



Institut für Biotechnologie

Elektrochemische Oxidation von Nukleotidkofaktoren

***Charakterisierung und Prozessentwicklung
asymmetrischer enzymatischer Katalysesysteme***

Iris Schröder

Elektrochemische Oxidation von Nukleotidkofaktoren

***Charakterisierung und Prozessentwicklung
asymmetrischer enzymatischer Katalysesysteme***

Iris Schröder

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4064

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-4064

D 5 (Diss., Bonn, Univ., 2003)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1997 bis Mai 2000 am Kékulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. Eberhard Steckhan († 10.02.2000) begonnen. Von Juni 2000 bis Dezember 2002 wurde die Arbeit am Institut für Biotechnologie der Forschungszentrum Jülich GmbH unter Leitung von Prof. Dr. C. Wandrey, Lehrstuhl für Biotechnologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn fortgesetzt.

Mein Dank gilt:

- Meinem früheren Doktorvater Prof. Dr. Eberhard Steckhan, oder auch einfach Eberhard, für seine herzliche und fürsorgliche Art, die interessante Themenstellung, die vielen anregenden nicht nur wissenschaftlichen Gespräche und vor allem für seine kompetenten Hilfestellungen. Er war mir stets eine unerschöpfliche Wissensquelle.
- Meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Wandrey, für die herzliche Aufnahme und die Begeisterungsfähigkeit für das Gebiet der Elektroenzymatik; darüber hinaus für die kompetenten Hilfestellungen und Diskussionen bei der Erweiterung des elektrochemischen Themas um die Bereiche der Biotechnologie und der Verfahrenstechnik.
- Herrn Prof. Dr. Heinrich Wamhoff für die Übernahme des Korreferats.
- Der ganzen Enzym-Gruppe und Herrn Dr. Andreas Liese für die fachliche und organisatorische Betreuung meiner Arbeit und die Gruppendynamik, ohne die die Arbeit in diesem Umfang nicht möglich gewesen wäre; und Herrn Liese besonders für die Hilfe bei kinetischen Simulationen und die Korrekturarbeit. Es war eine sehr schöne und lehrreiche Zeit.
- Der ganzen ehemaligen Steckhan-Gruppe und besonders Frau Elke Koppmann für die schöne Arbeitsatmosphäre auch in schweren Zeiten; darüber hinaus Frau Koppmann für die unermüdliche und hartnäckige Organisationsarbeit, die eine Weiterführung aller Arbeiten nach dem Tod Prof. Dr. Eberhard Steckhans erst ermöglicht hat.
- Herrn Dipl.-Chem. Lasse Greiner für seine Hilfe bei der Konstruktion der Durchflusszelle und beim Aufbau des E³MRs, für die vielen Diskussionen und die richtungsweisenden Korrekturen bei der Erstellung dieser Arbeit.

- Frau Dipl.-Chem. Daniela Degenring für die arbeitsintensive Entwicklung und Durchführung der Simulationen zum E³MR, die wesentlich zur Identifizierung limitierender Prozessgrößen beigetragen haben.
- Herrn Dipl.-Chem. Jürgen Haberland für die Hilfe bei wissenschaftlichen, logistischen und sonstigen Fragestellungen und gemeinsam mit Herrn Dipl.-Chem. Stephan Luetz für die nette Büro- und Laboratmosphäre.
- Frau Doris Hahn, Frau Daniela Müller und ganz besonders Herrn Christian Reimers für ihre engagierte und kompetente experimentelle Unterstützung.
- Frau Prof. Dr. Durda Vasic-Racki für die Unterstützung bei der kinetischen Charakterisierung der Glycerindehydrogenase und für ihre richtungsweisenden Ratschläge bezüglich der modularen Systembetrachtung für die Versuche im E³MR.
- Frau Heike Offermann für die nette Laboratmosphäre, ihre stete Hilfsbereitschaft und für unermüdliches Füttern meiner Literaturdatenbank.
- Frau Marianne Heß für ihre stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen bürokratischen und sonstigen organisatorischen Dingen.
- Der BASF AG, Ludwigshafen und der Graduiertenförderung des Landes Nordrhein-Westfalen für die finanzielle Unterstützung.
- Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer, Herrn Dr. Hermann Pütter, Frau Dr. Claudia Merk, Herrn Dr. T. Zelinski und Herrn Dr. Tilo Habicher, BASF AG, Ludwigshafen für viele anregende Diskussionen.
- Den Damen und Herren der Werkstätten, des Elektronik- und des Fotolabors für die immer wieder gewährte, teilweise sehr kurzfristige, Unterstützung.
- Meinen Eltern und meiner Schwester für ihre fortwährende Unterstützung und Zuversicht und für die Rundum-Versorgung während der Jülicher Zeit.
- Meinem Mann Peer Nils für seine stete Unterstützung und Rücksichtnahme, seinen bedingungslosen Rückhalt und für seine Liebe.

Elektrochemische Oxidation von Nukleotidkofaktoren

Charakterisierung und Prozessentwicklung asymmetrischer enzymatischer Katalysesysteme

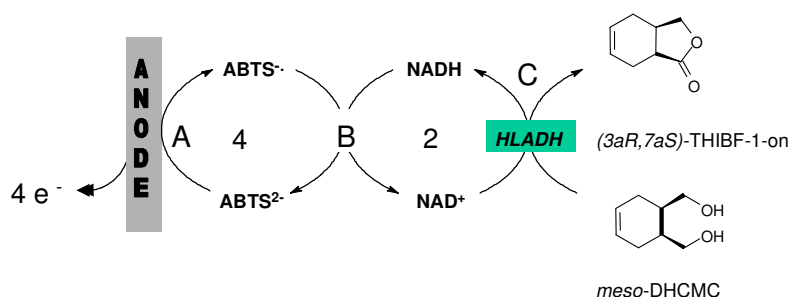


Abbildung 1: Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase (HLADH)-katalysierte Oxidation von *meso*-3,4-Dihydroxymethylcyclohexen (*meso*-DHMC) zu (3aR,7aS)-3a,4,7,7a-Tetrahydro-3H-isobenzofuran-1-on (THIBF-1-on), 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat⁻) (ABTS^{•-})

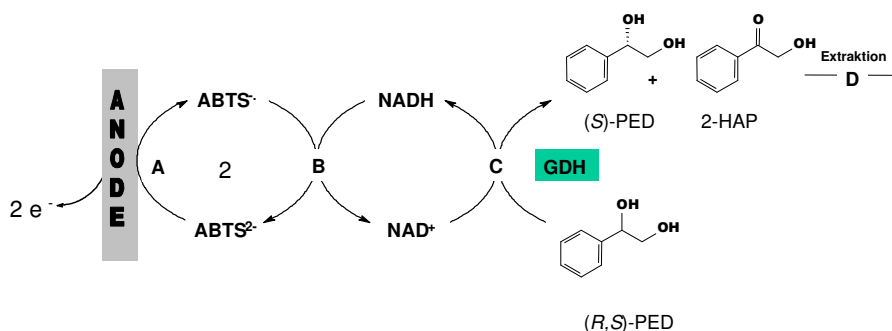


Abbildung 2: Glycerin-Dehydrogenase (GDH)-katalysierte Racematspaltung von (R,S)-1-Phenyl-1,2ethandiol, Alkoholdehydrogenase (ADH)-katalysierte Oxidationen stellen verfahrenstechnisch eine besondere Herausforderung dar, da sie zumeist durch eine doppelte Produktinhibition durch den reduzierten Kofaktor und das gebildete Oxidationsprodukt gekennzeichnet sind.

Es wurde eine effektive Kofaktorregenerierung (A,B) entwickelt. Nach Substrat- und Enzymscreening wurden zwei Enzym/Substratpaare ausgewählt, die zwei verschiedene Möglichkeiten zur Umgehung der Inhibition durch das Oxidationsprodukt zeigen. Intramolekulare Cyclisierung (Abbildung 1) ist eine verfahrenstechnisch wenig aufwendige Möglichkeit, das intermediär gebildete inhibierende Produkt *in situ* zu entfernen. Gleichzeitig eröffnen die hier dargestellten Verfahren einen Zugang einerseits zu Zwischenstoffen für die Pharmaindustrie (Dirole) und andererseits zu Produkten im Bereich Flavour&Fragrances (Lactone).

Eine prozesstechnisch wesentlich anspruchsvollere Aufgabe ergibt sich, wenn das gebildete Oxidationsprodukt, der Inhibitor, nicht über eine chemische Folgereaktion abgefangen wird, sondern in der Reaktionslösung verbleibt (Abbildung 2).

Für die Umsetzung der integrierten Extraktion wurde ein neuer Reaktor, der **extraktive elektrochemische Enzym-Membranreaktor (E³MR)** entwickelt, der schematisch vereinfacht in der folgenden Abbildung gezeigt ist.

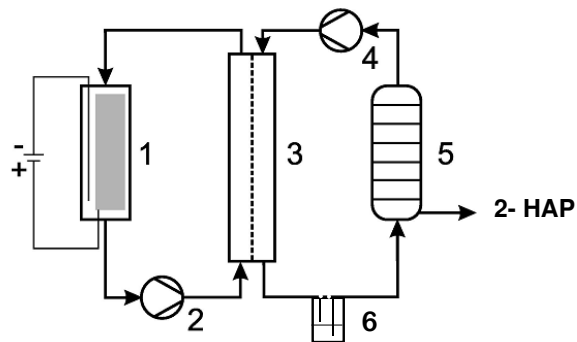


Abbildung 3: E³MR: 1) Elektrochemische Durchflussszelle, 2) wässrige Kreislaufrpumpe (Peristaltikpumpe), 3) Extraktionsmodul (UF-Hohlfasermembran) 10 kD, 8000 cm² Austauschfläche, 4) organische Kreislaufrpumpe (*iso*-Oktan), 5) Rotationsverdampfer, 6) Druckausgleichgefäß; On-Line-Datenerfassung ist nicht gezeigt.

Die einzelnen Teilschritte der Reaktion wurden verfahrenstechnisch charakterisiert und über eine adaptive Prozesssimulation wurden die Selektivität der Extraktion und die Stabilität des Enzyms als kritische Prozessgrößen identifiziert.

Electrochemical Oxidation of Nucleotide Cofactors

Characterization and Process Development for Asymmetric Enzymatic Catalysts

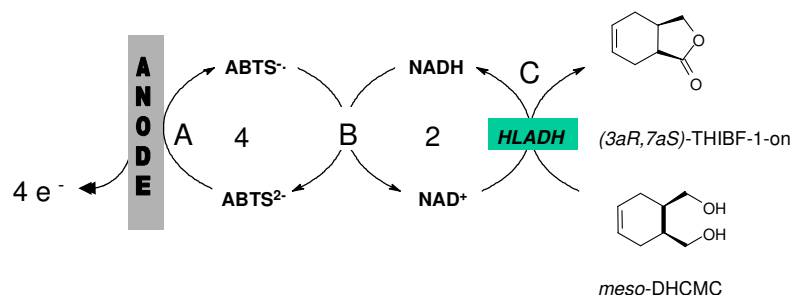


Fig. 1: Horse liver alcohol dehydrogenase (HLADH) catalyzed oxidation of *meso*-3,4-dihydroxymethylcyclohexene (*meso*-DHMC) to (3*a*R,7*a*S)-3*a*,4,7,7*a*-tetrahydro-3H-isobenzofuran-1-one (THIBF-1-one), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate $^{+}$) (ABTS $^{+}$)

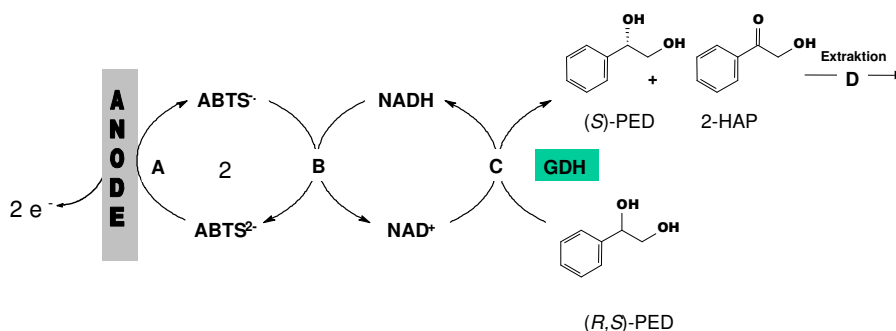


Fig. 2: Glycerol dehydrogenase (GDH)-catalyzed racemic resolution of (R,S)-1-phenyl-1,2-ethanediol,

From the process development point of view, alcohol dehydrogenase (ADH)-catalyzed oxidations represent a major challenge as they are usually characterized by double product inhibition by both the reduced co-factor and the oxidation product formed in the reaction.

This thesis describes a newly developed effective procedure for cofactor regeneration (A, B). Following exhaustive screening for suitable substrates and enzymes an enzyme/substrate pair was chosen that allows two different ways to circumvent inhibition by the oxidation product. Intra-molecular cyclization (Fig. 1) for *in situ* removal of the intermediary product is easier to realize in process development. Moreover, the described procedure opens up synthetic pathways towards diols as intermediate compounds for the pharmaceutical industry as well as toward lactones for flavors and fragrances.

When the inhibiting intermediary oxidation product cannot be removed by subsequent chemical reaction but remains in the reaction volume (Fig. 2), a more sophisticated process has to be developed.

To solve this problem, a new type of reactor for integrated product extraction was developed, the *extractive electrochemical enzyme membrane reactor* (E³MR) which is schematically shown in Fig. 3.

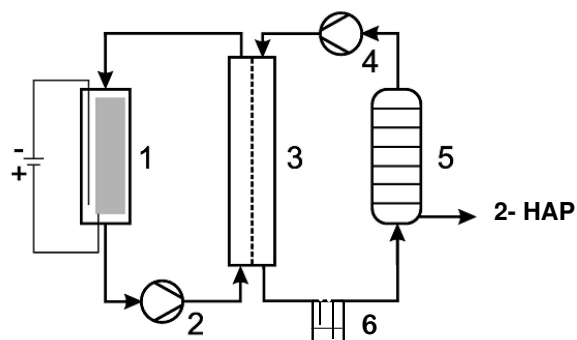


Fig 3: E³MR: 1) electrochemical flow cell, 2) pump for aqueous circle (peristaltic pump), 3) extraction module (UF hollow fibre module) 10 kD, 8000 cm² surface area, 4) pump for organic circle (*iso*-octane), 5) distillation, 6) pressure compensation vessel. Online data recording not shown

During process development, the single steps of the reaction were characterized and the selectivity of the extraction process as well as enzyme stability as critical process parameters were identified by adaptive process simulation.

Inhaltsverzeichnis

1	Nachhaltigkeit elektroenzymatischer Synthesen	1
1.1	Einleitung - Was ist Nachhaltigkeit?	1
1.2	Elektrochemische Prozesse und Nachhaltigkeit	2
1.3	Elektroenzymatik - Synergistische Effekte	5
2	Ziel der Arbeit	8
2.1	Aufgabenstellung	8
3	Verwendete Enzyme	10
3.1	Einführung – Dehydrogenase-katalysierte Oxidation	10
3.2	Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber (HLADH)	11
3.2.1	Struktur und Mechanismus	11
3.2.2	<i>HLADH</i> -katalysierte Oxidationen	13
3.2.3	Temperatur- und pH-Einfluß	16
3.2.3.1	Temperaturabhängigkeit der Aktivität	16
3.2.3.2	pH-Abhängigkeit der Aktivität	17
3.2.4	Zusammenfassung	18
3.3	Glycerin-Dehydrogenase (GDH)	19
3.3.1	<i>GDH</i> aus <i>Cellulomonas</i> sp. und <i>Enterobacter aerogenes</i>	21
3.3.2	Aktivität und Stabilität der <i>GDH</i>	22
3.3.2.1	pH-Abhängigkeit der Aktivität	22
3.3.2.2	Ioneneinfluss auf die Aktivität	23
3.3.2.3	Stabilitätsuntersuchungen	24
3.3.2.4	Stabilität während der Elektrolyse	24
3.3.2.5	Einfluss organischer Lösungsmittel	25
3.3.3	Kinetische Charakterisierung der <i>GDH</i>	26
3.3.4	Zusammenfassung	30
4	Nukleotidkofaktoren	31
4.1	Einleitung	31
4.2	Stabilität der Nukleotidkofaktoren	33
4.3	Zusammenfassung	35

5	Oxidative Regenerierung von Nukleotidkofaktoren	36
5.1	Einleitung	36
5.2	Mediatoren	37
5.3	Enzymatische Kofaktoroxidation	40
5.3.1	Dehydrogenasen	40
5.3.2	Oxidasen	41
5.4	Chemische Kofaktoroxidation	42
5.5	Elektrochemische Kofaktoroxidation	43
5.5.1	Direkte elektrochemische Oxidation	44
5.5.2	Mediatisierte elektrochemische Kofaktoroxidation	46
5.6	Zusammenfassung	49
6	Exkurs: Cyclovoltammetrie	51
6.1	Einleitung	51
6.2	Grundlagen der Cyclovoltammetrie	52
6.3	Mechanismen	54
6.3.1	Heterogener Elektronentransfer (A)	55
6.3.1.1	Mehrstufige Redoxsysteme	56
6.3.2	Homogen-chemische Reaktionen (B)	57
6.3.2.1	Katalytischer EC'-Mechanismus	58
6.4	CV – Was man beachten sollte	61
7	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat)	62
7.1	Einleitung	62
7.2	Anwendungsgebiete	63
7.3	Das Redoxsystem	66
7.4	Cyclovoltammetrische Untersuchungen	68
7.4.1	Betrachtung des Redoxsystems	68
7.4.2	Digitale Simulation	70
7.4.3	Nebenreaktionen des Radikalkations und des Dikations	73
7.5	Zusammenfassung	76
8	ABTS-mediatisierte anodische Kofaktoroxidation	77
8.1.1	Oxidation von NADH	77
8.1.1.1	Cyclovoltammetrie	79
8.1.1.2	Photometrie	81

8.1.2	Oxidation von NADPH	82
8.2	Zusammenfassung	84
9	Darstellung des Radikalkations	85
9.1	Einführung	85
9.2	Bildungsgeschwindigkeit von $\text{ABTS}^{\bullet-}$	86
9.2.1	Becherglas-Zelle	86
9.2.2	Durchflusszelle	87
9.3	Zusammenfassung	93
10	Enzymatische Umsetzungen	94
10.1	Einleitung	94
10.2	Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase (<i>HLADH</i>)	97
10.2.1	Zusammenfassung HLADH	100
10.3	GDH	101
10.3.1	Batch-Elektrolysen ohne Extraktion des Hydroxyketons	101
10.3.1.1	Zusammenfassung	103
10.3.2	Batch-Elektrolysen mit kontinuierlicher Produktabtrennung - der E^3MR	104
10.3.3	Extraktion	106
10.3.4	Umsetzungen im E^3MR	107
10.3.4.1	E^3MR -1	107
10.3.4.2	E^3MR -2	109
10.3.5	Vergleich der Elektrolysen	112
10.3.6	Zusammenfassung	114
10.4	Zusammenfassung	115
11	Adaptive Simulation - E^3MR	116
11.1	Einleitung	116
11.2	Vorbedingungen der Simulation	117
11.2.1	A: Anodische Bildung des Radikalkations $\text{ABTS}^{\bullet-}$	117
11.2.2	B: Homogen-chemische Oxidation von NADH	118
11.2.3	C: <i>GDH</i> -katalysierte Racematspaltung von (<i>R,S</i>)-PED	118
11.2.4	D: Extraktion mit <i>iso</i> -Oktan	119
11.2.5	E: Zerfall des Kofaktors und Abnahme der Enzymaktivität	119
11.3	Simulation	121
11.3.1	Untersuchung der vorgelagerten Reaktionen	121

11.3.2	Simulation des Experiments E ³ MR-2	123
11.4	Simulierte Experimente	126
11.5	Zusammenfassung	129
12	Zusammenfassung der Ergebnisse	130
12.1	Elektrochemische Bildung der aktiven Mediatorspezies	130
12.2	Anodische mediatisierte Kofaktoroxidation	130
12.3	Dehydrogenasen	131
12.3.1	HLADH	131
12.3.2	GDH	131
12.4	Enzymatische Umsetzungen mit anodischer mediatisierter Kofaktoroxidation	132
12.4.1	HLADH	132
12.4.2	GDH	133
13	Diskussion und Ausblick	134
13.1	Vergleich der elektroenzymatischen Synthesen	134
13.2	ABTS ^{•-} als Mediator zur Oxidation von Nukleotidkofaktoren	135
13.3	Weitere Anwendungsgebiete von ABTS ^{•-}	136
14	Material & Methoden	139
14.1	Firmen und Geräte	139
14.2	Chemikalien und Enzyme	140
14.3	Generelle Arbeitsvorschriften	141
14.3.1	Puffer	141
14.3.2	Proteinbestimmung	141
14.3.3	Elektrolysen	142
14.3.3.1	Becherglaszelle	142
14.3.3.2	Durchflusszelle	143
14.4	Chemische Synthesen	144
14.4.1	2-Hydroxyacetophenon (2-HAP) (2-Hydroxy-1-phenylpropanon)	144
14.4.2	<i>meso</i> -3,4-Dihydroxymethylcyclohexen (<i>meso</i> -DHMC)	144
14.4.3	3a,4,7,7a-Tetrahydro-3H-isobenzofuran-1-on (THIBF-1-on)	144
14.5	Photometrische Untersuchungen	144
14.5.1	Bildungsgeschwindigkeit von ABTS ^{•-}	144
14.5.2	Oxidation von NADH durch ABTS ^{•-}	145
14.5.3	Nebenreaktionen von ABTS ^{•-}	145

14.5.4	Aktivitätsvergleich der <i>GDH</i> aus zwei Quellen.	146
14.5.5	Kinetische Charakterisierung der <i>GDH</i> -katalysierten Racematspaltung von (<i>R,S</i>)-PED	146
14.5.6	Aktivitätsmessung <i>HLADH</i>	147
14.5.7	Stabilitätsmessungen	148
14.5.8	Temperaturabhängigkeit der enzymatische Oxidation	149
14.5.9	Einfluss des pH-Werts auf die Enzymaktivität	149
14.5.10	Einfluss monovalenter Kationen auf die Enzymaktivität	149
14.5.11	<i>GDH</i> -Aktivität in Gegenwart von <i>iso</i> -Oktan	150
14.6	Cyclovoltammetrie	150
14.6.1	Untersuchung des Mediatorsystems	151
14.6.2	Nebenreaktionen von ABTS ^{•+} und ABTS ^{•-}	151
14.6.3	Oxidation von NADH durch ABTS ^{•+}	151
14.7	Digitale Simulation	151
14.8	Analytik der Enzym-katalysierten Oxidationen	156
14.8.1	(<i>R,S</i>)-1-Phenyl-1,2-ethandiol	156
14.8.2	(3 <i>aR</i> ,7 <i>aS</i>)-3 <i>a</i> ,4,7,7 <i>a</i> -Tetrahydro-3 <i>H</i> -isobenzofuran-1-on	156
14.9	HPLC-Analytik der Oxidation von NADH durch ABTS ^{•+}	158
14.10	Enzymatische Synthesen	159
14.10.1	<i>HLADH</i> -katalysierte Lactonisierung	159
14.10.2	<i>GDH</i> -katalysierte Racematspaltung von (<i>R,S</i>)-PED ohne Extraktion des Hydroxyketons	160
14.10.3	E ³ MR- <i>GDH</i> -katalysierte Racematspaltung mit integrierter Produktextraktion	161
14.10.3.1	Reaktoraufbau und Reaktionsdurchführung	161
A	Elektrochemie - eine allgemeine Einführung	166
A.1	Definitionen und grundlegende Gesetze	166
A.1.1	Die <i>Nernstsche</i> Gleichung	168
A.1.2	Referenzelektroden	169
A.1.3	Das Faradaysche Gesetz	170
A.2	Elektrolyse	171
A.2.1	Überspannung	174
A.3	Elektrodenprozesse	175
A.3.1	Die elektrische Doppelschicht	175
A.4	Zusammenfassung	178

A.5	Die Durchtrittsreaktion	179
A.6	Kinetik des Elektronentransfer	180
A.6.1	Theorie des aktivierten Komplexes	180
A.6.2	Der Durchtrittsfaktor α und die Strom-Spannungsbeziehung	183
A.6.3	Die Strom-Überspannungs-Beziehung und die <i>Butler-Volmer</i> -Gleichung	185
A.7	Exkurs: Marcus-Theorie	189
A.8	Zusammenfassung	192
A.9	Massentransport	193
A.10	Diffusion	195
A.11	Konvektion	197
A.12	Migration	198
A.13	Zusammenfassung	200
B	Cyclovoltammetrie	201
B.1	Heterogener Elektronentransfer- Die Elektrodenreaktion	201
B.1.1	Ein-Elektronentransferreaktionen	202
B.1.2	Mehrstufige Redoxsysteme	208
B.1.3	Zusammenfassung heterogener Elektronentransfer	210
B.2	Homogen-chemische Reaktionen	212
B.2.1	Der <i>CE</i> -Mechanismus	212
B.2.2	Der <i>EC</i> -Mechanismus	213
B.2.3	Katalytischer <i>EC'</i> -Mechanismus	214
B.2.4	Zusammenfassung homogen-chemische Reaktionen	216
	Literaturverzeichnis	217

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.2.1: Anodische Regeneration von Chromsäure zur Bleiche von Montanwachsen.....	3
Abbildung 1.2.2: Bishydroxylierung nach <i>Sharpless</i> mit anodischer Regenerierung des Kooxidans	4
Abbildung 1.2.3: Elektrochemisch regenerierbares Indigo-Färbepad.....	4
Abbildung 1.2.4: Gepaarte Elektrolyse in der 200%-Zelle	5
Abbildung 1.3.1: Elektroenzymatische Synthese von (<i>R</i>)-1-(4-Hydroxyphenyl)ethanol mit <i>EMPH</i>	6
Abbildung 1.3.2: <i>HLADH</i> -katalysierte Oxidation von Cyclohexanol.....	7
Abbildung 2.1.1: Indirekte elektrochemische Kofaktorregenerierung	8
Abbildung 2.1.1: Enzymatische Oxidation	10
Abbildung 3.2.1: <i>HLADH</i> -katalysierte Oxidation von <i>meso</i> -3,4-Dihydroxymethylcyclohexen.....	11
Abbildung 3.2.2: Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der <i>HLADH</i>	12
Abbildung 3.2.3: <i>Theorell-Chance</i> compulsory order bi-bi—Mechanismus	12
Abbildung 3.2.4: <i>cis</i> - γ -Iron - Hauptbestandteil von Iris-Öl und Veilchenduft.....	13
Abbildung 3.2.5: Ausgewählte Lactone und ihre Eigenschaften als Aromastoffe für die Lebensmittelindustrie .	14
Abbildung 3.2.6: Eichen-Lactone	14
Abbildung 3.2.7: <i>HLADH</i> -katalysierte Lactonisierung mit mediatisierter anodischer Kofaktoroxidation	16
Abbildung 3.2.8: Temperaturabhängigkeit der <i>HLADH</i> -katalysierten Oxidation nach <i>Arrhenius</i>	17
Abbildung 3.2.9: Einfluss der pH-Werts auf die Enzymaktivität.....	18
Abbildung 3.3.1: <i>GDH</i> -katalysierte Umwandlung von Diol und α -Hydroxyketon	19
Abbildung 3.3.2: Einige Substrate der <i>GDH</i>	20
Abbildung 3.3.3: Vergleich der relativen Aktivität der <i>GDH</i>	21
Abbildung 3.3.4: <i>GDH</i> -katalysierte Racematspaltung von (<i>R,S</i>)-1-Phenyl-1,2-ethandiol ((<i>R,S</i>)-PED)	22
Abbildung 3.3.5: pH-Abhängigkeit der Aktivität der <i>GDH</i> aus <i>Cellulomonas</i> sp.	23
Abbildung 3.3.6: Einfluss von Na^+ und K^+ auf die Aktivität der GDH	23
Abbildung 3.3.7: Stabilität der GDH aus <i>Cellulomonas</i> sp.....	24
Abbildung 3.3.8: Enzymaktivität als Funktion der Zeit für Batch-Elektrolysen	25
Abbildung 3.3.9: Enzymdesaktivierung in Gegenwart von <i>iso</i> -Oktan.....	25
Abbildung 3.3.10: Kinetische Untersuchung (<i>GDH</i>), Variation an NAD^+	27
Abbildung 3.3.11: Variation an 2-HAP	27
Abbildung 3.3.12: Variation an (<i>R</i>)-PED und (<i>S</i>)-PED	28
Abbildung 3.3.13: Simulation von Batch-Reaktionen mit vollständiger Kofaktorregenerierung	29
Abbildung 3.3.14: Simulation des Umsatzes als Funktion der Zeit für Batch-Reaktionen.....	29
Abbildung 4.1.1: <i>GDH</i> -katalysierte Racematspaltung von (<i>R,S</i>)-1-Phenyl-1,2-ethandiol.....	31
Abbildung 4.2.1: Geschwindigkeitskonstanten des Zerfalls der Nukleotidkofaktoren	33
Abbildung 4.2.2: Stabilität von NADH.....	34
Abbildung 4.2.3: Basenkatalysierter Zerfall von NAD^+	34
Abbildung 4.2.4: Nukleophile 1,4-Addition an NAD^+	35
Abbildung 5.1.1: Nach <i>Nernst</i> berechnete Abhängigkeit des Reduktionspotentials von $\text{NADH} \mid \text{NAD}^+$	36

Abbildung 5.2.1: Elektronentransfer-Mediatoren für die Kofaktorregenerierung	38
Abbildung 5.3.1: Schematische Darstellung der Dehydrogenase-katalysierten NAD^+ -Regenerierung	40
Abbildung 5.3.2: Schematische Darstellung der <i>GluDH</i> katalysierten Regeneration von NAD^+	40
Abbildung 5.3.3: Enzymkatalysierte Oxidation von NADH mit Sauerstoff	41
Abbildung 5.4.1: Chemische Kofaktoroxidation durch sauerstoffaktivierbare Mediatoren.....	43
Abbildung 5.5.1: Direkte elektrochemische Kofaktoroxidation	44
Abbildung 5.5.2: Indirekte elektrochemische Kofaktoroxidation	46
Abbildung 5.5.3: Vergleich der Geschwindigkeit der Oxidation von NADH	47
Abbildung 6.2.1: Apparativer Aufbau für cyclovoltammetrische Messungen.....	52
Abbildung 6.2.2: Allgemeiner Aufbau eines Cyclovoltammogramms	53
Abbildung 6.3.1: Mediatisierte Kofaktoroxidation	54
Abbildung 6.3.2: Simulierte Cyclovoltammogramme (reversibel, quasi-reversibel, irreversibel).....	55
Abbildung 6.3.3: Simuliertes CV einer Zwei-Elektronentransferreaktion	56
Abbildung 6.3.4: Simulierte Cyclovoltammogramme für den EC' -Mechanismus	59
Abbildung 6.3.5: Simulierte Cyclovoltammogramme für EC' -Mechanismus mit sigmoidalem Kurvenverlauf ..	60
Abbildung 7.1.1: Redoxstufen von ABTS	62
Abbildung 7.2.1 Laccase-Mediator-System - katalysierte Oxidation benzyliischer Alkohole.....	63
Abbildung 7.2.2: Brennstoffzelle mit der Entladung von $\text{ABTS}^\bullet$ als freiwillig ablaufender Kathodenreaktion ..	64
Abbildung 7.2.3: Laccase-mediatisierte Regenerierung des Elektronenakzeptors $\text{ABTS}^\bullet$	65
Abbildung 7.4.1: Cyclovoltammogramm von ABTS^{2-}	68
Abbildung 7.4.2: CV von ABTS^{2-} - Lineare Abhängigkeit des I_{ox} von $\sqrt{v}$ nach <i>Randles</i> und <i>Sevčik</i>	69
Abbildung 7.4.3: Simulation eines CVs ABTS^{2-} - EE_{Disp} -Mechanismus	70
Abbildung 7.4.4: Simulation eines CVs ABTS^{2-} - $EE_{Disp}C$ -Mechanismus	71
Abbildung 7.4.5: Simulation eines CVs ABTS^{2-} - $EE_{Disp}CC'$ -Mechanismus	72
Abbildung 7.4.6: Cyclovoltammogramme von ABTS^{2-} - Nebenreaktionen.....	73
Abbildung 7.4.7: Cyclovoltammogramm von ABTS^{2-} in Gegenwart von BSA	75
Abbildung 7.5.1: Formale Oxidation von einem Molekül NAD(P)H durch zwei Moleküle $\text{ABTS}^\bullet$	77
Abbildung 7.5.2: HPLC-Messungen der Reaktion von $\text{ABTS}^\bullet$ mit NADH	78
Abbildung 7.5.3: CV von ABTS^{2-} in Gegenwart von NADH.....	79
Abbildung 7.5.4: Bestimmung der apparenten Geschwindigkeitskonstante k_{NADH}	80
Abbildung 7.5.5: Photometrische Bestimmung von k_{NADH}	82
Abbildung 7.5.7: Bestimmung der apparenten Geschwindigkeitskonstante k_{NADPH}	83
Abbildung 9.1.1: Anodische Oxidation von ABTS^{2-}	85
Abbildung 9.2.1: Schematischer Aufbau der Apparatur zur Bestimmung der Bildungsgeschwindigkeit	86
Abbildung 9.2.2: Elektrolyse von ABTS^{2-} in der Becherglaszelle.....	87
Abbildung 9.2.3: Aufbau der Durchflusszelle mit Kohlefilz-Anode	88
Abbildung 9.2.4: Erwartete Steigerung der Bildungsgeschwindigkeit v_b von $\text{ABTS}^\bullet$	89
Abbildung 9.2.5: Abhängigkeit v_b von der eingesetzten Konzentration und der Fließgeschwindigkeit v_{fl}	89
Abbildung 9.2.6: Vergleich von erwarteter und gemessener Bildungsgeschwindigkeit v_b	90
Abbildung 9.2.7: Einfluss des verbesserten Massentransports auf die Bildungsgeschwindigkeit	91

Abbildung 9.2.8: Abhängigkeit von v_b (ABTS ^{•+}) von der Konzentration an ABTS ²⁻	91
Abbildung 9.2.9: Typischer Konzentrations-Zeit-Verlauf der Bildung von ABTS ^{•+}	92
Abbildung 10.1.1: <i>GDH</i> -katalysierte Racematspaltung von (<i>R,S</i>)-PED.	94
Abbildung 10.1.2: <i>HLADH</i> -katalysierte Lactonisierung	95
Abbildung 10.1.3: Verwendete Elektrolysezellen	96
Abbildung 10.2.1: <i>HLADH</i> -katalysierte Lactonisierung	97
Abbildung 10.2.2: <i>HLADH</i> -katalysierte Batch-Elektrolysen	97
Abbildung 10.2.3: Vergleich des Umsatzes und der <i>sty</i>	98
Abbildung 10.2.4: Vergleich der <i>ttn</i> von Kofaktor und Mediator	99
Abbildung 10.3.1: Batch-Elektrolyse: Racematspaltung von (<i>R,S</i>)-PED mit <i>GDH</i> aus <i>Cellulomonas</i> sp.	101
Abbildung 10.3.2: Vergleich der <i>ttn</i> von Kofaktor und Mediator der Elektrolysen	102
Abbildung 10.3.3: Elektrochemischer Bi-Membran-Reaktor nach <i>Kruse</i>	104
Abbildung 10.3.4: Aufbau des E ³ MR	105
Abbildung 10.3.5: Extraktion von 2-HAP mit <i>iso</i> -Oktan	106
Abbildung 10.3.6: Extraktion von (<i>R,S</i>)-PED mit <i>iso</i> -Oktan	106
Abbildung 10.3.7: E ³ MR 1 - Racematspaltung von (<i>R,S</i>)-PED mit kontinuierlicher Extraktion	107
Abbildung 10.3.8: E ³ MR 1 - zeitlicher Verlauf von <i>ee</i> und <i>U</i> ab 44 h	108
Abbildung 10.3.9: E ³ MR 1 – <i>ee</i> als Funktion von <i>U</i>	109
Abbildung 10.3.10: E ³ MR-2 - zeitlicher Verlauf von <i>ee</i> und <i>U</i>	109
Abbildung 10.3.11: E ³ MR 2 – Verhältnis von <i>ee</i> und <i>U</i>	110
Abbildung 10.3.12: E ³ MR 2 – <i>GDH</i> , Aktivität und Proteingehalt	110
Abbildung 10.3.13: Enzymatisch dargestelltes (<i>S</i>)-Phenylethan-1,2-diol	111
Abbildung 10.3.14: Vergleich von <i>ee</i> und <i>U</i> der Elektrolysen	112
Abbildung 10.3.15: <i>GDH</i> - Vergleich der <i>ttn</i> von Kofaktor und Mediator	113
Abbildung 11.2.1: Übersicht: <i>GDH</i> -katalysierte Racematspaltung von (<i>R,S</i>)-PED	117
Abbildung 11.2.2: Aktivität der <i>GDH</i> während der Versuchsdauer	119
Abbildung 11.3.1: Simulierte Konzentrationsverläufe während der ersten 2,8 h	122
Abbildung 11.3.2: Simulierter Konzentrationsverlauf von 2-HAP in der wässrigen Phase	124
Abbildung 11.3.3: Konzentrationsprofil für (<i>R</i>)-PED und (<i>S</i>)-PED	124
Abbildung 11.3.4: Umsatzabhängigkeit des Enantiomerenüberschusses	125
Abbildung 11.4.1: Veränderung des Enantiomerenverhältnisses (<i>er</i>) bei 50% Umsatz (<i>U</i>)	126
Abbildung 13.3.1: ABTS ^{•+} -katalysierte Oxidation von Benzylalkoholen	136
Abbildung 13.3.2: ABTS ^{•+} -katalysierte Regenerierung von Flavoenzymen	137
Abbildung 13.3.3: Brennstoffzelle: Laccase-ABTS- Sauerstoff <i>PFH</i> - Wasserstoff	138
Abbildung 14.3.1: Becherglaszelle mit Drei-Elektrodenanordnung	142
Abbildung 14.3.2: Bemaßung der Durchflusszelle.	143
Abbildung 14.5.1: Aufbau der Apparatur zur Bestimmung der Bildungsgeschwindigkeit von ABTS ^{•+}	145
Abbildung 14.8.1: Chromatogramme einer <i>GDH</i> -katalysierten Racematspaltung	156
Abbildung 14.8.2: Chromatogramm von <i>meso</i> -DHMC, THIBF-1-ol und THIBF-1-on	157
Abbildung 14.8.3: Bestimmung des <i>ee</i> einer <i>HLADH</i> -katalysierten Lactonisierung	157

Abbildung 14.9.1: Chromatogramm von NAD^+ und NADH	158
Abbildung 14.10.1: Reaktionsschema der Racematspaltung	160
Abbildung 14.10.2: Reaktionsschema der Racematspaltung mit Produktextraktion	161
Abbildung 14.10.3: Schematische Aufbau des E^3MR	161
Abbildung A.1.1: Galvanisches Element aus Zn/Cu	167
Abbildung A.1.2: Die Bestimmung des Normalpotentials von Zn gegen NHE	168
Abbildung A.2.1: Schematische Darstellung einer Elektrolyseapparatur	171
Abbildung A.2.2: Elektrolyse von 1M Salzsäure in Umkehrung der Chlorknallgasreaktion	172
Abbildung A.2.3: Strom-Spannungs-Diagramm	172
Abbildung A.2.4: Allgemeines Reaktionsschema einer Elektrolyse.....	174
Abbildung A.3.1: <i>Helmholtz</i> -Modell der elektrischen Doppelschicht	176
Abbildung A.3.2: Modelle der elektrischen Doppelschicht in chronologischer Reihenfolge	177
Abbildung A.5.1: Die Elektrode als Redoxreagens	179
Abbildung A.6.1 Diagramm der <i>Gibbsschen</i> Freien Energie als Funktion der Reaktionskoordinate	180
Abbildung A.6.2: Änderung der Freien Energie G	181
Abbildung A.6.3: Auswirkung einer Potentialänderung auf die freie Aktivierungsenergie.....	183
Abbildung A.6.4: Strom-Überspannungskurve.....	186
Abbildung A.7.1: Übergangszustandsdiagramm nach der <i>Marcus</i> -Theorie	190
Abbildung A.9.1: Der Einfluss von Massentransportphänomene auf elektrochemische Reaktionen	194
Abbildung A.10.1: Diffusion des Edukts zur Elektrodenoberfläche	195
Abbildung B.1.1: Simulierte Cyclovoltammogramme für reversiblen bis irreversiblen Elektronentransfer	203
Abbildung B.1.2 Lineare Abhängigkeit I_{ox} von $\sqrt{v}$ nach <i>Randles</i> und <i>Sevčík</i> .für den reversiblen Fall	204
Abbildung B.1.3 Lineare Abhängigkeit I_{red} von $\sqrt{v}$ nach <i>Randles</i> und <i>Sevčík</i> . für den irreversiblen Fall.....	205
Abbildung B.1.4 Lineare Abhängigkeit des I_{red} von $\sqrt{\alpha}$ für den irreversiblen Fall.....	206
Abbildung B.1.5: Arbeitskurve zur Bestimmung von k_s nach <i>Nicholson</i>	207
Abbildung B.1.6: Simulation für EE_{Disp} -Mechanismus ohne Peakseparation.....	209
Abbildung B.1.7: Simulation für EE_{Disp} -Mechanismus mit Peakseparation	209
Abbildung B.1.8: Stromstärke der reduktiven Peakströmeals Funktion von ΔE°	210
Abbildung B.2.1: <i>CE</i> -Mechanismus - Simulation.....	212
Abbildung B.2.2: <i>EC</i> -Mechanismus- Simulation.....	215
Abbildung B.2.4: Arbeitskurve nach <i>Nicholson</i> und <i>Shain</i>	215

Abkürzungsverzeichnis

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
2-HAP	2-Hydroxyacetophenon
A	Anode
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat)-Dikation
ABTS [•]	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat)-Radikalkation
ABTS ²⁻	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat)
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
AE	Arbeitselektrode
BSA	Rinderserum-Albumin, engl.
<i>cstr</i>	kontinuierlich betriebener Rührkessel, engl.
CV	Cyclovoltammogramm, Cyclovoltammetrie
EC	Enzym-Klasse, engl.
EMPH	Ethylphenolmethylen-Hydroxylase
EMR	Enzym-Membran-Reaktor
E ³ MR	extraktiver elektrochemischer EMR
FDH	Formiat-Dehydrogenase
FMN	Flavinmononukleotid
G	Gegenelektrode
GC	glasartiger Kohlenstoff eng.
GDH	Glycerin-Dehydrogenase
HLADH	Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase, engl.
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, engl.
K	Kathode
K-Carbonat	Kaliumcarbonat-Puffer
K _{pi}	Kaliumphosphat
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LMS	Laccase-Mediator-System
MED	Mediator
<i>meso</i> -DHMC	<i>meso</i> -3,4-Dihydroxymethylcyclohexen
NAD(H)	Nikotinamidadenidinukleotid

NADP(H)	Nikotinamidadenidinukleotidmonophosphat
NHE	Normal-Wasserstoff-Elektrode
nn	nicht nachweisbar
PD	1,10-Phenanthrolin-5,6-dion
PdMe	1-Methyl-1,2-Phenanthrolin-5,6-dionium-tetrafluoroborat
PED	1-Phenyl-1,2-ethandiol
PEG	Polyethylenglykol
R	Referenzelektrode
TEA	Triethanolamin
THIBF-1-ol	3a,4,7,7a-Tetrahydro-3H-isobenzofuran-1-ol
THIBF-1-on	3a,4,7,7a-Tetrahydro-3H-isobenzofuran-1-on
<i>ttn</i>	maximale Cyclenzahl, engl.
UF	Ultrafiltration
UV	Ultraviolett
vs.	gegen

Symbolverzeichnis

<i>Symbol</i>	<i>Bedeutung</i>	<i>Einheit</i>
A	Fläche	cm^2
α	Durchtrittsfaktor, Transferkoeffizient	
c	Konzentration	mol L^{-1}
D	Diffusionskoeffizient	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
D	Diffusionskoeffizient	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
$\Delta G^\ddagger$	<i>Gibbs</i> freie Standardaktivierungsenergie	kJ mol^{-1}
E	Elektrodenpotential	V
E^0	Standardelektrodenpotential	V
$E^{0'}$	formales Elektrodenpotential	V
E_A	Aktivierungsenergie	kJ mol^{-1}
ee	Enantiomerenüberschuss, engl.	
E_{eq}	Gleichgewichtselektrodenpotential	V
E_F	Fermi-Niveau	eV
er	Enatiomerenverhältnis, engl.	
F	Faraday-Konstante	C mol^{-1}
G	<i>Gibbs</i> freie Energie	kJ
η	Überspannung [Ausbeute]	V [-]
I	Strom	A
j	Stromdichte	A cm^{-2}
J	Stofffluß	$\text{mol s}^{-1} \text{cm}^{-2}$
φ	Potential	V
K	Gleichgewichtskonstante	
$k_{[ABTS.-]}$	Geschwindigkeitskonstante der Radikalkation-Bildung	s^{-1}
$k_{ex,a}$	Geschwindigkeitskonstante der Extraktion von a	s^{-1}
k_f	Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung	s^{-1}
K_{iP}	Inhibierungskonstante von P	mM
K_M	Michaelis-Menten-Konstante	mM
k_{NADH}	Geschwindigkeitskonstante der Kofaktoroxidation	$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
k_s	heterogene Standardgeschwindigkeitskonstante	cm s^{-1}

k_{zerf}	Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls	s^{-1}
λ	Wellenlänge	nm
λ	adiabatische Reorganisationsenergie	kJ
m	Stoffmenge	mol
M	Konzentration	mol L^{-1}
n	Anzahl der übertragenen Elektronen	
Q	Ladungsmenge	C
R	Widerstand	Ω
R_i	Lösungswiderstand	Ω
sty	Raum-Zeit-Ausbeute, engl.	$\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$
τ	Verweilzeit	h
$\tau_{1/2}$	Halbwertszeit	h
U	Umsatz	
U	Einheit (engl. Unit), entspricht der Katalysatormenge, die pro Minute 1 μmol Produkt erzeugt	
v	Vorschubgeschwindigkeit	V s^{-1}
V	Volumen	L
v_b	spez. Bildungsgeschwindigkeit	$\text{s}^{-1} \text{g}^{-1}$
v_{fl}	Fließgeschwindigkeit	mL min^{-1}
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit	U mL^{-1} ; U mg^{-1}
$v_{\text{max},R}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von R	mM s^{-1}

1 Nachhaltigkeit elektroenzymatischer Synthesen

1.1 Einleitung - Was ist Nachhaltigkeit?

Kaum ein Begriff ist während der letzten fünf Jahre so häufig in verschiedensten Zusammenhängen quer durch die Medienwelt und die Politik genannt worden wie der der Nachhaltigkeit. Der Begriff der Nachhaltigkeit gilt seit einigen Jahren als Leitbild für eine zukunftsfähige Entwicklung („sustainable development“) der Menschheit. Leider gibt es für diesen Begriff keine konkrete Definition [1-3]. Er stammt ursprünglich aus der Holzwirtschaft des 18. Jahrhunderts und bedeutete damals, dass nur soviel Holz geschlagen werden sollte, wie innerhalb eines bestimmten Zeitraums nachwachsen konnte. Als „*sustainable development*“ wurde der Begriff auf dem Weltgipfel in Rio 1992 einer breiten Öffentlichkeit zugänglich [1]. Heute wird er gemeinhin einfach als *nachhaltige Entwicklung* oder

- dauerhaft umweltgerechte Entwicklung
- nachhaltig zukunftsverträgliche Entwicklung

übersetzt.

