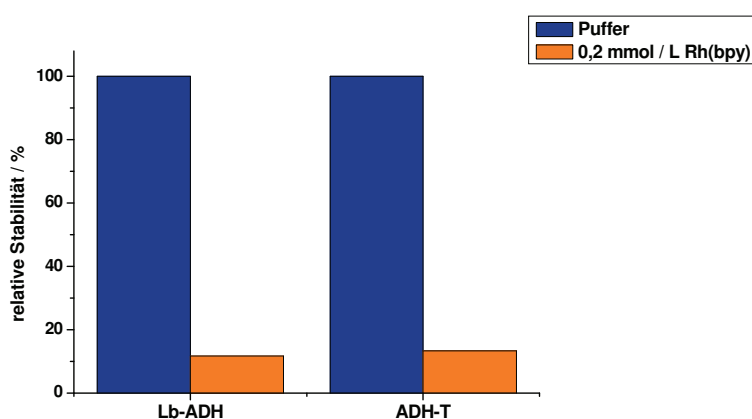


Abbildung 41: Enzymstabilität in Gegenwart von Mediator

Reaktionsbedingungen: 2 mL 50 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7; 3 mmol L⁻¹ MgCl₂; 0,2 mmol L⁻¹ Rh(bpy);
1 U mL⁻¹ Enzym

Dabei fällt die relative Enzymstabilität auf etwa 10 % der Lagerung in reiner Pufferlösung. Dies entspricht Halbwertszeiten von etwa einer Stunde. Diese geringe Stabilität wird auch für andere Alkoholdehydrogenasen gefunden, etwa die ADH aus einem thermophilen Organismus (ADH-T).

Eine mögliche Erklärung für die Inaktivierung des Enzyms ist die Reaktion von nucleophilen Aminosäureseitenketten auf der Enzymoberfläche mit dem Rhodiumkomplex, wodurch das Enzym in seiner Tertiärstruktur verändert und so inaktiviert wird (Hollmann *et al.* 2006).

3.3.2 Nebenreaktion

Die unselektive Bildung von Produkt ist nicht auf einen Verlust an Enzymselektivität zurückzuführen, da sie auch bei vollständigem Verlust an Enzymaktivität weiter voranschreitet. Durch Experimente in Abwesenheit von Enzym konnte gezeigt werden, dass auch eine Elektronenübertragung vom Mediator auf das Substrat möglich ist. Da der Mediator keine chirale Information beinhaltet, wird das Substrat unselektiv zum Enantiomergemisch reduziert. Der Mediator erfüllt also strenggenommen

nicht die dritte Anforderung an einen Mediator zur Regenerierung von NADPH nach Steckhan (siehe 1.5.2).

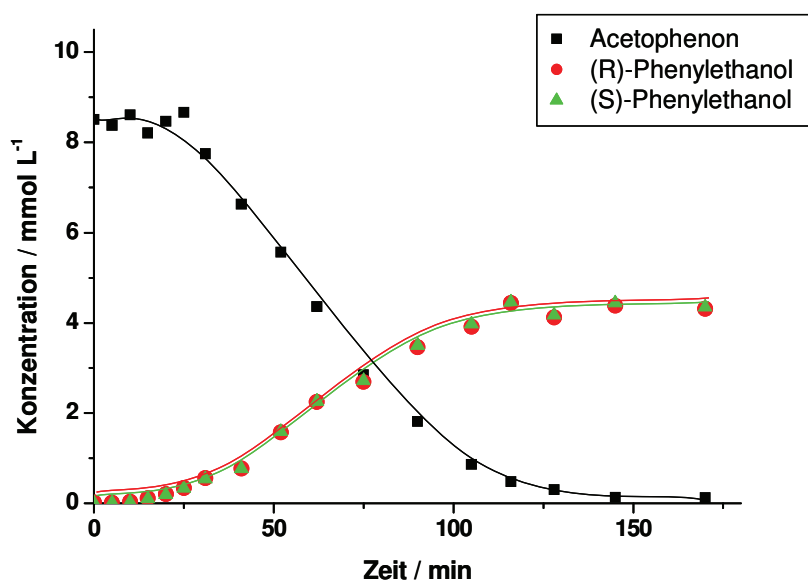


Abbildung 42: Elektrochemischer Satzreaktor ohne Enzym

Reaktionsbedingungen: 180 mL 100 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7; 100 mmol L⁻¹ Na₂SO₄; 1 mmol L⁻¹ MgCl₂; 9 mmol L⁻¹ Acetophenon; 1 mmol L⁻¹ Rh(bpy); -700 mV vs. Ag|AgCl

Diese direkte Reduktion wird aber in Anwesenheit von Enzymaktivität nicht beobachtet, hier liegt der *ee* bei über 99,9 %. Zieht man weiterhin in Betracht, dass etwa zehnmals soviel Substrat wie oxidiertes Cofaktor im Reaktionssystem vorliegt, kann man davon ausgehen, dass die Geschwindigkeitskonstante der direkten Reduktion mehrere Größenordnungen kleiner als die der Reduktion von NADP⁺ sein muss, andernfalls würde man eine Verringerung des Enantiomerenüberschusses auch schon in Anwesenheit von Enzymaktivität beobachten.

Abbildung 43 verdeutlicht das erweiterte Reaktionssystem. Solange Enzymaktivität vorliegt, findet ausschließlich die enzymkatalysierte Reaktion statt und ergibt vollständige Enantioselektivität. Mit zunehmender Inaktivierung des Enzyms und einer Verarmung der Lösung an NADP⁺ kommt es zu einer Reaktion zwischen dem reduzierten Mediator und dem Substrat, die unselektiv verläuft und so den gesamten Enantiomerenüberschuss verringert.

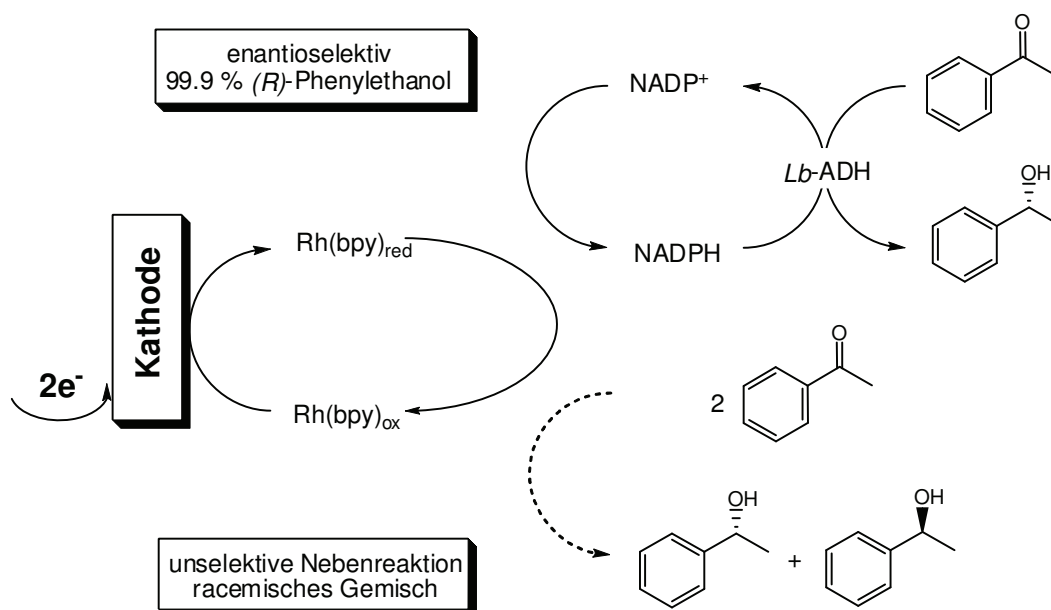


Abbildung 43: Reaktionsschema unter Berücksichtigung der Nebenreaktion

3.4 Zusammenfassung

- ❖ Ein optimierter Mediator bewirkt eine Beschleunigung der Gesamtreaktion, da der elektrochemische Reaktionsschritt als langsamster Teilschritt beschleunigt wird. Zwölf neue Mediatoren mit unterschiedlich funktionalisierten 2,2'-Bipyridinen wurden dargestellt und mit Hilfe der Zyklischen Voltammetrie auf ihre katalytische Aktivität untersucht. Zwei Rhodium-Komplexe mit den Liganden 5,5'- CH_3 -2,2'-Bipyridin und 4,4'- CH_3O -2,2'-Bipyridin ergaben unter Satzreaktorbedingungen zur Reduktion von NADP^+ katalytische Aktivitäten, die jene des Standardmediators um das Dreifache übertrafen. Wechselzahlen von bis zu 113 h^{-1} und Produktivitäten von $136 \text{ mmol L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ NADPH konnten erzielt werden.
- ❖ In den ersten Satzreaktoren mit angekoppelter Enzymreaktion zeigte das Enzym nur eine geringe Stabilität. Diese beschleunigte Inaktivierung geschieht durch Reaktion des Enzyms mit dem Mediator; die genaue Art der Reaktion ist aber noch unbekannt.
- ❖ Bei verminderter Enzymaktivität kommt es zu unselektiver Produktbildung durch direkte Reaktion des Mediators mit dem Substrat. Diese Nebenreaktion verringert den Enantiomerenüberschuss.

4 Erhöhung der Enzymstabilität

Im vorherigen Kapitel wurden die Limitierungen des Reaktionssystems eingehend untersucht. Vor allem der rapide Verlust an Enzymaktivität stellt ein Problem dar, da die Inaktivierung kurze Laufzeiten und hohen Enzymverbrauch bewirkt. Bereits unter Laborbedingungen ist der bisherige Reaktionsansatz nicht praktikabel, eine Anwendung in größerem Maßstab verbietet sich aufgrund der hohen Kosten für den Biokatalysator.

Die Stabilisierung von Enzymen unter Reaktionsbedingungen ist ein zentrales Feld der Biotechnologie und von hohem kommerziellem Interesse. Im Folgenden sollen drei klassische Ansätze zur Enzymstabilisierung untersucht werden. Erstens können die Versuchsbedingungen einen großen Einfluss auf das Enzym haben, sodass der Einfluss von Parametern wie Temperatur, pH-Wert und Pufferzusammensetzung untersucht wird (siehe 4.1). Zweitens kann auch der Zusatz von Additiven einen stabilisierenden Effekt haben (siehe 4.2). Drittens kann auch eine Immobilisierung das Enzym vor schädigenden Einflüssen aus der Reaktionsmischung schützen (siehe 4.3)

Im Folgenden wird die Stabilität der Enzyme durch Inkubation unter bestimmten Bedingungen und periodische Aktivitätsbestimmung ermittelt. Sie wird als Halbwertszeit angegeben, der Zeit, nach der die Enzymaktivität unter Annahme exponentiellen Zerfalls auf die Hälfte gefallen ist. Weiterhin muss deutlich zwischen der Lagerstabilität und der Prozessstabilität eines Enzyms unterschieden werden. Unter Lagerbedingungen verliert das Enzym hauptsächlich durch thermische Inaktivierung und Proteolyse an Aktivität, unter Prozessbedingungen kommt es dagegen durch die katalytische Aktivität des Enzyms zu einer Vielzahl weiterer Wechselwirkungen mit Substraten, Cofaktoren und anderen Bestandteilen der Reaktionslösung. Eine hohe Lagerstabilität unter bestimmten Bedingungen garantiert daher nicht, dass die Enzymreaktion unter den gleichen Bedingungen ebenfalls stabil verläuft.

4.1 Variation der Reaktionsbedingungen

4.1.1 Temperatur

Katalysatoren setzen die Aktivierungsenergie von Reaktionen herab. Liegen in einem Reaktionssystem zwei konkurrierende Reaktionen vor, von denen eine katalysiert abläuft und eine unkatalysiert, so sollte sich das Verhältnis ihrer Reaktionsgeschwindigkeiten durch eine Absenkung der Reaktionstemperatur zugunsten der katalysierten Reaktion verändern. Im vorliegenden Fall sollte eine niedrigere Reaktionstemperatur die inaktivierende Reaktion zwischen Enzym und Mediator stärker hemmen als die Enzymreaktion.

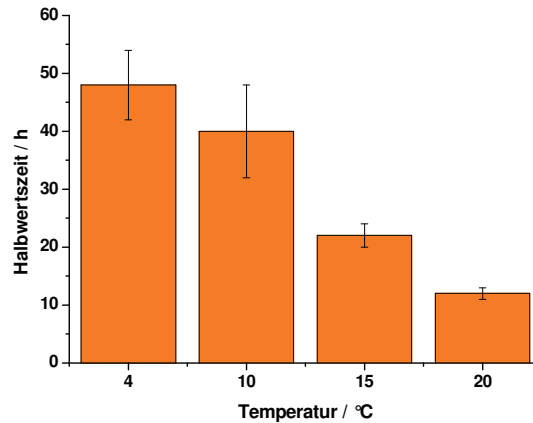


Abbildung 44: Enzymstabilität von *Lb*-ADH mit $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ Rh(bpy) bei verschiedenen Temperaturen

Reaktionsbedingungen: $2 \text{ mL } 50 \text{ mmol L}^{-1}$ Phosphatpuffer pH = 7; 3 mmol L^{-1} MgCl_2 ; $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ Rh(bpy); 1 U mL^{-1} Enzym; 4 -20 °C

Weiterhin haben Voruntersuchungen gezeigt, dass der Mediator bei einer Absenkung der Temperatur von 20 °C auf 4 °C etwa 60 Prozent seiner Aktivität behält. Die Aufnahme von Elektronen und der Transfer auf den Cofaktor sollten also weiterhin mit genügender Geschwindigkeit ablaufen. Abbildung 44 verdeutlicht die zunehmende Stabilität mit abnehmender Temperatur in Gegenwart von Mediator.

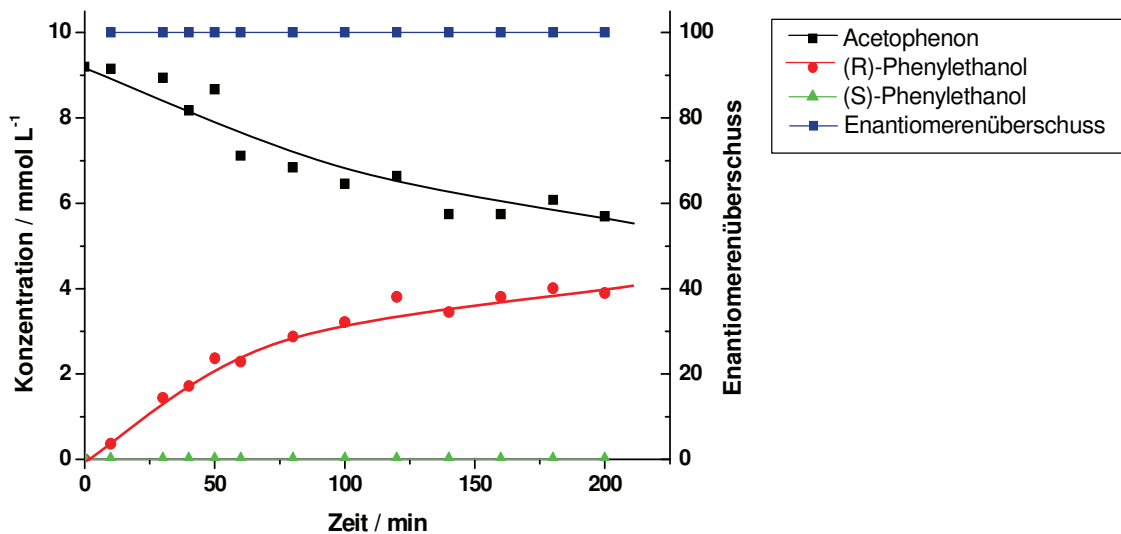


Abbildung 45: Satzreaktor mit elektrochemischer Cofaktorregenerierung bei 4 °C

Reaktionsbedingungen: $70 \text{ mL } 100 \text{ mmol L}^{-1}$ Phosphatpuffer pH = 7; 3 mmol L^{-1} MgCl_2 ; 15 mmol L^{-1} Acetophenon; $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ Rh(bpy); $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ NADP^+ ; 2 U mL^{-1} *Lb*-ADH; $-750 \text{ mV vs. Ag|AgCl}$

Zur Überprüfung der gestiegenen Enzymstabilität wurde ein elektrochemischer Satzreaktor zur *Lb*-ADH-katalysierten Synthese von (*R*)-Phenylethanol bei 4 °C betrieben. Wie Abbildung 45 verdeutlicht, tritt allerdings trotz niedrigerer Temperatur nach etwa 1 h eine Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit ein, nach drei Stunden kommt die Reaktion zum Erliegen.

Der Grund für diesen Reaktionsabbruch ist noch unbekannt. Die Absenkung der Reaktionstemperatur ermöglicht somit nicht das Arbeiten über längere Zeiträume.

4.1.2 pH-Wert

Aus der Literatur sind Vermutungen bekannt, dass die Inaktivierung des Enzyms unter Prozessbedingungen auf nucleophile Aminosäureseitenketten zurückgeführt werden kann (Hollmann *et al.* 2006). Da diese Nucleophilie der basischen Aminosäureketten abhängig vom pH-Wert der Lösung ist, könnte eine gezielte Absenkung des pH-Wertes eine erhöhte Prozessstabilität bewirken. Abbildung 46 verdeutlicht die Tatsache, dass bei pH-Werten, die um mehr als eine pH-Einheit unter dem pK-Wert der Seitenkette liegen, die Seitenkette vollständig protoniert vorliegt und so ihre Nucleophilie verliert.

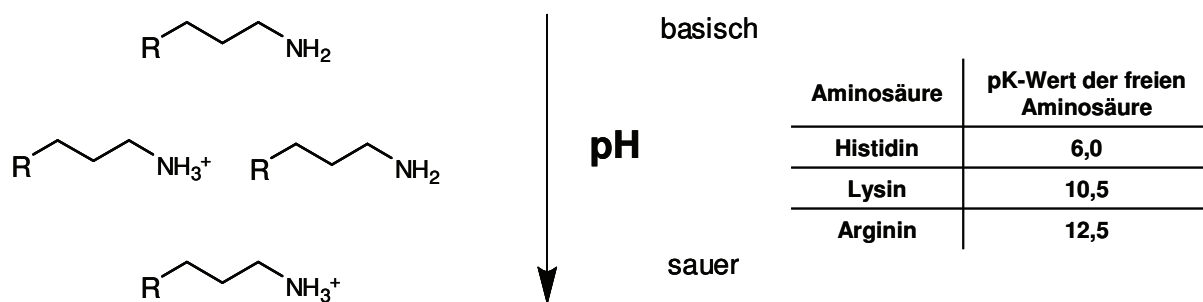


Abbildung 46: Protonierungsgrad basischer Aminosäuren in Abhängigkeit vom pH-Wert

Natürlich muss bei dieser Annahme beachtet werden, dass die pK-Werte der Aminosäuren in einem Protein von denen der freien Aminosäuren abweichen können. Außerdem ist die Wahl des pH-Wertes auf den Bereich beschränkt, in dem das Enzym noch eine ausreichende Stabilität und Aktivität besitzt.

Wie in Abbildung 47 deutlich wird, hat das Absenken des pH-Wertes durchaus einen positiven Einfluss auf die Enzymstabilität in Anwesenheit des Mediators. Die Halbwertszeit des Enzyms erhöht sich von 7 ± 1 h bei $\text{pH} = 7$ auf 22 ± 3 h bei einem pH-Wert von 4,6. Diese Stabilisierung würde wohl noch deutlicher ausfallen, würde nicht der Verlust an Stabilität in reinem Puffer darauf hindeuten, dass die generelle Enzymstabilität bei $\text{pH}=5$ bereits stark reduziert wird. Während die Stabilität in reiner Pufferlösung ein Maximum bei einem pH von 6 durchläuft, steigt die Stabilität in Anwesenheit von Mediator kontinuierlich mit sinkendem pH-Wert an. Eine Absenkung des pH-Werts bewirkt also eine deutliche Stabilisierung, die sogar die generell abnehmende Stabilität des Enzyms überkompensiert und so zu höheren Halbwertszeiten führt. Dennoch liegt selbst bei einem pH-Wert von 4,6 die Stabilität des Mediators in Anwesenheit von Mediator unter der in reiner Pufferlösung. Der inaktivierende Effekt kann also nicht vollständig vermieden werden.

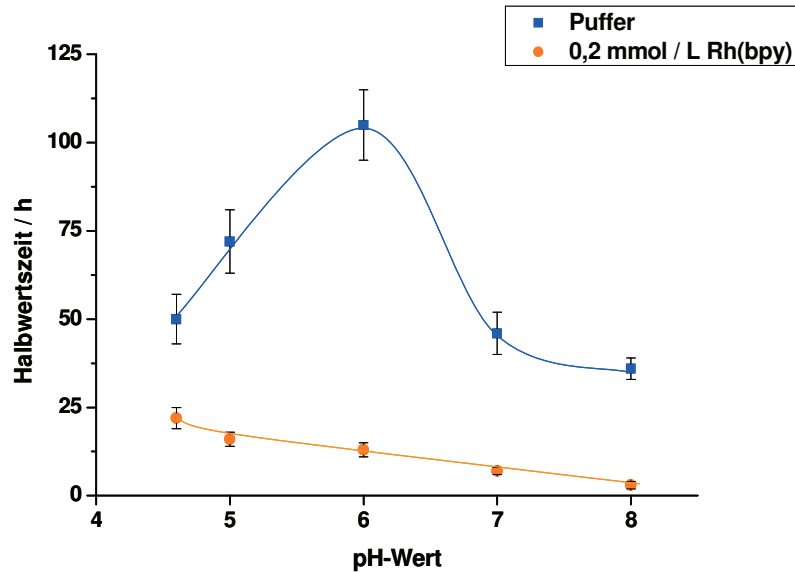


Abbildung 47: Enzymstabilitäten bei verschiedenen pH-Werten und in An- und Abwesenheit von Rh(bpy)

Reaktionsbedingungen: 2 mL 50 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer; 3 mmol L⁻¹ MgCl₂; 0,2 mmol L⁻¹ Rh(bpy); 1 U mL⁻¹ Enzym;
20 °C

Unter Reaktionsbedingungen wird allerdings deutlich, dass auch die Absenkung des pH-Werts keine nennenswerte Stabilisierung bewirkt (siehe Abbildung 48). Nach etwa 70 min brach die Produktbildung dramatisch ein und auch die zunehmende Racemisierung des Produktes konnte beobachtet werden.

Es besteht also anscheinend ein deutlicher Unterschied zwischen der Stabilität des Enzyms unter Lagerbedingungen und unter Prozessbedingungen. Während das Enzym bei pH = 4,6 auch in Anwesenheit von Mediator eine Halbwertszeit von 22 h zeigt, wird es während der Elektrolyse bereits nach wenigen Stunden weitestgehend inaktiviert. Die Enzymstabilität unter Prozessbedingungen ist also eine weitere Größenordnung kleiner als unter Lagerbedingungen.

Zwei Erklärungen für diese verminderte Stabilität sind denkbar. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass das Enzym durch die während der katalytischen Reaktion auftretenden Änderungen in der Konformation oder elektronischen Situation leichter vom Mediator angegriffen und inaktiviert werden kann. Andererseits ist es auch denkbar, dass die aktivierte Form des Mediators sich noch schädlicher auf das Enzym auswirkt. Dem widerspräche allerdings die Hypothese, dass insbesondere nucleophile Aminosäuren mit dem Mediator reagieren. Diese sollten geringere Wechselwirkungen mit der reduzierten Form des Mediators ausüben.

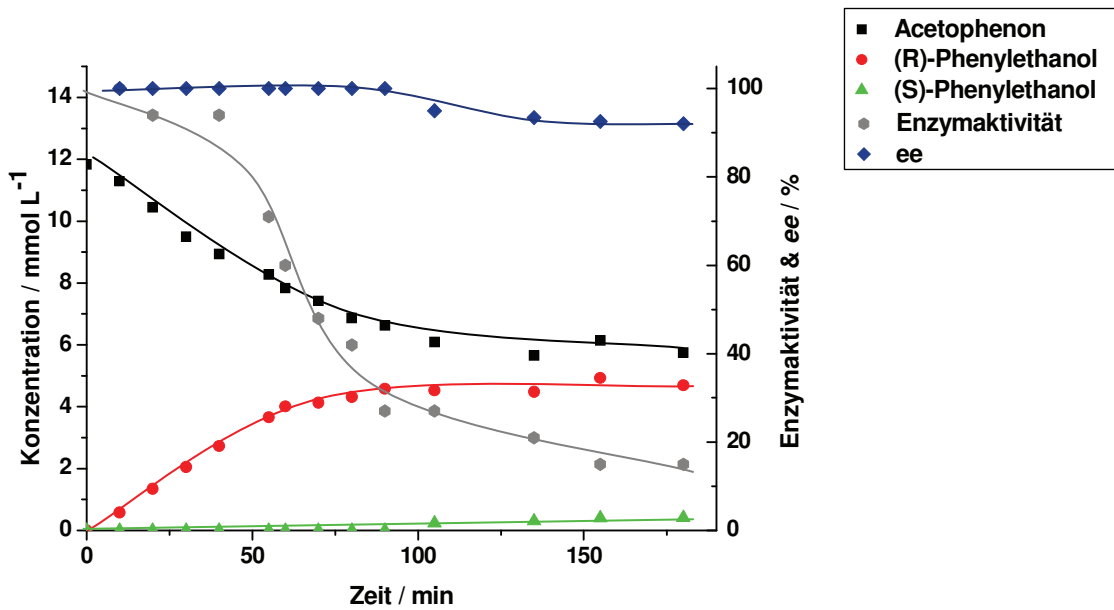


Abbildung 48: elektrochemischer Satzreaktor bei pH = 4,6

Reaktionsbedingungen: 60 mL 100 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 4,6; 3 mmol L⁻¹ Mg²⁺; 15 mmol L⁻¹ Acetophenon; 0,2 mmol L⁻¹ Rh(bpy); 0,2 mmol L⁻¹ NADP⁺; 2 U mL⁻¹ *Lb*-ADH; -700 mV vs. Ag|AgCl

4.1.3 Puffer

Höllrigl *et al.* berichten, dass die Verwendung von Bis-Tris-Puffer die Wechselwirkungen zwischen Rh(bpy) und dem Produktionsezym, einer thermophilen ADH aus *Thermus sp.*, verhindert und über mindestens 7 h kein Verlust an Enzymaktivität zu beobachten ist (Höllrigl *et al.* 2007). Für *Lb*-ADH konnte allerdings keine Stabilisierung gefunden werden.

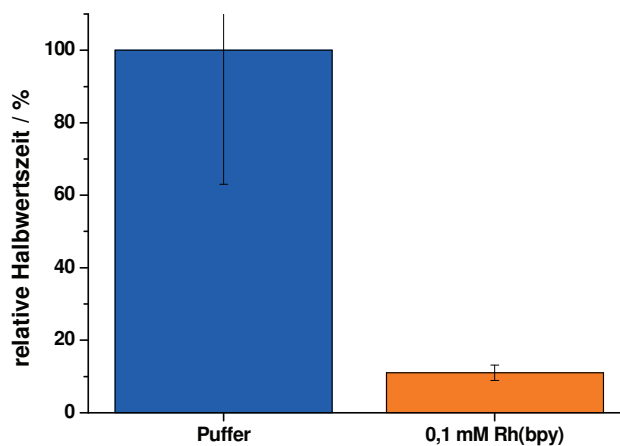


Abbildung 49: Enzymstabilität von *Lb*-ADH in Bis-Tris-Puffer in An- und Abwesenheit von Mediator

Reaktionsbedingungen: 2 mL 50 mmol L⁻¹ Bis-Tris-Puffer; 3 mmol L⁻¹ MgCl₂; 0,1 mmol L⁻¹ Rh(bpy); 1 U mL⁻¹ Enzym; 20 °C

4.2 Ionische Flüssigkeiten als Additive

Ionische Flüssigkeiten (ILs) sind Salze, die bei unter 100 °C flüssig vorliegen. Durch sterisch anspruchsvolle organische Kationen und anorganische oder organische Anionen ist die Kristallbildung derart erschwert, dass sie als Schmelze vorliegen. Ihr Einsatz in der Biokatalyse findet zunehmendes Interesse (Kragl *et al.* 2002; Kragl 2002; Sheldon *et al.* 2002; van Rantwijk und Sheldon 2007). Aus den Arbeiten von Kohlmann ist bekannt, dass einige Ionische Flüssigkeiten zur Stabilisierung von Oxidoreduktasen genutzt werden können (Kohlmann und Lütz 2007). Bestimmte Ionische Flüssigkeiten, besonders mit Ethylmethylimidazolium-Kationen (EMIM), konnten als Cosolvens verwendet eine Stabilisierung von Alkoholdehydrogenasen erzielen (Kohlmann und Lütz 2007). Möglicherweise kann diese Stabilisierung auch zum Schutz des Enzyms vor dem Mediator verwendet werden. Nachdem von Kohlmann die EMIM-ILs mit Ethylsulfat (EtSO₄), 2(2-Methoxyethoxy)ethylsulfat (MDEGSO₄) und Diethylsulfat (Et₂PO₄) untersucht wurden, wurde in dieser Arbeit der Effekt von EMIM Chlorid untersucht. Durch das Halogenid als einfaches anorganisches Anion sollte ein stabilisierender Effekt, wenn vorhanden, klar dem Kation zugeschrieben werden können.

Es wurden jeweils die Lagerstabilitäten des Enzyms in An- und Abwesenheit von Mediator bei verschiedenen Konzentrationen an Ionischer Flüssigkeit untersucht. Abbildung 50 verdeutlicht die Stabilitäten als Halbwertszeiten. Es ist offensichtlich, dass der Zusatz von IL einen drastischen Stabilitätsgewinn zur Folge hat. Dies gilt sowohl für reine Pufferlösung, wo der Zusatz von 170 mmol L⁻¹ IL eine Stabilitätssteigerung von 24 ± 4 h auf 165 ± 24 h hat, als auch für die Mediatorlösung, wo die Halbwertszeit von 1,2 ± 0,2 h auf 96 ± 7 h steigt. Der Zusatz von 170 mmol L⁻¹ Ionischer Flüssigkeit bewirkt also eine derart große Stabilisierung, dass das Enzym trotz Anwesenheit von Mediator viermal so stabil ist wie in reiner Pufferlösung. Auch kann der stabilisierende Effekt der Ionischen Flüssigkeit eindeutig dem Kation zugeordnet werden.

Allerdings konnte die unter Lagerbedingungen gefundene Stabilisierung nur bedingt in den präparativen Ansatz übertragen werden. Die Enzymstabilität verringerte sich deutlich langsamer, dennoch kam die Reaktion bei unvollständigem Umsatz zum Erliegen (siehe Abbildung 51). Bemerkenswert ist dabei die Tatsache, dass der Enantiomerenüberschuss bis zuletzt sehr hoch war (*ee* > 99 %), die Nebenreaktion also keine Rolle spielte. Auch nach 1300 min war noch eine geringe Restmenge Enzymaktivität zu beobachten.

Der Einsatz der Ionischen Flüssigkeit EMIM Cl wirkt sich also positiv auf die Enzymstabilität aus, unter Prozessbedingungen ist dieser Effekt aber zu gering ausgeprägt, um hohe Umsätze oder sogar kontinuierliches Arbeiten zu ermöglichen.

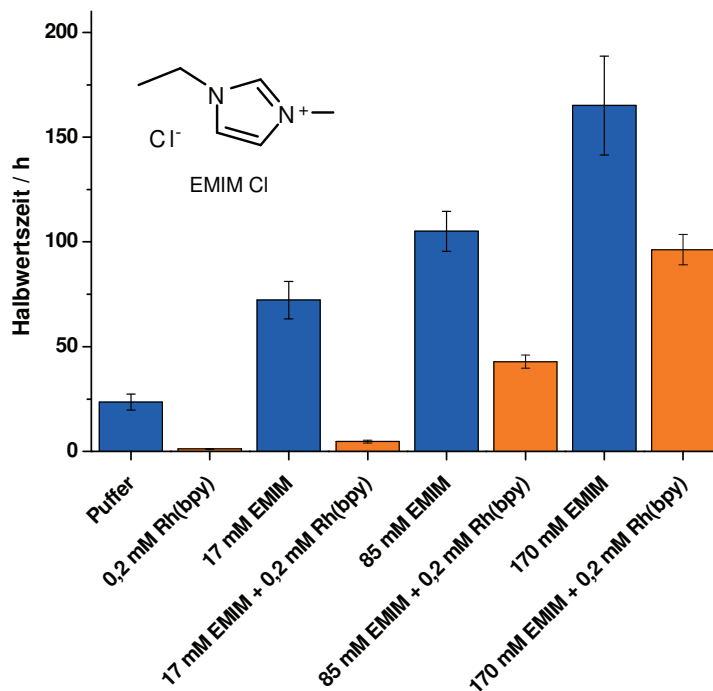


Abbildung 50: Enzymstabilität unter Zusatz von Rh(bpy) und EMIM Cl

Reaktionsbedingungen: 2 mL 50 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer; 3 mmol L⁻¹ MgCl₂; 0 - 0,2 mmol L⁻¹ Rh(bpy); 1 U mL⁻¹ Enzym; 0 - 170 mmol L⁻¹ EMIM Cl; 20 °C,

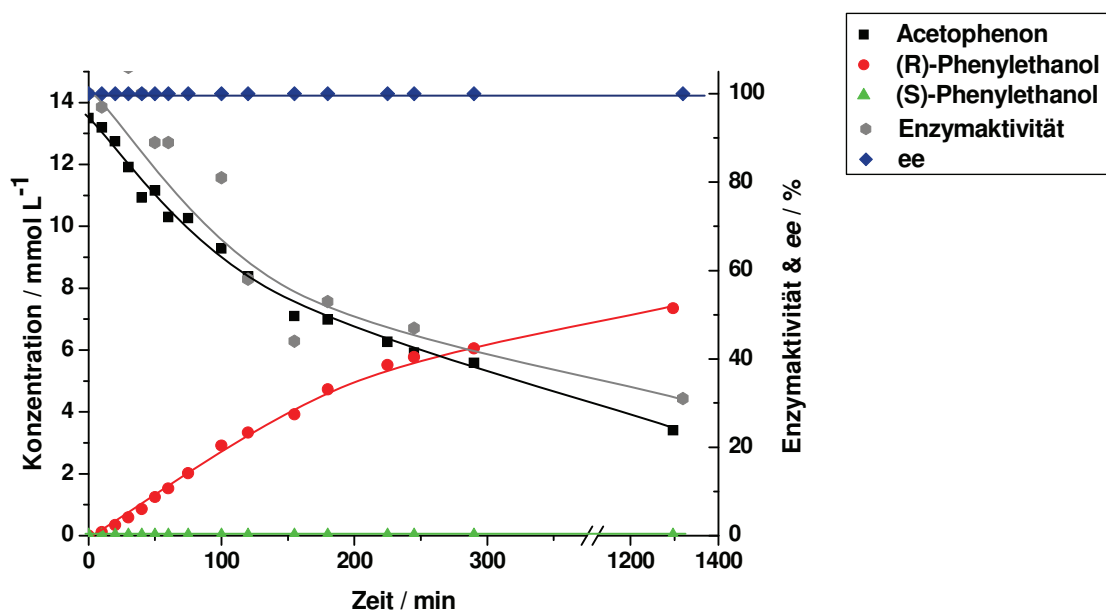


Abbildung 51: Satzreaktor mit elektrochemischer Cofaktorregenerierung unter Zusatz von EMIM Cl

Reaktionsbedingungen: 60 mL 100 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7; 3 mmol L⁻¹ Mg²⁺; 15 mmol L⁻¹ Acetophenon; 0,2 mmol L⁻¹ Rh(bpy); 0,2 mmol L⁻¹ NADP⁺; 170 mmol L⁻¹ EMIM Cl; 2 U mL⁻¹ *Lb*-ADH; -700 mV vs. Ag|AgCl

4.3 Immobilisierung

Um nucleophile Gruppen des Enzyms an der Reaktion mit dem Mediator zu hindern, könnte eine Immobilisierung hilfreich sein. Einerseits könnte die Anbindung des Enzyms an ein Trägermaterial von Vorteil sein, wenn diese Anbindung über die nucleophilen Gruppen geschieht und sie dadurch an der Reaktion mit dem Mediator hindert. Andererseits könnte auch eine Einkapselung des Enzyms den direkten Kontakt zwischen Enzym und Mediator verhindern.

4.3.1 Kovalente Anbindung³

In 1.6.2 wurden bereits die am häufigsten verwendeten Reaktionen beschrieben, mit denen man Enzyme über die Seitenketten der Aminosäuren an ein funktionalisiertes Trägermaterial binden kann. Für Alkoholdehydrogenasen sind nur zwei Beispiele literaturbekannt, in denen das Enzym kovalent an ein Trägermaterial angebunden wurde (Pithawala und Bahadur 2002; Soni 2001). Die Immobilisierung soll für die in dieser Arbeit untersuchte ADH aus *Lactobacillus brevis* entwickelt werden. Obwohl es sich dabei um ein industriell wichtiges Enzym handelt, ist bisher nur eine Immobilisierung durch Deposition auf Glaskugeln bekannt (Trivedi et al. 2005), die für die Gasphasenreaktion entwickelt wurde.

4.3.1.1 Voruntersuchungen

Die kovalente Anbindung an ein funktionalisiertes Trägermaterial wurde an Sepabeads[®] der Firma Resindion untersucht. Es besteht aus einem hochporösen Silikatgerüst, das sich dennoch durch eine hohe mechanische Stabilität auszeichnet. Oberfläche und Poren des Trägers sind mit organischen Seitenketten funktionalisiert, deren Struktur sich je nach Anwendung unterscheidet. Durch diese Seitenketten kann das Enzym an mehreren Punkten gebunden und so in seiner Struktur stabilisiert werden (multi-point covalent attachment).

