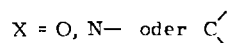
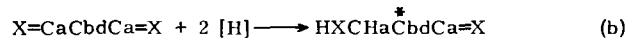
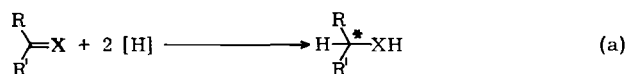


Von Helmut Simon*, Johann Bader, Helmut Günther, Stefan Neumann und
Jordanes Thanos

Die Gewinnung chiraler Verbindungen durch stereospezifische biokatalytische Reduktion ist seit vielen Jahrzehnten bekannt, doch erst im letzten Jahrzehnt hat man sich in stärkerem Maße um eine Weiterentwicklung der Verfahren bemüht, sei es durch Einsatz vorher nicht verwendeter Mikroorganismen und Elektronendonoren, durch Auffinden weiterer Substrate für bekannte Reduktasen, durch Erarbeitung von Methoden zur Regenerierung reduzierter Pyridinnucleotide oder durch die Entdeckung von Reduktasen, die unter präparativen Aspekten gesucht wurden. Heute lassen sich zahlreiche chirale Verbindungen durch mikrobielle Hydrierung mit H_2 und Mikroorganismen, die Hydrogenase enthalten, sowie durch elektromikrobielle oder elektroenzymatische Reduktion herstellen. Bei den beiden letztgenannten Methoden werden anaeroben oder aeroben Organismen Elektronen durch elektrochemisch reduzierte künstliche Mediatoren, z. B. Methylviologen, zugeführt. Besonders nützlich sind Reduktasen, die keine Pyridinnucleotide benötigen und Elektronen direkt von reduzierten Viologen aufnehmen können. Zwei Beispiele für solche präparativ interessanten Enzyme werden beschrieben. Viele Zellen enthalten Methylviologen-abhängige NAD(P)-Reduktasen, die häufig noch nicht charakterisiert sind. Die verschiedenen Methoden der Biokonversion mit Mikroorganismen werden anhand einer Produktivitätszahl verglichen. Nicht selten lassen sich durch die in diesem Beitrag geschilderten Methoden Verbindungen mit zehn- bis hundertfach höheren Produktivitätszahlen gewinnen als dies auf konventionellem Wege möglich ist.

1. Einleitung

Durch stereospezifische Reduktion passend substituierter ungesättigter Verbindungen lassen sich zahlreiche chirale Produkte nach Reaktion (a) oder (b) erhalten.



Bei Reaktionstyp (a) muß der Biokatalysator nur die *Re*- und *Si*-Seite eines π -Systems unterscheiden. Bei Reaktionstyp (b) sind zwei Fälle möglich: Eines der ursprünglich sp^2 -hybridisierten C-Atome wird durch die Reduktion nicht zu einem Chiralitätszentrum; dann muß nur zwi-

schen der *pro-R*- und *pro-S*-Gruppe ($-C^a=X$) unterschieden werden. Ist a jedoch ein Substituent, der bewirkt, daß aus dem π -System durch Hydrierung eine chirale Gruppe entsteht, dann erhebt sich die Frage nach der Diastereomerenreinheit, da neben der *pro-R*- und *pro-S*-Gruppe noch die *Re*- und *Si*-Seite unterschieden werden muß.

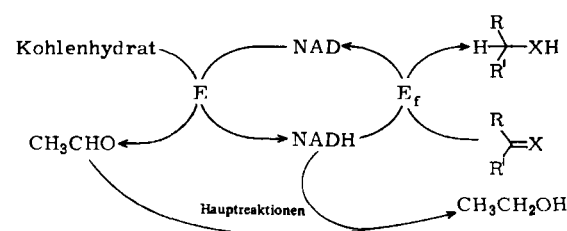
Reaktionstyp (a) ist wichtiger als (b). Carbonylgruppen wurden viel häufiger reduziert als CC-Doppelbindungen. Die Reduktion von CN-Doppelbindungen ist selten beschrieben, spielt aber bei der reduktiven Aminierung von Oxoverbindungen, z. B. bei der Gewinnung von Aminosäuren, eine wesentliche Rolle. Über die mikrobielle enantio-

selektive Reduktion von Ketonen wurde kürzlich zusammenfassend berichtet^[1] (weitere Übersichtsartikel und Literaturzusammenstellungen siehe [2-8]).

Bereits vor mehr als 70 Jahren wurde durch fermentierende Hefe Phenylglyoxylsäure zu Mandelsäure reduziert^[9]. Mitte der fünfziger Jahre war in etwa 160 Publikationen die Reduktion von Ketonen zu chiralen Alkoholen beschrieben. Mikrobielle Reduktionen von Systemen des Typs $-CH=C<$ waren in nur ca. 20 Arbeiten behandelt^[2]. Später wurden neben Mikroorganismen mehr oder weniger reine Enzyme zur präparativen Reduktion ungesättigter Verbindungen eingesetzt^[4, 10, 11]. Die verwendeten Reduktasen benötigten jedoch reduzierte Pyridinnucleotide (Nicotinamadenin-dinucleotid = NAD oder Nicotinamadenin-dinucleotidphosphat = NADP). Diese Cofaktoren kosten pro mol noch immer einige tausend Mark. Daher müssen sie während der Reaktion regeneriert werden, um in katalytischen Mengen eingesetzt werden zu können.

Sechs verschiedene Methoden der biokatalytischen Reduktion lassen sich durch den Donor und den Weg des Elektronentransports vom Donor zum Substrat beschreiben:

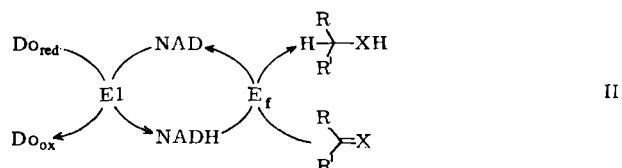
- Für mikrobielle Reduktionen wurden bisher meist Kohlenhydrate als Elektronendonoren zur Reduktion des ungesättigten Substrats eingesetzt. Nach einer Serie von



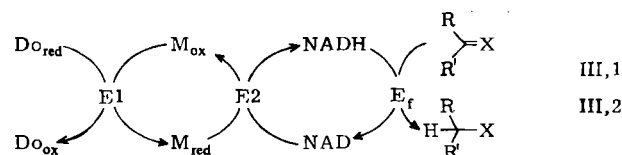
[*] Prof. Dr. H. Simon, Dr. J. Bader, Dr. H. Günther, Dr. S. Neumann,
Dr. J. Thanos
Organisch-chemisches Institut der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-8046 Garching

enzymkatalysierten Schritten entsteht aus dem Kohlenhydrat NADH und ein Elektronenacceptor, z. B. Acetaldehyd oder Pyruvat (Weg I). Die gewünschte Reaktion, katalysiert durch die „finale“ Reduktase E_f , ist in der Regel eine Nebenreaktion.

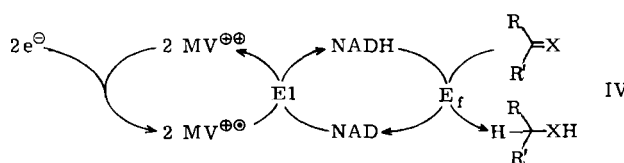
- Günstiger ist ein System, bei dem der Elektronendonator Do_{red} in einem Schritt und praktisch irreversibel NAD in NADH überführt, das unter Katalyse von E_f verbraucht werden kann (Weg II). Für diesen Weg können auch zwei isolierte Enzyme aus verschiedenen Quellen kombiniert werden.



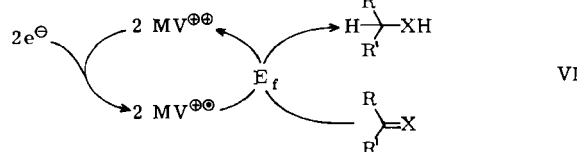
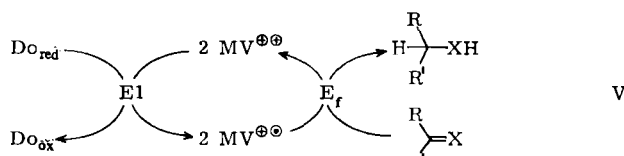
- Systeme, bei denen der primäre Elektronendonator, z. B. H_2 oder Formiat, erst einen natürlichen Elektronenmediator (z. B. Ferredoxin) zu M_{red} reduziert, der seinerseits, katalysiert durch E_2 , NAD in NADH überführt, können ebenfalls recht günstig sein (Weg III, 1). Häufig kann der Elektronentransport dabei noch beschleunigt werden, wenn anstatt eines natürlichen ein künstlicher Mediator, z. B. ein Viologen, verwendet werden kann (Weg III, 2).
- Da Viologene (z. B. Methylviologen = $MV^{\oplus\oplus}$, 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium-Dikation) definiert elektroche-



misch reduziert werden können und nach unseren Befunden Methylviologen-abhängige NAD-Reduktasen weit verbreitet scheinen, hat sich Weg IV in vielen Fällen bewährt.



- Nach weiteren Befunden von uns gibt es präparativ brauchbare Reduktasen, die Elektronen direkt von reduzierten Viologen übernehmen können. Damit eröffnen sich die Wege V und VI. Bei Weg V wird z. B. mit H_2



oder Formiat als Elektronendonator enzymatisch reduziertes Methylviologen erzeugt, und bei Weg VI, dem kürzesten und einfachsten Elektronentransportsystem, werden dem Enzym E_f die Elektronen über den Mediator MV^{\oplus} elektrochemisch, d. h. „aus der Steckdose“, zugeführt.

Die sechs Wege sind in Tabelle 1 kurz charakterisiert und werden in Abschnitt 2.2 vom praktischen Standpunkt

Tabelle 1. Möglichkeiten der biologischen Reduktion.

Charakteristicum	Elektronendonor	Katalysator(en) zur NAD(P)H-Regenerierung oder zur Reduktion der finalen Reduktase	Schema des Elektronenflusses	Bemerkungen
NAD(P)H-Bildung erst nach einer Reihe von enzymkatalysierten Schritten und Bildung konkurrierender Elektronenacceptoren	Glucose oder andere Kohlenhydrate	Ganze Zellen, z. B. Hefen oder Bakterien	I	Am häufigsten angewandt; meist geringe Produktivitätszahlen
Direkte NADH-Bildung	$HCOOH$, H_2 , CH_3CH_2OH	Ganze Zellen, z. B. <i>Pseudomonas ovalis</i> , <i>Arthrobacter spec.</i> oder <i>Clostridium kluyveri</i>	II	Noch wenig praktiziert; Zellen zur NADH-Regenerierung verwendet
Reduktion von NAD(P) über natürliche oder künstliche Mediatoren	H_2 , $HCOOH$	Ganze Zellen, z. B. Clostridien oder <i>Proteus vulgaris</i> ; mit oder ohne Mediatoren wie Viologenen	III, 1; III, 2 oder V	Zahlreiche α,β -ungesättigte Carboxylate und 2-Oxocarboxylate wurden zu chiralen Verbindungen reduziert
System aus zwei Enzymen	$HCOOH$ oder andere Substrate einer NAD-abhängigen Dehydrogenase, z. B. Isopropanol oder Cyclohexanol	Dehydrogenase und finale Reduktase	II	In einigen Fällen mit molekulargewichtvergrößertem NAD im Membranreaktor im Pilotmaßstab bewährt
Elektromikrobiell	Kathode einer elektrochemischen Zelle	Zellen mit Methylviologen-abhängiger NAD(P)H-Reduktase und Pyridinnucleotid-abhängiger finaler Reduktase	IV	Beispiele in diesem Aufsatz
Elektroenzymatisch	Kathode einer elektrochemischen Zelle	Zellen mit finaler Reduktase, die Elektronen direkt von Mediatoren wie Viologen aufnehmen können oder die isolierte finale Reduktase	VI	Bisher bekannte Beispiele: Enolat-Reduktase und 2-Oxocarboxylat-Reduktase. Beide zeigen große Substratbreite

aus besprochen. Es ist uns gelungen, durch bisher selten verwendete Mikroorganismen und darin vorkommende neue Enzymtypen und durch bisher nicht oder kaum verwendete Methoden der Coenzymregenerierung die biokatalytische Reduktion methodisch deutlich zu erweitern.

2. Was konnte und kann durch neue Methoden verbessert werden?

2.1. Kriterien zur Beurteilung einer Stoffumwandlung mit Mikroorganismen

Die Effizienz einer Stoffumwandlung mit Mikroorganismen läßt sich mit einer sogenannten Produktivitätszahl (PZ)^[12, 13] charakterisieren:

$$PZ = \frac{\text{Produktmenge [mmol]}}{\text{Trockenmasse Katalysator [kg]} \times \text{Zeit [h]}}$$

Hohe Produktivitätszahlen bedeuten bessere Volumen-Zeit-Ausbeuten und in der Regel einfachere Isolierung der Produkte. Sollen z. B. 500 mmol eines Produkts in 24 h erhalten werden, so braucht man bei einer häufig beobachteten Produktivitätszahl von 20 ca. 1000 g Katalysator und bei einer von 2000 nur 10 g. Auch ist es wesentlich einfacher, 100 g eines Produkts von 10 g Katalysator (Mikroorganismen) abzutrennen als von 1000 g. Falls ein Mikroorganismus zu 50% aus Protein besteht, so ergibt sich für diese Produktivitätszahlen und der in der Biochemie üblichen Angabe von Enzymeinheiten U folgender Zusammenhang: Ist im Rohextrakt eines Organismus das für eine Umsetzung geschwindigkeitsbestimmende Enzym mit der spezifischen Aktivität von 1 U/mg Protein (1 µmol Umsatz/mg Protein × min) enthalten, so kann eine Produktivitätszahl von 30000 erreicht werden. Dies setzt allerdings voraus, daß keine anderen Faktoren, z.B. Transportvorgänge, Konzentrationslimitierungen, Hemmwirkungen des Substrats und/oder des Produkts wirksam werden. (Aktivitätsangaben in SI-Einheiten, wonach eine Enzymmenge die Aktivität 1 Katal hat, wenn sie 1 mol pro s umsetzt, sind noch wenig gebräuchlich. 1 U \approx 16,7 · 10⁻⁹ Katal.)

