

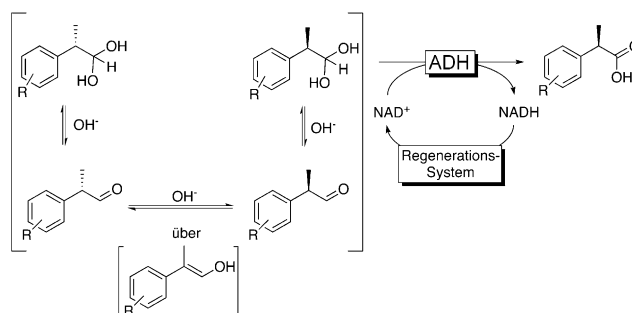
# Oxidation von Aldehyden mit Alkoholdehydrogenasen\*\*

Paul Könst, Hedda Merkens, Selin Kara, Svenja Kochius, Andreas Vogel, Ralf Zuhse, Dirk Holtmann, Isabel W. C. E. Arends und Frank Hollmann\*

Alkoholdehydrogenasen (ADHs) erfreuen sich sowohl in der akademischen Forschung als auch in der industriellen Anwendung einer stetig wachsenden Popularität.<sup>[1]</sup> Besonders beliebt ist die stereospezifische Reduktion prochiraler Ketone,<sup>[2]</sup> wohingegen die Oxidation von Alkoholen weniger verbreitet ist.<sup>[3]</sup> Darüber hinaus beschränkt sich die oxidative Anwendung von ADHs auf die Umsetzung von Alkoholen zu den entsprechenden Aldehyden oder Ketonen. Über „Durchoxidationen“ von Alkoholen zu den entsprechenden Säuren wurde entweder mit ganzen Zellen<sup>[4]</sup> oder in der Kombination von ADHs mit Aldehyddehydrogenasen (AldDHs) berichtet.<sup>[5]</sup> Interessanterweise ist mit der so genannten Dismutaseaktivität<sup>[6]</sup> auch die ADH-katalysierte Oxidation von Aldehyden prinzipiell bekannt. Dadurch wären die obengenannten „Durchoxidationen“ mit nur einem Biokatalysator möglich. Sehr zu unserem Erstaunen wurde aber eine präparative Anwendung dieser altbekannten Aktivität bislang nicht beschrieben.

Daher war es unser Ziel, das präparative Potenzial ADH-katalysierter Aldehydoxidation anhand der Oxidation racemischer Profenaldehyde auszuloten. Die angestrebten Produkte, Profene ( $\alpha$ -Arylpropionsäuren), sind gängige Antirheumatika und Schmerzmittel, die bis jetzt als Racemate vertrieben werden. Aufgrund der steigenden Nachfrage nach enantiomerenreinen Profenen werden in letzter Zeit auch verstärkt Syntheserouten für diese evaluiert.<sup>[7]</sup> Im Wesentlichen beruhen diese auf einer kinetischen Racematspaltung (KR) der Profene selbst. Enantioselektive Routen würden die intrinsischen Nachteile der KR (maximal 50 % Ausbeute) umgehen.<sup>[8]</sup>

Die von uns angestrebte oxidative dynamische kinetische Racematspaltung ist in Schema 1 wiedergegeben. Vorteilhaft



**Schema 1.** Oxidative dynamische kinetische Racematspaltung von Profenaldehyden als Zugang zu enantiomerenreinen Profenen. ADH: Alkoholdehydrogenase.

bei dieser Methode ist insbesondere, dass im Vergleich zu den bisher berichteten reduktiven DKRs<sup>[8a-c]</sup> direkt das gewünschte Produkt statt des Profenalkohols gebildet wird.