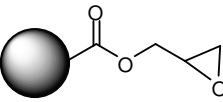
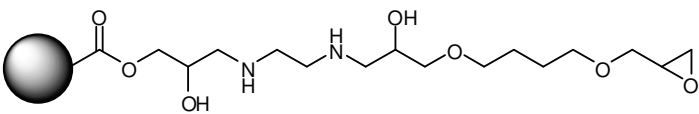
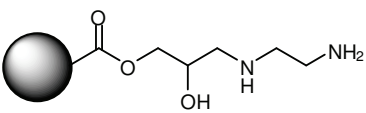
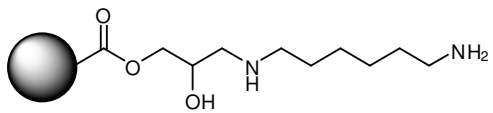
Zur Immobilisierung der *Lb*-ADH wurden drei verschiedenen funktionalisierte Träger untersucht (siehe Tabelle 4). Allen Funktionalisierungen ist gemein, dass sie mit nucleophilen Gruppen des Enzyms reagieren können. Für eine reine Epoxy-Funktionalisierung (a) konnte so gut wie keine Restaktivität gefunden werden. Anders ist dies bei den Epoxy-Gruppen in der Amino-Epoxy-Species (b), bei der eine längere, hydrophile Seitenkette die vorgelagerte Adsorption des Proteins erleichtern soll (siehe unten). Hier konnte eine Restaktivität von 15 % erreicht werden. Die Amino-Funktionalisierungen Ethyl-Amino (c) und Hexamethyl-Amino (d) müssen vor der Reaktion mit Glutardialdehyd aktiviert

³ Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden veröffentlicht als:

Hildebrand, F., Lütz, S. "Immobilisation of alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* and its application in a plug-flow reactor" *Tetrahedron-Asymmetry* **2006**, *17*, 3219-3225.

werden. Obwohl dieses Trägermaterial bei anderen Enzymen zu hohen Restaktivitäten führte (Kubitzki *et al.* 2008), war es zur Immobilisierung von *Lb*-ADH kaum geeignet.

Tabelle 4: verschieden funktionalisierte Sepabeads® und erzielte Restaktivitäten bei der Immobilisierung von *Lb*-ADH

Name	Struktur der Seitenketten	Erzielte Restaktivität
a) EC-EP (Epoxy)		1 %
b) EC-HFA (Amino-Epoxy)		15 %
c) EC-EA (Ethyl-Amino)		4 %
d) EC-HA (Hexamethyl-Amino)		4 %

Die Voruntersuchungen ergaben die höchsten Restaktivitäten für die Amino-Epoxy-Funktionalisierung (b), sodass sich die weiteren Untersuchungen auf dieses Material beschränkten.

Die Anbindung des Enzyms an die Oberfläche erfolgt über einen Zwei-Schritt-Mechanismus. Durch die hohe Konzentration an Amino-Gruppen auf der Oberfläche erfolgt selbst bei niedrigen Pufferkonzentrationen eine Adsorption des Enzyms an die Oberfläche. Durch die räumliche Nähe kann anschließend die Reaktion zwischen Epoxy-Gruppen des Trägermaterials und nucleophilen Gruppen (Amino-Gruppen, Thiol-Gruppen) des Enzyms stattfinden.

Diese Reaktion ist pH-abhängig, da die Amino-Gruppen bei basischen pH-Werten als NH_2 -Gruppen vorliegen und ihre Nucleophilie höher ist (siehe auch 4.1.2). Es stellte sich aber heraus, dass die Inaktivierung des Enzyms bei basischen pH-Werten derart beschleunigt wurde, dass die zusätzliche Reaktivität dies nicht kompensieren konnte. Stattdessen wurden die Proben über Nacht bei neutralem pH inkubiert, um ausreichend Zeit für die Reaktion zu ermöglichen.

Um die Lagerstabilität des immobilisierten Enzyms abzuschätzen, wurden die Immobilisate bei 30 °C inkubiert. Dabei betrug die Halbwertszeit 20 ± 2 h, die des gelösten Enzyms unter gleichen Bedingungen 20 ± 1 h. Es wird also deutlich, dass das Enzym sich zwar an der Oberfläche des Trägermaterials befindet, aber keine Stabilisierung stattgefunden hat

Um diese Stabilisierung zu erreichen, wurden zwei Ansätze geprüft, einerseits die Absättigung der übrigen funktionellen Gruppen und andererseits die Quervernetzung des adsorbierten Enzyms durch Glutardialdehyd (GDA).

4.3.1.2 Absättigung der übrigen funktionellen Gruppen

Es wurde berichtet, dass die Restaktivität und die Anbindung von Enzymen begünstigt werden, wenn die übrigen funktionellen Gruppen des Trägermaterials mit niedermolekularen Verbindungen abgesättigt wurden (Fernandez-Lafuente *et al.* 1999a; Fernandez-Lafuente *et al.* 1999b). Die mikroskopische Umgebung der Enzyme wird dadurch hydrophiler, was eine Stabilisierung des Enzyms mit sich bringen kann. Als Absättigungs-Reagenzien bieten sich niedermolekulare Nucleophile an wie Aminosäuren oder Thiole. Im konkreten Fall wurde das Trägermaterial mit dem adsorbierten Enzym in Lösungen von 1 mol L^{-1} Glycin oder 5 % Mercaptoethanol inkubiert, anschließend gewaschen und erneut Aktivität und Stabilität bestimmt.

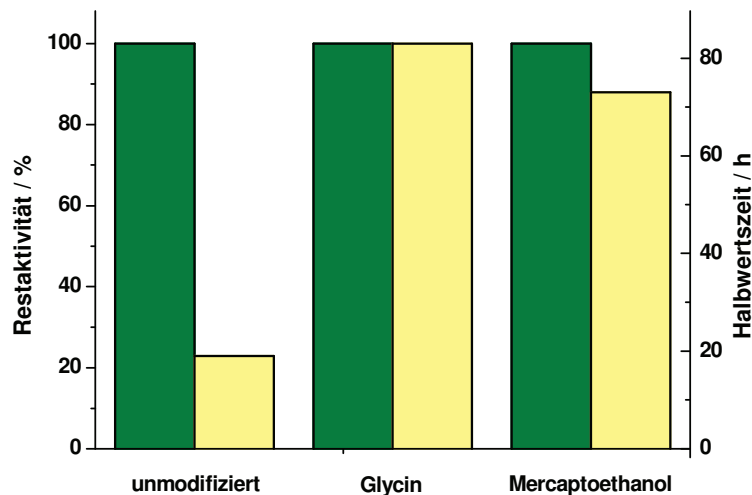


Abbildung 52: Enzymstabilität und Restaktivität nach Absättigung der übrigen funktionellen Gruppen

Bestimmung der Restaktivität und der Stabilität siehe 10.2.1

Wie in Abbildung 52 dargestellt, vervierfacht sich die Halbwertszeit nach einer Stunde Inkubation in 1 M Glycin auf $83 \pm 6 \text{ h}$, für Mercaptoethanol steigt sie auf $73 \pm 24 \text{ h}$. Längere Inkubationen ergaben keinen weiteren Stabilitätsgewinn. Die Absättigung der übrigen funktionellen Gruppen hat zwar keinen signifikanten Einfluss auf die Restaktivität, durch die hydrophilere Mikro-Umgebung des Enzyms kann aber eine höhere Enzymstabilität erzielt werden.

4.3.1.3 Quervernetzung mit Glutardialdehyd

Weitere Untersuchungen ergaben, dass das immobilisierte Enzym durch den Absättigungsprozess zwar stabilisiert wurde, aber immer noch nur adsorptiv an den Träger gebunden war. Um kovalente Bindungen auszubilden, wurde nun untersucht, ob das Enzym auf dem Träger quervernetzt werden kann. Durch das bifunktionelle Glutardialdehyd (GDA) können nucleophile Gruppen des Enzyms mit

der Oberfläche des Trägers sowie der Enzyme untereinander vernetzt werden. Die Anbindung des Proteins an den Träger sollte dadurch fester werden und ein Ablösen des Enzyms vom Träger verhindert werden. Abbildung 53 zeigt sowohl die Stabilitäten als auch die Restaktivitäten der immobilisierten Enzyme, die für 30 min in GDA-Lösungen verschiedener Konzentration inkubiert wurden.

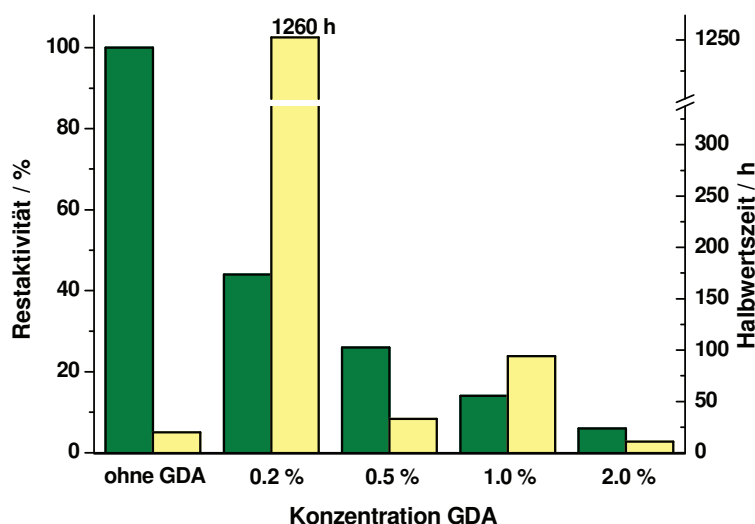


Abbildung 53: Enzymstabilität und Restaktivität nach Quervernetzung

Bestimmung der Restaktivität und der Stabilität siehe 10.2.1

Es wird deutlich, dass alle Quervernetzungen einen Verlust an Restaktivität zur Folge haben. Dies ist wohl auf Reaktionen zwischen Glutardialdehyd und den Aminosäuren des katalytischen Zentrums zurückzuführen, was in einer verminderten oder aufgehobenen Enzymaktivität resultiert. Allerdings kann durch sehr verdünnte Lösungen (0,2 %) ein dramatischer Stabilitätsgewinn erreicht werden, der die Halbwertszeit von 20 ± 2 h auf 1260 ± 390 h erhöht. Durch die geringe Konzentration von GDA wird also der optimale Kompromiss aus Reaktivität zur Quervernetzung und schädlichem Einfluss des Glutardialdehyds erreicht. Die Halbwertszeit des Enzyms wird um den Faktor 60 gesteigert.

4.3.1.4 Absättigung und Quervernetzung

Nach den positiven Ergebnissen sowohl bei der Absättigung als auch bei der Quervernetzung lag es nahe, zu untersuchen, ob die Effekte kombiniert werden können. Das Immobilisat wurde erst mit Glycin oder Mercaptoethanol abgesättigt und anschließend mit 0,2 % Glutardialdehyd quervernetzt. Abbildung 54 zeigt die Ergebnisse. Es wird deutlich, dass auch hier ein stabilisierender Effekt auftritt, der für Glycin deutlich weniger ausgeprägt ist. Dies wird verständlich, wenn man in Betracht zieht, dass auch Glycin ein schwaches Nucleophil ist, das mit GDA reagieren kann und so die effektive Konzentration für die Quervernetzung reduziert. Für die Kombination aus Mercaptoethanol und GDA ergibt sich die höchste Stabilität mit 560 ± 67 h.

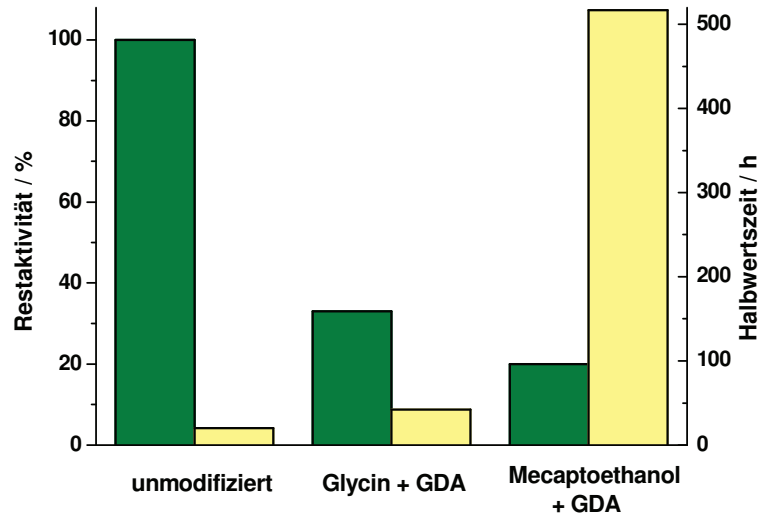


Abbildung 54: Enzymstabilität und Restaktivität nach Absättigung und Quervernetzung

Bestimmung der Restaktivität und der Stabilität siehe 10.2.1

4.3.1.5 Stabilität des Immobilisats gegen Mediator

Es soll nun überprüft werden, ob die hervorragende Lagerstabilität durch Absättigung und Quervernetzung sich auch auf die Anwesenheit von Mediator erstreckt. Falls die Anbindung und Quervernetzung über diejenigen Aminosäuren erfolgte, die auch die Inaktivierung bewirken, sollte das immobilisierte Enzym deutlich stabiler gegenüber dem Mediator sein. Abbildung 55 verdeutlicht aber, dass die Immobilisierung keinen stabilisierenden Effekt in Gegenwart von Mediator hat. Die Halbwertszeit bei Inkubation in $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ Rh(bpy) beträgt lediglich 3 ± 1 h. Bei den Aminosäuren, über die das Enzym angebunden wird, handelt es sich um die nucleophilen Aminosäuren Lysin, Histidin und Arginin und in geringerem Maße Cystein. Diese Aminosäuren können die Epoxidgruppe nucleophil angreifen, beziehungsweise mit Glutardialdehyd reagieren. Die immer noch geringe Stabilität des Enzyms in Gegenwart von Mediator ist ein Anzeichen dafür, dass auch andere Aminosäuren bei der Inaktivierung eine Rolle spielen.

Auch wenn das Immobilisat nicht für die elektrochemische Cofaktorregenerierung genutzt werden kann, wird die herausragende Prozessstabilität in 11.1 in Kombination mit einer substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung unter Beweis gestellt.

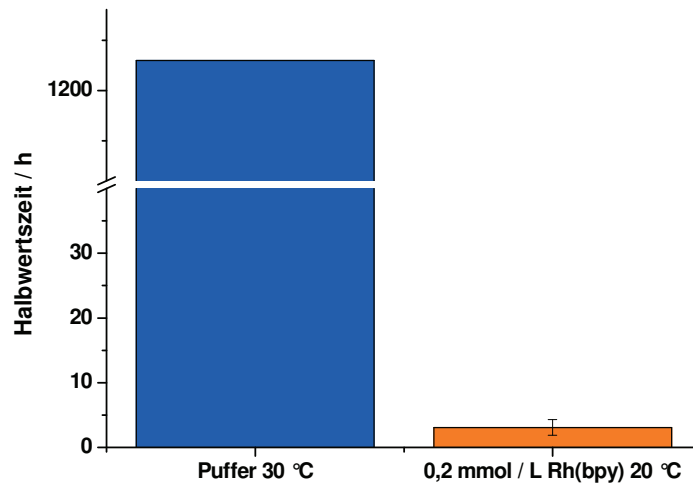


Abbildung 55: Stabilität von *Lb*-ADH auf Sepabeads® in An- und Abwesenheit von Rh(bpy)

Reaktionsbedingungen: Sepabeads® nach 10.2.3.3 bei a) 50 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7; 3 mmol L⁻¹ MgCl₂; 30 °C und b) 50 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7; 3 mmol L⁻¹ MgCl₂; 0,2 mmol L⁻¹ Rh(bpy); 20 °C

4.3.2 Einkapselung

Die Einkapselung von Enzymen stellt eine hervorragende Möglichkeit zur Immobilisierung dar. Dadurch kann das Enzym vor schädlichen äußeren Einflüssen wie mechanischem Stress oder Phasengrenzen geschützt und so eine höhere Prozessstabilität erzielt werden. Setzt man dieses Immobilisat in einem organischen Lösemittel ein, kann außerdem die Löslichkeit hydrophober Substrate verbessert werden, ohne hohe und damit eventuell inhibierende Konzentrationen am Enzym zu bewirken.

In dieser Arbeit soll die Einkapselung des Enzyms in ein Gel aus Polyvinylalkohol untersucht werden. Durch die Kompartimentierung besteht die Möglichkeit, dass das Enzym unter Reaktionsbedingungen eine höhere Stabilität zeigt, weil der direkte Kontakt mit der Elektrode verhindert wird und die Geleinkapselung eventuell auch die Desaktivierung durch den Mediator reduziert. Dabei könnte die Phasengrenze zwischen Reaktionslösung und Gel als Diffusionsbarriere für den Mediator wirken, was zu einer geringeren Stationärkonzentration im Inneren der Kugeln führen könnte.

Komplementär zur Immobilisierung von (*R*)-selektiver *Lb*-ADH auf Sepabeads® wird nun die Immobilisierung einer (*S*)-selektiven ADH aus einem thermophilen Organismus (ADH-T) untersucht.

Die Geleinkapselung geschah durch das Eintropfen einer Mischung aus verseiftem Polyvinylalkohol, Polyethylenglykol und Enzymlösung in -30 °C kaltes Silikonöl. Durch die tiefe Temperatur bilden sich gefrorene Kugeln aus, die durch langsames Auftauen auf Raumtemperatur eine Gelstruktur ausbilden, sodass das Immobilisat eine hohe mechanische Stabilität und Elastizität aufweist (Ansorge-Schumacher 2006; Hischer et al. 2006).

Bei der Untersuchung der Lagerstabilität der gelstabilisierten Enzyme in Pufferlösung wurde nur eine recht geringe Halbwertszeit von einigen Stunden gefunden (siehe Abbildung 56). Dies steht in Kontrast zu den Berichten, nach denen der Einsatz dieser Immobilisate in organischen Lösemitteln fast unveränderte Enzymstabilität garantierte. Vermutlich kommt es beim Einsatz der Gelkugeln in wässrigen Lösungen zu einem Auswaschen von wasserlöslichen Gelbestandteilen, etwa Polyethylenglykol. Polyethylenglykol wurde den Kugeln als strukturgebende Substanz zugesetzt, sodass ein Ausspülen negative Einflüsse auf die Struktur der Kugeln und damit des immobilisierten Enzyms haben kann. Um auszuschließen, dass die Inaktivierung des co-immobilisierten Cofaktors eine niedrige Enzymaktivität vorspiegelt, wurden die Gelkugeln in einer weiteren Messreihe vor jeder Aktivitätsbestimmung in einer Pufferlösung aus frischem Cofaktor inkubiert. Die Stabilität blieb unverändert niedrig.

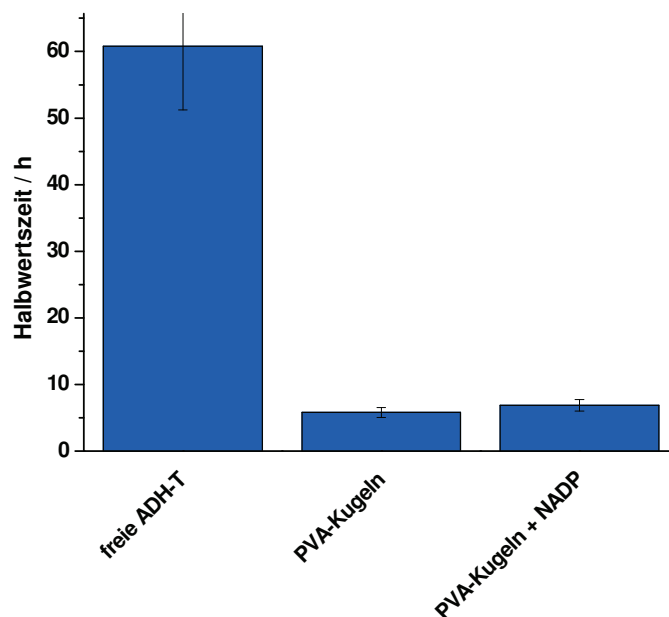


Abbildung 56: Stabilität von gelstabilisierter ADH-T in Pufferlösung

Reaktionsbedingungen: 50 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7, 20 °C; 1 mmol L⁻¹ NADP⁺

Dieser Effekt tritt bei Verwendung von nicht-wässrigen Lösemitteln naturgemäß nicht auf, da die Bestandteile der Gelkugeln in der hydrophoben Phase nicht löslich sind.

Diese mangelnde Stabilität schließt die Immobilisierung in Gelkugeln als wirkungsvolle Methode zur Enzymstabilisierung aus. Das Potential einer Immobilisierung von Enzymen in Polyvinylalkohol-Gelen wird aber in 11.2 eindrucksvoll unter Beweis gestellt.

4.4 Zusammenfassung

- ❖ Die Variation der Reaktionsparameter, insbesondere die Absenkung des pH-Werts, kann die Wechselwirkungen zwischen Mediator und Enzym geringfügig verringern, macht aber dennoch kein längerfristiges Arbeiten möglich.
- ❖ Bei Zusatz von Ionischen Flüssigkeiten als Cosolventien kann eine deutlich erhöhte Lagerstabilität des Enzyms in Gegenwart von Mediator gefunden werden. Allerdings ist dieser Effekt unter Reaktionsbedingungen weniger ausgeprägt und verzögert die Inaktivierung nur geringfügig.
- ❖ Die Immobilisierung auf dem porösen Trägermaterial Sepabeads[®] bewirkt eine enorme Steigerung der Lagerstabilität des Enzyms, allerdings erstreckt sich diese Stabilisierung nicht auf die Anwesenheit von Mediator.
- ❖ Die Immobilisierung durch Einkapselung des Enzyms in Gelkugeln aus Polyvinylalkohol ist nicht für die Anwendung in wässrigen Medien geeignet.
- ❖ Die Anwendung der Immobilisate in Kombination mit der substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung wird in Kapitel 11 beschrieben.

5 Mechanistische Untersuchung der Inaktivierung

5.1 Zyklovoltammetrische Untersuchungen

Durch die im vorigen Kapitel beschriebenen Ansätze konnte die Enzymstabilität unter Reaktionsbedingungen nicht signifikant erhöht werden. Damit stellt die Enzyminaktivierung weiterhin den limitierenden Faktor des Reaktionssystems dar, der längere Laufzeiten und höhere Katalysatorausnutzung verhindert. Da konventionelle Ansätze zur Enzymstabilisierung nicht erfolgreich waren, muss die Inaktivierungsreaktion zwischen Mediator und Enzym genauer untersucht werden. Ein besseres Verständnis der Inaktivierung soll dann eine gezielte und systematische Stabilisierung ermöglichen. Unklar sind auch die Gründe für die Tatsache, dass die Reaktion scheinbar willkürlich entweder bei sehr hohen Enantiomerenüberschüssen abbricht oder aber der Enantiomerenüberschuss langsam reduziert wird.

Eine langsame Abnahme des Enantiomerenüberschusses deutet auf das Vorhandensein der Nebenreaktion hin, bei der das Substrat direkt von dem Mediator reduziert wird. Da der Mediator aber eine sehr viel höhere Affinität zum Cofaktor als zum Substrat hat (Hildebrand und Lütz 2007), deutet dies auf ein Fehlen von oxidiertem Cofaktor hin. Der Cofaktor zeigt allerdings im Reaktionsgemisch eine deutlich höhere Stabilität als der Zeitrahmen, in dem die Experimente im Satzreaktor stattfinden. Deshalb ist die einzige Erklärung für das Fehlen von oxidiertem Cofaktor als Reaktionspartner für den aktivierten Mediator, dass der gesamte Cofaktor in reduzierter Form vorliegt und so keine Elektronen mehr aufnehmen kann. Stichproben aus dem Reaktor belegen diese Vermutung. Die Nebenreaktion der direkten Reduktion ist also nur in Abwesenheit von oxidiertem Cofaktor von Bedeutung und diese Situation kann unter Reaktionsbedingungen nur bei fehlender Enzymaktivität auftreten.

Unklar ist aber weiterhin, warum andere Elektrolysen bei sehr hohem ee zum Stillstand kommen, während immer noch Enzymaktivität vorhanden ist. Es muss also einen zweiten Effekt geben, der ebenfalls zum Abbruch der Reaktion führt. Da sowohl Cofaktor als auch Enzymaktivität noch vorhanden sind, liegt der Schluss nahe, dass die elektrochemische Teilreaktion der Mediatoraktivierung unterbrochen wird (siehe Abbildung 57). Bei fehlender Mediatoraktivität würde der erste Reaktionsschritt nicht stattfinden, sodass keine Produktbildung mehr stattfindet und der bis dahin erzielte Enantiomerenüberschuss erhalten bliebe.

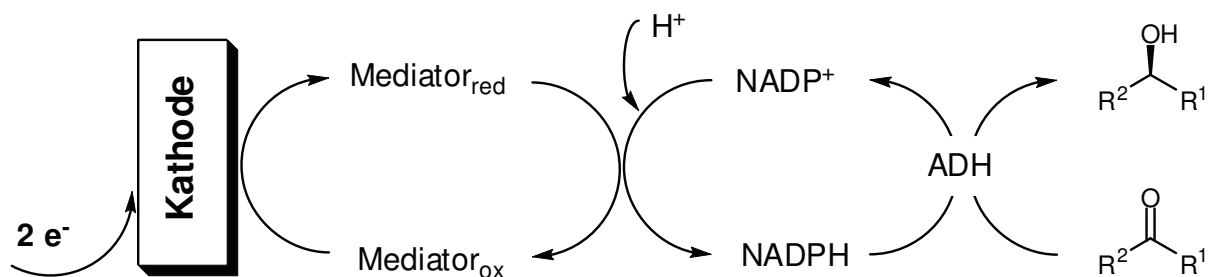


Abbildung 57: Reaktionssystem der indirekten elektrochemischen Cofaktorregenerierung

In der Literatur ist der Einfluss der Reaktionsbedingungen auf den Mediator bisher unberücksichtigt geblieben. Das Augenmerk richtete sich lediglich auf die vom Mediator ausgehende Inaktivierung des Enzyms (Hollmann et al. 2002).

Um zu klären, ob eine Mediatorinaktivierung stattfindet und auf welche Weise dies geschieht, wurde der Effekt von Proteinen auf die Aktivität des Mediators eingehender untersucht.

Mit Hilfe der Zyklischen Voltammetrie wurden Aktivitätsmessungen einer Mediatorlösung durchgeführt. Dabei korreliert der kathodische Peakstrom direkt mit der katalytischen Aktivität. Für eine experimentell einfache und reproduzierbare Messung wurde die Lösung nun nicht mit Proteinen versetzt, sondern mit einzelnen Aminosäuren. Diese Vorgehensweise ermöglicht es, eventuelle Inaktivierungen zu beobachten und sie gleichzeitig bestimmten Aminosäuren zuzuordnen. Nach Inkubation mit einer Aminosäure wird erneut die Mediatoraktivität bestimmt und der Quotient der Peakströme als prozentuale Restaktivität ermittelt. In Abbildung 58 sind die verbleibenden Mediatoraktivitäten dargestellt.

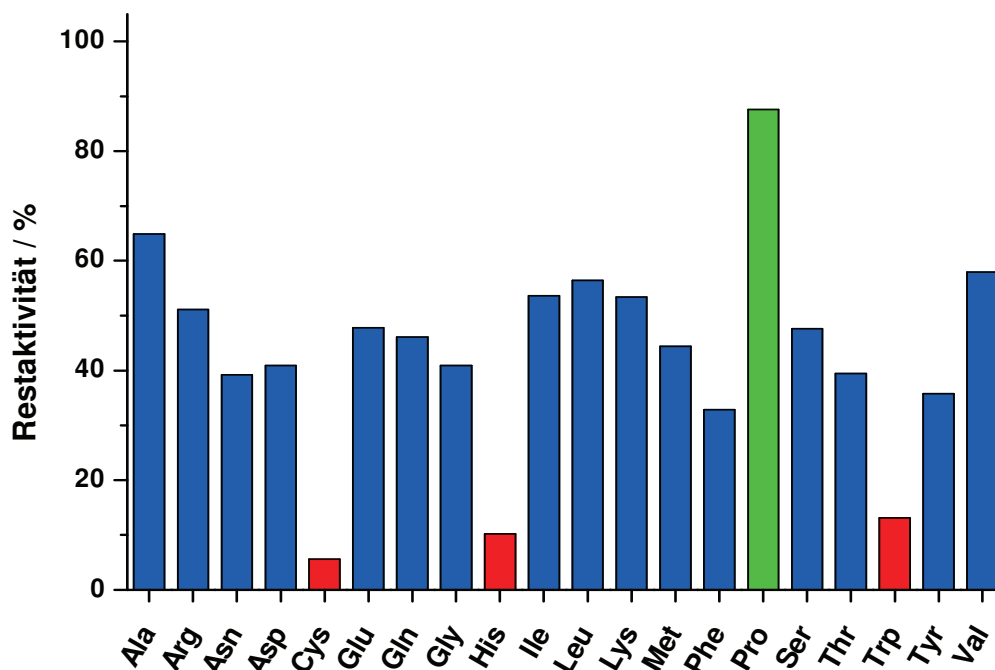


Abbildung 58: Mediatoraktivität in Gegenwart von Aminosäuren

Reaktionsbedingungen: 20 mL 50 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7; 2 mmol L⁻¹ Rh(bpy); 5 mmol L⁻¹ Aminosäure;
 WE: glassy carbon; CE: Platindraht; RE: Ag|AgCl; Potential -1000 - 0 mV; Vorschubgeschwindigkeit 100 mV s⁻¹

Wie aus Abbildung 58 hervorgeht, haben die zugesetzten Aminosäuren sehr verschiedene Einflüsse auf die verbleibende Katalysatoraktivität. Für Cystein, Histidin und Tryptophan können nur noch Restaktivitäten von weniger als 15 % gefunden werden. Für die meisten Aminosäuren bewegt sich die Restaktivität zwischen 35 und 65 %, nur für Prolin kann annähernd die gesamte Restaktivität

gefunden werden. Diese Messungen stellen den ersten experimentellen Beweis dafür dar, dass sich die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Mediator nicht nur schädigend auf das Enzym auswirken, sondern auch den Mediator inaktivieren.

Im Fall von Cystein kommt es zu einer starken Wechselwirkung zwischen dem Rhodium-Zentralatom und dem Schwefelatom der Seitenkette. Diese Reaktion kann sogar als Farbveränderung der gelben Lösung zu einem dunkel-orangen Farbton beobachtet werden. Es ist bekannt, dass Schwefel starke Bindungen zu Übergangsmetallen ausbilden kann, was einerseits zur Entfernung von Schwermetallionen aus Abwässern genutzt werden kann (Kim *et al.* 2002), andererseits aber auch zur Vergiftung heterogener Katalysatoren führt (Bitsch-Larsen *et al.* 2008; Deng *et al.* 1993). Diese inaktivierende Wirkung von Rhodium wurde bereits für andere Enzyme beobachtet (Pohl 2007).

Weiterhin können die Aminosäuren Histidin und Tryptophan mit ihren heterogen aromatischen Seitenketten mit dem Mediator wechselwirken und ihn weitestgehend inaktivieren. Phenylalanin und Tyrosin als weitere Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten hingegen haben keinen außergewöhnlich stark inaktivierenden Einfluss auf den Mediator. Von Prolin abgesehen haben alle verbleibenden Aminosäuren einen mäßig inaktivierenden Einfluss auf den Mediator. Dies kann auf die Insertion der nucleophilen Amino-Funktion in den Komplex zurückgeführt werden.

Hierbei ist allerdings zu beachten, dass diese Aminosäuren eine freie Aminogruppe tragen, die in einem Protein Teil der Peptidbindung wäre und nicht zur Reaktion bereitstünde. Ihr Einfluss als Teil eines Proteins sollte also vergleichbar zu Prolin sein, welches durch das Fehlen einer freien Aminogruppe keinen Einfluss auf die Mediatoraktivität hat. Geringfügige Verluste in der Größenordnung einiger Prozente sind auch auf zunehmende Viskosität der Lösung zurückzuführen (Speiser 1981).

In Abbildung 59 sind die Zyklischen Voltammogramme der wichtigsten Aminosäuren dargestellt. Im Gegensatz zu Cystein, Histidin und Tryptophan, bei denen bereits 5 mmol L^{-1} Aminosäure (2,5 Äquivalente) eine annähernd vollständige Inaktivierung des Mediators herbeiführen, bewirkt die Zugabe der anderen basischen Aminosäuren Lysin und Arginin auch in höheren Konzentrationen nur eine graduelle Verringerung der Restaktivität. Die Wechselwirkung der Amino-Gruppen mit dem Mediator stellt also vermutlich eine Gleichgewichtsreaktion dar, bei der mit zunehmender Aminosäurekonzentration das Gleichgewicht zum inaktivierten Mediator verschoben wird.

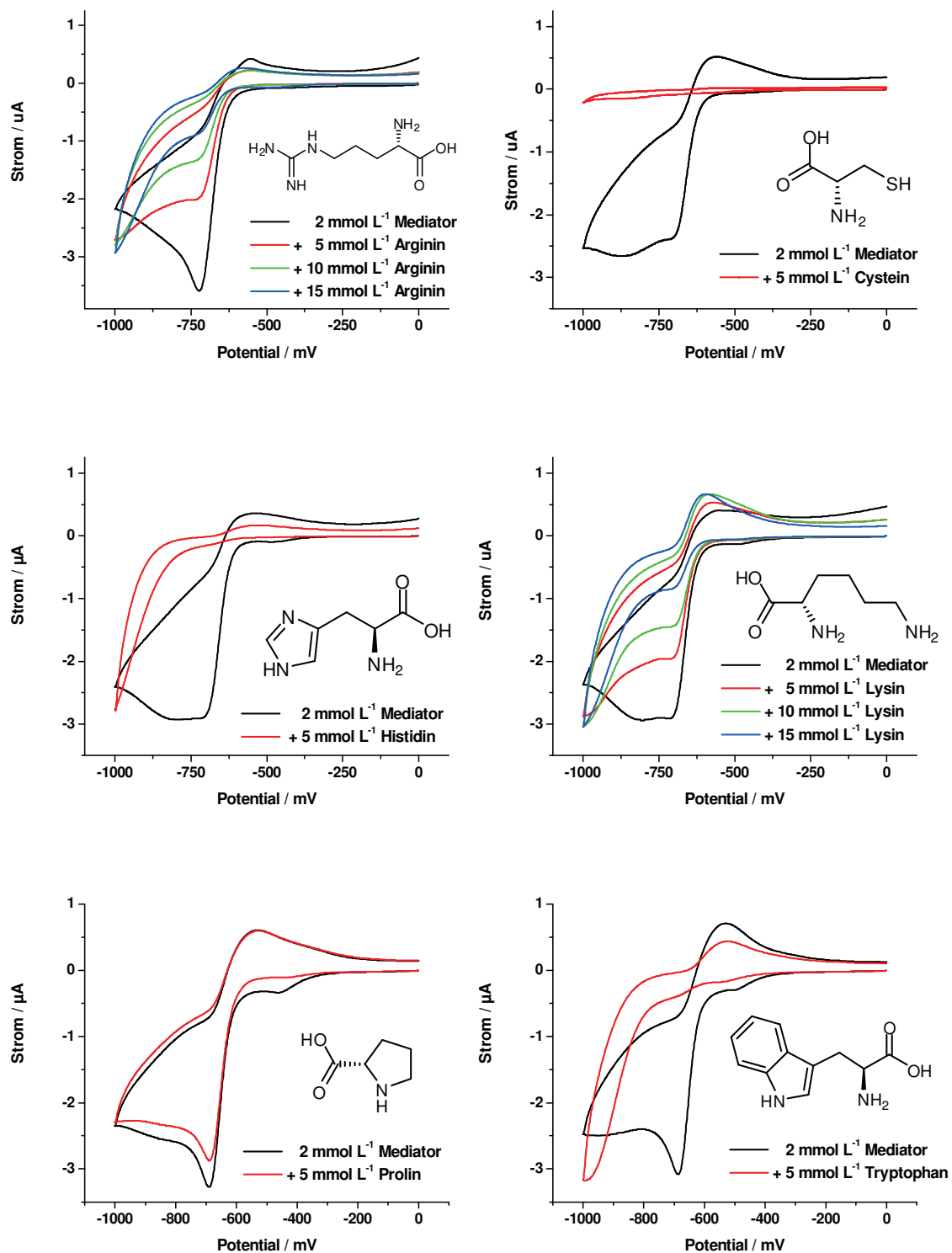


Abbildung 59: Zyklische Voltammogramme Mediator in Gegenwart von ausgewählten Aminosäuren

Reaktionsbedingungen: 20 mL 50 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7; 2 mmol L⁻¹ Rh(bpy); 5 mmol L⁻¹ Aminosäure;
 WE: glassy carbon; CE: Platindraht; RE: Ag|AgCl; Potential -1000 - 0 mV; Vorschubgeschwindigkeit 100 mV s⁻¹

5.2 Mediatorinaktivierung durch hohe Proteinkonzentrationen

Die Wechselwirkung zwischen Mediator und Enzym inaktiviert also beide Reaktionspartner und kann den Aminosäuren Cystein, Histidin und Tryptophan zugeordnet werden. Mit dieser Erkenntnis ist es nun auch möglich, die zwei verschiedenen Resultate der Elektrolysen zu verstehen. In Abhängigkeit von der Stöchiometrie kann es entweder zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms oder des Mediators kommen. Verbleibt aktiver Mediator in der Lösung, entsteht in der unselektiven Nebenreaktion das racemische Produkt. Bei einem Überschuss an Enzym kommt es zu einer vollständigen Inaktivierung des Mediators, die Reaktion bricht ab und eine Restmenge an Enzymaktivität verbleibt. Das Produkt behält seinen hohen Enantiomerenüberschuss.