Neben guten Produktivitätszahlen sind folgende Faktoren für Biokonversionen wichtig:

- Verfügbarkeit der Zellen. Sind Zellen oder ist Impfmateri- al von einer Mikroorganismensammlung käuflich, und ist die Zellanzucht einfach und reproduzierbar?
- Reaktionsspezifität. Wird das Substrat nur in das gewünschte Produkt umgewandelt oder werden Substrat und/oder Produkt noch anderweitig umgesetzt?
- Hohe Stereospezifität des Enzyms (oder gleiche und hohe Stereospezifität der katalysierenden Enzyme). Viele Enzyme reagieren mit sehr hoher Stereospezifität, es gibt jedoch auch zahlreiche Ausnahmen^[14]. Weiterhin kann ein Mikroorganismus zwei oder mehr Enzyme besitzen, die ein Substrat stereochemisch verschieden umsetzen. Zur Diskussion dieses Sachverhalts siehe ^[1].
- Michaelis-Menten- und Inhibitions-Konstanten (K_m bzw. K_i) von Substrat bzw. Substrat und Produkt für das katalysierende Enzym. Kleine K_m -Werte ermöglichen eine rasche Umsetzung (auch der letzten 5–10%) des Substrats, d.h. die Reaktion wird nicht „schleichend“

beendet. Kleine K_i -Werte für das Substrat erfordern eventuell eine kontinuierliche Substratzugabe, was in der Regel dann nicht schwierig ist, wenn die Reaktionsgeschwindigkeit und damit die jeweils aktuelle Substratkonzentration bekannt ist. Bei kleinen K_i -Werten für das Produkt muß dieses selektiv entfernt werden, was meist nur mit erheblichem Aufwand möglich ist.

- Stabilität des Biokatalysators. Hier ist zu unterscheiden, ob man mit sogenannten ruhenden oder mit sich vermehrenden Zellen arbeitet. Im ersten Fall können die Aktivitäten der benötigten Enzyme oder die Konzentrationen der Cosubstrate wie NAD(P) oder NAD(P)H, z. B. im Verlauf von 24 h, stark abfallen bevor das Substrat umgesetzt ist. Beim Arbeiten mit wachsenden Zellen ist die Produktisolierung in der Regel durch die große Menge an Biokatalysator erschwert und je nach Mikroorganismus können Substrat und/oder Produkt noch anderweitig umgesetzt werden.
- Eignung zum Immobilisieren. Um die Produkte leichter zu isolieren und um den Biokatalysator (intakte Zellen, Rohextrakte oder Enzyme) zu stabilisieren und eventuell wiederzuverwenden, kann es wünschenswert sein, ihn zu immobilisieren. Hierfür sind Biokatalysatoren unterschiedlich gut geeignet.
- Lagerstabilität. Es ist vorteilhaft, wenn ein einmal hergestellter Biokatalysator, z. B. in eingefrorenem Zustand, seine Enzymaktivitäten lange erhält.

2.2. Wertung alter und neuerer Verfahren

Gemessen an vorstehend genannten Kriterien ist der für Reduktionen meistbenutzte Biokatalysator, die Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), angewandt nach Reaktionsweg I (siehe Tabelle 1), wenig geeignet. Zwar lassen Zugänglichkeit und Stabilität nichts zu wünschen übrig, doch können nach Reaktionsweg I prinzipiell keine hohen Produktivitätszahlen erreicht werden: Bei Kohlenhydraten als Elektronendonoren müssen z. B. fünf oder sechs enzymkatalysierte Reaktionen ablaufen, bis NADH gebildet wird. Dabei kann auch die Aufnahme der Kohlenhydrate geschwindigkeitslimitierend sein^[15]. Außerdem entsteht bei der alkoholischen Gärung Acetaldehyd, der um das Reduktionsmittel konkurriert. In der Regel ist die Ethanolbildung die Hauptreaktion. So wird berichtet, daß bei der Reduktion von 1 mol Keton 200–2000 mol Ethanol entstehen^[16, 17].

Die experimentellen Angaben in vielen Publikationen erlauben die Berechnung oder auch nur die Abschätzung von Produktivitätszahlen nicht. Dort, wo eine Berechnung möglich ist^[17–26], zeigt sich, daß die meisten mit Mikroorganismen und Kohlenhydraten durchgeführten Reduktionen Produktivitätszahlen von 5–50 aufweisen. Werte um 200 sind selten. Der höchste uns bekannte Wert mit ca. 1000 wurde bei der Hefe-Reduktion von 2,2,6-Trimethyl-5-cyclohexen-1,4-dion zu (6R)-2,2,6-Trimethyl-1,4-cyclohexandion erzielt^[24]. Die besondere Problematik der Anwendung nicht standardisierter Bäckerhefe und nicht standardisierter Methoden demonstrieren die seit fünf Jahrzehnten publizierten Arbeiten zur Darstellung von chiralem 3-Hydroxybuttersäureester^[22, 25, 26]. Allein in den Publikationen der letzten sieben Jahre werden für die Herstellung

von (S)-3-Hydroxybuttersäureethylester mit Bäckerhefe Enantiomerenüberschüsse (*ee*-Werte) zwischen 80 und 97% angegeben^[22, 25]. Dabei wurden Produktivitätszahlen von ca. 100 gefunden^[22]. Die *ee*-Werte von 95–97% für das (S)-Enantiomer sind jedoch nur erreichbar, wenn die Konzentration des 3-Oxoesters 1 g/L nicht übersteigt. Bei einer Konzentration von 5 g/L werden nur noch *ee*-Werte von 72% erzielt. *Mucor javanicus*^[27] und *Geotrichum candidum*^[22] reduzieren zum (R)-Enantiomer. *Sih et al.*^[11, 21, 27] haben durch ihre Untersuchungen zur Herstellung des als Carnitinvorläufers interessierenden 4-Chlor-3-hydroxybuttersäureesters zur Klärung der Verhältnisse bei Reduktionen mit Bäckerhefe beigetragen (vgl. Abschnitt 3.2).

Selten und erst in jüngster Zeit wurden für ganze Zellen Elektronendonoren verwendet, die keine Kohlenhydrate sind. Es erhebt sich die Frage, ob nicht auch bei Hefe Ethanol als Elektronendonor der Glucose vorzuziehen wäre. Auch wurde vorgeschlagen, Ketone mit Hefe ohne Zusatz von Kohlenhydraten oder eines anderen Elektronendonors zu reduzieren und stattdessen entsprechend mehr Zellmaterial zu verwenden^[17].

Die unterschiedlichen Ergebnisse in einer Fülle von Arbeiten zeigen, daß die biochemischen Grundlagen von Reduktionen nicht immer durchdacht werden und daß den Anwendern nicht immer klar ist, daß Bäckerhefe nicht gleich Bäckerhefe ist. Selbst beim gleichen Stamm kann das Verhalten bei Reduktionen stark von Anzuchtbedingungen (Nährmedium, Temperatur, Wachstumsphase) abhängen. Ein Beispiel ist die Reduktion der 5-ständigen Oxogruppe des Monothioacetals von 5,6-Dioxocaprinsäuremethylester. *Takaishi et al.*^[29] fanden für das Produkt, das mit verschiedenen Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae* erhalten wurde, spezifische Drehwerte zwischen +5.4 und –21.1°. Probleme dieser Art gibt es bei mehr oder weniger allen Mikroorganismen.

Nach unseren Befunden^[12, 13, 30–34] ist H₂ als Elektronendonor (Weg III, 1, III, 2 oder V) für Reduktionen mit Hydrogenase enthaltenden Organismen besonders günstig. In diesen Fällen ist Do_{red} H₂; dies gilt vor allem, falls Weg V gangbar ist. Auch der Einsatz von Formiat könnte in vielen Fällen vorteilhaft sein. Es kommen in Hefen NAD-abhängige Formiat-Dehydrogenasen vor. *Allais et al.*^[35] fanden im Rohextrakt von *Pichia pastoris* ein solches Enzym mit 0.16 U/mg Protein. *Schütte et al.*^[36] isolierten aus der Hefe *Candida boidinii* eine Formiat-Dehydrogenase, die sich im Enzymmembran-Reaktor der Arbeitsgruppen von *Kula* und *Wandrey* sehr gut zur NADH-Regenerierung bewährt (siehe unten). *Izumi et al.*^[37] verwenden die NAD-abhängige Formiat-Dehydrogenase aus Methanol verwertenden Bakterien, um mit Formiat NADH zu regenerieren. Dabei werden Produktivitätszahlen für die Regenerierung bis fast 6000 erhalten.

Beispiele für die Verwendung von Ethanol als Elektronendonor (Tabelle 1) sind die von *Noma et al.*^[38] durchgeführten Reduktionen von (+)- und (–)-Carvon mit *Pseudomonas ovalis*. Wir reduzierten diverse Allylalkoholderivate mit *Clostridium kluyveri* und Ethanol zu chiralen Alkoholen wie (R)-2-Methyl-1-butanol, (R)-3-Methyl-1-pentanol und (2R,3S)-2-Methyl-3-phenyl[2,3-²H]-1-propanol^[39]. Der Vorteil von Ethanol gegenüber H₂ in diesem speziellen Fall wird in Abschnitt 3.1 erklärt werden (vgl. auch ^[40]).

Falls im präparativen Maßstab mit Enzymen statt mit Zellen gearbeitet wird, muß bei Verwendung NAD(P)H-abhängiger Reduktasen ebenfalls eine enzymatische NAD(P)H-Regenerierung erfolgen (Tabelle 1, Weg II). Es ist bisher nicht gelungen, NAD(P) chemisch oder elektrochemisch mit praktisch verwertbaren Cyclenzahlen zu reduzieren (über neuere Versuche in dieser Hinsicht siehe *Wienkamp und Steckhan*^[41, 42]). Die Arbeitsgruppen von *Kula* und *Wandrey* berichteten, daß an Polyethylenglykol gebundenes NAD in einem Enzymmembran-Reaktor bei der Herstellung von Aminosäuren mit Hilfe von Formiat-Dehydrogenase verwendet werden konnte, wobei Cyclenzahlen von bis zu 80000 erreicht wurden^[43]. Über weitere Möglichkeiten der enzymatischen NAD(P)H-Regenerierung wurde in den letzten Jahren viel publiziert^[44–47] (siehe auch Abschnitt 4.2).

Im Laboratoriumsmaßstab ist die NAD-Regenerierung, insbesondere mit der Formiat-Dehydrogenase-Methode oder mit einem der später beschriebenen Verfahren, heute eine Routineoperation. Durch die Kombination der NADH-Regenerierung mit einigen wenigen Reduktasen sind bereits zahlreiche chirale Verbindungen zugänglich. So haben z. B. *Jones et al.*^[11, 48] sowie *Nakazaki et al.*^[49] für Leber-Alkohol-Dehydrogenase in den letzten Jahren zahlreiche weitere Substrate für dieses, seit Jahrzehnten wohlbekannte Enzym gefunden. Auf interessante Anwendungen einer Alkohol/Aldehyd/Keton-Oxidoreduktase aus dem thermophilen *Thermoanaerobium brokii* wiesen *Lamed et al.*^[50] hin. Über mögliche Anwendungen von Oxidoreduktasen berichteten *May und Padgett*^[51]. Es ist anzunehmen, daß noch weitere präparativ oder gar technisch nutzbare Oxidoreduktasen gefunden werden, da die Suche nach ihnen unter dem Anwendungsgesichtspunkt erst vor wenigen Jahren intensiv begonnen wurde. Zu jüngst gefundenen Enzymen dieser Art gehören (S)-Phenylalanin- oder (S)-Hydroxy-4-methylpentanoat-Dehydrogenase^[52, 53].

Auch die enzymatische Reduktion unpolarer Verbindungen ist mit NADH-regenerierenden Systemen möglich. *Hilhorst et al.*^[54] regenerierten NADH in inversen Micellen mit Hydrogenase, Methylviologen und Lipoamid-Dehydrogenase. Die 20 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase wurde benutzt, um Progesteron, gelöst in Hexanol/Octan, an der Grenzschicht zur wäßrigen Phase zu 20 β -Hydroxy-4-pregnen-3-on zu reduzieren. Die Wege IV und VI können durch Einsatz elektrochemischer Zellen zur kontinuierlichen Reduktion katalytischer Mengen von artifiziellen Elektronenüberträgern genutzt werden, um mit häufig in Mikroorganismen anwesenden NAD(P)-Reduktasen NAD(P)H zu regenerieren (Weg IV) oder um Elektronen direkt auf die finale Reduktase E_r zu übertragen.

