

- [7] 1: $C_{32}H_{68}Li_2N_{11}O_3P_3$, $M = 761.8$, monoklin, $P2_1/n$, $a = 18.427(1)$, $b = 14.036(1)$, $c = 19.130(1)$ Å, $\beta = 115.683(4)^\circ$, $V = 4459.1$ Å 3 , $Z = 4$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.135$ g cm $^{-3}$, $F(000) = 1648$, Stoe-Siemens-Diffraktometer, Cu-K α -Strahlung, $\lambda = 1.54184$ Å, $\mu = 1.56$ mm $^{-1}$. 3639 unabhängige Reflexe beobachtet. Strukturlösung: Direkte Methoden. Anisotrope Verfeinerung der Nichtwasserstoffatome, die Wasserstoffatome wurden isotrop in berechneten Positionen verfeinert. $R = 0.063$, $R_e = 0.049$, 461 Parameter. Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturuntersuchung können beim Direktor des Cambridge Crystallographic Data Centre, University Chemical Laboratory, Lensfield Road, GB-Cambridge CB2 1EW (UK), unter Angabe des vollständigen Literaturzitats angefordert werden.
- [8] L. M. Engelhardt, J. MacB. Harrowfield, M. F. Lappert, L. A. MacKinnon, B. H. Newton, C. L. Raston, B. W. Skelton, A. H. White, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1986, 846.
- [9] a) D. Barr, W. Clegg, R. E. Mulvey, R. Snaith, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1984, 700; b) *ibid.* 1984, 974.
- [10] a) M. Dupuis, D. Spangler, J. J. Wendoloski, *GAMESS, N.R.C.C Software Catalogue*, Program No. 2 GOI, 1980, Vol. 1; b) M. F. Guest, J. Kendrick, S. A. Pope, *GAMESS Documentation*, Daresbury Laboratory, 1983.
- [11] a) W. J. Hehe, R. Ditchfield, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* 56 (1972) 2257; b) P. C. Hariharan, J. A. Pople, *Theor. Chim. Acta* 28 (1973) 213; c) J. D. Dill, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* 62 (1975) 2921.

Kontinuierliche Erzeugung von NADH aus NAD^{\oplus} und Formiat mit einem molekulargewichtsvergrößerten Homogenkatalysator in einem Membranreaktor **

Von Eberhard Steckhan*, Sabine Herrmann, Romain Ruppert, Jörg Thömmes und Christian Wandrey

Homogenkatalysatoren, die oft schon bei niedrigen Reaktionstemperaturen hohe Wirksamkeit und große Selektivität aufweisen, sind bisher meist nur im diskontinuierlichen Betrieb technisch einsetzbar. Auf der anderen Seite lässt sich mit den für den kontinuierlichen Betrieb geeigneten Heterogenkatalysatoren oft nur geringe Selektivität erreichen. Versuche, die prinzipiell vorteilhaften Homogenkatalysatoren durch Anbindung an Polymere zu heterogenisieren, waren bisher nur mäßig erfolgreich. Viele Probleme wie uneinheitliche und zum Teil unbekannte Strukturen der heterogenisierten Katalysatoren, gehinderte Diffusion durch zu starke Vernetzung der Polymermatrix, geringe katalytische Aktivität, Metallverluste und Selbstvergiftung der aktiven Zentren konnten noch nicht überwunden werden^[1]. Kürzlich haben wir den kationischen Rh^{III}-Komplex 1 als effektiven Homogenkatalysator für die Regeneration der Enzym-Cosubstrate Nicotinamidadenindinucleotid (NADH) und Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH) vorgestellt, die mit Formiat als Hydrid-Donor^[2] oder elektrochemisch abläuft. Der Rhodiumkatalysator setzt NAD(P)[⊕] mit sehr viel höherer Geschwindigkeit um als Carbonylverbindungen und ermöglicht daher bei geeigneten Konzentrationsverhältnissen die selektive Reduktion der Cofaktoren^[3]. Nach 100 katalytischen Cyclen für 1 konnte enzymatisch keine Bildung von 1,6-NADH nachgewiesen werden.