Um diese Erkenntnis weiter zu belegen, wird die Inaktivierung des Mediators durch hohe Proteinkonzentrationen noch deutlicher gezeigt.

Auf der einen Seite ist es möglich, ein kostengünstiges Protein ohne katalytische Wirkung hinzuzugeben, wie beispielsweise Bovines Serum Albumin (BSA).

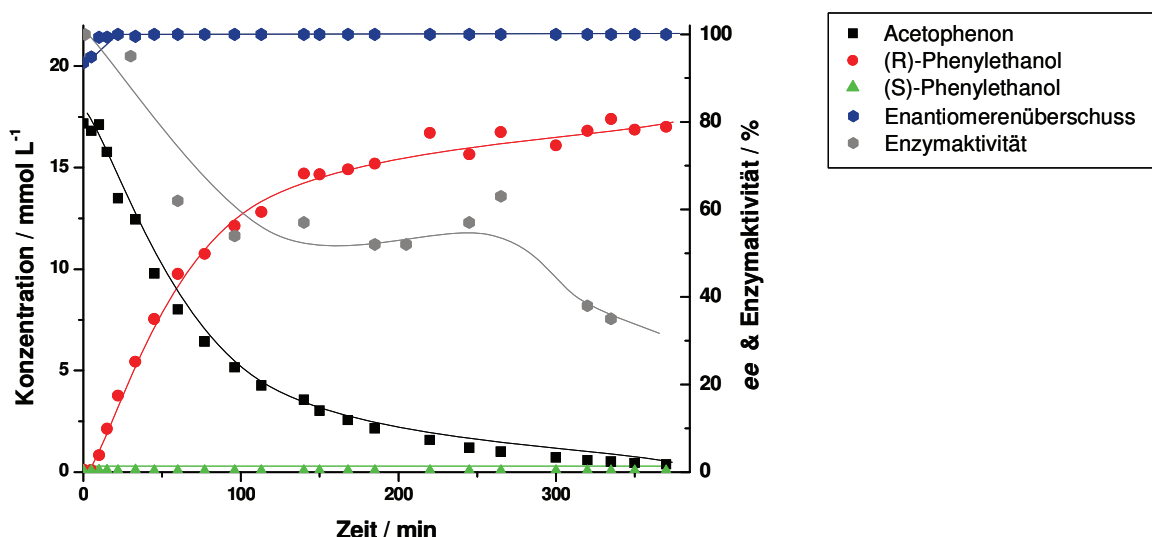


Abbildung 60: elektrochemischer Satzreaktor mit BSA

Reaktionsbedingungen: 250 mL 100 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7; 100 mmol L⁻¹ Na₂SO₄; 1 mmol L⁻¹ MgCl₂; 17 mmol L⁻¹ Acetophenon; 0,5 mmol L⁻¹ Rh(bpy); 0,5 mmol L⁻¹ NADP⁺; 5 U mL⁻¹ Lb-ADH; 5 mg mL⁻¹ BSA; -700 mV vs. Ag|AgCl

Es wird deutlich, dass durch die Verwendung von BSA als zusätzlichem Protein die Inaktivierung des Produktionsenzym verringert wird, sodass hohe Umsätze mit hervorragendem Enantiomerenüberschuss möglich sind. Durch die Reaktion zwischen BSA und dem Mediator sinkt allerdings dennoch die Reaktionsgeschwindigkeit, während man im Fall einer konstanten Mediatoraktivität eine lineare Produktbildung beobachten müsste.

Besteht der Proteinüberschuss nicht aus einem zusätzlichen Protein, sondern verwendet man eine Alkoholdehydrogenase mit sehr niedriger spezifischer Aktivität (siehe Tabelle 5; $U = \mu\text{mol min}^{-1}$), so kommt man zu ähnlichen Resultaten:

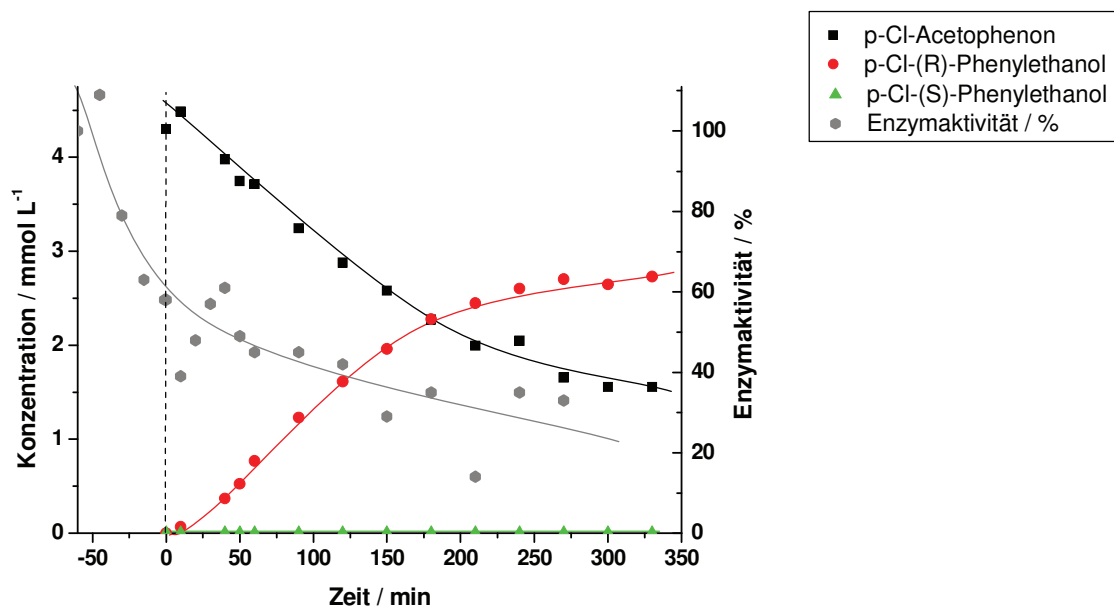


Abbildung 61: elektrochemischer Satzreaktor mit ADH CDX010

Reaktionsbedingungen: 120 mL 100 mmol L^{-1} Phosphatpuffer pH=7; 100 mmol L^{-1} Na_2SO_4 ; 3 mmol L^{-1} MgCl_2 ; 4 mmol L^{-1} para-Chlor-Acetophenon; $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ Rh(bpy); $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ NAD^+ ; $2,5 \text{ U mL}^{-1}$ CDX010; $-700 \text{ mV vs. Ag|AgCl}$

Tabelle 5: Vergleich der Eigenschaften von *Lb*-ADH und CDX010

Name	Substrat	Cofaktor	Aktivität pro mg Protein / U	Proteinmasse pro U / μg
<i>Lb</i> -ADH	Acetophenon	NADPH	89,1	11,2
CDX010	para-Cl-Acetophenon	NADH	10,0	100,0

Man erkennt bereits vor dem Anlegen des Potentials eine rapide Enzyminaktivierung. Nach dem Start der Reaktion kann Produktbildung beobachtet werden, allerdings bricht die Reaktion nach etwa 200 min ein, obwohl noch etwa 30 % an Enzymaktivität vorhanden sind. Auch hier kommt die Reaktion durch fehlende Mediatoraktivität zum Erliegen, während die verbliebene Enzymaktivität konstant bleibt.

5.3 Der Mechanismus der Inaktivierung

In den vorherigen Kapiteln wurde eine Vielzahl von Möglichkeiten untersucht, die Enzymstabilität unter Reaktionsbedingungen zu erhöhen. Leider waren diese Bemühungen nicht erfolgreich.

Dies bedeutet, dass eine Optimierung des Reaktionssystems nicht ohne eine genaue Kenntnis des Inaktivierungsmechanismus möglich ist. In der Literatur wird bisher nur unspezifisch über diese Inaktivierung berichtet. Obwohl außer Frage steht, dass die geringe Enzymstabilität auf eine Wechselwirkung des Enzyms mit dem Mediator zurückzuführen ist, so war die genaue Art der Wechselwirkung bisher nicht bekannt gewesen. In diesem Zusammenhang wurde zwar vermutet, dass die Inaktivierung durch eine Wechselwirkung der basischen Aminosäuren Lysin, Arginin und Histidin mit dem Rhodiumkomplex geschieht, etwa durch eine Insertion der nucleophilen Seitenketten in die Koordinationssphäre des Rhodiumkomplexes. Diese Vermutungen entbehrten aber einer soliden experimentellen Grundlage (Hollmann et al. 2006; Höllrigl et al. 2007). Die literaturbeschriebenen Ansätze zur Einschränkung dieser Wechselwirkung waren ebenso ohne ein systematisches Verständnis der Reaktion (siehe 4.1) und konnten nicht reproduziert werden.

Die Beobachtung, dass in manchen Synthesen die Reaktion ohne vollständigen Verlust der Enzymaktivität abbrach, und die detaillierten elektrochemischen Analysen legten den Schluss nahe, dass die Inaktivierung ein gegenseitiges Phänomen darstellt, welches nicht nur die Enzymaktivität, sondern auch die Mediatoraktivität verringert. Diese These wird nicht nur durch die Zyklischen Voltammogramme gestützt; auch die Elektrolysen mit sehr hohen Proteinmengen an Enzym oder BSA zeigten eindrücklich, dass selbst bei verbleibender Enzymaktivität die Reaktion abbricht, weil sämtlicher Mediator inaktiviert wurde. In Abhängigkeit von der Stöchiometrie zwischen Protein und Mediator kommt die Reaktion also entweder durch fehlende Enzymaktivität oder durch inaktivierten Mediator zum Erliegen. Dies wird in den Abbildungen 62 und 63 verdeutlicht.

Durch die elektroanalytischen Untersuchungen konnte auch gezeigt werden, dass die Inaktivierung kein Resultat einer Reaktion der basischen Aminosäureseitenketten ist, sondern dass die Aminosäuren Cystein, Histidin und Tryptophan mit dem Mediator reagieren. Dies bedeutet, dass die Verwendung eines nucleophilen Puffers zur Vermeidung von Wechselwirkungen zwischen Mediator und basischen Seitenketten (Höllrigl et al. 2007) nicht funktionieren kann, da sie keinen Einfluss auf Cystein und Tryptophan hat. Genauso kann eine Absenkung des pH-Werts offensichtlich zwar den Einfluss von basischen Aminosäuren, im vorliegenden Fall vor allem Histidin vermeiden (vergleiche 4.1.2), auf den inaktivierenden Effekt von Cystein und Tryptophan hat dies aber keinen Einfluss. Deshalb liegt die Enzymstabilität in Anwesenheit von Mediator auch bei sauren pH-Werten unter der von reiner Pufferlösung des gleichen pH-Werts.

(a) Keine Enzymaktivität

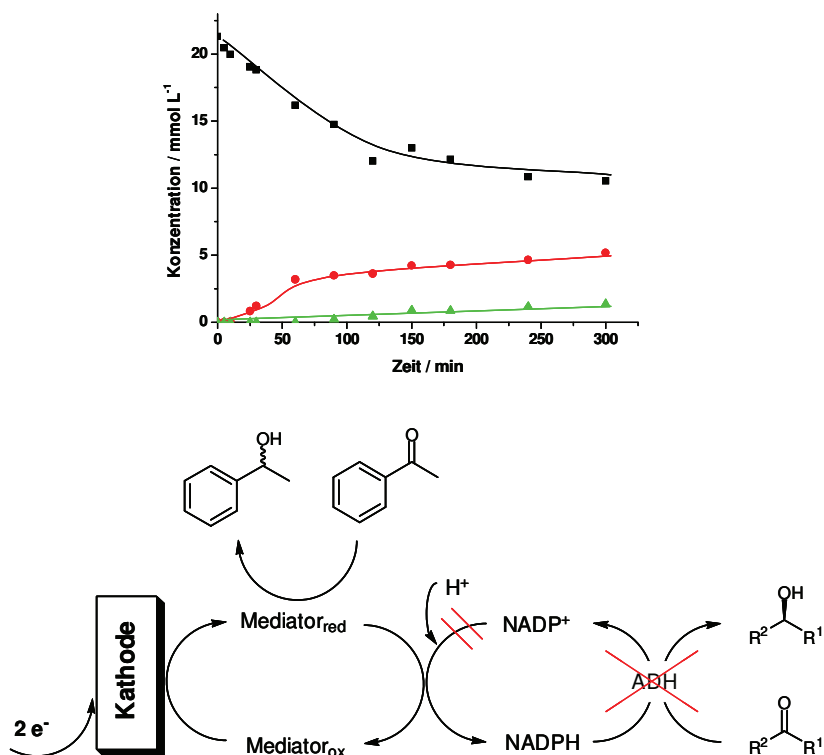


Abbildung 62: Reaktionsabbruch der Elektrolysen durch (a) fehlende Enzymaktivität, unselektive Nebenreaktion

(b) Keine Mediatoraktivität

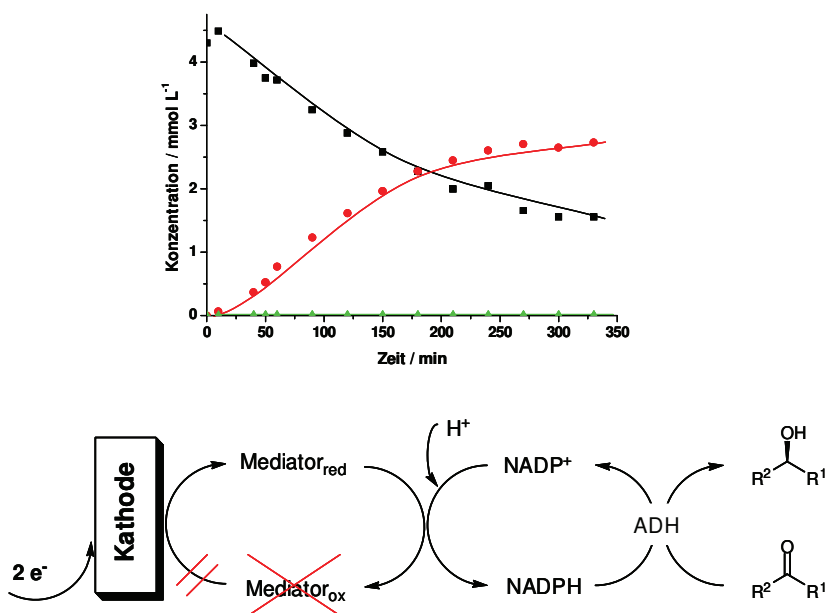


Abbildung 63: Reaktionsabbruch der Elektrolysen durch (b) fehlende Mediatoraktivität, vollständiger Reaktionsabbruch

Dabei muss noch ein weiterer Aspekt beachtet werden: In Absatz 4.2 konnte die Lagerstabilität von Enzymen in Gegenwart von Mediator deutlich erhöht werden, vermutlich weil die nucleophilen Kationen der IL sich an die freie Koordinationsstelle des Mediators anlagerten und so eine Reaktion mit dem Enzym verhinderten. Dieser Schutzeffekt konnte aber unter Reaktionsbedingungen nicht genutzt werden, weil der Mediator zur Regenerierung des Cofaktors die freie Koordinationsstelle zur Anlagerung des Hydridions benötigt. Wird diese Koordinationsstelle durch Diffusion des Kations frei, ist aber ebenso die Inaktivierung des Enzyms möglich.

Da es sich um drei Aminosäuren handelt, die an der inaktivierenden Wechselwirkung beteiligt sein können, ist auch eine Modifikation des Enzyms schwierig. Es ist unwahrscheinlich, dass der gezielte Austausch aller dieser Aminosäuren immer noch ein katalytisch aktives Protein ergibt. Beispielsweise würde das für *Lb*-ADH den Austausch von 8 Aminosäuren bedeuten (Niefind et al. 2000). Auch die chemische Modifikation dieser Aminosäuren erscheint nicht erfolgversprechend.

Es ist offensichtlich, dass die Inaktivierung von Mediator und Enzym nicht verhindert werden kann, sobald diese in Kontakt geraten. Weder die Variation der Reaktionsparameter noch die Verwendung von Additiven resultierte in einer Vermeidung der Inaktivierung. Somit kann ein stabiles Reaktionssystem nur aufrechterhalten werden, wenn der direkte Kontakt zwischen Mediator und Enzym durch eine räumliche Trennung unterbunden wird. Eine derartige Kompartimentierung sollte zu deutlich gesteigerten Stabilitäten führen, gestaltet sich aber schwierig, da sich der Cofaktor zur Übertragung der Redoxäquivalente frei zwischen Mediator und Enzym bewegen können muss.

Eine Retention des Enzyms ist durch die etablierte Technik des Membranreaktors ohne weiteres machbar, der Mediator allerdings ist dem Cofaktor sehr ähnlich in Hinblick auf Molekulargewicht und Polarität, sodass eine selektive Rückhaltung des Mediators durch eine Membran oder eine Phasengrenze nicht möglich ist. Dies wäre erst dann möglich, wenn die Eigenschaften des Mediators deutlichere Unterschiede zu denen des Cofaktors aufwiesen. In der Literatur wurde schon von Mediatoren berichtet, die durch Anbindung an ein Polyethylenglykol-Molekül (PEG) in ihrem Molekulargewicht derart vergrößert wurden, dass eine Membranrückhaltung möglich wurde (Steckhan et al. 1991). Diese Polymermediatoren zeigten aber stark verringerte Aktivitäten. Weiterhin wurden Mediator und Enzym im gleichen Reaktorraum eingesetzt, was zwar die Retention beider Moleküle ermöglichte, aber nicht die inaktivierende Wechselwirkung vermeiden konnte.

Die wasserlösliche Polymeranbindung des Mediators in Kombination mit räumlicher Abtrennung vom Enzym verspricht die größten Aussichten auf Stabilisierung des Reaktionssystems. Aufbauend auf diesen Ergebnissen soll nun eine Methode entwickelt werden, den Mediator in seinem Molekulargewicht zu vergrößern, mit besonderem Augenmerk auf geeigneter Membranretention und hoher Aktivität.

5.4 Zusammenfassung

- ❖ Zyklovoltammetrische Untersuchungen zeigen, dass durch die Reaktion zwischen Enzym und Mediator auch der Mediator inaktiviert wird. Für diese Inaktivierung sind die Aminosäuren Cystein, Histidin und Tryptophan verantwortlich.
- ❖ Alle Versuche zur Stabilisierung des Reaktionssystems durch Additive unter Reaktionsbedingungen scheitern daran, dass die während der Reaktion entstehende freie Koordinationsstelle am Rhodium-Zentrum mit dem Enzym reagieren kann.
- ❖ Enzym und Mediator müssen räumlich getrennt werden. Den größten Erfolg verspricht dabei eine Molekulargewichtserhöhung des Mediators durch Anbindung an ein wasserlösliches Polymer.

6 Polymermediatoren

6.1 Methoden der Polymerisation

Im Rahmen dieser Arbeit sollen zwei Methoden zur Synthese von polymergebundenem Mediator untersucht werden. Auf der einen Seite ist es möglich, ein bestehendes Polymer über reaktive Seitenketten mit dem Katalysator zu funktionalisieren. Andererseits ist es möglich, aus Katalysatoren mit zwei Anbindungsstellen und kleineren Polymereinheiten ein sogenanntes Block-Polymerisat herzustellen, bei denen die Katalysatoreinheiten in das Rückgrat des Polymers integriert sind (siehe Abbildung 64).

In beiden Fällen ist es notwendig, modifizierte Mediatoren zu finden, die neben ihrer katalytischen Funktion auch noch eine beziehungsweise zwei funktionelle Gruppen tragen, mit denen sie an das Polymer angebunden werden können. Dabei ist zu beachten, dass dies erhebliche Auswirkungen auf die katalytischen Eigenschaften des Katalysators haben kann (siehe 3.2.2.3). Eine Seitenkettenmodifikation setzt außerdem das generelle Vorhandensein von reaktiven Gruppen in der Seitenkette voraus, beispielsweise Säure-Funktionen in Polyacrylsäure. Die bereits zu Reaktionsbeginn hohe Molekularmasse des Polymers wirkt sich vorteilhaft auf die Membranretention aus, da selbst eine unvollständige Reaktion gute Retention ermöglicht.

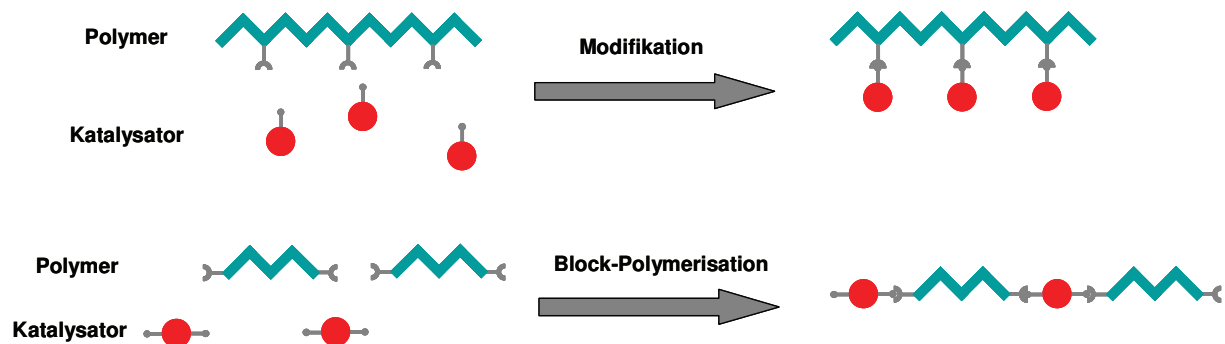


Abbildung 64: Anbindungsstrategien für polymergebundene Katalysatoren

Ein weiterer Vorteil der Seitenkettenmodifikation ist, dass die Belegung der reaktiven Seitenketten mit Katalysator durch die Versuchsbedingungen variiert werden kann. Im Gegensatz dazu ist das Verhältnis von Polymer zu Katalysator bei der Block-Polymerisation durch den Reaktionsmechanismus auf 1:1 festgelegt. Hier sind außerdem hohe Umsätze nötig, um hohe Molekularmassen zu erzielen. Auf der anderen Seite kann durch das Block-Polymerisat eine recht hohe katalytische Dichte erzielt werden, da es im Gegensatz zum modifizierten Polymer nur kürzere unreaktive Polymerketten gibt, die weniger verknäult vorliegen und so die reaktiven Zentren sterisch weniger abschirmen (Spika 1994).

Zusätzlich zu einer sterischen Hinderung kann auch die elektronische Situation des Mediators durch das Polymer beeinflusst werden. Dadurch kann es zu Verschiebungen des Reduktionspotentials und

zu einer Änderung der katalytischen Aktivität kommen, wie dies bereits in Kapitel 3.2.2.2 für die niedermolekularen Mediatoren beschrieben wurde (Hildebrand *et al.* 2008).

Die Auswahl an möglichen Polymeren beschränkt sich im Rahmen dieser Arbeit auf wasserlösliche Spezies. Mit Hinblick auf die Vorarbeiten mit Polyethylenglykol (PEG) wurde für die Blockpolymerisation die Anbindung des Mediators an verschiedene kürzere PEG-Moleküle untersucht.

Als mögliches Polymer zur Seitenkettenmodifikation bietet sich Polyacrylsäure (PAA) an, da eine Anbindung des bereits dargestellten Amino-Bipyridins **5a** (siehe Abbildung 33) in Analogie zu einer Peptidbindung möglich sein sollte (Malmström und Andersson 2000; Malmström *et al.* 1995).

6.2 Polyacrylsäure

Als erste Möglichkeit zur Polymeranbindung des Mediators soll die Seitenkettenmodifikation von Polyacrylsäure (PAA) untersucht werden. Durch die gute Wasserlöslichkeit und die reaktiven Säuregruppen ist dieses Polymer zur Anbindung von Bipyridin gut geeignet.

Die Säuregruppen können über verschiedene Reaktionstypen mit einem funktionalisierten Bipyridin reagieren. Denkbar ist etwa die Ausbildung einer Esterbrücke mit einer Säure-Gruppe am Bipyridin. In Hinblick auf die geringe katalytische Aktivität des Mediators **15b** (siehe Abbildung 33) mit zwei freien Säure-Gruppen und die Hydrolyseempfindlichkeit der Esterbindung wurde stattdessen aber die Bildung einer Peptidbindung untersucht. Dazu muss ein amino-funktionalisiertes Bipyridin durch ein Kupplungsreagenz an die Säuregruppe gebunden werden. Durch die enorme Bedeutung der Peptidbindung ist eine Vielzahl von Kupplungsreagenzien bekannt. In der Literatur gibt es bereits Beispiele (Malmström und Andersson 1997; Malmström und Andersson 1999; Malmström *et al.* 1999), in denen Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zur Kupplung eines Rhodium-Phosphin-Komplexes an Polyacrylsäure verwendet wurde. Aus Kapitel 3.2 sind 4-Amino (**11a**) beziehungsweise 4,4'-di-Amino-Bipyridin (**5a**) bekannt, deren Kopplung an Polyacrylsäure möglich sein sollte. Die Darstellung von **5a** und **11a** gelingt in einem Schritt aus **3a** beziehungsweise **10a**, alternativ kann **3a** aber auch aus dem deutlich kostengünstigeren **1a** in zwei Schritten synthetisiert werden. Es wurde aber hauptsächlich das di-funktionalisierte **5a** untersucht, da die doppelt funktionalisierten Bipyridine synthetisch leichter zugänglich sind. Eine Verknüpfung der Polymerketten untereinander durch die zweite funktionelle Gruppe wurde dabei als vernachlässigbar angesehen. Entgegen der Erwartung und der bereits literaturbeschriebenen Synthesen erwies sich DCC nicht als geeignetes Kupplungsreagenz. Im Gegensatz dazu gelang die Kupplung durch Zugabe von 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium-chlorid (DMTMM) (Kunishima *et al.* 1999a; Kunishima *et al.* 1999b; Thompson und Michielsen 2006).

Abbildung 65 verdeutlicht den Reaktionsmechanismus. Ausgehend von Polyacrylsäure, 2,2'-Bipyridin und RhCl_3 beläuft sich die gesamte Synthese auf sechs Syntheseschritte.

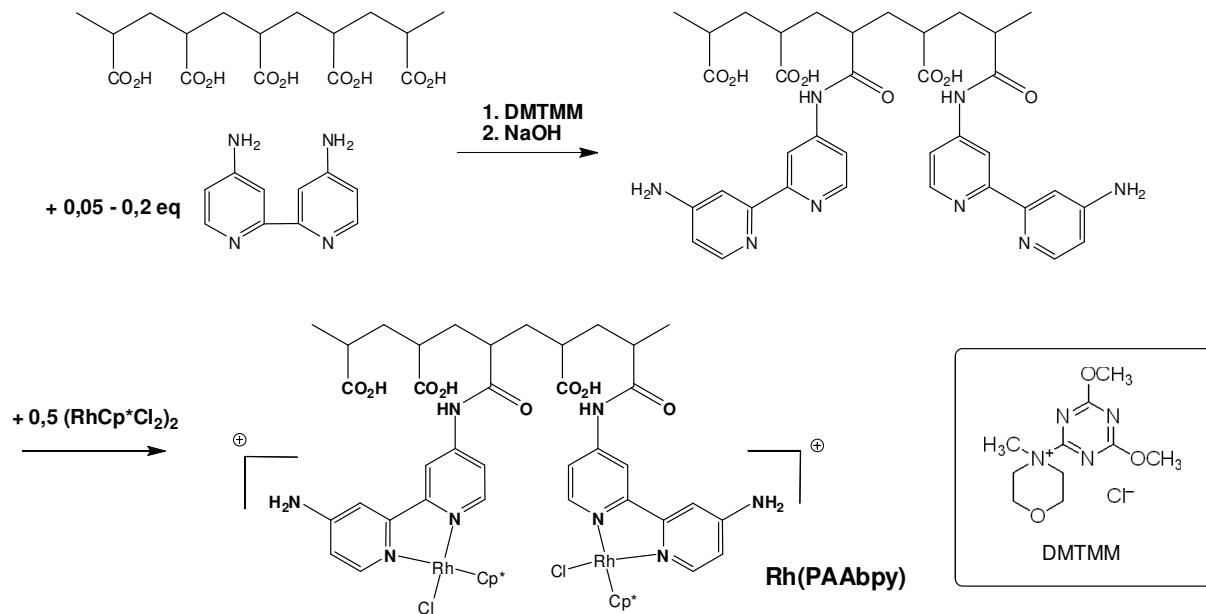


Abbildung 65: Syntheseweg für die Anbindung des Mediators an Polyacrylsäure

Es wurde bereits erwähnt, dass bei einer Seitenkettenfunktionalisierung der Belegungsgrad an Katalysator variiert werden kann. In diesem konkreten Fall wurden Polymere mit einer Belegung von 5, 10 und 20 % Mediator dargestellt. Die Belegung kann dabei leicht durch Absorptionmessungen bestimmt werden, da die Bipyridine ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum um 250 nm zeigen. Abbildung 66 zeigt die unterschiedlichen Absorptionen in Abhängigkeit von der Belegungsrate.

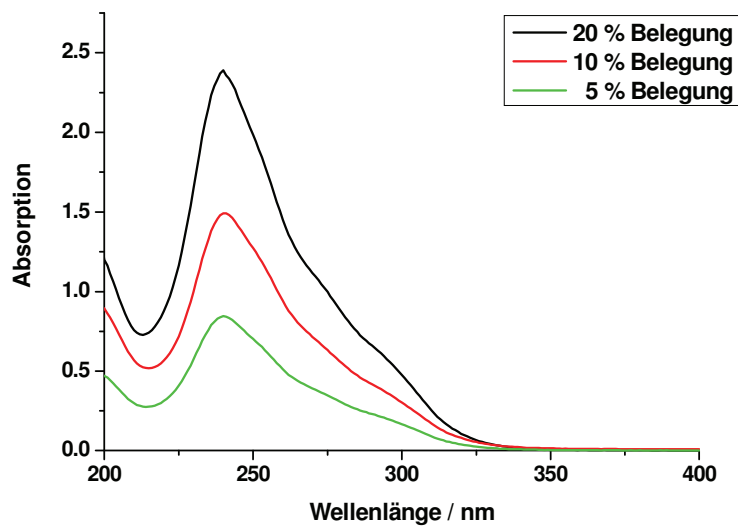


Abbildung 66: Absorptionsspektren verschieden stark belegter Polyacrylsäuren

Reaktionsbedingungen: $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ Polymer in Wasser

Die Charakterisierung des Polyacrylsäuremediators erfolgt in den Abschnitten 6.4 und 6.5.

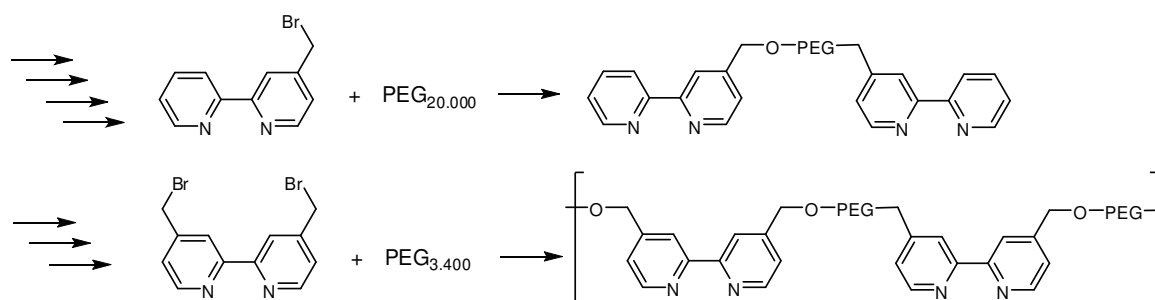
6.3 Polyethylenglykol

6.3.1.1 Bisherige Arbeiten

In der Literatur sind bereits zwei Methoden bekannt, wie der Mediator Rh(bpy) durch Polymeranbindung in seinem Molekulargewicht vergrößert werden kann (Spika 1994). Bei beiden Reaktionen handelt es sich um Veretherungen, bei denen eine Etherbindung zwischen dem PEG-Molekül und einem modifizierten Bipyridin ausgebildet wird.

Der erste Weg zu polymergebundenem Bipyridin führt über eine Veretherung nach Williamson. Dabei wird das PEG-Molekül in einer Natriumsuspension deprotoniert und dann mit einem Brom-Derivat von 2,2'-Bipyridin umgesetzt (siehe Abbildung 67). Dabei ist sowohl die Endgruppenmodifikation durch ein mono-funktionalisiertes Bipyridin als auch die Blockpolymerisation mit einem di-funktionalisierten Bipyridin möglich. Die Brom-Derivate von 2,2'-Bipyridin können in drei beziehungsweise vier Stufen dargestellt werden, sodass die gesamte Reaktion inklusive Komplexierung sechs beziehungsweise sieben Stufen beträgt (vergleiche Abbildung 34).

Williamson-Ethersynthese



PEG-Schmelze

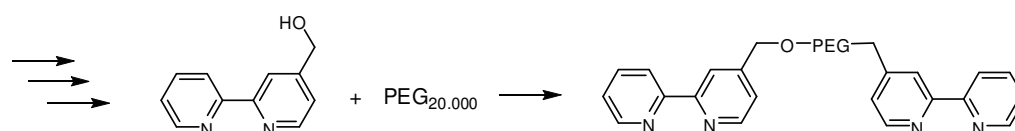


Abbildung 67: frühere Arbeiten zur Polymeranbindung von Rh(bpy) (Spika 1994)

Es ist auch möglich, Polyethylenglykol in einer Schmelze lösungsmittelfrei mit Bortrioxid zu deprotonieren und dann mit einem hydroxylierten 2,2'-Bipyridin umzusetzen. Die Synthese hydroxylierter Bipyridine umfasst drei Schritte, wodurch der Umfang der Gesamtreaktion sechs Reaktionsschritte umfasst.

Diese polymervergrößerten Komplexe wurden mit dem Ziel synthetisiert, den Mediator durch eine Membran zurückzuhalten und so die Effizienz zu steigern. Allerdings geschah dies noch ohne die Erkenntnisse aus Kapitel 5, denn die Retention von Enzym und Mediator im selben Reaktionsraum führte rasch zu der beschriebenen Inaktivierung. Weiterhin waren diese Synthesen mit erheblichen Problemen verbunden. Die Synthesewege beinhalten sechs bis sieben Syntheseschritte, einige davon

unter Einsatz aggressiver Chemikalien und mit geringen Ausbeuten. Außerdem zeigen die endgruppenmodifizierten Polymere nur eine mäßige Belegung mit Bipyridinen. Im besten Fall lag die Belegung der über die 4-Position veretherten Bipyridine bei 30 %, das heißt von drei PEG_{20.000}-Molekülen wurden nur 2 Bipyridin-Einheiten bereitgestellt. Dies bedeutet eine enorme Verdünnung der katalytischen Aktivität, da ein Großteil des Polymers unfunktionalisiert bleibt. Im Fall der Williamson'schen Ethersynthese ist dies wahrscheinlich auf eine unvollständige Deprotonierung des PEGs zurückzuführen, auch Spuren von Wasser könnten hier höhere Belegungen verhindern. Bei der PEG-Schmelze ist das stöchiometrische Verhältnis zwischen PEG und Bipyridin schwer zu kontrollieren, da die hohe Viskosität der Reaktionsschmelze experimentelle Schwierigkeiten mit sich bringt. Die Belegung im Block-Polymerisat wurde nicht bestimmt, allerdings ist davon auszugehen, dass sie bei ausreichendem Polymerisierungsgrad bei einem Verhältnis der Polymereinheiten zu Bipyridinen von 1:1 liegt. Damit sollte das Block-Polymerisat die höchste katalytische Dichte haben. In CV-Untersuchungen konnte allerdings nur für das in 4-Position veretherte Polymer (30 % Belegung) überhaupt ein eindeutiger Reduktionsstrom gemessen werden, der etwa 5 % des Stroms von Rh(bpy) entsprach.

6.3.1.2 Entwicklung einer neuen Syntheseroute

Eine neue Syntheseroute wurde entwickelt, bei der besonderes Augenmerk auf eine geringe Anzahl an Reaktionsschritten und hohe Ausbeuten gelegt wurde. Dabei soll die Bildung eines Block-Polymerisats erreicht werden, um eine akzeptable katalytische Dichte zu erhalten. Um die experimentell schwierige Deprotonierung von PEG zu vermeiden, wurde von einem funktionalisierten PEG-Molekül ausgegangen. Es sind einige PEG-Spezies kommerziell erhältlich, deren Endgruppen modifiziert wurden, für unsere Zwecke bot sich das α,ω -aminierte Polyethylenglykol an, deren endständige Amino-Gruppen erheblich leichter zur Reaktion gebracht werden können als die Hydroxy-Gruppen im konventionellen PEG. Eine elegante Methode zur Bildung einer C-N-Bindung ist die Ausbildung von Schiff-Basen zwischen Aldehyden und Amino-Gruppen. Da es sich hierbei um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, bei der Wasser abgespalten wird, kann man durch wasserfreie Reaktionsführung die Produktbildung begünstigen. Für eine hydrolysestabile Bindung wird die entstandene Doppelbindung anschließend durch komplexe Hydride reduziert.