Der erste Schritt bestand in der Identifizierung eines geeigneten Biokatalysators. Dazu wurde die ADH-Bibliothek der Firma c-LEcta mit 70 unterschiedlichen ADHs (alle rekombinant in *Escherichia coli* überexprimiert) hinsichtlich ihrer Aktivität in der Oxidation von 2-Phenylpropionaldehyd durchmustert.<sup>[9]</sup> Die NAD(P)<sup>+</sup>-Regeneration wurde durch Zugabe der NAD(P)H-Oxidase (NOX) aus *Lactobacillus sanfanciscensis*<sup>[10]</sup> im Überschuss sichergestellt.<sup>[11]</sup> 9 der 70 untersuchten ADHs zeigten dabei die gewünschte Aktivität (Tabelle 1) mit 8 *R*-selektiven und einer *S*-selektiven ADH. Beachtenswert ist, dass auch das *E. coli*-Expressionssystem eine deutliche Hintergrundaktivität aufwies. Es bleibt in weiterführenden Studien zu klären, ob dies auf *E. coli*-ADHs mit „Dismutaseaktivität“ oder endogene AldDHs zurückzuführen ist.

Entsprechend dem Mechanismus der ADH-katalysierten Oxidation von Alkoholen halten wir im Fall der Aldehydoxidation die entsprechenden Aldehydhydrate für die eigentlichen ADH-Substrate. Demzufolge sollte der pH-Wert der Reaktionslösung einen Einfluss auf die Konzentration der Aldehydhydrate in situ und somit auf die enzymatische Oxidation haben. In der Tat wirkte sich ein höherer pH-Wert positiv auf die Selektivität (das Verhältnis von Säure zu Alkohol) der Reaktion aus (Tabelle 1). Allerdings blieb die erwartete Erhöhung der Umsatzrate aufgrund höherer ADH-Oxidationsaktivität<sup>[12]</sup> aus; möglicherweise ist dies der niedrigeren NOX-Aktivität bei höheren pH-Werten zuzuschreiben.<sup>[9,10]</sup> Nichtsdestotrotz liegt, wie NMR-Versuche zeigten,<sup>[9]</sup> bereits bei neutralem pH-Wert das Hydratisierungsgleichgewicht weit auf Seiten der Aldehydhydrate.

[\*] Dr. P. Könst, Dr. S. Kara, Dr. A. Vogel, Prof. Dr. I. W. C. E. Arends, Dr. F. Hollmann  
Department of Biotechnology, Delft University of Technology  
Julianalaan 136, 2628BL Delft (Niederlande)  
E-Mail: f.hollmann@tudelft.nl

Dr. H. Merkens  
c-LEcta GmbH  
Deutscher Platz 5, 04103 Leipzig (Deutschland)

S. Kochius, Dr. D. Holtmann  
Biochemical Engineering Group, DECHEMA Research Institute  
Theodor-Heuss-Allee 25, 60486 Frankfurt am Main (Deutschland)

Dr. R. Zuhse  
Chiracon GmbH  
Biotechnologiepark, 14943 Luckenwalde (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt, ChemBioTec (AZ 13253) unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201203219> zu finden.

**Tabelle 1:** Ergebnisse des ADH-Screenings hinsichtlich der Oxidation von 2-Phenylpropionaldehyd.<sup>[a]</sup>

Nr. <sup>[b]</sup>	$A_{\text{spez}}$ [U mL <sup>-1</sup> ] <sup>[c]</sup>		Säure/Alkohol <sup>[d]</sup>		$ee$ [%] <sup>[e]</sup>	
	pH 7	pH 9	pH 7	pH 9	pH 7	pH 9
<b>R-spezifische ADHs</b>						
1	0.1	0.04	0.6	1.6	72	53
2	0.7	0.7	3.6	5.3	50	47
3	0.6	0.7	3.9	7.5	46	49
4	0.4	0.2	2.4	9.6	37	47
5	0.7	0.2	2.1	2.4	23	21
6	0.7	0.6	1.9	2.8	81	81
7 <sup>[f]</sup>	2.2	2.1	3.2	5.4	94	90
8	0.1	0.04	1.3	> 10	39	45
<b>S-spezifische ADHs</b>						
9 <sup>[g]</sup>	0.4	0.2	> 10	> 10	77	46
Kontrolle <sup>[h]</sup>	0.02	0.04	> 10	> 10	45 (R)	40 (R)