Mittlerweile, im Rahmen der Agenda 21 [4] und auch des ersten Weltgipfels zum Thema Nachhaltigkeit (Johannesburg, 2002), sind diese Zielvorgaben für die Industrie konkretisiert worden [4-6]. Der Verband der chemischen Industrie (VCI) formulierte: „Sustainable development ist der Versuch, dringende Probleme strategiegeleitet zu lösen.“ [7]. Wirtschaftliche, soziale und ökologische Aspekte sollen im Gleichgewicht stehen [6]. Für die chemische Industrie bedeutet es unter anderem, dass auch andere Rohstoffquellen anstelle von fossilen Brennstoffen erschlossen werden sollen und dass mit den vorhandenen Rohstoffen möglichst sparsam umgegangen werden soll. Des weiteren sollen die Synthesen möglichst energieeffizient und mit möglichst wenig Emission verbunden sein. Umschrieben werden diese Zusammenhänge mit dem Begriff „geschlossene Stoffkreisläufe“ [8]. Im Sinne einer industriellen Produktion bedeutet dies immer auch einen wirtschaftlichen Vorteil, weil entweder Rohstoff- oder Produktionskosten gesenkt werden können und insbesondere die Entsorgungskosten minimiert werden [9-12].

Der Beitrag der Biotechnologie zur nachhaltigen industriellen Synthese oder auch „Green Chemistry“ z.B. durch fermentative oder enzymatische Prozesse ergibt sich daraus, dass in der Regel nachwachsende Rohstoffe wie etwa Glucose eingesetzt werden und im Vergleich

zu konventionellen chemischen Synthesen die Emissionen in Luft oder Abwasser wesentlich unproblematischer sind [13-15]. Häufig sind diese Synthesen auch deutlich verkürzt und das Produkt ist von höherer Qualität als das chemisch hergestellte, was z. B. bei der Synthese enantiomerenreiner Verbindungen auch aus ökonomischen Aspekten bedeutend ist [16]. Als Beispiel seien hier die Darstellung chiraler Oxirane über eine enzymkatalysierte Racematspaltung [17, 18] oder die industrielle Produktion nicht-natürlicher Aminosäuren (*L-tert.*-Leucin, degussa.) genannt [19]. Darüber hinaus tragen die milden Reaktionsbedingungen zur Einsparung von Energiekosten bei [20].

1.2 Elektrochemische Prozesse und Nachhaltigkeit

Elektrochemische Prozesse sind im Sinne der oben angeführten Kriterien leicht als nachhaltige Prozesse zu beschreiben, da Elektronen als Reagens eingesetzt werden und die Nebenprodukte und Emissionen auf den ersten Blick gering sind. Trotzdem ist nicht jede Elektrolyse nachhaltig, wie etwa die herkömmliche Chlor-Alkali-Elektrolyse, deren Umweltverträglichkeit gerade beim Amalgam-Verfahren eher problematisch ist. Die Elektrochemie ist vielmehr auch aufgrund ihres großen Synthespektrums ein ideales Werkzeug [21, 22], um aus konventionellen organisch-chemischen Synthesen nachhaltige Prozesse zu machen [23-25].

In der klassischen organischen Synthese wird das Redoxreagens mindestens in stöchiometrischen Mengen eingesetzt. Dies führt zu großen Mengen von Abfall, z.B. schwermetallhaltiger Abwässer. Ein Beispiel, wie durch Einsatz einer anodischen Oxidation ein Redoxreagens recycelt werden kann, ist in Abbildung 1.2.1 gezeigt [26].

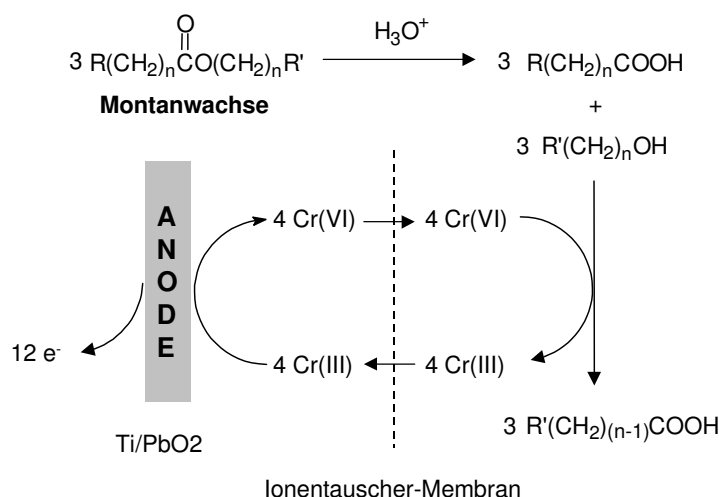
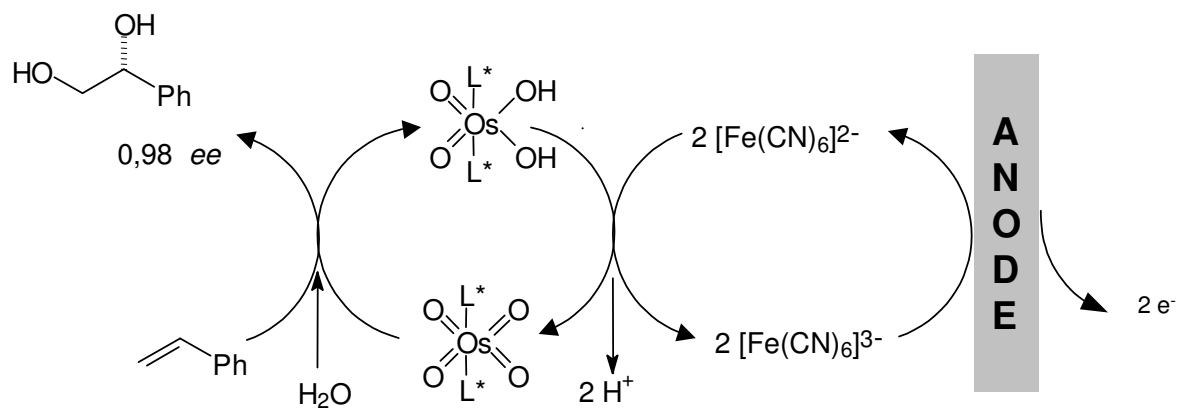


Abbildung 1.2.1: Anodische Regeneration von Chromsäure zur Bleiche von Montanwachsen, Kathodenreaktion: Wasserstoffentwicklung ($12\text{H}^+ + 12\text{e}^- \rightarrow 6\text{H}_2$)

In obiger Darstellung ist zur Vereinfachung schematisch lediglich die Anodenreaktion dargestellt, als Kathodenreaktion tritt Wasserstoffbildung durch Protonenreduktion auf. Wenn keine andere Kathodenreaktion gezeigt ist, so ist im folgenden immer Wasserstoffbildung als Kathodenreaktion angenommen. Bei der Bleiche von Montanwachsen, die z.B. in der Kosmetikindustrie aber auch der Herstellung von Druckfarben Anwendung finden, wird zunächst unter schwefelsauren Bedingungen eine Esterspaltung durchgeführt. Der so erhaltene Alkohol wird dann mit Chromsäure oxidiert. Die dabei entstehende Cr(III)-Verbindung wird durch eine Ionenaustauscher-Membran in einen Regenerierungstank überführt und dort an speziellen mit Bleidioxid beschichteten Ti-Anoden zur Chromsäure reoxidiert. Auf diese Weise kann eine minimale, katalytische Menge an Chromsäure eingesetzt werden und die kostenintensive Entsorgung der Cr(III)-haltigen Abwässer wird auf ein Minimum reduziert (Clariant, > 10000 t/a, [26]).

Auch in katalytischen Prozessen kann häufig die Salzfracht verringert werden, indem man das chemische Oxidationsmittel (oder Reduktionsmittel) durch einen Elektrodenprozess ersetzt.

Als Beispiel einer solchen indirekten Elektrolyse ist in Abbildung 1.2.2 die asymmetrische Bishydroxylierung einer Doppelbindung nach *Sharpless* dargestellt [27, 28].



L* = chirale Liganden

Abbildung 1.2.2: Bishydroxylierung nach *Sharpless* mit anodischer Regenerierung des Kooxidans .
Kathodenreaktion: Wasserstoffentwicklung ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$)

Hier wird das Kooxidans anodisch regeneriert und kann somit in geringen Mengen eingesetzt werden [28]. Ein solches Kooxidans, welches den Elektronentransfer zwischen Elektrode und Substrat vermittelt, bezeichnet man auch als Mediator (MED).

Ein weiteres Beispiel für eine Reduzierung der Salzfracht in einem Prozess stellt die indirekte elektrochemische Reduktion von Indigo dar (Abbildung 1.2.3).

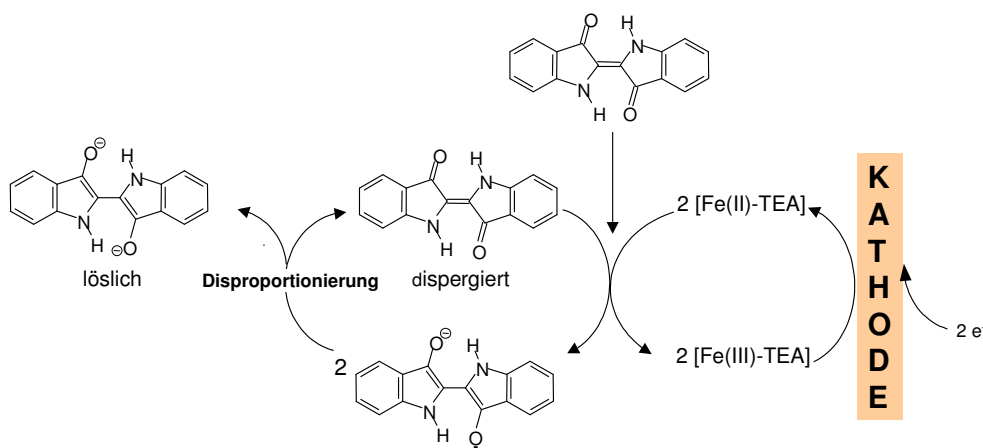


Abbildung 1.2.3: Elektrochemisch regenerierbares Indigo-Färbepfad, Anodenreaktion: Sauerstoffbildung ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- + 0,5\text{O}_2$)

Um die aktive, reduzierte Leukoform des Farbstoffs zu generieren, werden im herkömmlichen Prozess Dithionit oder Hydrogensulfit in stöchiometrischen Mengen verwendet. Diese Farbbäder haben außerdem den Nachteil, dass sie nicht regeneriert werden können. Überschüssiges Färbemittel muss somit verworfen werden. Unter Verwendung von

Triethanolamin (TEA)-Eisenkomplexen, kann das Reduktionsmittel regeneriert werden und das Farbbad ist somit wiederverwendbar [29, 30].

Besonders elegant und im Sinne der Energieeffizienz besonders nachhaltig ist ein elektrochemischer Prozess, bei dem an Anode und Kathode gleichzeitig ökonomisch wertvolle Produkte gebildet werden. Da bei einer solchen „gepaarten Elektrolyse“ der Strom doppelt genutzt wird, spricht man auch von einer 200%-Zelle [25]. Die erste industriell durchgeführte Elektrolyse dieser Art ist in Abbildung 1.2.4 dargestellt.

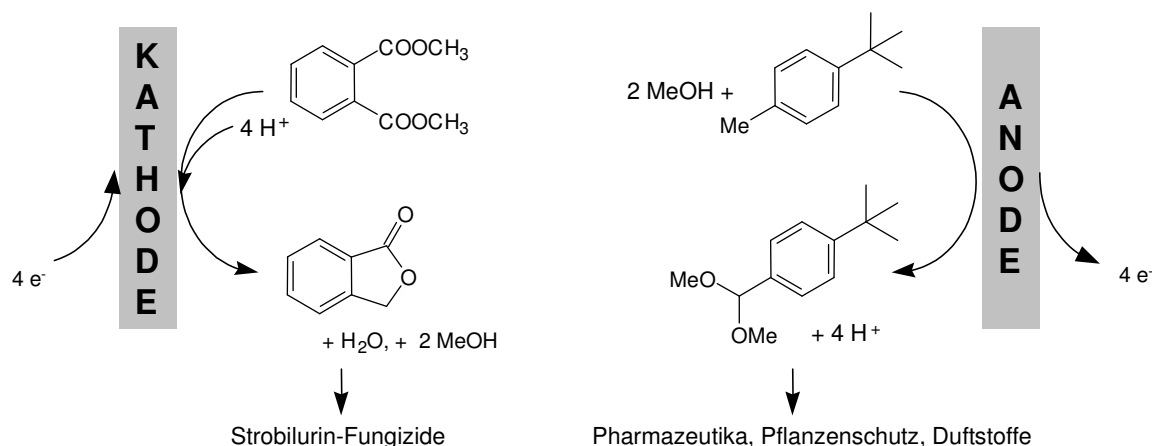


Abbildung 1.2.4: Gepaarte Elektrolyse in der 200%-Zelle

Diese Synthese wird seit 1999 bei der BASF AG (Ludwigshafen) durchgeführt [31]. An der Kathode wird Methylphthalat zu Phthalid reduziert, einem Vorläufer von Strobilurin-Fungiziden, während anodisch 4-(tert-Butyl)-Benzaldehyddimethylacetal gebildet wird. Letzteres ist ein Zwischenprodukt der Synthese von Lysmeral (Maiglöckchenaroma) und auch eine Vorstufe für Pflanzenschutzmittel und Pharmazeutika. Beide Schritte lassen sich voneinander entkoppeln, um nachfrageorientiert arbeiten zu können.

1.3 Elektroenzymatik - Synergistische Effekte

Die im vorangegangenen Kapitel dargestellten Beispiele belegen die Anwendbarkeit und den Nutzen von elektrochemischen Prozessen. Es gibt es jedoch nur sehr wenige Anwendungen im Bereich asymmetrischer Synthesen, bei denen bevorzugt ein Enantiomer einer Verbindung gebildet wird (eine ist in Abbildung 1.2.2 auf Seite 4 dargestellt). Verwendet man Enzyme als Katalysatoren bei elektrochemischen Prozessen, erschließt sich hier die Möglichkeit, diese natürlichen und enantioselektiven Biokatalysatoren „doppelt“ nachhaltig für die organische Synthese zu nutzen. Die Synthese enantiomerenreiner Verbindungen ist aber, wie eingangs

erwähnt, die Hauptdomäne der enzymatische Synthese. In besonderen Fällen lässt sich das Enzym elektrochemisch regenerieren, bzw. der interne redoxaktive Kofaktor (prosthetische Gruppe) ist für eine elektrochemische Oxidation oder Reduktion zugänglich. Ein Beispiel ist in Abbildung 1.3.1 dargestellt [24, 32, 33].

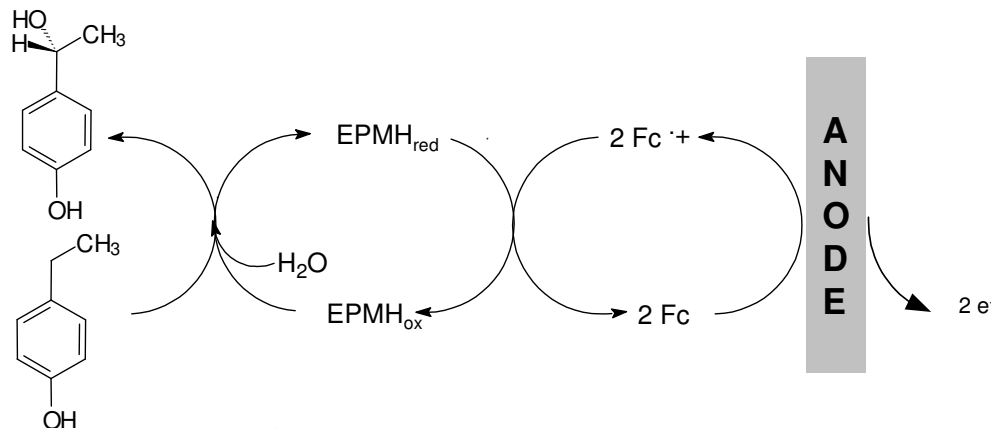


Abbildung 1.3.1: Elektroenzymatische Synthese von (*R*)-1-(4-Hydroxyphenyl)ethanol mit *EMPH* ; Mediator: Ferrocen (Fc), *ee* > 0,99 , Kathodenreaktion: Wasserstoffbildung ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$)

Hierbei wird die Seitenkette eines Phenols stereoselektiv durch Ethylphenolmethylen-Hydroxylase (*EMPH*) hydroxyliert. Das Enzym wird durch den Mediator Ferrocen (Fc) reoxidiert, welcher seinerseits anodisch oxidierbar ist. Ein weiteres vielversprechendes Anwendungsgebiet stellt die mediatisierte Regeneration von Nukleotidkofaktoren dar.

In Abbildung 1.3.2 ist ein Beispiel einer solchen Kofaktorregenerierung für eine Pferdeleberalkohol-Dehydrogenase (engl. *HLADH*) katalysierte Oxidation gezeigt [34].

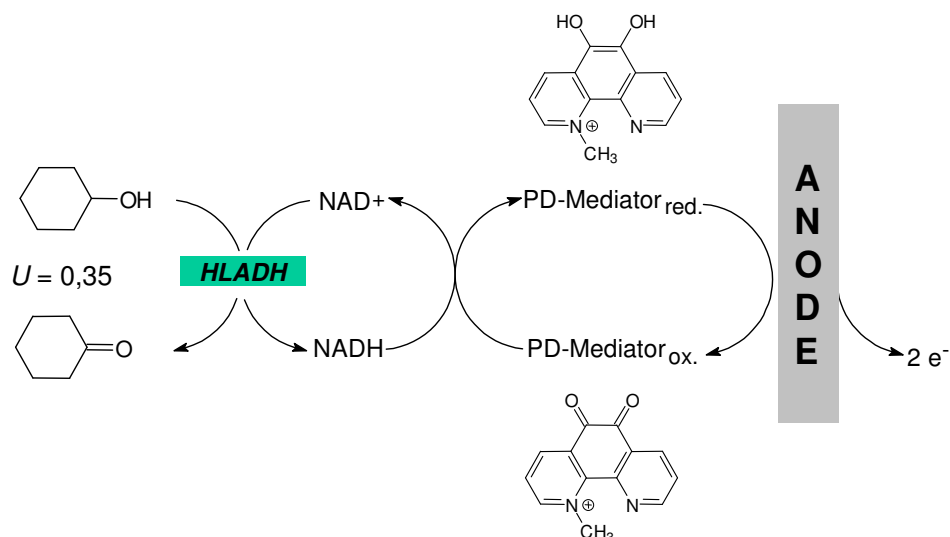


Abbildung 1.3.2: *HLADH*-katalysierte Oxidation von Cyclohexanol mit mediatisierter anodischer Kofaktorregenerierung, Kathodenreaktion: Wasserstoffbildung ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$)

Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) wird durch einen Phenanthrolinmediator (PD) oxidiert, welcher *in situ* anodisch generiert wird. Der Umsatz (U) stagniert bei dieser Oxidation bei etwa 0,35. Wie an obigem Beispiel deutlich zu erkennen ist, greifen mehrere Prozesse, nämlich die enzymatische Oxidation, die Reaktion zwischen Mediator und Kofaktor sowie die anodische Generierung der aktiven Mediatorspezies, ineinander. Der geringe Umsatz weist auf die kritischen Punkte hin, die man bei elektroenzymatischen Systemen beachten muss:

Die Wahl geeigneter Regenerationssysteme und enzymatischer Transformationen sowie die Kompatibilität der enzymatischen und der elektrochemischen Teilschritte.

2 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll neue Wege für ein rationales Design elektroenzymatischer Prozesse aufzeigen, um die enormen Potentiale der elektroenzymatischen Synthese für nachhaltige technische Applikationen effektiv zu nutzen.

Nachdem nun im vorangegangenen Kapitel bereits ein Beispiel einer elektroenzymatischen Synthese vorgestellt wurde, soll in der vorliegenden Arbeit ein neuer elektrochemischer Mediator für elektroenzymatische Synthesen mit Nukleotidkofaktor-abhängigen Dehydrogenasen erschlossen werden.

2.1 Aufgabenstellung

Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit war, die Eignung des Radikalkations¹ 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat⁻ (ABTS^{•-}) als Elektronentransfer-Mediator zur *insitu* Oxidation von NADH und NADPH zu den korrespondierenden biologisch aktiven Nukleotidkofaktoren zu verifizieren. Dabei sollte das Radikalkation ABTS^{•-} elektrochemisch erzeugt und die mediatisierte Kofaktorregenerierung mit mindestens einer enzymatischen Umsetzung erfolgreich gekoppelt werden (Abbildung 2.1.1).

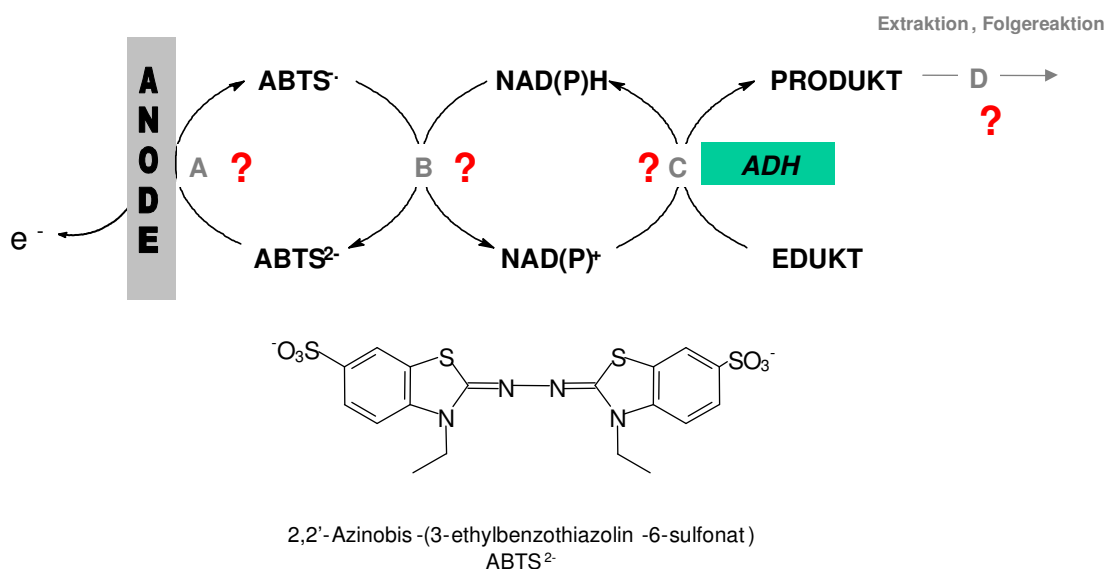


Abbildung 2.1.1: Indirekte elektrochemische Kofaktorregenerierung

¹ ABTS^{•-} ist trotz der negativen Gesamtladung ein Radikalkation, da die negative Ladung ausschließlich an den Sulfonsäureresten lokalisiert ist.

Da bei einer Alkohol-Dehydrogenase (*ADH*)-katalysierten Oxidation mit der Inhibition durch das gebildete Oxidationsprodukt zu rechnen ist, sollen zwei Methoden zur Entfernung des inhibierenden Ketoprodukts bearbeitet werden:

Zum einen die Folgereaktion einer intramolekularen Cyclisierung, wie sie bereits beschrieben wurde [35] und zum anderen die Extraktion mittels eines organischen Lösungsmittels. Diese Methode wurde bereits erfolgreich für enzymatische Transformation angewandt [36, 37] (Abbildung 2.1.1, D).

Die gesamte Reaktion setzt sich aus den Teilschritten **A-D** zusammen. Die Teilschritte A bis D, sollen getrennt reaktionstechnisch charakterisiert werden, vor allem hinsichtlich der Reaktionsgeschwindigkeit, der Stabilität, der Thermodynamik und auch der Selektivität. Neben der Untersuchung der einzelnen Teilschritte müssen auch die Enzyme, Kofaktoren und Mediatoren sowie Edukte und Produkte hinsichtlich ihrer physikalischen. und chemischen Eigenschaften untersucht werden. Beispielsweise muss geklärt werden, inwiefern die einzelnen Reaktionskomponenten unter den Bedingungen der Elektrolyse stabil sind und ob eventuell Nebenreaktionen auftreten.

3 Verwendete Enzyme

In diesem Kapitel werden die verwendeten Dehydrogenasen zunächst hinsichtlich ihrer Eigenschaften, Kosten, Verfügbarkeit und Anwendungsgebiete vorgestellt. Es folgt eine genauere Charakterisierung der Enzyme, die schließlich zu einer Auswahl von Modellsystemen (Substrat/Enzym) und ersten verfahrenstechnischen Konzepten führt.

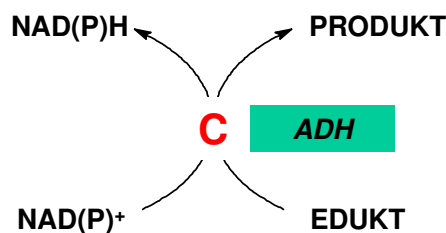


Abbildung 2.1.1: Enzymatische Oxidation (Teilreaktion C), siehe auch Abbildung 2.1.1, Seite 8

3.1 Einführung – Dehydrogenase-katalysierte Oxidation

Dehydrogenasen sind Kofaktor-abhängige Oxidoreduktasen, d.h. sie benötigen für die katalytische Aktivität ein spezifisches Redoxäquivalent. Zwar wurden bisher eine Vielzahl NAD(P)H-abhängiger Dehydrogenasen beschrieben, jedoch wurden sie entweder aus Gründen der Verfügbarkeit, der Stabilität oder der hohen Kosten nur selten zu enzymatischen Transformationen in größerem Maßstab herangezogen [19]. Weiterhin sind diese Anwendungen Reduktionen, wie beispielsweise die Reduktion aromatischer Ketone mit einer Alkohol-Dehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis* oder die industrielle *tert*-Leucin-Darstellung mit Hilfe einer Leucin-Dehydrogenase aus *Bacillus sphaericus* (degussa.) [19, 38-40]. Dehydrogenase-katalysierte Oxidationen wurden bisher vernachlässigt, da keine wirklich effiziente Methode zur Regeneration von NAD(P)⁺ zur Verfügung steht. Darüber hinaus liegt das Gleichgewicht im allgemeinen auf Seiten der oxidierten Kofaktoren² bzw. reduzierten Substrate und sowohl die reduzierten Kofaktoren als auch die gebildeten Ketoprodukte inhibieren häufig die enzymatische Transformation. Um eine effektive Dehydrogenase-katalysierte Oxidation zu ermöglichen, wird eine effektive *in situ* Regenerierung der oxidierten Kofaktoren benötigt, die unter Umständen auch zur Überwindung von kinetischen Limitierungen geeignet ist [19, 41-43].

² siehe auch Kapitel 4, Seite 31 ff.

3.2 Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber (HLADH)

Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase (*HLADH*, EC 1.1.1.1) gehört zu den zinkhaltigen NAD^+ | NADH abhängigen Dehydrogenasen. Die *HLADH* katalysiert bevorzugt die Oxidation primärer Alkoholfunktionen zu den korrespondierenden Aldehyden bzw. Lactolen und die Oxidation der Lactole zu den Lactonen [44-47].

Ein Beispiel für die *HLADH*-katalysierte Lactonisierung zeigt Abbildung 3.2.1.

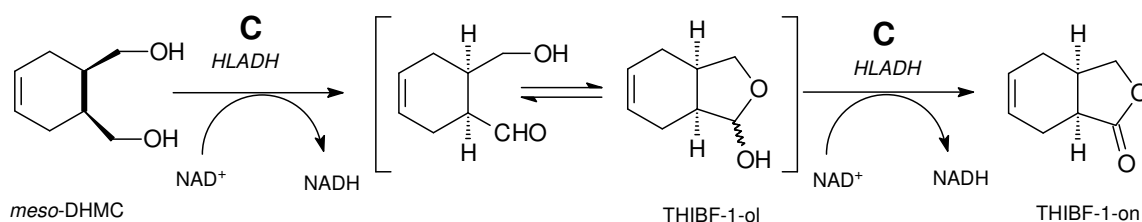


Abbildung 3.2.1: *HLADH*-katalysierte Oxidation von *meso*-3,4-Dihydroxymethylcyclohexen (*meso*-DHMC), über (1*R*,3*aR*,7*aS*)-3*a*,4,7,7*a*-Tetrahydro-3*H*-isobenzofuran-1-ol (THIBF-1-ol) zu (3*aR*,7*aS*)-3*a*,4,7,7*a*-Tetrahydro-3*H*-isobenzofuran-1-on (THIBF-1-on)

3.2.1 Struktur und Mechanismus

Die *HLADH* ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 80 kD, welches aus zwei Untereinheiten besteht. Es gibt zwei verschiedene Typen von Untereinheiten, die man nach ihrer unterschiedlichen Substratspezifität als *E* (für Ethanol-Aktivität) und *S* (für Steroid-Aktivität) bezeichnet [44]. Von der *HLADH* gibt es drei verschiedene Isoenzyme, nämlich *EE*, *SS* und *ES* [48, 49]. Beide Untereinheiten bestehen aus je 374 Aminosäuren und beide enthalten je zwei fest eingebundene Zink-Atome und ein aktives Zentrum. Die *E* und *S*-Untereinheiten unterscheiden sich lediglich in sechs Aminosäuren, von denen nur eine (Position 110) festlegt, um welche Untereinheit es sich handelt. Phenylalanin an dieser Position führt zur Ethanol-Aktivität (*E*), Leucin bewirkt eine Steroid-Aktivität (*S*). Aus Leber isoliert liegen 40-60% der *HLADH* als *EE*-Isoenzym vor. Von den zwei Zink-Atomen ist eins durch vier Cystein-Schwefelatome koordiniert und hat vermutlich nur eine strukturelle, fixierende Funktion. Das zweite Zink-Atom befindet sich, wie in Abbildung 3.2.2 dargestellt, im aktiven Zentrum und ist von zwei Schwefelatomen (Cys-46, Cys-174) [50] und einem Stickstoff (His-67) koordiniert.

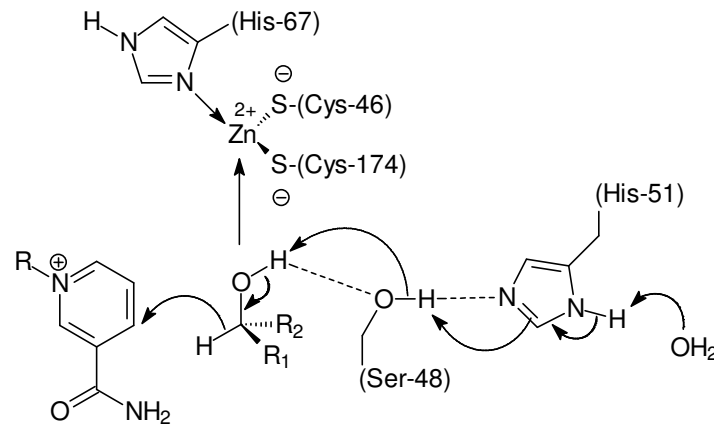


Abbildung 3.2.2: Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der *HLADH* und des vermutlichen Mechanismus der Alkohol-Oxidation; von NAD ist nur die Nicotinamideinheit gezeigt; Cys = Cystein, Ser = Serin, His = Histidin, Quelle: [51-53]

Die vierte Koordinationsstelle wird je nach pH-Wert durch Wasser oder ein Hydroxyl-Ion besetzt, welches über Wasserstoffbrücken an Ser-48 gebunden ist. Das Zink-Atom des aktiven Zentrums befindet sich an der Verbindung zweier Bindungsstellen, nämlich einer Bindungstasche für den Kofaktor und einer Bindungsspalte für das Substrat. Im Reaktionszyklus bindet zunächst NAD^+ und initiiert konformative Änderungen, die zum Verlust des gebundenen Wassers bzw. Hydroxyl-Ions führen [54, 55]. Nun kann das Substrat-Molekül gebunden werden, wobei die C-O-Bindung und OH-Bindung durch Koordination an das Zink-Atom, die Wasserstoffbrücke zum Serin und die positive Ladung des Kofaktors polarisiert werden [56-59]. Wie in der Abbildung 3.2.2 gezeigt, findet dann die Oxidation des Alkohols durch Hydridtransfer auf den Kofaktor statt [60-62]. Der Mechanismus entspricht einem *Theorell-Chance* compulsory order bi-bi—Mechanismus [53, 63]. Bei diesem Mechanismus (Abbildung 3.2.3) bestimmen sechs Geschwindigkeitskonstanten den Verlauf der enzymatischen Umsetzung, die mit einfacher *Michaelis-Menten*-Kinetik nur unzureichend bestimmt werden können.

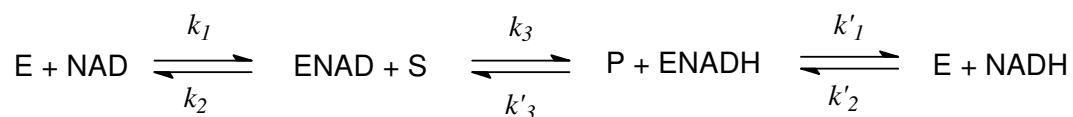


Abbildung 3.2.3: *Theorell-Chance* compulsory order bi-bi—Mechanismus; E = Enzym (*HLADH*), S = Substrat, P = Produkt

3.2.2 HLADH-katalysierte Oxidationen

Neben der Racematspaltung ist die Oxidation von Diolen eine Zugangsmöglichkeit zu chiralen Lactonen, wie sie in Tabelle 3.2.1 dargestellt sind. Diese sind wichtige Intermediate z.B. für die Synthese von Duftstoffen und Aromen (Abbildung 3.2.4) [64, 65].

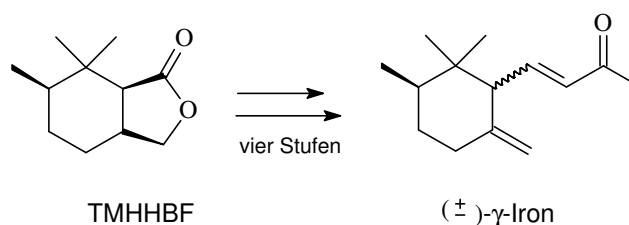


Abbildung 3.2.4: cis-γ-Iron - Hauptbestandteil von Iris-Öl und Veilchenduft; Synthese beider Diastereomere ausgehend von (±)-(3a*R**,6*S**,7a*R**)-6,7,7-Trimethylhexahydro-2-benzofuran-1(3*H*)-on (TMHHBF) [64]

Substrat	Lacton	Ausbeute / %	ee
		65 ^a	> 0,97
		65 ^a	> 0,97
		64 ^a	> 0,97
		88 ^b 99 ^c	> 0,99 > 0,99

Tabelle 3.2.1: Verschiedene HLADH-katalysierte Oxidationen; Kofaktorregenerierung: ^aFMN/O₂ [46, 47, 66-69], ^bPdMe/ Anode [35, 70], ^c[Ru(PD)₃]/O₂ [35, 70]

Neben der Verwendung als Intermediate werden Lactone auch direkt als Duftstoffe als Aromen in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Lactone mit niedrigem Molekulargewicht

(< C₈) wie etwa γ -Butyrolacton oder δ -Hexalacton (Abbildung 3.2.5) zeichnen sich durch einen karamellartigen Geschmack aus und werden in Konzentrationen von 20 ppm bis zu 500 ppm Lebensmitteln und Getränken zugesetzt. Längerkettige Lactone besitzen einen cremigen, sahnigen oder Pfirsichgeschmack und unter industriell eingesetzten bicyclischen Lactonen besitzen einige ein kräftiges Pfefferminzaroma (Abbildung 3.2.5) [71-73].

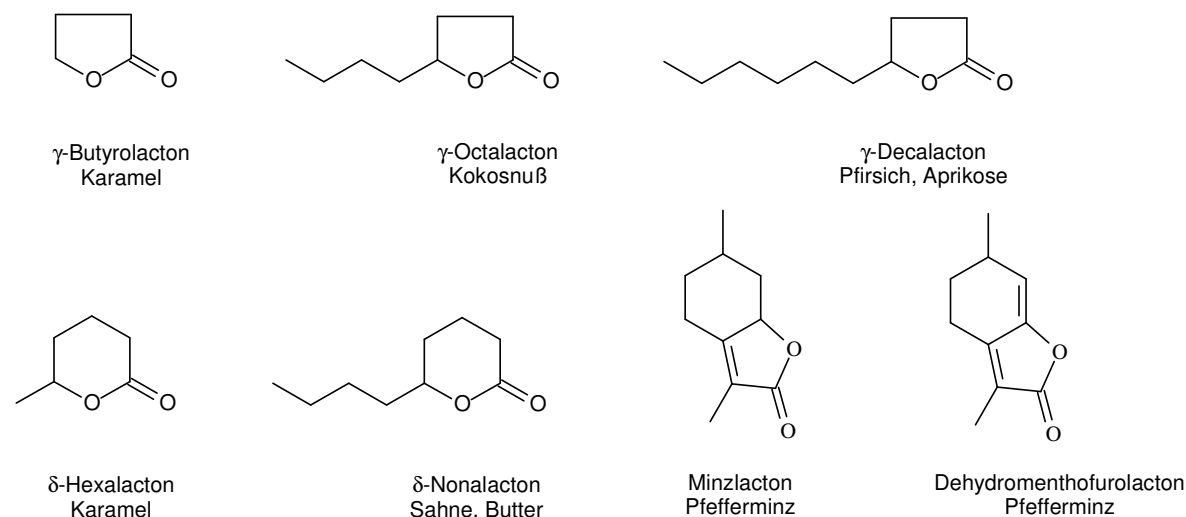


Abbildung 3.2.5: Ausgewählte Lactone und ihre Eigenschaften als Aromastoffe für die Lebensmittelindustrie

Die charakteristischen Geschmacksstoffe in Whiskey [74] und Cognac [75] und auch der typische Barrique-Geschmack³ [76] von Wein ist ebenfalls auf Lactone zurückzuführen [77]. Diese Lactone werden wegen ihrer Herkunft aus dem Holz der Fässer auch als Eichen-Lactone bezeichnet (Abbildung 3.2.6).

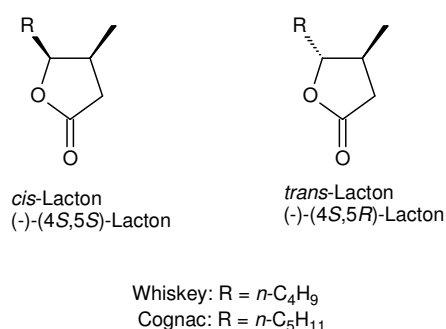


Abbildung 3.2.6: Eichen-Lactone

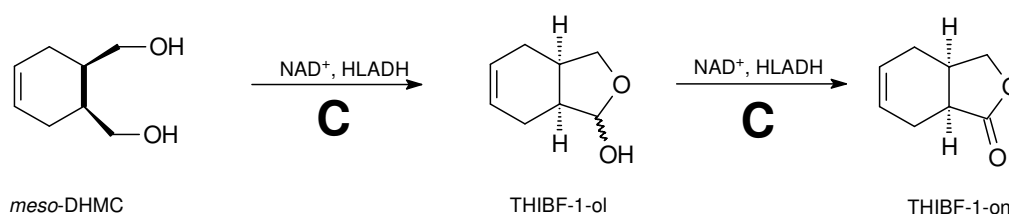
³ Als Barrique-Ausbau bezeichnet man die Reifung von Wein in Eichenholzfässern unterschiedlichen Alters, eigentlich in klassischen Bordeaux-Fässern von 225 L. Der Wein zeichnet sich anschließend durch eine Vanillernote aus.

Bislang gibt es keine großtechnischen Synthesen mit isolierten Enzymen zur Darstellung dieser Aromastoffe und nur wenige Ganzzellbiotransformationen [71]. Der Bedarf an Aromastoffen für die Parfüm und Lebensmittelindustrie ist jedoch sehr groß (Tabelle 3.2.2) und kann nicht mehr über die Extraktion natürlicher Aromastoffe gedeckt werden [71, 72]. Daher besteht ein industrielles Interesse an neuen biotechnologischen Zugängen zu diesen Substanzklassen. Nimmt man an, dass z. B. nur fünf Prozent des gesamten Umsatzes (Weltmarkt 2000 über 10,9 Mrd. US \$) auf Lactone entfallen, handelt es sich um einen Markt der Größenordnung von 545 Mio. US \$/a.