3. Hydrierung mit Mikroorganismen

3.1. Hydrierung der CC-Doppelbindung α,β -ungesättigter Aldehyde und Carbonsäuren





Nach unseren Untersuchungen kann mit einigen Mikroorganismen H₂ als Elektronendonor verwendet werden^[12, 13, 30–34, 55]. Damit sind folgende Vorteile verbunden: 1. Das Gleichgewicht der Reaktion (c) liegt extrem auf der rechten Seite. 2. Der Elektronendonor kann bei ruhenden



Zellen nur für die gewünschte Reaktion verwendet werden; Nebenreaktionen wie sie z. B. mit Acetaldehyd oder anderen Produkten, die aus Kohlenhydraten entstehen, ablaufen können, finden nicht statt. 3. Die Reaktion kann aufgrund des Wasserstoffverbrauchs kontinuierlich verfolgt werden. 4. Die Produktivitätszahlen sind häufig 10–100mal höher als bei Reduktionen mit Hefen, was die Isolierung der Produkte wesentlich erleichtert. Nach unseren Befunden werden Produktivitätszahlen von 1000 bis 3000 dann häufig erreicht, wenn katalytische Mengen (1–4 mM) eines artifiziellen Elektronenüberträgers, z. B. Methylviologens, zugesetzt werden. Der Elektronenfluß bei der Reduktion mit Clostridien läßt sich durch Weg III, 1 oder III, 2 beschreiben.

Nachfolgend werden Hydrierungen mit *Clostridium spec. La1* (DSM 1460), *Clostridium kluyveri* (DSM 555), *Proteus mirabilis* (DSM 30115) sowie *Proteus vulgaris* (DSM 30118) behandelt. Zahlreiche α,β -ungesättigte Carbonsäuren oder Aldehyde (Tabelle 2 und 3) lassen sich mit *C. La1*

Tabelle 2. Enoate des Typs $\text{R}^1\text{R}^2\text{C}=\text{CR}^3\text{CO}_2^-$, die mit *Clostridium La1* und H_2 hydrierbar sind [a]. Bei den letzten fünf Verbindungen handelt es sich um Allenderivate.

R^1	R^2	R^3	Relative Geschwindigkeit [%] [b]
H	H	H	320
H	H	Me	170
Me	Me	H	150
Me	H	Me	30
H	Me	Me	20
Me	H	H	300
H	Et	H	100
H	Pr	H	90
H		H	100
H		H	130
H		H	100
H		H	20
CN	H	OEt [c]	20
Me	C_6H_5	H	40
OMe	$p\text{-ClC}_6\text{H}_4$	H	90
Br	C_6H_5	Br	90
Me	EtCH=	—	—
Et	MeCH=	—	—
Et	PhCH=	80	—
H	Ph(Et)C=	—	—
Et	Ph(Et)C=	—	—

[a] Auch alle Verbindungen in Tabelle 3 sind hydrierbar, da sie Substrate der Enoat-Reduktase sind. [b] Eine relative Geschwindigkeit 100 bedeutet, daß von 400 mg nassem Zellsediment (≈ 80 mg Trockenmasse) bei 35°C und pH 7.0 100 mM Lösungen mit einer Geschwindigkeit von $150 \mu\text{mol/h}$ hydriert werden. Dies entspricht einer Produktivitätszahl von ca. 1900. [c] *E/Z*-Verhältnis nicht bekannt.

(Weg V, Tabelle 1) hydrieren. Dabei ist $\text{Do}_{\text{red}} = \text{H}_2$, E_1 eine Hydrogenase und E_2 die von uns entdeckte Enoat-Reduktase (EC 1.3.1.31)^[13,56–60]. Dieses Enzym katalysiert unter anderem die Reaktionen (d) und (e)^[12,13,60,61].

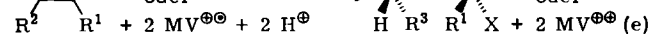
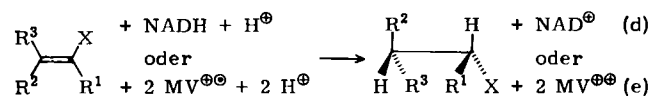
Die Umsetzung mit $\text{MV}^{\oplus\oplus}$ ist 1.5mal so schnell wie die mit NADH. Die Substratbreite der Enoat-Reduktase ist

Tabelle 3. Substrate ($\text{R}^1\text{R}^2\text{C}=\text{CR}^3\text{X}$) der Enoat-Reduktase, die nach Gleichung (d) oder (e) reduziert werden [a], aber auch mit H_2 und Zellen von *C. La1* hydrierbar sind.

R^1	R^2	R^3	v_{max} [b]	K_m [c]
Me	Me	H	100	1.5
H	Me	H	280	0.8
H	Et	Me	11	—
H	Me	Et	11	—
H	<i>i</i> Pr	H	130	—
H	COOMe	H	9	—
H	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}_2$	H	18	[d]
H	C_6H_5	H	60	0.013
H	$p\text{-ClC}_6\text{H}_4$	H	88	—
H	$p\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4$	H	30	—
H	$p\text{-MeOC}_6\text{H}_4$	H	44	—
H	$p\text{-Me}_2\text{NC}_6\text{H}_4$	H	29	—
H	$o\text{-HOC}_6\text{H}_4$	H	35	—
NHCHO	C_6H_5	H	21	—
H	$o,m\text{-(MeO)}_2\text{C}_6\text{H}_3$	H	8	—
F	Me	H	150	6.2 [f]
Cl	H	Me	180	5.2 [f]
Br	Me	H	150 [g, h]	28 [f]
J	H	Me	180 [i]	21 [f]
F	C_6H_5	H	30	0.1
Br	C_6H_5	H	76	0.50
Cl	$p\text{-ClC}_6\text{H}_4$	H	20	0.1
Cl	H	$p\text{-ClC}_6\text{H}_4$	0.03	—
Me	HOCH_2CH_2	H	120	—
H	HOCH_2CH_2	Me	10	10
H	Me	HOCH_2CH_2	9	15
H	Me	$\text{MeOCH}_2\text{CH}_2$	5	14
H	HO	Me	6	3.3
H	$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CHCH}=\text{CHCH}_2$	H	7	—
H	$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3$	Me	19	0.014
H	Me	$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3$	1.1	0.19
H	$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3$	Me	60 [e]	0.06
Me	PhCH=	—	20	—

[a] Falls nicht anders erwähnt ist $\text{X} = \text{COO}^-$. [b] Relative Geschwindigkeiten bezogen auf (*E*)-2-Methylbutenoat (100%). Für dieses Substrat zeigt gereinigte Enoat-Reduktase mit reduziertem Methylviologen bei 25°C eine spezifische Aktivität von 20 U/mg . [c] K_m -Werte in mM. [d] Nur die α,β -Doppelbindung wird hydriert. [e] $\text{X} = \text{CHO}$. [f] 90% *E*- und 10% *Z*-Isomer. [g] Starke Substrathemmung ab 40 mM. [h] Starke Substrathemmung ab 10 mM.

sehr hoch. Folgende Regeln haben sich ergeben: R^1 sollte nicht zu groß sein. NHCOCH_3 - und OC_2H_5 -Reste werden anstelle von NHCHO bzw. OCH_3 nicht akzeptiert, falls R^2

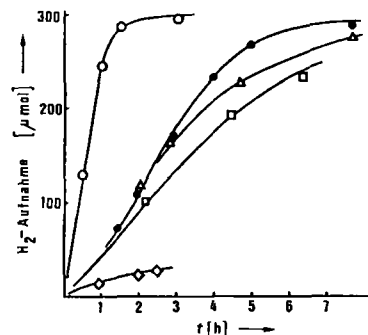


$\text{X} = \text{COO}^-$, $\text{C}=\text{O}$; R^1 , R^2 , R^3 siehe Tabelle 2 und 3

Phenyl ist. Die Halogenatome F, Cl und Br werden in α -Stellung toleriert, in β -Stellung jedoch reduktiv eliminiert^[62,63]. Bei R^2 ergeben sich die geringsten Restriktionen. Verzweigung in β -Stellung führt zu verringerten Aktivitäten. Falls R^2 und R^3 vertauscht werden, d. h. wenn *E*- und *Z*-Isomere von Substraten des Typs $\text{R}^3\text{R}^2\text{C}=\text{CHX}$ umgesetzt werden, so entstehen Enantiomere. Deshalb dürfen keine *E/Z*-Mischungen von Substraten verwendet werden, bei denen das β -C-Atom durch die Reduktion zu einem chiralen Zentrum wird. Wie wir bei der Hydrierung von (*E*)- und (*Z*)-Geraniat (**1a** und **2a**) beobachteten, kann es jedoch zu Komplikationen kommen, wenn mit ganzen Zellen gearbeitet wird. Nach Abbildung 1 ergibt zwar **1a**

[illegible]

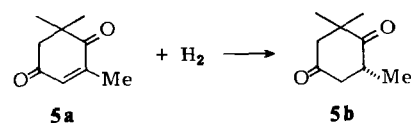
Ein Teil der bisher durchgeführten Hydrierungen ist in den Tabellen 2 und 3 enthalten. Alle Verbindungen, die in Tabelle 3 angegeben sind, wurden auch bereits hydriert. Dabei ist zu beachten, daß mit Enoat-Reduktase und NADH Nitrogruppen nicht reduziert werden, wohl aber mit ganzen Zellen^[65]. Den zeitlichen Verlauf der Hydrierungen zeigt Abbildung 2. Der Elektronenfluß bei der Hydrierung α,β -ungesättigter Carboxylate und anderer Carbonylverbindungen erfolgt mit *C. La1* nach Weg V (Tabelle 1). Dabei kann man zwei Fälle unterscheiden: Falls das ungesättigte Substrat von der Enoat-Reduktase rascher umgesetzt wird, als die Hydrogenase (E1) Methylviologen reduzieren kann, sind die Hydrieransätze zunächst nicht blau. Erst wenn gegen Ende der Hydrierung die Lösung an Substrat verarmt und damit die Enoat-Reduktase nicht mehr gesättigt ist, wird die Lösung durch reduziertes Methylviologen blau. Wird dagegen das ungesättigte Substrat relativ langsam umgesetzt, so daß die Hydrogenase rasch genug Methylviologen reduzieren kann, dann ist die Lösung ständig blau. Abbildung 2 zeigt, daß die Hydrierungen von **3a** und **4a** mit *C. La1* ähnlich schnell verlaufen, obwohl nach Tabelle 3 **3a** mit Enoat-Reduktase ca. zwölfmal so schnell reduziert wird wie **4a**. Bei der Hydrierung



$\text{HOCH}_2\text{C}(\text{Me})=\text{CHCOO}^- + \text{H}_2 \longrightarrow \text{HOCH}_2\text{CH}(\text{Me})\text{CH}_2\text{COO}^-$ (isoliert als Lacton)

$\text{HOCH}_2\text{C}(\text{Me})=\text{CHCH}_2\text{COO}^- + \text{H}_2 \longrightarrow \text{HOCH}_2\text{CH}(\text{Me})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$ (isoliert als Lacton)

Reaktion (e) verläuft zwar bei pH 5.2 am besten^[13], für die Gesamtreaktion der Hydrierung hat sich jedoch ein pH-Wert zwischen 6.5 und 7.0 als optimal herausgestellt. Auch die Hydrierung des Diketons **5a** gelingt – allerdings ohne Methylviologen (vgl. Abschnitt 4.3) – im präparativen Maßstab.



Angew. Chem. 97 (1985) 541-555

doch keine Allylalkoholderivate, und die Zellen besitzen auch kein anderes Enzym, das diese Reduktion katalysiert. Es hat sich herausgestellt, daß die Allylalkoholderivate zunächst zu den entsprechenden Aldehyden dehydriert werden, deren CC-Doppelbindung dann rasch von der Enoat-Reduktase reduziert wird. Anschließend wird die Aldehyd wieder zur Alkoholgruppe reduziert. Dies ist der Grund dafür, daß in solchen Fällen Methylviologen die Reduktion verhindert, da mit H₂ und Methylviologen rasch NAD zu NADH reduziert wird und damit kein NAD zur Dehydrierung des Allylalkoholderivats mehr zur Verfügung steht. In diesen Fällen ist Ethanol der günstigere Elektronendonator^[39,40].

3.2. Hydrierung von Ketonen

Mit Clostridien wie *C. La1* oder *C. kluyveri* lassen sich auch Ketone zu chiralen sekundären Alkoholen reduzieren [Reaktion (f)]. Beispiele zeigt Tabelle 4. In vielen Fällen lassen sich exzellente *ee*-Werte erhalten, in einigen sind sie jedoch gering.



Tabelle 4. Reduktion von Ketonen mit Clostridien. Falls nicht anders erwähnt, wurde H₂ als Elektronendonator verwendet.

Mikroorganismus	Produkt	PZ	Enantiomer	<i>ee</i> [%]
<i>C. kluyveri</i>		1500	(S)	95 [a]
<i>C. kluyveri</i>		80	(2R,3S)	81 [b]
<i>C. kluyveri</i>		350	(R)	99 [c]
<i>C. kluyveri</i>		6	(R)	94 [c]
<i>C. La1</i>		4	(R)	96 [c]
<i>C. La1</i>		22	(R)	94 [c]
<i>C. La1</i>		11	(R)	91 [c]
<i>C. kluyveri</i>		12	(R)	99 [c, d]
<i>C. kluyveri</i>		3	(R)	98 [c, d]
<i>C. kluyveri</i> und <i>Candida utilis</i>		3800	(R)	94
<i>C. kluyveri</i> und <i>Enterobacter agglomerans</i>		3300	(S)	—

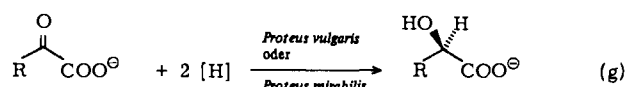
[a] Durch enzymatische Analyse bestimmt. [b] Eingesetzt wurde ein racemisches Gemisch von 2-Methyl-3-oxobuttersäureethylester. Die Reaktionsmischung bestand aus 81% (2R,3S)-3-Hydroxy-2-methylbuttersäureester sowie 13% der (2R,3R)-, 4% der (2R,3S)- und 2% der (2S,3S)-Form. [c] Analyse: B. Koppenhöfer et al., unveröffentlicht. [d] Verwendung von 10% Ethanol als Elektronendonator.