Abbildung 68 zeigt den Syntheseweg. Da beide Edukte kommerziell erhältlich sind, reduziert sich die Zahl der Syntheseschritte inklusive der Herstellung des Rhodium-Vorkomplexes auf vier, im Vergleich zu zwei für den niedermolekularen Mediator Rh(bpy). Ein weiterer Vorteil ist die Tatsache, dass vor allem die Reduktion mit NaBH₄ und die Komplexierung bekanntermaßen mit hohen Ausbeuten ablaufen.

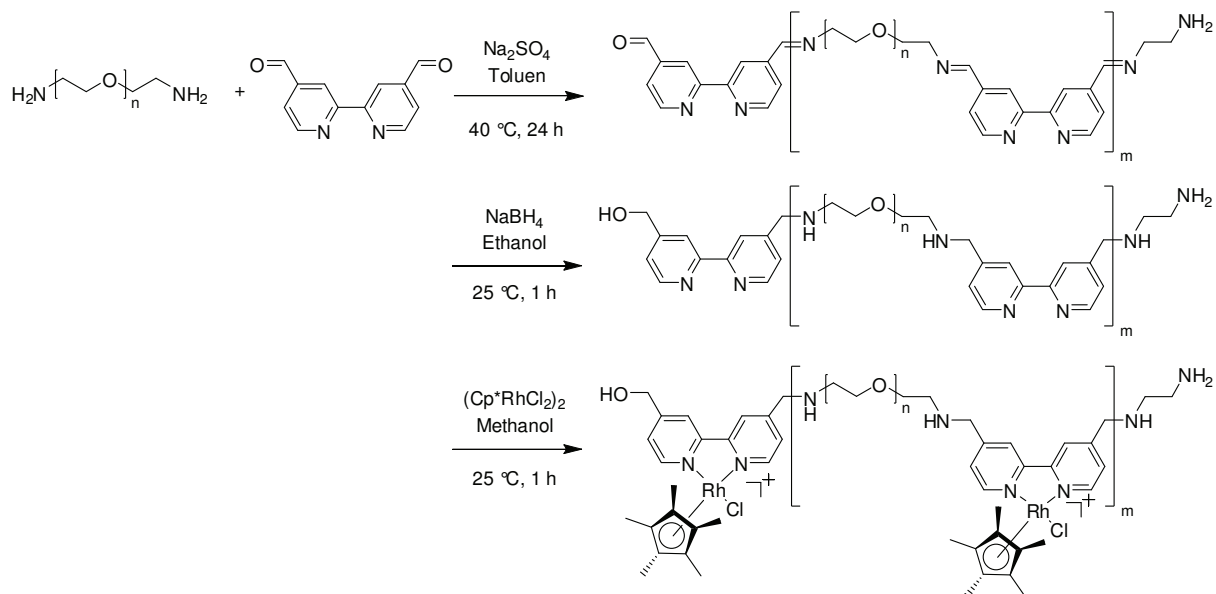


Abbildung 68: Syntheseroute der Mediatoranbindung an Polyethylenglykol

Da schwer abzuschätzen ist, welche Molekularmassen auf diese Weise erreicht werden können, sollen drei funktionalisierte PEG-Moleküle mit verschiedenen Molmassen von 3400, 6000 und 10.000 g mol^{-1} untersucht werden. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass Mediatoren mit größeren Polymerblöcken zwar eine höhere Membranretention bei gleichem Polymerisierungsgrad zeigen, vermutlich aber an Aktivität einbüßen, da die katalytischen Zentren sterisch mehr gehindert werden.

6.4 Aktivität

6.4.1 Elektrochemische Aktivität

Es wurden analog zu 3.2.2 zykl voltammometrische Untersuchungen durchgeführt, um das katalytische Potential der neuen Polymermediatoren einzuschätzen. Dazu wurden die Reduktionsströme von Mediatorlösungen gemessen und mit dem des niedermolekularen Mediators Rh(bpy) verglichen. Da es sich bei den Polymermediatoren um große Moleküle mit entsprechend geringen Diffusionskonstanten handelt, wurde eine Vorschubgeschwindigkeit von 16 mV s^{-1} gewählt, um mehr Mediatormolekülen die Diffusion zur Elektrode zu ermöglichen und so höhere Ströme zu messen.

Abbildung 69 stellt die gemessenen Voltammogramme dar. Es wird deutlich, dass alle Polymermediatoren deutlich verringerte Ströme aufweisen. Dies hat drei Gründe. Durch die Polymeranbindung werden einerseits die Diffusionskonstanten deutlich erhöht, sodass die Mediatoren langsamer an die Elektrodenoberfläche gelangen können. Andererseits werden die Rhodium-Zentren durch den unreaktiven Polymeranteil sterisch abgeschirmt, sodass es für sie schwieriger wird, die Elektrodenoberfläche zu erreichen und aktiviert zu werden. Da Zyklische Voltammetrie eine Analyseverfahren ist, die diffusionslimitiert abläuft (Speiser 1981), hat auch die zunehmende Viskosität der Lösung eine Reduzierung der Ströme zur Folge.

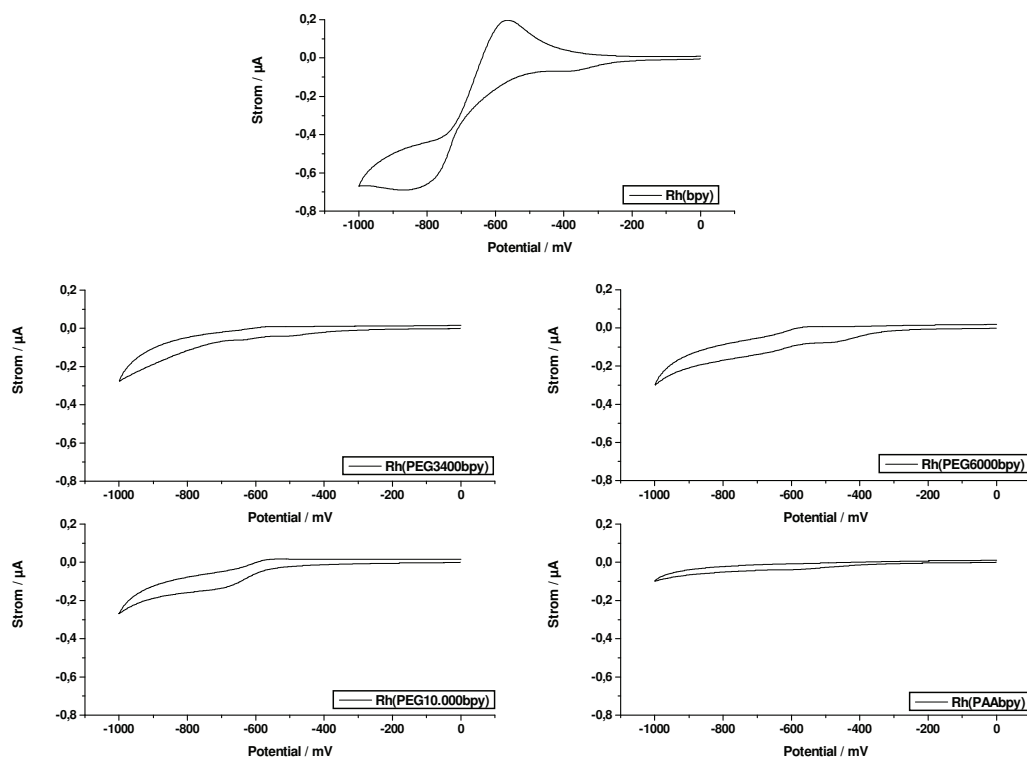


Abbildung 69: Zyklische Voltammogramme der Polymermediatoren im Vergleich zu Rh(bpy)
Reaktionsbedingungen siehe Abbildung 70

Weiterhin ist kein definierter Reduktionspeak mehr zu erkennen, stattdessen beginnt oberhalb von -700 mV ein stetig zunehmender Reduktionsstrom. Dieses Phänomen macht es unmöglich, ein genaues Reduktionspotential zu definieren. Um dennoch die katalytischen Aktivitäten miteinander zu vergleichen, wurden die Ströme bei -800 mV vs. Ag|AgCl bestimmt und mit dem des niedermolekularen Mediators verglichen. Dieses Potential stellt das äußerste Potential dar, bei dem unter Elektrolysebedingungen gearbeitet werden kann, ohne eine direkte Reduktion des Cofaktors zu riskieren.

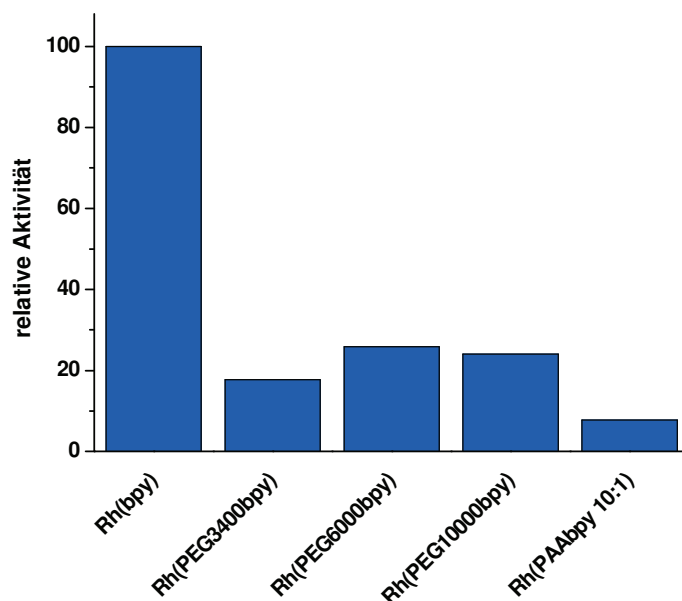


Abbildung 70: elektrochemische Aktivität der Polymermediatoren im Vergleich zu Rh(bpy)

Reaktionsbedingungen: 10 mL 50 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7; 0,5 mmol L⁻¹ Mediator; Vergleich der Reduktionsströme bei -800 mV vs. Ag|AgCl und 16 mV s⁻¹

Aus dem Vergleich der Reduktionsströme wird deutlich, dass die Anbindung des Mediators an Polyacrylsäure nur sehr geringe elektrochemische Aktivitäten erzielt (siehe Abbildung 70). Der Reduktionsstrom liegt dabei unter 10 % des niedermolekularen Mediators Rh(bpy), während die an Polyethylenglykol gebundenen Mediatoren deutlich bessere Aktivitäten aufweisen. In Abhängigkeit von der Größe des Polymerblocks können Aktivitäten von 18 % (3400 g mol⁻¹), 26 % (6000 g mol⁻¹) und 24 % (10.000 g mol⁻¹) erreicht werden. Erstaunlich ist dabei die deutlich höhere Aktivität der beiden größeren Polymerblöcke. Denkbar wäre, dass die verschiedenen Polymerketten verschiedene Faltungen bewirken und so bei größeren Polymeren die Mediatoreinheiten exponierter liegen.

Die neuen Mediatoren weisen also elektrochemische Aktivitäten von bis zu einem Viertel des niedermolekularen Mediators auf. Sie stellen damit eine deutliche Verbesserung der bisherigen Arbeiten dar (Spika 1994). Weil die Mediatoren durch Retention von der Verweilzeit entkoppelt werden können, sollte es möglich sein, die reduzierte Aktivität durch höhere Mediatorladung zu kompensieren.

6.4.2 Aktivität mit Formiat

Außer der elektrochemischen Aktivierung des Mediators ist auch die Reaktion mit Formiat möglich, wobei ein Hydrid abstrahiert wird und Kohlenstoffdioxid entsteht (Ruppert *et al.* 1988; Steckhan *et al.* 1991). Diese Methode der Aktivierung hat ebenfalls schon Anwendungen gefunden (Steckhan *et al.* 1990; Westerhausen *et al.* 1992), auch wenn über eine Inaktivierung des Mediators durch Formiat berichtet wurde (Uhlenbrock 1994). Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit die elektrochemische Variante untersucht werden soll, ist diese Reaktion dennoch von Interesse, da die sterische Hinderung durch das Polymer für Formiat-Ionen eine geringere Rolle spielen sollte.

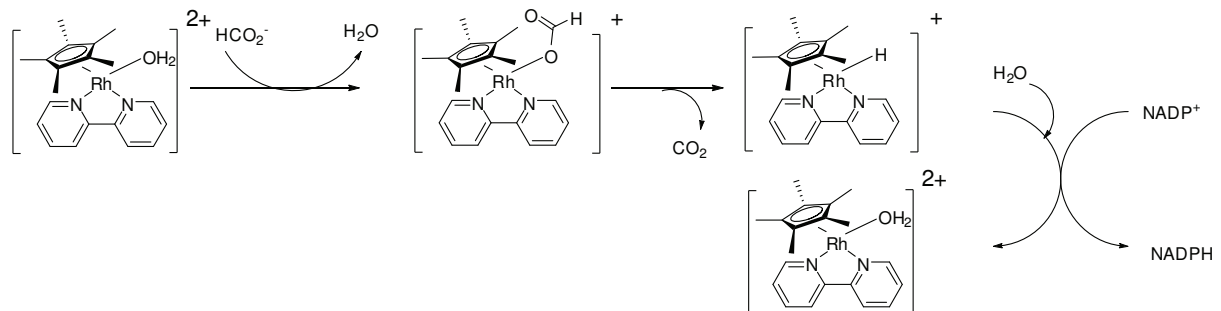


Abbildung 71: Mediatoraktivierung und Cofaktorreduktion durch Formiat

Für den PEG-Mediator mit dem kleinsten Polymerbaustein wird eine Aktivität von 67% in Bezug auf Rh(bpy) beobachtet. Für die größeren Polymerblöcke finden sich Aktivitäten von 18 % (Rh(PEG₆₀₀₀bpy)) beziehungsweise 31 % (Rh(PEG_{10.000}bpy)). Der Polyacrylsäuremediator zeigt auch hier eine sehr geringe Aktivität von weniger als einem Prozent. Hier spielt eventuell auch die elektronische Umgebung der Mediatoreinheiten in Form der freien Säuregruppen eine Rolle. Da die Mediatoren auch mit Formiat Aktivität zeigen, kann diese Reaktion eingesetzt werden, um während einer Elektrolyse durch Probenahme die Mediatoraktivität im Reaktor zu bestimmen.

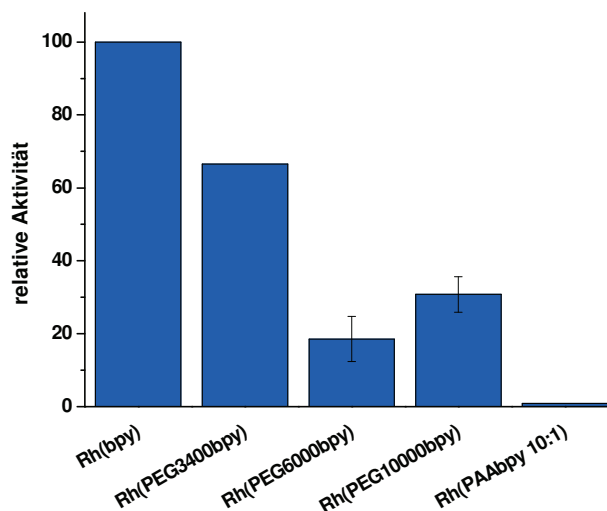


Abbildung 72: Aktivitäten der Polymermediatoren im Vergleich zu Rh(bpy) bei der Aktivierung durch Formiat

Reaktionsbedingungen: 0,8 mL 50 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7; 500 mmol L⁻¹ Natriumformiat; 0,2 mmol L⁻¹ NADP⁺; 0,2 mL 1 mmol L⁻¹ Mediatorlösung; Bestimmung der Absorptionsänderung bei $\lambda = 340$ nm

6.5 Retentionsverhalten und maximale Löslichkeit

Neben einer hohen katalytischen Aktivität ist bei den Polymermediatoren auch die Membranretention von entscheidender Bedeutung. Gelingt keine annähernd vollständige Retention des Mediators, so führt dies zu unerwünschtem Kontakt zwischen Mediator und Enzym und damit zu der Inaktivierung, die durch die Molekulargewichtsvergrößerung verhindert werden sollte. Wird das Polymer unter kontinuierlich betriebenen Bedingungen eingesetzt, kommt es außerdem zu einem Auswaschen des Mediators und so zum Verlust an katalytischer Aktivität.

Generell gibt es zwei Methoden zur Bestimmung der Retention an einer Membran. Bei der ersten Methode wird der Membranreaktor mit Polymer beladen und als Umlaufreaktor betrieben, das Permeat wird also wieder in den Reaktor eingespült. Nach Einstellung eines Gleichgewichts bestimmt man die Konzentration des Polymers vor und hinter der Membran. Danach ergibt sich der Retentionsfaktor gemäß:

$$R = 1 - \frac{c_{\text{Permeat}}}{c_{\text{Retentat}}}$$

Es ist aber auch möglich, den Reaktor kontinuierlich mit frischem Lösemittel durchströmen zu lassen und das ausgewaschene Polymer gravimetrisch zu bestimmen. Für diese Methode wird deutlich mehr Lösemittel benötigt, dafür erhält man zusätzlich die zeitliche Entwicklung der Retention, falls kleinere Bestandteile ausgewaschen werden. Hier ergibt sich die Retention aus:

$$R = 1 + \frac{1}{\sum \tau} \ln \frac{m_1}{m_0}$$

mit $\sum \tau$ als Anzahl der zusammengefassten Verweilzeiten, m_0 als Ausgangsmasse des Polymers zu Beginn dieser Fraktion und m_1 als Masse zum Ende dieser Fraktion.

Aufgrund der Vermutung, dass auch niedermolekulare Bestandteile im Polymermediator enthalten sind und mit Wasser als kostengünstigem Lösemittel wurde die zweite Methode zur Bestimmung der Retentionen verwendet. Es wurden 300 mg Substanz in den Reaktor eingespült, das hundertfache Reaktorvolumen hindurchgepumpt und jeweils die ausgespülte Polymermasse in Zehnerfraktionen bestimmt.

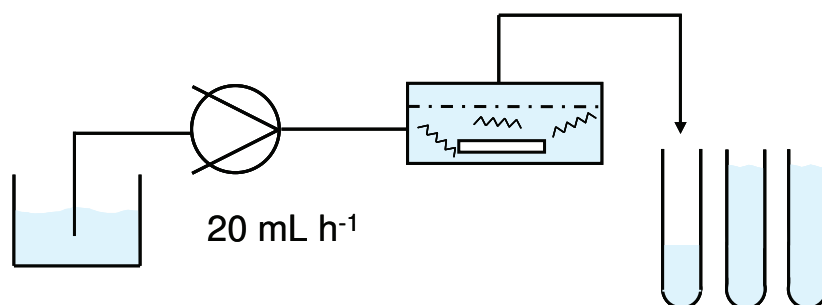


Abbildung 73: Retentionsmessung im Membranreaktor

Tabelle 6: Retentionsfaktoren der Polymermediatoren

Polymermediator	Retention YM3 Membran	Retention YM10 Membran
Rh(PAAbpy(10:1))	0,999	n. b.
Rh(PEG ₃₄₀₀ bpy)	0,997	n. b.
Rh(PEG ₆₀₀₀ bpy)	0,999	0,997
Rh(PEG _{10.000} bpy)	0,999	0,998

Es wird deutlich, dass alle Polymermediatoren hervorragende Retentionen an einer Membran mit einem *cut-off* von 3 kDa zeigen. Für die Polyacrylsäurederivate ist naturgemäß eine sehr hohe Retention zu erwarten, da hier von einem Polymer mit einem Molekulargewicht von 100 kDa ausgegangen wird. Aber auch die PEG-Mediatoren können sehr gut zurückgehalten werden. Für die Polymere mit einem PEG-Baustein von 6000 g mol⁻¹ oder 10.000 g mol⁻¹ kann ebenfalls ein Retentionsfaktor von 0,999 erzielt werden. Sogar für eine größerporige Membran mit einem *cut-off* von 10 kDa werden noch sehr gute Werte gefunden. Die Verwendung einer größerporigen Membran würde höhere Permeatflüsse und damit höhere Produktivitäten erlauben. Im Folgenden soll aber die Betonung besonders auf der Erhaltung von Mediator- und Enzymaktivität liegen, sodass in den weiteren Reaktorläufen die kleinerporige Membran verwendet wird.

Um abschätzen zu können, wie hoch die maximale Mediatorladung sein kann, wurde die Löslichkeit der Polymermediatoren in Wasser bestimmt (siehe Abbildung 74).

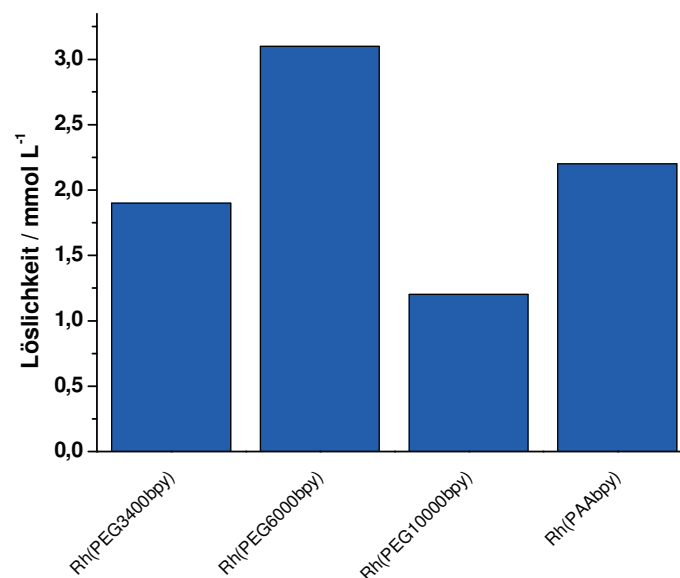


Abbildung 74: maximale Löslichkeit der Polymermediatoren in Wasser

Die Löslichkeit ist weitgehend unabhängig von der Größe des PEG-Bausteins und liegt generell bei Werten von etwa 2 mmol L^{-1} . Zieht man in Betracht, dass die Polymermediatoren etwa ein Viertel der elektrochemischen Aktivität des niedermolekularen Mediators Rh(bpy) zeigen und dieser gewöhnlich in Konzentrationen von $0,05$ bis $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ eingesetzt wird (Hildebrand und Lütz 2007; Höllrigl et al. 2007; Vuorilehto et al. 2004), sollte diese maximale Löslichkeit keine Hinderung des Gesamtprozesses darstellen.

6.6 Aktivitätsverlust durch Ausspülen von Rhodium

Die bisher bestimmten Retentionen bezogen sich immer auf die Gesamtmenge an Polymer, die aus dem Reaktor gespült wurde. Dies äußert sich auch in der Tatsache, dass größere Polymerblöcke zu besseren Retentionen führen. Ein anderer Aspekt, der beachtet werden muss, ist das Ausbluten des Katalysators, das heißt die Spaltung der Bindung zwischen Ligand und Edelmetall. Dieser Bindungsbruch führt zur Inaktivierung des Katalysators. Ist es in einem diskontinuierlichen Reaktor noch möglich, dass Ligand und Metall diese Bindung erneut ausbilden, so führt eine kontinuierliche Betriebsweise durch die Entkopplung der Katalysatorkonzentration von der Verweilzeit dazu, dass das Metall-Ion aus dem Reaktor ausgewaschen wird und so katalytische Aktivität verloren geht. Dieser Prozess stellt oft den limitierenden Faktor eines löslichen Polymerkatalysators dar, da durch die nötige Nachdosierung an Edelmetall zusätzliche Kosten entstehen. Als Beispiel für diese Limitierung kann die enantioselektive Hydrierung von 2-N-Acetyl-acetamidozimtsäure durch einen polymerengebundenen PyrPhos-Katalysator (siehe Abbildung 75) genannt werden, wie sie Greiner in seiner Dissertation beschreibt (Greiner 2002).

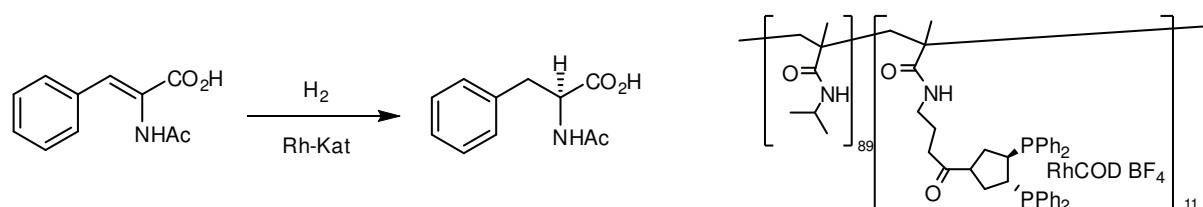


Abbildung 75: Hydrierung von N-Acetylacetamido-zimtsäure zu N-Acetyl-Phenylalanin durch polymergebundenen Rhodium-Katalysator

Die schwache Bindung des Liganden zum zentralen Rhodium und die damit verbundene geringe Retention machten die kontinuierliche Betriebsweise unmöglich. Das Auftreten von metallischem Rhodium war ein weiteres Indiz für den Bindungsbruch.

Auch bei einer kontinuierlichen Sharpless-Dihydroxylierung durch polymergebundenen Osmium-Katalysator wurde ein Ausspülen des Edelmetalls berichtet (Wöltinger *et al.* 2001). Um konstant hohe Umsätze zu erreichen, war eine kontinuierliche Nachdosierung von 23 % der Katalysatorkonzentration pro Verweilzeit nötig (siehe Abbildung 76).

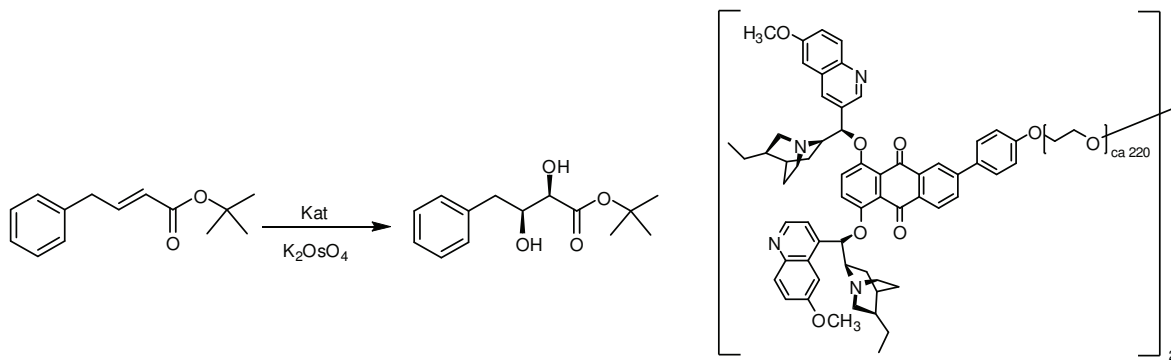


Abbildung 76: Sharpless-Dihydroxylierung durch polymerengebundenen Katalysator

Um die Retention des Rhodiums für den polymerengebundenen Rh(bpy)-Mediator zu bestimmen, wurde die Restaktivität einer Mediatorlösung in einem Membranreaktor nach unterschiedlichen Verweilzeiten bestimmt. Im Vergleich zu einer Rhodium-Bestimmung im Auslauf hat dieser Ansatz den Vorteil, dass direkte Aussagen über den Verlauf der katalytischen Aktivität getroffen werden können. Der Einsatz des Rhodium-Polymers mit einem PEG-Baustein von $10.000 \text{ g mol}^{-1}$ garantiert dabei, dass die Messung nicht durch das Ausspülen ganzer kleinerer Mediatoren verfälscht wird.

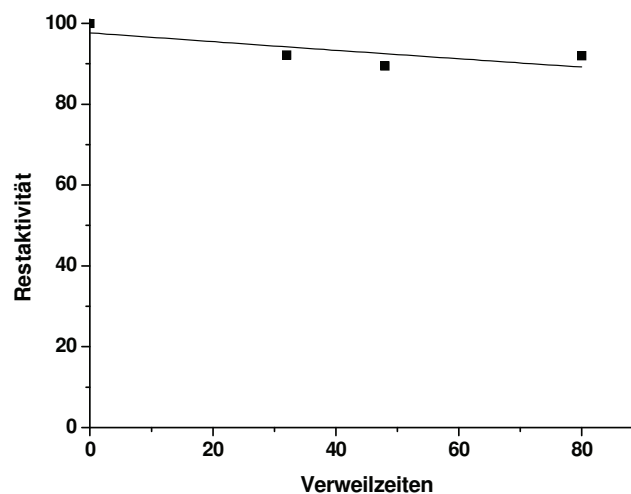


Abbildung 77: Ausspülen von Rhodium; Verlauf der Restaktivität im kontinuierlich betriebenen Membranreaktor

Reaktionsbedingungen: $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ Rh(PEG10.000bpy), Flussgeschwindigkeit $10\text{-}20 \text{ mL h}^{-1}$; Membran: YM3

Es wird deutlich, dass im Gegensatz zu den vorher beschriebenen literaturbekannten Beispielen die Metall-Ligand-Bindung extrem stark ist. Wie Abbildung 77 verdeutlicht, können nach über 80 Verweilzeiten immer noch mehr als 90 Prozent der Aktivität gefunden werden. Anpassung der Messwerte durch nicht-lineare Regression ergab einen durchschnittlichen Aktivitätsverlust von $0,08 \%$ pro Verweilzeit. Der Bindungsbruch zwischen Rhodium und Bipyridin-Ligand und die damit einhergehende Inaktivierung des Mediators können also weitestgehend vernachlässigt werden.

6.7 Zusammenfassung

- ❖ Um die räumliche Trennung von Mediator und Enzym zu ermöglichen, wurde eine Polymeranbindung des Mediators über den Bipyridinliganden untersucht. Dabei wurde einerseits die Seitenkettenmodifizierung von Polyacrylsäure untersucht, andererseits die Blockpolymerisation von Mediator und Polyethylenglykol-Bausteinen.
- ❖ Polyacrylsäure wurde durch 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chlorid (DMTMM) mit 4,4'-Amino-Bipyridin modifiziert. Diese Methode erlaubte verschiedene Belegungsraten, die Aktivitäten des Polymermediators waren aber sowohl elektrochemisch als auch mit Formiat als Hydrid-Donor sehr gering. Die Retention an Membranen mit einem *cut-off* von 3 kDa war naturgemäß sehr hoch (99,9 %).
- ❖ Bipyridin-4,4'-di-aldehyd wurde durch Ausbildung von Schiff-Basen an modifizierte Amino-Polyethylenglykole mit Molekularmassen von 3400, 6000 und 10.000 g mol⁻¹ gebunden. Reduktion mit komplexen Hydriden und anschließende Komplexierung ergab Mediatoren, die bis zu 26 % elektrochemische Aktivität zeigten (verglichen mit Rh(bpy)) und unter Aktivierung mit Formiat bis zu 67 %. Auch hier konnten an einer Membran mit einem *cut-off* von 3 kDa hervorragende Retentionen von bis zu 99,9 % gefunden werden.
- ❖ Im Vergleich der Polymermediatoren wird deutlich, dass die Polyethylenglykol-Mediatoren deutlich überlegene katalytische Eigenschaften bei gleicher Retention zeigen, sodass sich weitere Untersuchungen auf sie beschränken.
- ❖ Ein Verlust an Aktivität durch "Ausbluten" des Rhodiummetalls kann weitestgehend vernachlässigt werden, die Inaktivierung liegt bei unter einem Promille pro Verweilzeit.

7 Reaktoren

Im Folgenden sollen die neu entwickelten Polymermediatoren unter Reaktionsbedingungen untersucht werden. Nachdem bewiesen wurde, dass die Polymermediatoren erfolgreich zur Reduktion von NADP^+ unter Reaktorbedingungen eingesetzt werden können, erfolgt die Ankopplung der enzymatischen Reaktion.

7.1 3D-Zelle

Für die folgenden Reaktorläufe wurde eine optimierte elektrochemische Zelle eingesetzt, die von Vuorilehto entwickelt wurde (Vuorilehto et al. 2004). Dabei handelt es sich um eine sogenannte 3D-Zelle mit einer Reihe von aneinander geschraubten Plexiglasblöcken, deren Hohlraum mit sphärischen Kohlepartikeln gefüllt ist (siehe Abbildung 78). Diese Kohlepartikel können über Silberdrähte elektrisch kontaktiert werden und dienen so als dreidimensionale Arbeitselektrode. Die Reaktionslösung kann ohne Druckabfall durch das Bett aus Kohlepartikeln gepumpt werden, wobei ein hervorragendes Verhältnis aus Elektrodenoberfläche und Reaktorvolumen erzielt werden kann. Ladungsausgleich erfolgt über eine Ionentauschermembran, die die Gegenelektrode aus Platin abtrennt, das Potential wird über eine Ag|AgCl -Referenzelektrode kontrolliert.

Die Verwendung dieser optimierten Zelle bietet eine Reihe von Vorteilen. Da die limitierende Reaktion an der Arbeitselektrode stattfindet, kann durch die große Elektrodenfläche eine hohe Produktivität erzielt werden. Weiterhin kann durch den geschlossenen Aufbau leichter Sauerstoff von der Lösung ferngehalten werden, der viele elektrochemische Reaktionen inhibiert. Außerdem kann diese 3D-Zelle durch die Tatsache, dass unter geringem Überdruck gearbeitet werden kann, leichter in einen größeren Reaktor integriert werden. Durch die offene Bauweise des herkömmlichen Satzreaktors würde für die Zuleitung und Abführung von Reaktionslösung je eine Pumpe benötigt. Auch eine Maßstabsvergrößerung (scale-up) ist bei der Verwendung der 3D-Zelle durch Aneinanderschaltung mehrerer Zellen sehr viel leichter möglich als bei dem bisherigen Satzreaktor. Tabelle 7 fasst die Parameter beider Reaktortypen zusammen.

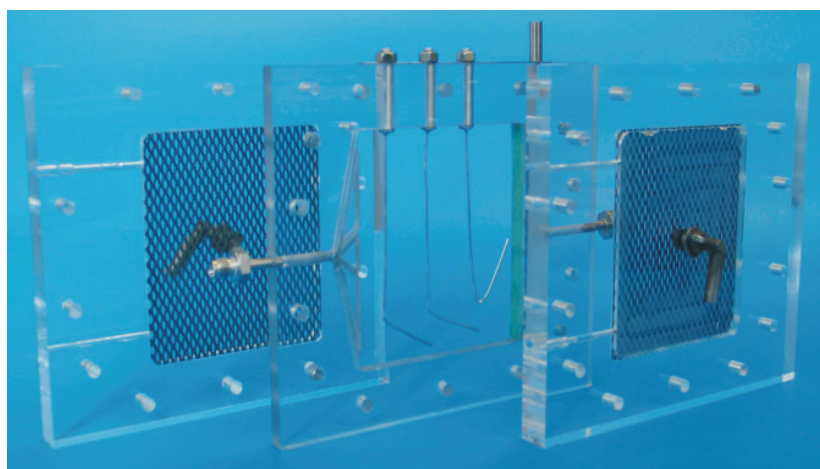


Abbildung 78: 3D-Zelle (nach (Vuorilehto et al. 2004))

Tabelle 7: Parametervergleich Satzreaktor / 3D-Zelle

Parameter	Satzreaktor	3D-Zelle
Volumen	60-200 mL	45 mL
Reproduzierbarkeit	Gut	Sehr gut
Sauerstoffausschluss	Nein	Ja
Verhältnis Elektrodenoberfläche zu Volumen	Mittel	Sehr hoch

Um die Funktionsweise der 3D-Zelle zu überprüfen und um einen Eindruck von der Effizienz der dreidimensionalen Elektrodenoberfläche zu gewinnen, wurde die Zelle als Flussbettreaktor zur kontinuierlichen Reduktion von NADP^+ eingesetzt. Um diesen ersten Versuch so einfach wie möglich zu halten, wurde kontinuierlich niedermolekulares Rh(bpy) mit dem Substratstrom zugegeben. In den weiteren Versuchen sollen dann die polymervergrößerten Derivate zum Einsatz kommen.