Produzent	Umsatz 2000 in Mio. US \$	Markanteil 2000 in %	Umsatz 2001 in Mio US \$
IFF	1396,9	12,7	1843,8
Givaudan	1462,8	13,3	1446
Firmenich	1179,7	10,7	nn
Quest International	1026,0	9,3	1057,3
Takasago	883,4	8,0	791,6
H&R	814,8	7,4	775,9
Sensient Flavors	378	3,4	383,7
Dragoco	331,1	3,0	332,1
T. Hasegawa	374,1	3,4	324,3
Mane SA	220	2,0	217
Gesamt	8256,7	75,6	nn

Tabelle 3.2.2: Umsatz der zehn größten Flavor & Fragrance-Produzenten, Quelle: www.leffingwell.com 2002

Als Modellreaktion für die Synthese chiraler Lactone wird die Oxidation von *meso*-DHMC zu THIBF-1-on gewählt (Abbildung 3.2.1, Seite 11).



Für eine ähnliche Reaktion (Umsetzung von *meso*-Dihydroxymethylcyclohexan) ist die Inhibierungskonstante K_i des Lactons mit 80 mM so hoch [78], dass sich ein vollständiger Umsatz auch ohne Produktextraktion erzielen lässt [35]. Eine zusätzliche Extraktion des Produkts durch organische Lösungsmittel wird jedoch als vorteilhaft beschrieben [79].

Man kann davon ausgehen, dass die intramolekulare Cyclisierung zum Lactol und die Weiteroxidation zum Lacton eine Möglichkeit darstellt, die bei Dehydrogenasen sonst auftretende Produktinhibierung durch *in situ* Maskierung der inhibierenden Ketofunktion zu umgehen. Damit ist dieses Modellsystem besonders geeignet, um ohne größeren apparativen Aufwand in einfachen Batch-Elektrolysen zu zeigen, dass $\text{ABTS}^{\bullet-}$ ein geeigneter Mediator für die Regenerierung von NAD^+ , wie in Abbildung 3.2.7 dargestellt ist.

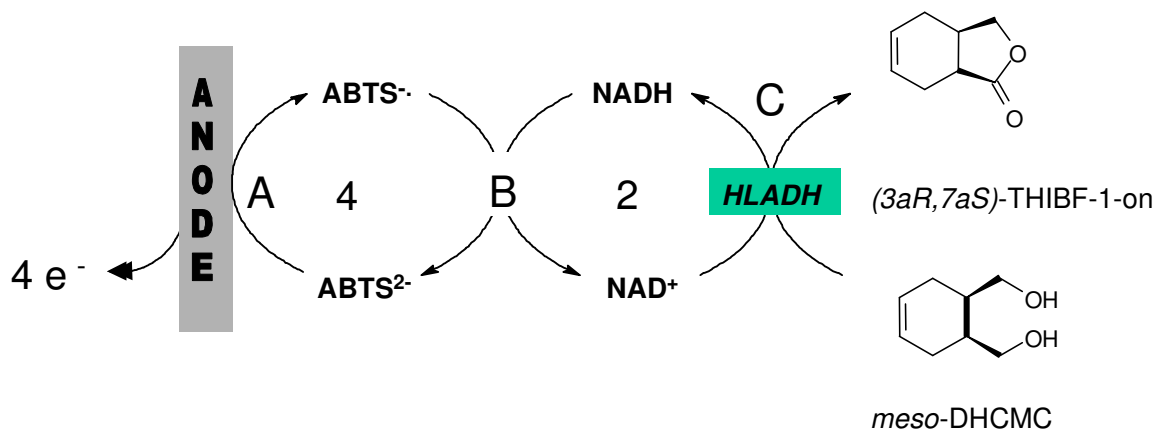


Abbildung 3.2.7: HLADH-katalysierte Lactonisierung mit mediatisierter anodischer Kofaktorregeneration, Protonen werden an der Kathode entladen ($2 \text{H}^+ + 2 e^- \rightarrow \text{H}_2$)

3.2.3 Temperatur- und pH-Einfluß

3.2.3.1 Temperaturabhängigkeit der Aktivität

Die Erhöhung der Reaktionstemperatur führt zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit, die durch die Arrhenius-Gleichung

Gleichung 3.2.1:

$$k = A \cdot e^{\left(\frac{E_A}{RT}\right)}$$

beschrieben wird. A ist eine empirisch bestimmbare Konstante, E_A (kJ mol^{-1}) die Aktivierungsenergie des Übergangszustands der Enzymreaktion, die in erster Näherung als nahezu temperaturunabhängig angenommen wird. R ist die allgemeine Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Man erhält durch nicht-lineare Regression eine Aktivierungsenergie von $46 \pm 4 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die HLADH-katalysierte Oxidation von *meso*-DHMC, wie in Abbildung 3.2.8 dargestellt ist.

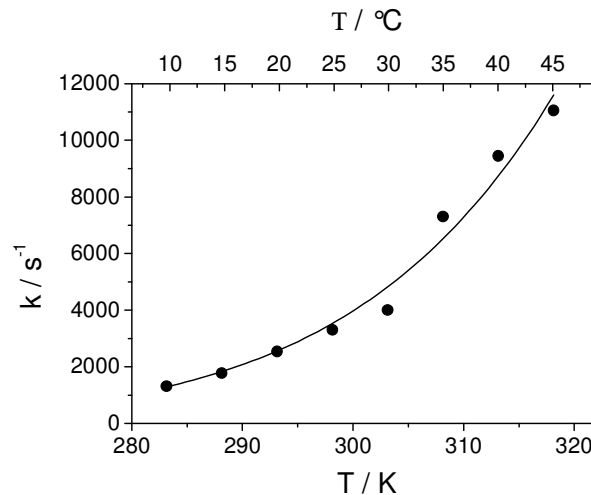


Abbildung 3.2.8: Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der *HLADH*-katalysierten Oxidation nach Arrhenius, $E_A = 46 \pm 4 \text{ kJ mol}^{-1}$, Reaktionsbedingungen: siehe Seite 149

Oberhalb von 40-45°C ist der Einfluß thermische Desaktivierung des Enzyms größer als der Aktivitätsgewinn durch die Temperaturerhöhung.

3.2.3.2 pH-Abhängigkeit der Aktivität

Mit steigendem pH-Wert nimmt die Aktivität der *HLADH* wie die der meisten Dehydrogenasen zu. Aus Abbildung 3.2.9 ist ersichtlich, dass das Maximum der Aktivität unter den Reaktionsbedingungen bei pH 10 liegt. Oberhalb dieses pH-Werts beginnt die basische Proteindenaturierung und das Enzym verliert an Aktivität.⁴

⁴ Die Aktivität eines Enzyms wird in U angegeben. Ein U entspricht der Menge an Enzym je mg oder L, die benötigt wird, um ein μmol Produkt je Minute zu erzeugen.

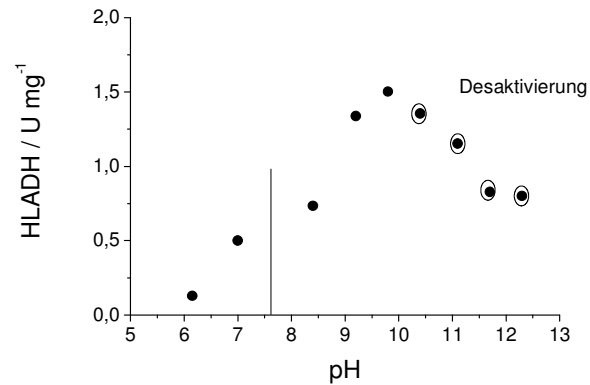


Abbildung 3.2.9: Einfluss der pH-Werts auf die Enzymaktivität, pH 6-7 KPi-Puffer, 0.05 M, pH 8,5-12,5 Kaliumcarbonat 0,05 M, T 25°C, Der Pufferwechsel ist durch den senkrechten Strich angedeutet.

Aufgrund der Vergleichbarkeit mit vorherigen Arbeiten [34, 35] wurden ein pH-Wert von 8 (50mM KPi-Puffer) und eine Temperatur von 25°C als Reaktionsbedingungen für die enzymatische Oxidation von *meso*-DHMC gewählt.

3.2.4 Zusammenfassung

- HLADH-katalysierten Umsetzung von *meso*-DHMC als Modellreaktion, Überwindung der Produktinhibierung durch geeignetes Substrat.
- Als Reaktionsbedingungen wurden T = 25°C und ein KPi-Puffer, pH 8.0, 50 mM gewählt.
 - Die Aktivierungsenergie beträgt $E_A = 46 \pm 4 \text{ kJmol}^{-1}$.

3.3 Glycerin-Dehydrogenase (GDH)

Glycerin-Dehydrogenase (EC 1.1.1.6) zählt zu den NAD-abhängigen zinkhaltigen Polyol-Dehydrogenasen. Im Organismus hat die *GDH* die Funktion, Glycerin in Dihydroxyaceton zu überführen, welches dann weiter katabolisiert wird.

Die *GDH* befindet sich an einer Schnittstelle zwischen dem Fett- und dem Kohlenhydratstoffwechsel. In oxidativer Richtung überträgt das Enzym stereoselektiv ein Hydrid vom Substrat auf den Kofaktor und bildet so ein α -Hydroxyketon (Abbildung 3.3.1).

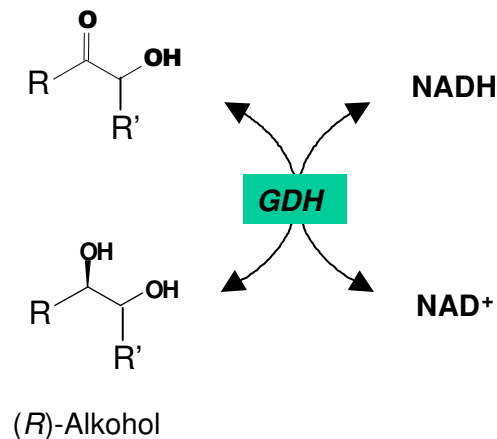


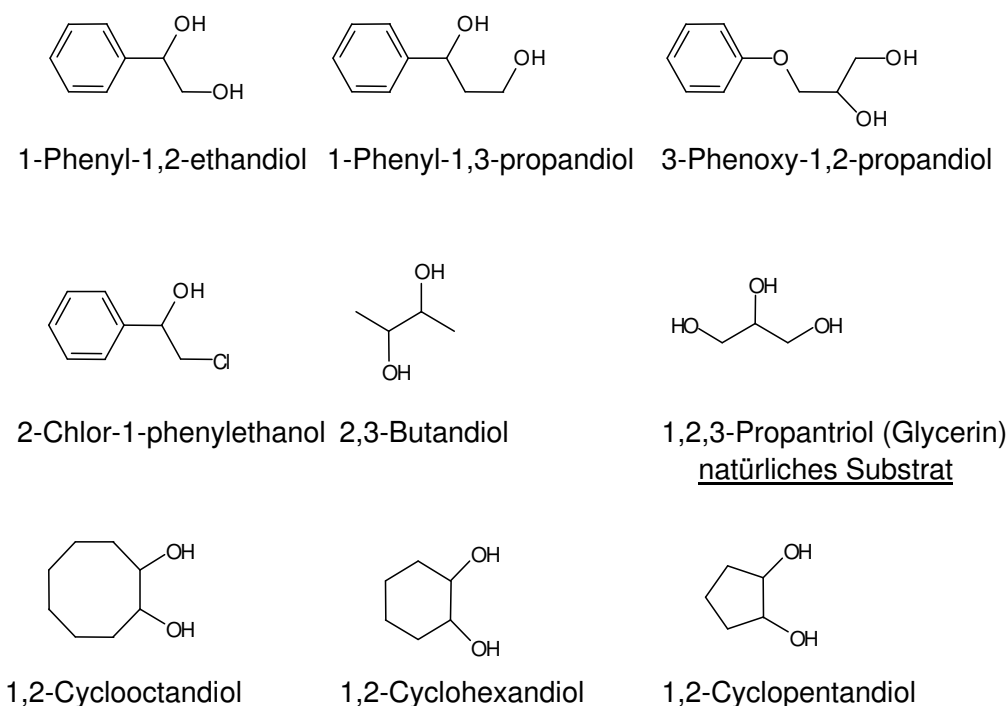
Abbildung 3.3.1: *GDH*-katalysierte Umwandlung von Diol und α -Hydroxyketon; für R = Ph, R' = H: (R)-1-Phenyl-1,2-ethandiol ((R)-PED)

Glycerin-Dehydrogenasen aus verschiedenen Organismen sind kommerziell erhältlich. Die Enzyme unterscheiden sich dabei hinsichtlich ihrer Substratspezifität und nicht zuletzt ihrer spezifischen Kosten⁵. Bisher wurden zu synthetischen Zwecken vornehmlich *GDH* aus *Enterobacter aerogenes* und *GDH* aus *Cellulomonas* species eingesetzt [37, 78].

Die *GDH* aus *Cellulomonas* sp. ist ein Protein von ~336 kD und besteht aus acht identischen Untereinheiten (42-43 kD) [80-82]. Hauptanwendungsgebiet der Glycerin-Dehydrogenase stellt die Analytik dar. Als immobilisiertes Enzym wird es für die elektrochemische und die optische Detektion von Glycerin unter anderem bei der Qualitätskontrolle von Wein eingesetzt [83-85].

In Abbildung 3.3.2 sind exemplarisch einige Substrate der *GDH* dargestellt.

⁵ siehe hierzu Tabelle 10.1.1, Seite 95

Abbildung 3.3.2: Einige Substrate der *GDH*

Im Fall der *GDH* muss das α -Hydroxyketon bzw. das Diol so aufgebaut sein, dass der Rest R' entweder ein Wasserstoff, eine Methylgruppe oder eine cyclische Alkylgruppe ist (Abbildung 3.3.1). R besitzt eine größere Variabilität und kann von einfachen Gruppen (CH_2OH , CH_2SH , CH_2OCH_3 , $(\text{CH}_2)_n$) bis hin zu größeren aromatischen Resten reichen (Abbildung 3.3.1). Hierbei spielt die sterische Hinderung eine entscheidende Rolle, denn raumerfüllende Reste werden nur in weiterer Entfernung von der zu oxidierenden bzw. reduzierenden Position toleriert. Dieser Einfluss manifestiert sich auch in der Abstufung der einzelnen Substrate nach ihrer Aktivität (Abbildung 3.3.3). Substrate mit direkt benachbarten Phenylgruppen weisen eine wesentlich geringere spezifische Aktivität auf [78, 86]. Neben vicinalen Diolen werden 1,3-Diole enzymatisch oxidiert. Je weiter die Hydroxyfunktionen von einander entfernt sind, um so schlechter passen sie in die enzymatische Bindungstasche. Auch Verbindungen mit mehr als zwei Hydroxyfunktionen können von der Glycerin-Dehydrogenase oxidiert werden, jedoch werden lediglich Polyole mit bis zu drei direkt benachbarten Hydroxyfunktionen als Substrat gebunden. Da gerade bei Dehydrogenasen häufig Produktinhibition auftritt, wirken Ketone in oxidativer Richtung inhibierend, wobei insbesondere 1,2-Diketone starke Inhibitoren darstellen [37, 78, 87].

3.3.1 GDH aus *Cellulomonas* sp. und *Enterobacter aerogenes*

Für unterschiedliche Substrate ergibt sich für die untersuchte Glycerindehydrogenase aus *Cellulomonas* species und aus *Enterobacter aerogenes* ein leicht variierendes Bild der relativen Aktivitäten (Abbildung 3.3.3).

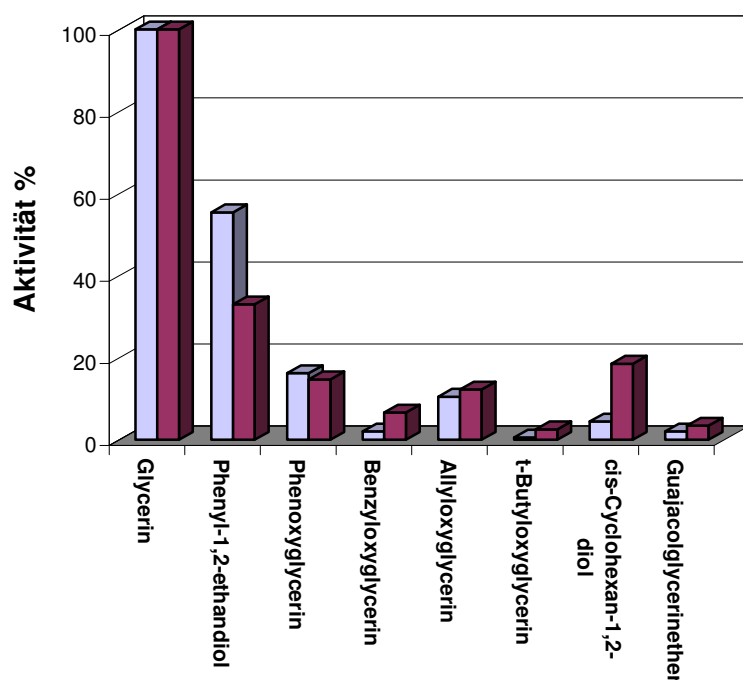


Abbildung 3.3.3: Vergleich der relativen Aktivität der GDH in Prozent bezogen auf Glycerin. Die Substrate sind von links nach rechts nach steigendem sterischen Anspruch geordnet. Legende: hell = *Cellulomonas* sp., dunkel = *Enterobacter aerogenes*; Standardassay-Bedingungen, siehe Kapitel 14.5.4, Seite 146

Im Vergleich zur GDH aus *Enterobacter aerogenes* zeigt das Enzym aus *Cellulomonas* sp. kaum Aktivität gegenüber cyclischen Diolen und von den Glycerinderivaten weisen lediglich Phenoxyglycerin und Allyloxyglycerin eine relative Aktivität von ≥ 10 % bezogen auf Glycerin als Substrat auf.

1-Phenyl-1,2-ethandiol (PED) zeigte im Vergleich mit Glycerin die größte relative Aktivität mit GDH aus *Cellulomonas* sp. Daher wurde diese Verbindung als Modells substrat für eine GDH-katalysierte oxidative Racematspaltung mit prozesstechnischer Überwindung der Produktinhibierung (Abbildung 3.3.4) ausgewählt.

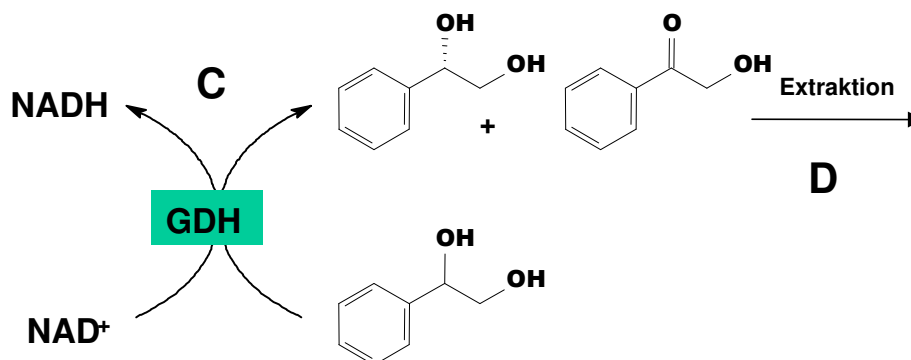


Abbildung 3.3.4. *GDH*-katalysierte Racematspaltung von (*R,S*)-1-Phenyl-1,2-ethandiol ((*R,S*)-PED)

3.3.2 Aktivität und Stabilität der *GDH*

Die *GDH* aus *Enterobacter aerogenes* wurde bereits mehrfach untersucht. Sie zeigt eine starke Abhängigkeit von monovalenten Kationen [88, 89]. Dabei bewirken Rubidium-, Thallium-, Kalium- und Ammoniumionen eine Aktivierung des Enzyms in oxidativer Richtung, während Natriumionen das Enzym in reduktiver Richtung aktivieren. Generell desaktivieren mehrwertige Kationen das Enzym, sowie alle Substanzen, die in der Lage sind, die koordinativen Cystein-SH-Metallbindungen durch Oxidation oder Chelatisierung zu zerstören. Im folgenden werden die Ergebnisse der Stabilitäts- und Aktivitätsuntersuchungen für die *GDH* aus *Cellulomonas* sp. dargestellt.

3.3.2.1 pH-Abhängigkeit der Aktivität

Im alkalischen Bereich von pH 8,5-11 katalysiert die *GDH* aus *Cellulomonas* sp. bevorzugt die oxidativer Richtung, wohingegen bei pH-Werten kleiner als pH 8,0 das Gleichgewicht auf Seiten des reduzierten Substrats bzw. oxidierten Kofaktors liegt. Bei pH- Werten > 9 erreicht das Enzym unter den Reaktionsbedingungen seine maximale Aktivität.

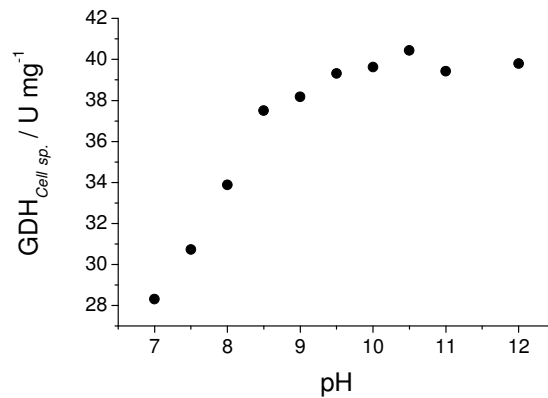


Abbildung 3.3.5: pH-Abhängigkeit der Aktivität der *GDH* aus *Cellulomonas* sp., Reaktionsbedingungen: siehe Seite 149

Für enzymatische Umsetzung wurde pH 9,0 gewählt als Kompromiss zwischen Enzymaktivität und Kofaktorstabilität⁶.

3.3.2.2 Ioneneinfluss auf die Aktivität

Wie auch bei der *HLADH*, beeinflussen Ionen die Aktivität des Enzyms (Abbildung 3.3.6).

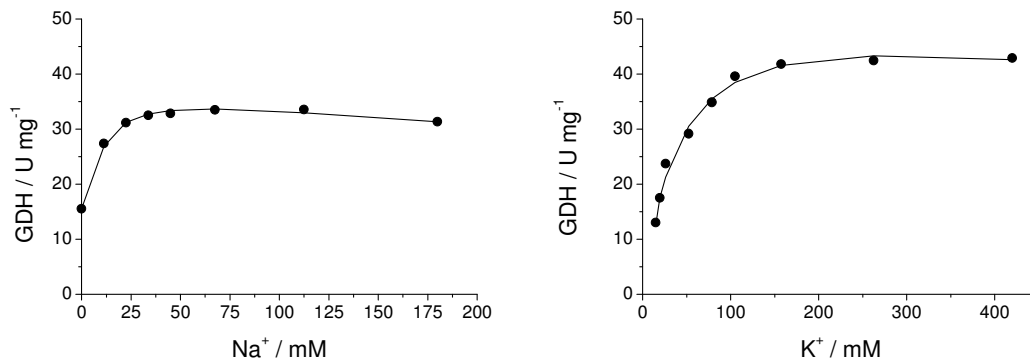


Abbildung 3.3.6: Einfluss von Na⁺ und K⁺ auf die Aktivität der GDH, jeweils Carbonat-Puffer pH 9,0, 25°C; durchgezogene Linien als Visualisierungshilfe. Reaktionsbedingungen siehe Kapitel 14.5.10, Seite 150

Genau wie bei der *GDH* aus *Enterobacter aerogenes* wirkt K⁺ als Enzymaktivator, jedoch im Gegensatz zur *GDH* aus *Enterobacter aerogenes* lässt sich die *GDH* aus *Cellulomonas* sp auch durch Na⁺ in oxidativer Richtung aktivieren. Als Puffer für enzymatische Umsetzungen wurde ein 100 mM Kaliumcarbonat-Puffer gewählt.

⁶ siehe dazu auch Kapitel 4.2, Seite 33 ff.

3.3.2.3 Stabilitätsuntersuchungen

Nach anfänglich scheinbar rascher Desaktivierung erweist sich die *GDH* auch über einen langen Zeitraum als stabil (Abbildung 3.3.7).

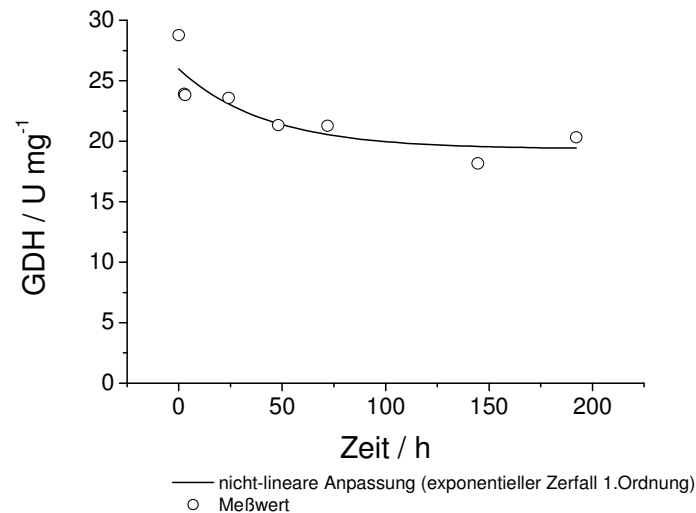


Abbildung 3.3.7. Stabilität der GDH aus *Cellulomonas sp.* in Kaliumcarbonat 0,1 M, pH 9,0, 25°C in Gegenwart einer hydrophoben Oberfläche (*Eppendorff*-Reaktionsgefäß), Reaktionsbedingungen: siehe Seite 148.

Die anfänglich scheinbar rasche Desaktivierung ist vermutlich auf Adsorption des Enzyms an der Wand des Reaktionsgefäßes zurück zu führen. Mit einer Halbwertszeit von $\tau = 42$ h fällt die Aktivität auf eine stabile Restaktivität von etwa zwei Drittel der Ursprungsaktivität ab. Das Adsorptionsphänomen zeigte sich auch bei Umsetzungen im extraktiven elektrochemischen Enzym-Membranreaktor (E³MR, siehe Kapitel 10.3.4, Seite 107 ff.).

3.3.2.4 Stabilität während der Elektrolyse

Um zu ermitteln, wie sich die *GDH* unter Elektrolysebedingungen, also in Gegenwart von Substrat, Kofaktor und Mediator und in Gegenwart der Kohlefilz-Elektrode verhält, wurden zwei Elektrolysen durchgeführt und währenddessen die Enzymaktivität bestimmt. Der Verlauf der Elektrolysen für *GDH* aus *Enterobacter aerogenes* und *Cellulomonas species* ist in Abbildung 3.3.8 dargestellt.

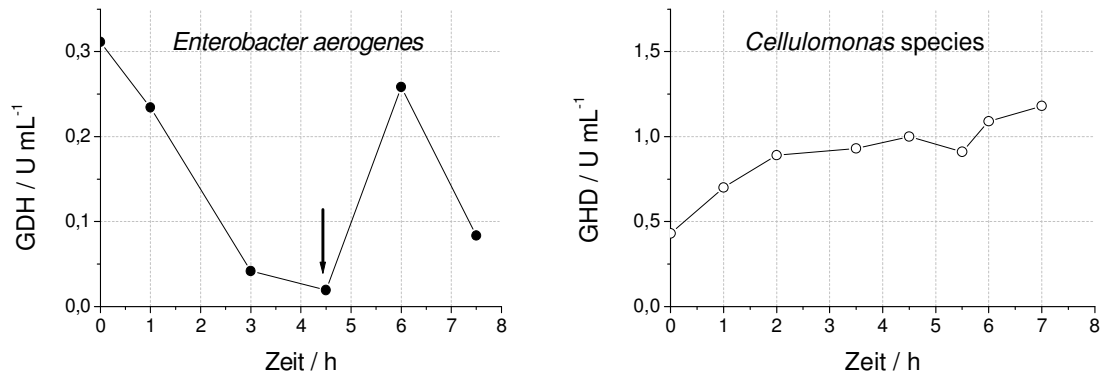


Abbildung 3.3.8: Enzymaktivität als Funktion der Zeit für Batch-Elektrolysen (30 mL Kaliumcarbonatpuffer pH 9,0, 0,1M, 25°C, Anode (A): Kohlefilz, Kathode (K): Pt-Draht, (R,S)-PED 40 mM, NAD^+ 4 mM ABTS^{2-} 0,4 mM, 550 (links) –585 mV (rechts) gegen Ag/AgCl; Enzymnachdosierung ist mit einem Pfeil markiert; der Anstieg der Aktivität in der rechten Grafik ist ein Konzentrierungseffekt im offenen Reaktionsgefäß. Die Linien dienen als Visualisierungshilfe

Es zeigt sich, dass die *GDH* aus *Enterobacter aerogenes* unter Elektrolysebedingungen im Gegensatz zur *GDH* aus *Cellulomonas species* nicht stabil ist. Für alle weiteren Untersuchungen und Reaktionen wird daher nur das Enzym aus *Cellulomonas species* verwendet.

3.3.2.5 Einfluss organischer Lösungsmittel

In Gegenwart von organischen Lösungsmitteln wie *iso*-Oktan (Abbildung 3.3.9), wie sie für die Extraktion des Produktes benötigt werden, desaktiviert das Enzym rasch ($\tau_{1/2} = 2,6$ h).

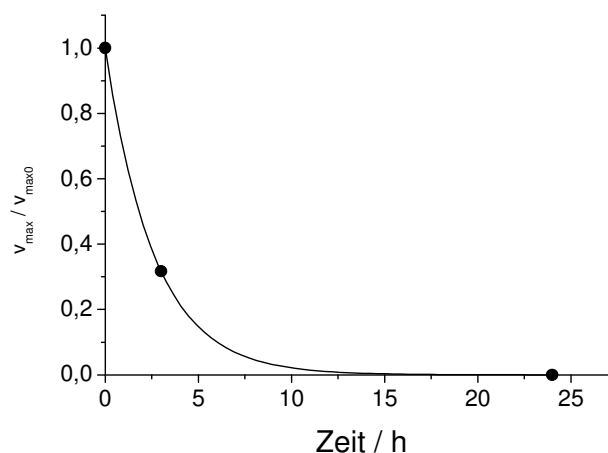


Abbildung 3.3.9: Enzymdesaktivierung in Gegenwart von *iso*-Oktan (Emulsion), Kaliumcarbonatpuffer 0,1 M, pH 9,0, 25°C; $k_{\text{desakt.}} = 9401,8 \pm 2,8 \text{ s}^{-1}$ ($= 2,6 \text{ h}^{-1}$), Reaktionsbedingungen: Kapitel 14.5.11, Seite 150

Für eine ausreichende Stabilität der *GDH*, muss der direkte Phasenkontakt vermieden werden, daher kann keine Reaktion in einem Emulsionsreaktor durchgeführt werden. Hier bieten sich membrangestützte Systeme an, wie sie bereits erfolgreich für enzymatische Transformationen in zweiphasigen Systemen eingesetzt wurden [37, 40, 90]. Ultrafiltrations-Membranen (UF-Membranen) gewährleisten einen Stofftransport zwischen wässriger und organischer Phase. Die makromolekularen Enzyme können in der Regel nicht an die Phasengrenzfläche gelangen.

3.3.3 Kinetische Charakterisierung der *GDH*

Wie bei den meisten Oxidoreduktasen, kann auch bei der *GDH* in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen Produktinhibierung beobachtet werden. Die kinetische Charakterisierung ermöglicht es, Einflussgrößen auf die Enzymaktivität zu quantifizieren.

Der Reaktionsverlauf der meisten Dehydrogenasen und auch der *GDH* folgt einem *ordered bi-bi Mechanismus* [80-82, 91]. Dabei binden Kofaktor und Substrat nacheinander an das aktive Zentrum des Enzyms und werden nach Beendigung der Reaktion in umgekehrter Reihenfolge wieder aus der Bindungsstelle freigesetzt.

Die makrokinetische Beschreibung der Geschwindigkeit der enzymatischen Oxidation erfolgt im Rahmen dieser Arbeit vereinfacht gemäß der hyperbolischen Geschwindigkeitsgleichung

Gleichung 3.3.1

$$v_o = v_{max} \cdot \frac{[RS]}{K_{M,RS} \cdot \left(1 + \frac{[P]}{K_{i,P}}\right) + [RS]} \cdot \frac{[NAD]}{K_{M,NAD^+} \cdot \left(1 + \frac{[NADH]}{K_{i,NADH}}\right) + [NAD]}$$

als Doppelsubstratkinetik mit doppelter kompetitiver Produktinhibition [92]. RS bezeichnet das Substrat. Dieselbe Gleichung wurde zur Bestimmung der kinetischen Konstanten für die einzelnen Enantiomere verwendet. Dann wurde entsprechend [S] oder [R] für die Konzentration an (*S*)-Enantiomer bzw. (*R*)-Enantiomer eingesetzt.

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten K_M sowie der Geschwindigkeitskonstante v_{max} wurden nacheinander die Konzentrationen an (*R,S*)-PED, bzw. den enantiomerenreinen Verbindungen sowie die Konzentration an NAD^+ variiert. Die Auftragung der bestimmten enzymatischen Aktivitäten in Abhängigkeit von der Konzentration wurde nach Gleichung 3.3.1 nicht-linear angepasst. Zur Bestimmung der Inhibierungskonstante K_i für NADH und

Hydroxyacetophenon (2-HAP) wurde die enzymatische Aktivität in Gegenwart variierender Inhibitorkonzentrationen bestimmt. Die nicht-lineare Anpassung der so ermittelten Daten erfolgte wiederum nach Gleichung 3.3.1. Die genauen Versuchsbedingungen sind in Kapitel 14.5.5, Seite 146, dargelegt.

In Abbildung 3.3.10 bis Abbildung 3.3.12 sind die Ergebnisse der Messungen und der Auswertung nach Gleichung 3.3.1 gezeigt

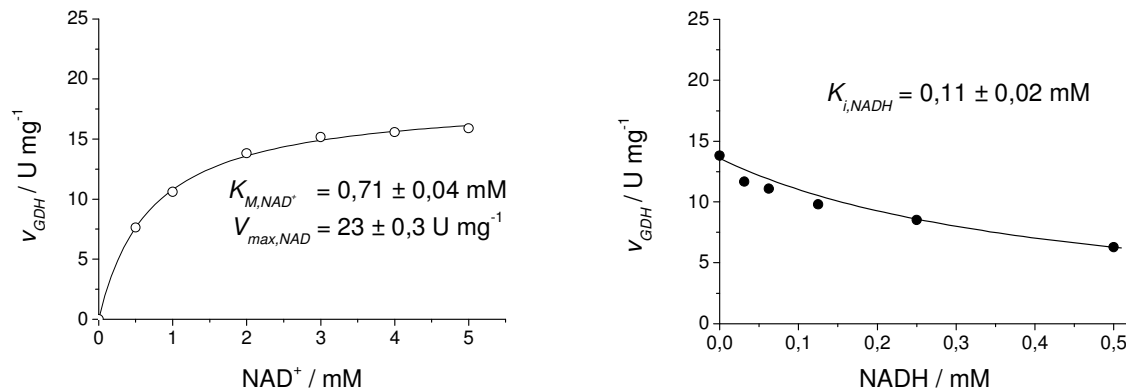


Abbildung 3.3.10: Variation an NAD⁺ (links, (R,S)-PED = 100 mM) und NADH (rechts, (R,S)-PED = 100 mM, NAD⁺ = 2 mM); durchgezogene Linie: nicht-lineare Regression

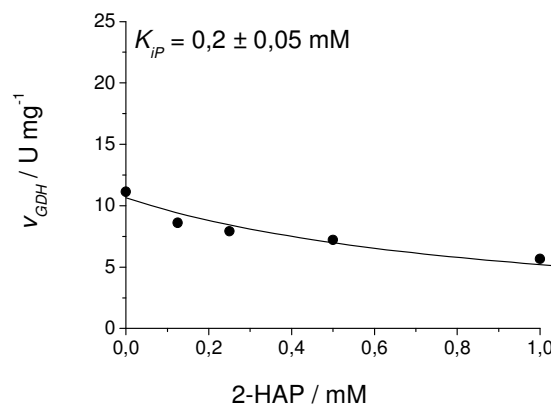


Abbildung 3.3.11: Variation an 2-HAP ((R,S)-PED = 100 mM, NAD⁺ = 2 mM); durchgezogene Linie: nicht-lineare Regression

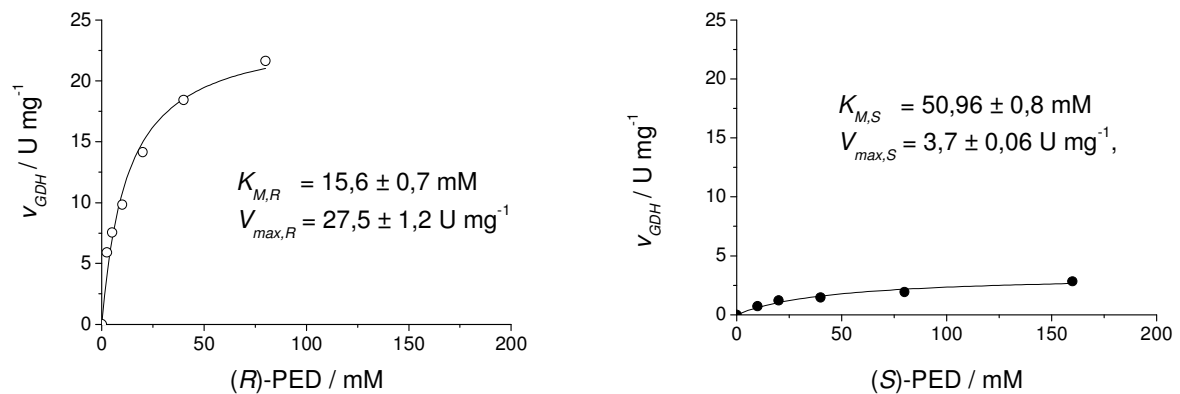


Abbildung 3.3.12: Variation an (R)-PED (links) und (S)-PED (rechts), $\text{NAD}^+ = 2 \text{ mM}$, durchgezogene Linie: nicht-lineare Regression

Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 3.3.1 auf Seite 30 zusammengefasst. Die oxidative Umsetzung mittels der Glycerin-Dehydrogenase ist gekennzeichnet durch eine sehr starke Inhibierung sowohl durch den reduzierten Kofaktor NADH als auch durch das Hydroxyketon 2-HAP. Beide K_i -Werte sind in der gleichen Größenordnung ($K_{i,NADH} = 0,11 \text{ mM}$, $K_{i,2-HAP} = 0,19 \text{ mM}$). Die sehr starke Inhibition durch den reduzierten Kofaktor ist bei Dehydrogenasen häufig anzutreffen, weshalb die *in situ* Regenerierung von NAD^+ für eine erfolgreiche enzymatische Umsetzung zwingend notwendig ist. Darüber hinaus ist in diesem Fall das K_i/K_M -Verhältnis (Produkt/Substrat) deutlich kleiner eins ($\sim 0,008$), was in der Regel einen vollständigen Umsatz verhindert, da die Reaktionsgeschwindigkeit schon bei geringen Umsätzen stark abnimmt.

Mit Hilfe von Simulationen, welche auf den erarbeiteten kinetischen Daten beruhen, zeigt sich diese Auswirkung der Inhibierung durch 2-HAP auf die Geschwindigkeit der enzymatischen Oxidation (Abbildung 3.3.13). Die Reaktionen wurden als Umsetzungen im Satzreaktor (Batch) mit vollständiger Kofaktorregenerierung ($\text{NADH} = 0 \text{ mM}$) berechnet.

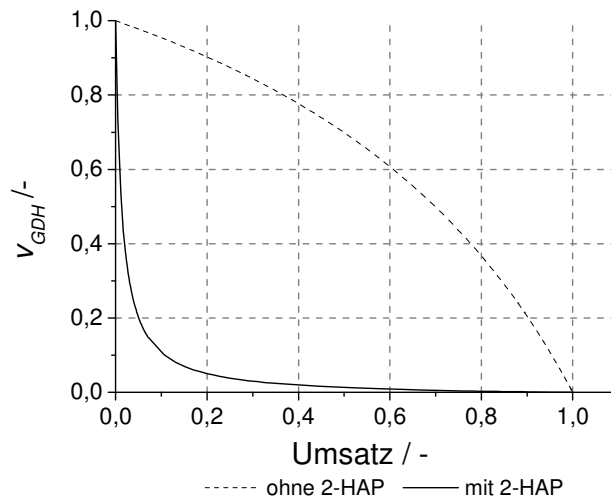


Abbildung 3.3.13: Simulation von Batch-Reaktionen mit vollständiger Kofaktorregenerierung in Gegenwart und ohne 2-HAP, Bedingungen wie in Kapitel 14.10.3 Versuch 2, S.161 f. ohne Extraktion und Nachdosierung

Man erkennt, dass ohne eine Entfernung des inhibierenden Oxidationsprodukts 2-HAP die Reaktionsgeschwindigkeit V_{GDH} rasch abfällt. Bei 20 % Umsatz beträgt die enzymatische Aktivität nur noch etwa 5 % der ursprünglichen Aktivität. Bei 50 % Umsatz, den man mindestens für eine vollständige Racematspaltung bräuchte, ist fast keine enzymatische Aktivität mehr vorhanden. Ohne 2-HAP liegt die Aktivität bei 50 % Umsatz mit 70 % der ursprünglichen enzymatischen Aktivität deutlich höher. Die Konsequenz dieser starken Verlangsamung der Reaktion durch die inhibierende Wirkung von 2-HAP zeigt sich besonders in Simulationen des Umsatzes als Funktion der Zeit (Abbildung 3.3.14).

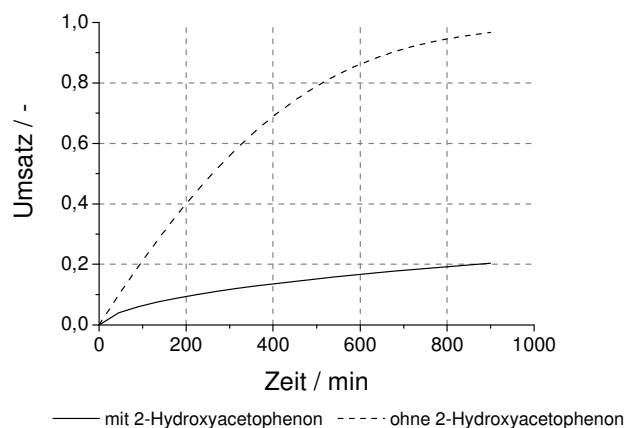


Abbildung 3.3.14: Simulation des Umsatzes als Funktion der Zeit für Batch-Reaktionen mit vollständiger Kofaktorregenerierung in Gegenwart und ohne 2-HAP, Bedingungen s. o.

Ohne eine Entfernung des Hydroxyketons 2-HAP *in situ* ist keine vollständige Umsetzung innerhalb eines sinnvollen Zeitrahmens möglich. Es können Umsätze von maximal 20 % erreicht werden, bevor die Reaktionsgeschwindigkeit zu sehr abfällt.

Eine effektive enzymatische Umsetzung des Substrats zum Produkt kann nur stattfinden, wenn das Produkt der Reaktionslösung entzogen wird. Es muss folglich ein Reaktor mit integrierter Produktabtrennung entwickelt werden.

3.3.4 Zusammenfassung

In Tabelle 3.3.1 sind die ermittelten kinetischen Daten der *GDH* aus *Cellulomonas* sp. zusammengefasst.

varierte Substanz	K_M / mM	K_i / mM	V_{max} / U mg ⁻¹
(R)-PED	15,6 ± 0,7	-	27,5 ± 1,2
(S)-PED	50,96 ± 0,8	-	3,7 ± 0,06
NAD ⁺	0,71 ± 0,04	-	23 ± 0,3
NADH	-	0,11 ± 0,02	-
2-HAP	-	0,19 ± 0,05	-

Tabelle 3.3.1: Kinetische Daten der *GDH* aus *Cellulomonas* sp.