Sih et al.^[1,21,27] haben gefunden, daß bei der Reduktion von Estern des 4-Chlor-3-oxobutyrate mit Bäckerhefe der *ee*-Wert eine Funktion der Größe der Estergruppe ist. Der Methyl ester wird mit einem *ee*-Wert von 65% zum (S)-, der Octylester dagegen mit *ee* = 97% zum (R)-Enantiomer hydriert. Mit den anderen Alkylresten des Typs (CH₂)_nH

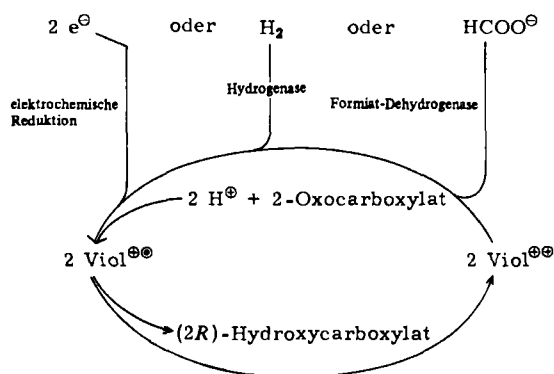
(n = 2–7) werden *ee*-Werte erhalten, die dazwischen liegen. *C. kluyveri* hydriert den Ethylester des 4-Chlor-3-oxobutyrate mit einem *ee*-Wert > 99% mit einer ca. 50fach höheren Produktivitätszahl zum (R)-Enantiomer (*H. Simon* et al. sowie *B. Koppenhöfer* et al., unveröffentlicht). Die Enantiomerenreinheit der mit *C. kluyveri* erhaltenen Phenylethyl- und -propylalkohole scheint bisher noch nicht erreicht worden zu sein. In anderen Fällen (Phenylglykole) sind die *ee*-Werte schlecht; dabei handelt es sich um eine bisher bei Clostridien selten beobachtete Erscheinung. Auch die zum Teil recht niedrigen Produktivitätszahlen gehören zu den Ausnahmen.

3.3. Hydrierung von 2-Oxocarboxylaten

Mit erstaunlicher Substratbreite lassen sich in Gegenwart von reduziertem Methyl- oder Benzylviologen 2-Oxocarboxylate zu (2R)-Hydroxycarboxylaten von sehr hoher Enantiomerenreinheit mit *Proteus mirabilis* oder *Proteus vulgaris* reduzieren [Reaktion (g)]^[47,66,67].

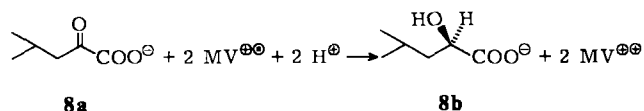
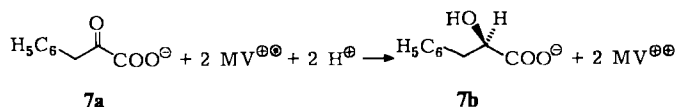
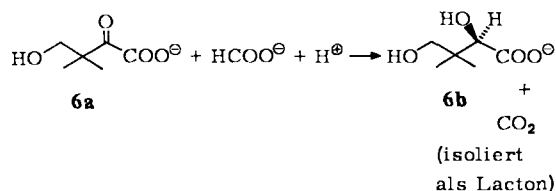


Auch dieser Reaktion liegt ein bisher unbekannter Enzymtyp zugrunde, den wir teilweise charakterisiert haben (siehe Abschnitt 3.6). Statt H₂ kann auch Formiat in Kombination mit einem Viologen als Elektronendonator verwendet werden. Da Viologene (Abschnitt 4) auch elektrochemisch leicht regeneriert werden können, ergeben sich drei Möglichkeiten zur Synthese von (2R)-Hydroxycarbonsäuren (Schema 1). Diese entsprechen den in der Einleitung genannten Wegen V mit Do_{red} = H₂ oder HCOO[−] und VI. Beispiele sind die Reduktionen von 6a–8a zu 6b–8b.



Schema 1. *Proteus vulgaris* kann mit drei Elektronendonoren zur Darstellung von (2R)-Hydroxycarbonsäuren verwendet werden. Viol* = oxidiertes Methyl- oder Benzylviologen; Viol** = reduziertes Viologen. Der Mediator kann entweder elektrochemisch oder durch die im Mikroorganismus vorhandene Hydrogenase und H₂ oder mit einer ebenfalls vorhandenen Formiat-Dehydrogenase und Formiat reduziert werden.

Abbildung 3 zeigt den zeitlichen Verlauf der Reduktion von 4-Methyl-2-oxo-pentanoat 8a mit Formiat und H₂, wobei die (2R)-Hydroxysäure 8b entsteht. Wie in Abschnitt 4.4 dargelegt, lassen sich bei Kenntnis und Ausnutzung der kinetischen Parameter bei der elektromikrobiellen Reduktion Produktivitätszahlen von > 100000 errei-



chen. In Tabelle 5 sind die Substrate aufgelistet, die mit *Proteus mirabilis* oder *Proteus vulgaris* nach Schema 1 reduziert werden können. Bisher ließ sich nur Glyoxylsäure nicht mit diesem Enzym umsetzen.

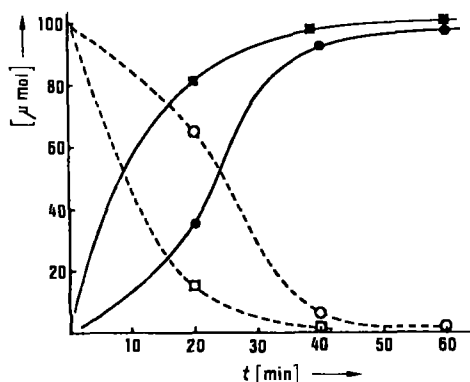


Abb. 3. Reduktion von 4-Methyl-2-oxopentanoat mit *P. vulgaris* und H_2 oder Formiat als Elektronendonator. Abnahme des 4-Methyl-2-oxopentanoats bei der Reduktion mit H_2 ○—○—○ und mit Formiat □—□—□ sowie Bildung des Produkts mit H_2 ●—●—● bzw. mit Formiat ■—■—■.

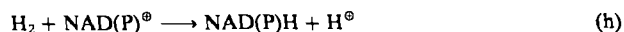
Tabelle 5. Relative Geschwindigkeiten der Reduktion von 2-Oxocarboxylaten durch eine Reduktase in *P. mirabilis* und *P. vulgaris*.

Substrate	Relative Geschwindigkeit [%]	
	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>
Phenylpyruvat [a]	100	100
Pyruvat [a]	92	85
2-Oxobutanoat	40	65
Indolylpyruvat	35	67
5-Benzoyloxyindolylpyruvat	30	—
3-Fluorpyruvat	22	20
4-Methyl-2-oxopentanoat	81	83
(S)-3-Methyl-2-oxopentanoat	28	25
(R,S)-3-Methyl-2-oxopentanoat	63	46
4-Hydroxy-3,3-dimethyl-2-oxopentanoat [a]	7	4
Phenylglyoxylat [a]	16	5
2-Oxononanoat	83	93
2-Oxododecanoat	27	46
2-Oxotridecanoat	23	26
Oxalacetat [a]	73	50
2-Oxoglutarat	78	62
2-Oxadipat	70	73
4-Hydroxymethyl-phosphinyl(2-oxo)-butanoat	24	6

[a] Die Produkte dieser Substrate wurden nach verschiedenen Methoden auf Enantiomerenreinheit untersucht. In keinem Fall konnten (S)-Enantiomere nachgewiesen werden.

3.4. Hydrierung mit zwei Mikroorganismen

Wie in Abschnitt 4.2 näher ausgeführt ist, zeigen Rohextrakte von *C. kluyveri* in Gegenwart von 1–2 mM Methylviologen hohe Aktivitäten für die Reaktion (h).



Reaktion (h) entspricht einem Teil des Wegs III,2 (Tabelle 1). Hefen weisen insbesondere für einige Carbonylverbindungen gute Reduktaseaktivitäten auf, jedoch kann die NADH-Verfügbarkeit limitierend sein. Es war daher naheliegend, Lysate von zwei Zelltypen zu kombinieren, wobei durch Zelltyp 1 mit H_2 (oder einem anderen Elektronendonator) rasch NADH erzeugt und dieses dann durch Zelltyp 2 für die Reduktion des ungesättigten Substrats verbraucht wird. Ein Beispiel dieses Prinzips wird in Abschnitt 4.4 beschrieben. Auf diese Weise läßt sich z. B. (2R)-Propandiol mit einer Produktivitätszahl von bis zu 5700 gewinnen^[44]. Durch Kombination von *C. kluyveri* und *Enterobacter agglomerans* läßt sich 3-Hydroxy-3-methyl-2-butanon mit einer Produktivitätszahl von 3300 (Tabelle 4) zum (S)-2,3-Dihydroxy-2-methylbutan hydrieren. Aerob gezüchteter *Enterobacter agglomerans* ist nicht in der Lage, H_2 zu verwerten, und *C. kluyveri* zeigt keine Aktivität gegenüber dem Keton.

Dieses Verfahren hat die bereits geschilderten Vorteile hoher Produktivitätszahlen und einfacher Umsatzkontrolle (manometrisch). Außer *C. kluyveri* läßt sich z. B. auch *Alcaligenes eutrophus* zur NADH-Bildung nach Reaktion (h) benutzen. Wir beobachteten mit Zellen, die nach Schlegel et al.^[68] angezüchtet und fünf Jahre bei -15°C gelagert worden waren, immer noch eine Aktivität zur NADH-Bildung von 1 U/mg Protein im Rohextrakt. Durch die gemeinsame Verwendung von *C. kluyveri* und *C. Lal* lassen sich auch solche Substrate schneller hydrieren, bei denen die Hydrogenase limitierend ist (vgl. Abschnitt 3.1).

3.5. Hydrierung mit immobilisierten Zellen

Nach unseren Erfahrungen^[69] lassen sich Clostridien gut mit Acrylsäurederivaten immobilisieren; diese von Fukui et al.^[70] eingeführten photovernetzbaaren Präpolymere schädigen die Zellen kaum. Die beobachtete Abnahme der Aktivität kann durch Diffusionshemmung erklärt werden. In Gegenwart von 2 mM Methylviologen haben wir bei Raumtemperatur 63 d mit immobilisierten C.-Lal-Zellen hydriert. Die Geschwindigkeit der H_2 -Aufnahme betrug nach 12 d noch 50% des Anfangswertes. Solche Immobilisate sind sehr gut lagerfähig. Nach 150 d zeigten immobilisierte Zellen von *C. kluyveri*, gelagert in Trispuffer mit 50% Glycerin, keine Verminderung der Aktivität und immobilisierte C.-Lal-Zellen noch eine von 40%^[69]. Auch die gereinigte Enoat-Reduktase läßt sich mit photovernetzbaaren Präpolymeren immobilisieren. Sie eignen sich jedoch nicht zur Immobilisierung von *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* oder der daraus gewonnenen 2-Oxocarboxylat-Reduktase. Für diese Biokatalysatoren sind ionotrope Gele, z. B. durch Calcium-Ionen vernetzte Alginat, gut geeignet^[71]. Da die Gele aus photovernetzbaaren Präpolymeren in elektrochemischen Zellen, in denen stark gerührt werden muß, nicht so gut geeignet sind, haben wir Alginatfilme mit immobili-

siertem Enzym auf Filterpapier aufgebracht. Diese Systeme bewähren sich für ganze Zellen und für mehr oder weniger gereinigte Enzyme. Mit Enoat-Reduktase haben wir dabei in elektrochemischen Zellen trotz starken Rührens eine Erhöhung der Halbwertszeit von ca. 6 h auf 150 h erreicht^[61].

3.6. Kinetische Daten für die Enoat- und die 2-Oxocarboxylat-Reduktase

Mit reduziertem Methylviologen hat die Enoat-Reduktase ihre maximale Aktivität bei pH 5.2^[13]. Bei pH 4.5 und 6.2 ist die Geschwindigkeit noch 2/3 des maximalen Wertes. In einer elektrochemischen Zelle sollte ein pH-Wert < 5.2 vermieden werden. Dagegen scheinen pH-Werte bis 8.0 ohne Nachteil für die Stabilität des Enzyms zu sein. Ein pH-Wert zwischen 6.0 und 6.2 ist empfehlenswert als Kompromiß zwischen Stabilität des Methylviologens und Reaktionsgeschwindigkeit der Enoat-Reduktase.

Eine Reihe von v_{\max} - und K_m -Werten für Substrate der Enoat-Reduktase enthält Tabelle 3. Für reduziertes Methylviologen ist der K_m -Wert 0.4 mM, für NADH 0.012 mM. Für die Reaktion (e) empfiehlt sich daher für optimale Geschwindigkeit eine Konzentration von ca. 2 mM MV^{+} . Die K_i -Werte für reduziertes und oxidiertes Methylviologen sind so hoch, daß bei einer Gesamtkonzentration von Methylviologen von 3–4 mM die Geschwindigkeit nicht beeinträchtigt wird. Die K_m -Werte für Enoate erstrecken sich über zwei Größenordnungen. Je kleiner der K_m -Wert, desto später wird die Reaktionsgeschwindigkeit durch die geringer werdende Substratkonzentration begrenzt. Die K_i -Werte für aliphatische Enoate und für die Reaktionsprodukte liegen hoch, z. B. bei ca. 500 mM, d. h. sie sind für präparatives Arbeiten günstig. Die K_i -Werte aromatischer Produkte sind dagegen geringer. Der Wert für 3-Phenylpropionat (15 mM) ist der geringste, den wir bisher beobachtet haben. Über den Mechanismus und die Kinetik der Reduktion von Enoaten mit NADH haben wir detailliert berichtet^[58]. Es erhebt sich jedoch die Frage, ob manche dieser Werte bei der Reduktion mit MV^{+} nicht etwas anders sind, wie dies z. B. auch für die pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Fall ist.