Bedingungen: 50 mM Tris/HCl-Puffer (30°C, pH 7 bzw. 9, 2 mM MgCl<sub>2</sub>); 1 % (v/v) DMSO;  $c(2\text{-Phenylpropionaldehyd})_0 = 5$  mM,  $c(\text{NAD}^+) = c(\text{NADP}^+) = 1$  mM, NOX-Rohextrakt. [a] Jeder Eintrag repräsentiert eine individuelle rekombinante ADH (in *E. coli*). [b] Spezifische Aktivitäten wurden nach 3 Stunden bestimmt. [c] Werte von > 10 bedeuten, dass kein Alkohol detektiert war. [d]  $ee$ -Wert der Säure, bestimmt über HPLC an chiraler Festphase. [e] *E. coli*-ADH dkgB (2,5-Diketo-D-gluconat-Reduktase B, GenBank: BAL37507.1). [f] Die volle Sequenz von ADH-9 ist in den Hintergrundinformationen angegeben. [g] *E. coli*-Zellen ohne Expressionsplasmid unter ansonsten identischen Bedingungen.

Für weitere Studien wurde die ADH-9 als Modellenzym ausgewählt. Obendrein wurde auch eine hinsichtlich Enantioselektivität und Aktivität verbesserte Variante (ADH-9V1) verwendet.<sup>[9,13]</sup>

Um die unterschiedliche Säureselektivität verschiedener ADH besser zu verstehen, wurden die kinetischen Parameter der unselektiven ADH-1 mit denen der selektiven ADH-9 (und der aktiveren Variante V1) verglichen (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Vergleich der kinetischen Parameter einiger (un)selektiver ADHs.<sup>[a]</sup>

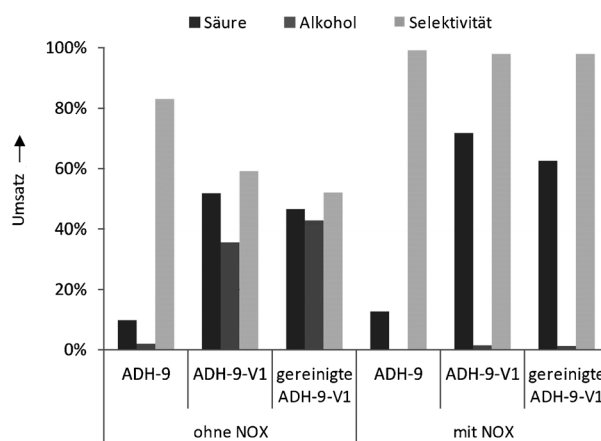
	$K_M$ [mM]		Selektivität <sup>[b]</sup>
	NAD <sup>+</sup>	NADH	
ADH-1	0.059	0.054	0.6
ADH-9	0.26	13.3	4.55
ADH-9-V1	0.12	0.37	1.38

Bedingungen: 50 mM Tris/HCl-Puffer (30°C, pH 7, 2 mM MgCl<sub>2</sub>); 20 % (v/v) DMSO;  $c(2\text{-Phenylpropionaldehyd})_0 = 5$  mM,  $c(\text{NAD}^+) = 1.5$  mM. [a] Selektivität = [Säure]/[Alkohol] (Tabelle 1).

Dabei fiel auf, dass die selektive ADH-9 eine außergewöhnlich niedrige Affinität für den reduzierten Nicotinamid-Cofaktor ausweist. Somit ließe sich die beobachtete Säureselektivität kinetisch erklären. Oxidierte und reduzierte Cofaktoren konkurrieren beim Umsatz des Aldehydsubstrates; entscheidend für die jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten (zum Alkohol oder zur Säure) ist die katalytische Effizienz, mit der die Cofaktoren von der ADH umgesetzt werden, wobei auch die Affinität der ADH zu den jeweiligen Cofaktoren eine Rolle spielt.

Möglicherweise stellt der Quotient aus  $K_M(\text{NAD}^+)$  und  $K_M(\text{NADH})$  ein einfaches diagnostisches Kriterium dar, um säureselektive ADHs zu identifizieren. Weitergehende Untersuchungen dahingehend werden momentan von uns durchgeführt.