- Die *GDH* aus *Enterobacter aerogenes* deaktiviert unter Elektrolysebedingungen und kann daher nicht eingesetzt werden.
- Für die *GDH* aus *Cellulomonas* sp. wird die Racematspaltung von 1-Phenyl-1,2-ethandiol als Modellreaktion gewählt.
- NADH muss aufgrund der starken Inhibition direkt *in situ* reoxidiert werden.
- Zur Überwindung der Produktinhibierung wird ein verfahrenstechnisches Konzept mit integrierter Produktabtrennung entwickelt.
- Die *GDH* adsorbiert an hydrophoben Oberflächen.
- Das Enzym deaktiviert in Gegenwart von *iso*-Oktan ($\tau_{1/2} = 2,6$ h).

4 Nukleotidkofaktoren

Zur Übertragung von Elektronen benötigen Oxidoreduktasen Vermittler, die den Ladungstransfer bzw. Hydridtransfer zwischen Substrat und Enzym ermöglichen [93]. Die prominentesten Kofaktoren sind die Nukleotidkofaktoren Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) und Nikotinamidadenindinukleotidmonophosphat (NADP) [94].

4.1 Einleitung

Bei einer Dehydrogenase-katalysierten Oxidation wird ein Hydrid vom Substrat auf den Kofaktor übertragen (als Beispiel die *GDH*-katalysierte Racematspaltung, Abbildung 4.1.1).

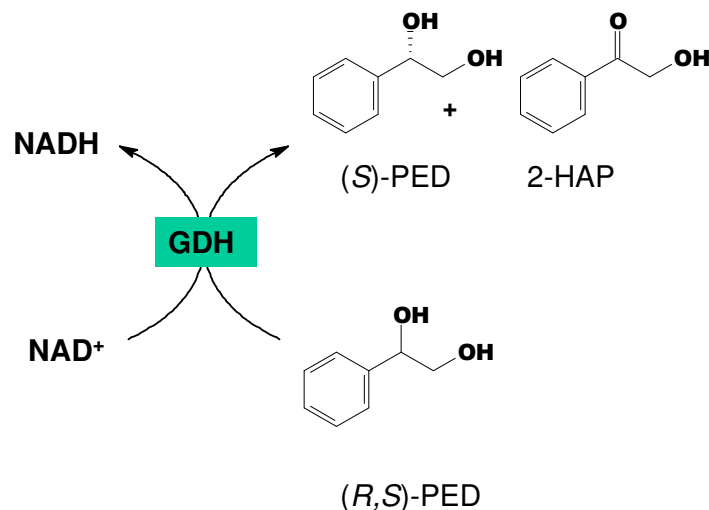


Abbildung 4.1.1: *GDH*-katalysierte Racematspaltung von *(R,S)*-1-Phenyl-1,2-ethandiol

Es gibt drei Gründe, den oxidierten Kofaktor nicht in stöchiometrischen Mengen einzusetzen, sondern *in situ* zu regenerieren:

1: Kinetik

Der dabei entstehende reduzierte Kofaktor NADH oder NADPH wirkt als potenter Inhibitor und sollte in minimaler Konzentration vorhanden sein.

2. Kosten

Der Einsatz von unterstöchiometrischen Mengen reduziert die Kosten der eingesetzten Kofaktoren. Diese tragen erheblich zu den Gesamtkosten der Synthese bei (Tabelle 4.1.1).

Kofaktor	Preis in k€ mol ⁻¹
NAD ⁺	1,3
NADH	5,2
NADP ⁺	5,4
NADPH	39,2

Tabelle 4.1.1: Preise für Nukleotidkofaktoren, Stand: 06-2002, Quelle: Jülich Fine Chemicals

3. Thermodynamik

Fast alle Substrat/Produktpaare bei Dehydrogenase-katalysierten Oxidationen, beispielsweise Ethanol | Ethanal ($E_0' = -0,199 \text{ V vs. NHE}$), haben ein positiveres Redoxpotential als NAD(P)H | NAD(P)⁺ ($E_0' = -0,320 (-0,324) \text{ V vs. NHE}$)⁷, so dass die Bildung von NAD(P)H thermodynamisch ungünstig ist. Ein weiterer wichtiger Grund für eine möglichst schnelle und effiziente Oxidation des reduzierten Kofaktors ist also Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite der oxidierten Produkte.

⁷ siehe auch Tabelle 5.2.1, Seite 37

4.2 Stabilität der Nukleotidkofaktoren

In Abbildung 4.2.1 ist der pH-Einfluß auf die Stabilität der Kofaktoren dargestellt.

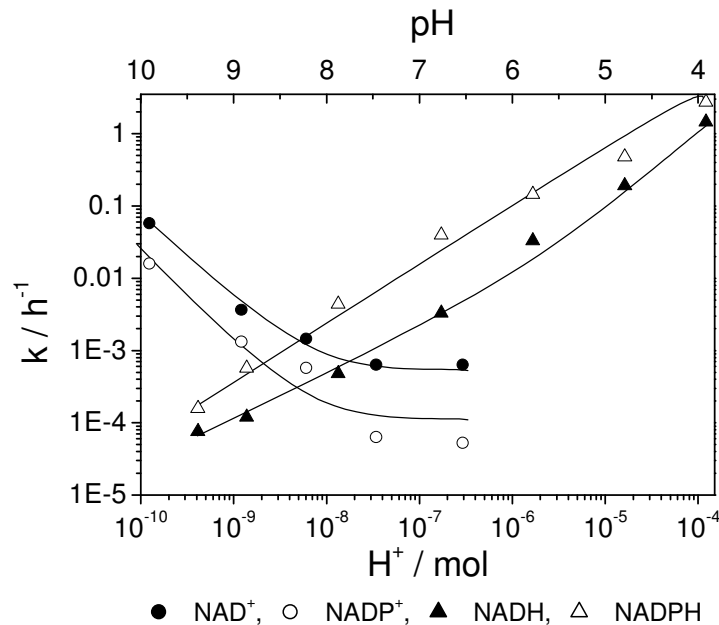


Abbildung 4.2.1: Geschwindigkeitskonstanten des Zerfalls der Nukleotidkofaktoren in Abhängigkeit vom pH-Wert, Bedingungen: 0,1 mM Kofaktor, 25°C, 50 mM (Puffer: Acetat pH 3,8-5,8; Triethanolamin pH 6,5-8,8, Bicarbonat pH >9,0); Quelle: [95, 96], Linien als Visualisierungshilfe

Während die reduzierte Form der Nukleotidkofaktoren NAD(P)H vornehmlich säurekatalysiert über intramolekulare Zyklisierung zerfällt [95, 96] und im alkalischen Medium recht stabil ist, zersetzen sich NAD⁺ und NADP⁺ unter basischen Bedingungen (Abbildung 4.2.1.) [97]. Die Geschwindigkeitskonstanten des Zerfalls wurden für die oxidierten Nukleotidkofaktoren jeweils bei pH 9,0, 25°C bestimmt (Abbildung 4.2.2 und Abbildung 4.2.3).

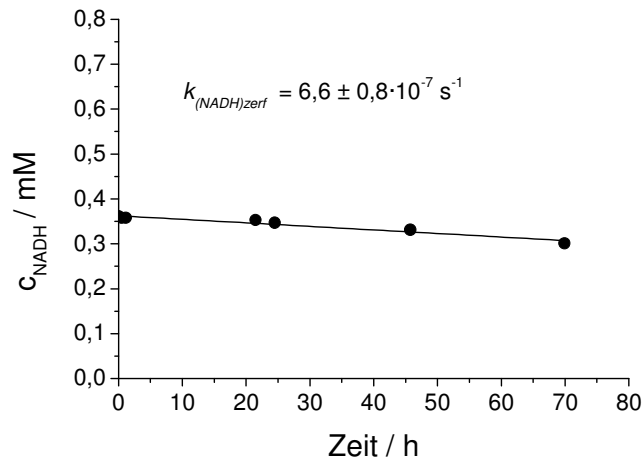


Abbildung 4.2.2: Stabilität von NADH [0,5 mM] in Kaliumcarbonat-Puffer [100 mM], pH 9,0, 25°C; Punkte: Messdaten, Linie: nicht-lineare Anpassung exponentieller Zerfall erster Ordnung

Für NADH ist die Zerfallskonstante mit $k_{(\text{NADH})\text{zerf}} = 6,6 \pm 0,8 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ eine Größenordnung kleiner als für die oxidierte Form des Kofaktors unter ähnlichen Versuchsbedingungen

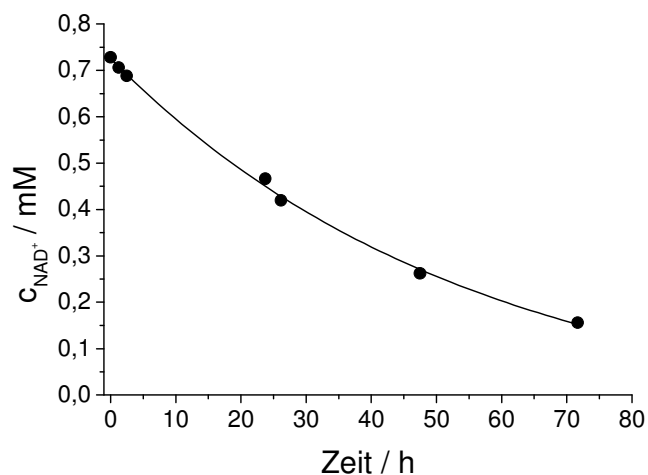


Abbildung 4.2.3: Basenkatalysierter Zerfall von NAD^{+} [1 mM] in Kaliumcarbonat-Puffer [100 mM], pH 9,0, 25°C; Punkte: Messdaten, Linie: nicht-lineare Anpassung exponentieller Zerfall erster Ordnung

Aus Abbildung 4.2.3 geht hervor, dass der Zerfall des NAD^{+} einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung folgt. Bei einem pH-Wert von 9,0 und einer Temperatur von 25°C ergibt sich die Zerfallskonstante für NAD^{+} $k_{\text{zerf}} = 5,9 \pm 0,2 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Dies entspricht einer Halbwertszeit von 55 Stunden. Da die Stabilität des Kofaktors auch von Fremdionen in der Lösung bestimmt wird, wurde für spätere Reaktionen eine minimale Halbwertszeit von 24 Stunden

angenommen [98]. Eine nukleophile Addition von Hydroxyketonen wie 2-Hydroxyacetophenon (2-HAP), wie sie bereits beschrieben wurde [37], konnte nicht festgestellt werden.

Dieser in Abbildung 4.2.4 gezeigte nukleophile Angriff CH-acider leicht enolisierbarer Verbindungen auf den Nikotinamidring ist jedoch mehrfach literaturbelegt für Pyruvat als Nukleophil [95, 99-103], was gegen eine enzymatische Kofaktorregenerierung mittels Lactat-Dehydrogenase spricht⁸, bei der Pyruvat im Überschuss eingesetzt werden muss.

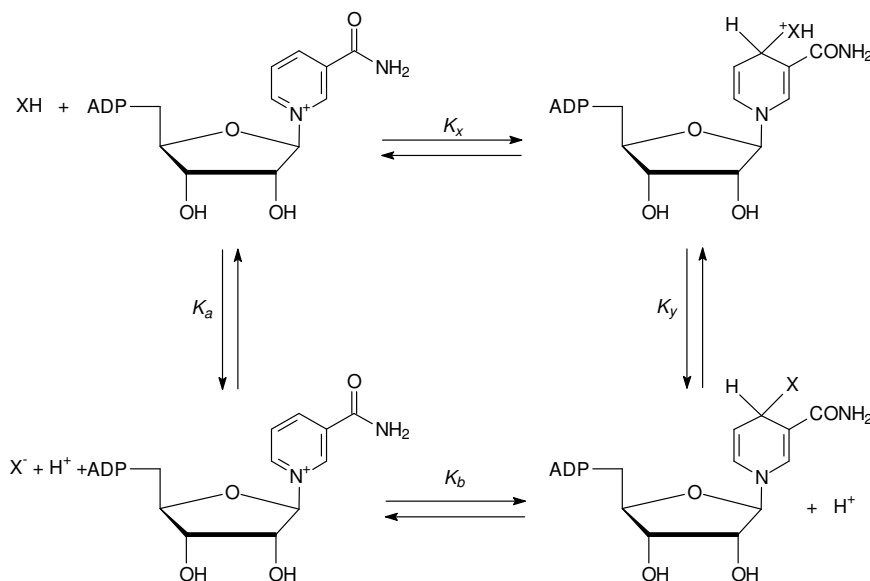


Abbildung 4.2.4: Nukleophile 1,4-Addition an NAD⁺; Quelle:[95]

4.3 Zusammenfassung

Allgemein sind die reduzierten Nukleotidkofaktoren im alkalischen und die oxidierten im sauren Milieu stabiler.

- Für NAD⁺ beträgt die Zerfallskonstante bei pH 9,0 und 25°C in 0,1 M Kaliumcarbonatpuffer $k_{\text{zerf}} = 5,9 \pm 0,2 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$.
- Für NADH ist die Zerfallskonstante mit $k_{(\text{NADH})\text{zerf}} = 6,6 \pm 0,8 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ unter vergleichbaren Bedingungen eine Zehnerpotenz kleiner.
- 2-Hydroxyacetophenon greift NAD⁺ nicht nukleophil an.

⁸ siehe auch Kapitel 5.3, Seite 40 ff.

5 Oxidative Regenerierung von Nukleotidkofaktoren

5.1 Einleitung

Bei der Rezyklisierung der oxidierten Form der Nukleotidkofaktoren spielt die geringe Stabilität der Kofaktoren eine ausschlaggebende Rolle bei der Wahl der geeigneten Methode der Regenerierung. Für eine effektive Regenerierung von NAD(P)^+ (hohe *ttn*⁹) benötigt man eine Reaktion mit ausreichend großer thermodynamischer Triebkraft und günstiger Gleichgewichtslage¹⁰. Darüber hinaus muss die Oxidation des Kofaktors mit ausreichender Geschwindigkeit (große *tof*⁹) stattfinden und gleichzeitig sollte es nicht zu unerwünschten Nebenreaktionen kommen, die die Stabilität des Kofaktors weiter beeinträchtigen und die *ttn* verringern. Schließlich darf die Regenerationsmethode keine negativen Auswirkungen auf die Stabilität der Reaktionspartner, z.B. von Enzymen haben. Nach *Nernst* ändert sich das Redoxpotential in Abhängigkeit von pH und Temperatur. Für pH 7,0, 25°C beträgt das Redoxpotential von $\text{NADH}|\text{NAD}^+ = -0,320 \text{ V vs. NHE}$ ($\text{NADPH}|\text{NADP}^+ = -0,324 \text{ V}$)¹¹. Der Einfluss des pH-Werts auf das Redoxpotential von $\text{NADH}|\text{NAD}^+$ beträgt -30 mV je Erhöhung um eine pH-Einheit. Der Einfluss der Temperatur zeigt sich am Beispiel von pH 7,0 durch eine Verschiebung des Potentials von -0,7 mV/°C (Abbildung 5.1.1).

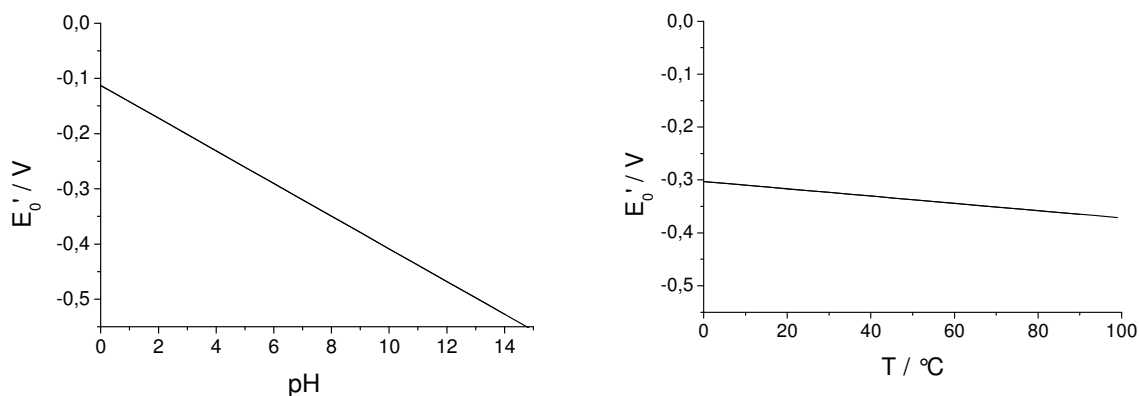


Abbildung 5.1.1: Nach *Nernst*¹⁰ berechnete Abhängigkeit des Redoxpotentials von $\text{NADH}|\text{NAD}^+$ von pH-Wert und Temperatur (links: $T = 25^\circ\text{C}$, andere Konzentrationen 1M, rechts: pH 7,0, andere Konzentrationen 1M)

⁹ *tof* = turnover frequency = $\frac{(\text{mol Produkt})}{(\text{mol Kofaktor}) \cdot (\text{Zeit})}$; *ttn* = total turnover number = $\frac{(\text{mol Produkt})}{(\text{mol Kofaktor})}$

¹⁰ siehe auch Potentialdifferenz, Kapitel A.1.1, Seite 168 f.

¹¹ siehe auch Kapitel A.1.1, Seite 168 ff.

5.2 Mediatoren

Als Mediatoren bezeichnet man Elektronentransferkatalysatoren oder allgemeiner Vermittler von Reduktionsäquivalenten wie Elektronen oder Hydride. Die in Tabelle 5.2.1 aufgeführten Redoxpaare werden als Elektronentransfer-Mediatoren bzw. Kofaktoren für die enzymatische, chemische und elektrochemische Kofaktorregenerierung eingesetzt.

Redoxpaar		Redoxpotential E_0' / V
H ₂ O O ₂ [104]		0,820
ABTS ²⁻ ABTS ^{•-} [105]	↑	0,682
Ferrocen Ferrocen ^{•+} [24, 32]		0,420
[Fe(CN) ₆] ⁴⁻ [Fe(CN) ₆] ³⁻ [104, 106]		0,360
[Ru(PD) ₃] _{red} [Ru(PD) ₃] _{ox} [35, 70]		0,242 (pH 8,0)
Dichlorphenolindophenol _{red} DCPIP _{ox} [95, 107]		0,217
Nitrofluorenonderivat _{red} NFD _{ox} [108-111]		0,18 (20 °C, pH 8)
Phenazinmethosulfat _{red} PMS _{ox} [112, 113]		0,08 (30 °C)
Phenazinethosulfat _{red} PES _{ox} [95]		0,055 (30 °C)
Methylen Blau _{red} Methylen Blau _{ox} [95, 114, 115]		0,011 (30 °C)
N-Methyl-1,10-phenanthrolin-5,6-dion _{red} PDMe _{ox} [35, 70, 86]		0,003
NH ₄ ⁺ /Glutamat 2-Oxoglutarat [95]		-0,121
Lactat Pyruvat [95, 99, 103]		-0,185
N-Methylphenazinium _{red} NMP _{ox} [116]		-0,160
Meldola Blau _{red} Meldola Blau _{ox} [116, 117]		-0,175
Flavinmononukleotid _{red} FMN _{ox} [91, 118]		-0,220
NADH NAD ⁺ [95, 99]		-0,320
NADPH NADP ⁺ [95, 99]		-0,324

Tabelle 5.2.1: Redoxpotentiale einiger ausgewählter Redoxpaare (wenn nicht anders angegeben T = 25°C, pH 7,0); Pfeil deutet zunehmende Oxidationskraft an.

Bei den Mediatoren handelt es sich zumeist um chinoide oder analoge Verbindungen mit aromatischem oder heteroaromatischem Grundgerüst, die sich von den natürlichen Kofaktoren wie PQQ oder FMN ableiten (Abbildung 5.2.1). Die natürlichen Elektronentransfervermittler, die Redoxäquivalente einer Zelle, wie PQQ [119] können auch als Mediatoren zur Kofaktorregenerierung eingesetzt werden.

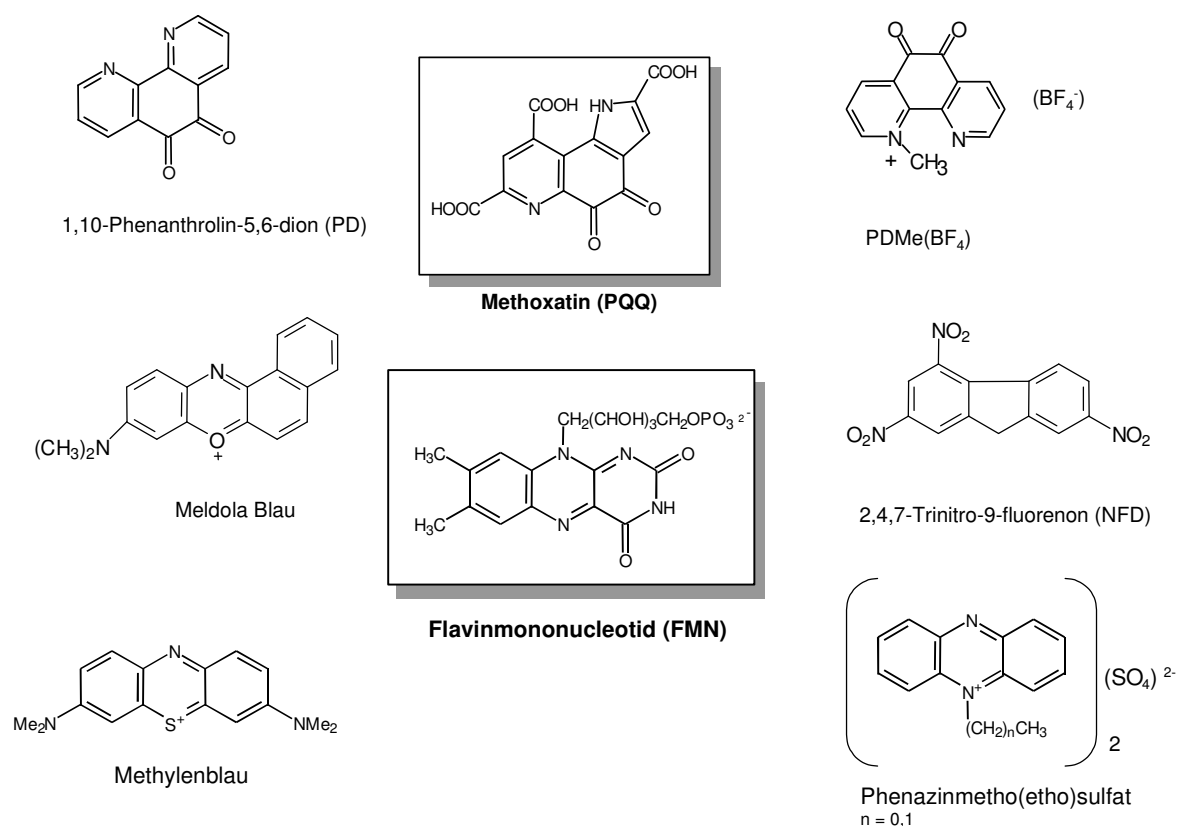


Abbildung 5.2.1: Elektronentransfer-Mediatoren für die Kofaktorregenerierung (natürliche Mediatoren grau unterlegt), NFD ist eine Vorläufer des aktiven Mediators

Bei der formalen Oxidation des Kofaktors NAD(P)H durch den Mediator handelt es sich um eine homogene chemische Reaktion, die sich in der Regel als Reaktion 2. Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{NAD(P)H}}$ beschreiben lässt.

Die Effektivität einiger Mediatoren für eine Oxidation von NADH ist in Abbildung 5.2.1 dargestellt. Generell gilt, je größer die Potentialdifferenz zwischen NAD(P)H und dem Oxidationsmittel (Tabelle 5.2.1, Seite 37), desto größer die Triebkraft der Reaktion, aber desto eher treten auch Nebenreaktionen auf. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass die Redoxpotentiale von Mediatoren, an deren Oxidation oder Reduktion in stöchiometrischen Mengen Protonen beteiligt sind, etwa bei chinoiden Systemen, sich analog wie bei NAD(P)H beschreiben mit dem pH-Wert verschieben.

Außerdem sind Zwei-Elektronen-Protonen-Überträger in der Regel in der Lage, NADH schneller zu oxidieren als Ein-Elektronen-Überträger. Ausgewählte Mediatoren werden in den Unterkapiteln näher vorgestellt.

Mediator in oxidiert Form	$k_{NADH} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
ABTS^{••} [120] siehe auch Kapitel 6, Seite 51	^a 6,4·10³
Ferrocen ^{•+} -Derivate (Fec) [121]	^b 0,62 – 90,1
[Os(4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin) ₂ PD] _{ox} ¹² [122]	1,9·10 ³
Dichlorphenolindophenol _{ox} (DCPIP) [95, 107]	1
NFD _{ox} [108-111]	5,2·10 ⁴
Phenazinmethosulfat _{ox} (PMS) [112, 113]	^c 3,8·10 ³
<i>p</i> -Methylaminophenol _{ox} (MAP)	1·10 ³
Methylen Blau _{ox} (MB) [95, 114, 115]	3,2
1,4-Naphthochinon (NQ) ¹³ [123]	^d 20
Meldola Blau _{ox} (MeIB) [116, 117]	2,7·10 ⁴
FMN _{ox} [91, 118]	0,3

Tabelle 5.2.2: Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion zweiter Ordnung zwischen Mediator und NADH k_{NADH} , wenn nicht anders angegeben gilt pH 7,0; 25°C; (^a pH 9,0, ^b pH 7,0; 30°C, ^c pH 7,4 (70 M⁻¹s⁻¹ [91]), ^d pH 8,5)

¹² E₀' = 0,242 V vs. NHE, pH 7,0, 25°C

¹³ E₀' = -0,01 V vs NHE, pH 8,5, 25°C

5.3 Enzymatische Kofaktoroxidation

Für die enzymatische Kofaktoroxidation können entweder Dehydrogenasen oder Oxidasen eingesetzt werden, wobei letztere in der Regel einen weiteren Elektronenakzeptor zur Sauerstoffreduktion und erstere ein Kosubstrat benötigen. Diese enzymatischen Methoden haben den Vorteil, kompatibel zu den meisten biochemischen Systemen zu sein, jedoch ist der Einsatz eines zusätzlichen Enzyms mit höheren Kosten verbunden [97]. Exemplarisch werden hier kurz für die Dehydrogenase-katalysierte Kofaktorregenerierung Glutamat- und Lactat-Dehydrogenase [87, 91, 95, 97, 99, 103, 124, 125] vorgestellt sowie FMN-Reduktase, Diaphorase und NADH-Oxidase für die Regeneration mit sauerstoffaktivierbaren Enzymen.

In Abbildung 5.3.1 ist die Regeneration von NAD^+ durch den Einsatz von Lactat-Dehydrogenase (*LDH*) als Beispiel einer Dehydrogenase-gekoppelten Kofaktorregenerierung dargestellt.

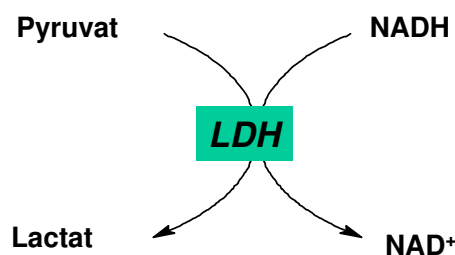


Abbildung 5.3.1: Schematische Darstellung der Dehydrogenase-katalysierten NAD^+ -Regenerierung am Beispiel der Lactat-Dehydrogenase (*LDH*)

5.3.1 Dehydrogenasen

Bei Verwendung von Glutamat-Dehydrogenase als Regenerationsenzym wird α -Ketoglutarat als Ammoniumsalz zur korrespondierenden Aminosäure Glutamat umgesetzt (Abbildung 5.3.2).

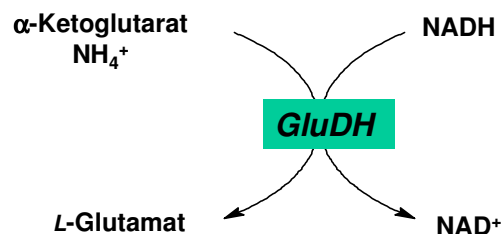


Abbildung 5.3.2: Schematische Darstellung der Glutamat-Dehydrogenase (*GluDH*) katalysierten Regeneration von NAD^+

Größter Nachteil dieser Methode ist die stöchiometrische Menge an Glutamat, die im Verlauf der reduktiven Aminierung gebildet wird und die die Produktabtrennung, bzw. die Aufarbeitung erschwert. Das gleiche Problem tritt bei der Verwendung von Lactat-Dehydrogenase als Regenerationsenzym auf. Dieses Enzym katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Lactat unter gleichzeitiger Oxidation von NADH (Abbildung 5.3.1). Hierbei tritt als weitere Komplikation die Inaktivierung des oxidierten Kofaktors auf, da Pyruvat den Nikotinamidring des Kofaktors nukleophil angreift (Abbildung 4.2.4) und damit die *tm* des Kofaktors verringert. Zusätzlich wird diese Reaktion durch die Lactat-Dehydrogenase katalysiert [100, 101]. Darüber hinaus ist die Potentialdifferenz und damit die Triebkraft der Regenerationsreaktion geringer, als bei Verwendung der Glutamat-Dehydrogenase katalysierten Kofaktoroxidation (Tabelle 5.2.1, Seite 37).

Nachteilig bei der Dehydrogenase-katalysierten Rezyklisierung von NAD(P)^+ ist im allgemeinen, dass die Gleichgewichtslage der meisten Dehydrogenase-katalysierten Reaktionen im alkalischen Bereich eher auf Seiten der Substratoxidation also der reduzierten Kofaktoren, im Sauren vornehmlich auf Seiten der Substratreduktion (oxidierte Kofaktoren) liegt. Die Reaktionsbedingungen für die Gesamtreaktion mit Oxidation des Substrats stellen daher immer einen Kompromiss dar, der meist für keines der Enzyme optimal ist..

5.3.2 Oxidasen

Obwohl NADH-Oxidase die Elektronen der NADH-Oxidation unter Bildung von Wasserstoffperoxid direkt auf Sauerstoff überträgt und somit weder Kosubstrate noch Mediatoren benötigt werden (Abbildung 5.3.3), wird diese Methode zur Regenerierung von NAD^+ fast ausschließlich im analytischen Bereich verwendet [124, 126-131].

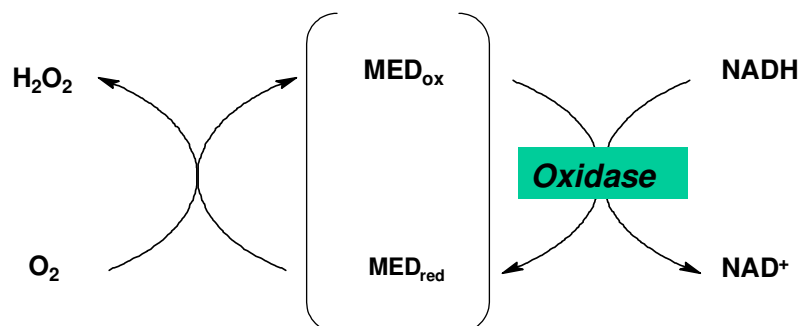


Abbildung 5.3.3: Enzymkatalysierte Oxidation von NADH mit Sauerstoff, NADH-Oxidase ohne MED

Hauptnachteil ist neben der Instabilität des Enzyms vor allem die Bildung von Wasserstoffperoxid, welches für eine präparative Anwendung durch Katalase entfernt werden muss, da es sich negativ auf die Stabilität der Enzyme und Kofaktoren auswirkt. Vorteilhaft ist die größere Potentialdifferenz zwischen NAD(P)H und Sauerstoff ($E_0'(\text{H}_2\text{O}_2 \mid \text{O}_2) = 0,295 \text{ V vs. NHE, pH 7,0, } 25^\circ\text{C}$) und damit die günstigere Gleichgewichtslage.

Flavinmononukleotid-Reduktase (FMN-Reduktase) [132] und Diaphorase [91, 119] benötigen einen Mediator, der den Elektronentransfer vom reduzierten Kofaktor auf Sauerstoff vermittelt. Nachteil der FMN-mediatisierten Oxidation ist die langsame Reaktionsgeschwindigkeit zwischen FMN und NADH ($k_{app} = 0,3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Tabelle 5.2.2,) und wie bei der NADH-Oxidase die Bildung von Wasserstoffperoxid. Zwar führt die Verwendung von Metylen Blau mit Diaphorase zu einer zehnfach schnelleren NADH Oxidation, aber darüber hinaus ist Diaphorase thermisch instabil [91]. Auch hier muss wiederum Wasserstoffperoxid mit Hilfe von Katalase entfernt werden. Wegen der geringen Oxidationsgeschwindigkeit müssen hohe Kofaktor- und Mediatorkonzentrationen gewählt werden, obwohl die Bildung des oxidierten Mediators enzymkatalysiert schnell erfolgt (10^6 - $10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [91, 123].

5.4 Chemische Kofaktoroxidation

Zwar kann NAD(P)H mit vielen chemischen Oxidationsmitteln wie etwa $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ zu NAD^+ oxidiert werden, jedoch stellt die stöchiometrische Verwendung von Oxidationsmitteln einen Nachteil bei der Aufarbeitung dar, was eine Anwendung in größerem Maßstab erschwert [91]. Darüber hinaus sind die meisten chemischen Oxidationsmittel mit biochemischen Systemen inkompatibel. Eine katalytische chemische Regeneration, wie sie in Abbildung 5.4.1 dargestellt ist, lässt sich mit Hilfe von Oxidationsmitteln bewerkstelligen, die sauerstoffaktivierbar sind [46]. Es werden dabei prinzipiell die gleichen Verbindungen eingesetzt, die auch die NAD(P)^+ Regeneration mittels Diaphorase bzw. FMN-Reduktase mediatisieren. Da hier wieder Sauerstoff in die Reaktionslösung eingetragen wird und Wasserstoffperoxid gebildet wird, stellt die Denaturierung des Enzyms durch Oxidation ein großes Problem dar.

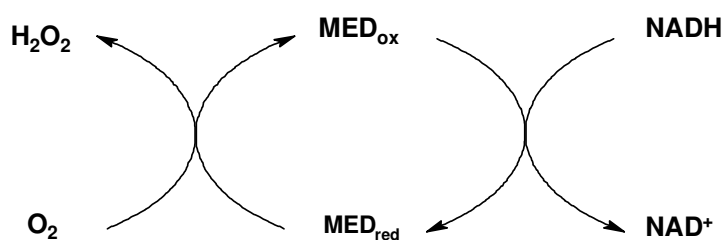


Abbildung 5.4.1: Chemische Kofaktoroxidation durch sauerstoffaktivierbare Mediatoren (MED)

Weiterhin bleibt die Oxidationsgeschwindigkeit von NADH gleich, jedoch ist die Bildung der aktiven Mediatorspezies unkatalysiert und damit langsamer, als in Gegenwart der Enzyme FMN-Reduktase oder Diaphorase. Damit müssen noch höhere Konzentrationen des Mediators eingesetzt werden, was für eine präparative Anwendung nicht sinnvoll ist. Vorteilhaft ist, dass auf weitere kostspielige Enzyme verzichtet werden kann. Einige Mediatoren wie Meldola Blau und PMS sind in der Lage, NADH schnell zu oxidieren (Tabelle 5.2.2, Seite 39, $k_{app} = 2,7 \cdot 10^4$ bzw. $3,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Beide sind jedoch instabil und eignen sich nicht für die Anwendung im größeren Maßstab. Gleiches gilt für die Phenanthrolindion (PD)-Derivate, die zwar in der Lage sind, eine hohe *tof* bezüglich des Mediators zu erreichen (900 h^{-1} [70]), jedoch im alkalischen Medium nicht langzeitstabil sind ($\tau_{1/2} \sim 12 \text{ h}$ [86]). Außerdem ist auch die Bildungsgeschwindigkeit der oxidierten Mediatorspezies durch Luftsauerstoff z.B. für PMS mit nur $180 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ im Vergleich zur NADH-Oxidation langsam und diese Reaktion damit geschwindigkeitslimitierend, vor allem für geringe Konzentrationen an Kofaktor und Mediator [113].

5.5 Elektrochemische Kofaktoroxidation

Ein besonders intensiv untersuchtes Gebiet der Kofaktorregenerierung stellt die elektrochemische Kofaktoroxidation dar. Einerseits ist die Oxidation von NADH und NADPH leichter zu bewerkstelligen als die Reduktion, da die Ansprüche an die Regioselektivität bei der Oxidation geringer sind, um einen biologisch aktiven oxidierten Kofaktor zu generieren, andererseits jedoch sind die meisten der beschriebenen Methoden auf den Einsatz für analytische Zwecke beschränkt [24, 33, 95, 97, 99, 116, 118, 133, 134].

5.5.1 Direkte elektrochemische Oxidation

Von den beschriebenen Möglichkeiten der oxidativen Kofaktorregenerierung, ist die in Abbildung 5.5.1 am Beispiel von NADH dargestellte direkte elektrochemische Oxidation von Nukleotidkofaktoren die zunächst interessanteste, da keine zusätzlichen Enzyme, Substrate oder Elektronentransfer-Reagenzien benötigt werden, und die thermodynamische Triebkraft vom angelegten Elektrodenpotential bestimmt wird [135, 136]. Die Elektrode stellt also ein direkt durchstimmbares Oxidationsmittel dar.¹⁴

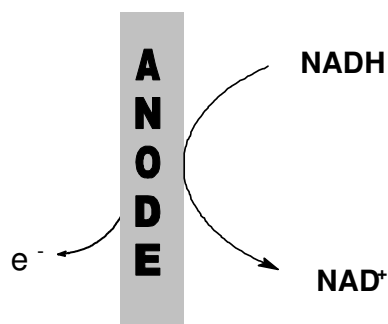


Abbildung 5.5.1: Direkte elektrochemische Kofaktoroxidação

Tatsächlich wurden auch enzymatische Synthesen in kleinem Maßstab durchgeführt, welche mit einer direkten elektrochemischen Kofaktorregenerierung gekoppelt wurden [135, 137, 138], jedoch lässt sich diese Methode bislang weder in größerem Maßstab [19] noch für analytische Zwecke einsetzen. Der Grund dafür ist die hohe Überspannung von fast 1 V [134], die angelegt werden muss, um zu einer effektiven Kofaktoroxidação, bzw. messbaren Geschwindigkeiten zu gelangen¹⁵. Infolge des positiven Potentials werden auch andere Substanzen wie Aldehyde, Phenole und Alkohole direkt anodisch oxidiert¹⁶. Damit steigt der Hintergrundstrom an und das Signal/Rausch-Verhältnis wird für analytische Zwecke ungünstig. Man versucht, diese Überspannung durch die Wahl eines geeigneten Anodenmaterials zu verringern, doch lassen sich solche Materialien in der Regel aus technischen oder Kostengründen nicht im größeren Maßstab einsetzen [136]. Für die präparative Anwendung wirkt sich zusätzlich die Passivierung der Elektroden negativ aus, die

¹⁴ siehe auch Kapitel A.5, Seite 179 ff.

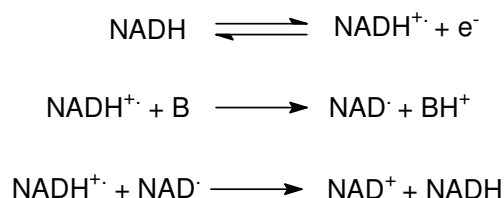
¹⁵ siehe auch Kapitel A.2.1, Seite 174 ff. und Kapitel A.6.3, Seite 185 ff.

¹⁶ siehe auch Tabelle 5.2.1, Seite 37

sich im Verlauf der elektrochemischen Kofaktoroxidation mit Nebenprodukten der unselektiven Oxidation von NADH (Überoxidaionsprodukten) belegen. Ein solches sogenanntes Elektroden-Fouling verringert nicht nur den Stromfluss sondern entzieht der Lösung NAD(P)^+ und vermindert die *tm* des Kofaktors [136]. Für die direkte Oxidation wird in der aktuellen Literatur vornehmlich eine Oxidation zum Radikalkation diskutiert, gefolgt von einer basenkatalysierten (B) Deprotonierung und einer Disproportionierung [139, 140] (Gleichung 5.5.1).

Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt. Derzeit versucht man, diesen anhand von Kofaktor-analogen Modellverbindungen zu ergründen [98, 139-142].

Gleichung 5.5.1



Die in Gleichung 5.5.1 beschriebenen Reaktionen spielen sich vermutlich in direkter Nähe zur Elektrode ab, weshalb bei der direkten Oxidation Überoxidaionsprodukte und Radikalfolgeprodukte vermehrt auftreten. Die Wahrscheinlichkeit solcher Reaktionen ist durch die höhere Konzentration von NAD(P) in allen Oxidationsstufen an der Elektrodenoberfläche im Vergleich zur Reaktionslösung erhöht¹⁷. Vielfach ist eine erfolgreiche „direkte“ NAD(P)H -Oxidation tatsächlich auf eine mediatierende Wirkung dieser Überoxidaionsprodukte zurückzuführen [136, 141, 143]. Die direkte Oxidation ist also bislang keine Methode für eine effektive Kofaktorregenerierung.

¹⁷ sie auch Kapitel A.3.1, Seite 175 ff.

5.5.2 Mediatisierte elektrochemische Kofaktoroxidation

Bei der indirekten elektrochemischen Kofaktoroxidation wird nicht der Kofaktor selbst, sondern ein Mediator (Med) an der Anode oxidiert (Abbildung 5.5.2). Dieser oxidiert homogen chemisch dann seinerseits NAD(P)H zu NAD(P)⁺. Der Mediator verringert die hohe Überspannung der direkten Oxidation.

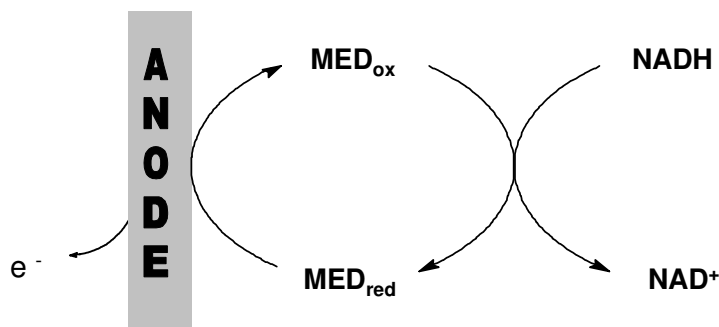


Abbildung 5.5.2: Indirekte elektrochemische Kofaktoroxidation

Generell unterscheidet man die Mediatoren (MED) in Ein- oder Zwei-Elektronen-Überträger, wobei letztere genauer als Zwei-Elektronen-Protonen-Überträger bezeichnet werden. Hinsichtlich der *tm* der Kofaktoren ist diese Methode generell besser als die direkte Oxidation, da durch die geringere Überspannung auch ein Verlust des Kofaktors durch Überoxidation geringer ist [33]. Der Mediator ist also besser als der Kofaktor für die heterogene Elektrodenreaktion geeignet.

Aufgrund ihrer Fähigkeit, die Überspannung der Kofaktoroxidation sehr stark zu verringern, werden vornehmlich Zwei-Elektronen-Protonen-Überträger des chinoiden oder Phenylendiamin-Typs¹⁸ wie kommerziell erhältliche Farbstoffe (z.B. Methylen Blau, Meldola Blau etc, siehe Normalpotentiale, Tabelle 5.2.1, Seite 37) verwendet [70, 115, 144-147].

Im Vergleich zur chemischen oder enzymatischen Kofaktorregenerierung ist hier von Vorteil, dass zur Oxidation des Mediators kein Sauerstoff benötigt wird und kein Wasserstoffperoxid gebildet wird. Die Dosierung des Oxidationsmittels kann leicht über geeignete Verhältnisse von Reaktorvolumen zu Anodenfläche, über die Stromdichte oder den Massentransport eingestellt werden.¹⁹

¹⁸ siehe Abbildung 5.2.1, Seite 38

¹⁹ siehe auch Kapitel A.9, Seite 193 ff. und Kapitel 9, Seite 85 ff.

Nachteilig ist auch in diesem Fall wieder die mangelnde Stabilität vieler Mediatoren und die teilweise geringe Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Mediator und reduziertem Kofaktor, wie sie auch bei der enzymatischen oder chemischen Kofaktorregenerierung bereits dargestellt wurde (Tabelle 5.2.2, Seite 39).