Mit reduziertem Methylviologen hat die 2-Oxocarboxylat-Reduktase aus *Proteus vulgaris* eine optimale Aktivität bei pH 7.0. Bei pH 6.0 und 8.0 beträgt die Aktivität noch 80% des maximalen Wertes. Einige typische K_m - und K_i -Werte für die 2-Oxocarboxylat-Reduktase sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Die Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Reduktion von 2-Oxocarboxylaten von der Konzentration des Methylviologens zeigt kein Michaelis-Menten-Verhalten. Die Geschwindigkeit der Reduktion eines 2-Oxocarboxylats steigt mit abnehmender Konzentration des reduzierten Methylviologens bis zu einer Konzentration von < 0.05 mM! Das Verhalten bei noch geringerer Konzentration läßt sich wegen experimenteller Schwierigkeiten nicht verfolgen. Bei der Bestimmung der K_m -Werte verschiedener 2-Oxocarboxylate konnte Michaelis-Menten-Verhalten beobachtet werden. Die K_m -Werte unterscheiden sich stark für verschiedene Substrate, liegen aber in einem für präparative Zwecke geeigneten Bereich. Die K_i -Werte der aliphatischen Substrate und Produkte sind gün-

Tabelle 6. Einige typische K_m - und K_i -Werte für 2-Oxocarboxylat-Reduktase.

Substrate	K_m [mM]	Substrate/Produkte	K_i [mM]
Reduziertes Methylviologen	< 0.05 [a]	Reduziertes Benzylviologen	0.7 [b]
Reduziertes Benzylviologen	0.1	Benzylviologen	10.0
Phenylpyruvat	0.15	(R)-Phenyllactat	100
4-Methyl-2-oxopentanoat	2.1	(R)-2-Hydroxy-4-methylpentanoat	100
4-Hydroxy-3,3-dimethyl-2-oxobutanoat	7.5	4-Hydroxy-3,3-dimethyl-2-oxobutanoat	50
2-Oxoglutarat	2.5	Phenylpyruvat	12
		4-Methyl-2-oxopentanoat	70

[a] Die Hydrogenase von *Proteus vulgaris* hat für reduziertes Methylviologen einen K_m -Wert von ca. 0.3 mM. [b] Konzentration, bei der die Geschwindigkeit nur noch halb so groß ist wie mit 0.1 mM reduziertem Viologen.

stig. Für Phenylpyruvat ist der Wert relativ klein, für das Produkt jedoch günstig. Bei der praktischen Anwendung spielt das keine wesentliche Rolle. 100 mM Lösungen von Phenylpyruvat können in der elektrochemischen Zelle mit Produktivitätszahlen > 100000 umgesetzt werden. Hierbei spielt das überraschende Verhalten der 2-Oxocarboxylat-Reduktase gegenüber oxidiertem Methylviologen eine Rolle. Wie Tabelle 7 zeigt, ist oxidiertes Methylviologen ein positiver Effektor, d. h. durch Zusatz von oxidiertem Methylviologen kann die Enzymaktivität je nach Konzentration des reduzierten Methylviologens um das drei- bis sechsfache gesteigert werden. Das Verhältnis MV^{+}/MV^{+} läßt sich in einer elektrochemischen Zelle durch das Kathodenpotential gut einstellen, so daß sehr hohe Enzymaktivitäten erzielt werden können.

Tabelle 7. Einfluß von oxidiertem Methylviologen auf die Geschwindigkeit der Reduktion eines 2-Oxocarboxylats.

0.14 mM MV^{+} mit steigenden Konzentrationen MV^{+} [mM]	Verhältnis MV^{+}/MV^{+}	Relative Geschwindigkeit	1.6 mM MV^{+} mit steigenden Konzentrationen MV^{+} [mM]	Verhältnis MV^{+}/MV^{+}	Relative Geschwindigkeit
0.02	7	18.1	0.02	80	10.2 [a]
0.07	2	41.9	0.8	2	29.3
0.14	1	46.0	1.6	1	33.7
0.7	0.2	62.0	8.0	0.2	53.1
			17.8	0.09	61.5

[a] Die verschiedenen Geschwindigkeiten beim selben MV^{+}/MV^{+} -Verhältnis sind vermutlich auf den Hemmeffekt von höheren MV^{+} -Konzentrationen zurückzuführen.

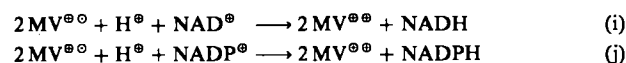
4. Elektromikrobielle Reduktionen

4.1. Prinzipien

Die Enoat-Reduktase in *C. La1* und die 2-Oxocarboxylat-Reduktase sind Enzyme, denen Elektronen nicht unbedingt durch NAD(P)H zugeführt werden müssen, sie können sie auch direkt von reduzierten Viologenen aufnehmen. Da sich Viologene in elektrochemischen Zellen reduzieren lassen, kann man mit Mikroorganismen, die Enzyme wie die Enoat- oder die 2-Oxocarboxylat-Reduktase enthalten, ungesättigte Substrate elektrochemisch stereo-

spezifisch reduzieren, wobei dann nur ein Enzym benötigt wird. Der Fluß der Elektronen wird durch Weg VI (siehe Einleitung) beschrieben.

Wir haben auch gefunden, daß zahlreiche Mikroorganismen die Reaktionen (i) und (j) katalysieren (siehe Abschnitt 4.2)^[44,72].



In Kenntnis dieser Befunde lassen sich mit zahlreichen Mikroorganismen elektromikrobielle Reduktionen durchführen. Abbildung 4 zeigt beispielhaft eine Strom-Zeit-Kurve für eine derartige Umsetzung. Die dabei stattfindenden Reduktionsschritte (k), (i) und (l) ergeben die Gesamtreaktion (m)^[72]:

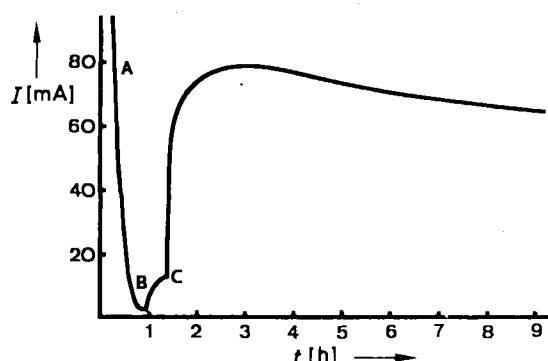
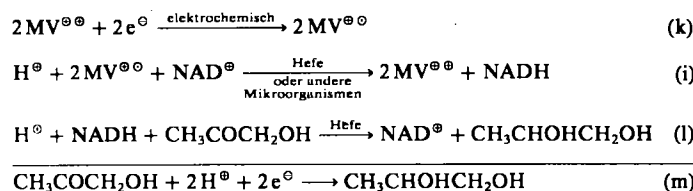


Abb. 4. Eine Lösung von 40 mmol Hydroxyacetone, 1,2 mmol Methylviologen und 0,1 mmol NAD in 200 mL Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0) wurde bei -792 mV (gegen die gesättigte Kalomelektrode) reduziert (A). Zur Zeit B wurden 175 mg *Candida utilis* (Trockengewicht) und zur Zeit C 7,6 mg *C. kluyveri* (Trockengewicht) zugegeben. Nach weiterer Zugabe von 350 mg *Candida utilis* und 3,8 mg *C. kluyveri* sowie 0,1 mmol NAD floß ein Strom von 93 mA. Nach 140 h waren 33 mmol Propandiol entstanden und 2 mmol Hydroxyacetone waren unumgesetzt geblieben.

Durch elektromikrobielle Reduktion^[47,72,73] läßt sich (2R)-1,2-Propandiol mit 20–50fach höherer Produktivitätszahl gewinnen als nach einer Organic-Synthesis-Vorschrift^[74].

4.2. Art, Vorkommen und Anwendung

Methylviologen-abhängiger NAD- und NADP-Reduktasen zur NAD(P)H-Regenerierung

Tabelle 8 zeigt, daß viele Mikroorganismen die Reaktionen (i) und (j) katalysieren^[44,47]. Diese Aktivitäten sind für die Regenerierung von NADH und NADPH interessant, obwohl ihre Werte um einige Größenordnungen schwanken. Um die Zahlen beurteilen zu können, sei daran erinnert, daß 0,1 U/mg Protein einer Produktivitätszahl von 3000 entspricht (siehe Abschnitt 2.1).

Man kann vier Gruppen von Mikroorganismen in Tabelle 8 unterscheiden:

Tabelle 8. Spezifische Aktivitäten der Methylviologen-abhängigen NAD(P)-Reduktasen in Rohextrakten verschiedener Mikroorganismen (Raumtemperatur, falls nicht anders erwähnt).

Mikroorganismus	Herkunft [a]	μmol	
		min × mg Protein	
		NAD	NADP
Anaerobe Organismen			
<i>Clostridium kluyveri</i>	DSM 555	16.6	3.3
<i>Clostridium Lal</i>	DSM 1460	2.4	0.31
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	DSM 663	3.3	0.55
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	ATCC 25755	1.2	0.79
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	DSM 1731	0.77	0.81
<i>Clostridium pasteurianum</i>	DSM 525	0.17	0.05
<i>Clostridium propionicum</i>	ATCC 25522	1.02	0.04
<i>Clostridium bifermentans</i>	ATCC 638	1.56	1.1
<i>Clostridium difficile</i>	ATCC 9689	0.13	0.13
<i>Clostridium ghoni</i>	ATCC 25757	2.7	0.46
<i>Clostridium hastiforme</i>	ATCC 25772	1.2	0.25
<i>Clostridium manganoti</i>	ATCC 25761	0.69	0.23
<i>Clostridium oceanicum</i>	ATCC 25647	1.03	0.38
<i>Clostridium putrificum</i>	ATCC 25784	0.55	0.60
<i>Clostridium sordellii</i>	ATCC 9714	1.96	1.5
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 3584	4.62	0.61
<i>Clostridium sticklandi</i>	DSM 519	0.29	0.79
<i>Clostridium symbiosum</i>	ATCC 14940	0.47	0.045
<i>Peptococcus aerogenes</i>	ATCC 14963	0.54	3.2
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	DSM 20357	0.29	0.06
<i>Acidaminococcus fermentans</i>	ATCC 25085	1.3	0.24
<i>Eubacterium limosum</i>	DSM 20402	1.14	1.03
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	DSM 2133 [b]	0.33	0.25
<i>Desulfurococcus mobilis</i>	DSM 2161 [c]	0.86	23.5
<i>Thermoproteus tenax</i>	DSM 2078 [c]	0.46	1.0
<i>Thermococcus celer</i>	DSM 2476 [c]	0.33	4.6
Aerobe Organismen			
<i>Candida utilis</i>	DSM 70167	0.18	0.023
<i>Candida boidinii</i>	DSM 70026	0.066	0.013
<i>Candida valida</i>	DSM 70178	0.040	0.011
<i>Rhodotorula glutinis</i>	DSM 70389	0.10	0.007
<i>Bäckerhefe</i>		0.018	0.012
<i>Geotrichum candidum</i>	DSM 1240	0.16	0.10
<i>Bacillus cereus</i>	DSM 31	0.022	0.059
<i>Bacillus macerans</i>	DSM 24	0.016	0.076
<i>Bacillus spec.</i>	DSM 406	0.1	—
<i>Alcaligenes eutrophus H 16</i>	DSM 428	0.80	0.026
<i>Acromonas hydrophila</i>	ATCC 13137	0.13	0.071
<i>Enterobacter agglomerans</i>	NCTC 9381	0.013	0.016
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536	0.04	0.01
<i>Klebsiella aerogenes</i>	DSM 30102	0.12	0.07
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 30115	0.09	0.03
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50090	0.095	0.025
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 50071	0.086	0.010
<i>Micrococcus luteus</i>	DSM 20030	0.12	0.010
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20231	0.008	0.011
<i>Staphylococcus carnosus</i>	DSM 20501	0.011	0.015
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 7469	0.001	0.001
<i>Propionibacterium pentosaceum</i>	DSM 20272	0.04	0.008
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	DSM 1616	0.027	0.21

[a] DSM = Deutsche Sammlung Mikroorganismen, Göttingen. ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA. NCTC = National Collection of Type Cultures, London (England). [b] Manometrisch durch H₂-Verbrauch bestimmt. [c] Test bei 80 °C.

1. Anaerobe Eubakterien, speziell Clostridien: Sie enthalten NAD(P)-Reduktasen mit meist hohen Aktivitäten. In diesen Organismen läuft, falls sie über eine Hydrogenase verfügen, in Konkurrenz zu Reaktion (i) und/oder (j) die Bildung von Wasserstoff ab [Reaktion (n)].



Besonders günstig ist bei Raumtemperatur *C. kluyveri*. Es hat sehr hohe Aktivitäten von NAD(P)-Reduktasen. Die Hydrogenaseaktivität beträgt nur ca. 10% des Wertes der NAD-Reduktasen.

2. Archaeobakterien: Methanogene Bakterien oxidieren reduziertes Methylviologen im wesentlichen unter Wasserstoffbildung. Drei bis jetzt getestete thermophile, Schwefel reduzierende Archaeobakterien haben erstaunlich hohe NADP-Reduktaseaktivitäten. In zwei Fällen sind diese Aktivitäten eine Größenordnung höher als die für die NADH-Bildung.