Ein effektives System zur *in-situ*-Regeneration der kostspieligen Cosubstrate bei enzymatischen Reduktionen ist

[*] Prof. Dr. E. Steckhan, Dr. S. Herrmann, Dr. R. Ruppert ^[+]
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität

Gerhard-Domagk-Straße 1, D-5300 Bonn 1

Dipl.-Chem. J. Thömmes, Prof. Dr. C. Wandrey

Kernforschungsanlage Jülich, Institut für Biotechnologie

D-5170 Jülich

[+] Neue Adresse:

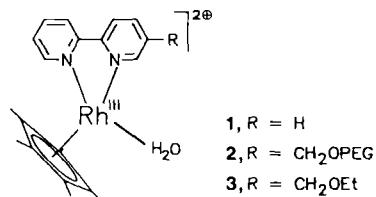
ENSCL, Laboratoire de Chimie Organique Appliquée

U.A.C.N.R.S. 402, Cité Scientifique

F-59652 Villeneuve d'Ascq (Frankreich)

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie und von der BASF AG gefördert. Frau Prof. Dr. M. R. Kula danken wir für PEG-NADH.

Voraussetzung für die Anwendung von Oxidoreduktasen als außerordentlich aktive Katalysatoren in der stereospezifischen Organischen Synthese. Die übliche enzymatische Regeneration ist nicht unproblematisch^[4]. Ein System mit Formiat-Dehydrogenase (FDH) als Regenerationsenzym und Formiat als Hydrid-Donor wurde bis zur technischen Reife entwickelt^[5]. Zur kontinuierlichen Produktion von enantiomerreinen Aminosäuren hält man die Aminosäure-Dehydrogenase, FDH und molekulargewichtsvergrößertes NADH (PEG-NADH)^[6] in einem Enzymmembranreaktor (EMR) hinter einer Ultrafiltrationsmembran zurück.



1 kann die Funktion der FDH prinzipiell übernehmen^[2]. Diese nicht-enzymatische NADH-Erzeugung hat gegenüber derjenigen mit FDH einige wesentliche Vorteile: 1) Die Reaktion ist nullter Ordnung in NAD^{\oplus} ; 1 zeigt im Gegensatz zur FDH keine Produkthemmung. 2) NADPH kann unter den gleichen Bedingungen erzeugt werden. 3) 1 ist stabiler als ein Enzym und unempfindlich gegenüber Sauerstoff.

Wir haben nun durch Anbindung von 1 an Polyethyleneglycol (PEG, MG 20 000) erstmals einen Homogenkatalysator (2) erzeugt, der sich durch eine Ultrafiltrationsmembran zurückhalten lässt, aber nicht die mit einer Heterogenisierung verbundenen Probleme hervorruft, da er wasserlöslich bleibt. Auf diese Weise bleiben die Eigenschaften von 1 weitgehend erhalten. Somit können wir die FDH im Ultrafiltrationsdurchflußreaktor ersetzen und kontinuierlich in einer homogenkatalytischen Reaktion NADH erzeugen. Durch die bessere Löslichkeit des PEG-gebundenen Komplexes sind größere stationäre Katalysatorkonzentrationen möglich als bei Verwendung von FDH. Die Reaktionsparameter können in weiten Bereichen variiert werden.

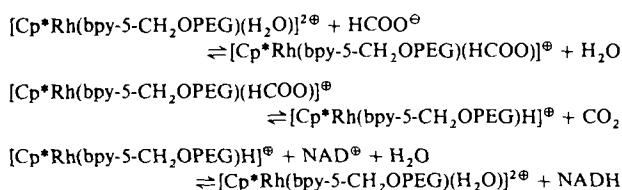
Um den Erhalt der Katalysatoreigenschaften des molekulargewichtsvergrößerten Rhodiumkomplexes 2^[7] im Ultrafiltrationsdurchflußreaktor nachzuweisen, mußten die kinetischen Werte der durch 2 katalysierten Reduktion von NAD^{\oplus} , $NADP^{\oplus}$ und PEG-NAD $^{\oplus}$ ^[6] mit Formiat bestimmt und mit den Werten für den analogen niedermolekularen Komplex 3^[8] verglichen werden. Die Wechselzahlen^[9] der Reduktion von (PEG-)NAD(P)[⊕] (MG 20 000) werden durch die Molekulargewichtsvergrößerung des Rhodiumkomplexes nur auf den 0.56- bis 0.66fachen Wert erniedrigt (Tabelle 1). Die Molekulargewichtsvergrößerung nimmt