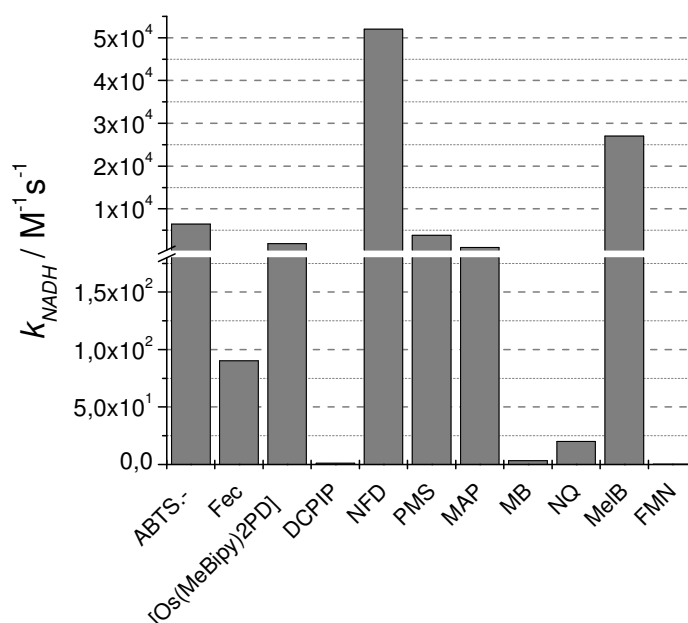


Abbildung 5.5.3: Vergleich der Geschwindigkeit der Oxidation von NADH, Abkürzungen siehe Tabelle 5.2.2, Seite 39

Die meisten elektrochemischen Methoden werden im analytischen Bereich angewendet. Dabei sind lösliche Mediatoren unerwünscht und müssen sogar immobilisiert werden [112, 134, 148, 149]. Tatsächlich sind viele Mediatoren schwerlöslich oder adsorbieren an der Elektrodenoberfläche, was aber für präparative Anwendungen ein Hindernis darstellt. Dies gilt leider gerade für die schnelleren Mediatoren wie etwa Phenanthrolindion oder auch Meldola Blau [70, 122]. Weiterhin ist bei den Zwei-Elektronen-Protonenüberträgern die bereits erwähnte pH-Abhängigkeit des Redoxpotential problematisch, da somit für eine hinreichende Kofaktoroxidation immer gewährleistet werden muss, dass der pH-Wert während der enzymatischen Umsetzung konstant bleibt. Die interessanteste Neuentdeckung der letzten Jahre stellt ein Nitroso/Hydroxylamin-Mediator dar, der *in situ* aus einem 2-Nitro-9-fluorenol durch elektrochemische Reduktion gewonnen wird [108-111] (siehe auch Abbildung 5.5.3 und Tabelle 5.2.2, Seite 39). Dieser Mediator ist in der Lage, NADH mit einer Geschwindigkeit von $5,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ zu oxidieren. Damit ist er der bislang schnellste bekannte Mediator zur Regenerierung von Nukleotid-Kofaktoren, wird aber aufgrund seiner

Schwerlöslichkeit bisher nur für analytische Zwecke eingesetzt. Eine Derivatisierung sollte zu löslichen Mediatoren führen.

Die elektrochemische Kofaktorregenerierung mit Einelektronen-Überträgern wie etwa Ferrocenderivaten (Fec Abbildung 5.5.3) ist aufgrund des hohen Redoxpotentials der Mediatoren zwar thermodynamisch begünstigt, jedoch ist die Geschwindigkeit der Kofaktoroxidation nicht schneller als bei den Zwei-Elektronen-Protonen-Überträgern, die aber aufgrund der niedrigeren Redoxpotentiale zu weniger Nebenreaktionen führen [121, 145]. Des weiteren kann bei Potentialen ab ca. 400 mV vs. NHE bereits direkte anodische Kofaktoroxidation auftreten, was mit den o.g. Nachteilen behaftet ist [136]. Vorteil der Einelektronen-Überträger ist jedoch, dass sie in Gegenwart von Sauerstoff kein Wasserstoffperoxid produzieren und daher in der Regel nicht auf sauerstofffreie Bedingungen geachtet werden muss. Außerdem sind sie stabiler als die Zweielektronen-Protonen-Überträger, auch unter basischen Bedingungen [145].

5.6 Zusammenfassung

Methode	Vorteile	Nachteile
Glutamat-Dehydrogenase/ α -Ketoglutarat/ NH_4^+	kompatibel mit enzymatischen Umsetzungen, selektiv	stöchiometrische Mengen an Nebenprodukt, weitere Enzymkosten, geringe thermodynamische Triebkraft
Lactat-Dehydrogenase /Pyruvat	kompatibel mit enzymatischen Umsetzungen, selektiv	stöchiometrische Mengen an Nebenprodukt, weitere Enzymkosten, Nebenreaktion
FMN-Reduktase/Med/ O_2	kompatibel mit den meisten enzymatischen Umsetzungen, variable thermodynamische Triebkraft	nicht kompatibel mit sauerstoffempfindlichen Enzymen, zu langsam; Produktion von Wasserstoffperoxid; instabile Med,
Diaphorase/Med/ O_2	kompatibel mit den meisten enzymatischen Umsetzungen, variable thermodynamische Triebkraft	nicht kompatibel mit sauerstoffempfindlichen Enzymen, zu langsam; Produktion von Wasserstoffperoxid; instabile Med, instabiles Enzym
Med/ O_2	keine Enzyme oder Kosubstrate, variable thermodynamische Triebkraft	meistens zu langsam, Produktion von Wasserstoff-Peroxid; instabile Med,
anodische Oxidation	keine Enzyme oder Kosubstrate, Durchstimbarkeit der thermodyn. Triebkraft	Elektrodenfouling, hohe Überspannung, Überoxidation,
mediatisierte anodische Oxidation mit Zwei-Elektronen-Protonen-Überträgern	kompatibel mit den meisten enzymatischen Umsetzungen, meistens schnell; variable thermodynamische Triebkraft	instabile Med, bildet meist Wasserstoffperoxid in Gegenwart von O_2
mediatisierte anodische Oxidation mit Ein-Elektronen-Überträgern	große thermodynamische Triebkraft, stabile Med, kein Wasserstoffperoxid	hohes Redoxpotential, Nebenreaktionen, (direkte Oxidation)

Tabelle 5.6.1: Vergleich der Regenerierungsmethoden

Aus Tabelle 5.6.1 kann man ableiten, dass es bislang keine wirklich „ideale“ Methode zur Oxidation von Nukleotidkofaktoren gibt. Bei der Wahl einer geeigneten Methode müssen jeweils Vorteile und Nachteile gegeneinander aufgewogen werden. Eine effektive Kofaktorregenerierung für eine präparative Umsetzung benötigt ein Oxidationsmittel, das

- NAD(P)H schnell oxidiert ($k_{\text{NAD(P)H}} = 10^3\text{-}10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).
- ein Redoxpotential besitzt, welches eine genügend große thermodynamische Triebkraft der Oxidationsreaktion gewährleistet, aber gering genug ist, um eine hinreichende Selektivität zu garantieren.
- stabil unter den Reaktionsbedingungen ist.
- ausreichend schnell und in beliebiger Menge in die oxidierte Form überführt werden kann.
- kommerziell und in größeren Mengen verfügbar und preiswert ist.

6 Exkurs: Cyclovoltammetrie

Im folgenden Kapitel werden in Grundzügen die Grundlagen und die wichtigsten Mechanismen der Cyclovoltammetrie zusammengefasst, da sie für die Diskussion der im darauffolgenden Kapitel untersuchten elektrochemischen Kofaktorregenerierung benötigt werden. Alle hier in Kürze erwähnten Mechanismen sowie die Interpretation von Cyclovoltammogrammen werden ausführlich im Anhang B, Seite 201 ff. erläutert.

6.1 Einleitung

Unter den elektroanalytischen Meßmethoden nimmt die Voltammetrie²⁰ und insbesondere die Cyclovoltammetrie einen wichtigen Platz ein und hat die Polarographie nahezu verdrängt [106, 150-155]. Mit Hilfe der Cyclovoltammetrie ist es möglich, thermodynamische und kinetische Parameter von heterogenen Elektronentransferreaktionen zu messen, und darüber hinaus kann man auch vorgelagerte oder angeschlossene homogen-chemische Reaktionen untersuchen. Dabei hat sich gezeigt, dass es sogar möglich ist, katalytische Reaktionen wie etwa enzymatische Umsetzungen mit Hilfe der Cyclovoltammetrie zu beobachten und die Geschwindigkeitskonstanten zu ermitteln [156-158]. Cyclovoltametrische Messungen liefern des weiteren Aufschluss über z.B. die Stabilität von Oxidationsstufen [159-161] oder gewähren einen Einblick in Reaktionsmechanismen [139, 162-164]. Auch Adsorptionsphänomene [109, 165, 166] oder elektrochemische Abscheidungsprozesse [167, 168] können so untersucht werden. Als dynamische elektroanalytische Methode liegt der Schwerpunkt auf der Ermittlung kinetischer Daten. Dazu hat insbesondere in den letzten Jahren die Möglichkeit der digitalen Simulation von Cyclovoltammogrammen beigetragen [106, 161, 169-177].

Im Verlauf der letzten drei Jahrzehnte haben sich aus der Voltammetrie bzw. Cyclovoltammetrie eine Fülle weiterer Disziplinen entwickelt, die in diesem Rahmen nicht ausführlich dargestellt werden [178-186].

²⁰ leitet sich von *Volt-Amperometrie* ab

6.2 Grundlagen der Cyclovoltammetrie

Für ein cyclovoltammetrisches Experiment benötigt man eine sog. Drei-Elektrodenanordnung, bestehend aus einer Arbeitselektrode (AE) definierter Oberfläche, einer Gegenelektrode (G), (meist Pt-Draht) und einer Bezugsselektrode (R).²¹ Da man unter diffusiven Bedingungen²² arbeitet, tauchen die Elektroden in einen ruhenden Elektrolyten ein (Abbildung 6.2.1). Dieser Elektrolyt sollte zur Sicherung der Grundleitfähigkeit und vor allem zur Unterdrückung von Migrationseffekten²³ eine ausreichende Leitsalz- oder Pufferkonzentration ($\sim 0,05 - 0,1 \text{ M}$) aufweisen.

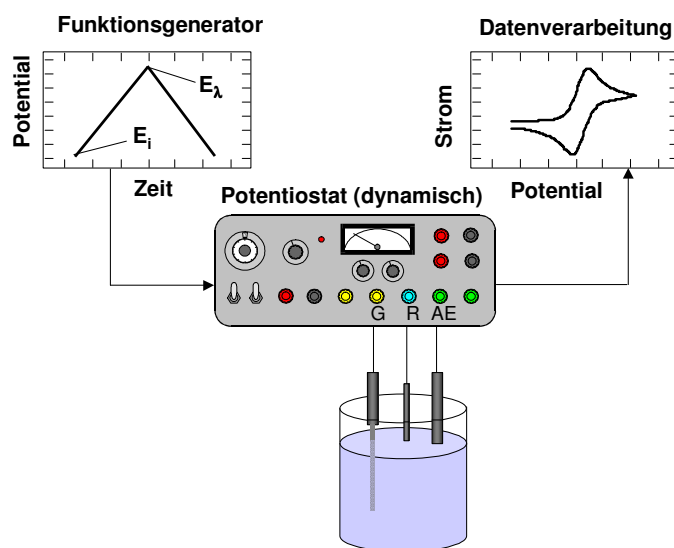


Abbildung 6.2.1: Apparativer Aufbau für cyclovoltammetrische Messungen

An die Arbeitselektrode wird ausgehend von einem Anfangspotential E_i ein sich zeitlich linear änderndes Potential $E(t)$ angelegt, das nach Erreichen des Umkehrpotentials E_λ mit gleicher Vorschubgeschwindigkeit zum Ausgangspotential zurückgeführt wird (Abbildung 6.2.2). Die Vorschubgeschwindigkeit, also die Geschwindigkeit, mit der das Potential geändert wird, variiert, von ca. 1 mV s^{-1} bis zu mehreren 10 kV s^{-1} . Der untere Bereich ist durch den zunehmenden Einfluss der natürlichen Konvektion limitiert, der obere Bereich ist abhängig von den apparativen Möglichkeiten. Für einfache kinetische Untersuchungen wird meist der Bereich von $2 - 400 \text{ mV s}^{-1}$ verwendet.

Der in Abbildung 6.2.1 gezeigte Aufbau einer cyclovoltammetrischen Messung umfasst neben der elektrochemischen Zelle und einem ansteuerbaren Potentiostaten auch einen

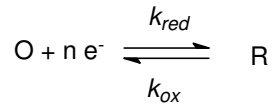
²¹ s. a. Kapitel A.2, Seite 171 ff. und A.3, Seite 175 ff.

²² s. a. Kapitel A.10, Seite 195 ff.

²³ s. a. Kapitel A.12, Seite 198 ff.

Funktionsgenerator. Dieser gibt die Dreiecksspannung der zeitlichen Potentialänderung der Arbeitselektrode vor.

Für ein Redoxpaar O und R einer Ein-Elektronentransferreaktion ($n = 1$, Gleichung A.2.2)



erhält man im reversiblen Fall²⁴ ein Cyclovoltammogramm wie in Abbildung 6.2.2 dargestellt.

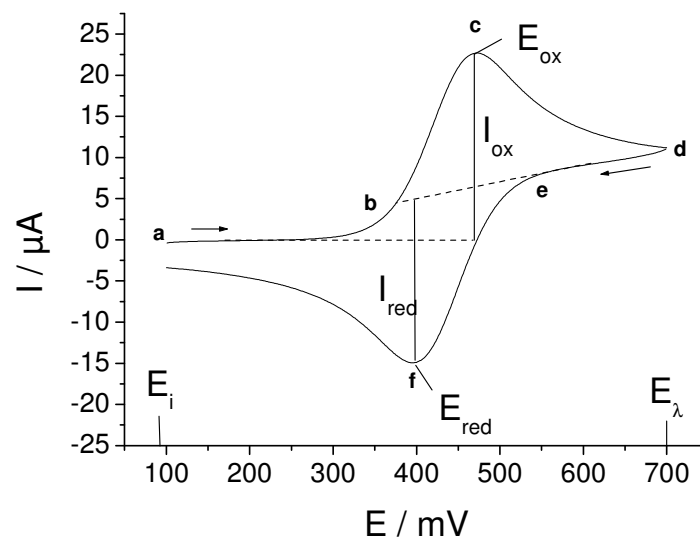


Abbildung 6.2.2: Allgemeiner Aufbau eines Cyclovoltammogramms

Ausgehend von einem Startpotential E_i (a) wird das angelegte Potential in positiver Richtung mit der Vorschubgeschwindigkeit v geändert. Wenn das Potential zur Oxidation von R ausreichend ist, steigt der Strom an (b), bis am anodischen Peakmaximum E_{ox} die Konzentration an R an der Elektrodenoberfläche durch die Oxidation deutlich abnimmt (c). Hierbei resultiert der über die *Nernst-Gleichung*²⁵ gegebene logarithmische Zusammenhang von Potential und Konzentrationsänderung in einem starken Stromanstieg. Der Strom fällt mit der sinkenden Konzentration an R wieder ab (c→d), da auch die die Elektrode umgebende Lösung an R verarmt. Bei Erreichen von E_λ (d) kehrt sich die Polarisierung der Arbeitselektrode um. Sowie ein ausreichend negatives Potential erreicht wird, wird die

²⁴ s. a. Kapitel A.6.3, Gleichung A.6.35, Seite 188

²⁵ s. a. Kapitel A.1.1, Gleichung A.1.2, Seite 169

Elektrode zum Reduktionsmittel, und O wird zu R reduziert (e). Der Strom steigt schließlich mit zunehmender Reduktionskraft der Elektrode (negativeres Potential) bis zum kathodischen Peakmaximum E_{red} an (f), bis schließlich die Konzentration an O wieder abnimmt. Dies erfolgt wiederum gemäß dem logarithmischen Zusammenhang. Im weiteren ist der Verlauf analog, bis wieder das Ausgangspotential erreicht wird. Für einen reversiblen Ein-Elektronentransfer ergibt sich so die charakteristische „Entenform“ des Cyclovoltammogramms.

Die charakteristischen Größen eines CVs sind zum einen die Peakpotentiale E_{ox} und E_{red} und zum anderen der zugehörige Strom der Potentialpeaks I_{ox} und I_{red} . Sie geben Aufschluss über die Art des heterogenen Elektronentransfers und gleichzeitig weisen sie auf angeschlossene oder vorgelagerte chemische Reaktionen hin.

6.3 Mechanismen

Im folgenden werden lediglich die für die elektrochemische Kofaktoroxidation relevanten Mechanismen diskutiert.²⁶

Die mediatisierte Kofaktoroxidation kann in zwei Teilschritte A und B unterteilt werden (Abbildung 6.3.1).

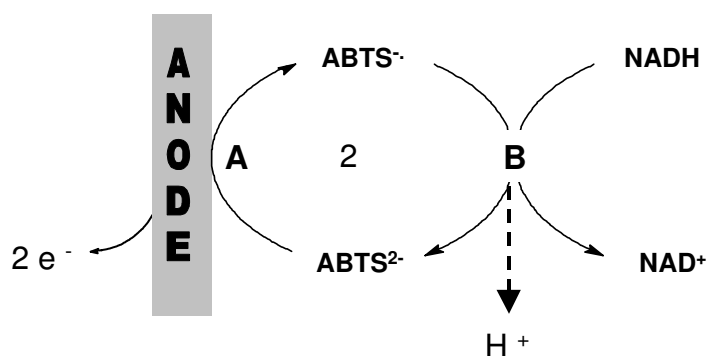


Abbildung 6.3.1: Mediatisierte Kofaktoroxidation

²⁶ Die Mechanismen sind ausführlich und mit Beispiel- Cyclovoltammogrammen im Anhang B, Kapitel B.1, Seite 201 ff. und Kapitel B.2, S.212 ff., dokumentiert.

A ist der heterogene Elektronentransfer, die Elektrodenreaktion z.B. die anodische Oxidation von ABTS^{2-} zum Radikalkation $\text{ABTS}^{\bullet+}$. B ist dann eine homogen-chemische Folgereaktion zwischen dem Radikalkation und der reduzierten Kofaktorspezies (hier NADH).

6.3.1 Heterogener Elektronentransfer (A)

Der Strom eines CVs wird bestimmt durch den heterogenen Ladungstransfer und den Massentransport (Abbildung 6.3.2, c). Man unterscheidet zwei Grenzfälle, nämlich einmal einen durch Massentransport limitierten Strom im sog. reversiblen Fall (Abbildung 6.3.2, a) und einmal die Limitierung des Stroms durch die Geschwindigkeit des Elektronentransfers im sog. irreversiblen Fall (Abbildung 6.3.2, c).

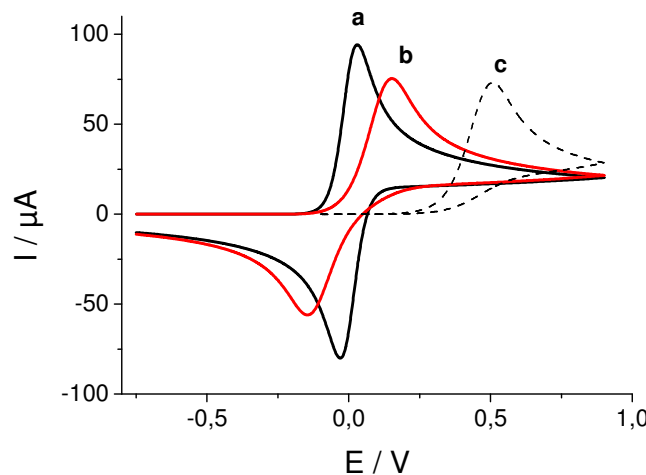


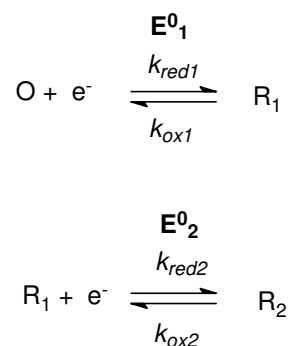
Abbildung 6.3.2: Mit DigiSim simulierte Cyclovoltammogramme; a) reversibel $k_s = 0,1 \text{ cm s}^{-1}$, b) quasi-reversibel $k_s = 5 \cdot 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$, c) irreversibel $k_s = 5 \cdot 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$; Randbedingungen: Elektrodenfläche $A = 0,07068 \text{ cm}^2$, $\alpha = 0,5$, $E^{0'} = 0 \text{ V}$, $D(\text{O}, \text{R}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $T = 298,2 \text{ K}$, $[\text{R}] = 5 \text{ mM}$, Vorschubgeschwindigkeit $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$

Die Reversibilität eines Redoxsystems ist abhängig von der Vorschubgeschwindigkeit, also der Geschwindigkeit der Umpolung der Arbeitselektrode. Da für die Reversibilität das Verhältnis der Geschwindigkeit des Massentransports zur Elektronentransferrgeschwindigkeit ausschlaggebend ist, ist es möglich, über eine Änderung der Vorschubgeschwindigkeit und damit einer Änderung des Massentransports, ein reversibles in ein irreversibles System und umgekehrt zu überführen. Dies gelingt deshalb, weil für die Symmetrie der Strom-Spannungskurve das Verhältnis von heterogenem Ladungstransfer zu Massentransport bestimmend ist, das man durch die Änderung der Vorschubgeschwindigkeit beeinflussen kann.

6.3.1.1 Mehrstufige Redoxsysteme

Bei vielen Redoxreaktionen werden formal zwei Elektronen übertragen (z.B. bei der Oxidation von NADH oder der vollständigen Oxidation von ABTS^{2-} zum Dikation ABTS, siehe auch Kapitel 7.2, Seite 63). Tatsächlich kommen konzertierte Zwei-Elektronen-Übertragungen aber aufgrund der hohen Aktivierungsenergie nur sehr selten vor [187]. Wie in Gleichung 6.3.1 dargestellt, findet der Elektronentransfer in zwei getrennten Elementarschritten statt und wird als *EE*-Mechanismus bezeichnet

Gleichung 6.3.1



Bei großer Differenz der Normalpotentiale ($\Delta E^0 > 150 \text{ mV}$) zwischen beiden Elektronentransferschritten erhält man zwei sich überlagernde Transferprozesse (Abbildung 6.3.3), wie es auch für das ABTS-System der Fall ist.

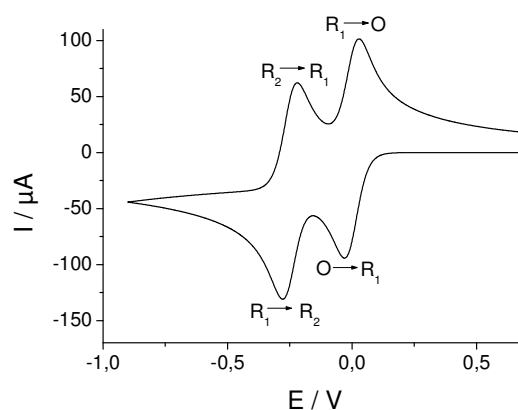
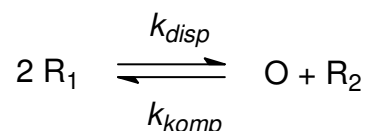


Abbildung 6.3.3. Simuliertes CV einer Zwei-Elektronentransferreaktion, EE_{Disp} -Mechanismus, $E^0_1 = 0 \text{ V}$, $E^0_2 = -0,25 \text{ V}$, $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$, $k_s = 1 \cdot 10^{-1} \text{ cm s}^{-1}$, $A = 0,07068 \text{ cm}^2$, $\alpha = 0,5$, $D(\text{O}, \text{R}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $T = 298,2 \text{ K}$, $[\text{O}] = 5 \text{ mM}$

Tatsächlich findet neben den zwei Elektrodenprozessen eine schnelle homogene Elektronentransferreaktion statt, die eine Disproportionierung oder Komproportionierung darstellt (Gleichung 6.3.2).

Daher ist jeder *EE*-Mechanismus prinzipiell ein *EE_{Disp}*-Mechanismus [150, 188].

Gleichung 6.3.2



6.3.2 Homogen-chemische Reaktionen (B)

Cyclovoltammetrische Untersuchungen eignen sich besonders zur Untersuchung von dem Elektronentransferschritt vorgelagerten oder angeschlossenen Reaktionen.

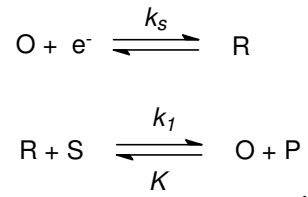
Diese Reaktionen führen zu charakteristischen Veränderungen der Form des Cyclovoltammogramms. Diese lassen sich für die Ermittlung der homogen-chemischen Geschwindigkeitskonstanten quantifizieren. Solche homogen-chemischen Reaktionen bezeichnet man als *C*-Mechanismen. Mit den in Kapitel B, Seite 201ff. beschriebenen *E*-Mechanismen kombiniert, ergibt sich eine sehr große Anzahl möglicher Mechanismen, die um so größer wird, je mehr Reaktionspartner teilnehmen [189, 190]. Im Folgenden sei der für diese Arbeit besonders wichtige katalytische *EC'*-Mechanismus dargestellt.²⁷

²⁷ Weitere Mechanismen sind im Anhang beschrieben, Kapitel B.2, 212 ff.

6.3.2.1 Katalytischer EC'-Mechanismus

Betrachten wir die Elektronentransferreaktion, bei der O zur R reduziert wird, so bezeichnet man eine Reaktion als katalytischen EC'-Mechanismus, bei der das elektrochemisch gebildete Produkt R in einer homogen-chemischen Reaktion zum Edukt O zurückgeführt wird.

Gleichung 6.3.3



P und S bezeichnen hier nicht elektrochemisch aktive Substanzen. P reagiert mit der elektrochemisch gebildeten Spezies unter Bildung von S.

Die Geschwindigkeitskonstante k_1 ergibt sich nach *Nicholson* und *Shain* [189] aus den Peakstromverhältnissen des Cyclovoltammogramms in Abhängigkeit von der Vorschubgeschwindigkeit v und der Konzentrationen an S. Bei einem katalytischen Mechanismus nimmt der Strom mit abnehmender Vorschubgeschwindigkeit entgegen der *Randles-Sevcik*-Gleichung²⁸ für einen reversiblen Elektronentransfer zu, da mit abnehmendem v die chemische Reaktion mehr Zeit hat, O nachzuliefern (Abbildung 6.3.4).

Die $\frac{|I_{red}|}{\sqrt{v}}$ Werte steigen mit der sinkender Vorschubgeschwindigkeit und die Peakform ist immer schwächer ausgeprägt.

²⁸ siehe auch Kapitel B.1.1, Seite 202 ff.

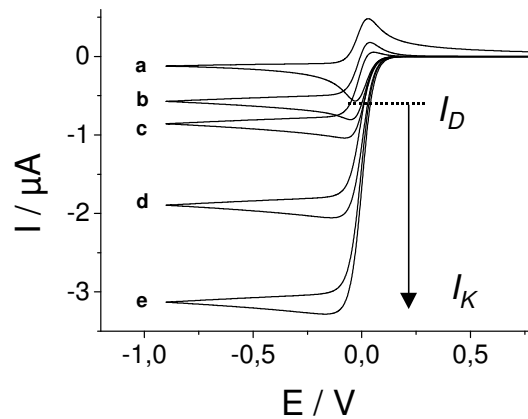


Abbildung 6.3.4: Simulierte Cyclovoltammogramme für den EC' -Mechanismus; Randbedingungen Simulation: $\nu = 0,036 \text{ V s}^{-1}$, $k_s = 0,1 \text{ cm s}^{-1}$, $A = 0,07068 \text{ cm}^2$, $\alpha = 0,5$, $E^0 = 0 \text{ mV}$, $D(\text{O}, \text{R}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $T = 298,2 \text{ K}$, $[\text{O}] = 50 \mu\text{M}$, $K = 10000$, $k_f = 2000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $S [\text{mM}]$: a) 0, b) 0,25, c) 0,5, d) 2, e) 5; I_K bezeichnet den Strom in Gegenwart von S, I_D den Strom ohne S.

Für langsame Vorschubgeschwindigkeiten wird die heterogene Bildung von R geschwindigkeitsbestimmend und R reagiert in der Folgereaktion immer mehr ab. Bei der Umpolung ist dann an der Elektrode kein R für die Oxidation vorhanden. Dies führt zu einer Erhöhung des Reduktionsstroms und zu einer Erniedrigung des Oxidationsstroms. Dies bezeichnet man auch als katalytischen Effekt und den entsprechenden Strom als katalytischen Strom I_k . Im Grenzfall ist die heterogene Bildung von R geschwindigkeitsbestimmend, so dass alles R, das gebildet wird sofort chemisch weiterreagiert und kein Oxidationsstrom mehr fließt, während mehr O reduziert werden muss. Dann weist die Strom-Spannungskurve des CVs einen sigmoidalen Verlauf auf (Abbildung 6.3.5 unten), mit einem sog. Plateaustrom I_{PL} , der unabhängig von der Vorschubgeschwindigkeit ist. Dies ist ein charakteristisches Merkmal einer besonders effektiven katalytischen Reaktion.

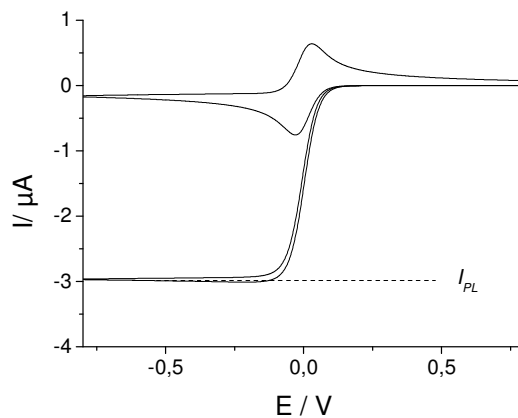


Abbildung 6.3.5: Simulierte Cyclovoltammogramme für EC' -Mechanismus mit sigmoidalem Kurvenverlauf; Randbedingungen Simulation: $\nu = 0,064 \text{ V s}^{-1}$, $k_s = 0,1 \text{ cm s}^{-1}$, $A = 0,07068 \text{ cm}^2$, $\alpha = 0,5$, $E^0 = 0 \text{ mV}$, $D(\text{O}, \text{R}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $T = 298,2 \text{ K}$, $K = 10000$, $k_t = 800 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $[\text{O}] = 50 \text{ μM}$, unten zusätzlich $[\text{S}] = 10 \text{ mM}$

6.4 CV – Was man beachten sollte

- Die Cyclovoltammetrie erlaubt die Abschätzung kinetischer und thermodynamischer Konstanten (Redoxpotentiale und damit Gleichgewichtskonstanten, k_s , D , α) und gibt einen Einblick in den Reaktionsmechanismus.
- Durch Arbeitskurven und Untersuchungen bei verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten und Konzentrationsverhältnissen können auch die kinetischen Daten angeschlossener oder vorgelagerter Reaktionen ermittelt werden. Dabei können bis zu zwei katalytische Folgereaktionen untersucht werden, wie etwa eine enzymatische Umsetzung mit indirekter elektrochemischer Kofaktorregenerierung [157, 191-193].
- Eine mittlerweile weit verbreitete Methode zur exakteren Bestimmung der kinetischen Konstanten aus den gemessenen Cyclovoltammogrammen und auch für mechanistische Untersuchungen stellt die digitale Simulation dar, die die Anpassung der kinetischen Konstanten des Modells an die Messwerte ermöglicht [106, 161, 169-177].
- Die digitale Simulation ist eine Methode zur Bestimmung der kinetischen Konstanten aus Cyclovoltammogrammen.

aber:

- Die Reaktionsbedingungen beeinflussen das CV. Direkt vergleichen kann man daher nur Cyclovoltammogramme die unter gleichen Reaktionsbedingungen aufgenommen wurden.
- Um kinetische Konstanten zu bestimmen, muss man ein Modell verwenden, d.h., es müssen Kenntnisse über den Mechanismus oder die Reaktionsordnung vorliegen. Umgekehrt können mechanistische Untersuchungen nur dann gemacht werden, wenn schon thermodynamische und kinetische Parameter bekannt sind.
- Bei mehrstufigen Redoxsystemen kann eine ungenügende Peakseparation zu Fehlinterpretationen führen, da eine Verdopplung des Peakstroms allein kein hinreichendes Indiz ist und auch nicht immer auftreten muss [175].
- Eine vorgelagerte oder angeschlossene Reaktion kann im CV zur Fehlinterpretation führen, wenn sie nicht als solche erkannt wird.

7 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat)

7.1 Einleitung

2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat) (Abbildung 7.1.1, ABTS^{2-}) wurde erstmals in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts von *Hünig* et al. synthetisiert und untersucht [194, 195].

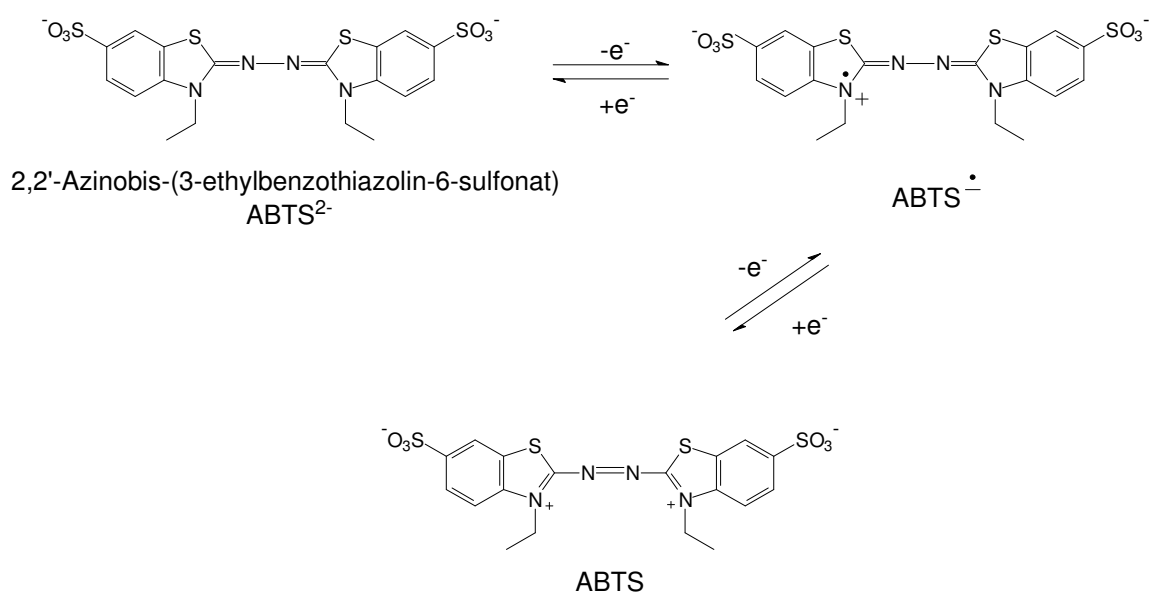


Abbildung 7.1.1: Redoxstufen von ABTS

Wie in Abbildung 7.1.1 gezeigt, ist 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat) ein zweistufiges Redoxsystem. In einem ersten Oxidationsschritt entsteht $\text{ABTS}^{\bullet-}$. Trotz seiner anionischen Gesamtladung, die vollständig an den Sulfonsäuregruppen lokalisiert ist, handelt es sich um ein Radikalkation. Der Stickstoff ist elektronendefizient und das Radikalkation somit elektrophil. In einem weiteren Schritt wird das Radikalkation dann zum Dikation ABTS oxidiert, welches in der Gesamtladung neutral ist.

7.2 Anwendungsgebiete

Insbesondere das Radikalkation wurde häufig eingesetzt, um etwa in der Lebensmittelanalytik oder zu medizinischen Zwecken den Gehalt an Antioxidantien zu bestimmen [196-199].

Eine weiteres Anwendungsgebiet von $\text{ABTS}^{\bullet-}$ ist die Verwendung als Mediator für Laccasen. In solchen Laccase-Mediator-Systemen (LMS) wird $\text{ABTS}^{\bullet-}$ Laccase-katalysiert durch Sauerstoff oxidiert (Abbildung 7.2.1).

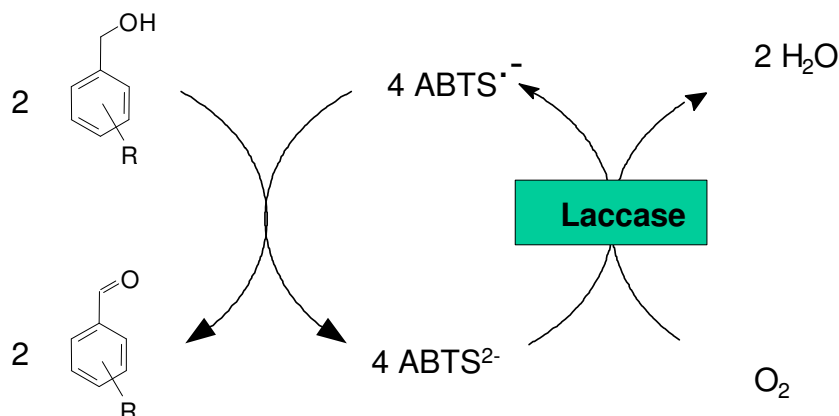


Abbildung 7.2.1 Laccase-Mediator-System (LMS)- katalysierte Oxidation benzyliker Alkohole

Das Radikalkation $\text{ABTS}^{\bullet-}$ wird dabei das eigentliche Oxidationsmittel. Es ist in der Lage, benzyliche Alkohole (Abbildung 7.2.1) [200-202] und allyliche Alkohole [203] zu den entsprechenden Carbonylverbindungen zu oxidieren. Ebenfalls werden Phenole oxidiert, die dann Kupplungsreaktionen eingehen [200, 204]. Alkylaromaten können in der Seitenkette zu Alkoholen und weiter zu Aldehyden oxidiert werden [205].

Für die enzymatische Oxidation von ABTS^{2-} zum Radikalkation werden vor allem Laccasen (EC 1.10.3.2) aus ligninabbauenden Baum-Pilzen (*Trametes versicolor* [206], *Trametes hirsuta* [203], *Pycnoporus cinnabarius* [204], *Pycnoporus coccineus* [207] oder *Coriolus versicolor* [200]) eingesetzt. Diese Enzyme sind Kupfer-Glycoproteine und von besonderem Interesse für die Zellstoffindustrie, da sie in der Lage sind, Lignin oxidativ abzubauen. Die oxidierende Wirkung in Verbindung mit Laccasen nutzt man auch zur Behandlung von Abwasser [206, 208-210]. Neben Laccasen werden auch verschiedene Peroxidasen und Oxidasen mit ABTS^{2-} als Mediator eingesetzt, die ebenfalls in der Lage sind, ABTS^{2-} mit Sauerstoff zu oxidieren, um damit das eigentliche Oxidans $\text{ABTS}^{\bullet-}$ zu erzeugen [211-213]. Die für ein Radikal besondere Stabilität über einen weiten pH- und Temperaturbereich nutzt

man in der Waschmittelindustrie in Verbindung mit Oxidasen und Peroxidasen zur Bleiche und Fleckentfernung [214, 215].

Die Fähigkeit der Laccasen und auch von Oxidasen, unter Verbrauch von Sauerstoff das ABTS-Radikalkation zu bilden, macht man sich auch beim Einsatz in Brennstoffzellen zunutze.

In Brennstoffzellen nutzt man freiwillig ablaufende elektrochemische Reaktionen aus, um aus einem Teil der Reaktionsenthalpie elektrische Energie zu gewinnen [216]. Eine besonders energiereiche Reaktion, die sich zur Nutzung in der Brennstoffzelle anbietet, ist die Knallgasreaktion unter Bildung von Wasser ($2 \text{ H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ H}_2\text{O}$). Diese Reaktion ist frei von Nebenprodukten und beide Edukte stehen in ausreichendem Maße zur Verfügung. Die im Anodenraum ablaufende Wasserstoffoxidation ist vielfach untersucht und wird auch in den bisher benutzten Brennstoffzellen eingesetzt. Problematisch ist die Reduktion des Sauerstoffs, da die Überspannung für die direkte Reduktion aufgrund kinetischer Effekte sehr hoch ist²⁹ [217-219]. Als elektrokatalytische Mediatoren zur Sauerstoffreduktion werden Metallkomplexe [220, 221] oder Redoxenzyme [222-227] eingesetzt.

In zwei Fällen wurde die enzymkatalysierte Übertragung der Elektronen von ABTS^{2-} auf Sauerstoff und die anschließende kathodische Entladung des Radikalkations zum Einsatz in einer Brennstoffzelle genutzt [226, 227] (mit Laccase, Abbildung 7.2.2).

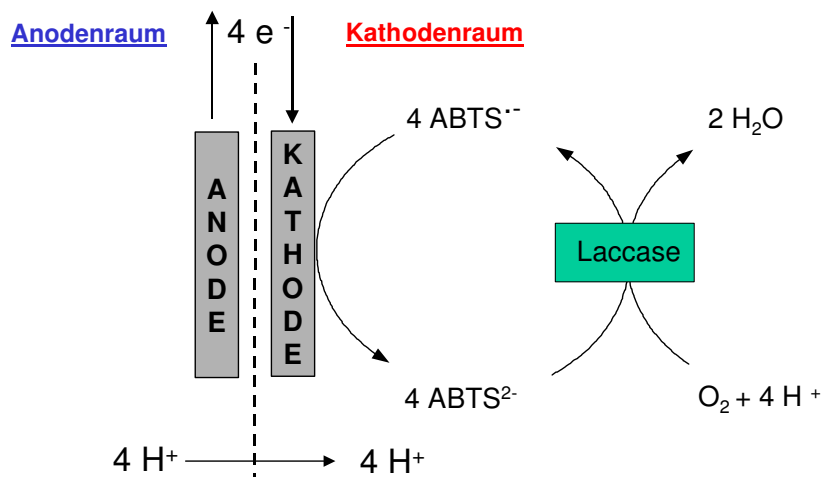


Abbildung 7.2.2: Brennstoffzelle mit der Entladung von $\text{ABTS}^{\bullet+}$ als freiwillig ablaufender Kathodenreaktion

Ikeda et al. verwenden zur Oxidation von ABTS^{2-} mit Sauerstoff Bilirubinoxidase (EC 1.3.3.5) aus *Myrothecium verrucaria* als Katalysator [227], während *Tayhas* et al. eine Laccase aus *Pyricularia oryzae* einsetzen [226].

²⁹ Es handelt sich hier um die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser.

Haltrich et al. setzen $\text{ABTS}^{\bullet-}$ als Mediator zur kontinuierlichen Synthese von Lactobionsäure und 2-Ketoglucose ein [228]. In der in Abbildung 7.2.3 dargestellten Synthese von Lactobionsäure (P) aus Lactose (S) (Flavoenzym = Cellobiose-Dehydrogenase) oder der Gewinnung von 2-Ketoglucose (P) aus Glucose (S) (Flavoenzym = Pyranose-Oxidase) ist das Radikalkation nicht das Oxidans des Substrats, sondern ein Elektronenakzeptor zur Regenerierung der oxidierten Form des jeweiligen Flavoenzyms.