Allerdings sollte sich auch in Fall einer unselektiven ADH (z. B. ADH-9V1) das Gleichgewicht durch ein effizientes NAD(P)<sup>+</sup>-Regenerationssystem zugunsten der Säureprodukte verschieben lassen. Um dies zu überprüfen, wurde der Einfluss des NOX-Regenerationssystems auf die Produktverteilung bei ADH-9 und ADH-9V1 betrachtet (Abbildung 1). Letztere wurde auch als gereinigtes Enzym eingesetzt, um den Einfluss „kontaminierender“ *E. coli*-Proteine auszuschließen.

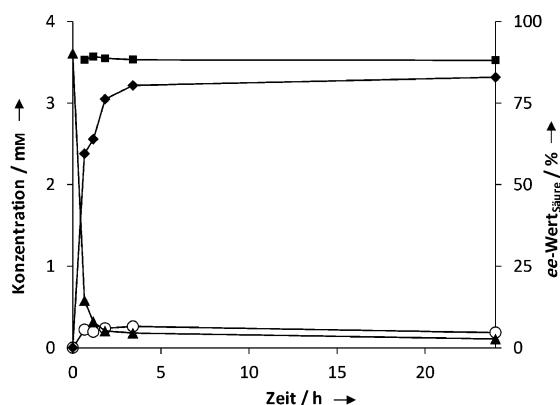


**Abbildung 1.** Vergleich der Säure/Alkohol-Selektivität von ADH-9 und ADH-9V1 in Abwesenheit (links) und Gegenwart (rechts) eines NAD<sup>+</sup>-Regenerationssystems. Bedingungen: 50 mM Tris/HCl-Puffer (30°C, pH 7, 2 mM MgCl<sub>2</sub>); 20 % (v/v) DMSO;  $T = 30^\circ\text{C}$ ;  $c(2\text{-Phenylpropionaldehyd})_0 = 5$  mM,  $c(\text{NAD}^+) = 1$  mM,  $c(\text{ADH}) = c(\text{NOX}) = 1$  mg mL<sup>-1</sup>;  $t = 40$  h.

Ohne externes Regenerationssystem und in Gegenwart stöchiometrischer Mengen NAD<sup>+</sup> wurde die „natürliche“ Selektivität beobachtet: selektive Säurebildung im Fall der ADH-9 und ein nahezu äquimolares Säure/Alkohol-Verhältnis bei der ADH-9V1. Unter denselben Bedingungen, aber in Gegenwart des NOX-Regenerationssystems, war in allen Fällen eine fast ausschließliche Säureselektivität zu beobachten. Somit sehen wir unsere Annahme bestätigt, dass auch unselektive ADHs, in Gegenwart eines effizienten NAD(P)<sup>+</sup>-Regenerationssystems, zur Aldehydoxidation geeignet sein können.

Abbildung 2 zeigt einen typischen Zeitverlauf einer oxidativen DKR von 2-Phenylpropionaldehyd. Innerhalb der ersten 5 Stunden wurde die Ausgangsverbindung beinahe quantitativ in das entsprechende (S)-Profen (88 %  $ee$ ) umgesetzt. Anfänglich gebildete Spuren des Alkohols (< 10 %) wurden mit der Zeit weiter zur Säure umgesetzt.

Interessanterweise zeigte sich ein umgekehrter Zusammenhang zwischen Biokatalysatorkonzentration und Enantiomerenreinheit des Produktes.<sup>[9,14]</sup> Zum Beispiel erhöhte sich der  $ee$ -Wert des Produktes von 52 auf über 97 % bei Verringerung der Konzentration an (gereinigtem) ADH-9V1



**Abbildung 2.** Repräsentativer Verlauf einer oxidativen DKR von 2-Phenylpropionaldehyd. Bedingungen wie in Abbildung 1 gezeigt. (◆): 2-Phenylpropionsäure, (○): 2-Phenylpropanol; (▲): 2-Phenylpropionaldehyd; (■): ee-Wert. Der ee-Wert des Produkts ist 88%.