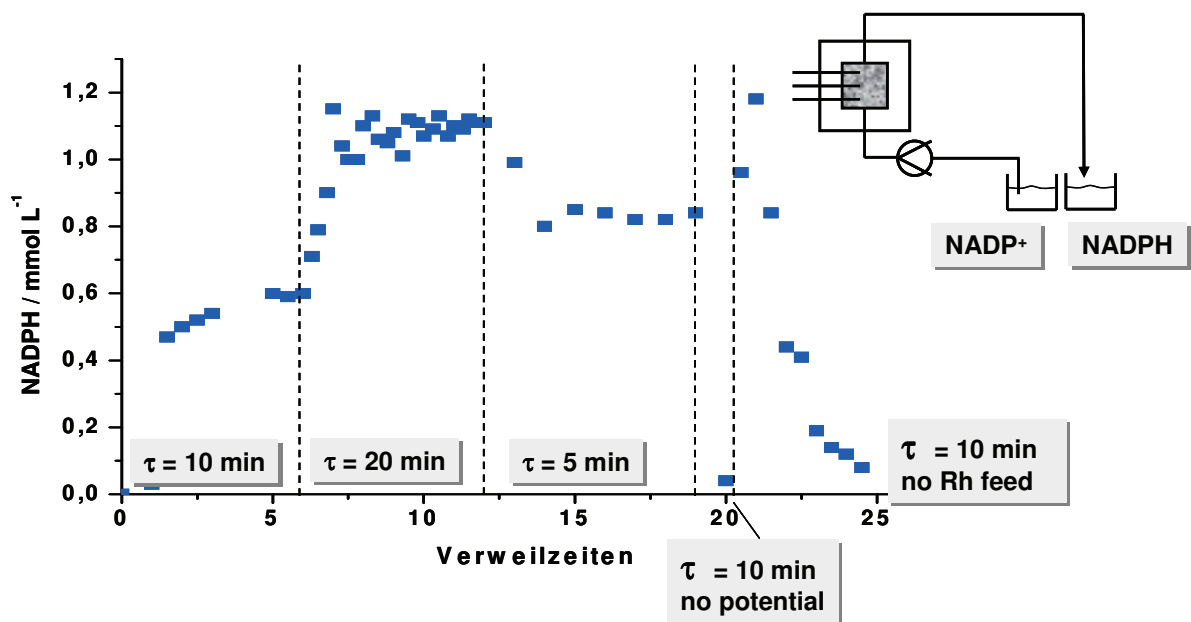


Abbildung 79: Flussbettreaktor zur kontinuierlichen Reduktion von NADP

Reaktionsbedingungen: 100 mmol L^{-1} Phosphatpuffer pH = 7; 45 mL Zelleninhalt; $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ Rh(bpy); 1 mmol L^{-1} NADP⁺; -750 mV vs. Ag|AgCl

Wie aus Abbildung 79 deutlich wird, ist das Konzept der dreidimensionalen Elektrodenoberfläche erfolgreich. In Abhängigkeit von der eingestellten Verweilzeit konnten verschiedene hohe Umsätze erzielt werden. Zwei Aspekte sind besonders zu betonen; zum einen bewirkt die in Anschluss an eine Verweilzeit von zwanzig Minuten vorgenommene Absenkung der Verweilzeit auf fünf Minuten einen höheren Umsatz als zu Beginn bei einer Verweilzeit von zehn Minuten. Dies resultiert aus der Tendenz des Mediators, auf der Oberfläche der Kohlepartikel zu adsorbieren (Vuorilehto et al. 2004). Dadurch kam es während der ersten zehn Verweilzeiten zu einer Akkumulation von Mediator im

Reaktorraum, die selbst die kurze Verweilzeit von fünf Minuten überkompensierte und einen Umsatz von 80 Prozent ermöglichte.

Zum anderen ist es möglich, diese Adsorption indirekt zu beweisen. Gab man keinen Mediator mehr zur Substratlösung, konnte dennoch für fünf Verweilzeiten eine Produktbildung beobachtet werden. Dies ist ein eindeutiges Zeichen dafür, dass auf den Kohlepartikeln noch Mediator adsorbiert war, der weiter die Reduktion von NADP^+ katalysierte. Zum Beweis, dass es sich dabei nicht lediglich um eine Auswaschung von übrigem Produkt handelte, kann Verweilzeit 20 aufgeführt werden. Legte man kein Potential an, unterbrach man also die Reaktion, konnte innerhalb einer Verweilzeit kein Produkt mehr detektiert werden. Die langsam abnehmende Produktkonzentration am Ende des Versuches ist also definitiv auf durch Adsorption verbliebenen Mediator zurückzuführen, nicht auf einen Auswascheffekt.

Der Einsatz der 3D-Zelle ermöglicht auf eine apparativ einfache Art und Weise hohe Produktivitäten. Im beschriebenen Flussbettreaktor konnten Produktivitäten bis zu $190 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ NADPH erzielt werden.

7.2 NADPH-Bildung durch Polymermediator

Nach der erfolgreichen Etablierung der neuen elektrochemischen Zelle soll nun der Polymermediator eingesetzt werden. Als erstes soll überprüft werden, ob der Polymermediator unter Prozessbedingungen aktiv ist, deshalb wird zuerst die Reduktion von NADP^+ untersucht. Der Mediator wird dabei in einem Kreislauf aus Pumpe, 3D-Zelle, Vorratsgefäß und Membranreaktor umgepumpt. Während in der 3D-Zelle der Cofaktor reduziert wird, ist es durch den Einsatz einer Membran möglich, den Mediator selektiv zurückzuhalten und erneut zur 3D-Zelle zu pumpen. Der Membranreaktor wird also im *cross-flow*-Modus betrieben, das heißt, die Reaktionslösung wird an der Membran vorbeigeführt, wobei ein Teil der Lösung die Membran passiert. Dies ist nötig, da ansonsten der Mediator gegen die Membran gespült würde und so nicht mehr mit der Elektrode in Kontakt kommen könnte. Die Kombination von Membran und Elektroden in einem Bauteil wäre apparativ schwierig, weil die elektrochemische Reaktion wegen des an der Gegenelektrode entstehenden gasförmigen Sauerstoffs drucklos erfolgen muss. Für eine reibungslose Reaktion muss dieser Sauerstoff aus der Lösung ausgasen. Die Membranabtrennung muss aber unter Druck geschehen, da sonst kaum Permeat entsteht.

Währenddessen wird mit dem Permeatstrom reduzierter Cofaktor durch die Membran transportiert, wo er bei Ankopplung der Enzymreaktion verbraucht würde. In diesem Versuch soll allerdings der Permeatstrom lediglich periodisch auf NADPH untersucht werden und dann in den Mediatorkreislauf zurückgeführt werden. Abbildung 80 macht deutlich, dass der Mediator unter Reaktorbedingungen aktiv ist. Es ergibt sich eine lineare Produktbildungsphase, die nach etwa 70 min bei vollständigem Umsatz endet. Dieses Experiment verdeutlicht eindrucksvoll, dass der Mediator aktiv ist, allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein geringer Teil des Mediators durch die Membran gespült wird und erneut ins System eingebracht wird. Diese These wird im nächsten Abschnitt untersucht.

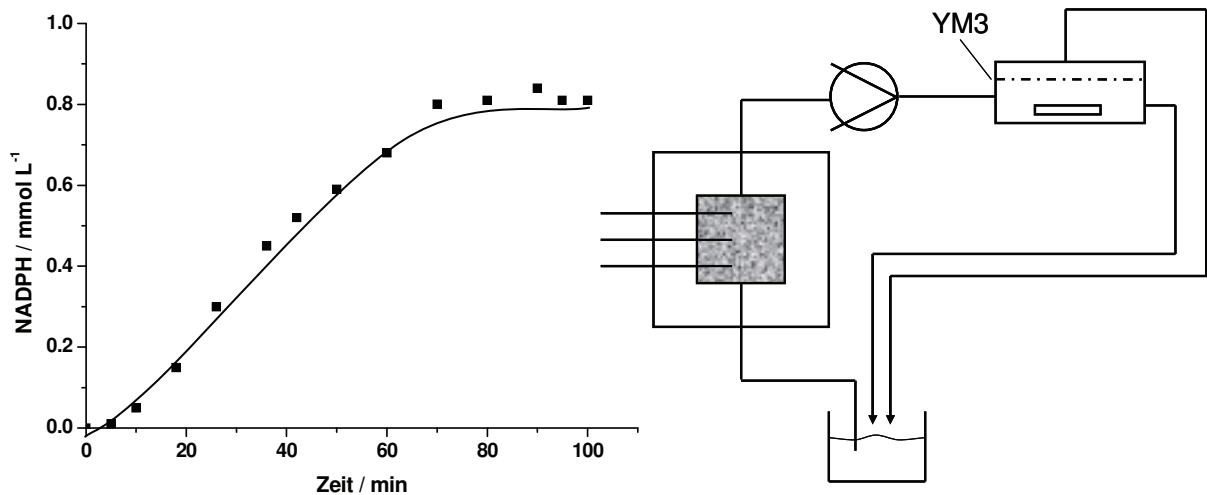


Abbildung 80: NADPH-Bildung mit Polymermediator im optimierten Reaktor

Reaktionsbedingungen: 70 mL 100 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7; 0,2 mmol L⁻¹ Rh(PEG₆₀₀₀bpy); 0,8 mmol L⁻¹ NADP⁺,
-750 mV vs. Ag|AgCl; 1 g PEG_{10.000}; Umpumpgeschwindigkeit 400 mL h⁻¹

7.3 Kontinuierliche NADPH-Bildung durch Polymermediator

Um die Langzeitstabilität des neuen Polymermediators zu überprüfen, wurde der Reaktor aus 7.2 erweitert, um ein kontinuierliches Reaktorkonzept zu ermöglichen. Wie Abbildung 81 verdeutlicht, wurde der Reaktor um zwei Pumpen ergänzt, die frische Substratlösung hinzupumpen, beziehungsweise Produktlösung aus dem System entfernen.

In den Abschnitten 6.5 und 6.6 wurden die hervorragenden Retentionen der Polymermediatoren und das geringe Maß an Rhodiumverlust durch Ausbluten beschrieben. Mit diesem Reaktoraufbau sollen diese Ergebnisse untermauert werden.

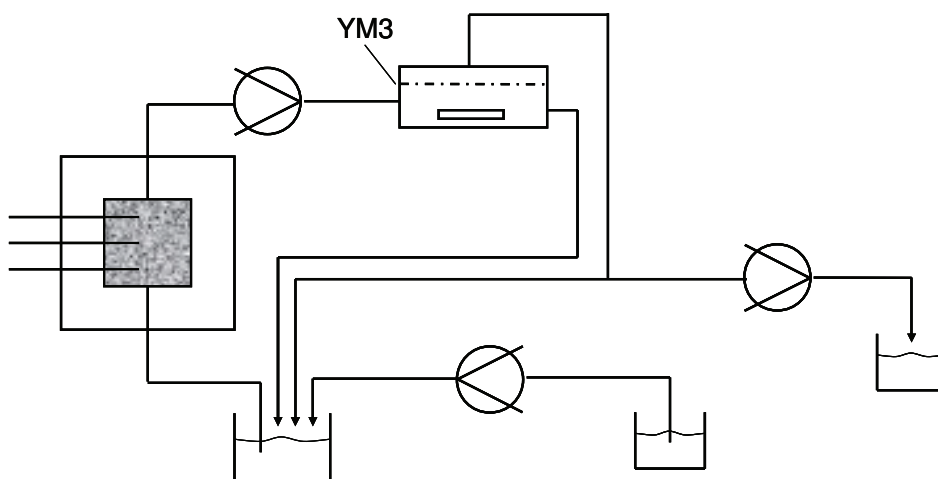


Abbildung 81: kontinuierliche Produktion von NADPH im modifizierten optimierten Reaktor

Wie aus Abbildung 82 hervorgeht, zeigte der Mediator eine hervorragende Langzeitstabilität. Nachdem nach sechs Verweilzeiten ein Umsatzeinbruch beobachtet werden konnte und Mediator nachdosiert wurde, war es möglich, den Reaktor über einen Zeitraum von 166 h oder 33 Verweilzeiten zu betreiben. Dabei waren Umsätze von bis zu 70 Prozent möglich. Die Umsatzschwankungen können bisher nicht erklärt werden, eventuell spielen hier Adsorptionseffekte des Mediators an der Elektrode und der Membran eine Rolle, die wechselnde effektive Mediatorkonzentrationen bewirken.

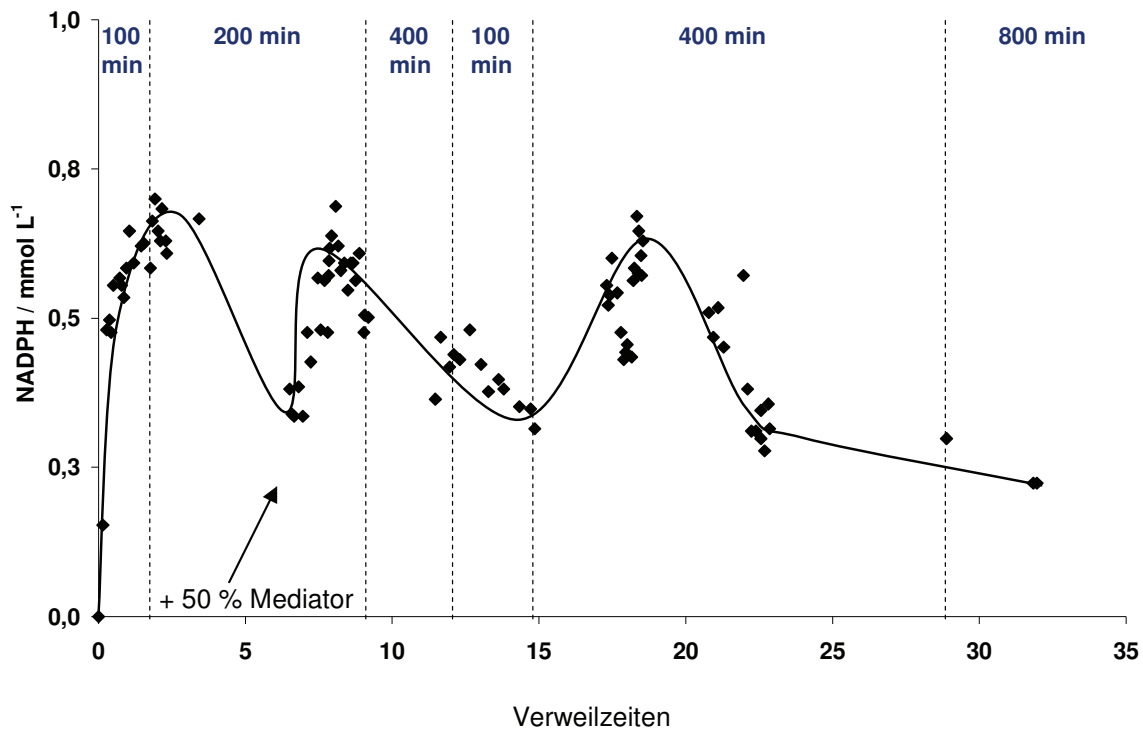


Abbildung 82: Konzentrationsverlauf bei der kontinuierlichen Produktion von NADPH

Reaktionsbedingungen: 70 mL 100 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7; 0,2 mmol L⁻¹ Rh(PEG₆₀₀₀bpy); 1 mmol L⁻¹ NADP⁺,
-800 mV vs. Ag|AgCl; 1 g PEG_{10.000}; Umpumpgeschwindigkeit 400 mL h⁻¹

Um die Ergebnisse einzuschätzen, werden sie in Tabelle mit den Ergebnissen von Spika verglichen, die in ihrer Dissertation vergleichbare Polymermediatoren beschreibt (vergleiche 6.3.1.1).

Tabelle 8: Vergleich der Reaktorkennzahlen von Kapitel 7.3 und (Spika 1994)

Kennzahl	Spika	Hildebrand
Umsatz / %	27	70
<i>t_{tn}</i> (Mediator)	7	59
Verweilzeiten	12	33
Reaktorlaufzeit / h	50	166
Produktivität / g L ⁻¹ d ⁻¹	2	10

Es wird deutlich, dass die Kombination des optimierten Mediators mit der dreidimensionalen Zelle eine deutliche Verbesserung der Reaktorkennzahlen gegenüber den bisher in der Literatur beschriebenen Ergebnissen darstellt. Die Produktivität konnte mit $10 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ um das Fünffache gesteigert werden. Vor allem aber ist die Mediatoreffizienz mit $ttn = 59$ deutlich höher.

7.4 Enzymankopplung

Nach der eingehenden Charakterisierung des Polymermediators soll nun die Anbindung der Cofaktorregenerierung an die Enzymreaktion erfolgen. Die bisherigen Experimente haben deutlich gezeigt, dass der Polymermediator durch den Einsatz einer Membran hervorragend zurückgehalten werden kann. Es sollte also möglich sein, den Kontakt zwischen Enzym und Mediator, welcher zur Inaktivierung führt, zu vermeiden. Um das Enzym zurückzuhalten, kommen zwei Möglichkeiten in Frage. Entweder das Enzym wird ebenfalls durch eine Membran zurückgehalten und so aus dem Mediatorkreislauf ferngehalten, oder es wird auf einem Träger immobilisiert, wie in 4.3.1 beschrieben. Die Membranrückhaltung ist insofern vorteilhaft, weil sie generell für jedes Enzym einsetzbar ist und die Nachdosierung von Enzym möglich ist. Allerdings ist hier eine weitere Pumpe nötig, die das Permeat des Mediatorkreislaufs durch den zweiten Membranreaktor pumpt. Erste Experimente zeigten, dass es experimentell anspruchsvoll ist, diese Pumpe derart zu regeln, dass Fluktuationen im Permeatstrom nicht zu Druckspitzen vor der Membran und zur Verblockung mit Protein führen. Weil außerdem davon auszugehen ist, dass Enzymnachdosierung unnötig ist, da das Immobilisat eine hervorragende Stabilität zeigt, wurde stattdessen die auf Sepabeads® immobilisierte *Lb*-ADH verwendet (siehe Abbildung 83). Damit kann auf die zweite Membran und die zweite Pumpe verzichtet werden, außerdem kann durch die Säule aus Immobilisat das Reaktorvolumen kleiner gehalten werden als durch einen zweiten Membranreaktor. Dies führt zu höheren Produktivitäten, da für die Produktivität das Verhältnis aus Elektrodenraum zu Gesamtreaktor möglichst groß sein muss.

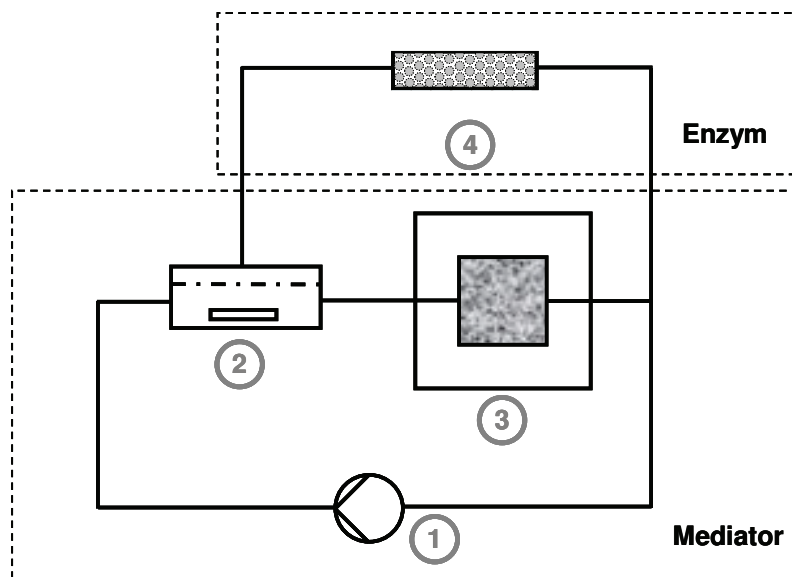


Abbildung 83: Reaktorschema des optimierten Reaktors mit Ankopplung der Enzymreaktion
(1) Pumpe; (2) Membranreaktor; (3) 3D-Zelle; (4) Enzym

Das Immobilisat wird in einer Säule an die Permeatseite des Membranreaktors angeschlossen. Durch die Beschaffenheit der Sepabeads® ist es möglich, das Permeat ohne Druckverlust durch das Bett aus Immobilisat zu leiten, ohne dass hier eine Pumpe notwendig wäre.

Als Enzymreaktion wurde die Reduktion von para-Chlor-Acetophenon zu para-Chlor-(*R*)-Phenylethanol untersucht.

Wie in Abbildung 84 gezeigt, ist die Kopplung der elektrochemischen Reaktion mit der Enzymreaktion erfolgreich. Eine lineare Produktbildung kann beobachtet werden, ein klares Zeichen dafür, dass der elektrochemische Schritt geschwindigkeitsbestimmend ist.

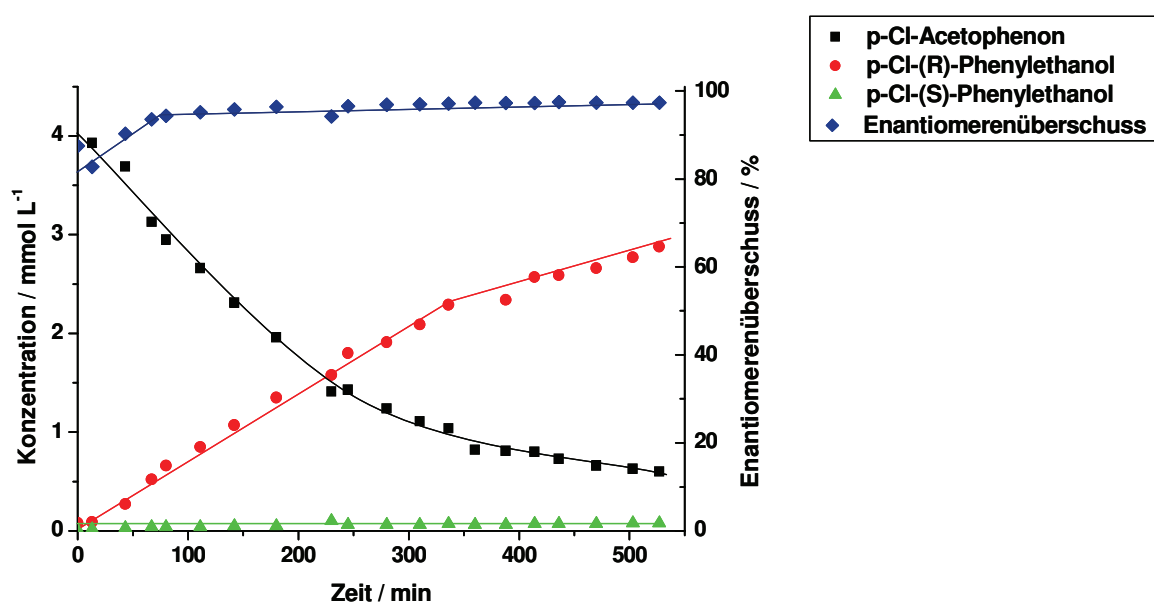


Abbildung 84: Konzentrationsverläufe im optimierten Reaktor zur Synthese von para-Chlor-(*R*)-Phenylethanol unter elektrochemischer Cofaktorregenerierung

Reaktionsbedingungen: 100 mL 100 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7; 3 mmol L⁻¹ MgCl₂; 4 mmol L⁻¹ para-Chlor-Acetophenon; 0,1 mmol L⁻¹ Rh(PEG₆₀₀₀bpy); 1 mmol L⁻¹ NADP⁺, -800 mV vs. Ag|AgCl; 0,5 g PEG_{10.000};
Umpumpgeschwindigkeit 400 mL h⁻¹

Es ist eindeutig, dass die Gesamtreaktion durch die räumliche Trennung von Mediator und Enzym erheblich an Stabilität gewinnt. Der Reaktor konnte für etwa 10 Stunden betrieben werden, während die Verwendung von niedermolekularem Rh(bpy) bereits nach höchstens einer Stunde zu vollständigem Aktivitätsverlust von Mediator oder Enzym führte. Für etwa sechs Stunden fand eine lineare Produktbildung statt, deren Geschwindigkeit 0,42 mmol L⁻¹ h⁻¹ (1,56 g L⁻¹ d⁻¹) betrug. Anschließend konnte eine geringere Produktbildung beobachtet werden. Dies ist allerdings nicht auf eine Inaktivierung zurückzuführen, da zu diesem Zeitpunkt noch über 80 % Mediatoraktivität vorhanden waren (Bestimmung mit Formiat). Stattdessen kann nun beobachtet werden, wie sich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt von der elektrochemischen Regenerierung hin zur

Substratverfügbarkeit verschiebt. Im stationären Zustand enthielt das Permeat etwa $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ NADPH. Sobald die Substratkonzentration unter diesen Wert fiel, wie dies nach etwa 6 h der Fall war, kann nicht mehr das gesamte NADPH durch das Enzym verbraucht werden, da zuwenig para-Chlor-Acetophenon vorlag. Stattdessen kam es zu einer Akkumulation an NADPH und die Gesamtreaktionsrate wurde durch die Geschwindigkeit bestimmt, mit der das verbliebene Substrat zum Enzym transportiert wurde.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die räumliche Trennung und den Erhalt von Mediator- und Enzymaktivität der Enantiomerenüberschuss auf hohem Niveau gehalten werden kann. Die Produktlösung hatte einen ee von über 97,3 %.

Die Aktivität des Enzyms blieb im Laufe der Elektrolyse vollständig erhalten. Es konnte nach Abschluss der Reaktion leicht wiedergewonnen und für weitere Anwendungen eingesetzt werden.

Auch die Mediatoreffizienz profitiert von der Membranrückhaltung. Basierend auf der Tatsache, dass zu Versuchsende noch 86 % Mediatoraktivität vorhanden waren, wurde eine Mediatoreffizienz von $ttn(\text{Mediator}) = 214$ erzielt. Zusätzlich zu der enormen Steigerung der Mediatoreffizienz hat die Membranretention den weiteren Vorteil, dass im Permeatfluss Rhodium-freie Produktlösung vorliegt, was die Aufarbeitung vereinfacht.

7.5 Abschätzung der maximalen Produktivität

Die enzymatische Ketonreduktion unter elektrochemischer Cofaktorregenerierung ist ein komplexes Reaktionssystem aus mehreren Teilreaktionen. Um bessere Aussagen über die idealen Katalysatorkonzentrationen und die maximal möglichen Produktivitäten treffen zu können, ist eine detaillierte kinetische Charakterisierung aller Teilreaktionen erforderlich. Da aber vor allem die Aktivierung des Mediators aus einer Vielzahl von Teilschritten besteht (Ref Spika), geht diese Charakterisierung weit über den Rahmen dieser Arbeit hinaus.

Es soll aber dennoch gezeigt werden, dass eine Abschätzung der kinetischen Parameter unter Berücksichtigung literaturbekannter Daten und den Erkenntnissen aus dieser Arbeit bereits Aussagen über Limitierungen und maximale Produktivitäten erlaubt.

Wie bereits erwähnt, zeigen Enzyme Wechselzahlen im Bereich von Tausenden pro Stunde. Die Michaeliskonstanten für typische Substrate liegen dabei im Bereich von mmol pro Minute , für Cofaktoren sogar noch geringer ($K_M(\text{NADPH}) = 30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Einerseits kann also mit sehr geringen Enzymkonzentrationen gearbeitet werden. Da für die Hydridübertragung auch ein sehr kleiner K_M -Wert für NADP^+ am Mediator berichtet wurde ($K_M = 9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ berichtet (Lit Hollmann)), kann auch die Cofaktorkonzentration auf Werte im mikromolaren Bereich reduziert werden, ohne die Produktivität zu beeinflussen.

Die elektrochemische Reaktion von der Mediatoraktivierung bis zur Elektronenübertragung auf den Cofaktor verläuft hingegen deutlich langsamer. Dabei gibt es drei möglicherweise limitierende

Reaktionsschritte, allerdings ist eine eindeutige Identifizierung des reaktionsbestimmenden Schrittes nicht ohne weiteres möglich.

- die elektrochemische Aktivierung an der Elektrodenoberfläche,
- die Aufnahme eines Protons zur Bildung des Hydridkomplexes,
- die Hydridübertragung auf den Cofaktor.

Die Untersuchungen zur katalytischen Aktivität der neu entwickelten niedermolekularen Mediatoren in Kapitel **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** deuten darauf hin, dass unter CV-Bedingungen der heterogene Ladungstransfer nicht limitierend ist, denn alle Mediatoren zeigen identische Geschwindigkeiten bei der Elektronenaufnahme an der Elektrodenoberfläche (siehe Abbildung 37). Steht also ein genügendes Maß an Elektrodenoberfläche zur Verfügung, so ist dieser Schritt vermutlich auch unter Reaktionsbedingungen nicht limitierend.

Unter den Bedingungen der Zyklischen Voltammetrie war entweder die Aufnahme des Protons oder die Hydridübertragung geschwindigkeitsbestimmend. Eine genauere Unterscheidung ist aus den vorhandenen Daten nicht möglich, es bleibt aber festzustellen, dass der Schritt der Cofaktorregenerierung die Gesamtreaktion limitiert.

Die höchste Wechselzahl, die unter Reaktionsbedingungen für die Cofaktorregenerierung erzielt wurde, beträgt 113 h^{-1} (siehe Tabelle 3). Für den Standardmediator konnten 33 h^{-1} erzielt werden. Verwendet man nun den polymervergrößerten Mediator, so ist bekannt, dass die elektrochemische Aktivierung durch sterische Hinderung auf etwa ein Viertel sinkt. Weiterhin soll angenommen werden, dass die kinetischen Parameter der Protonenaufnahme und der Hydridübertragung weitgehend unverändert bleiben. Da die Reaktionspartner H_3O^+ und NADP^+ in ihrer Größe unverändert bleiben, scheint diese Annahme gerechtfertigt. Damit sollte für den Polymermediator eine maximale Wechselzahl von etwa 8 h^{-1} erreicht werden können. Dieser Wert wird unter Reaktionsbedingungen bereits fast erreicht, wie die Wechselzahl von 4 h^{-1} bei der Synthese von NADPH unter Satzreaktorbedingungen beweist (siehe Abbildung 80).

Unter der Annahme, dass die Elektrodenoberfläche nicht limitierend ist, kann die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit also nur durch eine Erhöhung der Mediatorkonzentration erzielt werden. Während der niedermolekulare Mediator hervorragend wasserlöslich ist, konnte die Löslichkeit des Polymermediators in Pufferlösung auf etwa 2 mmol L^{-1} bestimmt werden (siehe Abbildung 74). Damit ist eine maximale Wechselzahl von 16 h^{-1} und eine maximale Aktivität von $0,27 \text{ U mL}^{-1}$ erreichbar. Die maximale Produktivität beträgt also bei maximaler Mediatorkonzentration $16 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Diese Abschätzung erscheint plausibel, wenn man die im optimierten Reaktor erzielte Produktivität von $0,42 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ Mediator mit der berechneten maximalen Produktivität von $0,8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ vergleicht. Dass dieser Wert nicht erreicht wird, liegt vermutlich an apparativen Limitierungen, so kann etwa der Massentransfer über die Membran die Reaktionsgeschwindigkeit vermindern.

7.6 Zusammenfassung

Um die gegenseitige Inaktivierung von Mediator und Enzym zu verhindern, musste einerseits der Mediator polymergebunden werden, andererseits musste aber auch ein angepasstes Reaktorkonzept entwickelt werden, das die räumliche Trennung der Katalysatoren ermöglicht. Die Entwicklung eines solchen Konzepts wurde in diesem Kapitel beschrieben. Der Mediator wird in einem Kreislauf zurückgehalten und reduziert hier den verbrauchten Cofaktor. Der Cofaktor kann unter Retention des Mediators über die Membran abgetrennt und durch ein Bett aus Enzymimmobilisat geleitet werden, wo er in der Ketonreduktion verbraucht wird. Das optimierte Reaktorkonzept ist komplexer als der bisher verwendete Satzreaktor. Aber sowohl die höhere Ausnutzung der Katalysatoren als auch der beträchtliche Zugewinn an Laufzeit und Stabilität rechtfertigen diese Modifikationen.

- ❖ Der Einsatz einer 3D-Zelle ermöglicht eine einfache Einbindung des elektrochemischen Reaktionsschritts in den Reaktor. Die große Elektrodenoberfläche ist dabei von entscheidender Bedeutung für die Produktivität.
- ❖ Die entwickelten Polymermediatoren sind unter Reaktorbedingungen aktiv.
- ❖ Bei der kontinuierlichen Produktion von NADPH konnten Produktivitäten bis zu $10 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ erreicht werden, die Mediatoreffizienz erreichte $ttn = 59$.
- ❖ Bei Ankopplung einer Enzymreaktion durch ein Immobilisat von *Lb*-ADH auf Sepabeads® konnte der Beweis erbracht werden, dass das Reaktionssystem bei räumlicher Trennung von Mediator und Enzym erheblich stabiler ist und sehr viel höhere Katalysatoreffizienzen erreicht werden können. Bei einer Produktivität von $0,42 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ konnte eine maximale Mediatoreffizienz von $ttn = 214$ erzielt werden. Es konnte kein Verlust an Enzymaktivität beobachtet werden und die Nebenreaktion wurde effektiv unterdrückt.
- ❖ Eine Abschätzung der maximalen Produktivität ergab $0,8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ Mediator und $16 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bei maximaler Mediatorkonzentration.

8 Diskussion und Ausblick

Im Zuge dieser Arbeit wurde das Reaktionssystem der elektrochemischen Cofaktorregenerierung in Verbindung mit einer enzymatischen Reaktion eingehend untersucht. In den bisherigen Anwendungen konnte zwar die generelle Anwendbarkeit des Systems bewiesen werden, allerdings waren die präparativen Elektrolysen geprägt von schwankendem und geringem Umsatz und hohem Katalysatorbedarf. Um eine sinnvolle Alternative zu den etablierten Verfahren der Cofaktorregenerierung darzustellen, mussten Fortschritte bei der Katalysatorausnutzung und der Robustheit des Systems, also den Reaktorlaufzeiten und den erzielten Umsätzen, erreicht werden.

Dies war das Ziel dieser Arbeit. Das Reaktionssystem der präparativen Ketonreduktion unter elektrochemischer Cofaktorregenerierung wurde eingehend charakterisiert und die limitierenden Faktoren bestimmt. Dabei wurde deutlich, dass eine unerwünschte Nebenreaktion zwischen dem Enzym und dem Mediator auftritt, die beide Katalysatoren inaktiviert. Dieser Effekt war zwar schon literaturbekannt, allerdings beschränkten sich bisherige Lösungsansätze lediglich auf eine Anpassung der Reaktionsbedingungen. Durch eingehende Untersuchung der Inaktivierung konnte nun aber das Inaktivierungsphänomen detailliert charakterisiert und ein größeres Verständnis des Reaktionssystems erzielt werden. Die limitierende Wechselwirkung zwischen Mediator und Enzym ist auf die Reaktion der drei Aminosäuren Cystein, Histidin und Tryptophan mit dem Rhodiumkomplex zurückzuführen, wobei sowohl der Mediator inaktiviert wird als auch das Enzym seine katalytische Aktivität verliert (siehe 5.1 und Abbildung 85).

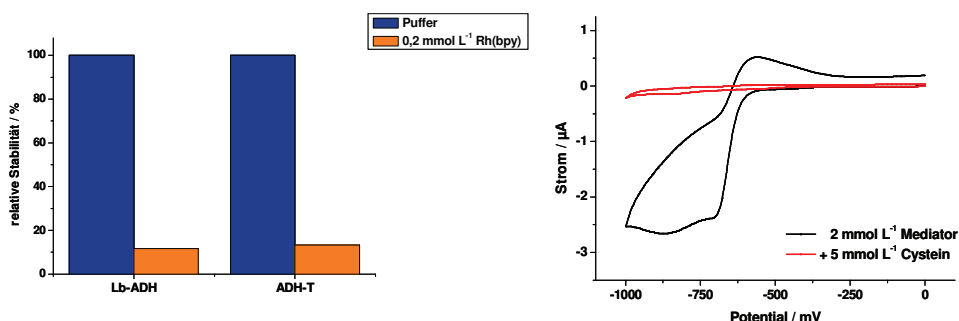


Abbildung 85: geringe Enzymstabilität in Gegenwart von Mediator (siehe 3.3.1) und Mediatorinaktivierung durch Aminosäuren (siehe 5.1)

Wie bereits in Kapitel 4.1 gezeigt wurde, kann zwar durch geeignete Variation der Versuchsparameter die Lagerstabilität des Enzyms in Gegenwart des Mediators erhöht werden. Dies geschieht beispielsweise durch Absättigung der Koordinationssphäre des Mediators durch weitere Bestandteile der Reaktionsmischung. Während der Reaktion muss aber eine freie Koordinationsstelle am Mediator vorhanden sein, damit das Hydridion gebildet werden kann (siehe 3.2.2.1). Während der katalytischen Wirkung ist also kein Schutz durch Additive möglich und somit die Verwendung von Additiven oder bestimmten Puffern lediglich eine kaum hilfreiche Behandlung der Symptome.

Die einzige Möglichkeit zur Vermeidung der gegenseitigen Inaktivierung stellt die räumliche Trennung von Enzym und Mediator dar. Eine Immobilisierung des Mediators wird ausgeschlossen, da er weiterhin in Kontakt mit der Elektrodenoberfläche treten muss. Somit ist eine Vergrößerung des Molekulargewichts durch Anbindung an ein wasserlösliches Polymer nötig.

Nach Anbindung der Bipyridineinheit an Grundgerüste aus Polyacrylsäure oder Polyethylenglykol und anschließender Komplexierung (siehe Abbildung 86) wurden diese Polymermediatoren in ihrer Aktivität und Membranretention charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Anbindung an ein Grundgerüst aus PEG höhere Aktivitäten ergab und außerdem eine hervorragende Retention an einer Ultrafiltrationsmembran möglich war. Weiterhin war die Bindung zwischen Rhodium-Zentrum und polymergebundenem Liganden sehr stark, sodass ein Ausspülen des Edelmetalls unter kontinuierlichen Bedingungen nur von untergeordneter Bedeutung war.