Tabelle 1. Wechselzahlen [h^{-1}] der Komplexe 2 und 3 für die Katalyse der Reduktion von NAD^{\oplus} , $NADP^{\oplus}$ und PEG-NAD $^{\oplus}$ ($0.5 \text{ M } \text{HCOONa}$, $3.8 \times 10^{-4} \text{ M}$ Cosubstrat, $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 2 bzw. 3 in entgastem, thermostatisiertem 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 7.0; Verfolgung der UV-Absorption bei 340 nm in Abhängigkeit von der Zeit).

$T [\text{°C}]$	NAD $^{\oplus}$		NADP $^{\oplus}$		PEG-NAD $^{\oplus}$	
	3	2	3	2	3	2
25	20.3	13.3	20.7	12.3	16.6	9.9
38	67.5	43.3	67.5	39.5	56.4	31.8

aber keinen Einfluß auf die nach der Arrhenius-Beziehung bestimmten Aktivierungsenergien der Reaktionen^[10]. Die Reaktionsordnung in NAD^{\oplus} beträgt auch bei Katalyse

durch **2** null. Dies lässt sich durch einfache Variation der NAD⁺-Anfangskonzentration ermitteln^[11]. Der Reaktionsmechanismus wird folgendermaßen formuliert:



Der Erhalt der Katalysatoreigenschaften von **2** auch gegenüber PEG-NAD⁺ ist deshalb von großer Bedeutung, weil er den Einsatz von **2** in einem Enzymmembranreaktor entsprechend Abbildung 1 ermöglicht. Ob sich der molekulare

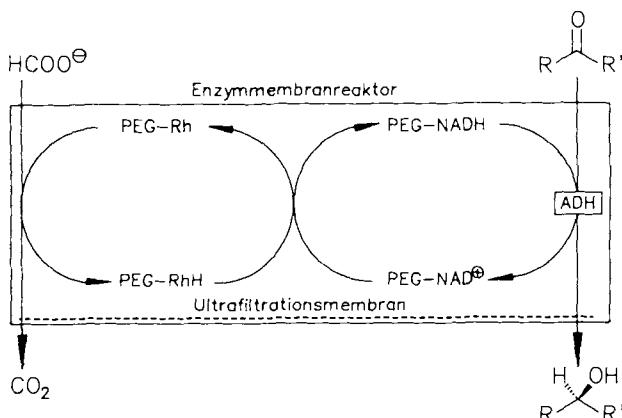


Abb. 1. Konzept zum Einsatz von **2** im Enzymmembranreaktor (ADH: Alkohol-Dehydrogenase).

largegewichtsvergrößerte Komplex **2** für die Verwendung in einem Durchflußreaktor eignet, wurde anhand der NADH-Erzeugung überprüft. Hierzu wurde ein neuartiger druckstabilen (bis 3 bar) Glas-Durchflußreaktor vom Rührkesseltyp verwendet (Abb. 2). Der Reaktionsraum befindet sich an-

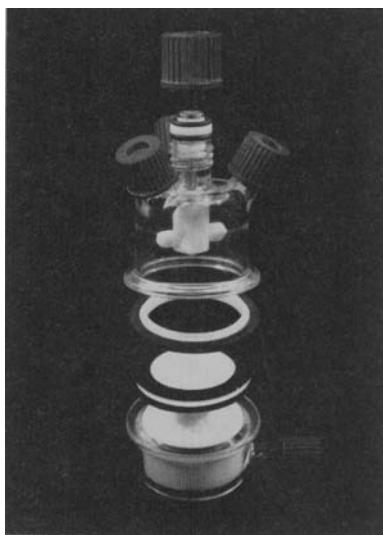


Abb. 2. Durchflußmembranreaktor zur kontinuierlichen NADH-Erzeugung.