von 20 auf  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ; damit einhergehend sank die Anfangsrate von  $7.4$  auf  $0.19 \text{ mm h}^{-1}$ . Dies könnte auf eine vergleichsweise langsame Racemisierung der Ausgangsverbindung (2-Phenylpropionaldehyd) unter den Reaktionsbedingungen zurückzuführen sein.<sup>[8b]</sup> Demnach wäre auch die Oxidation des nichtbevorzugten *R*-Enantiomers schneller als dessen Racemisierung, was die geringere Enantiomerenreinheit des Produktes erklärt. Vielversprechende Ansätze, um die Racemisierungsgeschwindigkeit zu erhöhen, beispielsweise Umsetzungen bei niedrigeren pH-Werten oder der Einsatz katalytisch aktiver Festphasen,<sup>[15]</sup> werden derzeit weiter verfolgt.

Weiterhin wurde die Anwendungsbreite der vorgestellten ADH-katalysierten Oxidation untersucht. Insbesondere die vollständige Oxidation primärer Alkohole zu den entsprechenden Säuren mit Sauerstoff als Oxidationsmittel könnte eine präparativ interessante Methode darstellen. Wie in Tabelle 3 gezeigt, konnten einige primäre Alkohole und deren Aldehyde gut in die entsprechenden Säuren umgesetzt werden.<sup>[17]</sup>

Schließlich sollte noch erwähnt werden, dass NOX unter den gegebenen Bedingungen nicht optimal geeignet war. Zum einen lagen die optimalen Bedingungen für NOX und ADH-9 recht weit auseinander; zum anderen war die Stabilität der NOX nicht allzu hoch.<sup>[9]</sup> Eine mögliche Lösung hierfür stellt die substratgekoppelte Regenerationsmethode dar. Hierbei wird durch Zugabe eines Cosubstrats (üblicherweise Aceton) die In-situ-Regeneration des oxidierten Co-faktors durch das Produktionsenzym selbst erreicht. Somit wird nur ein Biokatalysator benötigt, und man erhält ein besonders einfaches System. Dieses Konzept wurde anhand der oxidativen DKR von Flurbiprofenaldehyd überprüft. Bereits in Gegenwart von einem Äquivalent Aceton wurden über 90% Umsatz des Aldehyds zur Säure beobachtet. Bei höheren Cosubstratüberschüssen war der Umsatz quantitativ.<sup>[9]</sup> Dies ist insofern bemerkenswert, als üblicherweise bei (biokatalytischen) Oppenauer-Oxidationen hohe Cosubstratüberschüsse nötig sind, um das Gleichgewicht in die gewünschte Richtung zu verschieben.<sup>[16]</sup> Im vorliegenden Fall ist

**Tabelle 3:** Oxidation<sup>[a]</sup> verschiedener Alkohole/Aldehyde mit ADH-9V1/NOX.<sup>[17]</sup>

Produkt	Produkt [mM] (Umsatz [%]) <sup>[b]</sup> ausgehend vom	
	Alkohol	Aldehyd
	$1.4 \pm 0.2$ (73)	$1.39 \pm 0.01$ (>99)
	$1.36 \pm 0.04$ (70)	$1.00 \pm 0.06$ (67)
	$0.61 \pm 0.03$ (37)	$2.28 \pm 0.03$ (95)
	$0.39 \pm 0.02$ (9)	$2.43 \pm 0.09$ (94)
	n.b.	$0.72 \pm 0.07$ (65)

[a] Bedingungen: 50 mM Tris/HCl-Puffer (30°C, pH 7, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ); 20% (v/v) DMSO;  $T = 30^\circ\text{C}$ ;  $c(\text{Ausgangsverbindung})_0 = 5 \text{ mM}$ ,  $c(\text{NAD}^+) = 1 \text{ mM}$ ,  $c(\text{ADH}) = 20 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c(\text{NOX}) = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $t = 21 \text{ h}$ ; gezeigt sind jeweils Doppelbestimmungen. [b] Umsatz berechnet aus den gemessenen Reaktantenkonzentrationen nach 21 h. [c] Die Enantiomerenreinheit hing von der Konzentration des Biokatalysators ab.<sup>[9]</sup> [d] 56% ee; n.b. = nicht bestimmt.

aber die Säurebildung thermodynamisch und kinetisch irreversibel.