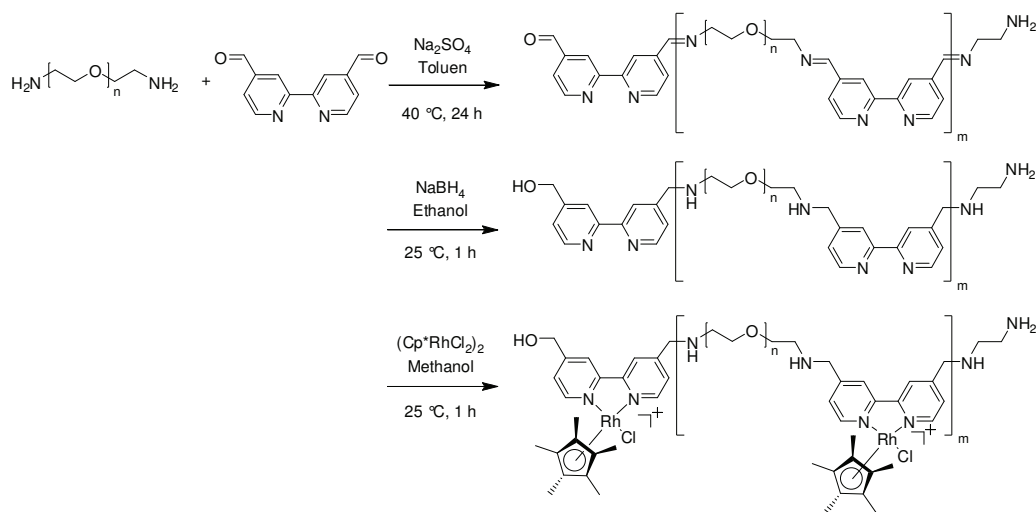


Abbildung 86: Synthese des PEG-angebundenen Mediators

Diese PEG-Mediatoren wurden dann in einem optimierten Reaktor eingesetzt. Hier gelang es, den Mediator in einem Kreislauf zurückzuhalten, in dem er in einer optimierten elektrochemischen Zelle aktiviert wurde und in dem er im *cross-flow*-Modus an einer Membran vorbeigespült wurde. Der reduzierte Cofaktor konnte durch die Membran treten und gemeinsam mit dem Substratketon mit dem immobilisierten Enzym reagieren. Der nun oxidierte Cofaktor wurde gemeinsam mit dem entstandenen Produkt für einen weiteren Reaktionszyklus in den Mediatorkreislauf zurückgeleitet (siehe Abbildung 87).

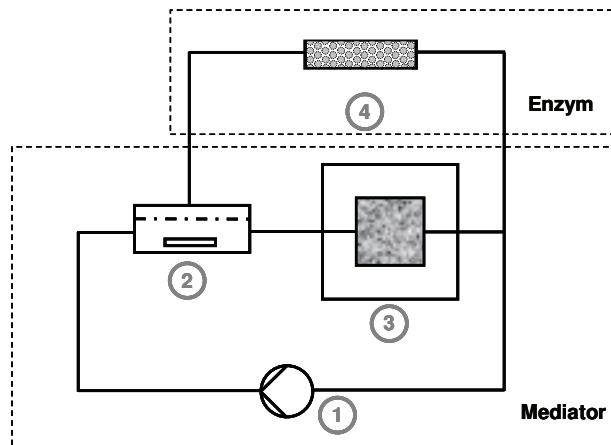


Abbildung 87: Fließschema optimierter Reaktor

Diese erfolgreiche räumliche Trennung von polymervergrößertem Mediator und Enzym hatte einen großen Einfluss auf die Robustheit des Prozesses. Während bei dem herkömmlichen Ansatz, bei dem alle Reagenzien gemeinsam in einem Reaktorraum vorlagen, die Katalysatoren innerhalb einer Stunde vollständig inaktiviert wurden, konnte der neue Reaktortyp für deutlich längere Zeiträume betrieben werden, wobei annähernd vollständiger Umsatz mit hervorragender Enantioselektivität gelang. Wie Abbildung 88 verdeutlicht, konnte die Nebenreaktion durch die konstant hohen Aktivitäten von Mediator und Enzym effektiv unterdrückt werden. Am Ende der Elektrolyse wurde das immobilisierte Enzym ohne Aktivitätsverlust wiedergewonnen, die verbleibende Mediatoraktivität lag noch bei über 80 %.

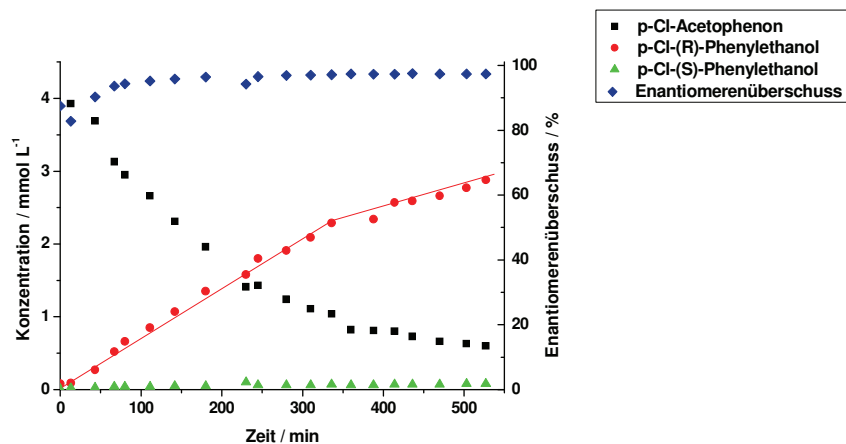


Abbildung 88: optimierter Reaktor

Die in Kapitel 5 aufgestellte Hypothese, dass die Inaktivierung und die kurzen Reaktorlaufzeiten durch räumliche Trennung von Enzym und Mediator vermieden werden können, ist also eindrucksvoll bestätigt worden.

Nachdem nun die Inaktivierung als limitierender Faktor des Prozesses identifiziert und behoben wurde, können in Zukunft andere Aspekte des Prozesses eingehender untersucht und optimiert werden. Die hohen Stabilitäten von Mediator und Enzym ermöglichen nun, in zukünftigen Arbeiten

noch stärker den Aspekt der Produktivität zu behandeln (Ruinatscha *et al.* 2006). Es gibt bereits einige Ansätze, wie eine weitere Steigerung der Produktivität möglich ist.

Als erstes kann eine konsequente Weiterentwicklung der Polymermediatoren höhere katalytische Aktivitäten ermöglichen. Denkbar wäre beispielsweise der Einsatz modifizierter Stern-Polymere, bei denen im Gegensatz zu den Blockpolymerisaten die katalytischen Einheiten nicht in die Kette eingebaut sind, sondern exponiert an den Kettenenden liegen, wo sie leichter in Kontakt mit der Elektrodenoberfläche treten können. Die hohe Verzweigung würde dabei ein günstigeres Verhältnis von Rhodiumzentren zu Molekulargewicht bieten als lineare Polymere.

Als einzig denkbare Alternative zur Polymeranbindung könnte eine Anbindung des Mediators an die Elektrodenoberfläche möglich sein. Dieser Prozess setzt aber bisher ein hohes Maß an experimentellem Aufwand in der Präparation der Elektrode voraus, das in keinem Verhältnis zu den überaus geringen Aktivitäten steht, die bisher erzielt wurden. Auch die Langzeitstabilität derart modifizierter Elektroden ist bisher gering (Geneste und Moinet 2006; Geneste *et al.* 2005; Geneste *et al.* 2002). Deshalb ist der Ansatz der Elektrodenmodifikation bisher nur in der Sensortechnik hilfreich, wo eine Miniaturisierung gewünscht ist und nur geringe Reaktionsraten auftreten. Für einen präparativen Ansatz müssten hier signifikante Zugewinne in Aktivität, Belegungsdichte und Prozessstabilität erreicht werden.

Als zweites könnte das entwickelte Reaktormodell optimiert werden. Dabei muss in Hinblick auf hohe Produktionsraten vor allem das Verhältnis zwischen Elektrodenoberfläche und Gesamtreaktor maximiert werden. Eventuell wäre es denkbar, die Membranabtrennung direkt in die elektrochemische Zelle zu integrieren. Dabei muss allerdings einerseits darauf geachtet werden, dass trotz hoher Permeatflüsse der Mediator nicht gegen die Membran gespült wird, wo er katalytisch nicht mehr aktiv sein kann. Außerdem bleibt die Gasentwicklung an der Gegenelektrode, die ein Hindernis bei Arbeiten unter Überdruck darstellt. Auch die Erhöhung des Permeatflusses durch Einsatz einer größerporigen Membran sollte zu schnellerer Produktbildung führen, da der reduzierte Cofaktor effizienter zum Enzym transportiert werden kann. Die Retentionsmessungen in Kapitel 6.5 geben schon einen Hinweis darauf, dass auch eine Ultrafiltrationsmembran mit einem *cut-off* von 10 kDa den Mediator noch sehr gut zurückhält.

Für die Umsetzung von hydrophoben Substraten wäre es außerdem von Vorteil, ein Zweiphasensystem zu etablieren, bei dem die zweite Phase als Substratreservoir dient und Produkt aus der Lösung extrahiert (Eckstein *et al.* 2004a; Eckstein *et al.* 2004b; Villela *et al.* 2003). Die generelle Verwendbarkeit eines solchen Systems wurde bereits gezeigt (Hildebrand und Lütz 2007; Höllrigl *et al.* 2007), aber bisher ohne die nun gewonnenen Erkenntnisse über die Inaktivierung. Als zweite Phase kämen entweder organische Lösemittel oder Ionische Flüssigkeiten in Betracht, wobei letztere den Vorteil hätten, dass die anteilig in die wässrige Phase übergehenden Lösemittelmoleküle zur Leitfähigkeit des Systems beitragen, während organische Lösemittel der Leitfähigkeit abträglich wären (Lütz 2004).

9 Zusammenfassung

9.1 Charakterisierung des Reaktionssystems

- ❖ Das Reaktionssystem der untersuchten elektroenzymatischen Synthese besteht aus einer Enzymreaktion, bei der unter Verbrauch des Cofaktors NADPH ein prochirales Keton zu einem chiralen Alkohol umgesetzt wird, und einer elektrochemischen Reaktion, bei der ein Rhodiummediator zwei Elektronen von der Elektrode als Hydrid auf den verbrauchten Cofaktor überträgt und ihn so regeneriert.
- ❖ Das System wird durch eine Inaktivierung limitiert, bei der Mediator und Enzym miteinander unter Aktivitätsverlust reagieren, was unselektive Nebenreaktionen begünstigt, die den Enantiomerenüberschuss der Gesamtreaktion verringern. Durch zykovoltammetrische Untersuchungen konnte bewiesen werden, dass diese Inaktivierung durch Reaktion des Mediators mit den Aminosäuren Cystein, Histidin und Tryptophan des Enzyms geschieht.
- ❖ Weil die Inaktivierung an der freien Koordinationsstelle des Mediators stattfindet, kann sie nicht durch Variation der Versuchsbedingungen oder Additive verhindert werden. Stattdessen kann die Inaktivierung nur vermieden werden, wenn Enzym und Mediator räumlich voneinander getrennt reagieren. Zu diesem Zweck wurde der Mediator durch Polymeranbindung in seinem Molekulargewicht derart vergrößert, dass er durch eine Ultrafiltrationsmembran zurückgehalten werden kann.

9.2 Synthese und Charakterisierung eines Polymermediators

- ❖ Zur Molekulargewichtsvergrößerung des Mediators wurde ein Blockpolymerisat entwickelt, bei dem Polymerblöcke und Bipyridin-Einheiten kettenförmig aneinandergebunden sind, um so hohe Katalysatordichten zu erzielen. Die Anbindung erfolgte über eine Polykondensation eines amino-funktionalisierten PEG-Moleküls und dem 4,4'-Aldehyd-Derivat von 2,2'-Bipyridin.
- ❖ Es konnten elektrochemische Aktivitäten von 26 % im Vergleich zum niedermolekularen Mediator gefunden werden.
- ❖ Die Mediatoren zeigten Retentionen von bis 99,9 % an einer Ultrafiltrationsmembran mit einem cut-off von 3 kDa.

9.3 Optimiertes Reaktorkonzept

- ❖ Es wurde ein Reaktorkonzept entwickelt, das die Trennung von Enzym und Polymermediator ermöglicht. Ein Umlaufreaktor aus elektrochemischer Zelle und Membranreaktor erlaubte die Aktivierung und Retention des Mediators. Das im Permeatstrom enthaltene NADPH wurde durch ein Bett aus Enzymimmobilisat geleitet, wo die Produktionsreaktion stattfand.
- ❖ Unter den optimierten Reaktorbedingungen zeigten Enzym und Mediator hervorragende Stabilitäten. Bezogen auf die verbrauchte Aktivität betrug die Mediatoreffizienz $ttn = 214$. Das Enzym konnte ohne Verlust an Aktivität wiedergewonnen werden. Die Bildungsgeschwindigkeit von para-Chlor-(*R*)-Phenylethanol aus para-Chlor-Acetophenon betrug bis zu hohen Umsätzen konstant $0,42 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($1,56 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) und verlief mit sehr guter Enantioselektivität ($ee > 97,3 \%$).

10 Material und Methoden

10.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma, München, bezogen.

Sepabeads [®]	Resindion S.R.L., Mailand, Italien
Rhodium(III)-chlorid	Umicore, Hanau
Ultrafiltrations-Membranen	YM3 / YM10 Millipore, Schwalbach
BMIM BTA	Solvent Innovations, Köln
Photometer	Shimadzu UV1601, Duisburg
Potentiostat	263 A, Princeton Applied Research, USA
Gaschromatograph	Agilent 6890N
Wechselkolbenpumpen	Pharmazia P500
3D-Zelle	mechanische Werkstätten IBT-2
NADP ⁺ / NADPH	Julich Chiral Solutions, Jülich
CV-Anlage	BAS, Kenilworth, Vereinigtes Königreich
Arbeitselektroden	Cypress Systems, Chelmsford, MA, USA
Lb-ADH, AD-T, CDX010	Julich Chiral Solutions, Jülich

10.2 Arbeitsvorschriften

10.2.1 Aktivitätsassay

Die Enzymaktivität gelöster Enzyme wird photometrisch bestimmt. Die Reaktionsmischung besteht aus 970 μL 50 mmol L^{-1} Pufferlösung pH = 7 mit 11 mmol L^{-1} Acetophenon als Substrat, 20 μL 9,5 mmol L^{-1} NADPH-Lösung und 10 μL Enzymlösung. Die Differenz der Absorption bei 340 nm nach einer Minute bei 20 °C wird bestimmt.

Die Enzymaktivität der immobilisierten Enzyme wird durch Zugabe einer definierten Menge Immobilisat zu einer Mischung aus 980 μL 50 mmol L^{-1} Pufferlösung mit 11 mmol L^{-1} Acetophenon und 20 μL 9,5 mmol L^{-1} NADPH-Lösung bestimmt. Es wird mit 400 rpm gerührt und nach bestimmten Zeitintervallen Proben genommen und gaschromatographisch bestimmt. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit wird durch lineare Regression aus der Produktbildung bestimmt.

10.2.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von Lösungen wird nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Zur Kalibrierung wird Rinderalbumin verwendet.

10.2.3 Immobilisierung auf Amino-Epoxy Sepabeads®

10.2.3.1 Adsorption

Das Trägermaterial wird mit Wasser gewaschen und 100 bis 1500 mg feuchtes Trägermaterial wird in 50 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer suspendiert. Das Enzym wird ebenfalls in Puffer gelöst und die Aktivität und Proteingehalt bestimmt. Die Enzymlösung wird zum Trägermaterial gegeben, 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt und dann über Nacht bei 4 °C gelagert. Anschließend wird das Immobilisat sorgfältig gewaschen und in Puffer aufbewahrt.

10.2.3.2 Absättigung der funktionellen Gruppen

Das Immobilisat wird für eine Stunde in 1 mol L⁻¹ Glycinlösung oder 5%iger Mercaptoethanollösung inkubiert und anschließend sorgfältig gewaschen.

10.2.3.3 Quervernetzung

Das Immobilisat wird für 20 min in Glutardialdehydlösungen verschiedener Konzentrationen inkubiert und anschließend sorgfältig gewaschen.

10.2.4 Stabilitätsmessungen

Die Enzymlösungen werden unter bestimmten Bedingungen inkubiert und regelmäßig werden Proben entnommen und die Aktivität wie oben beschrieben bestimmt. Die Stabilitäten werden unter Annahme von exponentiellem Zerfall als Halbwertszeit angegeben, der Zeit, nach der die Anfangsaktivität um 50 % gesunken ist.

10.2.5 Flussbettreaktor Sepabeads®

Als Substrat werden 16 mmol L⁻¹ Acetophenon und 100-200 mmol L⁻¹ *iso*-Propanol verwendet. Cofaktorkonzentrationen liegen zwischen 0,5 und 1,5 mmol L⁻¹ NADP⁺ oder NADPH, als Puffer wird 50 mmol L⁻¹ Phosphatpuffer pH = 7 mit 1 mmol L⁻¹ Magnesiumchlorid verwendet. Das Substrat wird mit einer Wechselkolbenpumpe in das Flussbett gepumpt (1 mL, 5cm Füllhöhe), das Immobilisat wird durch einen Minisart RC4 Filter zurückgehalten. Die Produktlösung wird von einem Fraktionssammler aufgefangen. 0,7 mg *Lb*-ADH werden auf 980 mg Träger immobilisiert.

10.2.6 Immobilisierung durch Einkapselung in ein Polyvinylalkohol-Gel

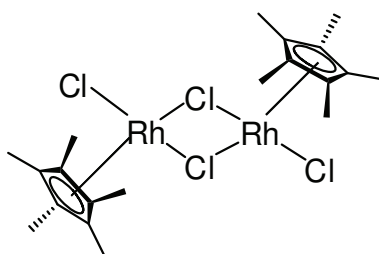
5g Polyvinylalkohol (Mowiol 10-98) 5g Polyethylenglykol 1000 werden in einem Erlenmeyerkolben in 45 mL bidestilliertem Wasser gelöst. Der Kolben wird mit Alufolie isoliert und unter ständigem Rühren

eine Stunde auf 90 °C erhitzt. Man lässt auf 30 °C abkühlen. 150 mg Natriumhydroxid werden abgewogen und in 500 µL bidestilliertem Wasser gelöst. Die NaOH-Lösung wird tropfenweise unter schnellem Rühren langsam zugegeben. Die Lösung wird für 30 Minuten gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7 eingestellt. Für etwa 23 g Immobilisat werden 20 mL Lösung mit 750 µL (150U/mL) ADH-T, 2250 µL Phosphatpuffer und 3,2 mg (0,1 mmol L⁻¹) NADP⁺ gemischt.

Die Lösung wird mit einer Multipipette in ständig gerührtes, -30 °C kaltes Silikonöl eingetropt. Die Tropfengröße beträgt dabei 50 µL. Die Kugeln werden im Silikonöl über Nacht bei 4 °C gelagert, am nächsten Tag wird auf Raumtemperatur erwärmt und die Kugeln mit Hexan gewaschen.

10.3 Synthesen

10.3.1 Di-µ-chloro-bis[(chloro)(pentymethylcyclopentadienyl)rhodium(III)]



10 g Hexamethylbicyclo[2.2.0]-hexa-2,5-dien (Hexamethyldewarbenzen) werden in 50 mL Methanol gelöst und mit 3,36 g Rhodiumchlorid-trihydrat versetzt. Es wird für 6 Stunden bei 60 °C gerührt. Nach Abkühlung wird der entstandene Feststoff abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Man erhält 1,5 g dunkelrote Nadeln (54%).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1,60 ppm S (Cp*)

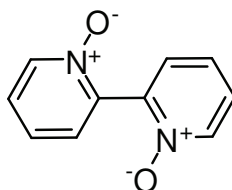
10.3.2 Synthese der Rhodium-Komplexe

Der Rhodium-Vorkomplex di-µ-chloro-bis[(chloro)(pentymethylcyclopentadienyl)rhodium(III)] wird in Methanol suspendiert und mit zwei Äquivalenten des Bipyridin-Derivats versetzt. Im Fall der niedermolekularen Bipyridine wird für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, die Reaktionsmischung filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Nach Wiederaufnahme in wenig Methanol wird der Komplex durch Zutropfen von *tert.*-Butyl-methylether zur Kristallisation gebracht.

Für die molekulargewichtsvergrößerten Komplexe wird die Reaktionsmischung für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Nach Aufnahme in Wasser wird das Produkt in einer Filtrationseinheit gespült (Membran YM3). Es folgt Gefriertrocknung.

10.3.3 Niedermolekulare 2,2'-Bipyridine

10.3.3.1 2,2'-Bipyridinyl-N,N'-dioxid (2a)



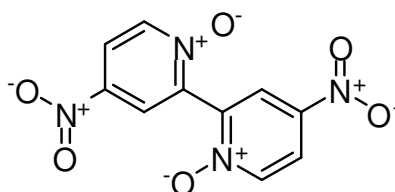
12 g 2,2'-Bipyridin werden in 14 mL Eisessig gelöst und 72 mL Peressigsäure (32 mass%) langsam hinzuge tropft, sodass die Temperatur zwischen 70 und 80 °C bleibt. Es wird cirka 66 h bei 35 °C gerührt. Die übrige Peressigsäure wird vorsichtig mit einem Überschuss Me₂S zersetzt. Das Lösemittel wird am Hochvakuum abdestilliert und der Rückstand für 3 h in Aceton unter Siedehitze erhitzt. Der entstehende Feststoff wird abfiltriert und am Hochvakuum getrocknet. Man erhält 6,6 g weißes Pulver (97%).

¹H-NMR (D₂O): δ = 8,44 ppm D J = 6,6 Hz, 2H, H6,6'; δ = 7,83 ppm Dd J = 6,8, 1,1 Hz, 2H, H3,3';

δ = 7,75 ppm M 4H, H5,5', H4,4'

¹³C-NMR(D₂O): δ = 143,4 ppm; 141,3 ppm; 133,3 ppm; 130,5 ppm; 130,1 ppm

10.3.3.2 4,4'-di-Nitro-[2,2']-Bipyridinyl-N,N'-dioxid (3a)

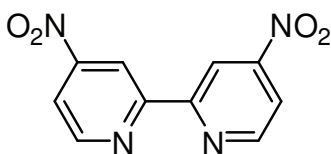


9 g [2,2']-bipyridin-N,N'-dioxid werden in 4 mL Oleum und 26 mL 96%iger Schwefelsäure gelöst und mit einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Es werden vorsichtig 10 mL rauchende Salpetersäure addiert. Die Reaktionsmischung wird für vier Stunden bei 100 °C gerührt. Es wird erneut auf 0 °C gekühlt und die Lösung vorsichtig auf 100 g Eiswasser gegossen. Aus dem entstehenden grünlichen Schlamm wird ein gelber Feststoff abfiltriert und bis zur Neutralität gewaschen. Nach Trocknen am Hochvakuum ergeben sich 4,4 g eines gelben Feststoffs (33%).

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 8,68 ppm D J = 3,4 Hz, 2H, H3,3'; δ = 8,58 ppm D J = 7,3 Hz, 2H, H6,6';

δ = 8,36 ppm Dd J = 7,3 Hz, 3,4 Hz, 2H, H5,5'

¹³C-NMR(DMSO-d₆): δ = 142,0 ppm; 141,1 ppm; 140,4 ppm; 123,7 ppm; 121,8 ppm

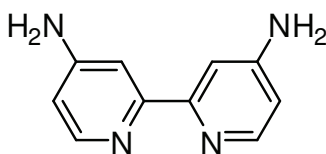
10.3.3.3 4,4'-di-Nitro-2,2'-Bipyridin (4a)

1,0 g 4,4'-Dinitro-2,2'-bipyridin-N,N'-dioxid (3,6 mmol) und 10 mL PCl_3 werden als Suspension unter Feuchtigkeitsausschluss 21 h unter Rückfluss erhitzt. Die Mischung wird abgekühlt und vorsichtig auf 90 g Eiswasser gegeben. Der pH-Wert wird mit konzentrierter Natronlauge auf pH = 13 gebracht; eine braune Suspension ergibt sich. Die Suspension wird mehrere Male mit dem gleichen Volumen an Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit CaCO_3 getrocknet. Das Lösemittel wird entfernt und ein braun-gelber Rückstand verbleibt. Umkristallisation aus Dichlormethan und Petrolether (40-60 °C) ergibt 532 mg gelbbraune Plättchen (60 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 9,21$ ppm Dd J = 2,2, 0,6 Hz, 2H, H_{3,3'}; $\delta = 9,03$ ppm Dd J = 5,3, 0,6 Hz, 2H, H_{6,6'}; $\delta = 8,12$ ppm Dd J = 5,3, 2,2 Hz 2H, H_{5,5'}

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 157,2$ ppm; 155,2 ppm; 151,7 ppm; 117,1 ppm; 114,3 ppm

Rf-Wert: 0,46 (Chloroform/Methanol/25% NH_3 (100:10:1))

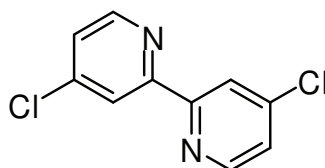
10.3.3.4 4,4'-di-Amino-2,2'-Bipyridin (5a)

1,11 g 4,4'-di-Nitro-2,2'-bipyridin-N,N'-dioxid und 1,0 g Pd/C (10%) werden in 120 mL Ethanol gegeben und mit Stickstoff entgast. Die Suspension wird unter Stickstoff bis zur Siedehitze erhitzt. Nach vollständiger Lösung des Komplexes werden 8,6 mL Hydrazinhydrat in 30 mL Ethanol über einen Zeitraum von einer Stunde tropfenweise hinzugefügt. Anschließend wird für 15 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wird heiß durch Celite filtriert. Der Rückstand wird viermal mit 30 mL kochendem Ethanol gewaschen. Entfernen des Lösemittels ergibt einen gelben Rückstand, der zermahlen in 80 mL Wasser gegeben wird und über Nacht bei 4 °C gelagert wird. Es ergibt sich ein weißer Feststoff, der abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und bei 50 °C getrocknet wird. Man erhält 0,63 g weißes Pulver (85 %).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): $\delta = 8,01$ ppm D J = 5,5 Hz, 2H, H_{6,6'}; $\delta = 7,52$ ppm D J = 2,3 Hz 2H, H_{3,3'}; $\delta = 6,43$ ppm Dd J = 5,5, 2,3 Hz 2H, H_{5,5'}; $\delta = 6,02$ ppm S 4H, NH_2

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 156,3$ ppm; 154,8 ppm; 148,7 ppm; 108,6 ppm; 105,8 ppm

Rf-Wert: 0,84 (Chloroform/Methanol/25% NH_3 (100:10:1))

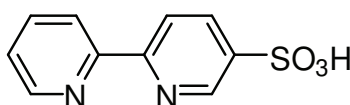
10.3.3.5 4,4'-di-Chloro-2,2'-bipyridin (6a)

3,08 g 4,4'-dinitro-[2,2']-Bipyridinyl-N,N'-dioxid werden in 60 mL Acetylchlorid gelöst und eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Es wird auf 0 °C abgekühlt und 25 mL Phosphortrichlorid werden hinzuge tropft. Es wird erneut 2 h unter Rückfluss erhitzt, dann auf 0 °C abgekühlt und vorsichtig auf 180 mL Eiswasser gegossen. Lösung wird dreimal mit 300 mL Chloroform extrahiert, auf 500 mL eingengt und mit MgSO₄ getrocknet. Entfernen des Lösemittels unter Vakuum ergibt 0,82 g blassgelbes Pulver (33 %).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 8,48 ppm D J = 5,0 Hz, 2H; δ = 8,35 ppm D J = 1,5 Hz, 2H; δ = 7,25 ppm Dd J = 5,0, 1,5 Hz, 2H

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 156,7 ppm, 150,3 ppm, 145,7 ppm, 124,7 ppm, 122,1 ppm

Rf-Wert: 0,12 (Chloroform/Methanol/25%NH₃ (100:10:1))

10.3.3.6 2,2'-Bipyridin-5-sulfonsäure (7a)

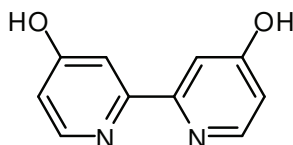
20 g 2,2'-Bipyridin werden in einem 250 mL Rundkolben vorgelegt. Es werden vorsichtig 50 mL Oleum und 0,8 g Quecksilbersulfat hinzugegeben. Es wird auf 220 °C erhitzt und anschließend die Schwefelsäure am Hochvakuum abdestilliert. Der Rückstand wird in 100 mL Wasser gelöst und 20 g Aktivkohle werden hinzugefügt. Man erhitzt für 30 min unter Rückfluss. Nach Abfiltrieren der Aktivkohle wird die Lösung durch Ammoniakzugabe basisch gemacht, nicht umgesetztes Substrat fällt aus und wird durch Extraktion mit Dichlormethan entfernt. Zur verbleibenden Lösung werden 24,6 g Tetra(n-butyl)-ammoniumbromid gegeben. Es wird dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Extrakte werden zweimal mit je 30 mL Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Man erhält einen beigen Feststoff, der in 60 mL Dichlormethan gelöst wird und mit 50 mL 47%iger Bromwasserstoffsäure versetzt wird. Nach intensiver Vermischung der Phasen wird die wässrige Phase abgetrennt und zweimal mit 20 mL Dichlormethan gewaschen. Man engt die Lösung auf 5 mL ein und gibt 25 mL kaltes iso-Propanol hinzu. Lagerung bei 4 °C über Nacht ergibt weißen Niederschlag, der mit 50 mL Methanol und 50 mL Diethylether gewaschen wird. Man erhält 5,16 g hellbraunes Pulver. Umkristallisation aus Chloroform/Petrolether ergab 4,76 g weißes Pulver (15 %).

¹H-NMR (D₂O): δ = 8,94 ppm S 1H, H₆; δ = 8,68 ppm D J = 5,5 Hz, 1H, H_{6'}; δ = 8,53 ppm T J = 7,9 Hz, 1H, H_{4'}; δ = 8,47 ppm D J = 7,9 Hz, 1H, H_{3'}; δ = 8,23 ppm D J = 8,5 Hz, 1H, H₄; δ = 8,19 ppm D J = 8,5 Hz, 1H, H₃; δ = 7,94 ppm T J = 7,9, 5,5 Hz, 1H, H_{5'}

¹³C-NMR (D₂O): δ = 150,6 ppm; 150,0 ppm; 149,5 ppm; 149,5 ppm; 144,6 ppm; 143,5 ppm; 138,8 ppm; 130,1 ppm; 127,5 ppm; 125,4 ppm

Rf-Wert: 0,88 (Chloroform/Methanol/25%NH₃ (100:10:1))

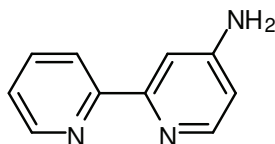
10.3.3.7 4,4'-di-Hydroxy-2,2'-bipyridin (9a)



3,5 g 4,4'-di-Methoxy-bipyridin werden in 200 mL Eisessig gelöst. 28 mL 48%ige Bromwasserstoffsäure werden addiert und die Lösung über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Man entfernt das Lösemittel und löst den Rückstand in Wasser. Nach Neutralisation mit Ammoniumhydroxid fällt ein weißer Feststoff aus, der abfiltriert und am Hochvakuum getrocknet wird. Es ergeben sich 2,08 g weißes Pulver (67 %).

Rf-Wert: 0,79 (Chloroform/Methanol/25%NH₃ (100:10:1))

10.3.3.8 4-Amino-2,2'-bipyridin (11a)



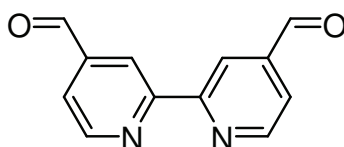
1,1 g 4-Nitro-2,2'-bipyridin-N-oxid (5,1 mmol), 200 mL Methanol und 0,23 g 10% Pd/C werden in einem Eisbad gekühlt und unter Inertatmosphäre gerührt. 2,5 g Natriumborhydrid (66 mmol) werden in kleinen Portionen hinzugefügt. Es wird gekühlt bis Gasentwicklung aufhört. Im Laufe der Reaktion geht das Edukt in Lösung. Es wird abfiltriert und das Methanol im Vakuum entfernt. 60 mL Wasser werden addiert und die wässrige Phase fünfmal mit 50 mL Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Es entsteht eine weiße Masse, die am Hochvakuum getrocknet wird. Der Rückstand wird 45 min in 200 mL Cyclohexan gekocht. Es wird abfiltriert und der Rückstand mit weiteren 25 mL Cyclohexan bis zur fast vollständigen Auflösung gekocht. Es wird erneut abfiltriert und die organischen Extrakte abgekühlt, wobei ein voluminöser Niederschlag entsteht. Abfiltrieren und Einengen der Flüssigkeit ergibt weiteres Produkt, das am Hochvakuum getrocknet wird. Alternativ dazu kann das Produkt auch mit Chloroform/Methanol/25%NH₃ (100:10:1) durch Säulenchromatographie aufgereinigt werden. Es entstehen 0,83 g farblose Nadeln (95%).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 8,64 ppm D J = 6,4 Hz 1H; δ = 8,35 ppm D J = 8,0 Hz 1H; δ = 8,27 ppm D J = 5,4 Hz 1H; δ = 7,80 ppm Ddd J = 8,0, 7,7, 1,8 Hz 1H; δ = 7,66 ppm D J = 2,4 Hz 1H; δ = 7,35 ppm Ddd J = 7,7, 4,8, 1,2 Hz 1H; δ = 6,52 ppm Dd J = 5,4, 2,4 Hz 1H; δ = 4,56 ppm br 2H

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 157,0, 156,7, 153,9, 150,0, 149,0, 136,8, 123,5, 121,3, 109,7, 107,1 ppm

Rf-Wert: 0,56 (Chloroform/Methanol/25%NH₃ (100:10:1))

10.3.3.9 2,2'-Bipyridin-4,4'-di-aldehyd



4,6 g 4,4'-di-Methyl-2,2'-bipyridin werden in 80 mL Dioxan und 2 mL Wasser gelöst und mit 11,1 g Selendioxid versetzt. Man erhitzt 24 h unter Rückfluss und filtriert dann heiß. Man wäscht sukzessive mit Dioxan und Wasser, entfernt das Dioxan im Vakuum und bringt die Lösung mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH 8. Man extrahiert dreimal mit Chloroform, trocknet die Extrakte über mit Natriumsulfat und entfernt das Lösemittel im Vakuum. Man erhält braune Kristalle, die aus Ethylacetat umkristallisiert werden. Es ergeben sich 1,38 g hellbraune Kristalle (26%).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 10,19 ppm S, 2H, CHO; δ = 8,94 ppm D J = 4,8 Hz 2H, H6,6'; δ = 8,87 ppm S 2H, H3,3'; δ = 7,77 ppm D, J = 4,8 Hz, 2H, H5,5'

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 192,4 ppm; 155,9 ppm; 150,5 ppm; 142,5 ppm; 122,3 ppm; 119,4 ppm

Rf-Wert: 0,78 (Chloroform/Methanol/25%NH₃ (100:10:1))

10.3.4 Polymervergrößerte Komplexe

10.3.4.1 Polyacrylsäure-Derivate

Für ein Polymer mit einer Belegung von 10 % werden 1074 mg Polyacrylsäurelösung (35 wt% in Wasser; MW ~ 100.000 g mol⁻¹; 10 Äquivalente) mit 100 mg 4,4'-di-Amino-2,2'-Bipyridin (1 Äquivalent) in 40 mL Methanol gelöst und mit 276 mg DMTMM (2 Äquivalente) versetzt. Es wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 100 mL Wasser versetzt. Anschließend wird durch Ultrafiltration aufgereinigt und lyophilisiert. Umsetzung mit Rhodium-Vorkomplex in Methanol und erneute Ultrafiltration mit anschließender Gefrierdrying ergab orange-gelbe Flocken.

10.3.4.2 Polyethylenglykol-Derivate

Jeweils ein Äquivalent α,ω-aminiertes Polyethylenglykol und ein Äquivalent 2,2'-Bipyridin-4,4'-di-aldehyd werden in 50 mL wasserfreiem Toluol bei 40 °C gerührt und mit 1 g wasserfreiem Natriumsulfat versetzt. Nach 24 h Reaktionszeit wird abfiltriert, das Lösemittel unter vermindertem

Druck entfernt und der Rückstand in 50 mL absolutem Ethanol aufgenommen. Es werden zwei Äquivalente Natriumborhydrid hinzugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 50 mL Wasser hinzugegeben und das Produkt an einer Ultrafiltrationsmembran aufgereinigt. Das lyophilisierte Produkt wird mit Rhodium-Vorkomplex in Methanol umgesetzt, erneut ultrafiltriert und nach anschließender Gefriertrocknung erhält man orange-gelbe Flocken.

10.4 Analytik

10.4.1 Gaschromatographie

Die Messungen von Phenylethanol und Acetophenon wurden auf einer Agilent 6890N Anlage mit einer Cyclodex β -1/P Säule (25 m x 250 μ m) und einem Wasserstofffluss von 0,2 mL min⁻¹ durchgeführt. Die Probelösung wurde bei 250 °C eingespritzt. Starttemperatur der Säule war 100 °C (für 11,5 min). Anschließend wurde die Säule in 3 min auf 180 °C erhitzt. Acetophenon wurde nach 5,7 min detektiert, (*R*)-Phenylethanol nach 9,8 min und (*S*)-Phenylethanol nach 10,5 min.