ders als beim EMR über der Ultrafiltrationsmembran. Dieser Reaktor hat einige prinzipielle Vorteile: Da er aus Glas angefertigt ist, kann man Reaktionen visuell verfolgen; au-

Berdem sind keine chemischen Störungen durch das Reaktormaterial zu erwarten. Ferner kann der Reaktor für verschiedene Zwecke eingesetzt werden, z.B. könnte man ohne Schwierigkeiten Elektroden für eine kontinuierliche elektrochemische NADH-Erzeugung einführen. Die Durchführung von Reaktionen mit gasförmigen Reaktanten ist ebenfalls unproblematisch. Abbildung 3 gibt vereinfacht den Versuchsaufbau zur kontinuierlichen NADH-Erzeugung wieder.

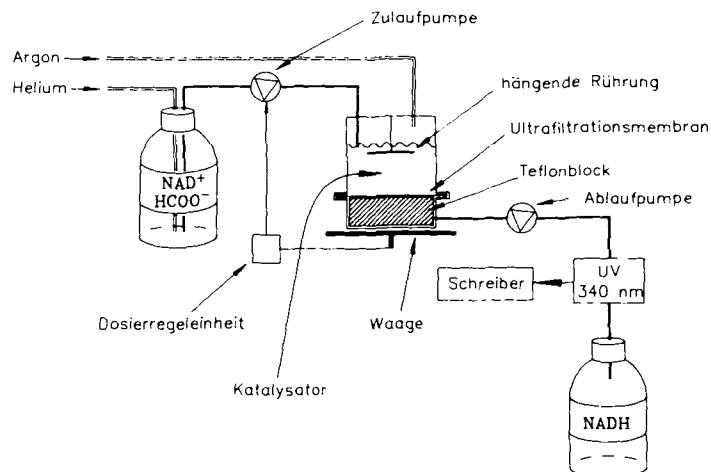


Abb. 3. Versuchsaufbau zur kontinuierlichen NADH-Erzeugung.

Im Hinblick auf eine einfache Isolierung von NADH setzen wir beim ersten Dauerversuch zunächst eine ungepufferte Ammoniumformiat/NAD⁺-Substrat-Lösung (pH 5.6) ein. Nach Zugabe von **2** steigt der NAD⁺-Umsatz schnell auf 70% an, wobei **2** eine Wechselzahl von 26.3 h^{-1} erreicht (Abb. 4A). Der anschließende Umsatzrückgang lässt sich durch eine längere Verweilzeit zwar verlangsamen (Abb. 4B), aber erst durch den Austausch von Ammoniumformiat durch Natriumformiat nach 30 h Dauerbetrieb (Abb. 4C) steigt der Umsatz von 30 auf 45% an, und es stellt sich anschließend ein stationärer Zustand ein. Der starke Umsatzrückgang in Gegenwart von Ammoniumformiat kann auf den Einbau von NH₃ in die Ligandensphäre des Rh-Atoms zurückgeführt werden. Dieser Ligand wird langsamer als H₂O und Cl⁻ gegen Formiat ausgetauscht. Man sollte also auf stark koordinierende Liganden wie NH₃ im Reaktionsmedium verzichten. In einem zweiten Versuch mit einer durch Phosphat (0.1 M) auf pH 8 gepufferten NAD⁺/Natriumformiat-Substratlösung (4.1 mM/0.5 M) steigt der Um-