Erste Versuche im präparativen Maßstab belegen auch die praktische Anwendbarkeit des vorgeschlagenen Systems,<sup>[9]</sup> allerdings sind die bisher erreichten Ausbeuten mit ca. 46% noch nicht zufriedenstellend. Insbesondere die hohe Reaktivität der Ausgangsaldehyde (insbesondere mit den Biokatalysatoren) und auch ihre geringe Wasserlöslichkeit stellen noch zu lösende Herausforderungen dar.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass auch alte Bekannte wie die Alkoholdehydrogenasen noch immer für Überraschungen gut sein können. Die hier vorgestellte Aldehydoxidation ist möglicherweise allgemein anwendbar mit einer ganzen Reihe von (kommerziell erhältlichen) ADHs und könnte einen interessanten Zugang zu beispielsweise enantiomerenreinen Profenen darstellen.

Eingegangen am 26. April 2012,  
veränderte Fassung am 12. Juli 2012  
Online veröffentlicht am 31. August 2012

**Stichwörter:** Aldehydoxidation · Alkoholdehydrogenasen · Alkoholoxidation · Dynamische kinetische Racematspaltung · Profene

- [1] a) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6. Aufl., Springer, Berlin, **2011**; b) K. Faber, S. M. Glueck, B. Seisser, W. Kroutil in *Enzyme Technologies: Metagenomics, Evolution, Biocatalysis and Biosynthesis* (Hrsg.: W. K. Yeh, H. C. Yang, J. R. McCarty), Wiley, Hoboken, **2010**, S. 199–248; c) S. M. A. De Wildeman, T. Sonke, H. E. Schoemaker, O. May, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1260–1266; d) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, D. Holtmann, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2285–2313; e) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, A. Schallmeyer, B. Buehler, *Green Chem.* **2011**, *13*, 226–265; f) S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl, *Green Chem.* **2011**, *13*, 3007–3047; g) A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [2] a) J. Liang, E. Mundorff, R. Voladri, S. Jenne, L. Gilson, A. Conway, A. Krebber, J. Wong, G. Huisman, S. Truesdell, J. Lalonde, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 188–192; b) J. Liang, J. Lalonde, B. Borup, V. Mitchell, E. Mundorff, N. Trinh, D. A. Kochrekar, R. N. Cherat, G. G. Pai, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 193–198; c) G. W. Huisman, J. Liang, A. Krebber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 122–129.
- [3] a) T. Orbegozo, I. Lavandera, W. M. F. Fabian, B. Mautner, J. G. de Vries, W. Kroutil, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 6805–6809; b) C. V. Voss, C. C. Gruber, W. Kroutil, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 753–757; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 741–745; c) C. V. Voss, C. C. Gruber, K. Faber, T. Knaus, P. Macheroux, W. Kroutil, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13969–13972; d) I. Lavandera, A. Kern, V. Resch, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, W. M. F. Fabian, S. de Wildeman, W. Kroutil, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2155–2158; e) W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 120–126; f) W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 125–142.
- [4] a) A. V. Presečki, D. Vasić-Rački, *Proc. Biochem.* **2009**, *44*, 54–61; b) R. Gandolfi, K. Cavenago, R. Gualandris, J. V. Sinisterra Gago, F. Molinari, *Proc. Biochem.* **2004**, *39*, 749–753; c) F. Molinari, R. Gandolfi, R. Villa, E. Urban, A. Kiener, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2041–2043; d) R. Villa, A. Romano, R. Gandolfi, J. V. Sinisterra Gago, F. Molinari, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6059–6061; e) A. Romano, R. Gandolfi, P. Nitti, M. Rollini, F. Molinari, *J. Mol. Catal. B* **2002**, *17*, 235–240; f) R. Gandolfi, A. Borrometi, A. Romano, J. V. Sinisterra Gago, F. Molinari, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 2345–2349; g) R. Gandolfi, N. Ferrara, F. Molinari, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 513–514.