3. Hefen: Sie zeigen geringere Aktivitäten, enthalten aber keine Hydrogenasen, was für die elektromikrobielle Reduktion ein Vorteil ist.

4. Aerobe Eubakterien: Die meisten getesteten aeroben Eubakterien haben geringere NAD(P)-Reduktaseaktivitäten als die anaeroben Bakterien.

Bisher ist nicht in jedem Fall klar, welcher Natur die Methylviologen-abhängigen NAD(P)-Reduktasen sind. Eine Reihe von NAD(P)H-abhängigen Flavoproteinen katalysieren diese Reaktionen. Praktisch angewandt wurde bereits die Diaphorase^[54]. Daneben ist die Reaktion (i) für Hydrogenase aus *Alcaligenes eutrophus*^[76] und für (j) die Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase aus Pflanzen bekannt^[77]; bisher scheinen jedoch die Reaktionen (i) und (j) für diese Enzyme nicht quantitativ untersucht worden zu sein. In Tabelle 9 sind für eine Reihe von Enzymen die gemessenen Aktivitäten für die Reaktionen (i) und (j) angegeben und mit den Aktivitäten physiologischer Reaktionen dieser Enzyme verglichen. Folgende Enzyme, bei denen aufgrund ihres Aufbaus die Katalyse der Reaktionen (i) oder (j) erwartet werden könnte, zeigen für die Praxis uninteressant geringe Aktivitäten: Glutathion-Reduktase aus Hefe, NAD(P)H-FMN-Reduktase aus *Photobacterium fisheri*, NADH-Dehydrogenase aus dem thermophilen *Bacillus spec.* DSM 406. Aus letztgenanntem Mikroorganismus läßt sich jedoch eine sehr stabile Methylviologen-abhängige NAD-Reduktase gewinnen. Die Aktivität als

NADH-Dehydrogenase mit Dichlorphenolindophenolnatrium als Acceptor ist dabei sehr gering. Dies zeigt eindeutig, daß die Aktivität der NADH-Dehydrogenase nicht mit der der Methylviologen-abhängigen NAD-Reduktase parallel gehen muß. Die Aktivität der Methylviologen-abhängigen NAD-Reduktase aus *Bacillus spec.* DSM 406 bleibt in verdünnter Lösung über 50 d bei 35°C praktisch konstant.

In den Fällen, in denen in Tabelle 9 die Stereochemie der [4-²H]NAD(P)H-Bildung ohne Literatur angegeben ist, haben wir NADH oder NADPH in einer elektrochemischen Zelle hergestellt und NMR-spektroskopisch bestimmt, um welches Enantiomer es sich handelt^[44]. Die Methode zur Bestimmung der Stereochemie ist beschrieben^[78].

4.3. Aufbau einer elektrochemischen Zelle

Für elektrochemische Reduktionen in Wasser müssen Kathoden mit hoher Überspannung für die Wasserstoffentwicklung verwendet werden. Elektrochemisch darf nur der Mediator, nicht jedoch das Substrat reduziert werden. Dies läßt sich cyclovoltammetrisch überprüfen^[81]. Auch darf der Mediator nicht spontan mit dem Substrat reagieren. Bisher haben wir bei Phenylglyoxylat, 4-Chlor-3-oxobuttersäureethylester und **5a** Spontanreaktion mit reduziertem Methylviologen beobachtet; Phenylglyoxylat läßt sich in Gegenwart von Benzylviologen umsetzen, die beiden anderen Verbindungen ohne Mediator mit H₂ und *C. kluyveri*.

Als Kathodenmaterial eignen sich beim Arbeiten im neutralen pH-Bereich und bei Potentialen von ca. -450 mV gegen die gesättigte Kalomelektrode (alle Potentialangaben in diesem Beitrag sind auf diese Elektrode be-

Tabelle 9. Enzyme, die auf die Reduktion von NAD(P) durch reduziertes Methylviologen getestet wurden. Initialgeschwindigkeiten für die Reaktionen (i) und (j) und Vergleich dieser Aktivität mit der physiologischen Reduktion bzw. der Dehydrierung von NAD(P)H in Gegenwart eines artifiziellen Acceptors. Alle Aktivitätsangaben gelten für Zweielektronenübergänge (μmol/mg Protein × min). Falls nicht anders erwähnt, wurden die Tests bei pH 7.0 in 0.1 M Trisacetatpuffer bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Konzentration an NAD(P) betrug 2.5 mM und die für MV^{••} 1.8 mM. Zur Bestimmung der Stereochemie wurde NAD(P) in einer elektrochemischen Zelle (Abbildung 5a) in ²H₂O-Puffer mit dem entsprechenden Enzym umgesetzt [44].

Enzym (EC-Nummer)	Physiol. Reaktion bzw. NAD(P)H-Dehydrogenase-Reaktion	Aktivität	MV ^{••} /NAD	MV ^{••} /NADP	Stereochemie von [4- ² H]NAD(P)H [Lit.]
Lipoamid-Reduktase (Diaphorase) (1.6.4.3)	NADH/Lipoamid	62	46	0.15	S [79]
Diaphorase aus Mikroorganismen (Fa. Boehringer Mannheim)	NADH/ <i>p</i> -Iodnitrotetrazoliumchlorid	0.6	1.1	0.03	—
Glutathion-Reduktase aus Hefe (1.6.4.2)	NADPH/GSSG	98	0.02	0.06	—
NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase aus Rattenleber (1.6.2.4) [a]	NADPH/Cytochrom c	6.5	1.2	15.2	R
Hydrogenase aus <i>Alcaligenes eutrophus</i> (1.12.1.2)	H ₂ /NAD	15 [b]	70	—	S [80]
NADH-Cytochrom-c-Reduktase aus Schweineherz (1.6.99.3)	NADH/Cytochrom c	0.16	0.22	0.001	S
NAD(P)H-FMN-Reduktase aus <i>Photobacterium fisheri</i> (1.6.8.1)	NADH/FMN	10	0.1	0.1	—
Xanthin-Oxidase (1.2.3.2)	NADH/Hypoxanthin	0.16	0.04	0.02	—
Enoat-Reduktase (1.3.1.31)	NADH/(<i>E</i>)-2-Methylbutenoat	12	7	0.01	S
NADH-Dehydrogenase aus <i>Bacillus spec.</i> DMS 406 (Membran-gebunden) [c]	NADH/Dichlorphenolindophenol	61	1.5	—	—
NADH-Dehydrogenase aus <i>Bacillus spec.</i> DSM 406 (löslich) [c]	NADH/Dichlorphenolindophenol	8.8	44	—	S

[a] Wir danken Prof. V. Ulrich, Konstanz, für dieses Präparat. [b] Ein ca. 1 Jahr gelagertes Präparat. [c] Enzyme wurden von S. Nagata in unserem Labor isoliert (unveröffentlicht).

zogen) Gold, Silber, Kohlenstoff und insbesondere Quecksilber. Bei negativeren Potentialen, z. B. bei -640 mV, sind auch Kathoden aus Blei, Bismut, Antimon und Zinn brauchbar. Das Potential wird in einer Dreielektroden-Standardordnung festgelegt (Abb. 5). Potentiostaten mit 15 V maximaler Klemmspannung und 200 mA sind geeignet, falls Kathodenflächen <250 cm² benutzt werden.

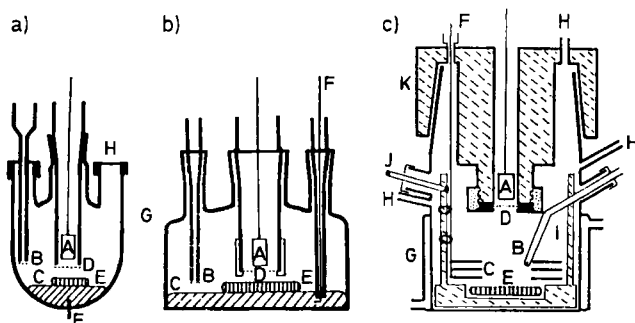


Abb. 5. Verschiedene elektrochemische Zellen. a) 50 mL-Dreihalskolben; b) 200 mL-Fünfhalskolben (zwei Hälse nicht gezeichnet); c) 70 mL-Zelle mit Multiring-Kohlenstoffelektroden. A: Platin-Anode, B: Luggin-Haber-Kapillare für die Bezugselektrode (gesättigte Kalomelelektrode), C: Quecksilber-Kathode bei a) und b), D: Diaphragma, E: Rührstab, F: Kathodenkontakt, G: Glasgefäß bei c) thermostatisierbar, H: Öffnung für Probenentnahme und Begasung mit N₂, I: Kathodenhalterung, J: Halterung für I um dessen Rotation zu verhindern, K: PVC-Deckel und Anodenraum.

Für das Diaphragma haben sich bei Zellen über 50 mL Nafion-Membranen mit 0.5 mm Schichtdicke bewährt, für kleinere Zellen (Abb. 5a) auch Vycor-Tips. Das Diaphragma muß folgende Aufgaben erfüllen: Es muß den Protonentransfer vom Anolyten zum Katholyten, in dem Protonen verbraucht werden (z. B. bei Reaktion (m)), gewährleisten. Es muß genügend leitfähig sein und vermeiden, daß Sauerstoff vom Anolyten in den Katholyten gelangt. Sauerstoff reagiert mit diffusionslimitierter Geschwindigkeit mit reduziertem Methylviologen. Das dabei entstehende Hyperoxid-Radikalanion^[82,83] und seine Folgeprodukte können mit den Enzymen, den Substraten und Produkten sowie dem Mediator reagieren. Außerdem täuscht Sauerstoff eine zu hohe Geschwindigkeit der Enzymreaktion vor. Durch die Symmetrie der Kathode sollen Potentialdifferenzen $> \pm 30$ mV vermieden werden.

Im Laboratorium sind Zellen mit Quecksilberkathode besonders einfach zu handhaben. Bei Lösungen, die im stationären Betriebszustand der Zelle 3 mM oxidiertes Methylviologen enthalten, lassen sich pro cm² Quecksilberoberfläche ca. 1 mA Strom erzeugen. Ein Strom von 3.2 mA reduziert pro min 1 μ mol Substrat mit zwei Reduktionsäquivalenten.

Da es insbesondere bei angereicherten Enzymen leicht ist, 10^2 – 10^4 U Enzymaktivität in 100 mL Katholyt zu bringen, sind die Reaktionen unter präparativen Gesichtspunkten meist von der Reduktion des Methylviologens her begrenzt. Daher sollten die Zellen unter diffusionskontrollierten Bedingungen betrieben werden. Die Diffusionsschicht auf der Kathode sollte z. B. durch effizientes Rühren (Magnetrührer) oder durch Rotieren der Kathode möglichst dünn gehalten werden; dadurch wird zugleich die notwendige gute Durchmischung der Reaktionslösung erreicht.

4.4. Praktische Aspekte der Durchführung elektromikrobieller und elektroenzymatischer Reduktionen

Die optimalen Konzentrationen an oxidiertem und reduziertem Methylviologen sowie an Substrat hängen von den kinetischen Daten der Enzyme ab (siehe Abschnitt 3.6). In dieser Hinsicht unterscheiden sich z. B. die Enoat- und die 2-Oxocarboxylat-Reduktase deutlich. Dies gilt auch bei Einsatz von Zellen oder Zellaufschlüssen, die diese Enzyme enthalten. Bei Nutzung der Enoat-Reduktase sollten 2–3 mM reduziertes Methylviologen vorhanden sein. Die Konzentration des oxidierten Methylviologens ist auf die Enoat-Reduktase ohne Einfluß.

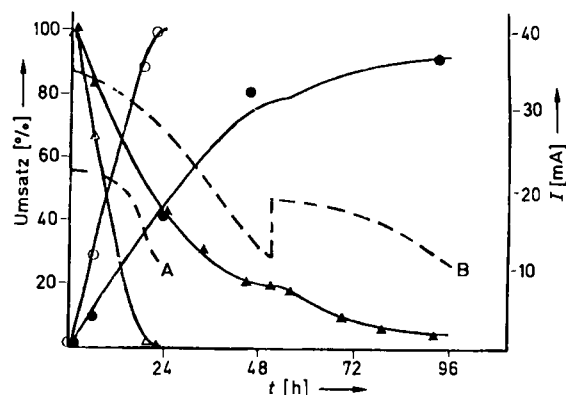


Abb. 6. Zeitlicher Verlauf der elektromikrobiellen Reduktion von 30 mM (Z)-2-Fluorzimtat und 30 mM 4a durch 122 mg *C. La1* und 184 mg *C. La1* in der in Abbildung 5c gezeigten Zelle. Δ – Δ : Abnahme des Fluorzimtats, \circ – \circ : Bildung von (2R)-2-Fluor-3-phenylpropionat, A: Stromverlauf bei dieser Reaktion, \blacktriangle – \blacktriangle : Abnahme von 4a, \bullet – \bullet : Bildung von 4b, B: Stromverlauf bei dieser Reaktion; nach 50 h wurden weitere 70 mg *C. La1* zugegeben. Die Konzentration an Methylviologen betrug 3 mM, $T=28^\circ\text{C}$, 63 mL 100 mM Phosphatpuffer (pH 6.3).