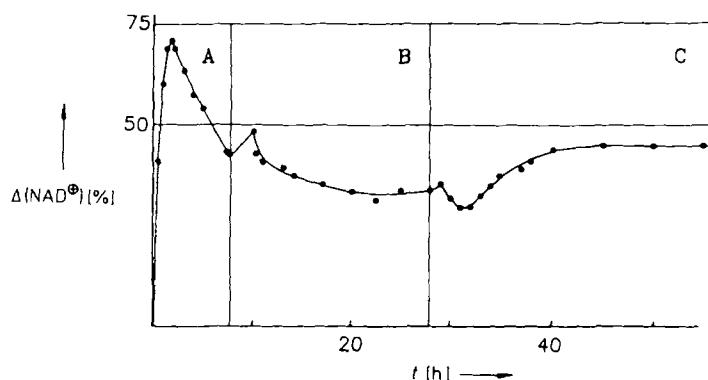


Abb. 4. Auftragung des NAD⁺-Umsatzes $\Delta(\text{NAD}^+)$ gegen die Zeit t bei der kontinuierlichen NADH-Erzeugung (5 mM NAD⁺, 0.13 mM **2**; A, B: 0.5 M HCOONH₄, C: 0.5 M HCOONa; Verweilzeit: A, C: 1 h, B: 2 h; Membranvorbelegung mit 300 mg PEG 35 000).

satz bei 25 °C und doppelter Konzentration von **2** wieder zunächst auf 70 % an und fällt erneut, jedoch langsamer als im ersten Versuch, innerhalb von 20 Verweilzeiten bis auf einen dann stationären Umsatz von 50 % ab. Vor der Einstellung des stationären Zustandes wurde durch eine Verdopplung des Reaktionsvolumens die Verweilzeit verdoppelt. Der Umsatz lag zwischenzeitlich bei 80 %. Die Quantifizierung von NAD⁺ in Substrat- und Produktlösung zeigt, daß die Stoffbilanz während der gesamten Versuchszeit ausgeglichen ist. Die Ursache des Umsatzrückgangs ist noch ungeklärt. Auszuschließen sind aber Verluste von Komplexendgruppen durch Hydrolyse sowie Ausspülen von **2**^[12]. Die Erhöhung des Umsatzes durch vorübergehende Verdoppelung des Reaktionsvolumens im zweiten Versuch zeigt, daß eine irreversible Desaktivierung von **2** nicht zur Erklärung des Umsatzrückgangs in Frage kommt.

Die Versuche ergeben, daß der molekulargewichtsvergrößerte Redoxkatalysator **2** gleiche Eigenschaften wie das niedermolekulare Modell aufweist. Im Durchflußreaktor kann nach der Einstellung eines stationären Zustandes ein kontinuierlicher Umsatz von 45–50 % aufrecht erhalten werden. Dabei erreicht der Redoxkatalysator die Wechselzahl 16.9 h⁻¹. Er durchlief in der gesamten Versuchszeit mehr als 1000 Reaktionsschleifen. Die Raum-Zeit-Ausbeute beträgt 44.4 mmol L⁻¹ d⁻¹. Bei 2.2facher Konzentration von **2** berechnet man unter Berücksichtigung der kinetischen Reaktionsdaten bei analogem Versuchsverlauf für den stationären Zustand vollständigen Umsatz. Dies entspricht einer Raum-Zeit-Ausbeute von 98.4 mmol L⁻¹ d⁻¹. Folglich ist der molekulargewichtsvergrößerte Rhodiumkomplex **2** zur Katalyse der kontinuierlichen Regeneration von NADH und NADPH sowie ihrer molekulargewichtsvergrößerten Formen für angekoppelte enzymatische Umsetzungen sehr gut geeignet. Mit dem hier beschriebenen Verfahren steht eine variabel einsetzbare Alternative zur enzymatischen NAD(P)H-Regeneration zur Verfügung.

Eingegangen am 8. November 1989 [Z 3626]

CAS-Registry-Nummern:

1, 125568-56-1; **2**, 125591-72-2; **3**, 125591-71-1; PEG, 25322-68-3; NAD⁺, 53-84-9; NADP⁺, 53-59-8; PEG-NAD⁺, 53-84-9; NADH, 58-68-4; NADPH, 53-57-6; NaHCOO, 141-53-7; PEG-2,2'-bipyridyl-5-methyl-Derivat, 125591-70-0; 5-Ethoxymethyl-2,2'-bipyridin, 125568-55-0; 5-Brommethyl-2,2'-bipyridin, 98007-15-9.