- [5] a) J. Hirano, K. Miyamoto, H. Ohta, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *80*, 71–78; b) C. H. Wong, J. R. Matos, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1992–1994.
- [6] L. P. Olson, J. Luo, O. Almarsson, T. C. Bruice, *Biochemistry* **1996**, *35*, 9782–9791.
- [7] a) K. Velonia, I. Smonou, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 2283–2287; b) R. H. Abeles, H. A. Lee, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 1499–1503; c) G. T. M. Hennehan, S. H. Chang, N. J. Oppenheimer, *Biochemistry* **1995**, *34*, 12294–12301; d) G. T. M. Hennehan, N. J. Oppenheimer, *Biochemistry* **1993**, *32*, 735–738; e) S. Trivić, V. Leskova, G. W. Winston, *Biotechnol. Lett.* **1999**, *21*, 231–234; f) B. Mee, D. Kelleher, J. Frias, R. Malone, K. F. Tipton, G. T. M. Hennehan, H. J. Windle, *FEBS J.* **2005**, *272*, 1255–1264; g) V. Höllrigl, F. Hollmann, A. Kleeb, K. Buehler, A. Schmid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 263–273; h) R. Kourist, P. Dominguez de Maria, K. Miyamoto, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2607–2618.
- [8] a) J. A. Friest, Y. Maezato, S. Broussy, P. Blum, D. B. Berkowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5930–5931; b) P. Galletti, E. Emer, G. Gucciardo, A. Quintavalla, M. Pori, D. Giacomini, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4117–4123; c) D. Giacomini, P. Galletti, A. Quintavalla, G. Gucciardo, F. Paradisi, *Chem. Commun.* **2007**, 4038–4040; d) J. Pietruszka, M. Schölzel, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 751–756.
- [9] Siehe die Hintergrundinformationen.
- [10] a) B. R. Riebel, P. Gibbs, W. Wellborn, A. Bommarius, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 707–712; b) B. R. Riebel, P. R. Gibbs, W. B. Wellborn, A. S. Bommarius, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 1156–1168.
- [11] In einem typischen Experiment wurden ADH und NOX in gleichen Mengen eingesetzt. Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivitäten (z. B. ADH-9V1 auf 2-Phenylpropionaldehyd: 6.2 U g<sup>-1</sup> und NOX: 4.5 U mg<sup>-1</sup>) entspricht dies einer ca. 1000-fachen höheren Aktivität der NAD<sup>+</sup>-Regeneration im Vergleich zur Aldehydoxidation.
- [12] A. Chang, M. Scheer, A. Grote, I. Schomburg, D. Schomburg, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D588–D592.
- [13] a) M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 144–182; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 138–174; b) M. T. Reetz, S. Prasad, J. D. Carballeira, Y. Gumulya, M. Bocola, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9144–9152; c) M. T. Reetz, J. D. Carballeira, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 891–903; d) M. T. Reetz, M. Bocola, J. D. Carballeira, D. Zha, A. Vogel, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4264–4268; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4192–4196.
- [14] M. Kitamura, M. Tokunaga, R. Noyori, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 1853–1860.
- [15] a) V. Alphand, R. Wohlgemuth, *Curr. Org. Chem.* **2011**, *14*, 1928–1965; b) N. Berezina, V. Alphand, R. Furstoss, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1953–1955.
- [16] a) T. Orbegozo, J. G. d. Vries, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3445–3448; b) F. Bisogno, E. García-Urdiales, H. Valdés, I. Lavandera, W. Kroutil, D. Suárez, V. Gotor, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 11012–11019; c) J. H. Schrittwieser, I. Lavandera, B. Seisser, B. Mautner, J. H. L. Spelberg, W. Kroutil, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 483–488.
- [17] Es sei hier darauf hingewiesen, dass die Massenbilanzen unter den bisherigen Reaktionsbedingungen typischerweise nur zu ca. 60% geschlossen waren. Kontrollexperimente weisen darauf hin, dass dies hauptsächlich auf Adsorption der hydrophoben Aldehyde (z. B. an den Gefäßwänden) zurückzuführen ist. Die Bildung unerwünschter Nebenprodukte ist nicht beobachtet worden.