10.4.2 NMR-Spektren der Komplexe

Cp*(Rh(4,4'-di-nitro-2,2'-bpy)) (**4b**)

¹H-NMR (D₂O): δ = 9,35 ppm D J = 2 Hz 2H (H^{33'}); δ = 9,28 ppm D J = 6 Hz 2H (H^{66'}); δ = 8,57 ppm Dd J = 6 Hz, 2 Hz 2H (H^{55'}); δ = 1,65 ppm S 15H (Cp*)

¹³C-NMR (D₂O): δ = 155,8 ppm, 155,6 ppm, 154,4 ppm C / CH (C^{22'}, C^{44'}, C^{66'}); δ = 122,2 ppm CH (C^{33'}); δ = 118,3 ppm CH (C^{55'}); δ = 99,4 ppm C (Cp*); δ = 9,7 ppm CH₃ (Cp*)

Rf-Wert: 0,77 (Chloroform/Methanol/25%NH₃ (100:10:1))

Cp*(Rh(4,4'-di-amino-2,2'-bpy)) (**5b**)

¹H-NMR (D₂O): δ = 8,20 ppm D J = 6 Hz 2H (H^{66'}); δ = 7,14 ppm D J = 2 Hz 2H (H^{33'}); δ = 6,79 ppm Dd J = 6 Hz 2H (H^{55'}); δ = 1,52 ppm S 15H (Cp*)

¹³C-NMR (D₂O): δ = 160,2 ppm C (C^{22'}), δ = 150,4 ppm C (C^{44'}); δ = 144,3 ppm CH (C^{66'}); δ = 116,1 ppm CH (C^{33'}); δ = 102,4 ppm CH (C^{55'}); δ = 96,5 ppm C (Cp*); δ = 7,9 ppm CH₃ (Cp*)

Rf-Wert: 0,36 (Chloroform/Methanol/25%NH₃ (100:10:1))

Cp*(Rh(4,4'-di-chloro-2,2'-bpy)) (**6b**)

¹H-NMR (D₂O): δ = 9,35 ppm D J = 2 Hz 2H (H^{66'}); δ = 9,28 ppm D J = 6 Hz 2H (H^{33'}); δ = 8,58 ppm Dd J = 6 Hz, 2 Hz 2H (H^{55'}); δ = 1,64 ppm S 15H (Cp*)

¹³C-NMR (D₂O): δ = 155,8 ppm, 155,6 ppm CH, C (C^{22'}, C^{66'}), δ = 154,0 ppm C (C^{44'}); δ = 122,2 ppm, 118,3 ppm CH (C^{33'}, C^{55'}); δ = 99,4 ppm C (Cp*); δ = 8,0 ppm CH₃ (Cp*)

Rf-Wert: 0,58 (Chloroform/Methanol/25%NH₃ (100:10:1))

Cp*(Rh(2,2'-bpy-5-sulfonsäure)) (**7b**)

¹H-NMR (D₂O): δ = 8,98 ppm S 1H (H⁶); δ = 8,68 ppm S 1H (H³); δ = 8,45 - 8,20 ppm M 4H (H^{3'}, H⁴, H^{4'}, H^{6'}); δ = 7,86 ppm M 1H (H^{5'}); δ = 1,54 ppm S 15H (Cp*)

¹³C-NMR (D₂O): δ = 152,0 ppm C (C²), δ = 150,4 ppm CH (C⁶); δ = 146,8 ppm CH (C⁶); δ = 145,5 ppm CH (C³); δ = 140,8 ppm C (C⁵); δ = 136,2 ppm CH (C⁴); δ = 127,0 ppm C (C²); δ = 124,5 ppm CH (C⁴); δ = 122,8 ppm CH (C⁵); δ = 117,8 ppm CH (C³); δ = 98,3 ppm C (Cp*); δ = 8,0 ppm CH₃ (Cp*)

Rf-Wert: 0,69 (Chloroform/Methanol/25%NH₃ (100:10:1))

Cp*(Rh(4,4'-di-methoxy-2,2'-bpy)) (**8b**)

¹H-NMR (D₂O): δ = 8,63 ppm D J = 6 Hz 2H (H^{66'}); δ = 7,73 ppm D J = 2 Hz 2H (H^{33'}); δ = 7,27 ppm Dd J = 6 Hz, 2 Hz 2H (H^{55'}); δ = 3,95 ppm S 6H (CH₃O-); δ = 1,56 ppm S 15H (Cp*)

¹³C-NMR (D₂O): δ = 168,5 ppm, 155,6 ppm C (C^{22'}, C^{44'}), δ = 152,4 ppm CH (C^{66'}); δ = 114,2 ppm, 110,2 ppm CH (C^{33'}, C^{55'}); δ = 97,4 ppm C (Cp*); δ = 56,6 ppm CH₃ (CH₃O-); δ = 8,0 ppm CH₃ (Cp*)

Rf-Wert: 0,33 (Chloroform/Methanol/25%NH₃ (100:10:1))

Cp*(Rh(4,4'-di-hydroxy-2,2'-bpy)) (**9b**)

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 12,1 ppm bs 2H; δ = 8,57 ppm d J = 6,5 Hz 2H; δ = 7,83 ppm d J = 2,7 Hz 2H; δ = 7,21 ppm dd J = 6,5, 2,7 Hz 2H; δ = 1,62 ppm s 15H

¹³C-NMR (D₂O): δ = 165,3 ppm; δ = 153,5 ppm; δ = 150,8 ppm; δ = 113,7 ppm; δ = 109,1 ppm; δ = 93,9 ppm; δ = 6,45 ppm

Rf-Wert: 0,69 (Chloroform/Methanol/25%NH₃ (100:10:1))

Cp*(Rh(4-amino-2,2'-bpy)) (**11b**)

¹H-NMR (D₂O): δ = 8,82 ppm D J = 6 Hz 1H (H⁵); δ = 8,22 ppm M 1H (H⁵); δ = 8,10 ppm D J = 7 Hz 1H (H³); δ = 8,06 ppm D J = 7 Hz 1H (H⁴); δ = 7,68 ppm D J = 6 Hz 1H (H⁶); δ = 7,37 ppm S 1H (H³); δ = 6,84 ppm D J = 6 Hz 1H (H⁵); δ = 1,55 ppm S 15H (Cp*)

¹³C-NMR (D₂O): δ = 156,7 ppm, 154,0 ppm C (C², C²); δ = 151,4 ppm, 150,5 ppm CH (C⁶, C⁶); δ = 140,2 ppm C (C⁴); δ = 127,9 ppm CH (C⁴); δ = 122,9 ppm CH (C³); δ = 112,8 ppm CH (C⁵); δ = 108,2 ppm CH (C³); δ = 97,2 ppm CH (C⁵)

Cp*(Rh(3,3'-di-carboxy-2,2'-bpy)) (**12b**)

¹H-NMR (D₂O): δ = 8,97 ppm D J = 5 Hz 2H (H⁶⁶); δ = 8,43 ppm D J = 8 Hz 2H (H⁴⁴); δ = 7,84 ppm Dd J = 5 Hz, 7 Hz 2H (H⁵⁵); δ = 1,55 ppm S 15H (Cp*)

¹³C-NMR (D₂O): δ = 168,3 ppm C (C^{COOH,COOH}); δ = 152,7 ppm C (C²²), δ = 140,6 ppm CH (C⁶⁶); δ = 135,4 ppm CH (C⁴⁴); δ = 127,8 ppm C (C⁵⁵); δ = 113,2 ppm C (C³³); δ = 98,2 ppm CH (Cp*); δ = 8,0 ppm CH₃ (Cp*)

Rf-Wert: 0,69 (Chloroform/Methanol/25%NH₃ (100:10:1))

Cp*(Rh(4,4'-di-methyl-2,2'-bpy)) (**13b**)

¹H-NMR (D₂O): δ = 8,70 ppm d J = 6 Hz 2H (H); δ = 8,07 ppm d J = 2 Hz 2H (H'); δ = 7,57 ppm dd J = 6, 2 Hz 2H (H); δ = 2,47 ppm s 6H ()

Rf-Wert: 0,38 (Chloroform/Methanol/25%NH₃ (100:10:1))

Cp*(Rh(4,4'-di-tert.-butyl-2,2'-bpy)) (**14b**)

¹H-NMR (D₂O): δ = 8,72 ppm D J = 6 Hz 2H (H^{66'}); δ = 8,22 ppm D J = 2 Hz 2H (H^{33'}); δ = 7,75 ppm Dd J = 6 Hz, 2 Hz 2H (H^{55'}); δ = 1,56 ppm S 15H (Cp*); δ = 1,32 ppm S 18H (Cp*)

¹³C-NMR (D₂O): δ = 165,7 ppm C (C^{44'}); δ = 154,3 ppm CH (C^{22'}); δ = 151,1 ppm CH (C^{66'}); δ = 125,8 ppm, 120,8 ppm CH (C^{33'}, C^{55'}); δ = 97,7 ppm C (Cp*); δ = 35,1 ppm C (C^{tBu,tBu'}); δ = 29,4 ppm CH₃ (C^{tBu,tBu'}); δ = 8,0 ppm CH₃ (Cp*)

Rf-Wert: 0,43 (Chloroform/Methanol/25%NH₃ (100:10:1))

Cp*(Rh(4,4'-di-carboxy-2,2'-bpy)) (**15b**)

¹H-NMR (D₂O): δ = 9,00 ppm d J = 6 Hz 2H (H); δ = 8,80 ppm d J = 2 Hz 2H (H); δ = 8,15 ppm d J = 6 Hz 2H (H); δ = 1,55 ppm s 15H (H)

Rf-Wert: 0,63 (Chloroform/Methanol/25%NH₃ (100:10:1))

Cp*(Rh(5,5'-di-methyl-2,2'-bpy)) (**16b**)

¹H-NMR (D₂O): δ = 8,62 ppm D J = 7 Hz 2H (H^{33'}); δ = 7,74 ppm S 2H (H^{66'}); δ = 7,25 ppm D J = 7 Hz, 2 Hz 2H (H^{44'}); δ = 3,30 ppm S 6H (CH₃); δ = 1,57 ppm S 15H (Cp*)

¹³C-NMR (D₂O): δ = 151,2 ppm C (C^{22'}); δ = 141,0 ppm CH (C^{66'}); δ = 139,4 ppm CH (C^{44'}); δ = 122,7 ppm C (C^{55'}); δ = 97,8 ppm CH (C^{33'}); δ = 17,5 ppm CH₃ (CH₃); δ = 8,0 ppm CH₃ (Cp*)

Rf-Wert: 0,34 (Chloroform/Methanol/25%NH₃ (100:10:1))

11 Anhang: Weitere Anwendungen der Immobilisate⁴

Im Zuge dieser Arbeit wurden zwei Immobilisierungstechniken beschrieben, durch die das immobilisierte Enzym gegen die schädlichen Auswirkungen des Mediators stabilisiert werden sollte (siehe 4.3.1 und 4.3.2). Diese Bemühungen waren nicht erfolgreich. Allerdings konnten durch die Immobilisierung deutlich höhere Stabilitäten erzielt werden und im Fall der gel-stabilisierten Enzyme ist die Auswahl des Reaktionsmediums auf hydrophobe Lösemittel erweitert worden. In diesem Anhang soll die Leistungsfähigkeit der Immobilisate unter Beweis gestellt werden. Als Alternative zur elektrochemischen Cofaktorregenerierung wird der Cofaktor in diesem Fall substrat-gekoppelt regeneriert (siehe Abbildung 89). Für die auf Sepabeads[®] immobilisierte *Lb*-ADH soll die hervorragende Langzeitstabilität in einem Flussbettreaktor unter Beweis gestellt werden; die breite Anwendbarkeit von gel-stabilisierten Enzymen in verschiedenen Lösemitteln soll durch den Einsatz von gel-stabilisierter ADH-T in Ionischer Flüssigkeit verdeutlicht werden.

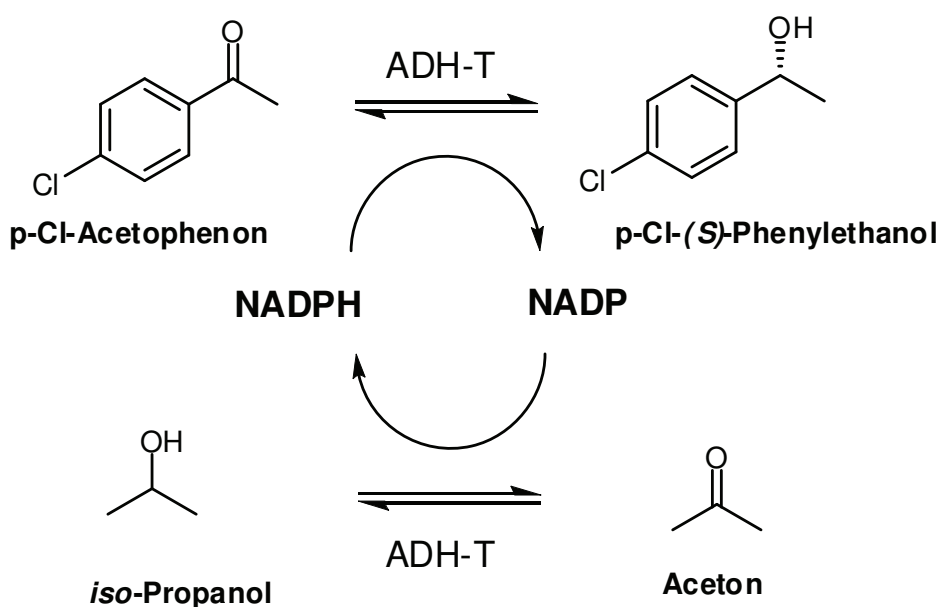


Abbildung 89: substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung mit *iso*-Propanol, am Beispiel ADH-T

⁴ Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden veröffentlicht als:

Hildebrand, F., Lütz, S. "Immobilisation of alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* and its application in a plug-flow reactor" *Tetrahedron-Asymmetry* **2006**, *17*, 3219-3225.

11.1 Sepabeads®

Das auf Sepabeads® immobilisierte Enzym zeigt keine erhöhte Stabilität gegenüber Mediator (siehe 4.3.1.5). Dennoch sollte bewiesen werden, dass sich der Stabilitätsgewinn durch die Immobilisierung nicht nur auf die Lagerstabilität beschränkt, sondern das Immobilisat auch unter Prozessbedingungen an Stabilität gewonnen hat. Das Immobilisat wurde deshalb in einem Flussbettreaktor mit substratgekoppelter Cofaktorregenerierung eingesetzt.

Dieser Reaktortyp verdeutlicht am besten die Vorteile des Immobilisats gegenüber dem gelösten Enzym. Durch die Anbindung an das Trägermaterial kann auf eine anspruchsvolle Enzymrückhaltung verzichtet werden, ein gewöhnlicher Filter reicht bereits aus, um das Trägermaterial zurückzuhalten. Dadurch kann der Reaktor ohne Druckabfall über den Reaktorraum kontinuierlich betrieben werden (siehe Abbildung 90). Als Reaktion wurde die Reduktion von Acetophenon zu (*R*)-Phenylethanol ausgewählt.

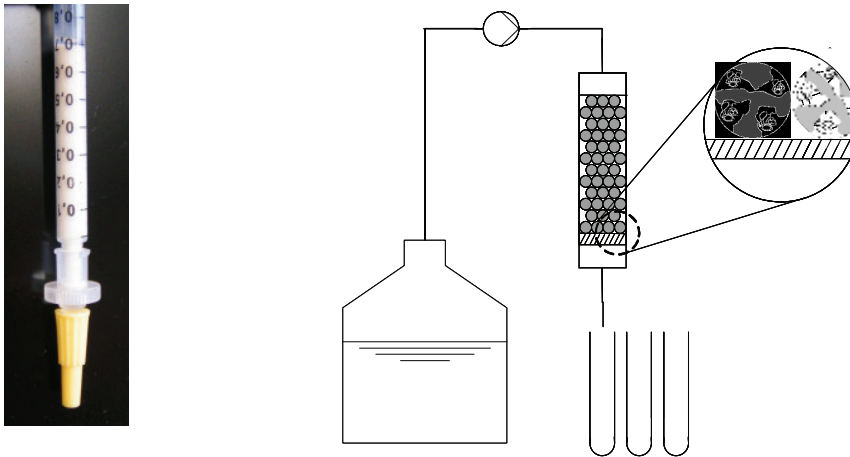


Abbildung 90: Retention des Immobilisats durch einen Spritzenfilter, Schema des Flussbettreaktors

Abbildung 91 demonstriert, dass die hohe Enzymstabilität auch unter Prozessbedingungen Bestand hat. Bei einer Verweilzeit von 60 min konnten dauerhaft 60 % Umsatz erzielt werden, was einer Raum-Zeit-Ausbeute von $30 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und einer Produktkonzentration von 10 mmol L^{-1} entspricht. Ein höherer Umsatz durch die Einstellung einer längeren Verweilzeit war aus apparativen Gründen nicht möglich. Der Reaktor konnte über 70 Tage lang ohne Umsatzverluste betrieben werden, das entspricht 1600 Verweilzeiten. Die Stabilisierung des Enzyms durch die Immobilisierung führt zu einer Enzymeffizienz von $ttn = 2.500.000$, dem höchsten Wert, der für dieses Enzym bisher berichtet wurde.

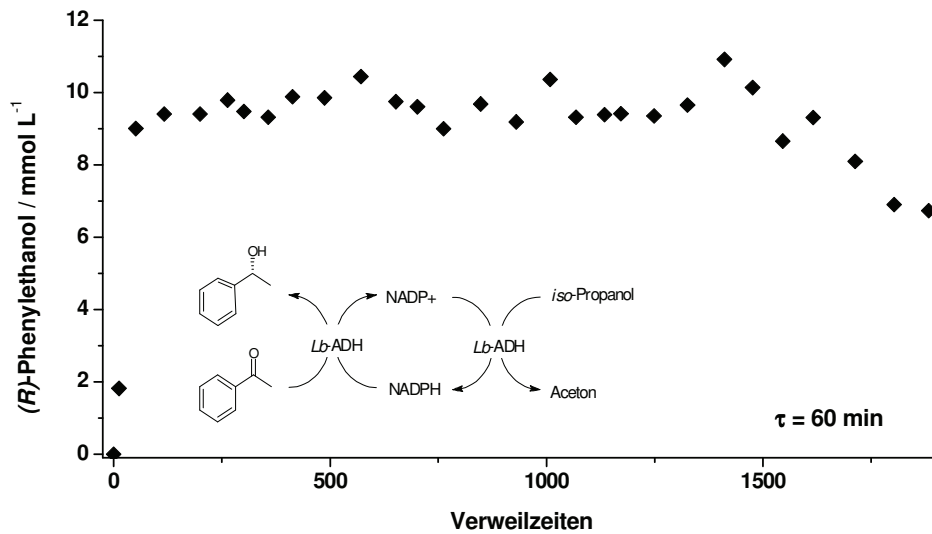


Abbildung 91: Flussbettreaktor

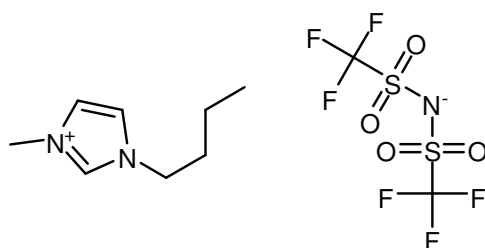
Reaktionsbedingungen: 50 mmol L^{-1} Phosphatpuffer; 1 mmol L^{-1} MgCl_2 ; 16 mmol L^{-1} Acetophenon; 200 mmol L^{-1} *iso*-Propanol; $0,5 - 1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ NADP⁺

Es wird deutlich, dass der Verlust an Aktivität durch Absättigung und Quervernetzung von der hervorragenden Prozessstabilität mehr als kompensiert wird. Die beschriebene Immobilisierungsmethode ermöglicht lange Reaktorlaufzeiten ohne Aktivitätsverlust und gute Produktivitäten. Durch Vergrößerung der Immobilisatmenge sollte außerdem ohne weiteres ein höherer Umsatz möglich sein.

11.2 Gel-Einkapselung

In Kapitel 4.3.2 hat sich herausgestellt, dass die Verwendung von gel-stabilisierten Enzymen in einem Polyvinylalkoholgel nicht für die Anwendung in wässrigen Medien geeignet ist. Um dennoch die Vorteile einer solchen Einkapselung zu beweisen, wurde der Einsatz dieser Gelkugeln in einer nicht-wassermischbaren Ionischen Flüssigkeit untersucht. Der Effekt der schnellen Inaktivierung durch Auswaschung von Gel-Bestandteilen sollte durch die hydrophobe Natur der Ionischen Flüssigkeit nicht zu beobachten sein. Darüber hinaus sollte die hydrophile Umgebung innerhalb der Kugeln das Enzym weitgehend vor den inaktivierenden Einflüssen eines nicht-wässrigen Mediums schützen. Durch die Gelstabilisierung wird der Kontakt des Enzyms mit der Phasengrenzfläche des Lösemittels ebenso vermieden wie mechanischer Stress durch das Rühren der Lösung.

Die Wahl des Lösemittels fiel auf die IL BMIM BTA (siehe Abbildung 92). Es wurde bereits über Synthesen berichtet, bei denen Alkoholdehydrogenasen in einem Zweiphasensystem aus Puffer und IL eingesetzt wurden (Eckstein et al. 2004a; Eckstein et al. 2004b). Diese Ionische Flüssigkeit zeichnet sich durch eine akzeptable Enzymkompatibilität und günstige Verteilungskoeffizienten für aromatische Ketone und Alkohole aus. Durch die Unlöslichkeit von NADP(H) in der IL kann zwar der Cofaktor in der Nähe des Enzyms gehalten werden, eine elektrochemische Cofaktorregenerierung scheidet aber aus. Deshalb wurde erneut auf die substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung zurückgegriffen.



1-Butyl-3-methyl-imidazolium bis-((trifluoromethyl)sulfonyl)amid

Abbildung 92: Struktur der Ionischen Flüssigkeit BMIM BTA

11.2.1 Stabilität des gel-stabilisierten Enzyms

Die immobilisierte ADH-T wurde in wassergesättigter BMIM BTA inkubiert und ihre Stabilität bestimmt. Wie Abbildung 93 verdeutlicht, kann eine Halbwertszeit von 164 ± 7 h erzielt werden. Die Geleinkapselung bietet also vorzügliche Stabilisierung gegen die Ionische Flüssigkeit. Die Verwendung eines Zweiphasensystems aus BMIM BTA und in Puffer gelösten Alkoholdehydrogenasen ist zwar praktikabel (Eckstein et al. 2004b), allerdings zeigt ADH-T in diesem Reaktionsgemisch durch den Kontakt mit der Phasengrenze eine deutlich geringere Stabilität (53 ± 8 h). Der Kontakt mit Gasblasen, wie er bei der Entfernung von Aceton durch Stripping auftreten kann (Stillger et al. 2002), hat sogar einen noch stärker inaktivierenden Effekt auf das Enzym. Hier beträgt die Halbwertszeit lediglich 28 ± 12 h.

Diese Messungen zeigen eindrucksvoll den Stabilitätsgewinn, der erzielt werden kann, wenn das Enzym durch Einkapselung vor Phasengrenzflächen geschützt wird.

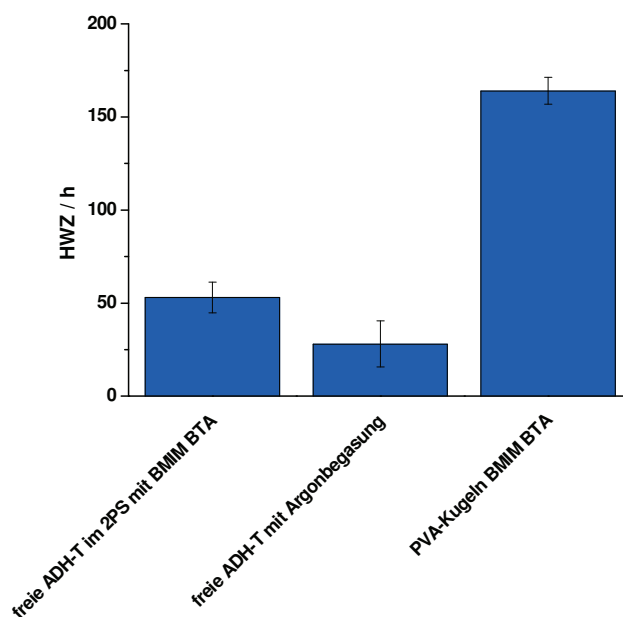


Abbildung 93: Stabilität ADH-T unter verschiedenen Bedingungen

Reaktionsbedingungen: a) 1 U mL^{-1} ADH-T in $5 \text{ mL } 50 \text{ mmol L}^{-1}$ Phosphatpuffer $\text{pH} = 8$ und 5 mL BMIM BTA ; b) 1 U mL^{-1} ADH-T in $5 \text{ mL } 50 \text{ mmol L}^{-1}$ Phosphatpuffer $\text{pH} = 8$ mit Argonbegasung; c) ADH-T-Gelkugeln in wassergesättigter BMIM BTA

11.2.2 Einsatz des gel-stabilisierten Enzyms in einem Stripping-Reaktor

Es wurde bereits in Kapitel 1.4 darauf hingewiesen, dass das bei der substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung stöchiometrisch entstehende Aceton sowohl einen inhibierenden Effekt auf das Enzym ausüben als auch durch Begünstigung der Rückreaktion vollständigen Umsatz verhindern kann. Es sind verschiedene Ansätze literaturbekannt, wie das Aceton aus der Lösung entfernt werden kann. Einerseits kann eine Membran eingesetzt werden, die in Verbindung mit Unterdruck das Aceton selektiv aus der Lösung entfernt (Pervaporation). Wenn keine niedriger siedenden Reagenzien vorliegen, kann das Aceton aber auch einfach durch einen Inertgasstrom aus der Lösung entfernt werden (Stripping). Das zweite Verfahren wurde bereits erfolgreich für wässrige Anwendungen eingesetzt, eine Übertragung auf Reaktionen in einem üblichen organischen Lösemittel wie Methanol oder Dichlormethan verbietet sich aber, da hierbei große Mengen an brennbarem Luft-Gas-Gemisch entstehen würden. Diese Tatsache ist ein wichtiges Argument für den Einsatz von ionischen Flüssigkeiten als Reaktionsmedien, denn durch ihren vernachlässigbar geringen Dampfdruck bleibt das Reaktionsvolumen auch bei Einleitung von Gas konstant.

Die gelstabilisierte ADH-T soll nun in Ionischer Flüssigkeit eingesetzt werden. Zur Beschleunigung der Reaktion wird ein mit *iso*-Propanol angereicherter Argonstrom durch die Lösung geleitet, der Aceton aus der Lösung austreibt.

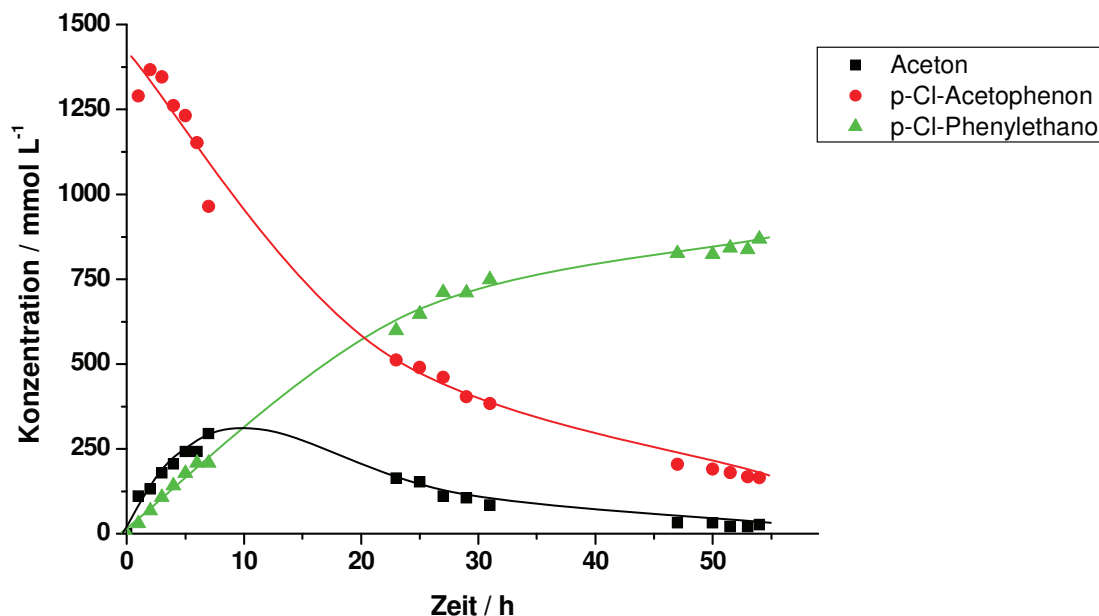


Abbildung 94: Einsatz gel-stabilsierter ADH-T in einem Stripping-Reaktor mit BMIM BTA

Reaktionsbedingungen: 50 mL BMIM BTA, gesättigt mit Wasser; 1,3 M p-Cl-ACP; 1 M *iso*-Propanol; 350 U ADH-T; 0,1 mg NADP⁺; Begasung: Argon, gesättigt mit Wasser und *iso*-Propanol

Abbildung 94 verdeutlicht die Konzentrationsverläufe im Stripping-Reaktor mit Ionischer Flüssigkeit als Reaktionsmedium. Die Substrate para-Chlor-Acetophenon und *iso*-Propanol sind unbegrenzt mit der IL mischbar, sodass eine Substratkonzentration von 1,3 mol L⁻¹ eingesetzt werden konnte. Man erkennt deutlich, dass anfangs die Konzentrationen der beiden Produkte Aceton und para-Chlor-(*S*)-Phenylethanol in gleichem Maße ansteigen, dann gewinnt aber das Stripping mit Argon an Bedeutung und das Coprodukt kann aus der Lösung ausgetrieben werden. Der gewünschte chirale Alkohol akkumulierte weiter in der Lösung, bis eine enantiomerenreine Produktkonzentration von 0,87 mol L⁻¹ erreicht wird. Dieser Wert liegt Größenordnungen über der maximalen Konzentration in wässrigem Medium. Nach fünfzig Stunden konnte ein Umsatz von 85 % erreicht werden, das entspricht einer volumetrischen Produktivität von etwa 90 g L⁻¹ d⁻¹. Die Enzym- und Cofaktoreffizienzen belaufen sich auf t_{90} (ADH-T) = 300.000 und t_{90} (NADP) = 440.

Diese Resultate stellen die erste Anwendung von Alkoholdehydrogenasen in einer Reaktionsmischung aus IL und Immobilisat dar. Vor allem die hohe Produktivität und die hohen Produktkonzentrationen geben einen ersten Eindruck, welche Perspektiven der Einsatz von gelstabilisierten Enzymen in Ionischen Flüssigkeiten bietet. In diesem Zusammenhang ist es sowohl aus theoretischer wie aus präparativer Sicht von großem Interesse zu untersuchen, wie sich andere Ionische Flüssigkeiten auf die Leistungsfähigkeit des Prozesses auswirken. Dabei spielen der Einfluss

der in dem Gel gelösten Bestandteile der Ionischen Flüssigkeit auf die Enzyme ebenso eine Rolle wie die Verteilungskoeffizienten. Auch für inhibierende oder toxische Substrate sollte die Biokatalyse in Ionischen Flüssigkeiten mit gel-stabilisierten Enzymen große Möglichkeiten bieten.

11.3 Vergleich der Prozesse

Es wurden zwei verschiedene Arten der Immobilisierung von Enzymen vorgestellt, die kovalente Anbindung an ein heterogenes Trägermaterial und die Gel-Stabilisierung durch Polyvinylalkohol. Diese Immobilisate unterscheiden sich in ihren physikalischen und katalytischen Eigenschaften und es wurde jeweils ein Prozess vorgestellt, der die jeweiligen Stärken der Immobilisierung hervorhebt.

Die kovalente Anbindung besticht durch eine hervorragende Stabilisierung des Enzyms, die lange Reaktorlaufzeiten ohne Verlust an Aktivität ermöglicht. Durch das heterogene Trägermaterial ist es möglich, das Immobilisat in einem Flussbettreaktor einzusetzen und der vernachlässigbare Druckabfall erleichtert dabei eine mögliche Maßstabsvergrößerung. Es konnten ausgezeichnete Enzymausnutzungen erreicht werden. Nachteilig lässt sich erwähnen, dass die Verwendung eines wässrigen Reaktionssystems nur geringe Löslichkeiten an hydrophoben Substraten zulässt, was einerseits die Produktivität senkt, aber auch die Produktaufarbeitung erschwert. Hier könnte sich der Einsatz einer organischen Phase als Substrat- und Produktreservoir anbieten, da sich die Enzymstabilisierung nach ersten Untersuchungen auch auf wässrig-organische Zweiphasensysteme erstreckt. Dies würde außerdem zu höheren Cofaktoreffizienzen führen, da dieser im jetzigen Reaktormodell kontinuierlich nachdosiert werden muss.

Die Gel-Einkapselung durch Polyvinylalkohol bewirkt ebenfalls eine Stabilisierung, allerdings weniger gegen thermische Inaktivierung, sondern vor allem gegen mechanischen Stress und Phasengrenzen. Dies ermöglicht den Einsatz in nahezu allen Medien, die das Polymergerüst als solches nicht angreifen. Der Einsatz in Ionischer Flüssigkeit erlaubt hohe Substratkonzentrationen und damit verbunden hohe Produktivitäten. Der Einsatz von Stripping kann außerdem durch Verringerung der Aceton-Konzentration als Coprodukt die Reaktion beschleunigen und hohe Umsätze ermöglichen.

Tabelle 9 fasst die Reaktormodelle zusammen.

Tabelle 9: Vergleich der Reaktormodelle für Sepabeads® und Gelkugeln

Parameter	Sepabeads®	Gel-Einkapselung
Medium	wässrig / Trägermaterial	gel-stabilisiert wässrig / IL
Reaktortyp	Flussbettreaktor	Satzreaktor
Substratkonzentration / mmol L ⁻¹	16	1300
Produktkonzentration / mmol L ⁻¹	10	870
Reaktorlaufzeit / h	1700	53
Umsatz / %	60	84
Enzymeffizienz	2.500.000	300.000
Cofaktoreffizienz	20	440
Produktivität / g L ⁻¹ d ⁻¹	30	90
Aufarbeitung	Extraktion	Destillation oder Extraktion

12 Literatur

- Ager D. 1999. Handbook of chiral chemicals. New York, USA: Dekker, Inc.
- Anderson S, Constable EC, Seddon KR, Turp JE, Baggott JE, Pilling MJ **1985**; "Preparation and Characterization of 2,2'-Bipyridine-4,4'-Disulphonic and Bipyridine-5-Sulfonic Acids and Their Ruthenium(II) Complexes - Excited-State Properties and Excited-State Electron-Transfer Reactions of Ruthenium(II) Complexes Containing 2,2'-Bipyridine-4,4'-Disulphonic Acid or 2,2'-Bipyridine-4,4'-Dicarboxylic Acid", *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*(11):2247-2261.
- Andrade LH, Keppler AF, Schoenlein-Crusius IH, Porto ALM, Comasseto JV **2004**; "Evaluation of acetophenone monooxygenase and alcohol dehydrogenase activities in different fungal strains by biotransformation of acetophenone derivatives", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 31(4-6):129-135.
- Ansorge-Schumacher MB, Greiner, L., Schroeper, F., Mirtschin, S., Hischer, T. **2006**; "Operational concept for the improved synthesis of (*R*)-3,3'-furoin and related hydrophobic compounds with benzaldehyde lyase", *Biotechnology Journal* 1(5):564-568.
- Ansorge-Schumacher MB, Slusarczyk H, Schumers J, Hirtz D **2006**; "Directed evolution of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* for improved stability during entrapment in polyacrylamide", *Febs Journal* 273(17):3938-3945.
- Ariens EJ **1986**; "Stereochemistry - a Source of Problems in Medicinal Chemistry", *Medicinal Research Reviews* 6(4):451-466.
- Atkinson PS. 1995. Stereoselective Synthesis. London: Wiley & Sons.
- Bacheva AV, Belyaeva AV, Lysogorskaya EN, Oksenoit ES, Lozinsky VI, Filippova IY **2005**; "Biocatalytic properties of native and immobilized subtilisin 72 in aqueous-organic and low water media", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 32(5-6):253-260.
- Baik SH, Kang C, Jeon IC, Yun SE **1999**; "Direct electrochemical regeneration of NADH from NAD⁺ using cholesterol-modified gold amalgam electrode", *Biotechnology Techniques* 13(1):1-5.
- Bitsch-Larsen A, Degenstein NJ, Schmidt LD **2008**; "Effect of sulfur in catalytic partial oxidation of methane over Rh-Ce coated foam monoliths", *Applied Catalysis B-Environmental* 78(3-4):364-370.
- Blaser HU **1992**; "The chiral pool as a source of enantioselective catalysts and auxiliaries", *Chem. Rev.* 92(5):935-952.
- Bolivar JM, Wilson L, Ferrarotti SA, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM, Mateo C **2006**; "Stabilization of a formate dehydrogenase by covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose supports", *Biomacromolecules* 7(3):669-673.
-

- Bolm C, Hildebrand JP, Muniz K. 2000. Catalytic Asymmetric Synthesis. Ojima I, editor. Weinheim: Wiley-VCH. 299 p.
- Bonnefoy J, Moiroux J, Laval JM, Bourdillon C **1988**; "Electrochemical regeneration of NAD⁺ - a new evaluation of its actual yield", *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions I* 84:941-950.
- Bozó É, Boros S, Kuzsmann J **1999**; "Synthesis of 4-cyanophenyl and 4-nitrophenyl 1,5-dithio-ribopyranosides as well as their 2-deoxy and 2,3-dideoxy derivatives possessing antithrombotic activity", *Carbohydrate Research* 321(1-2):52-66.
- Bradford MM **1976**; "Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding", *Analytical Biochemistry* 72(1-2):248-254.
- Bradshaw C **1992**; "*Lactobacillus-kefir* alcohol-dehydrogenase - A useful catalyst for synthesis", *Journal of Organic Chemistry* 57(5):1532-1536.
- Brielbeck B, Frede M, Steckhan E **1994**; "Continuous Electroenzymatic Synthesis Employing the Electrochemical Enzyme Membrane Reactor", *Biocatalysis* 10(1-4):49-64.
- Burk MJ **1991**; "C₂-Symmetrical Bis(Phospholanes) and Their Use in Highly Enantioselective Hydrogenation Reactions", *Journal of the American Chemical Society* 113(22):8518-8519.
- Busto MD, Meza V, Ortega N, Perez-Mateos M **2007**; "Immobilization of naringinase from *Aspergillus niger* CECT 2088 in poly(vinyl alcohol) cryogels for the debittering of juices", *Food Chemistry* 104(3):1177-1182.
- Cao LQ, van Langen L, Sheldon RA **2003**; "Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?" *Current Opinion in Biotechnology* 14(4):387-394.
- Carell T, Begriffe zur Enantiomerenreinheit und deren Bestimmung, http://www.cup.uni-muenchen.de/oc/carell/teaching/stereochemie/kap%205_begriffe%20zur%20enantiomerenreinheit.pdf, 9.09.2008
- Chenault HK, Whitesides GM **1987**; "Regeneration of Nicotinamide Cofactors for Use in Organic-Synthesis", *Applied Biochemistry and Biotechnology* 14(2):147-197.
- Cook MJ, Lewis AP, Mcauliffe GSG, Skarda V, Thomson AJ, Glasper JL, Robbins DJ **1984**; "Luminescent Metal-Complexes .1. Tris-Chelates of Substituted 2,2'-Bipyridyls with Ruthenium(II) as Dyes for Luminescent Solar Collectors", *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*(8):1293-1301.
- Coquerel G. 2007. Preferential crystallization. Novel Optical Resolution Technologies. Berlin: SPRINGER-VERLAG BERLIN. p 1-51.
- Crispino GA, Ho PT, Sharpless KB **1993**; "Selective Perhydroxylation of Squalene - Taming the Arithmetic Demon", *Science* 259(5091):64-66.