- [1] G. Braca, *Catalisi* 1988, 23; F. A. Cotton, G. Wilkinson: *Advanced Inorganic Chemistry*, 5. Aufl., Wiley-Interscience, New York 1988, S. 1271.
- [2] R. Ruppert, S. Herrmann, E. Steckhan, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1988, 1150.
- [3] R. Ruppert, S. Herrmann, E. Steckhan, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 6583.
- [4] J. B. Jones, J. F. Beck in J. B. Jones, C. J. Sih, D. Perlman (Hrsg.): *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry, Part I*, Wiley-Interscience, New York 1976, S. 370–376; J. B. Jones in R. Porter, S. Clark (Hrsg.): *Enzymes in Organic Synthesis*, Pitman, London 1985, S. 3; G. M. Whitesides, *ibid.*, S. 76; H. Simon, *GIT Fachz. Lab.* 32 (1988) 458.
- [5] C. Wandrey, R. Wichmann, A. F. Bückmann, M. R. Kula, *Umschau* 84 (1984) 88; C. Wandrey, R. Wichmann, W. Berke, M. Morr, M. R. Kula, *Prepr. Eur. Congr. Biotechnol.*, 3rd 1984, 239; C. Wandrey, R. Wichmann in A. J. Laskin (Hrsg.): *Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology*, Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA, 1985, S. 177; M. E. Kula, C. Wandrey, *Methods Enzymol.* 136 (1986) 9.
- [6] Polyethenglycol-(20 000)-N⁶-(2-aminoethyl)-NADH und -NAD⁺: A. F. Bückmann, M. R. Kula, R. Wichmann, C. Wandrey, *J. Appl. Biochem.* 3 (1981) 301.
- [7] Arbeitsvorschrift für **2**: Zu einer Lösung von 5 g (0.25 mmol) PEG (M.G. 20 000) in 1 L wasserfreiem THF werden unter Argon-Schutzgas 115 mg (1 mmol) frisch sublimiertes Kalium-*tert*-butylalkoholat gegeben. Nach 20 h Erhitzen unter Rückfluß versetzt man mit 500 mg (2 mmol) 5-Brommethyl-2,2'-bipyridin und erhitzt weitere 28 h unter Rückfluß. Man läßt abkühlen, versetzt mit 200 mL Wasser und entfernt das THF im Vakuum. Nach Dialyse und Gefriertrocknung erhält man 4.7 g farbloses, watteartiges Produkt; UV: $\lambda_{\text{max}} [\text{nm}] = 242, 303$. Davon werden 4.3 g in 1 L wasserfreiem Methanol gelöst und nach Zugabe von 400 mg

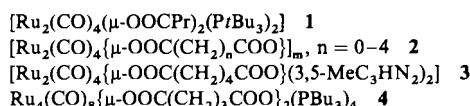
(0.65 mmol) Di- μ -chloro-dichlorobis(pentamethylcyclopentadienyl)dRhodium(II) (Herstellung: B. L. Booth, R. N. Hazeldine, M. Hill, *J. Chem. Soc. A* 1969, 1299) 1 h gerührt. Anschließend versetzt man mit 1 L Wasser und entfernt das organische Lösungsmittel im Vakuum. Nach Dialyse und Gefriertrocknung erhält man 4.1 g schwach orangefarbenes Produkt; UV (H₂O; pH 7.5; 25 °C): $\lambda_{\text{max}} [\text{nm}] (\epsilon [\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]) = 233 (12700), 308 (6150), 318 (6300)$.