Abbildung 6 zeigt die Reduktion von (Z)-2-Fluorzimtat und von 4a in einer elektrochemischen Zelle (Abb. 5c) mit *C. La1*. (Z)-2-Fluorzimtat hat einen höheren v_{\max} -Wert als 4a und einen sehr viel kleineren K_m -Wert (Tabelle 3). Dies hat folgende Konsequenzen: (Z)-2-Fluorzimtat wird wesentlich rascher reduziert, und die Stromausbeute ist viel höher; dies gilt insbesondere für die Umsetzung des letzten Drittels an Substrat und ist vor allem eine Folge des ca. 100mal günstigeren K_m -Wertes von Fluorzimtat. Bei der Reduktion beider Substrate ist durch die vorhandene Hydrogenase die H₂-Bildung aus reduziertem Methylviologen [Reaktion (n)] eine Konkurrenzreaktion. Das Fluorzimtat wird mit einer Stromausbeute von ca. 50% umgesetzt, während bei der Reduktion von 4a die Stromausbeute in den ersten 5 h ungefähr 10%, nach 24 h 7% und nach 72 h nur noch 4.5% beträgt. Der Strom wird also im wesentlichen für die H₂-Entwicklung verwendet.

Der Stromverlauf einer Reduktion von Phenylpyruvat mit *Proteus vulgaris* ist in Abbildung 7 gezeigt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von oxidiertem Methylviologen. Das Potential wurde so eingestellt, daß die optimalen Verhältnisse nach Tabelle 7 erreicht wurden. Eine Lösung mit einer Konzentration von <0.1 mM reduziertem Methylviologen ist himmelblau. Der weitere Stromverlauf läßt sich aus den in Tabelle 6 genannten kinetischen Daten qualitativ verstehen. Phenylpyruvat be-

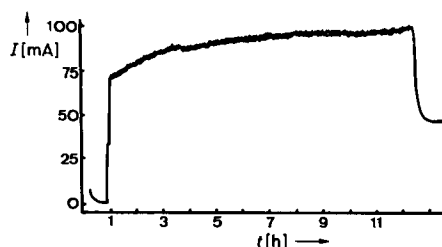


Abb. 7. Stromverlauf bei der elektromikrobiellen Reduktion von 7a zu 7b. Nähere Einzelheiten siehe Arbeitsvorschrift.

wirkt Substrathemmung und hat einen geringen K_m -Wert. Mit abnehmender Gesamtkonzentration steigt die Enzymaktivität und damit der Strom an. Aufgrund des K_m -Wertes fällt die Geschwindigkeit erst nach einem Umsatz > 98%, dann jedoch sehr steil, ab. Dabei wird die Lösung innerhalb einer Minute dunkelblau. Der Grund liegt darin, daß das Fließgleichgewicht der konsekutiven Reaktionsfolge, elektrochemische Reduktion von Methylviologen und dessen Reoxidation durch das Enzym, wegen des fehlenden Substrats zusammenbricht. Daß der Strom nicht Null wird kommt daher, daß *Proteus vulgaris* Hydrogenase enthält. Diese Reaktion hat wegen des mit 0.3 mM vergleichsweise großen K_m -Wertes der Hydrogenase für reduziertes Methylviologen bis zum Verbrauch des Phenylpyruvats keine Rolle gespielt, da bis dahin die Konzentration an reduziertem Methylviologen < 0.05 mM war. Das Produkt aus Strom und Zeit zwischen Anstieg und Abfall des Stromes in Abbildung 7 entspricht der Menge des gebildeten Phenyllactats.

Typische Arbeitsvorschriften

Die Anzucht von *C. La1*, *C. kluyveri*, *P. mirabilis* und *P. vulgaris* ist beschrieben [57, 66, 67]. Die Zellen werden nach Erreichen der stationären Wachstumsphase bei ca. 5000 g ab zentrifugiert und ohne Waschen unter Luftabschluß bei ca. -15 °C aufbewahrt. Das Trockengewicht des Sediments beträgt ca. 20% des Feuchtgewichts. Die Hydrierungen werden in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7.0) unter H_2 -Atmosphäre bei Normaldruck durch Schütteln (ca. 200 Ausschläge pro min) bei 35 °C durchgeführt. Um das Wachsen anderer Mikroorganismen zu vermeiden, wird in Gegenwart von 0.4 mg Tetracyclin/10 mL Puffer hydriert. Alle Arbeiten werden bei weitgehendem Sauerstoffausschluß durchgeführt. Der H_2 -Verbrauch wird an einem mit dem Hydriergefäß verbundenen, mit Quecksilber gefüllten Warburg-Manometer abgelesen. Alle Angaben der Zellmenge sind Trockengewichte.

1. Hydrierung von 1a zu 1b mit *C. La1*: In 26 mL Puffer wurden mit 150 mg Zellen und 1 mM Methylviologen 0.70 mmol Substrat in 4.5 h vollständig hydriert (siehe Abb. 1).

2. Hydrierung von 3a, 4a und 5a: 1.6 g *C. La1*-Zellen, 12 mg Methylviologen-dihydrochlorid und 6.0 mmol des Natriumsalzes von 3a in 40 mL Puffer wurden in einer ca. 200 mL fassenden Schüttelente, die mit einem 2.5 L H_2 -Reservoir verbunden war, ca. 3–4 h hydriert. Das als Lacton isolierte 3b zeigte nach Destillation gaschromatographisch keine Verunreinigung. 4b wurde aus 4a analog gewonnen. Die Enantioselektivität war bei beiden Reaktionen > 96%. Von 5a wurden 6 mmol mit 1.6 g *C. kluyveri*-Zellen in 52 mL Puffer ohne Methylviologen in 3.5 h hydriert ($ee > 96\%$). (Wir danken Dr. H. G. Leuenberger und Dr. M. Schmid, Fa. Hoffmann-La Roche, Basel, für Analysen.)

3. Reduktion von 6a zu 6b mit *Proteus vulgaris* und Formiat: Eine Lösung von 90 mL bestehend aus Phosphatpuffer (85 mM), dem Natriumsalz von 6a (33.3 mM), Natriumformiat (65 mM), *Proteus vulgaris* (600 mg) und Benzylviologen (1.0 mM) wurden unter N_2 21 h bei 35 °C geschüttelt. Danach war die Lösung 32 mM an 6b; 6a war nicht mehr nachweisbar. 6b wurde als Pantolacton isoliert, $[\alpha]_D^{25} -51.1$ (H_2O , $c = 30$ mg/mL), $ee > 99.5\%$, gaschromatographisch bestimmt. (Wir danken der BASF AG für diese Analyse.)

4. Elektromikrobielle Reduktion von 7a zu 7b: 200 mL 0.1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7.0), die 100 mM an 7a war, wurden im Kathodenraum einer elektrochemischen Zelle (Abb. 5b) mit N_2 sauerstofffrei gespült und mit einer Suspension von *Proteus vulgaris* (15 mg) versetzt; es wurde ein Kathodenpotential von -900 mV gegen die gesättigte Kalomelektrode angelegt. Nach Zugabe von 6 mmol Methylviologen floß ein Strom von 70 mA.

Der maximale Strom (100 mA) wurde kurz vor dem Ende der Reaktion erreicht, der nachfolgende Stromabfall zeigte an, daß alles Substrat verbraucht war (Abb. 7). Die zu diesem Zeitpunkt aufgenommene Ladungsmenge entsprach einem Umsatz von 99%. Mit HPLC konnte kein Substrat mehr nachgewiesen werden. Die Produktivitätszahl betrug 117 000.

5. Elektromikrobielle Reduktion von 8b zu 8a: Der Kathodenraum einer elektrochemischen Zelle enthielt: 41 mL 0.1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7.0), der 0.6 M an 8a war. Das Diaphragma bestand aus einer 3.6 cm² großen Nafion-Kationenaustauschermembran, als Anolyt dienten 10 mL des Phosphatpuffers. Im Katholyten gelöster Sauerstoff wurde durch Spülen mit N_2 entfernt, 15.1 mg *Proteus vulgaris* wurden zugegeben, und es wurde ein Kathodenpotential von -760 mV angelegt. Nach Zugabe von 6 mmol Methylviologen und Rühren mit 400–500 Umdrehungen/min floß ein Strom von 120 mA. Nach 12 h waren laut HPLC 96% des zu erwartenden 8b gebildet ($[\alpha]_D^{25} +11.1$ (H_2O , $c = 20.7$ mg/mL); dies entspricht dem Literaturwert [84, 85], falls man die Konzentrationsabhängigkeit berücksichtigt). Die Produktivitätszahl betrug ca. 125 000.

5. Ausblick

Die biokatalytische enantioselektive Reduktion ungesättigter Verbindungen wurde in den letzten Jahren methodisch stark verbessert. Inzwischen gibt es mehrere leistungsfähige Verfahren der NADH-Regenerierung. Die Gruppen um Whitesides^[45] und Jones^[48] haben zahlreiche Verbindungen im Laboratoriumsmaßstab unter NADH-Regenerierung synthetisiert. Sogar die Herstellung von Aminosäuren im technischen Maßstab mit kg-Preisen von ca. 50 DM ist durch Arbeiten der Gruppen von Kula, Wandrey und Leuchtenberger in Reichweite gerückt^[43, 86]. Allgemein wird das neue Methodenarsenal in der präparativen organischen Chemie allerdings noch relativ wenig genutzt.

Es ist anzunehmen, daß weitere Mikroorganismen und Reduktasen für Reduktionen gefunden werden. Allerdings erhält diese Methode Konkurrenz durch andere Entwicklungen: Einerseits sind dies die synthetischen chiralen Hydrierkatalysatoren und andererseits Enzyme, die keine Reduktasen sind. Dazu gehören Esterasen, die in letzter Zeit häufig zur selektiven Spaltung von Estern sekundärer Alkohole genutzt wurden^[87–89]; zu nennen ist auch die Bildung chiraler sekundärer Alkohole durch biokatalytische Kondensationsreaktionen^[90]. Auch Synthesen, bei denen ein biokatalytisch erhaltenes Chiralitätszentrum für sterisch kontrollierte Folgereaktionen genutzt wird, werden vermutlich an Bedeutung gewinnen. So zeigte Reetz^[91] kürzlich die Möglichkeiten auf, die bei Additionsreaktionen an chirale α - und β -Alkoxy-carbonylverbindungen gegeben sind.

Wir nehmen an, daß die mikrobielle Hydrierung sowie die elektromikrobielle und elektroenzymatische Reduktion, die wir in den letzten Jahren bearbeiteten, in Zukunft häufiger angewendet werden. Es wäre gut, wenn noch andere Reduktasen wie die Enoat- und die 2-Oxocarboxylat-Reduktase gefunden würden, die Elektronen von elektrochemisch regenerierbaren, artifiziellen Mediatoren aufnehmen und daneben sowohl große Substratbreite aufweisen als auch hochstereoselektiv reagieren. Wir halten die elektrochemische Regenerierung von Elektronenüberträgern, z. B. von reduziertem Methylviologen, der mit dem System Licht/[Ru(bpy)₃]/Ethyldiamintetraessigsäure^[92] in verschiedener Hinsicht für überlegen.

Die in diesem Beitrag geschilderten Ergebnisse haben wir nur dank der Hilfe zahlreicher Personen und Einrichtungen erarbeiten können. Neben den im Text und in den Literatur-

zitat^{en} erw^{ähnt}en Damen und Herren danken wir insbesondere Herrn Dr. P. Rauschenbach für die Bereitstellung geeigneter HPLC-Methoden, den technischen Assistenten R. Feicht, H. Leichmann, L. Riesinger, C. Stuber und F. Wendling für zahlreiche Versuche und Messungen, den Firmen BASF, Degussa und Hoffmann La Roche für Substrate und Analysen sowie Frau M. L. Rudolf für die Mitarbeit am Manuskript. Finanzielle Unterstützung erhielten wir von der BASF, dem Fonds der Chemischen Industrie und insbesondere der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die unsere Arbeiten im Rahmen des Sonderforschungsbereichs „Biokonversion“ unterstützt.