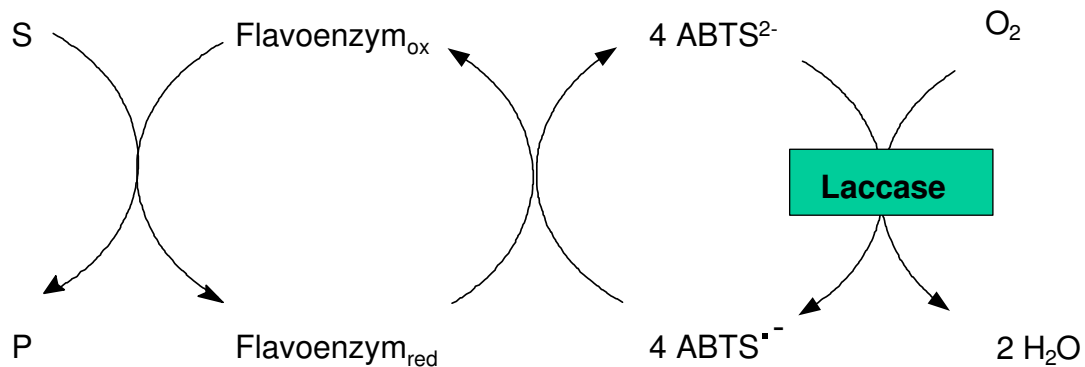


Abbildung 7.2.3: Laccase-mediatisierte Regenerierung des Elektronenakzeptors $\text{ABTS}^{\bullet-}$

Das Radikalkation selbst wird wieder durch die Laccase-katalysierte Sauerstoffreduktion zur Verfügung gestellt.

Neben der enzymatischen Bereitstellung des Radikalkations ist vor allem auch die elektrochemische Generierung von Interesse, da so kostengünstig Radikalkation hergestellt werden kann. Dieses Verfahren dient der Bleiche von Jeansstoffen [229] oder der Delignifizierung [230, 231]. Diese Verfahren sind zwar patentiert und seit 2002 werden Laccasen in der industriellen Zellstoff-Bleiche und zur Abwasserbehandlung in Papiermühlen eingesetzt, jedoch bislang nicht mit $\text{ABTS}^{\bullet-}$ als Mediator [232-235].

7.3 Das Redoxsystem

Das in Abbildung 7.1.1 dargestellte ABTS^{2-} ist farblos bis blassgrün gefärbt (Absorptionsmaximum bei 340 nm) wohingegen das Radikalkation $\text{ABTS}^{\bullet-}$ aufgrund der Ladungsdelokalisierung über zwei heteroaromatische Systeme intensiv blaugrün gefärbt ist (Absorptionsmaxima bei 728, 645 und 420 nm). Beide Oxidationsstufen sind sehr stabil und halten sich in neutraler Lösung mehrere Wochen [236]. ABTS^{2-} und $\text{ABTS}^{\bullet-}$ lassen sich sogar in kristalliner Form gewinnen [194, 195]. Im Gegensatz dazu zersetzt sich das rotgefärbte, schwerlösliche Dikation ABTS rasch [236, 237].

$\text{ABTS}^{\bullet-}$ und das Dikation können chemisch durch Reaktion mit starken Oxidationsmitteln wie Brom oder Cer(IV)-Salzen [105] oder Peroxomonosulfat (KHSO_5) [236] dargestellt werden. Das Radikalkation kann enzymatisch mittels Luftsauerstoff und Laccasen [200-203, 205-207, 209, 210, 213-215, 226, 237-240], Oxidasen [197, 213, 227] oder Peroxidasen [198, 210, 212, 241] oder elektrochemisch [105, 229-231, 237] dargestellt werden. Die Standard-Reduktionspotentiale der beiden Redoxpaare betragen 0,472 und 0,885 V vs. Ag | AgCl [237]. Damit stellen sowohl das Dikation als auch das Radikalkation starke Oxidationsmittel dar. Cyclovoltametrische Untersuchungen zeigen, dass sich im sauren bis alkalischen Bereich das $\text{ABTS}^{2-} | \text{ABTS}^{\bullet-}$ Redoxpaar reversibel bis quasi-reversibel verhält. Da der Abstand der formalen Redoxpotentiale beider Redoxpaare größer als 100 mV ist, weisen Cyclovoltammogramme jeweils zwei Peakmaxima auf.

Die heterogene Bildungsgeschwindigkeitskonstante k_s wurde als $4,54 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ [226] bzw. $1 \cdot 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$ [227] ermittelt.

Das zweite Redoxpaar $\text{ABTS}^{\bullet-} | \text{ABTS}$ ist im sauren Bereich (1,5 M HClO_4) ebenfalls reversibel, mit zunehmendem pH-Wert wird die Elektrodenreaktion irreversibel, bis kein Reduktionspeak mehr sichtbar ist [237]. Bei höheren Potentialvorschubgeschwindigkeiten ($1\text{--}10 \text{ V s}^{-1}$) tritt dieser Effekt nicht mehr auf. Dies kann man dadurch erklären, dass dann Nebenreaktionen wie das Disproportionierungs – Komproportionierungsgleichgewicht und Zerfallsreaktionen des Dikations langsamer sind als die Umpolung der Elektrode.

Die Disproportionierungskonstante ergibt sich aus den Normalpotentialen nach

Gleichung B.1.10

$$\ln K_{Disp} = -\frac{nF}{RT}(E_1^0 - E_2^0)$$

mit

$$K_{Disp} = \frac{[ABTS^{2-}][ABTS^0]}{[ABTS^{\bullet-}]^2} = 1 \cdot 10^{-7}$$

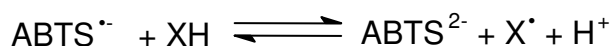
Darüber hinaus findet ein rascher Elektronenaustausch



statt ($k_{Austausch} = 4 \pm 1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [105], der zeigt, dass die Energiebarriere des Elektronentransfers gering ist. Damit ist nach der *Marcus*-Theorie³⁰ die adiabatische Reorganisationsenergie λ ebenfalls gering. Daher ist das Radikalkation ein sehr gutes Oxidationsmittel, denn es weist nicht nur ein genügend hohes Redoxpotential auf (Thermodynamik), sondern die Reaktion ist aufgrund der geringen Energiebarriere auch schnell (Kinetik) [121].

In kinetischen Studien zeigte sich die rasche Reaktion des Radikalkations mit Aminosäuren die über ein labiles H-Atom verfügen [$k_{Cystein} = 1,9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$] [242]. Mit Phenolen [243] und Peroxiden [244] ist die Reaktion langsamer und eine Rückreaktion unter Rückbildung des Radikalkations findet statt gemäß

Gleichung 7.3.2



Da das Gleichgewicht des ersten Schritts pH-abhängig ist (Gleichung 7.3.2), tritt die Rückbildung des Radikalkations unter basischen Bedingungen kaum auf und ist damit vernachlässigbar. Die elektrochemische Oxidation verschiebt das Gleichgewicht zugunsten der Oxidationsprodukte. Darüber hinaus ist das Gleichgewicht stark abhängig von der

³⁰ siehe auch Kapitel A.7, Seite 189 ff.

Potentialdifferenz zwischen $\text{ABTS}^{\bullet-}$ und XH [242]. Mit steigender Potentialdifferenz verschiebt sich nach *Nernst* das Gleichgewicht ebenfalls nach rechts. Damit sollte für die Oxidation von Nukleotidkofaktoren unter basischen Bedingungen der erste Schritt nahezu irreversibel sein. Die Rückreaktion kann dann vernachlässigt werden. ABTS ist also ein Einelektronen-Protonen-Überträger und reagiert nicht mit Substanzen, die kein labiles H-Atom besitzen.

7.4 Cyclovoltammetrische Untersuchungen

7.4.1 Betrachtung des Redoxsystems

Cyclovoltammetrische Untersuchungen des ABTS-Redoxsystems zeigten wie erwartet zwei Redoxpaare, wobei das $\text{ABTS}^{2-} | \text{ABTS}^{\bullet-}$ (1) Redoxpaar sowohl einen Oxidationspeak als auch einen Reduktionspeak aufweist, während das zweite Redoxpaar $\text{ABTS}^{\bullet-} | \text{ABTS}$ (2) lediglich einen ausgeprägten Oxidationspeak zeigt (Abbildung 7.4.1).

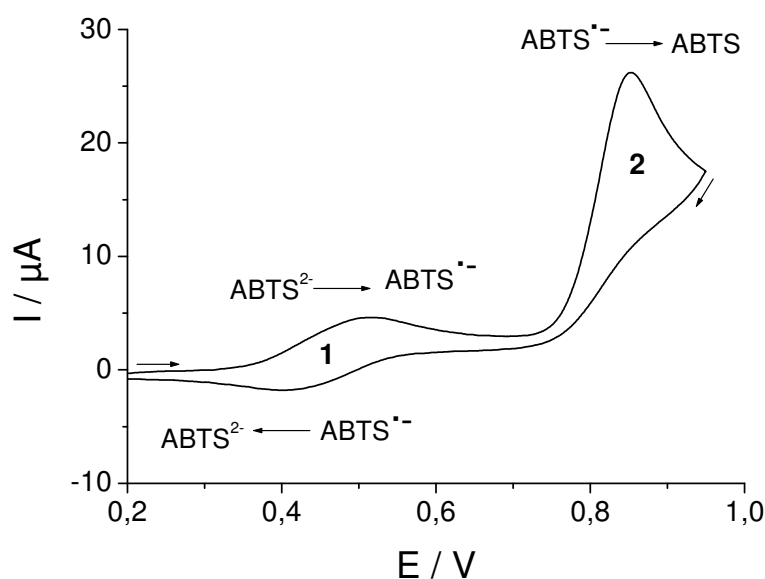


Abbildung 7.4.1: Cyclovoltammogramm von $[\text{ABTS}^{2-}] = 1 \text{ mM}$ in Kaliumcarbonatpuffer, 100 mM , $\text{pH } 9,0$; $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $v = 0,036 \text{ V}$, Vorschubrichtung ist durch Pfeil angezeigt.

Die formalen Redoxpotentiale der beiden Redoxpaare $\text{ABTS}^{2-} | \text{ABTS}^{\bullet-}$ ($0,461 \text{ V}$) und $\text{ABTS}^{\bullet-} | \text{ABTS}$ ($0,852 \text{ V}$) unterscheiden sich von den Redoxpotentialen ($0,472$ und $0,885 \text{ V}$),

die *Bourbonnais* et al. bestimmt haben, jedoch lässt sich dies mit den unterschiedlichen pH-Verhältnissen³¹ erklären [237].

Für verschiedene Potentialvorschubgeschwindigkeiten wurden Cyclovoltammogramme des ersten Redoxpaares aufgenommen (Abbildung 7.4.2). Aus der Steigung der Auftragung des Oxidationsstroms gegen die Wurzel der Vorschubgeschwindigkeit nach *Randles* und *Sevcik* (Abbildung 7.4.2, Einschub) wurde der Diffusionskoeffizient $D = 3,2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, ermittelt, der mit dem literaturbekannten Wert übereinstimmt [226].

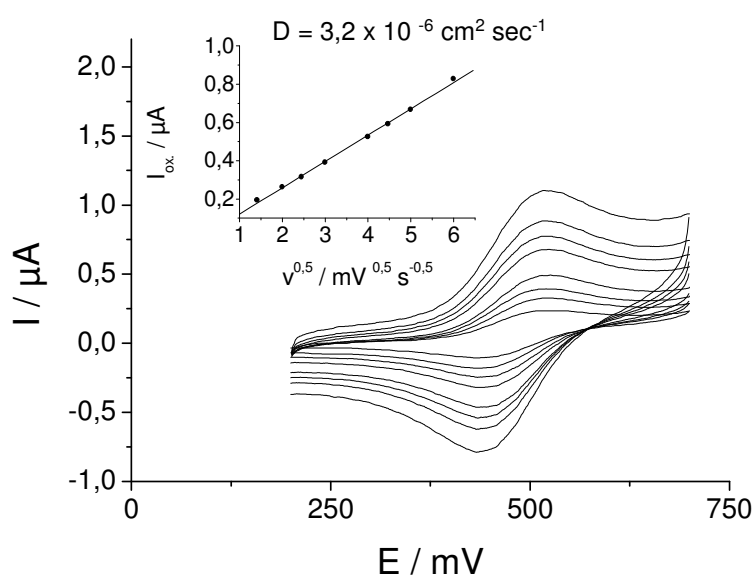


Abbildung 7.4.2: CV von $[\text{ABTS}^{2-}] = 0.12 \text{ mM}$, ν (von innen nach außen) [mV s^{-1}]: 2, 4, 6, 9, 16, 20, 25, 36; Kaliumcarbonatpuffer, 100 mM, pH 9,0; $T = 298,2 \text{ K}$; Einschub: Lineare Abhängigkeit des I_{ox} von $\sqrt{\nu}$ nach *Randles* und *Sevcik*

$\text{ABTS}^{2-}|\text{ABTS}^{\cdot-}$ erfüllt die Bedingungen eines reversiblen bis quasi-reversiblen Elektronentransfers, d.h., der Potentialabstand ΔE_p von oxidativem und reduktivem Peak ist unabhängig von der Potentialvorschubgeschwindigkeit ν und beträgt 59 – 83 mV, die Peakströme I_{red} und I_{ox} sind betragsmäßig gleich.

³¹ Hier wurden Lösungen mit pH 9, bei *Bourbonnais* et al. Lösungen mit pH 4 verwendet. Siehe dazu auch Kapitel 5.1, Seite 36 ff.

7.4.2 Digitale Simulation

Mit Hilfe digitaler Simulation soll im folgenden geklärt werden, inwiefern Disproportionierung und Komproportionierung auftreten.

Für das zweite Redoxpaar $\text{ABTS}^{\cdot-} | \text{ABTS}$ ergab sich keine Übereinstimmung mit einfachen Elektronentransfer-Mechanismen. Mit Hilfe digitaler Simulation konnte gezeigt werden (Abbildung 7.4.3), dass die unter den Reaktionsbedingungen erwartete Komproportionierung (Gleichung 7.4.1, 3) nicht ausreicht, um das Wegfallen des Reduktionspeaks zu erklären, wie dies von *Bourbonnais* et al. beschrieben wurde [237]. Im folgenden sind immer zunächst die für die Simulation verwendeten vereinfachten Gleichungen dargestellt und die Simulationsbedingungen sind dann jeweils unter den Abbildungen detailliert angegeben.

Gleichung 7.4.1

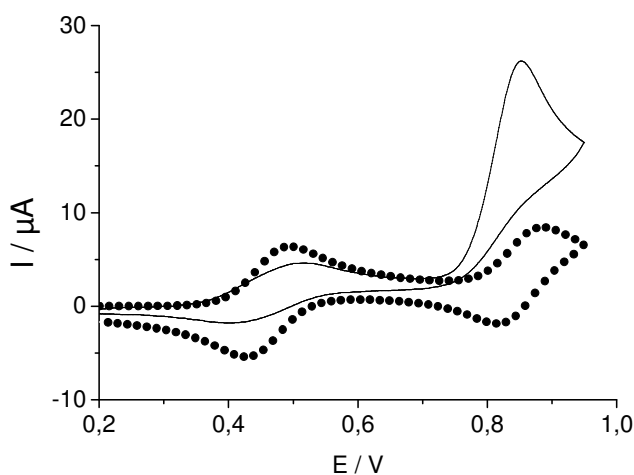
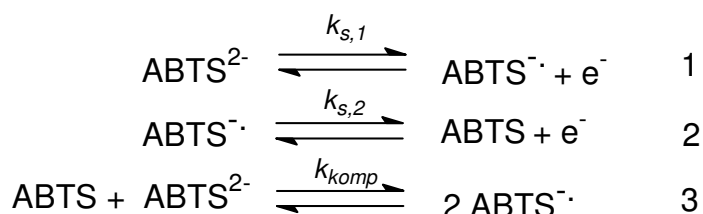


Abbildung 7.4.3: Digitale Simulation mit DigiSim, EE_{Disp} -Mechanismus (Punkte); Randbedingungen Simulation: $\nu = 0,036 \text{ V s}^{-1}$, $T = 298,2 \text{ K}$, $E_1^0 = 0,461 \text{ V}$, $E_2^0 = 0,852 \text{ V}$, $\alpha(1,2) = 0,5$, $k_s(1,2) = 0,01 \text{ cm s}^{-1}$, $D(1,2 \text{ ABTS}) = 3,3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $K_{\text{komp}} = 4,06 \cdot 10^6$, $k_{\text{komp}} = 2,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} [\text{ABTS}^{2-}] = 1 \text{ mM}$; Cyclovoltammogramm von ABTS^{2-} (durchgezogene Linie) wie in Abbildung 7.4.1

Auch die Berücksichtigung einer für alkalische Medien beschriebenen Zerfallsreaktion (Gleichung 7.4.2 (4)) des Dikations ABTS [236, 237] kann die starke Erhöhung des Oxidationsstroms alleine nicht erklären. Das digital simulierte CV stimmt mit den Messwerten daher nur unzureichend überein (Abbildung 7.4.4).

Gleichung 7.4.2

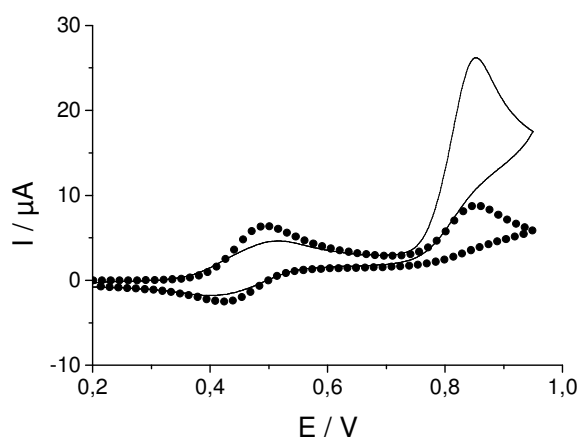
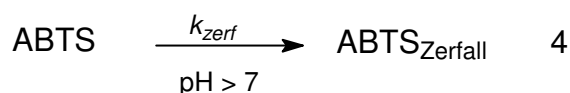
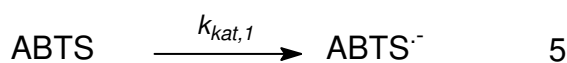


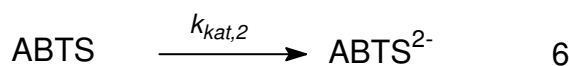
Abbildung 7.4.4: Digitale Simulation mit DigiSim, $EE_{\text{Disp}}C$ -Mechanismus (Punkte); Simulation: wie Abbildung 7.4.3 mit $k_{\text{komp}} = 7,28 \cdot 10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $K_{\text{zerf}} = 1280$, $k_{\text{zerf}} = 10,737 \text{ s}^{-1}$; Cyclovoltammogramm von ABTS^{2-} (durchgezogene Linie) wie in Abbildung 7.4.1

Der starke oxidative Stromanstieg weist auf eine katalytische Rückbildung des Radikalkations oder ABTS^{2-} in einem EC' -Mechanismus hin. Dies ist durch die Gleichungen

Gleichung 7.4.3



oder



dargestellt. Diese Gleichungen sind zu Reaktionen erster Ordnung vereinfacht, wie es der Darstellung der digitalen Simulation entspricht. Bei der digitalen Simulation mit DigiSim ist es nicht möglich, weitere Reaktionspartner wie etwa hier Sauerstoff mit zu berücksichtigen. Eine katalytische Rückbildung gemäß Gleichung 7.4.3 alleine kann jedoch die Peakform des

zweiten Redoxsystems nicht erklären, da bei Wegfallen des Reduktionspeaks dann ein sigmoidaler Verlauf zu erwarten wäre.³²

Verbindet man nun die katalytische Reaktion C' (Gleichung 7.4.3, 5 oder 6) mit der Zerfallsreaktion C (Gleichung 7.4.2, 4) und dem EE_{Disp} -Mechanismus (Gleichung 7.4.1), erhält man für beide katalytischen Elementarreaktionen annähernd gleiche digitale Simulationen (Abbildung 7.4.5), die eine gute Übereinstimmung mit dem gemessenen CV aufweisen. Man kann daher den Mechanismus als einen $EE_{disp}CC'$ -Mechanismus beschreiben.

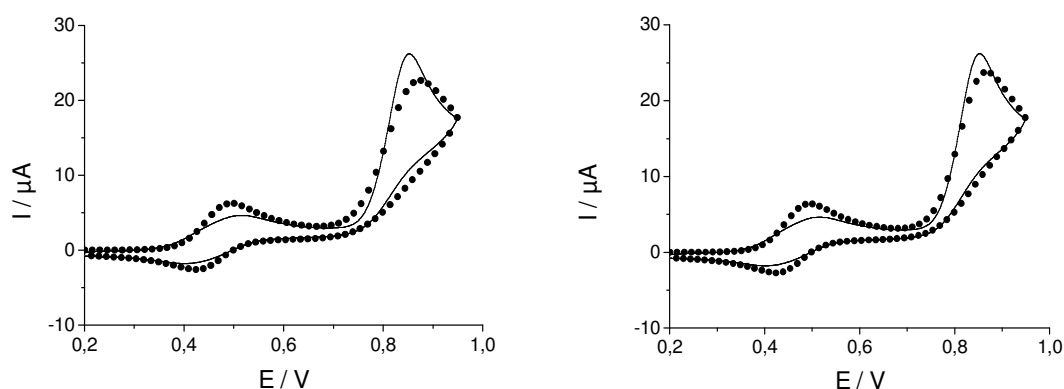


Abbildung 7.4.5: Digitale Simulation, $EE_{Disp}CC'$ -Mechanismus (Punkte), links mit Elementarreaktion Gleichung 7.4.3, 5, rechts mit Gleichung 7.4.3, 6. Simulation: wie Abbildung 7.4.3;

links: $k_{komp} = 7,5 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $K_{zerfall} = 1,6 \cdot 10^{10}$, $k_{zerf} = 133,2 \text{ s}^{-1}$, $K_{kat,1} = 1,04 \cdot 10^{11}$, $k_{kat,1} = 402,5 \text{ s}^{-1}$,
rechts: $k_{komp} = 3,7 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $K_{zerf} = 3336,1$, $k_{zerf} = 32,4 \text{ s}^{-1}$, $K_{kat,2} = 2,7 \cdot 10^{15}$, $k_{kat,2} = 46,5 \text{ s}^{-1}$; Cyclovoltammogramm von ABTS^{2-} (durchgezogene Linie) wie in Abbildung 7.4.1

Da Gleichung 7.4.3, 6 zu einer besseren Übereinstimmung führt, ist es wahrscheinlich, dass in Nebenreaktionen ABTS^{2-} gebildet wird.

³² siehe auch Kapitel 6.3.2.1, Seite 58 ff.

Die Diskrepanz zwischen digitaler Simulation und dem Messergebnis ist eventuell auf Adsorptionsprozesse des Dikations an der Elektrode zurückzuführen, jedoch ist der tatsächliche Mechanismus vermutlich wesentlich komplexer als in den Elementarreaktionen 1 bis 6 beschrieben. Infolgedessen ist eine Beschreibung der chemischen Folgereaktionen als Reaktionen erster Ordnung unzureichend. Trotzdem kann man aus den Daten ablesen, dass das Radikalkation unter den Reaktionsbedingungen hinreichend stabil ist, wohingegen das Dikation zerfällt, bzw. an Nebenreaktionen teilnimmt. Die Disproportionierung bzw. Komproportionierung spielt dabei eine untergeordnete Rolle. Man kann also davon ausgehen, dass sich im alkalischen Bereich nur unwesentliche Mengen an Dikation spontan aus dem elektrochemisch produzierten Radikalkation bilden.

7.4.3 Nebenreaktionen des Radikalkations und des Dikations

Da sowohl $\text{ABTS}^{\bullet-}$ als auch ABTS starke Oxidationsmittel darstellen, muss geklärt werden, ob unerwünschte Nebenreaktionen des Radikalkations oder des Dikations mit Reaktionskomponenten der ausgewählten enzymatischen Reaktionen (*GDH*, *HLADH*) auftreten. Neben cyclovoltammetrischen Untersuchungen wurden auch qualitative photometrische Messungen durchgeführt.

In Abbildung 7.4.6 zeigt sich die Reaktion des Dikations mit 2-Hydroxyacetophenon (c) aber auch mit 1-Phenyl-1,2-ethandiol (b) durch einen Anstieg des Oxidationsstrom im Vergleich zum Diffusionsstrom (a).

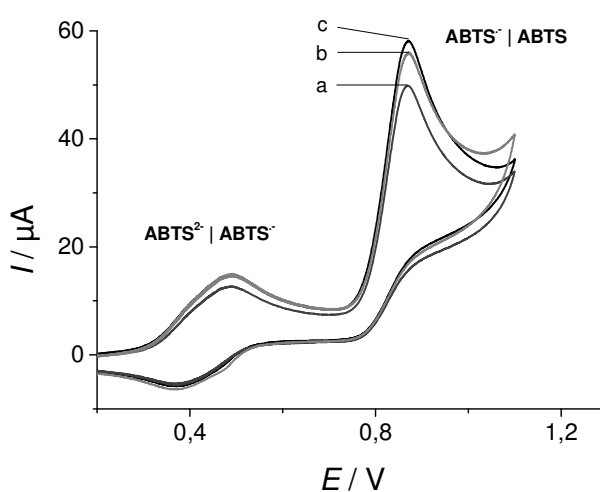


Abbildung 7.4.6: Cyclovoltammogramme von a) ABTS^{2-} [1 mM] in Kaliumcarbonatpuffer pH 9,0, 25°C, $\nu = 0,1 \text{ V s}^{-1}$; b) unter Zusatz von 1-Phenyl-1,2-ethandiol; c) unter Zusatz von 2-Hydroxyacetophenon

Da ein solcher Anstieg des Oxidationsstroms auch für das Radikalkation zu erkennen ist, wurde dieses noch photometrisch über die Abnahme der Absorption des Radikalkation bei 420 in Gegenwart beider Substanzen vermessen.

Mit Hilfe dieser qualitativen photometrischen Methode wurden auch weitere Reaktionskomponenten auf eine mögliche Oxidation durch $\text{ABTS}^{\bullet-}$ untersucht. Die Ergebnisse sind in (Tabelle 7.4.1) zusammengefasst.

Untersuchte Substanz	Reaktion mit $\text{ABTS}^{\bullet-}$
1-Phenyl-1,2-ethandiol	-
2-Hydroxyacetophenon	+
Triethanolamin-Hydrochlorid	++
Ammoniumsulfat	-
Rinderserumalbumin (BSA)	+++
PEG4000	-
HLADH – Lyophilisat	+
HLADH-Suspension	-
NAD^+	-
NADH	+++

Tabelle 7.4.1: Oxidierende Wirkung von $\text{ABTS}^{\bullet-}$; - keine Reaktion, + schwache Reaktion, ++ starke Reaktion, +++ heftige Reaktion

Aus den Absorptionsmessungen geht eindeutig hervor, dass das Radikalkation nicht in der Lage ist, 1-Phenyl-1,2-ethandiol zu oxidieren, wohingegen 2-Hydroxyacetophenon oxidiert wird.

Dieses Ergebnis entspricht Untersuchungen von *Bourbonnais et al.*, *Majcherczyk et al.* und *Aliaga et al.*, die zeigen, dass $\text{ABTS}^{\bullet-}$ umso leichter mit einer Substanz reagiert, je leichter ein H-Atom abstrahiert werden kann [201, 237, 244]³³. Dies wiederum erlaubt die Schlussfolgerung, dass $\text{ABTS}^{\bullet-}$ ein Ein-Elektronen-Protonen-Überträger³⁴ ist. Dazu gibt es jedoch keine Literaturbelege.

³³ siehe auch Kapitel 7.2, Seite 67

³⁴ entspricht einer H-Atom-Abstraktion

Aliaga und *Lissi* beschreiben die teils sehr rasche Reaktion des Radikalkations mit verschiedenen Aminosäuren, weshalb die verwendeten Enzyme auf eine Oxidation durch $\text{ABTS}^{\bullet+}$ untersucht wurden [242]. Lediglich Rinderserum-Albumin (engl. *BSA*) und ein Lyophilisat von *HLADH* zeigten eine deutliche Reaktion, die *GDH* aus *Enterobacter aerogenes* reagiert zwar weniger stark mit dem Radikalkation, jedoch wird das Enzym während einer Elektrolyse rasch deaktiviert.³⁵ In Abbildung 7.4.7, Seite 75, erkennt man die Reaktion des Radikalkation mit dem Protein vor allem daran, dass nach Zugabe von *BSA* kein Oxidations- bzw. Reduktionspeak mehr erkennbar ist.³⁶

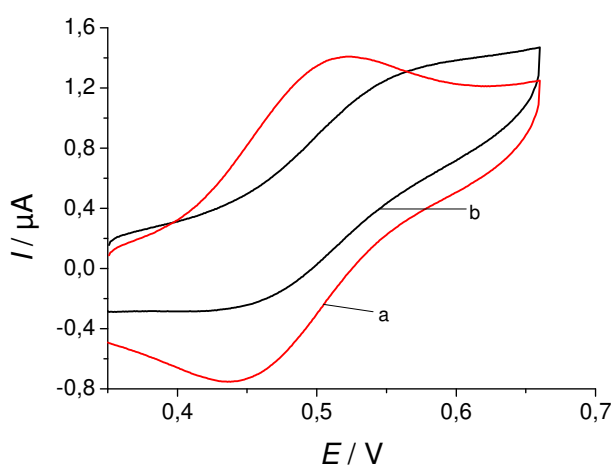


Abbildung 7.4.7: Cyclovoltammogramm von ABTS^{2-} [0,1 mM] ohne (a) und in Gegenwart von 1 mg mL^{-1} BSA, b), $v = 0,004 \text{ V s}^{-1}$

Eine Lösung des Radikalkations verfärbt sich nach Zugabe von *BSA* violett. Diese Verfärbung ist auf Reaktionsprodukte der gebildeten Aminosäureradikale mit Luftsauerstoff zurückzuführen [242].

³⁵ siehe Kapitel 3.3.2.4, Seite 24

³⁶ Dieser Effekt ist nicht auf eine Ablagerung des elektrochemisch inaktiven Proteins auf der Oberfläche der Arbeitselektrode zurückzuführen.

7.5 Zusammenfassung

- ABTS ist ein zweistufiges Redoxsystem ($\text{ABTS}^{2-}|\text{ABTS}^{\bullet-}$, $E'_0 = 0,472 \text{ V}$ vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}$, $\text{ABTS}^{\bullet-}|\text{ABTS}$, $E'_0 = 0,885 \text{ V}$),
- Der Diffusionskoeffizient beträgt $D = 3,2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$
- Die Absorption von $\text{ABTS}^{\bullet-}$ bei 420 nm erlaubt die einfache qualitative und quantitative Messung von Oxidationsreaktionen.
- Disproportionierung/Komproportionierung spielt nur eine untergeordnete Rolle. ($K_{\text{disp}} = 1 \cdot 10^{-7}$), höchstwahrscheinlich $EE_{\text{disp}}CC'$ -Mechanismus
- $\text{ABTS}^{2-}|\text{ABTS}^{\bullet-}$: reversibles bis quasireversibles System, $\Delta E_p = 0,059\text{-}0,083 \text{ V}$
 - stabil bei pH 9,0, Kaliumcarbonat 0,1 M, 25°C
 - $\text{ABTS}^{\bullet-}$ reagiert mit: (2-HAP), TEA^+HCl , NAD(P)H , *BSA*, *HLADH*-Lyophilisat
- $\text{ABTS}^{\bullet-}|\text{ABTS}$: irreversibles System, kein Reduktionspeak
 - ABTS ist schwerlöslich und instabil bei pH 9,0, Kaliumcarbonat 0,1 M, 25°C
 - ABTS reagiert mit 2-HAP, PED, TEA^+HCl , NAD(P)H , *BSA*, *HLADH*-Lyophilisat

8 ABTS-mediatisierte anodische Kofaktoroxidation

Im folgenden Abschnitt soll die Reaktion zwischen reduziertem Nukleotidkofaktor und $\text{ABTS}^{\cdot-}$ (Abbildung 7.5.1) charakterisiert werden.

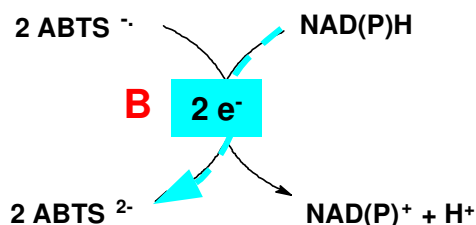


Abbildung 7.5.1: Formale Oxidation von einem Molekül NAD(P)H durch zwei Moleküle $\text{ABTS}^{\cdot-}$

Bei der Oxidation von NAD(P)H zu NAD(P)^+ wird ein Hydrid abstrahiert, daher werden rein formal je Molekül NAD(P)H zwei Moleküle Radikalkation reduziert.³⁷

8.1.1 Oxidation von NADH

Das Redoxpotential von $\text{NADH}|\text{NAD}^+$ vs $\text{Ag}|\text{AgCl}$ ³⁸ ist mit -0,53 V deutlich negativer als das Redoxpotential von $\text{ABTS}^{2-}|\text{ABTS}^{\cdot-}$ (0,472 V). Damit ist $\text{ABTS}^{\cdot-}$ aufgrund der großen Potentialdifferenz und damit auch Triebkraft der Reaktion aus thermodynamischer Sicht ein gutes Oxidationsmittel.³⁹ Die Oxidation von NADH durch das Radikalkation führt zu NAD^+ , was neben den später diskutierten angeschlossenen enzymatischen Reaktionen auch HPLC-Untersuchungen zeigen (Abbildung 7.5.2).

³⁷ Hier muss wieder beachtet werden, dass es sich bei $\text{ABTS}^{\cdot-}$ um ein Radikalkation handelt.

³⁸ -0,32 V vs. NHE

³⁹ EMK, siehe Kapitel A.1, Seite 167 f.

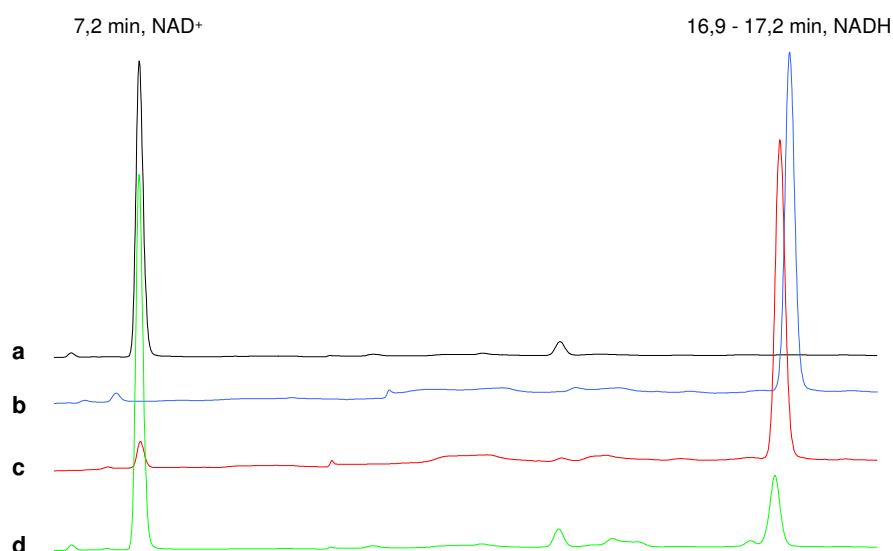
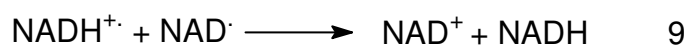


Abbildung 7.5.2: HPLC-Messungen der Reaktion von $\text{ABTS}^{\bullet+}$ mit NADH; a) nur NAD^+ , b) nur NADH, c) Reaktion von NADH (Überschuss) mit $\text{ABTS}^{\bullet+}$, d) wie c mit Zusatz von NAD^+

Die Kinetik der Oxidationsreaktion wird im Folgenden diskutiert.

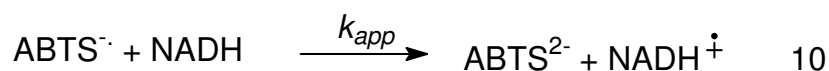
Für die direkte Oxidation von NADH [139, 140] und auch für die Oxidation durch Ein-Elektronen-Überträger wie $\text{ABTS}^{\bullet+}$ [121] wird vornehmlich eine Oxidation zum Radikalkation diskutiert, gefolgt von einer basenkatalysierten Deprotonierung ($\text{B} = \text{Base}$) und einer Disproportionierung gemäß

Gleichung 7.5.1



Dabei stellt die erste Elementarreaktion höchstwahrscheinlich den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar [121, 139, 140]. Vermutlich ist auch $\text{ABTS}^{\bullet+}$ in der Lage, NADH zu deprotonieren, wie Beispiele mit anderen CH-labilen Verbindungen zeigen [242]. Da der Reaktionsmechanismus nicht genau bekannt ist, sind die Geschwindigkeitskonstanten apparente Konstanten, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt charakterisieren.

Gleichung 7.5.2



Für die in Gleichung 7.5.2 dargestellte Kofaktoroxidation ist die Oxidation von NADH zum Radikalkation $\text{NADH}^{\cdot+}$ der geschwindigkeitsbestimmende Schritt [121]. Es ist jedoch unklar, ob der Mediator nicht auch direkt das Proton abstrahiert und somit ein Radikal des Kofaktors entstünde.

8.1.1.1 Cyclovoltammetrie

Die Geschwindigkeit der Oxidation des Nukleotid-Kofaktors wurde einerseits cyclovoltammetrisch nach der Methode von *Nicholson* und *Shain*⁴⁰ [189] und andererseits über photometrische Messungen [242, 244] bestimmt.

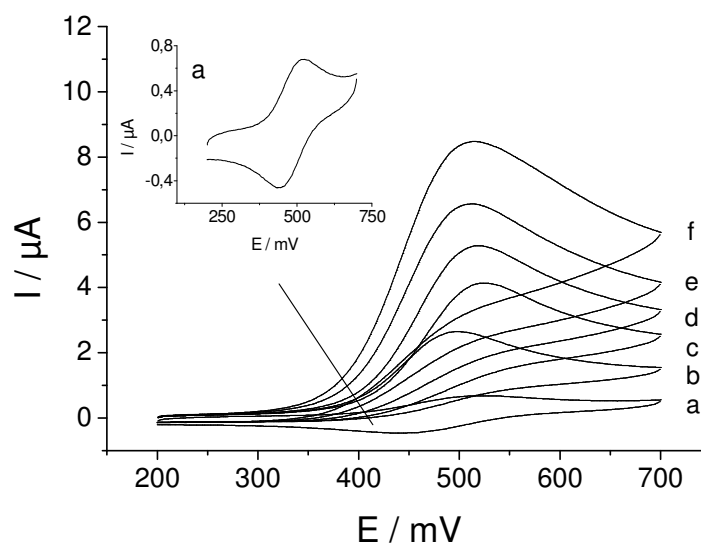


Abbildung 7.5.3: CV von $[\text{ABTS}^{2-}]$ in Gegenwart von NADH; $[\text{ABTS}^{2-}] = 0,12 \text{ mM}$, $\nu = 0,016 \text{ V s}^{-1}$, NADH [mM] a) 0, b) 0,23, c) 0,86, d) 2,64, e) 4,72, f) 13,02.

⁴⁰ siehe auch Kapitel 6.3.2.1, Seite 58

Bei cyclovoltammetrischen Messungen, die in Abbildung 7.5.3 dargestellt sind, zeigt sich erwartungsgemäß mit steigender Konzentration an NADH eine Zunahme des oxidativen Peakstroms und eine Abnahme des Reduktionsstroms.

Dies entspricht in zwar einem EC'-Mechanismus, d. h., einem katalytischen Mechanismus⁴¹ analog Gleichung 7.5.2. Eine sigmoidale Verlaufsform wird jedoch nicht erreicht, was vermutlich damit zu erklären ist, dass mit steigender Konzentration an NADH auch eine direkte Oxidation stattfindet. Darüber hinaus wirkt das als Zwischenprodukt erzeugte Radikal bzw. Radikalkation von NADH vermutlich selbst mediatisierend [136]. Dies erkennt man auch daran, dass in Abbildung 7.5.4 die Gerade nicht durch den Ursprung läuft, wie sie eigentlich bei einem EC'-Mechanismus nach *Nicholson* und *Shain* sollte [189, 245].⁴²

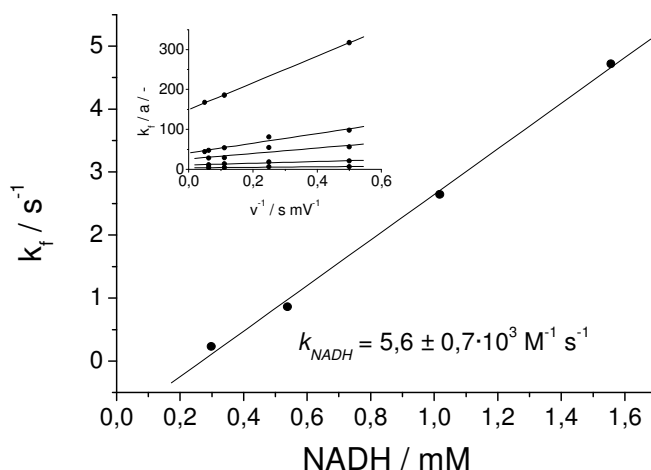


Abbildung 7.5.4: Bestimmung der apparenten Geschwindigkeitskonstante k_{app} ; Einschub: Bestimmung von k_f (Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung) für verschiedene NADH-Konzentrationen, zugehörige Cyclovoltammogramme siehe Abbildung 7.5.3.

Die so bestimmte Geschwindigkeitskonstante ist daher mit einem systematischen Fehler behaftet. Die Geschwindigkeitskonstante der NADH-Oxidation ergibt sich aus der Auftragung der Stromverhältnisse mit und ohne NADH in Abhängigkeit von der Potentialvorschubgeschwindigkeit v (Abbildung 7.5.4, Einschub) und Auftragung der daraus bestimmten Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung k_f über die jeweils eingesetzte Kofaktorkonzentration zu $k_{NADH} = 5,6 \pm 0,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Abbildung 7.5.4).

⁴¹ siehe auch Kapitel 6.3.2.1, Seite 59

⁴² siehe auch B.2.3, Seite 214 ff.

8.1.1.2 Photometrie

Da die cyclovoltammetrisch ermittelte Geschwindigkeitskonstante mit einem systematischen Fehler behaftet ist, wurde die apparente Geschwindigkeitskonstante zusätzlich photometrisch bestimmt $k_{NADH} = 6,45 \pm 0,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Abbildung 7.5.5).

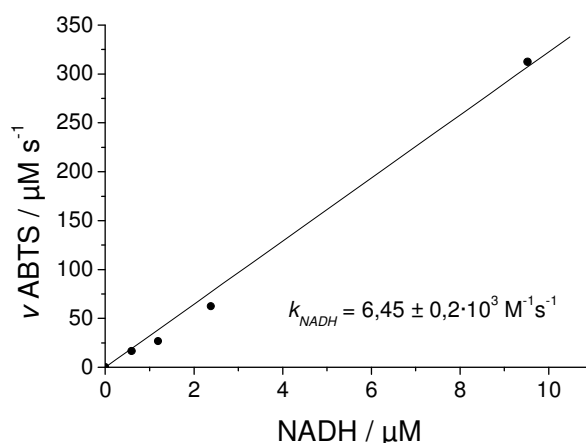


Abbildung 7.5.5: Photometrische Bestimmung von k_{NADH} , über die Anfangsgeschwindigkeit der Absorptionsabnahme bei $\lambda_{\text{ABTS}^{\bullet-}} = 420 \text{ nm}$, $\text{ABTS}^{\bullet-}$ 10 mM, NADH [μM]: 0,6, 1,2, 2,4, 9,5

Die Oxidation von NADH durch das Radikalkation $\text{ABTS}^{\bullet-}$ erfolgt also sehr schnell, was bei den photometrischen Messungen qualitativ durch die rasche Entfärbung der grünen Radikalkation-Lösung nach Zugabe von NADH erkennbar ist.

Die nächsten Schritte auf dem Weg zu NAD^+ sind nicht geklärt, jedoch sind Modelluntersuchungen hierzu veröffentlicht [139-141], die nahe legen, dass unter basischen Bedingungen der erste Reaktionsschritt, die Elektronenübertragung von NADH auf den Mediator, als langsamster Schritt die Gesamtgeschwindigkeit der Reaktion bestimmt.

Damit beschreiben die hier gemessenen Konstanten die Reaktion hinreichend, wie später auch für die enzymatischen Umsetzungen gezeigt werden konnte.⁴³ Darüber hinaus konnte durch qualitative Untersuchungen NAD^+ als Reaktionsprodukt verifiziert werden (Abbildung 7.5.2, Seite 78).

⁴³ siehe Kapitel 11, Seite 116 ff.