- [8] Physikalische Daten von 5-Ethoxymethyl-2,2'-bipyridin und von **3**: Darstellung von 5-Ethoxymethyl-2,2'-bipyridin aus 5-Brommethyl-2,2'-bipyridin (Synthese: J. G. Eaves, H. S. Munro, D. Parker, *Inorg. Chem.* 26 (1987) 644) durch Umsetzung mit EtO². ¹H-NMR (60 MHz, CDCl₃, TMS int.): $\delta = 1.26$ (t, 3 H, ³J = 7 Hz), 3.57 (q, 2 H, ³J = 7 Hz), 4.53 (s, 2 H), 7.07–8.73 (m, 7 H); MS (70 eV, 300 μA): *m/z* 214 (M^+ , 42%), 1.85 ($M^+ - Et$, 28), 169 ($M^+ - OEt$, 100), 157 (bpy + H, 55), 141 (22), 115 (5), 78 (py, 13), 51 (8); UV (H₂O; pH 3.0; 25 °C): $\lambda_{\text{max}} [\text{nm}] (\epsilon [\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]) = 242 (8900), 304 (1680)$. Herstellung des Rhodiumkomplexes analog U. Kölle, M. Grätzel, *Angew. Chem.* 99 (1987) 572; ¹H-NMR (60 MHz, D₂O): $\delta = 1.23$ (t, 3 H, ³J = 7 Hz), 1.58 (s, 15 H), 3.63 (q, 2 H, ³J = 7 Hz), 7.57–8.97 (m, 7 H); UV (H₂O; pH 7.5; 25 °C): $\lambda_{\text{max}} [\text{nm}] (\epsilon [\text{L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]) = 233 (31600), 308 (15300), 318 (15700)$; korrekte Elementaranalyse (C, H, N).
- [9] Wechselzahl = (PEG)-NAD(P)-H-Konzentration/(Katalysatorkonzentration × Zeit).
- [10] Die Aktivierungsenergien für die Reaktion von NAD⁺ und (PEG)-NAD⁺ (je 3.8×10^{-4} M) in Natriumformiat (0.5 M) in Gegenwart von **2** bzw. **3** (je 2.6×10^{-5} M) wurden bei 17.3, 25.7, 32.1 und 40.0 °C in Natriumphosphat-Puffer von pH 7.0 bestimmt. Für die Reduktion von NAD⁺ erhält man $E_a = 64.0$ und 68.2 kJ mol^{-1} für **2** bzw. **3**; für die Reduktion von (PEG)-NAD⁺ erhält man $E_a = 70.3$ und 68.6 kJ mol^{-1} für **2** bzw. **3**.
- [11] Die Reaktionsordnung null in NAD⁺ konnte durch die Anwendung einer differentiellen Methode zur Bestimmung von Reaktionsordnungen auf zwei NADH-Konzentration-Zeit-Kurven bestätigt werden.
- [12] **2** ist bei Dialyse (sechsmal gegen 9 L H₂O bidest.) und bei Durchfluß von H₂O bidest. (sechs Verweilzeiten in Amicon-Ultrafiltrationseinheit) stabil.

Metallorganische Makrocyclen: Synthese und Molekülstruktur von trimeren Tartrato-Diruthenium-Komplexen **

Von Georg Süss-Fink *, Jean-Luc Wolfender, Frank Neumann und Helen Stoeckli-Evans

Seit 1969 ist bekannt, daß Dodecacarbonyl-triruthenium mit Carbonsäuren zu Carboxylatokomplexen mit dem Ru₂(CO)₄(μ -OOCR)₂-Strukturelement reagiert^[1]. Im Festkörper bilden diese Komplexe polymere Ketten, in denen die zweikernigen Bausteine über Ru-O-Bindungen miteinander verknüpft sind^[2, 3], in Lösung depolymerisieren die Ketten unter Aufnahme von Zwieelektronen-Liganden^[1]. Die Röntgenstrukturanalyse des Bis(*tri-tert*-butylphosphan)-Derivats **1** zeigt ein Molekül mit charakteristischer „Sägebock“-Struktur^[4]. Von Dicarbonsäurederivaten sind die als polymer beschriebenen Komplexe **2**^[5] sowie der Zweikernkomplex **3** bekannt^[6]. Die röntgenographische Untersuchung einer Glutarato-Tributylphosphan-Verbindung der Zusammensetzung **4** ergab, daß zwei Ru₂(CO)₄-Einheiten intramolekular über Glutaratoliganden verknüpft sind^[7].



Wir haben jetzt gefunden, daß mit Weinsäure trimere Tartrato-Diruthenium-Komplexe zugänglich sind, die als metallorganische Makrocyclen angesehen werden können. Die

* Prof. Dr. G. Süss-Fink, J.-L. Wolfender, F. Neumann,
Prof. Dr. H. Stoeckli-Evans
Institut de Chimie, Université de Neuchâtel
Avenue de Bellevaux 51, CH-2000 Neuchâtel (Schweiz)

** Diese Arbeit wurde vom Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique und der Volkswagen-Stiftung gefördert.