-
- Dalrymple-Alford P, Goto M, Oldham KB **1977**; "Shapes of derivative neopolarograms", *J. Electroanalyt. Chem.* 85:1.
- Damian A, Maloo K, Omanovic S **2007**; "Direct electrochemical regeneration of NADH on Au, Cu and Pt-Au electrodes", *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 21(1):21-32.
- Daussmann T, Hennemann, H-G, Rosen, TC, Dünkemann, P **2006**; "Enzymatic technologies for the synthesis of chiral alcohol derivatives", *Chemie Ingenieur Technik* 78(3):249-255.
- Daussmann T, Rosen TC, Dünkemann P **2006**; "Oxidoreductases and hydroxynitrilase lyases: Complementary enzymatic technologies for chiral alcohols", *Engineering in Life Sciences* 6(2):125-129.
- de Alteriis E, Silvestro G, Poletto M, Romano V, Capitano D, Compagno C, Parascandola P **2004**; "*Kluyveromyces lactis* cells entrapped in Ca-alginate beads for the continuous production of a heterologous glucoamylase", *Journal of Biotechnology* 109(1-2):83-92.
- de Maria PD, Pohl M, Gocke D, Gröger H, Trauthwein H, Stillger T, Walter L, Müller M **2007**; "Asymmetric synthesis of aliphatic 2-hydroxy ketones by enzymatic carbonylation of aldehydes", *European journal of organic chemistry*(18):2940-2944.
- Delecours-Servat K, Basseguy R, Bergel A **2002a**; "Designing membrane electrochemical reactors for oxidoreductase-catalysed synthesis", *Bioelectrochemistry* 55(1-2):93-95.
- Delecours-Servat K, Basseguy R, Bergel A **2002b**; "Membrane electrochemical reactor (MER): application to NADH regeneration for ADH-catalysed synthesis", *Chemical Engineering Science* 57(21):4633-4642.
- Deng YQ, Nevell TG, Ewen RJ, Honeybourne CL, Jones MG **1993**; "Sulfur Poisoning, Recovery and Related Phenomena over Supported Palladium, Rhodium and Iridium Catalysts for Methane Oxidation", *Applied Catalysis a-General* 101(1):51-62.
- Dicosimo R, Wong CH, Daniels L, Whitesides GM **1981**; "Enzyme-Catalyzed Organic-Synthesis - Electrochemical Regeneration of NAD(P)H from NAD(P) Using Methyl Viologen and Flavoenzymes", *Journal of Organic Chemistry* 46(22):4622-4623.
- Eckstein M, Daussmann T, Kragl U **2004a**; "Recent developments in NAD(P)H regeneration for enzymatic reductions in one- and two-phase systems", *Biocatalysis and Biotransformation* 22(2):89-96.
- Eckstein M, Villela M, Liese A, Kragl U **2004b**; "Use of an ionic liquid in a two-phase system to improve an alcohol dehydrogenase catalysed reduction", *Chemical Communications*(9):1084-1085.
- Eichenauer H, Friedrich E, Lutz W, Enders D **1978**; "Regiospecific and Enantioselective Aldol Reactions", *Angewandte Chemie-International Edition in English* 17(3):206-208.
-

- Enders D, Eichenauer H **1976**; "Asymmetric Synthesis of Alpha-Substituted Ketones by Metalation and Alkylation of Chiral Hydrazones", *Angewandte Chemie-International Edition in English* 15(9):549-551.
- Fang JM, Lin CH, Bradshaw CW, Wong CH **1995**; "Enzymes in Organic-Synthesis - Oxidoreductions", *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*(8):967-978.
- Fernandez-Lafuente R, Rodriguez V, Mateo C, Fernandez-Lorente G, Arminsen P, Sabuquillo P, Guisan JM **1999a**; "Stabilization of enzymes (D-amino acid oxidase) against hydrogen peroxide via immobilization and post-immobilization techniques", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 7(1-4):173-179.
- Fernandez-Lafuente R, Rodriguez V, Mateo C, Penzol G, Hernandez-Justiz O, Irazoqui G, Villarino A, Ovsejevi K, Batista F, Guisan JM **1999b**; "Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 7(1-4):181-189.
- Geneste F, Moinet C **2006**; "Electrocatalytic oxidation of alcohols by a [Ru(tpy)(phen)(OH₂)]²⁺-modified electrode", *Journal of Electroanalytical Chemistry* 594(2):105-110.
- Geneste F, Moinet C, Ababou-Girard S, Solal F **2005**; "Stability of [Ru-II(tpy)(bpy)(OH₂)]²⁺-modified graphite electrodes during indirect electrolyses", *Inorganic Chemistry* 44(12):4366-4371.
- Geneste F, Moinet C, Jezequel G **2002**; "First covalent attachment of a polypyridyl ruthenium complex on a graphite felt electrode", *New Journal of Chemistry* 26(11):1539-1541.
- Goldberg K, Edegger K, Kroutil W, Liese A **2006**; "Overcoming the thermodynamic limitation in asymmetric hydrogen transfer reactions catalyzed by whole cells", *Biotechnology and Bioengineering* 95(1):192-198.
- Goldberg K, Schroer K, Lütz S, Liese A **2007**; "Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols - part I: processes with isolated enzymes", *Applied Microbiology and Biotechnology* 76(2):237-248.
- Greiner L. 2002. Prozessentwicklung für die katalytische Reduktion mit molekularem Wasserstoff [Dissertation]. Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität. 176 p.
- Gröger H, Hummel W, Buchholz S, Drauz K, Van Nguyen T, Rollmann C, Husken H, Abokitse K **2003**; "Practical asymmetric enzymatic reduction through discovery of a dehydrogenase-compatible biphasic reaction media", *Organic Letters* 5(2):173-176.
- Gröger H, Hummel W, Rollmann C, Chamouveau F, Husken H, Werner H, Wunderlich C, Abokitse K, Drauz K, Buchholz S **2004**; "Preparative asymmetric reduction of ketones in a biphasic medium with an (S)-alcohol dehydrogenase under *in situ*-cofactor-recycling with a formate dehydrogenase", *Tetrahedron* 60(3):633-640.

-
- Herrmann WA, Thiel WR, Kuchler JG **1990**; "Water-Soluble Metal-Complexes and Catalysts .4. 2,2'-Bipyridine-5-Sulfonic Acid - Synthesis, Purification, Derivatives and Metal-Complexes", *Chemische Berichte* 123(10):1953-1961.
- Hildebrand F, Kohlmann C, Franz A, Lütz S **2008**; "Synthesis, Characterization and Application of New Rhodium Complexes for Indirect Electrochemical Cofactor Regeneration", *Advanced Synthesis & Catalysis* 350(6):909-918.
- Hildebrand F, Kühl S, Pohl M, Vasic-Racki D, Müller M, Wandrey C, Lütz S **2007**; "The production of (*R*)-2-hydroxy-1-phenyl-propan-1-one derivatives by benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* in a continuously operated membrane reactor", *Biotechnology and Bioengineering* 96(5):835-843.
- Hildebrand F, Lütz S **2006**; "Immobilisation of alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* and its application in a plug-flow reactor", *Tetrahedron-Asymmetry* 17(23):3219-3225.
- Hildebrand F, Lütz S **2007**; "Electroenzymatic synthesis of chiral alcohols in an aqueous-organic two-phase system", *Tetrahedron-Asymmetry* 18(10):1187-1193.
- 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 Annalen-Recueil*(11):2289-2296.
- Hilt G, Steckhan E **1993**; "Transition-Metal Complexes of 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione as Efficient Mediators for the Regeneration of NAD⁺ in Enzymatic-Synthesis", *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*(22):1706-1707.
- Himeda Y, Onozawa-Komatsuzaki N, Sugihara H, Kasuga K **2007**; "Simultaneous tuning of activity and water solubility of complex catalysts by acid-base equilibrium of ligands for conversion of carbon dioxide", *Organometallics* 26(3):702-712.
- Hischer T, Steinsiek S, Ansorge-Schumacher MB **2006**; "Use of polyvinyl alcohol cryogels for the compartmentation of biocatalyzed reactions in non-aqueous media", *Biocatalysis and Biotransformation* 24(6):437-442.
- Hollmann F. 2003. Coupling Homogeneous and Enzyme Catalysis for highly specific Hydroxylations, Epoxidations and Hydrogenations [Dissertation]. Zürich.
- Hollmann F, Hofstetter K, Habicher T, Hauer B, Schmid A **2005**; "Direct electrochemical regeneration of monooxygenase subunits for biocatalytic asymmetric epoxidation", *Journal of the American Chemical Society* 127(18):6540-6541.
- Hollmann F, Kleeb A, Otto K, Schmid A **2006**; "Coupled chemoenzymatic transfer hydrogenation catalysis for enantioselective reduction and oxidation reactions (vol 16, pg 3512, 2005)", *Tetrahedron-Asymmetry* 17(5):867-868.
-

- Hollmann F, Schmid A, Steckhan E **2001**; "The first synthetic application of a monooxygenase employing indirect electrochemical NADH regeneration", *Angewandte Chemie-International Edition* 40(1):169-171.
- Hollmann F, Witholt B, Schmid A **2002**; "[Cp*Rh(bpy)(H₂O)]²⁺: a versatile tool for efficient and non-enzymatic regeneration of nicotinamide and flavin coenzymes", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19-20:167-176.
- Höllrigl V, Otto K, Schmid A **2007**; "Electroenzymatic Asymmetric Reduction of *rac*-3-Methylcyclohexanone to (*1S,3S*)-3-Methylcyclohexanol in Organic/Aqueous Media Catalyzed by a Thermophilic Alcohol Dehydrogenase", *Advanced Synthesis & Catalysis* 349(8-9):1337-1340.
- Holz J, Heller D, Sturmer R, Borner A **1999**; "Synthesis of the first water-soluble chiral tetrahydroxy diphosphine Rh(I) catalyst for enantioselective hydrogenation", *Tetrahedron Letters* 40(39):7059-7062.
- Holz J, Sturmer R, Schmidt U, Drexler HJ, Heller D, Krimmer HP, Borner A **2001**; "Synthesis of chiral 2,5-bis(oxyethyl)-functionalized bis(phospholanes) and their application in Rh- and Ru-catalyzed enantioselective hydrogenations", *European journal of organic chemistry*(24):4615-4624.
- Hong YR, Gorman CB **2003**; "Synthetic approaches to an isostructural series of redox-active, metal tris(bipyridine) core dendrimers", *Journal of Organic Chemistry* 68(23):9019-9025.
- Hummel W, Kula MR **1989**; "Dehydrogenases for the Synthesis of Chiral Compounds", *European Journal of Biochemistry* 184(1):1-13.
- Jaeger KE, Eggert T **2002**; "Lipases for biotechnology", *Current Opinion in Biotechnology* 13(4):390-397.
- Jaeger KE, Schneidinger B, Rosenau F, Werner M, Lang D, Dijkstra BW, Schimossek K, Zonta A, Reetz MT **1997**; "Bacterial lipases for biotechnological applications", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 3(1-4):3-12.
- Job A, Janeck CF, Betray W, Peters R, Enders D **2002**; "The SAMP-/RAMP-hydrazone methodology in asymmetric synthesis", *Tetrahedron* 58(12):2253-+.
- Jones JB, Lewis AJ, Sneddon DW, Higgins W **1972**; "Preparative-Scale Reductions of Cyclic Ketone and Aldehyde Substrates of Horse Liver Alcohol-Dehydrogenase with *in situ* Sodium Dithionite Bicycling of Catalytic Amounts of NAD", *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*(15):856-&.
- Kadnikova EN, Thakor VA **2008**; "Enantioselective hydrolysis of 1-arylallyl acetates catalyzed by *Candida antarctica* lipase", *Tetrahedron: Asymmetry* 19(9):1053-1058.

-
- Kang YW, Kang C, Hong JS, Yun SE **2001**; "Optimization of the mediated electrocatalytic reduction of NAD(+) by cyclic voltammetry and construction of electrochemically driven enzyme bioreactor", *Biotechnology Letters* 23(8):599-604.
- Kavanagh P, Leech D **2004**; "Improved synthesis of 4,4'-diamino-2,2'-bipyridine from 4,4'-dinitro-2,2'-bipyridine-N,N'-dioxide", *Tetrahedron Letters* 45(1):121-123.
- Kawaguti HY, Sato HH **2007**; "Palatinose production by free and Ca-alginate gel immobilized cells of *Erwinia sp.*", *Biochemical Engineering Journal* 36:202-208.
- Kazlauskas RJ, Weissfloch ANE, Rappaport AT, Cuccia LA **1991**; "A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*", *J. Org. Chem.* 56(8):2656-2665.
- Keinan E, Seth KK, Lamed R **1987**; "Synthetic Applications of Alcohol-Dehydrogenase from *Thermoanaerobium-Brockii*", *Annals of the New York Academy of Sciences* 501:130-149.
- Kennedy JF, Cabral JMS. 1987. In: Rehm H-J, Reed G, editors. *Biotechnology, A Comprehensive Treatise in 8 Volumes*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft. p 347-404.
- Khare SK, Vaidya S, Gupta MN **1991**; "Entrapment of Proteins by Aggregation within Sephadex Beads", *Applied Biochemistry and Biotechnology* 27(3):205-216.
- Kihumbu D, Stillger T, Hummel W, Liese A **2002**; "Enzymatic synthesis of all stereoisomers of 1-phenylpropane-1,2-diol", *Tetrahedron-Asymmetry* 13(10):1069-1072.
- Kim BR, Gaines WA, Szafranski MJ, Bernath EF, Miles AM **2002**; "Removal of heavy metals from automotive wastewater by sulfide precipitation", *Journal of Environmental Engineering-Asce* 128(7):612-623.
- Kim MH, Yun SE **2004**; "Construction of an electro-enzymatic bioreactor for the production of (*R*)-mandelate from benzoylformate", *Biotechnology Letters* 26(1):21-26.
- Kohlmann C, Lütz S **2006**; "Electroenzymatic synthesis of chiral sulfoxides", *Engineering in Life Sciences* 6(2):170-174.
- Kohlmann C, Lütz S. 2007. persönliche Mitteilung.
- Kohlmann C, Märkle W, Lütz S **2007**; "Electroenzymatic synthesis", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 51:57-72.
- Kolb HC, Vannieuwenhze MS, Sharpless KB **1994**; "Catalytic Asymmetric Dihydroxylation", *Chemical Reviews* 94(8):2483-2547.
- Kölle U, Grätzel M **1987**; "Organometallic Rhodium(III) Complexes as Catalysts for the Photoreduction of Protons to Hydrogen on Colloidal TiO₂", *Angewandte Chemie-International Edition in English* 26(6):567-570.
-

- Kölle U, Kang BS, Infelta P, Comte P, Grätzel M **1989**; "Electrochemical and Pulse-Radiolytic Reduction of (Pentamethylcyclopentadienyl)(Polypyridyl)Rhodium Complexes", *Chemische Berichte* 122(10):1869-1880.
- Komoschinski J, Steckhan E **1988**; "Efficient Indirect Electrochemical *in situ* Regeneration of NAD⁺ and NADP⁺ for Enzymatic Oxidations Using Iron Bipyridine and Phenanthroline Complexes as Redox Catalysts", *Tetrahedron Letters* 29(27):3299-3300.
- Kragl U, Eckstein M, Kaftzik N **2002**; "Enzyme catalysis in ionic liquids", *Current Opinion in Biotechnology* 13(6):565-571.
- Kragl U, Eckstein, M., Kaftzik, N. 2002. Biocatalytic Reactions In Ionic Liquids. In: Wasserscheid P, editor. Ionic Liquids in Synthesis: Wiley-VCH. p 336-571.
- Kragl U, Kruse W, Hummel W, Wandrey C **1996**; "Enzyme engineering aspects of biocatalysis: Cofactor regeneration as example", *Biotechnology and Bioengineering* 52(2):309-319.
- Kubitzki T, Noll T, Lütz S **2008**; "Immobilisation of bovine enterokinase and application of the immobilised enzyme in fusion protein cleavage", *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31(3):173-182.
- Kühl S, Zehentgruber D, Pohl M, Müller M, Lütz S **2007**; "Process development for enzyme catalysed asymmetric C-C-bond formation", *Chemical Engineering Science* 62(18-20):5201-5205.
- Kunishima M, Kawachi C, Iwasaki F, Terao K, Tani S **1999a**; "Synthesis and characterization of 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride", *Tetrahedron Letters* 40(29):5327-5330.
- Kunishima M, Kawachi C, Morita J, Terao K, Iwasaki F, Tani S **1999b**; "4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride: An efficient condensing agent leading to the formation of amides and esters", *Tetrahedron* 55(46):13159-13170.
- Laca A, Garcia LA, Diaz M **2000**; "Analysis and description of the evolution of alginate immobilised cells systems", *Journal of Biotechnology* 80(3):203-215.
- Lee KT, Akoh CC **1998**; "Immobilization of lipases on clay, Celite 545, diethylaminoethyl-, and carboxymethyl-Sephadex and their interesterification activity", *Biotechnology Techniques* 12(5):381-384.
- Leksawasdi N, Breuer M, Hauer B, Rosche B, Rogers PL **2003**; "Kinetics of pyruvate decarboxylase deactivation by benzaldehyde", *Biocatalysis and Biotransformation* 21(6):315-320.
- Leksawasdi N, Chow YYS, Breuer M, Hauer B, Rosche B, Rogers PL **2004**; "Kinetic analysis and modelling of enzymatic (*R*)-phenylacetylcarbinol batch biotransformation process", *Journal of Biotechnology* 111(2):179-189.
- Liese A, Seelbach K, Wandrey C. 2005. Industrial Biotransformations. Weinheim: Wiley-VCH.

-
- Lozinsky VI, Galaev IY, Plieva FM, Savinal IN, Jungvid H, Mattiasson B **2003**; "Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest", *Trends in Biotechnology* 21(10):445-451.
- Lozinsky VI, Plieva FM **1998**; "Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments", *Enzyme and Microbial Technology* 23(3-4):227-242.
- Lozinsky VI, Plieva FM, Galaev IY, Mattiasson B **2001**; "The potential of polymeric cryogels in bioseparation", *Bioseparation* 10(4-5):163-188.
- Lütz S. 2004. Prozeßentwicklung der elektroenzymatischen Sulfoxidation mit Chloroperoxidase [Dissertation]. Bonn: Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität.
- Lütz S, Vuorilehto K, Liese A **2007**; "Process development for the electroenzymatic synthesis of (*R*)-methylphenylsulfoxide by use of a 3-dimensional electrode", *Biotechnology and Bioengineering* 98(3):525-534.
- Lysogorskaya EN, Roslyakova TV, Belyaeva AV, Bacheva AV, Lozinskii VI, Filippova IY **2008**; "Preparation and catalytic properties of trypsin immobilized on cryogels of polyvinyl alcohol", *Applied Biochemistry and Microbiology* 44(3):241-246.
- Macario A, Giordano G, Setti L, Parise A, Campelo JM, Marinas JM, Luna D **2007**; "Study of lipase immobilization on zeolitic support and transesterification reaction in a solvent free-system", *Biocatalysis and Biotransformation* 25(2-4):328-335.
- Malmström T, Andersson C **1997**; "Synthesis, spectroscopic and catalytic properties of cationic Rh(I) complexes bound to phosphine functionalized water-soluble polymers", *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical* 116(1-2):237-245.
- Malmström T, Andersson C **1999**; "Enantioselective hydrogenation in water catalysed by rhodium phosphine complexes bound to polyacrylic acid", *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical* 139(2-3):259-270.
- Malmström T, Andersson C **2000**; "Rhodium catalysed enantioselective hydrogenation in water using pyrrhos bound to poly-acrylic acid as ligand", *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical* 157(1-2):79-82.
- Malmström T, Andersson C, Hjortkjaer J **1999**; "Biphasic and SAPC hydroformylation catalysed by rhodium phosphines bound to water-soluble polymers", *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical* 139(2-3):139-147.
- Malmström T, Weigl H, Andersson C **1995**; "Coupling of the Triphenylphosphine Moiety to Water-Soluble Polymers - a New Method to Achieve Water-Soluble Metal Phosphine Complexes", *Organometallics* 14(5):2593-2596.
-

- Mandoli A, Pini D, Fiori M, Salvadori P **2005**; "Asymmetric dihydroxylation with recoverable cinchona alkaloid derivatives: A warning note and an improved, insoluble polymer-bound ligand 5 architecture", *European journal of organic chemistry*(7):1271-1282.
- Manjon A, Obon JM, Casanova P, Fernandez VM, Ilborra JL **2002**; "Increased activity of glucose dehydrogenase co-immobilized with a redox mediator in a bioreactor with electrochemical NAD⁺ regeneration", *Biotechnology Letters* 24(15):1227-1232.
- Marx T, Wesemann L, Dehnen S **2001**; "Coordination of a closo-cluster at rhodium and iridium", *Zeitschrift Für Anorganische Und Allgemeine Chemie* 627(6):1146-1150.
- Marzi M, Misiti D **1989**; "Asymmetric-Synthesis of Trans-(2*R*,5*R*)-Bis(Benzyloxymethyl)Pyrrolidine", *Tetrahedron Letters* 30(44):6075-6076.
- Mateo C, Abian O, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM **2000**; "Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites", *Biotechnology and Bioengineering* 68(1):98-105.
- McGlacken GP, Breeden SW **2005**; "A highly enantioselective, moderately anti-selective aldol reaction using a novel hydrazone moiety as stereo director", *Tetrahedron-Asymmetry* 16(22):3615-3618.
- Miyashita A, Yasuda A, Takaya H, Toriumi K, Ito T, Souchi T, Noyori R **1980**; "Synthesis of 2,2'-Bis(Diphenylphosphino)-1,1'-Binaphthyl (BINAP), an Atropisomeric Chiral Bis(Triaryl)Phosphine, and Its Use in the Rhodium(I)-Catalyzed Asymmetric Hydrogenation of Alpha-(Acylamino)Acrylic Acids", *Journal of the American Chemical Society* 102(27):7932-7934.
- Mozhaev VV **1993**; "Mechanism-Based Strategies for Protein Thermostabilization", *Trends in Biotechnology* 11(3):88-95.
- Muniz K **2006**; "Asymmetrische Katalyse mit Metall-Komplexen", *Chemie in Unserer Zeit* 40:112-124.
- Niefind K, Müller J, Riebel B, Hummel W, Schomburg D **2003**; "The crystal structure of *R*-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* suggests the structural basis of its metal dependency", *Journal of Molecular Biology* 327(2):317-328.
- Niefind K, Riebel B, Müller J, Hummel W, Schomburg D **2000**; "Crystallization and preliminary characterization of crystals of *R*-alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*", *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 56:1696-1698.
- Nilsson K, Mosbach K **1980**; "Sephadex Bound Histamine in the Catalysis of Ester Hydrolysis", *Journal of Solid-Phase Biochemistry* 4(4):271-278.
- Noyori R **2002**; "Asymmetric catalysis: Science and opportunities (Nobel lecture)", *Angewandte Chemie-International Edition* 41(12):2008-2022.

-
- Noyori R, Takaya H **1990**; "BINAP - an Efficient Chiral Element for Asymmetric Catalysis", *Accounts of Chemical Research* 23(10):345-350.
- Noyori R, Tokunaga M, Kitamura M **1995**; "Stereoselective Organic-Synthesis Via Dynamic Kinetic Resolution", *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 68(1):36-55.
- Obon JM, Casanova P, Manjon A, Fernandez VM, Iborra JL **1997**; "Stabilization of glucose dehydrogenase with polyethyleneimine in an electrochemical reactor with NAD(P)⁺ regeneration", *Biotechnology Progress* 13(5):557-561.
- Pithawala KA, Bahadur A **2002**; "Studies on the immobilization of alcohol dehydrogenase and alkaline phosphatase onto cellulosic supports", *Cellulose Chemistry and Technology* 36(3-4):265-273.
- Pohl M. 2007. persönliche Mitteilung.
- Pollegioni L, Fukui K, Massey V **1994**; "Studies on the Kinetic Mechanism of Pig-Kidney D-Amino-Acid Oxidase by Site-Directed Mutagenesis of Tyrosine-224 and Tyrosine-228", *Journal of Biological Chemistry* 269(50):31666-31673.
- Randles JEB **1948**; "A Cathode Ray Polarograph .2. The Current-Voltage Curves", *Transactions of the Faraday Society* 44(5):327-&.
- Rickus JL, Chang PL, Tobin AJ, Zink JI, Dunn B **2004**; "Photochemical coenzyme regeneration in an enzymatically active optical material", *Journal of Physical Chemistry B* 108(26):9325-9332.
- Rissom S, Beliczey J, Giffels G, Kragl U, Wandrey C **1999**; "Asymmetric reduction of acetophenone in membrane reactors: comparison of oxazaborolidine and alcohol dehydrogenase catalysed processes", *Tetrahedron-Asymmetry* 10(5):923-928.
- Rosen TC, Dausmann T **2004**; "Biokatalytische Produktion chiraler Alkohole", *Transkript* 5:46.
- Ruinatscha R, Höllrigl V, Otto K, Schmid A **2006**; "Productivity of selective electroenzymatic reduction and oxidation reactions: Theoretical and practical considerations", *Advanced Synthesis & Catalysis* 348(15):2015-2026.
- Ruppert R, Herrmann S, Steckhan E **1987**; "Efficient Indirect Electrochemical *in situ* Regeneration of NADH - Electrochemically Driven Enzymatic Reduction of Pyruvate Catalyzed by D-LDH", *Tetrahedron Letters* 28(52):6583-6586.
- Ruppert R, Herrmann S, Steckhan E **1988**; "Very Efficient Reduction of NAD(P)⁺ with Formate Catalyzed by Cationic Rhodium Complexes", *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*(17):1150-1151.
- Santaniello E, Ferraboschi P, Grisenti P **1993**; "Lipase-Catalyzed Transesterification in Organic-Solvents - Applications to the Preparation of Enantiomerically Pure Compounds", *Enzyme and Microbial Technology* 15(5):367-382.
-

- Schröder I, Steckhan E, Liese A **2003**; "In situ NAD⁺ regeneration using 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) as an electron transfer mediator", *Journal of Electroanalytical Chemistry* 541:109-115.
- Schroer K, Tacha E, Lütz S **2007**; "Process intensification for substrate-coupled whole cell ketone reduction by *in situ* acetone removal", *Organic Process Research & Development* 11(5):836-841.
- Schubert T, Hummel W, Kula MR, Müller M **2001**; "Enantioselective synthesis of both enantiomers of various propargylic alcohols by use of two oxidoreductases", *European Journal of Organic Chemistry*(22):4181-4187.
- Schulz M, Leichmann H, Günther H, Simon H **1995**; "Electromicrobial Regeneration of Pyridine-Nucleotides and Other Preparative Redox Transformations with *Clostridium-Thermoaceticum*", *Applied Microbiology and Biotechnology* 42(6):916-922.
- Schumacher J, Eckstein, M., Kragl, U. **2006**; "Influence of water-miscible organic solvents on kinetics and enantioselectivity of the (*R*)-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*", *Biotechnology Journal* 1(5):574-581.
- Scott CD, Woodward CA, Thompson JE **1989**; "Solute Diffusion in Biocatalyst Gel Beads Containing Biocatalysis and Other Additives", *Enzyme and Microbial Technology* 11(5):258-263.
- Seelbach K, Riebel B, Hummel W, Kula MR, Tishkov VI, Egorov AM, Wandrey C, Kragl U **1996**; "A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase", *Tetrahedron Letters* 37(9):1377-1380.
- Sevcik A **1948**; *Collect. Czech. Chem. Commun.* 13:349.
- Sheldon RA, Lau RM, Sorgedraeger MJ, van Rantwijk F, Seddon KR **2002**; "Biocatalysis in ionic liquids", *Green Chemistry* 4(2):147-151.
- Sheldon RA, Schoevaart R, Van Langen LM **2005**; "Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review)", *Biocatalysis and Biotransformation* 23(3-4):141-147.
- Siu E, Won K, Park CB **2007**; "Electrochemical regeneration of NADH using conductive vanadia-silica xerogels", *Biotechnology Progress* 23(1):293-296.
- Soni S **2001**; "Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase by entrapment and covalent binding to polymeric supports", *Journal of applied polymer science* 82(5):1299-1305.
- Speiser B **1981**; "Electroanalytical Methods .2. Cyclic Voltametry", *Chemie in Unserer Zeit* 15(2):62-67.
- Spika E. 1994. Polymermodifizierte wasserlösliche Rhodiumkomplexderivate als Mediatoren zur kontinuierlichen indirekt-elektrochemischen NAD(P)H-Regeneration unter Ankopplung einer enzymatischen Reaktion [Dissertation]. Bonn: Friedrich-Wilhelms-Universität.

-
- Sprecher M, Breslow R, Uziel O, Link TM **1994**; "Monosubstituted 2,2'-Bipyridines", *Organic Preparations and Procedures International* 26(6):696-701.
- Steckhan E **1987**; "Organic Syntheses with Electrochemically Regenerable Redox Systems", *Topics in Current Chemistry* 142:1-69.
- Steckhan E **1994**; "Electroenzymatic Synthesis", *Topics in Current Chemistry* 170:83-111.
- Steckhan E, Arns T, Heineman WR, Hilt G, Hoormann D, Jorissen J, Kroner L, Lewall B, Putter H **2001**; "Environmental protection and economization of resources by electroorganic and electroenzymatic syntheses", *Chemosphere* 43(1):63-73.
- Steckhan E, Herrmann S, Ruppert R, Dietz E, Frede M, Spika E **1991**; "Analytical Study of a Series of Substituted (2,2'-Bipyridyl)(Pentamethylcyclopentadienyl)Rhodium and Iridium Complexes with Regard to Their Effectiveness as Redox Catalysts for the Indirect Electrochemical and Chemical-Reduction of NAD(P)⁺", *Organometallics* 10(5):1568-1577.
- Steckhan E, Herrmann S, Ruppert R, Thommes J, Wandrey C **1990**; "Continuous Generation of NADH from NAD⁺ and Formate Using a Homogeneous Catalyst with Enhanced Molecular-Weight in a Membrane Reactor", *Angewandte Chemie-International Edition in English* 29(4):388-390.
- Stillger T, Bonitz M, Villela M, Liese A **2002**; "Overcoming thermodynamic limitations in substrate-coupled cofactor regeneration processes", *Chemie Ingenieur Technik* 74(7):1035-1039.
- Stillger T, Pohl M, Wandrey C, Liese A **2006**; "Reaction engineering of benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* catalyzing enantioselective C-C bond formation", *Organic Process Research & Development* 10(6):1172-1177.
- Szczesna M, Galas E, Bielecki S **2001**; "PVA-biocatalyst with entrapped viable *Bacillus subtilis* cells", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 11(4-6):671-676.
- Tamminen A, Vuorilehto K, Ylasaari S **1996**; "Scale-up of an electrochemical cell for oxygen removal from water", *Journal of Applied Electrochemistry* 26(1):113-117.
- ten Brink GJ, Arends IWCE, Hoogenraad M, Verspui G, Sheldon RA **2003**; "Catalytic conversions in water. Part 22: Electronic effects in the (diimine)palladium(II)-catalysed aerobic oxidation of alcohols", *Advanced Synthesis & Catalysis* 345(4):497-505.
- Thompson K, Michielsen S **2006**; "Novel synthesis of N-substituted polyacrylamides: Derivatization of poly(acrylic acid) with amines using a triazine-based condensing reagent", *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* 44(1):126-136.
- Torchilin VP, Papisov MI, Smirnov VN **1985**; "Magnetic Sephadex as a Carrier for Enzyme Immobilization and Drug Targeting", *Journal of Biomedical Materials Research* 19(4):461-466.
-

- Trivedi A, Heinemann M, Spiess AC, Dausmann T, Büchs J **2005**; "Optimization of adsorptive immobilization of alcohol dehydrogenases", *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99(4):340-347.
- Trost EM, Fischer L **2002**; "Minimization of by-product formation during D-amino acid oxidase catalyzed racemate resolution of D/L-amino acids", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 19:189-195.
- Tumturk H, Karaca N, Demirel G, Sahin F **2007**; "Preparation and application of poly(N,N-dimethylacrylamide-co-acrylamide) and poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)/kappa-Carrageenan hydrogels for immobilization of lipase", *International Journal of Biological Macromolecules* 40(3):281-285.
- Ugi I **1962**; "Neuere Methoden Der Präparativen Organischen Chemie .4. Mit Sekundär-Reaktionen Gekoppelte Alpha-Additionen Von Immonium-Ionen und Anionen an Isonitrile", *Angewandte Chemie-International Edition* 74(1):9.
- Uhlenbrock K. 1994. Methoden zur reaktionstechnischen Optimierung enzymatischer Synthesen - dargestellt am Beispiel der enantioselektiven Reduktion von p-Chloracetophenon im organisch-wässrigen Zweiphasensystem [Dissertation]. Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität. 1-150 p.
- van der Donk W **2003**; "Recent developments in pyridine nucleotide regeneration", *Current Opinion in Biotechnology* 14(4):421-426.
- van Rantwijk F, Sheldon RA **2007**; "Biocatalysis in ionic liquids", *Chemical Reviews* 107(6):2757-2785.
- Villela M, Stillger T, Müller M, Liese A, Wandrey C **2003**; "Is log P a convenient criterion to guide the choice of solvents for biphasic enzymatic reactions?" *Angewandte Chemie-International Edition* 42(26):2993-2996.
- Vrbova E, Marek M **1990**; "Application of the Ugi Reaction for the Preparation of Enzyme Electrodes", *Analytica Chimica Acta* 239(2):263-268.
- Vuorilehto K **2008**; "Stable, colourless and water-soluble electron-transfer mediators used in enzyme electrochemistry", *Journal of Applied Electrochemistry* 38(10):1427-1433.
- Vuorilehto K, Lütz S, Wandrey C **2004**; "Indirect electrochemical reduction of nicotinamide coenzymes", *Bioelectrochemistry* 65(1):1-7.
- Wagenknecht PS, Penney JM, Hembre RT **2003**; "Transition-metal-catalyzed regeneration of nicotinamide coenzymes with hydrogen", *Organometallics* 22(6):1180-1182.
- Wang YL, Chen AM **2008**; "Enantioenrichment by crystallization", *Organic Process Research & Development* 12(2):282-290.
- Westerhausen D, Herrmann S, Hummel W, Steckhan E **1992**; "Formate-Driven, Nonenzymatic NAD(P)H Regeneration for the Alcohol-Dehydrogenase Catalyzed Stereoselective Reduction

-
- of 4-Phenyl-2-Butanone", *Angewandte Chemie-International Edition in English* 31(11):1529-1531.
- Wichmann R **2005**; "Cofactor regeneration at the lab scale", *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 92:225-260.
- Willner I, Maidan R, Willner B **1989**; "Photochemically Induced Oxidative and Reductive Regeneration of NAD(P)⁺ NAD(P)H Cofactors - Applications in Biotransformations", *Israel Journal of Chemistry* 29(2-3):289-301.
- Wilson L, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Illanes A, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R **2006**; "Improvement of the functional properties of a thermostable lipase from *Alcaligenes sp* via strong adsorption on hydrophobic supports", *Enzyme and Microbial Technology* 38(7):975-980.
- Wolberg M, Hummel W, Muller M **2001**; "Biocatalytic reduction of beta,delta-diketo esters: A highly stereoselective approach to all four stereoisomers of a chlorinated beta,delta-dihydroxy hexanoate", *Chemistry-a European Journal* 7(21):4562-4571.
- Wolfe JP, Buchwald SL **2000**; "Scope and limitations of the Pd/BINAP-catalyzed amination of aryl bromides", *Journal of Organic Chemistry* 65(4):1144-1157.
- Wöltinger J, Henniges H, Krimmer HP, Bommarius AS, Drauz K **2001**; "Application of the continuous Sharpless dihydroxylation", *Tetrahedron-Asymmetry* 12(15):2095-2098.
- Xi FN, Wu JM, Jia ZS, Lin XF **2005**; "Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead", *Process Biochemistry* 40(8):2833-2840.
- Zhao HM, van der Donk WA **2003**; "Regeneration of cofactors for use in biocatalysis", *Current Opinion in Biotechnology*:583-589.
-