8.1.2 Oxidation von NADPH

Analog zur Oxidation von NADH kann auch ein weiterer Nukleotid-Kofaktor, nämlich NADPH⁴⁴ ($E^{0'} = -0,534 \text{ V}$) durch ABTS^{•-} oxidiert werden. Cyclovoltammetrische Experimente zeigten einen im Vergleich zu NADH wesentlich stärker ausgeprägten katalytischen Effekt (Abbildung 7.5.6). Tatsächlich erkennt man einen sigmoidalen Kurvenverlauf, bei dem der Strom vor und nach der Umpolung der Elektrode nahezu auf einer Linie verläuft.⁴⁵ Da aber ebenso wie bei NADH bei Potentialen ab etwa 0,7 V direkte elektrochemische Oxidation einsetzt, wird kein Plateaustrom erreicht und somit kann die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion von NADPH mit ABTS^{•-} nicht direkt aus dem Plateaustrom bestimmt werden.

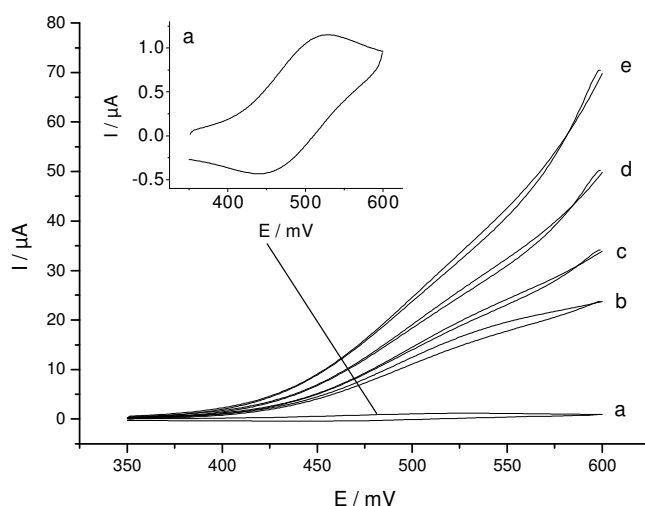


Abbildung 7.5.6: CV von $[\text{ABTS}^{2-}] = 0,1 \text{ mM}$ in Gegenwart von NADPH; $\nu = 0,036 \text{ V s}^{-1}$, NADPH [mM] a) 0, b) 5.55, c) 11, d) 16.6, e) 22.3, f) 27.8. Einschub: nur ABTS^{2-}

⁴⁴ $-0,324 \text{ V}$ vs. NHE

⁴⁵ siehe auch Kapitel 6.3.2.1, Seite 60

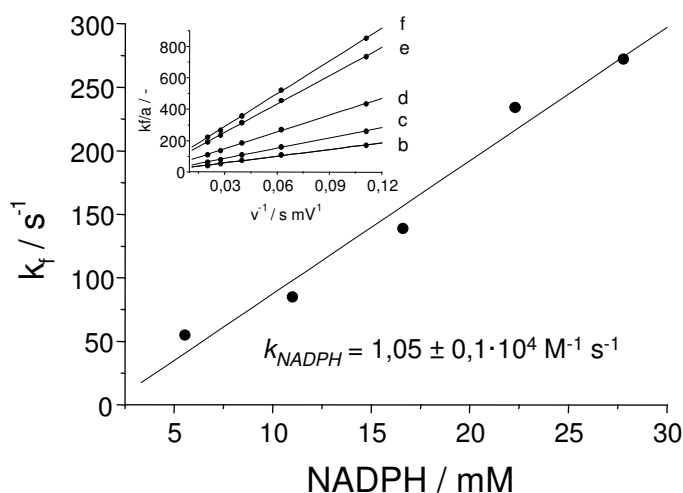


Abbildung 7.5.7: Bestimmung der apparenten Geschwindigkeitskonstante k_{NADPH} ; Einschub: Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung k_f für verschiedene NADPH-Konzentrationen, zugehörige Cyclovoltammogramme siehe Abbildung 7.5.6.

In Abbildung 7.5.7 ist die Bestimmung von $k_{NADPH} = 1,05 \pm 0,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ nach der Methode von *Nicholson* und *Shain* dargestellt. Wie auch an der sigmoidalen Form der Cyclovoltammogramme in Gegenwart von NADPH bereits erkennbar ist, findet die Reaktion von $\text{ABTS}^{\bullet-}$ mit NADPH deutlich schneller statt als mit NADH. Hier liegt gleichzeitig auch eine größere Übereinstimmung mit einem EC' -Mechanismus vor, obwohl auch hier die Gerade in Abbildung 7.5.7 nicht durch den Ursprung verläuft. Aufgrund des hohen angelegten Potentials (bis 600 mV vs Ag|AgCl tritt auch hier bereits wieder direkte Oxidation des Nukleotidkofaktors auf). Die Geschwindigkeit der Reaktion von $\text{ABTS}^{\bullet-}$ mit NADPH liegt im Bereich der höchsten Geschwindigkeit, die bislang für einen Mediator dokumentiert ist ($5,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, siehe NFD, Tabelle 5.2.2, Seite 39) [108, 109].⁴⁶

⁴⁶ siehe Tabelle 5.2.2, Seite 39

8.2 Zusammenfassung

- Für die homogenchemische Reaktion zwischen $\text{ABTS}^{\bullet-}$ und NADPH wurde ein Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung bezüglich beider Reaktionspartner angenommen.
 - CV: $k_{\text{NADH}} = 5,6 \pm 0,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; UV: $6,45 \pm 0,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
 - CV: $k_{\text{NADPH}} = 1,05 \pm 0,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
- Der Mechanismus entspricht nicht einem reinen EC'-Mechanismus sondern vermutlich tritt auch direkte Kofaktoroxidation auf.
- Das Produkt der Reaktion zwischen Radikalkation und NADH ist NAD^+ .
- Die Geschwindigkeit der Reaktion von $\text{ABTS}^{\bullet-}$ mit NADPH liegt im Bereich der höchsten Geschwindigkeit, die bisher für einen Mediator dokumentiert ist .

9 Darstellung des Radikalkations

9.1 Einführung

In diesem Kapitel wird nun untersucht, wie schnell - in Abhängigkeit von Konzentration und Massentransport - das Radikalkation anodisch gebildet werden kann (Abbildung 9.1.1).

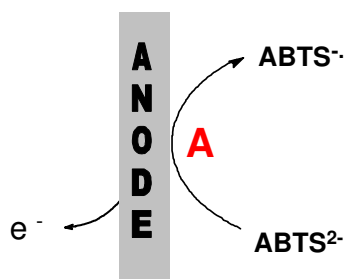


Abbildung 9.1.1: Anodische Oxidation von ABTS²⁻ (A)

Um eine enzymatische Umsetzung zu gewährleisten, muss immer ein Überschuss an oxidiertem Mediator ABTS^{•-} vorhanden sein, damit enzymatisch gebildetes NADH schnell oxidiert wird. Daher hat die Bildungsgeschwindigkeit des Radikalkations an der Elektrodenoberfläche eine entscheidende Bedeutung für den Reaktionsverlauf und darf nicht limitierend für die Gesamtreaktion sein. Die der Literatur entnommene Geschwindigkeitskonstante der heterogenen anodischen Oxidation 0,05-0,1 cm s⁻¹ [226, 237, 246] stellt wegen der bei diesen Untersuchungen diffusiven Limitierung, die untere Grenze dar.⁴⁷ Der Massentransport durch Konvektion ist aber wesentlich größer als durch diffusiven Stofftransport, weshalb die Bildungsgeschwindigkeit stark von der Art und der Geschwindigkeit des konvektiven Massentransports abhängt. Darüber hinaus wird die Bildungsgeschwindigkeit auch durch die Konzentration an nicht oxidiertem Mediator bestimmt.

⁴⁷ s. a. Kapitel 6.3.1, Seite 55

9.2 Bildungsgeschwindigkeit von $\text{ABTS}^{\bullet-}$

Zur Bestimmung der Bildungsgeschwindigkeit wurde der Elektrolyt aus der elektrochemischen Zelle (Becherglaszelle/Durchflusszelle) direkt oder über einen Bypass durch eine UV-Durchflusszelle gepumpt und die Absorption des Radikalkations diente als Maß für die Bildungsgeschwindigkeit (Abbildung 9.2.1).

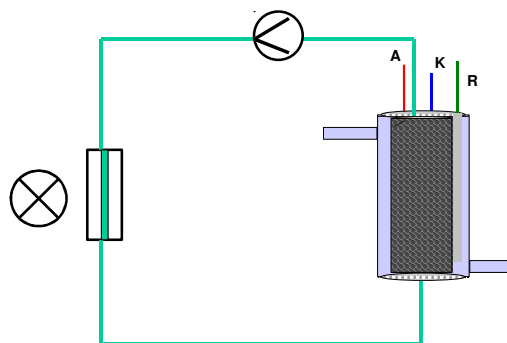


Abbildung 9.2.1: Schematischer Aufbau der Apparatur zur Bestimmung der Bildungsgeschwindigkeit von $\text{ABTS}^{\bullet-}$, A, K, R bezeichnen die Elektroden

9.2.1 Becherglas-Zelle

Zunächst wurde für die elektrochemische Synthese des Radikalkations eine ungeteilte Becherglaszelle⁴⁸ gewählt, jedoch zeigte sich rasch (Abbildung 9.2.2), dass die Bildung des Radikalkations für eine präparative Anwendung mit nur $0,072 \text{ U mL}^{-1}$ zu langsam erfolgt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das Radikalkation nicht schnell genug aus dem Kohlefilz in die Lösung transportiert wird und vermutlich auch der Transport der nichtoxidierten Spezies zur Elektrodenoberfläche zu langsam erfolgt. Während der Elektrolyse lässt sich die Massentransportlimitierung auch daran erkennen, dass das intensiv grün gefärbte Radikalkation einen Farbgradienten von der Elektrodenoberfläche in die Reaktionslösung bildet. Auch die Anfangsphase von ca. 50 s, in denen keine Absorption messbar ist und das schnelle Erreichen der Sättigung ab ca. 400 s sind auf eine unzureichende Vermischung und damit einen verzögerten Stofftransport zurückzuführen.

⁴⁸ Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit wurde zusätzlich umgepumpt.

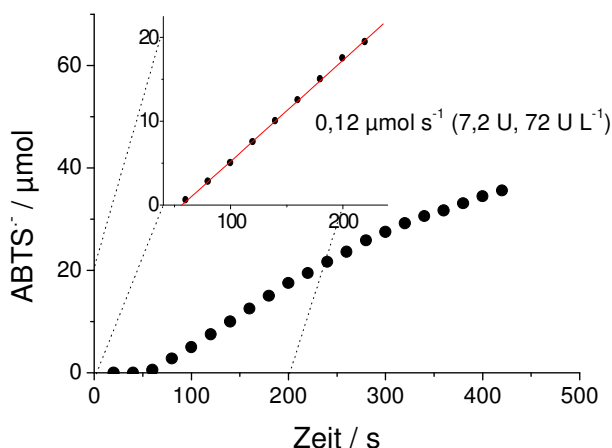


Abbildung 9.2.2: Elektrolyse von 0,1 mM ABTS^{2-} in Kaliumcarbonat-Puffer (0,1 M, pH 9,0, 25°C); potentiostatisch 585 mV, Anode Kohlefilz mit Pt-Kontakt ($A = 40 \text{ cm}^2$, 0,81 g), Kathode Pt-Draht, Referenz Ag|AgCl -Schlauchelektrode, gerührte Becherglaszelle Volumen 100 mL, Fließgeschwindigkeit $v_f = 42 \text{ mL min}^{-1}$

Eine bessere Vermischung kann in einer Becherglaszelle nicht erreicht werden, da der Kohlefilz sehr voluminös ist und bereits die größtmögliche Rührgeschwindigkeit gewählt wurde. Da neben dem Massentransport auch das Verhältnis von Volumen der Elektrolytlösung zur Elektrodenoberfläche für eine rasche Oxidation möglichst klein sein muss (hier $2,5 \text{ mL cm}^{-2}$), ist es sinnvoll, das Anodenmaterial aufzuwickeln, um so platzsparend eine möglichst große Elektrodenoberfläche zu erhalten. Diese Ansprüche lassen sich in einer Durchflusszelle realisieren, in der bessere konvektive Bedingungen durch höhere Strömungsgeschwindigkeiten erreicht werden können. Darüber hinaus ist eine solche Zelle modular mit anderen Komponenten kombinierbar.

9.2.2 Durchflusszelle⁴⁹

Wie bereits im vorigen Kapitel beschrieben, ist eine effiziente Elektrolyse vor allem von der Konzentration des Mediators, einem kleinen Volumen / Elektrodenoberflächenverhältnis und einem effektiven Massentransport abhängig. Die beiden letzten Punkte ermöglicht der Einsatz einer Durchflusszelle mit gewickelter Anode, wie sie in Abbildung 9.2.3 dargestellt ist.

⁴⁹ Die Durchflusszelle wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Lasse Greiner entwickelt.

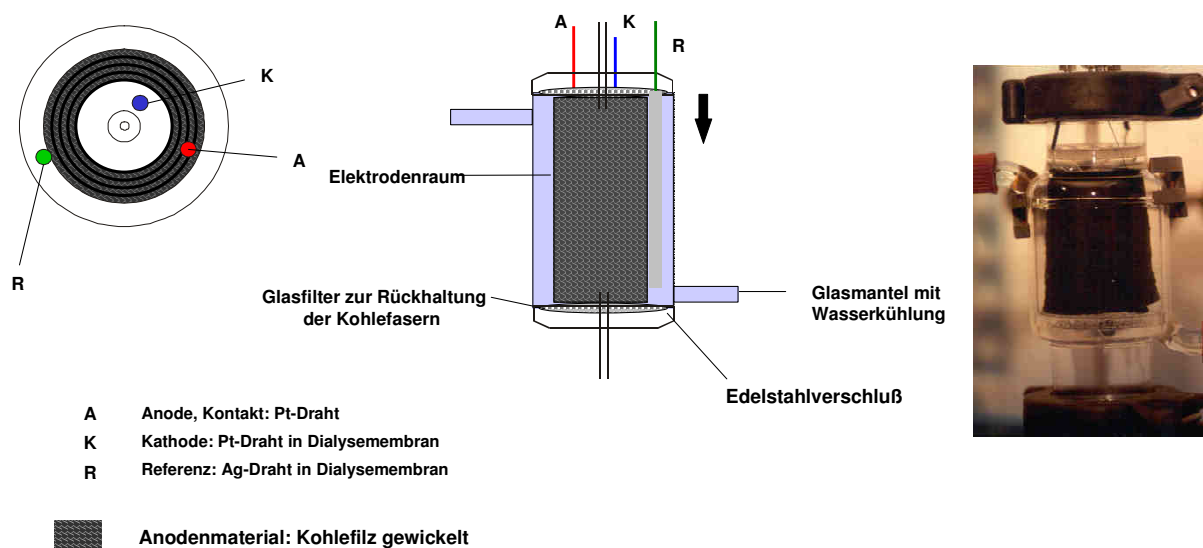


Abbildung 9.2.3: links: Schematischer Aufbau der Durchflusszelle mit Kohlefilz-Anode; rechts: Foto der verwendeten Durchflusszelle

Ausgehend von einer Bildungsgeschwindigkeit v_b von $\sim 70 \text{ U L}^{-1}$ (spezifische⁵⁰ $v_b = 0,14 \mu\text{Ms}^{-1} \text{g}_{\text{Anode}}^{-1}$) in der Becherglaszelle sollte bereits die größere Oberfläche der nun verwendeten Anode zu einer Bildungsgeschwindigkeit an Radikalkation von ca. 350 U L^{-1} führen (Abbildung 9.2.4). Für den Einsatz zur Kofaktorregenerierung bei der GDH-katalysierten Oxidation von 1-Phenyl-1,2-ethandiol benötigt man auf den Mediator bezogen 1000 U L^{-1} , um eine *sty* (engl. Raum-Zeit-Ausbeute) von $100 \text{ g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ an Produkt zu erzeugen.⁵¹

⁵⁰ Die Bezeichnung *tof* wurde nicht gewählt, da hier keine Sättigungsbedingungen erreicht werden.

⁵¹ Man nimmt an, dass zwei Mol Radikalkationen zur Bildung eines Mols NAD^+ benötigt werden.

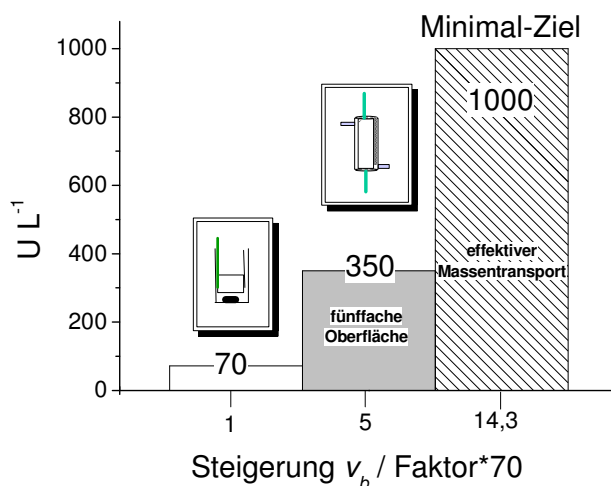


Abbildung 9.2.4: Erwartete Steigerung der Bildungsgeschwindigkeit v_b von $ABTS^{\bullet-}$ durch Verwendung einer Durchflusszelle

Das in der obigen Abbildung gezeigte Ziel konnte bei weitem übertroffen werden.

Die Abhängigkeit der Bildungsgeschwindigkeit des Radikalkations v_b von der eingesetzten Konzentration und der Flussgeschwindigkeit v_{fl} ist in Abbildung 9.2.5 gezeigt.

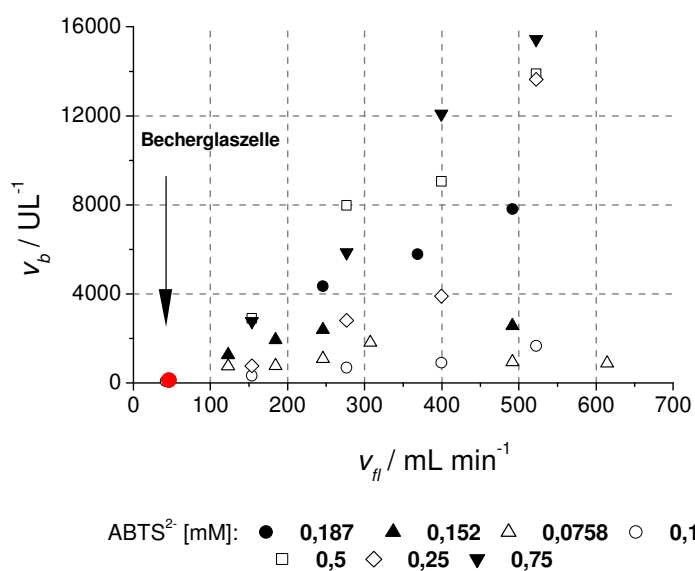


Abbildung 9.2.5: Abhängigkeit der Bildungsgeschwindigkeit des Radikalkations v_b von der eingesetzten Konzentration und der Fließgeschwindigkeit v_{fl} ; Die Bedingungen der Elektrolyse sind analog zu Abbildung 9.2.2, $A = 225 \text{ cm}^2$, $V/A = 0,667 \text{ ml cm}^{-2}$. Die Bildungsgeschwindigkeit in der Becherglaszelle ist mit einem Pfeil angezeigt.

In Abbildung 9.2.6 ist ein Vergleich zwischen erwarteter und tatsächlich gemessener Bildungsgeschwindigkeit dargestellt.

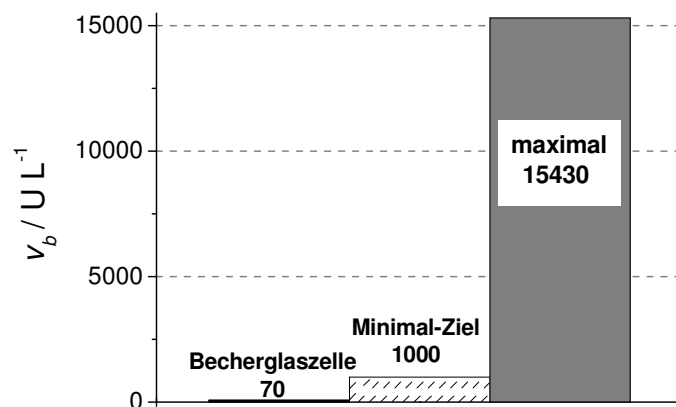


Abbildung 9.2.6: Vergleich von erwarteter und gemessener Bildungsgeschwindigkeit v_b

Bei Messungen der Bildungsgeschwindigkeit von $\text{ABTS}^{\bullet}$ in der Durchflusszelle (Abbildung 9.2.5 u. Abbildung 9.2.6) zeigte sich, dass die Erwartungen von etwa 1000 U L^{-1} bei weitem übertroffen wurden. Selbst bei geringen Mediatorkonzentrationen von $0,076\text{--}0,152 \text{ mM}$, wurden Bildungsgeschwindigkeit jenseits von 2000 U L^{-1} erreicht. Tatsächlich wurde mit einer Konzentration von $0,75 \text{ mM ABTS}^{2-}$ und einer Fließgeschwindigkeit von 522 mL min^{-1} eine maximale Bildungsgeschwindigkeit von 15430 U L^{-1} (spez. $v_b = 5,6 \mu\text{M s}^{-1} \text{ g}_{\text{Anode}}^{-1}$) erreicht, also ca. 200fach die Bildungsgeschwindigkeit in der Becherglaszelle, obwohl die Elektrodenoberfläche nur 5,6 Mal größer ist. Bezogen auf die Menge (g) eingesetzter Anode und eingesetztem Katalysator (M) wurde somit immerhin eine fünffache Steigerung der Bildungsgeschwindigkeit erreicht, die dann alleine auf den verbesserten Massentransport zurückzuführen ist. Für die Durchflußzelle ergibt sich ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen Fließgeschwindigkeit und Bildungsrate (Abbildung 9.2.7).

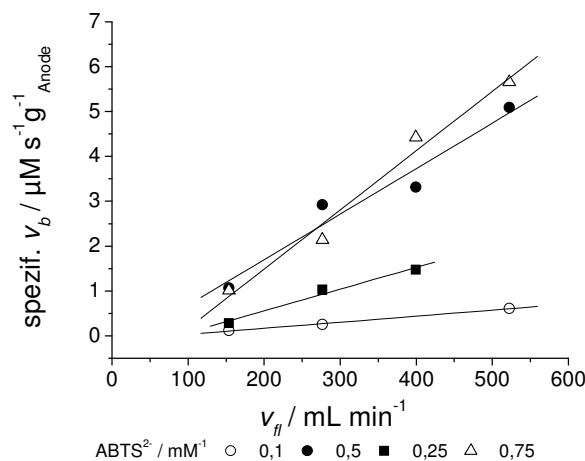


Abbildung 9.2.7: Einfluss des verbesserten Massentransports auf die Bildungsgeschwindigkeit des Radikalkations

Die Abweichungen der einzelnen Messungen voneinander sind auf unterschiedliche Kontaktierung und auf die hohe Affinität des Dikations zur Elektrode zurück zu führen.

Betrachtet man nun die Abhängigkeit der Bildungsgeschwindigkeit von der eingesetzten Konzentration die in Abbildung 9.2.8 dargestellt ist, so zeigt sich deutlich, dass für es jede Fließgeschwindigkeit eine Sättigungskonzentration gibt, bei der dann der Massentransport limitierend auf eine weitere Radikalkation-Bildung wirkt. Innerhalb eines Konzentrationsbereiches bis ca. 0,5 mM Mediator wächst die Bildungsgeschwindigkeit ebenfalls linear mit der Mediatorkonzentration.

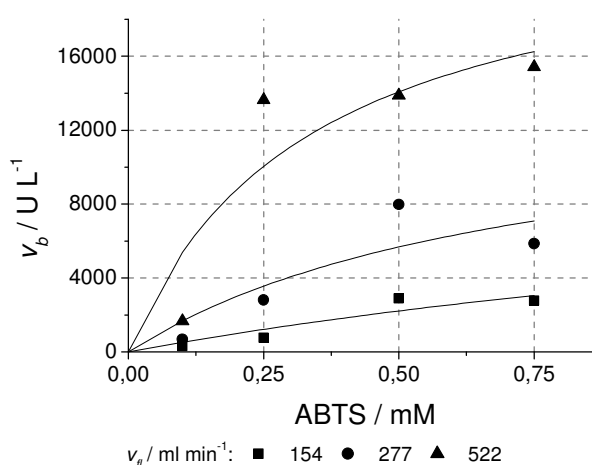


Abbildung 9.2.8: Abhängigkeit von v_b (ABTS^*) von der Konzentration an ABTS^{2-} , die Fließgeschwindigkeit v_f ist jeweils angegeben. Linien als Visualisierungshilfe.

Durch die Verwendung der Durchflusszelle anstelle der Becherglaszelle kann man nun die Bildungsgeschwindigkeit des Radikalkations über die eingesetzte Konzentration und die Fließgeschwindigkeit je nach Bedarf einstellen und damit immer ausreichend oxidierten Mediator zur Kofaktorregenerierung zur Verfügung stellen. Alleine über den Massentransport ist die Konzentration an Radikalkation über einen weiten Bereich durchstimmbar. Einhergehend mit der Überwindung der Massentransportlimitierung ist auch die Anfangsphase, während der kein Radikalkation messbar ist,⁵² wesentlich verkürzt (Abbildung 9.2.9).

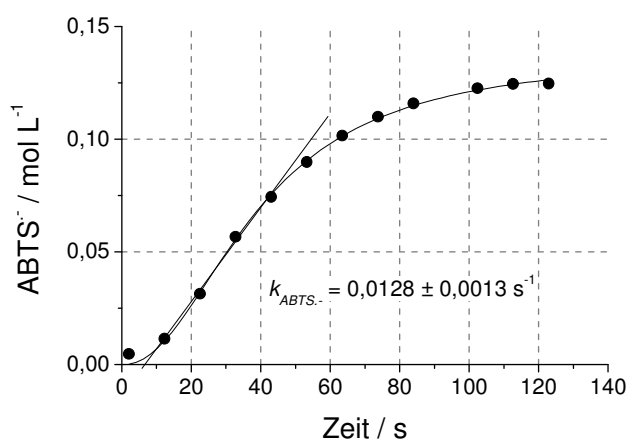


Abbildung 9.2.9: Typischer Konzentrations-Zeit-Verlauf der Bildung von ABTS•⁺ in der Durchflusszelle ($v_f = 0,5 \text{ L min}^{-1}$ und $\text{ABTS}^{2-} = 0,187 \text{ mM}$); Linie als Visualisierungshilfe

Beachtet man nun, dass für den Konzentrationsbereich 0 - 0,5 mM ABTS²⁻ die Bildungsgeschwindigkeit des Radikalkations linear von der Mediatorkonzentration abhängt (Abbildung 9.2.8), kann man die Geschwindigkeitskonstante der Bildung des Radikalkations aus der Steigung des linearen Anfangsbereichs bestimmen. Die Dimension ergibt sich unter Berücksichtigung der volumenbezogenen Elektrodenmenge (gL^{-1}).

Man kann den linearen Zusammenhang zwischen der Bildungsgeschwindigkeit des Radikalkations (und damit auch des Stroms, der während der Elektrolyse fließt) und der Eduktkonzentration über die Strom-Spannungsgleichung erklären gemäß

⁵² s. a. Kapitel 9.2.1, Abbildung 9.2.2, Seite 87

Gleichung 9.2.1⁵³

$$I = nFA \cdot k^0 \cdot \left[[O](0,t) \cdot \exp\left[\frac{-\alpha nF(E - E^{0'})}{RT}\right] - [R](0,t) \cdot \exp\left[\frac{(1-\alpha)nF(E - E^{0'})}{RT}\right] \right]$$

O = Edukt, R = Produkt, I = Strom, n = Anzahl der übertragenen Elektronen, F = Faraday-Konstante, α = Transferkoeffizient, E = Elektrodenpotential, $E^{0'}$ = Normalpotential, k^0 = het. Geschwindigkeitskonstante, A = Elektrodenfläche

Gleichzeitig hängt die Bildung des Radikals auch linear von der Elektrodenoberfläche A ab, weshalb für die oben beschriebenen Versuche immer dieselbe Elektrode verwendet wurde und die Bildungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der eingesetzten Elektrodenmenge und von den exakten Reaktionsbedingungen (E³MR) bestimmt wurde. Sie ist also abhängig von den Randbedingungen und eine reaktorimmanente Konstante. Die Bildungsgeschwindigkeit hängt für den beobachteten Bereich linear von der Fließgeschwindigkeit der Lösung ab, so lange die Steigerung zu einer proportionalen Erhöhung der Eduktkonzentration an der Elektrode und dem Abtransport des Produkts führt.

Die Potentialabhängigkeit ist in diesem Rahmen vernachlässigbar, da unter potentiostatischen Bedingungen gearbeitet wird.

9.3 Zusammenfassung

- Die Bildungsgeschwindigkeit des Radikalkations hängt annähernd linear von der eingesetzten Mediatorkonzentration und der Fließgeschwindigkeit v_f ab.
- Insgesamt wurde die Bildungsgeschwindigkeit für ABTS^{•-} um mehr als den Faktor 200 auf 15430 U L⁻¹ gesteigert.
- Die Geschwindigkeitskonstante der Bildung des Radikalkations unter den Bedingungen der enzymatischen Synthese (im Reaktor) wurde bestimmt zu:

$$k_{ABTS^{\bullet-}} = 0,0128 \pm 0,0013 \text{ s}^{-1}.$$

⁵³ siehe auch Kapitel A.6, Seite 180 ff.

10 Enzymatische Umsetzungen

Die Charakterisierung der Teilschritte

- A: Elektrochemische Bildung der aktiven Mediatorspezies
- B: Oxidation des reduzierten Kofaktors NADH
- C: Enzymatische Oxidation

erfolgte in den vorherigen Kapiteln, mit dem Ziel, ausgewählte elektrochemische Oxidationsreaktionen mit *in situ* elektrochemisch mediatisierter Regeneration des Kofaktors durchzuführen. Anhand zweier Modellreaktionen werden exemplarisch zwei verschiedene Methoden zur Überwindung der Produktinhibierung der enzymatischen Oxidation vorgestellt.

10.1 Einleitung

Für die *GDH*-katalysierte oxidative Racematspaltung von (*R,S*)-PED zum verbleibenden (*S*)-Diol und dem Hydroxyketon 2-HAP wird ein Reaktor zur integrierten extraktiven Abtrennung des Oxidationsproduktes (Abbildung 10.1.1, D), ein sogenannter extraktiver elektrochemischer Enzym-Membranreaktor (*E³MR*) eingesetzt, um so die Produktinhibierung zu minimieren und eine vollständigen Racematspaltung zu erreichen.

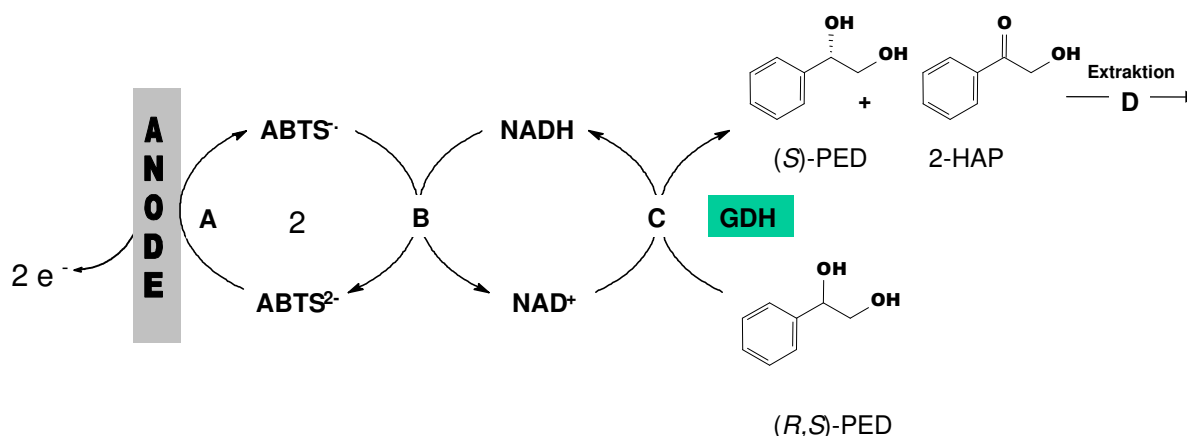


Abbildung 10.1.1: *GDH*-katalysierte Racematspaltung von (*R,S*)-PED, A-D stellen die einzelnen Teilschritte dar.

Bei der *HLADH*-katalysierten Oxidation eines *meso*-Diols wird keine Produktinhibierung beobachtet, da der Aldehyd spontan intramolekular unter Ausbildung eines bicyclischen

Lactols cyclisiert. Diese enzymkatalysierte Oxidation (Abbildung 10.1.2) wird ebenfalls mit der mediatisierten elektrochemischen Kofaktoroxidation gekoppelt.

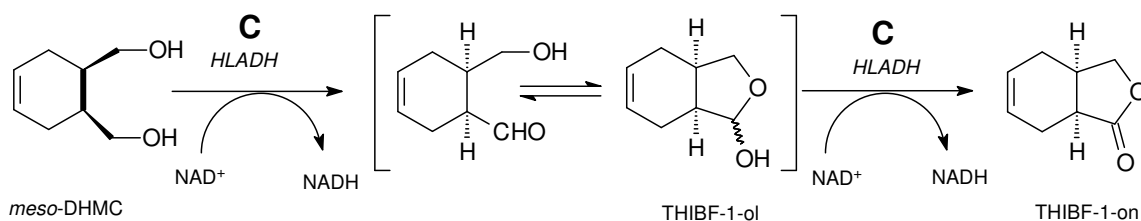


Abbildung 10.1.2: HLADH-katalysierte Lactonisierung

Tabelle 10.1.1 gibt einen Überblick über die Kosten der verwendeten Enzyme.

Enzym	Quelle	Kosten €/U
Alkohol-Dehydrogenase	Pferdeleber	5,5 ^a , 0,60
Glycerin-Dehydrogenasel	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1,24 ^a
Glycerin-Dehydrogenase	<i>Cellulomonas</i> sp.	0,07 ^b

Tabelle 10.1.1: Preise verschiedener Dehydrogenasen; Stand: 07-2002, ^a als Suspension sonst Lyophilisat, Quelle: ^bJülich Fine Chemicals sonst Sigma-Aldrich

Mit Abstand am günstigsten mit 7 Cent je U ist die Glycerin-Dehydrogenase aus *Cellulomonas* sp., welche daher als einzige im extraktiven elektrochemischen enzym-Membran-Reaktor (E³MR) eingesetzt wurde.

Zur Durchführung von einfachen Elektrolysen im Satzreaktor (Batch-Elektrolysen) sind in Abbildung 10.1.3 zwei Apparaturen dargestellt, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

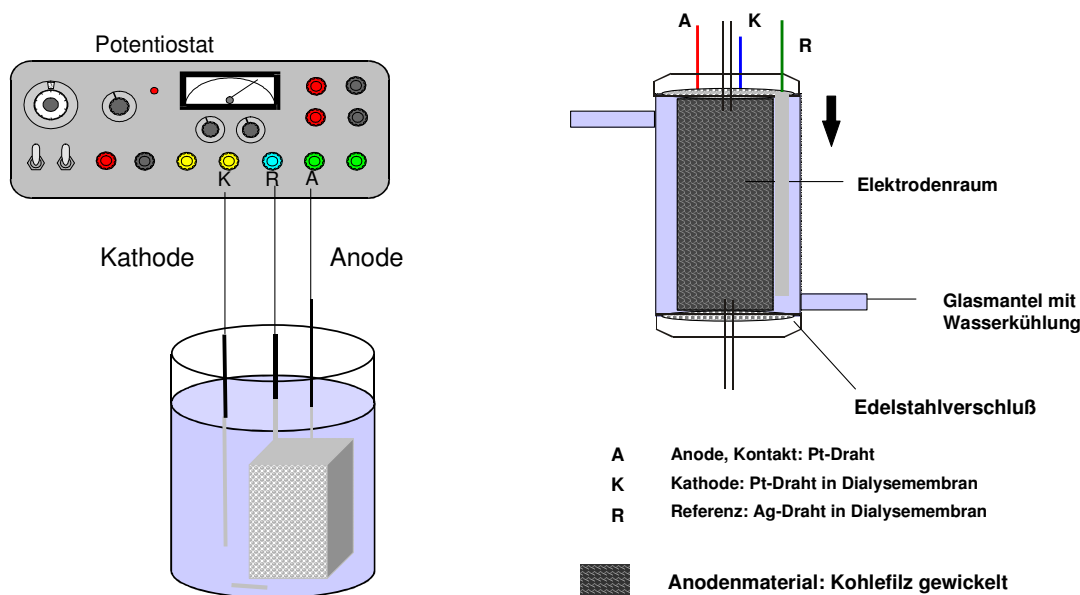


Abbildung 10.1.3: Links: einfache gerührte Becherglaszelle mit Drei-Elektrodenanordnung, (RVC-Anode) zur potentiostatischen (potentialkontrollierten) Elektrolyse; rechts: Durchflusszelle, Pfeil gibt die Flussrichtung an.

Aufgrund des einfachen Aufbaus wurde zunächst immer eine Becherglaszelle (Abbildung 10.1.3, links) verwendet⁵⁴. Um für die *GDH*-katalysierte Racematspaltung die elektrochemische Kofaktorregenerierung mit einer integrierten Extraktion des Hydroxyketons zu kombinieren, ist die Verwendung einer Durchflusszelle, wie sie in Abbildung 10.1.3, rechts dargestellt ist, vorteilhaft. Bei dieser Zelle wurde gewickelter Kohlefilz als Anode verwendet. Da Referenzelektrode und Kathode durch eine Dialysemembran von der Anode getrennt sind, bezeichnet man diesen Aufbau auch als geteilte Zelle. Die Durchflusszelle erweist sich wegen des besseren Elektrodenoberflächen/Reaktorvolumenverhältnisses und des verbesserten Massentransports durch die Minimierung der Filmdiffusionsschichten an der Anode als wesentlich effizienter für die Darstellung des Radikalkations.⁵⁵

⁵⁴ Eine sog. „quasi-geteilte“ Elektrolysezelle, wenn Anoden- und Kathodenraum nicht getrennt sind, aber die Elektroden stark unterschiedliche Flächen aufweisen, siehe auch Kapitel A.2, Seite 171 ff.

⁵⁵ siehe auch Kapitel 9.2.2, Seite 87 ff.

10.2 Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase (*HLADH*)

Die *HLADH*-katalysierte Darstellung von (3*aR*,7*aS*)-3*a*,4,7,7*a*-Tetrahydro-3*H*-isobenzofuran-1-on (THIBF-1-on) ausgehend *meso*-3,4-Dihydroxymethylcyclohex-1-en ((*meso*-DHMC) Abbildung 10.2.1) wurde in einer Becherglaszelle durchgeführt.

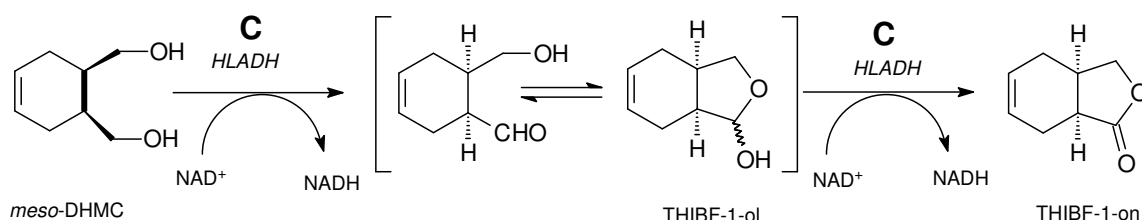


Abbildung 10.2.1: *HLADH*-katalysierte Lactonisierung

Der Verlauf dreier Elektrolysen ist in Abbildung 10.2.2 dargestellt. Ohne Zusatz des Mediators und auch in Abwesenheit des Enzyms konnte kein Lacton nachgewiesen werden.

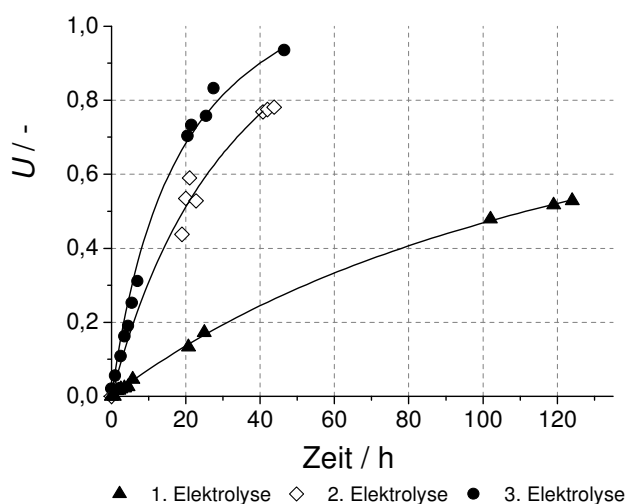


Abbildung 10.2.2: *HLADH*-katalysierte Batch-Elektrolysen von *meso*-3,4-Dihydroxymethylcyclohex-1-en zu (3*aR*,7*aS*)-3*a*,4,7,7*a*-Tetrahydro-3*H*-isobenzofuran-1-on in einer quasi-geteilten Becherglaszelle, Anode RVC, Kathode Pt-Draht, Referenz: Ag|AgCl-Schlauchelektrode, potentiostatische Elektrolyse 585 mV; Linien als Visualisierungshilfe, Startverhältnisse: Substrat:Kofaktor:Mediator 1. Elektrolyse 1 : 0,01 : 0,001, 2. Elektrolyse 1 : 0,035 : 0,017, 3. Elektrolyse: 1 : 0,063 : 0,028; genaue Angaben zu den Versuchsbedingungen siehe Tabelle 14.10.1, Seite 159

Von Elektrolyse eins bis Elektrolyse drei wurde eine deutliche Steigerung hinsichtlich der Verkürzung der Reaktionszeit und des Umsatzes (U)⁵⁶, der von etwa 50 % auf über 90 % gesteigert werden konnte. erreicht. Dies spiegelt sich auch in der *sty* (space time yield) in Abbildung 10.2.3 wider.

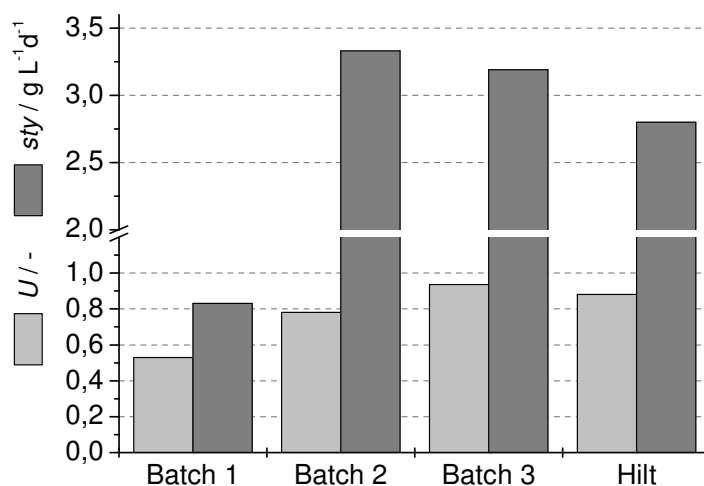


Abbildung 10.2.3: Vergleich des Umsatzes und der *sty* der Elektrolysen 1 bis 3 mit der Elektrolyse von *Hilt* [34, 35, 70].

Mit der einfachen Becherglaszelle konnten bis zu 3,3 g L⁻¹d⁻¹ an Lacton (ee > 0,99) erreicht werden. Damit wird im Vergleich zu Elektrolysen, die von *Hilt* mit Phenanthrolindionderivaten (PD) als Mediatoren durchgeführt wurden eine Verkürzung der Reaktionsdauer erreicht, wobei vergleichbare *sty* (2,8 g L⁻¹d⁻¹ mit PDMe als Mediator, siehe auch Tabelle 10.2.1, Seite 100) erzielt wurden [34, 35, 70].