Eingegangen am 10. Dezember 1984 [A 538]

- [1] C. J. Sih, C.-S. Chen, *Angew. Chem.* 96 (1984) 556; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 570.
- [2] *Type Reactions in Fermentation Chemistry*, US Department of Agriculture, Fermentation Laboratory Northern Utilization Research and Development Division, Peoria, IL, USA 1959.
- [3] C. J. Sih, J. P. Rosazza in J. B. Jones, C. J. Sih, D. Perlman: *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry, Part I*, Wiley, New York 1976, Kap. 3.
- [4] J. B. Jones, J. F. Beck in J. B. Jones, C. J. Sih, D. Perlman: *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry, Part I*, Wiley, New York 1976, Kap. 4.
- [5] K. Kieslich: *Microbial Transformations of Non-Steroid Cyclic Compounds*, Thieme, Stuttgart 1976.
- [6] H. Iizuka, A. Naito: *Microbial Conversion of Steroids and Alkaloids*, Springer, Tokio 1981.
- [7] H. G. W. Leuenberger in H. J. Rehm, G. Reed: *Biotechnology, Vol. 6a (Microbial Transformations)*, Verlag Chemie, Weinheim 1984, S. 5.
- [8] J. Mulzer, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 32 (1984) 520.
- [9] O. Neubauer, K. Fromherz, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 70 (1911) 326.
- [10] W. Hummel, H. Schütte, M.-R. Kula, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, im Druck.
- [11] J. B. Jones in: *Enzymes in Organic Synthesis (Ciba Found. Symp. 111)*, Pitman, London 1985, S. 3.
- [12] H. Simon, H. Günther in Z. I. Yoshida, N. Ise: *Biomimetic Chemistry*, Kodansha, Tokyo/Elsevier, Amsterdam 1983, S. 207.
- [13] H. Simon, J. Bader, H. Günther, S. Neumann, J. Thanos, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 434 (1984) 171.
- [14] R. Bentley: *Molecular Asymmetry in Biology, Vol. 1, 2*, Academic Press, New York 1970/71.
- [15] R. Lagunas, C. Dominguez, A. Busturia, M. J. Saez, *J. Bacteriol.* 152 (1982) 19.
- [16] R. MacLeod, H. Prosser, L. Fikentscher, J. Lanyi, H. S. Mosher, *Biochemistry* 3 (1964) 838.
- [17] M. Bucciarelli, A. Forni, I. Moretti, G. Torre, *Synthesis* 1983, 897.
- [18] B. S. Deol, D. D. Ridley, G. W. Simpson, *Aust. J. Chem.* 29 (1976) 2459.
- [19] D. W. Brooks, P. G. Grothaus, W. L. Irvin, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 2820.
- [20] T. Kitazume, N. Ishikawa, *Chem. Lett.* 1983, 237.
- [21] B. Zhou, A. S. Gopalan, F. Van Middlesworth, W. R. Shieh, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 5925.
- [22] B. Wipf, E. Kupfer, R. Bertazzi, H. G. W. Leuenberger, *Helv. Chim. Acta* 66 (1983) 485.
- [23] H. G. W. Leuenberger, W. Boguth, R. Barner, M. Schmid, R. Zell, *Helv. Chim. Acta* 62 (1979) 455.
- [24] H. G. W. Leuenberger, W. Boguth, E. Widmer, R. Zell, *Helv. Chim. Acta* 59 (1976) 1832.
- [25] K. Mori, *Tetrahedron* 37 (1981) 1341; zit. Lit.
- [26] D. Seebach, M. F. Züger, F. Giovannini, B. Sonleitner, A. Fiechter, *Angew. Chem.* 96 (1984) 155; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 151.
- [27] C. J. Sih, B. N. Zhou, A. S. Gopalan, W. R. Shieh, F. Van Middlesworth in W. Bartmann, B. M. Trost: *Selectivity - a Goal for Synthetic Efficiency (Workshop Conferences Hoechst, Vol. 14)*, Verlag Chemie, Weinheim 1983, S. 251.
- [28] E. Hochuli, K. E. Taylor, H. Dutler, *Eur. J. Biochem.* 75 (1977) 433.
- [29] Y. Takaishi, Y. L. Yang, D. DiTullio, C. J. Sih, *Tetrahedron Lett.* 23 (1982) 5489.
- [30] W. Tischer, W. Tiemeyer, H. Simon, *Biochimie* 62 (1980) 331.
- [31] B. Rambeck, H. Simon, *Angew. Chem.* 86 (1974) 675; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 13 (1974) 609.
- [32] H. Simon, J. Bader, B. Rambeck, E. Krezdorn, W. Tischer in H. Dellweg: *4. Symp. Tech. Mikrobiol., Versuchs- und Lehranstalt für Spiritusfabrikation und Fermentationstechnologie im Institut für Gärungsge- werbe und Biotechnologie*, Berlin 1979, S. 325.
- [33] H. Günther, J. Bader, S. Neumann, H. Simon in: *3. Eur. Congr. Biotechnol., Bd. 1*, Verlag Chemie, Weinheim 1984, S. 261.
- [34] E. Krezdorn, S. Höcherl, H. Simon, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358 (1977) 945.
- [35] J. J. Allais, A. Louktibi, J. Baratti, *Agric. Biol. Chem.* 47 (1983) 2547.
- [36] H. Schütte, J. Flossdorf, H. Sahm, M.-R. Kula, *Eur. J. Biochem.* 62 (1976) 151.
- [37] Y. Izumi, S. K. Mishra, B. S. Gosh, Y. Tani, H. Yamada, *J. Ferment. Technol.* 61 (1983) 135.
- [38] Y. Noma, S. Nonomura, H. Ueda, C. Tatsumi, *Agric. Biol. Chem.* 38 (1974) 735.
- [39] L. Angermaier, J. Bader, H. Simon, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 362 (1981) 33.
- [40] J. Bader, M.-A. Kim, H. Simon, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 362 (1981) 809.
- [41] R. Wienkamp, E. Steckhan, *Angew. Chem.* 94 (1982) 786; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 782; *Angew. Chem. Suppl.* 1982, 1739.
- [42] R. Wienkamp, E. Steckhan, *Angew. Chem.* 95 (1983) 508; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 497.
- [43] C. Wandrey, R. Wichmann, W. Berke, M. Morr, M.-R. Kula in: *3. Eur. Congr. Biotechnol., Bd. 1*, Verlag Chemie, Weinheim 1984, S. 239.
- [44] J. Bader, H. Günther, S. Nagata, H. J. Schuetz, M. L. Link, H. Simon, *J. Biotechnol.* 1 (1984) 95.
- [45] C. H. Wong, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 5012.
- [46] J. P. Vandecasteele, *Appl. Environm. Microbiol.* 39 (1980) 327.
- [47] H. Simon, H. Günther, J. Bader, S. Neumann in: *Enzymes in Organic Synthesis (Ciba Found. Symp. 111)*, Pitman, London 1985, S. 97.
- [48] J. B. Jones in P. Dunnill, A. Wisemann, N. Blakeborough: *Enzyme and Non Enzymatic Catalysis*, Wiley, New York 1980, S. 54.
- [49] M. Nakazaki, H. Chikamatsu, T. Fujii, Y. Sasaki, S. Ao, *J. Org. Chem.* 48 (1983) 4337.
- [50] R. J. Lamed, E. Kleinau, J. G. Zeikus, *Enzyme Microb. Technol.* 3 (1981) 144.
- [51] S. W. May, S. R. Padgett, *Bio/Technology* 1983, 677.
- [52] W. Hummel, N. Weiss, M.-R. Kula, *Arch. Microbiol.* 137 (1984) 47.
- [53] H. Schütte, W. Hummel, M.-R. Kula, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19 (1984) 167.
- [54] R. Hilhorst, R. Spruijt, C. Laane, C. Veeger, *Eur. J. Biochem.* 144 (1984) 459.
- [55] J. Bader, H. Günther, B. Rambeck, H. Simon, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359 (1978) 19.
- [56] W. Tischer, J. Bader, H. Simon, *Eur. J. Biochem.* 97 (1979) 103.
- [57] J. Bader, H. Simon, *Arch. Microbiol.* 127 (1980) 279.
- [58] M. Bühler, H. Simon, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 363 (1982) 609.
- [59] H. Giesel, H. Simon, *Arch. Microbiol.* 135 (1983) 51.
- [60] H. Simon, H. Günther, J. Bader, W. Tischer, *Angew. Chem.* 93 (1981) 897; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 861.
- [61] J. Thanos, J. Bader, H. Günther, S. Neumann, H. Simon, *Methods Enzymol.*, im Druck.
- [62] H. Hashimoto, H. Simon, *Angew. Chem.* 87 (1975) 111; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 14 (1975) 106.
- [63] H. Sedlmaier, W. Tischer, P. Rauschenbach, H. Simon, *FEBS Lett.* 100 (1979) 129.
- [64] K. Bartl, C. Cavalari, T. Krebs, E. Ripp, J. Rétey, W. E. Hull, H. Günther, H. Simon, *Eur. J. Biochem.* 72 (1977) 247.
- [65] L. Angermaier, H. Simon, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364 (1982) 961, 1653.
- [66] S. Neumann, H. Simon, *FEBS Lett.* 167 (1984) 29.
- [67] S. Neumann, H. Günther, H. Simon in: *3. Eur. Congr. Biotechnol., Bd. 1*, Verlag Chemie, Weinheim 1984, S. 239.
- [68] H. G. Schlegel, H. Kaltwasser, G. Gottschalk, *Arch. Microbiol.* 38 (1961) 209.
- [69] P. Egerer, H. Simon, *Biotechnol. Lett.* 4 (1982) 501.
- [70] A. Tanaka, S. Fukui, *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* 29 (1984) 1.
- [71] J. Klein, F. Wagner in L. B. Wingard, I. Chibata: *Appl. Biochem. Bioeng. Immobilized Cells* 4 (1983) 11.
- [72] J. Bader, H. Günther, S. Nagata, H. Simon in: *3. Eur. Congr. Biotechnol., Bd. 1*, Verlag Chemie, Weinheim 1984, S. 371.
- [73] H. Günther, C. Frank, H.-J. Schuetz, J. Bader, H. Simon, *Angew. Chem.* 95 (1983) 325; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 322; *Angew. Chem. Suppl.* 1983, 463.
- [74] P. A. Levene, A. Walti, *Org. Synth.* 10 (1930) 84.
- [75] C.-H. Wong, L. Daniels, W. H. Orme-Johnson, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 6227.
- [76] P. Egerer, H. Simon, *Biochim. Biophys. Acta* 703 (1982) 158.
- [77] M. Shin in A. San Pietro: *Methods Enzymol.* 23 (1971) 440.
- [78] L. J. Arnold, K. You, W. S. Allison, N. O. Kaplan, *Biochemistry* 15 (1976) 4844.
- [79] L. Ernster, H. D. Hoberman, R. L. Howard, T. E. King, C.-P. Lee, B. Mackler, G. Scottocasa, *Nature London* 207 (1965) 940.
- [80] E. Schleicher, H. Simon, *FEBS Lett.* 74 (1977) 269.
- [81] H. R. Thirsk, J. A. Harrison: *A Guide to the Study of Electrode Kinetics*, Academic Press, New York 1972.
- [82] J. A. Farrington, M. Ebert, E. J. Land, K. Fletcher, *Biochim. Biophys. Acta* 314 (1973) 372.

- [83] C. C. Winterbourn, *FEBS Lett.* 128 (1981) 339.
 [84] M. Arai, *Biochem. Z.* 122 (1921) 254.
 [85] O. Lutz, B. Jirgensons, *Chem. Ber.* 65 (1932) 788.
 [86] W. Leuchtenberger, M. Karrenbauer, U. Plöcker, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 434 (1984) 78.
 [87] B. D. Cambou, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 2687; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 434 (1984) 219.
 [88] M. Schneider, N. Engel, P. Hönicke, G. Heinemann, H. Göbrich, *Angew. Chem.* 96 (1984) 55; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 67.
 [89] C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 7294.
 [90] C. Fuganti in: *Enzymes in Organic Synthesis (Ciba Found. Symp. 111)*, Pitman, London 1985, S. 112.
 [91] M. T. Reetz, *Angew. Chem.* 96 (1984) 542; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 556.
 [92] D. Mandler, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 5352.

Synthesen mit Radikalen – C-C-Verknüpfungen via Organozinn- und -quecksilberverbindungen

Von Bernd Giese*

Neue synthetische
Methoden (52)

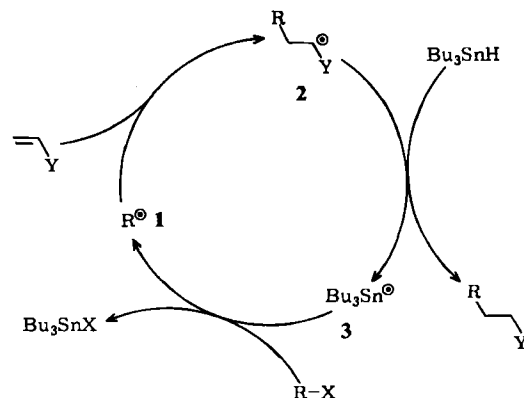
Professor Rolf Huisgen zum 65. Geburtstag gewidmet

Für die Synthese organischer Moleküle ist die Knüpfung von C–C-Bindungen essentiell. Hierfür hat sich in den letzten Jahren in steigendem Maße die Addition von Radikalen an Alkene bewährt. Die bei derartigen Reaktionen primär entstehenden Adduktradikale müssen, z. B. von einem H-Donor, abgefangen und so der Polymerisation entzogen werden. Diese Aufgabe können Organozinn- und Organoquecksilberhydride übernehmen, deren Einsatz zu neuen Synthesemethoden geführt hat. Für den Erfolg dieser Synthesen ist wichtig, daß sie über Radikalkettenreaktionen verlaufen, da dann mit geringen Mengen an Radikalinitiatoren gearbeitet werden kann. Ausbeute und auch Selektivität solcher Radikalreaktionen sind häufig sehr hoch.

1. Einleitung

Radikale, bis vor wenigen Jahren noch eine Domäne der mechanistisch orientierten Chemiker, werden zunehmend in der Synthese eingesetzt. Dabei werden die Produkte entweder durch Reaktionen von Radikalen miteinander oder mit „Nicht-radikalen“ gebildet. Bei Radikal-Radikal-Reaktionen werden mindestens äquivalente Mengen an Radikalinitiatoren benötigt. Beispiele hierfür sind Kupplungsreaktionen elektrochemisch hergestellter Radikale^[1] und die von Viehe et al.^[2] in den letzten Jahren entwickelte Methode der Dimerisation capto-dativ stabilisierter Radikale. Grundsätzlich unterscheiden sich hiervon die Verfahren, bei denen Reaktionen zwischen Radikalen und Nicht-radikalen die Produkte ergeben. Diese über Radikalkettenreaktionen ablaufenden Synthesen benötigen nur geringe Mengen an Radikalinitiatoren, wie z. B. die radikalische Verknüpfung von Alkylhalogeniden mit Alkenen in Ge-

genwart von Tributylzinnhydrid zeigt^[3]. Die Radikale 1–3 werden in Reaktionen mit Nicht-radikalen (Alken, Tributylzinnhydrid, Alkylhalogenid) immer wieder zurückgebildet.



[*] Prof. Dr. B. Giese
 Institut für Organische Chemie und Biochemie
 der Technischen Hochschule
 Petersenstraße 22, D-6100 Darmstadt

Radikalkettenreaktionen wie die $S_{RN}1$ -Reaktionen^[4], die Additionen von Molekülen mit aktivierten Kohlenstoff-