In Abbildung 10.2.4 sind die *ttn* von Kofaktor und Mediator für die drei Elektrolysen im Vergleich dargestellt.

⁵⁶
$$U = 1 - \frac{[Edukt]}{[Edukt]_0}$$

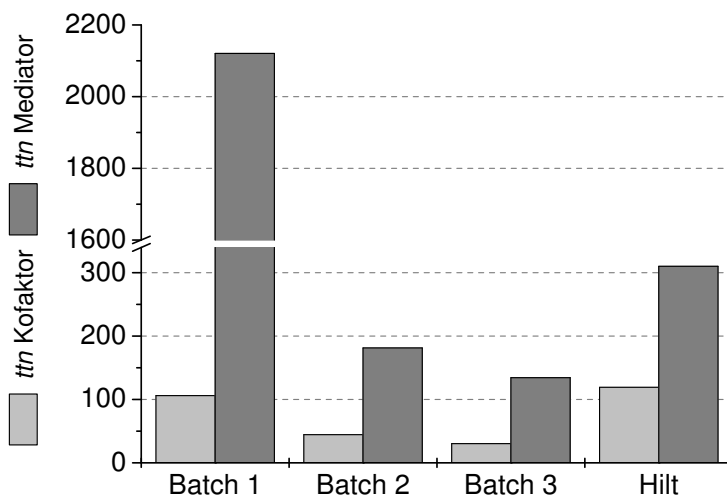


Abbildung 10.2.4: Vergleich der ttn^{57} von Kofaktor und Mediator der Elektrolysen 1 bis 3 mit der Elektrolyse von *Hilt* [34, 35, 70].

Die ttn des Kofaktors⁵⁷ liegt mit maximal 106 etwa im Bereich von *Hilt* (ttn 119), meistens jedoch darunter. Die ttn des Kofaktors ist zum einen durch die gewählten Konzentrationsverhältnisse limitiert, und zum anderen konnten die ersten beiden Elektrolysen aufgrund apparativer Schwierigkeiten⁵⁸ nicht zu vollständigen Umsätzen geführt werden. Den Reaktionsbedingungen nach *Hilt* entspricht am ehesten die erste Elektrolyse. Es konnte mit nur 53% Umsatz eine ttn des Mediators von 2120 erreicht werden. Dieser Wert entspricht einer Steigerung gegenüber der Reaktion von *Hilt* um das Siebenfache und übertrifft sogar die beste mit dem Mediator $[Ru(PD)_3]$ erzielte ttn von 1800 [34, 35, 70]. Da mit einer effektiveren Bildung des Radikalkations geringere Konzentrationen des Mediators eingesetzt werden können, sollte es möglich sein, durch die Verwendung der Durchflusszelle eine deutliche Steigerung der ttn des Mediators zu erzielen. Um die ttn des Kofaktors z. B. durch kürzere Reaktionszeiten zu verbessern, muss die Kinetik der enzymatischen Umsetzung genau bestimmt werden und dann ein geeigneter Reaktor gewählt werden. Auch hier kann eventuell die Extraktion des Oxidationsprodukts zu effektiveren Reaktionsführung genutzt werden, da eine Extraktion des Lactons durch eine organische Phase schneller zu einer vollständigen Umsetzung des *meso*-Diols führt [79].

⁵⁷ Die ttn wurde berechnet unter der Annahme, dass zwei Mol Kofaktor und vier Mol Radikalkation je Mol Lacton verbraucht werden.

⁵⁸ Kurzschlüsse

10.2.1 Zusammenfassung HLADH

Die Ergebnisse der drei Elektrolysen sind in Tabelle 10.2.1 aufgelistet.

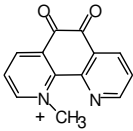
	1. Elektrolyse	2. Elektrolyse	3. Elektrolyse	nach <i>Hilt</i>
Mediator	ABTS ²⁻	ABTS ²⁻	ABTS ²⁻	 PDMC
<i>U</i> / -	0,53	0,78	0,935	0,88
<i>ee</i> / -	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
<i>ttn</i> ⁵⁹ (max. <i>ttn</i>) /-	NAD ⁺ : 106 (200); ABTS ²⁻ : 2120 (4000)	NAD ⁺ : 44 (56), ABTS ²⁻ : 183 (235)	NAD ⁺ : 30 (32), ABTS ²⁻ : 134 (143)	NAD ⁺ : 119 PDMC: 310
<i>sty</i> / g L ⁻¹ d ⁻¹	0,83	3,33	3,19	2,8

Tabelle 10.2.1: Ergebnisse der HLADH-katalysierten elektroenzymatischen Oxidationen

- Es wurde enantiomerenreines THIBF-1-on dargestellt.
- Die Ergebnisse von *Hilt* mit PDMC als Mediator wurden mit *ttn* (Mediator) von bis zu 2120 und einer *sty* von bis zu 3,33 g L⁻¹ d⁻¹ übertroffen.
- ABTS²⁻ | ABTS^{•-} ist ein effektiver Mediator für die indirekte elektrochemische Regeneration von NAD⁺.
- *meso*-DHMC ist ein geeignetes Substrat, um durch intramolekulare Zyklisierung eine Produktinhibition durch Hydroxycarbonylverbindungen zu verringern und zu hohen Umsätzen zu gelangen.

⁵⁹Die *ttn* wurde berechnet unter der Annahme, dass zwei Mol NAD⁺ und vier Mol ABTS^{•-} je Mol Lacton benötigt werden.

10.3 GDH

10.3.1 Batch-Elektrolysen ohne Extraktion des Hydroxyketons

Die in Abbildung 10.1.1 dargestellte Racematspaltung von (R,S)-PED wurde ohne Extraktion des Oxidationsprodukts durchgeführt.

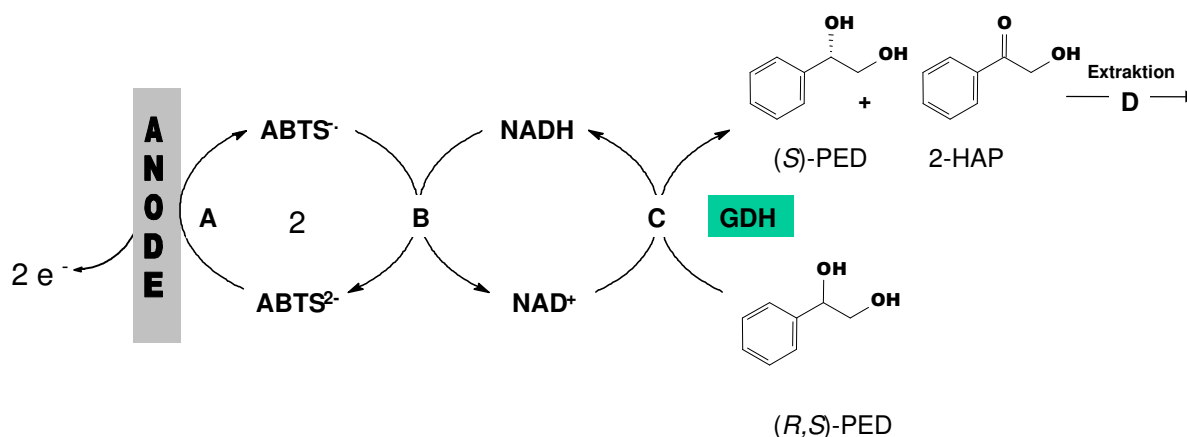


Abbildung 10.1.1: *GDH*-katalysierte Racematspaltung von (R,S)-PED, A-D stellen die einzelnen Teilschritte dar.

Die Umsatz-Zeit-Verläufe dieser Batch-Elektrolysen sowohl in der Becherglaszelle, als auch in der Durchflusszelle sind in Abbildung 10.3.1 dargestellt.

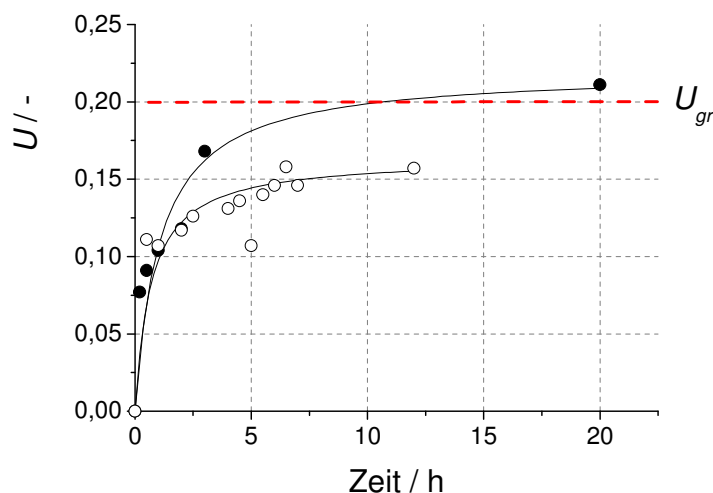


Abbildung 10.3.1: Batch-Elektrolyse: Racematspaltung von (R,S)-PED mit GDH aus *Cellulomonas* sp.; gefüllte Kreise Durchflusszelle ($\tau = 16$ s), A: Kohlefilz-Wickelektrode, K: Pt-Draht, Ag-Pseudoreferenz, leere Kreise: Becherglaszelle, A: Kohlefilz, K: Pt-Draht, R: Ag|AgCl-Schlauchelektrode; Linien als Visualisierungshilfen; U_{gr} = simulierter Grenzumsatz, ab dem die Reaktionsgeschwindigkeit minimal wird.

Im Vergleich zu den *HLADH*-katalysierten Lactonbildung kann keine vollständige Umsetzung innerhalb eines sinnvollen Zeitrahmens erreicht werden, da das gebildete 2-HAP die enzymatische Oxidation durch Inhibierung des Enzyms verlangsamt. Dieser Effekt kann durch die mediatisierte anodische Kofaktoroxidation nicht kompensiert werden, was bereits für PDMe als Mediator gezeigt wurde [86]. Der der maximal erzielte Umsatz stimmt gut mit dem durch Simulation berechneten Umsatz von 20 % überein (Abbildung 3.3.14, Seite 29). Der Einsatz einer Durchflusszelle mit der in Kapitel 9.2, Seite 86 ff., beschriebenen größeren $\text{ABTS}^{\bullet-}$ -Bildungsgeschwindigkeit führt zu einem höheren Umsatz innerhalb einer kürzeren Zeitspanne (siehe auch Abbildung 10.3.1, Seite 101). In Abbildung 10.3.2 sind die *ttn* für Kofaktor und Mediator dargestellt.

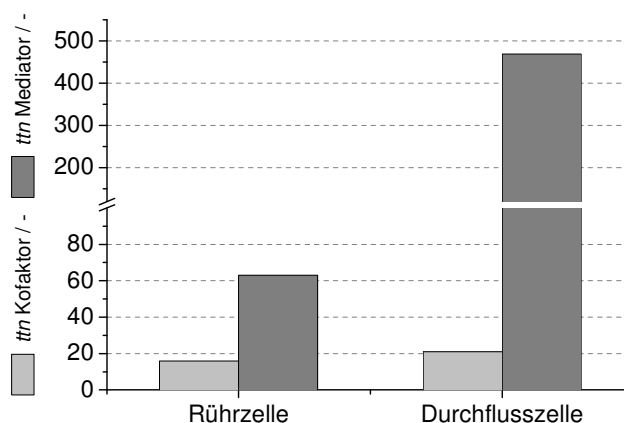


Abbildung 10.3.2: Vergleich der *ttn* von Kofaktor und Mediator der Elektrolysen

Hier erweist sich wiederum die Durchflusszelle als wesentlich effektiver für die elektrochemische Generierung des Radikalkations, da eine geringere Mediatorkonzentration eingesetzt werden kann und somit die *ttn* des Mediators um mehr als das Siebenfache gesteigert werden kann. Die *ttn* des Kofaktors ist gering, da nur ein geringer Umsatz erzielt wurde. Ausgehend von der Ausgangskonzentration hätte maximal eine *ttn* des Kofaktors von 100 erreicht werden können.

10.3.1.1 Zusammenfassung

In Tabelle 10.3.1 sind die Ergebnisse der Batch-Elektrolyse ohne Extraktion des Hydroxyketons zusammengefasst.

	Becherglaszelle	Durchflusszelle
<i>U</i> / -	0,16	0,21
<i>ee</i>	0,13	0,18
<i>ttn</i> ⁶⁰ / -	NAD ⁺ : 16 ABTS ²⁻ : 63	NAD ⁺ : 21 ABTS ²⁻ : 469

Tabelle 10.3.1: Vergleich der einfachen Batch-Elektrolysen

- Für ABTS²⁻ | ABTS^{•-} wurde eine *ttn* von mehr als 450 erzielt.
- Die Durchflusszelle ist einer gerührten Becherglaszelle überlegen.
- Ohne eine Extraktion des Hydroxyketons ist keine vollständige Racematspaltung möglich.

⁶⁰Die *ttn* wurde berechnet unter der Annahme, dass ein Mol NAD⁺ und zwei Mol ABTS^{•-} je Mol Produkt (2-HAP) benötigt werden.

10.3.2 Batch-Elektrolysen mit kontinuierlicher Produktabtrennung - der E³MR

Zur integrierten Extraktion des gebildeten Hydroxyketons 2-HAP wurde ein von *Kruse* et al. [40, 247, 248] vorgeschlagener Reaktor modifiziert, der erfolgreich auf andere Systeme und auch auf die Racematspaltung von (*R,S*)-PED angewandt wurde [37, 87, 249], (Abbildung 10.3.3). Dieser **extraktive elektrochemische Enzym-Membran-Reaktor** wird im folgenden als **E³MR** bezeichnet.

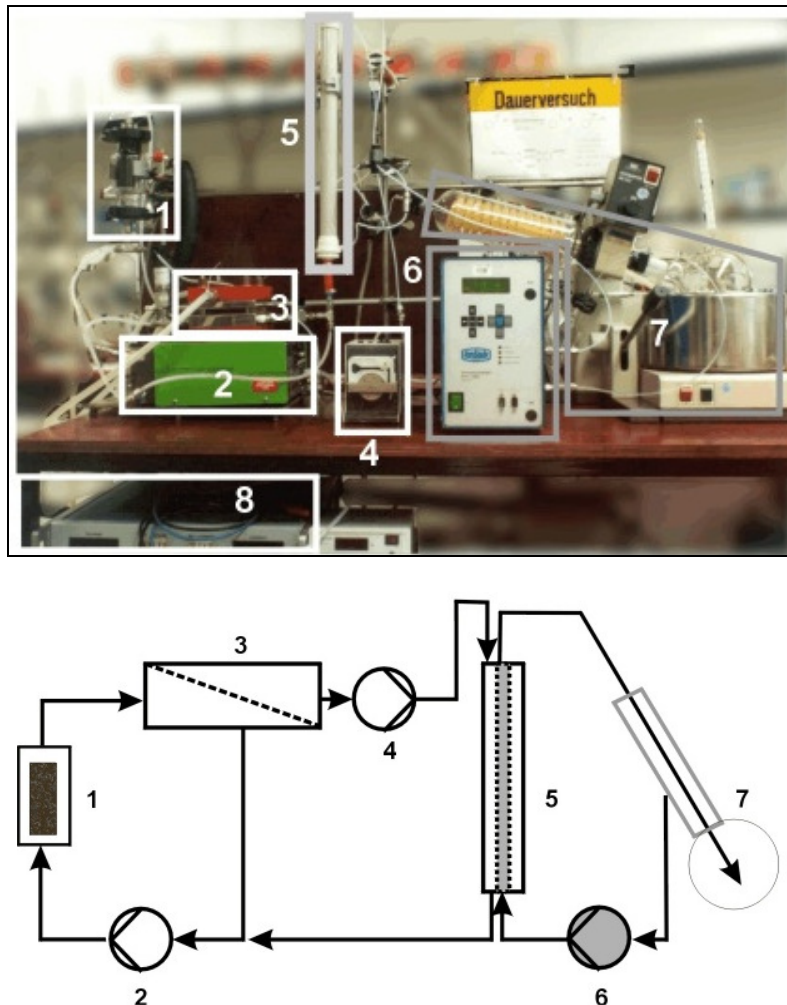


Abbildung 10.3.3: Elektrochemischer Bi-Membran-Reaktor nach *Kruse* : 1)Elektrochemische Zelle, 2,4) wässrige Kreislumpumpen, 3) Ultrafiltrationsmodul, 5) Extraktionsmodul, 6) organische Kreislumpumpe (*iso*-Oktan), 7) Rotationsverdampfer und Wasserbad, 8) Potentiostat

Bei diesem Bi-Membran-Reaktor nutzt man die unterschiedliche Hydrophobizität von Diol und Hydroxyketon, um das Hydroxyketon dem wässrigen Kreislauf zu entziehen und so die Inhibitorkonzentration zu minimieren. Im gezeigten Aufbau werden zwei wässrigen Kreisläufe benötigt, von denen einer allein der Rückhaltung des Enzyms dient. Ersetzt man das Extraktionsmodul durch ein Ultrafiltrations (UF)-Hohlfasermodule, so benötigt man nur

noch einen wässrigen Kreislauf. Der so modifizierte Aufbau ist in Abbildung 14.10.3 dargestellt.

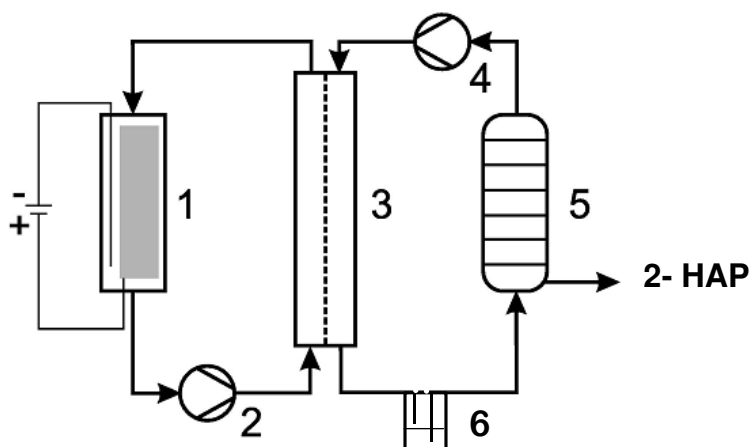


Abbildung 10.3.4: E³MR: 1) Elektrochemische Durchflussszelle, 2) wässrige Kreislaufrpumpe (Peristaltikpumpe), 3) Extraktionsmodul (UF-Hohlfasermembran) 10 kD, 8000 cm² Austauschfläche, 4) organische Kreislaufrpumpe (*iso*-Oktan), 5) Rotationsverdampfer, 6) Druckausgleichgefäß

Im direkten Vergleich zu Abbildung 10.3.3 ist dieser Aufbau nicht nur wesentlich weniger aufwendig, sondern das Volumen der wässrigen Phase wird um rund die Hälfte gegenüber dem Aufbau nach *Kruse et al.* verringert. Da die enzymatische Umsetzung und die Kofaktorregeneration gleichzeitig in einem Kreislauf stattfinden und Verweilzeit in der elektrochemischen Durchflussszelle lediglich 30 s beträgt, kann die Durchflussszelle als Rührkessel betrachtet werden. Dies zeigt sich auch bei der elektrochemischen Darstellung des Radikalkations, welche über einen weiten Bereich linear von der Fließgeschwindigkeit v_{fl} durch die Durchflussszelle abhängt (Kapitel 9.2.2, Abbildung 9.2.7, Seite 91). Im Gegensatz zum von *Kruse, Liese* oder *Rissom* verwendeten Reaktor muss kein Differenzdruck über die Membran des **Extraktionsmoduls** angelegt werden, was den Aufbau nochmals simplifiziert. Die **elektrochemische Durchflussszelle** wirkt als Blasenfalle und die Reaktionslösung wird für die Elektrolyse automatisch über die Extraktionsmembran entgast. Tatsächlich kann man den **E³MR** durch die Kompartimentierung mit einer biologischen Zelle vergleichen. Man nutzt die unterschiedlichen Lösungseigenschaften der Reaktionskomponenten aus und retentiert so die geladenen, polaren und makromolekularen Verbindungen (Mediator, Kofaktor, Diol und Enzym) im wässrigen Kreislauf, während das Hydroxyketon im Gegenstromprinzip in die organische Phase extrahiert wird. Das **Druckausgleichgefäß** ermöglicht eine Entkopplung des Minderdruckbereichs im Rotationsverdampfer vom organischen Kreislauf im Extraktionsmodul, welches bei Normaldruck betrieben wird.

10.3.3 Extraktion

Zunächst wird ein Lösungsmittel gesucht, das einerseits nicht mischbar mit Wasser ist und andererseits selektiv das gebildete 2-HAP aus der wässrigen Phase extrahiert. Außerdem muss das Extraktionsmodul eine hinreichende Stabilität gegenüber dem Lösungsmittel besitzen. Insbesondere die Hohlfasern und die Verklebung der Fasern mit dem Gehäuse dürfen nicht in Gegenwart des organischen Lösungsmittels quellen, da dies zur Zerstörung des Moduls führen kann [250]. *iso*-Oktan erfüllt diese Voraussetzungen und die Ergebnisse der Extraktion im oben gezeigten Reaktor (Abbildung 14.10.3, Seite 105) unter gleichen Prozessparametern wie im späteren Gesamtversuch, sind in Abbildung 10.3.5 und Abbildung 10.3.6 dargestellt.

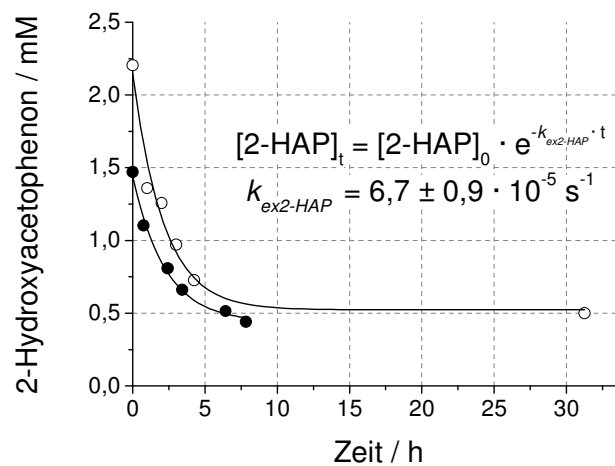


Abbildung 10.3.5: Extraktion von 2-HAP mit *iso*-Oktan; Punkte: Messwerte zweier Messreihen (UF-Hohlfasermodule, 10 kD)

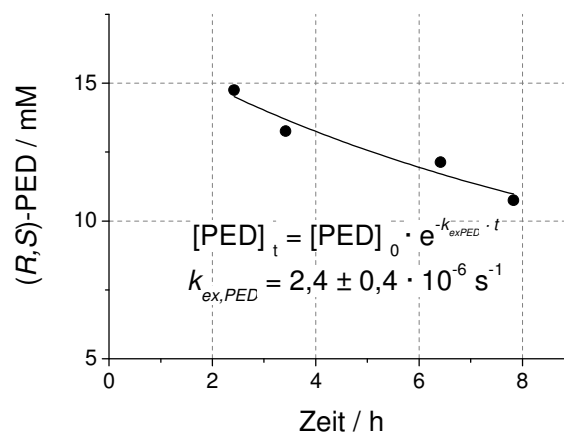


Abbildung 10.3.6: Extraktion von (R,S)-PED mit *iso*-Oktan (UF-Hohlfasermodule, 10 kD)

Für die Abnahme von (*R,S*)-PED bzw. von 2-HAP kann näherungsweise ein Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung angenommen werden (Abbildung 10.3.5 und Abbildung 10.3.6, Seite 106). Die Geschwindigkeitskonstanten der Extraktion des Hydroxyketons und des Diols verhalten sich 28 : 1, womit eine hinreichende Selektivität für die Verwendung zur Extraktion des Inhibitors 2-HAP gegeben ist. Es zeigte sich während des Versuchs, dass 2-HAP bei Drücken < 180 mbar, einer Wasserbadtemperatur von 50-60°C und einer Temperatur des Kühlmittels des Rotationsverdampfer < 10°C sublimiert, von den Kühlwendeln des Rotationsverdampfers in das Destillat ausgewaschen wird und sich damit in der organischen Phase bis zur Sättigung anreichert. Um eine Sublimation des Hydroxyketons zu vermeiden wurde bei konstantem Druck von 180 mbar und konstanter Temperatur (Wasserbad 60°C, Kühlung 10°C) gearbeitet. Damit ist jedoch die Extraktionsleistung durch die Destillationsleistung limitiert.

10.3.4 Umsetzungen im E³MR

10.3.4.1 E³MR-1

Es wurden zwei Versuche durchgeführt, der erste Versuch musste nach 284 h aufgrund technischer Probleme mit dem UF-Modul abgebrochen werden. Die Ergebnisse des ersten Versuches zur Racematspaltung sind in Abbildung 10.3.7 graphisch dargestellt.

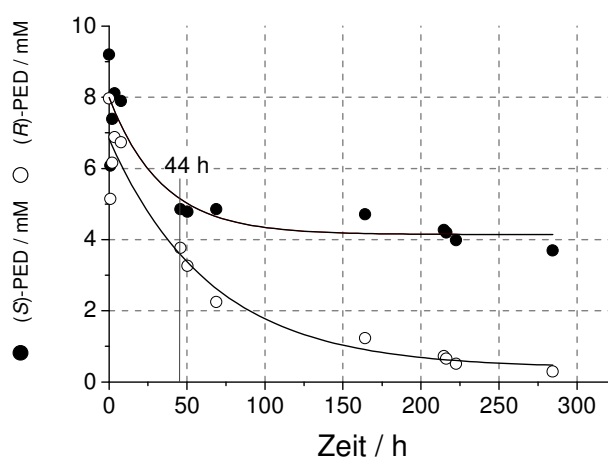


Abbildung 10.3.7: E³MR 1 - Racematspaltung von (*R,S*)-PED mit kontinuierlicher Extraktion von 2-HAP, Startbedingungen: (*R,S*)-PED 17 mM, NAD⁺: 0,37 mM, ABTS²⁻ 0,025 mM, GDH 0,77 U·mL⁻¹, Nachdosierungen siehe Tabelle 14.10.3, Seite 163; Linien als Visualisierungshilfe

Im zeitlich Verlauf zeigt sich deutlich, dass zwar die Konzentration an Phenylethandiol abnimmt, sich jedoch das Enantiomerenverhältnis bis etwa 44 h nicht signifikant verändert. Da sowohl eine direkte elektrochemische als auch eine ABTS⁻-katalysierte Oxidation des PED durch Voruntersuchungen⁶¹ ausgeschlossen werden konnte, und in der organischen Phasen nur geringe Spuren des Diols zu finden waren, ist die Abnahme der Konzentration an PED vermutlich auf eine Physi- oder Chemisorption am Modul oder den verwendeten Schläuchen zurückzuführen.

In Abbildung 10.3.8 ist der zeitliche Verlauf von Umsatz und Enantiomerenüberschuss ab 44h (als virtueller Anfangspunkt) dargestellt.

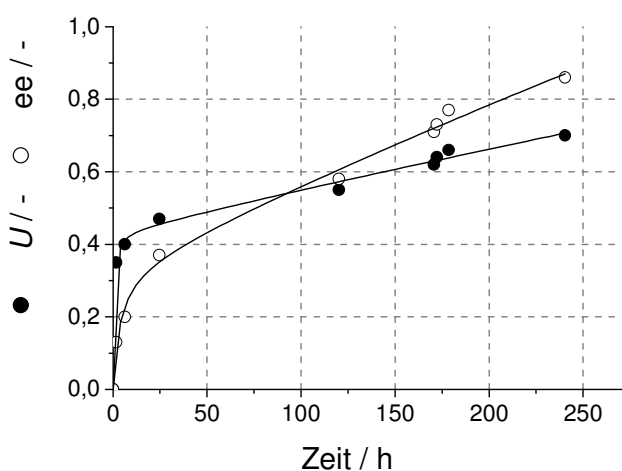


Abbildung 10.3.8: E³MR 1 - zeitlicher Verlauf von *ee* und *U* ab 44 h (gleich 0 gesetzt), Linien als Visualisierungshilfe

Bei einem Umsatz von 0,82 wurde ein Enantiomerenüberschuss von 0,86 des (*S*)-PED erzielt. Eine ideale Racematspaltung ist bei einem Umsatz von 0,5 vollständig. Da hier der Umsatz deutlich größer ist und zudem die Racematspaltung nicht vollständig ist, lässt dies zwei Schlussfolgerungen zu. Einerseits könnte die Selektivität des Enzyms⁶² [251, 252] zu gering sein und andererseits könnte die unselektive Adsorption des Diols den Umsatz beeinflussen. Eine Auftragung des Enantiomerenüberschusses gegen den Umsatz (Abbildung 10.3.9) zeigt, dass die Adsorption des Diols einen höheren Umsatz vortäuscht.

⁶¹Nebenreaktionen siehe Kapitel 7.4.3, Seite 73 ff

⁶² $E = \frac{K_M(R)}{v_{\max}(R)} / \frac{K_M(S)}{v_{\max}(S)} = 24$, nur als grobe Kenngröße, da dieser Wert bei Gleichgewichtsreaktionen und Produktinhibierung zu stark vereinfachend ist.

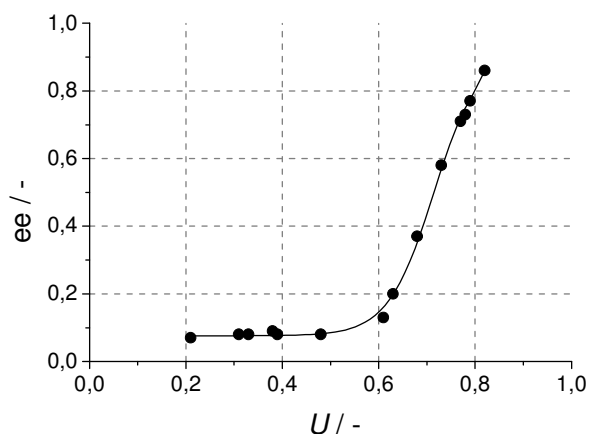


Abbildung 10.3.9. E³MR 1 – ee als Funktion von U, Linien als Visualisierungshilfe

Zu Beginn nimmt die Konzentration an Diol ab, wobei das Enantiomerenverhältnis konstant bleibt. Erst ab $U = 0,6$ nimmt der ee zu.

10.3.4.2 E³MR-2

Für den zweiten Versuch wurde das Modul über Nacht mit (R,S)-PED (33 mM) vorbehandelt, damit, keine weiteren Adsorptionseffekte des Diols den Umsatz beeinflussen. Der Verlauf des zweiten Versuch ist in Abbildung 10.3.10 dargestellt.

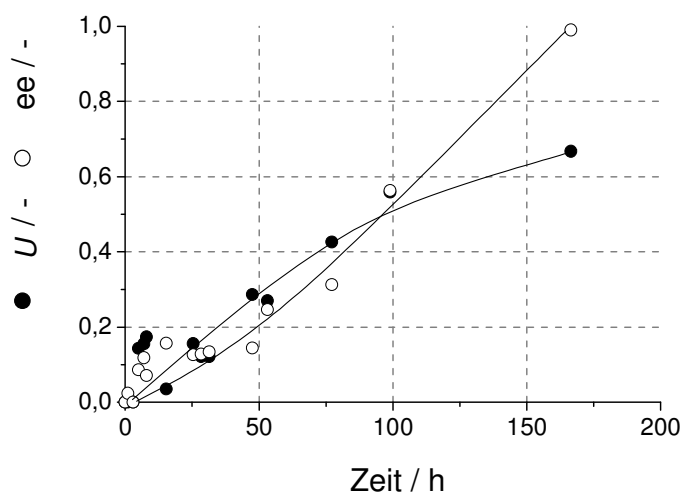


Abbildung 10.3.10: E³MR-2 - zeitlicher Verlauf von ee und U ; Startbedingungen: (R,S)-PED 33 mM, NAD⁺: 0,4 mM, ABTS²⁻ 0,2 mM, GDH 0,4 U mL⁻¹, Nachdosierungen siehe Tabelle 14.10.3, Seite 163; Linien als Visualisierungshilfe

Eine vollständige Racematspaltung gelingt nach 166 h mit einem Umsatz von 0,67. Nach einem Umsatz von 0,7 wurde die Reaktion abgebrochen. Der Enantiomerenüberschuss als Funktion des Umsatzes ist in Abbildung 10.3.11 gezeigt.

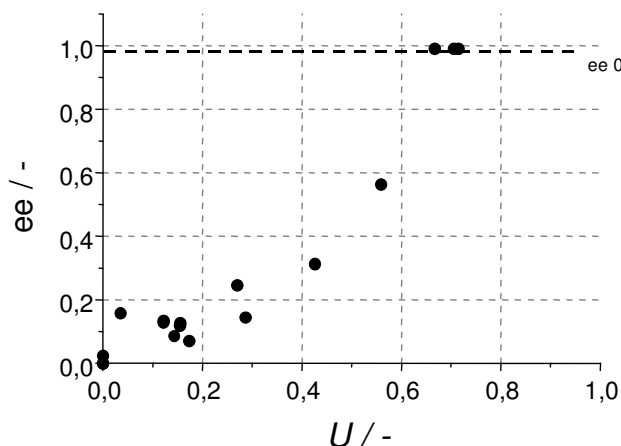


Abbildung 10.3.11: E³MR 2 – Verhältnis von *ee* und *U*. Die Nachweisgrenze des *ee* mit 0,99 ist eingezeichnet.

Während der Reaktion wurde mehrfach Enzym nachdosiert, da die Enzymaktivität unerwartet rasch abnahm; der Proteingehalt und die Enzymaktivität der Reaktionslösung sind in Abbildung 10.3.12 dargestellt.

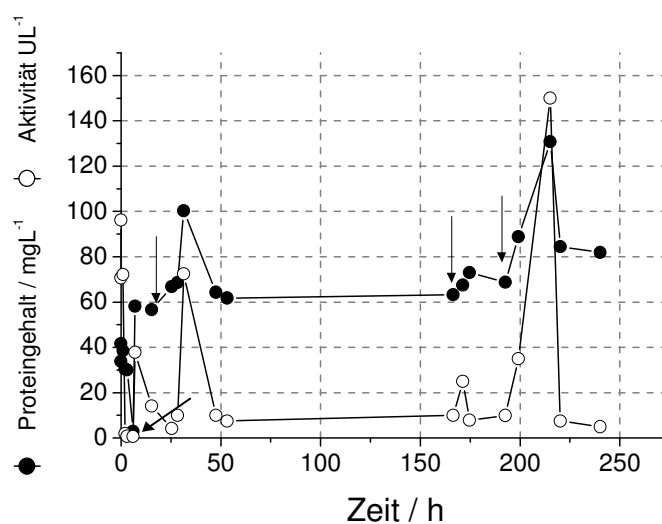


Abbildung 10.3.12: E³MR 2 – *GDH*, Aktivität und Proteingehalt, Nachdosierungen sind durch Pfeile angezeigt, siehe Tabelle 14.10.3, Seite 163

Die Aktivitätsabnahme ist eine Folge der Adsorption der *GDH* an die Membran des Extraktionsmoduls, da Voruntersuchungen (siehe Kapitel 3.3.2.4, Seite 24) gezeigt haben, dass die *GDH* aus *Cellulomonas* sp. während einer einfachen Batch-Elektrolyse stabil ist. An

der Membran ist das Enzym einem direkten Kontakt mit *iso*-Oktan ausgesetzt. Da Stabilitätsuntersuchungen (Kapitel 3.3.2.5, Seite 25) gezeigt haben, dass die *GDH* in Gegenwart von *iso*-Oktan rasch desaktiviert, führt wahrscheinlich auch die Adsorption an der Membran des Extraktionsmoduls zur Desaktivierung, da dort der Kontakt zwischen wässriger und organischer Phase stattfindet. Ein Teil des Enzyms desorbiert, ist aber offenbar nicht mehr aktiv. Das erklärt auch, weshalb die Enzymaktivität trotz steigenden Proteingehalts der Lösung immer wieder fast vollständig einbricht. Ein Versuch, die Membran des Hohlfasermoduls mit Protein, in diesem Fall Rinderserum-Albumin (BSA) vorzubelegen, schlug fehl, da der Mediator direkt mit der BSA reagiert⁶³. Mit Hilfe der kontinuierlichen Extraktion des Hydroxyketons gelang es in diesem Versuch, die Racematspaltung von (*R,S*)-PED erfolgreich durchzuführen und enantiomerenreines (*S*)-PED zu erhalten (Abbildung 10.3.13).



Abbildung 10.3.13: 30 mg (*S*)-Phenylethan-1,2-diol, ee > 0,99;

Ausbeute η insgesamt 350 mg, 28,2 % bezogen auf 9,9 mmol Racemat

⁶³ Nebenreaktion mit BSA, siehe auch Abbildung 7.4.7, Seite 75.

10.3.5 Vergleich der Elektrolysen

Tabelle 10.3.2 gibt eine Übersicht über die beiden *GDH*-katalysierten Racematspaltungen im extraktiven elektrochemischen Enzym Membran Reaktor.

	E³MR 1	E³MR 2
<i>U</i> / -	0,82	0,67 (0,7)
<i>ee</i> / -	0,86	> 0,99
<i>ttn</i> / -	NAD ⁺ : 6 ABTS ²⁻ : 190	NAD ⁺ : 9 ABTS ²⁻ : 144

Tabelle 10.3.2: Vergleich der Elektrolysen mit Produktextraktion

Im Vergleich zum ersten Versuch konnte durch die Vorbelegung der Membran mit dem Diol eine vollständige Racematspaltung mit einem Umsatz von 0,67 erreicht werden. Abbildung 10.3.14 gibt einen Überblick über *U* und *ee* der einzelnen Elektrolysen.

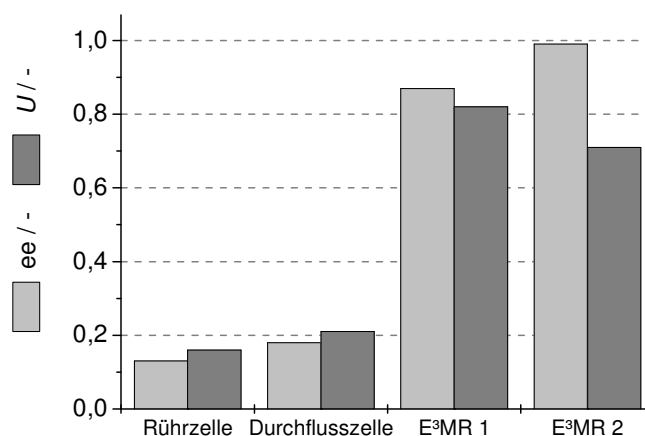


Abbildung 10.3.14: Vergleich von *ee* und *U* der Elektrolysen

Im Vergleich zu den Batch-Elektrolysen ohne Produktextraktion zeigt sich deutlich die Auswirkung der Inhibition durch das Hydroxyketon, denn diese Elektrolysen führten zu keiner vollständigen Racematspaltung und die Reaktionsgeschwindigkeit war bei Umsätzen von 0,15-0,2 nicht mehr messbar. Entsprechend gering sind die Enantiomerenüberschüsse, die ohne Produktextraktion erzielt wurden. Die Reaktionsführung im E³MR erwies sich als Möglichkeit, die Racematspaltung zu hohen Enantiomerenüberschüssen zu führen.

Vergleicht man jedoch die Reaktionen hinsichtlich der *ttn* von Kofaktor und Mediator (Abbildung 10.3.15), so scheinen die Batch-Elektrolysen in der Rührzelle und insbesondere in der Durchflussszelle ohne Extraktion von 2-HAP besser zu sein.

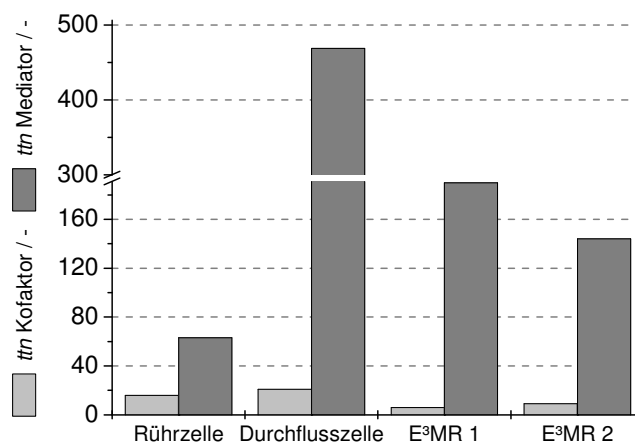


Abbildung 10.3.15: *GDH* - Vergleich der *ttn* von Kofaktor und Mediator

Tatsächlich ist die *ttn* für den Kofaktor für beide Versuche im E³MR gering, da aufgrund der langen Reaktionsdauer Kofaktor nachdosiert werden musste, um eine ausreichende Konzentration an aktivem Kofaktor zu gewährleisten⁶⁴. Die *ttn* des Mediator ist ebenfalls mit 140-190 geringer als bei der Umsetzung in der Durchflussszelle ohne Produktextraktion. Durch den Einsatz geringerer Mengen an Mediator, die ja aufgrund der Leistungsfähigkeit und der Durchstimbarkeit⁶⁵ der Durchflussszelle möglich sind, kann man diese jedoch leicht erhöhen. Im Vergleich zu den Reaktionen ohne Extraktion des Inhibitors mussten erhebliche Mengen an Enzym nachdosiert werden (bis zu 11 U mL^{-1} , Tabelle 14.10.3, Seite 163), da das Enzym nach Adsorption an der Membran des Extraktionsmoduls deaktiviert wurde.

⁶⁴ siehe auch Kapitel 4.2, Seite 33 ff.

⁶⁵ siehe auch Kapitel 9.2.2, Seite 87 ff.

10.3.6 Zusammenfassung

In Tabelle 10.3.3 sind die Ergebnisse der *GDH*-katalysierten Racematspaltung mit mediatisierter anodischer Kofaktoroxidation zusammengefasst.

	<i>ohne Extraktion</i>		<i>mit Extraktion</i>	
	Becherglaszelle	Durchflusszelle	E ³ MR 1	E ³ MR 2
<i>U</i> / -	0,16	0,21	0,82	(0,67) 0,7
<i>ee</i>	0,13	0,18	0,86	> 0,99
<i>ttn</i> ⁶⁶ / -	NAD ⁺ : 16 ABTS ²⁻ : 63	NAD ⁺ : 21 ABTS ²⁻ : 469	NAD ⁺ : 6 ABTS ²⁻ : 190	NAD ⁺ : 9 ABTS ²⁻ : 144

Tabelle 10.3.3: Batch-Elektrolysen mit und ohne Extraktion des Inhibitors

- Die Elektrolysen zur oxidativen Racematspaltung ohne Entfernung des Hydroxyketons stagnieren aufgrund der starken Produktinhibierung durch 2-HAP bei geringen Umsätzen und Enantiomerenüberschüssen.
- Durch die Extraktion des Produkts im E³MR gelingt eine vollständige Racematspaltung. Es wurden 350 mg (*S*)-PED isoliert (*ee* > 0,99).
- Die Enzymdesaktivierung infolge einer Adsorption an der Membran des Extraktionsmoduls führt zu langen Reaktionszeiten und damit auch zur geringen *ttn* von NAD⁺ im E³MR.

⁶⁶Die *ttn* wurde berechnet unter der Annahme, dass ein Mol NAD⁺ und zwei Mol ABTS^{•-} je Mol 2-HAP benötigt werden.

10.4 Zusammenfassung

- *HLADH*: Die Minimierung der Produktinhibierung durch Wahl eines geeigneten Substrats (intramolekulares Abfangen des Inhibitors) ist ein erfolgreiches Konzept. Es wurde enantiomerenreines THIBF-1-on dargestellt, $U \geq 0,93$. Die Ergebnisse von *Hilt* mit PDMe als Mediator wurden mit *ttn* (Mediator) von bis zu 2120 und einer *sty* von bis zu $3,33 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ übertroffen.
- *GDH*: Über eine integrierte Extraktion des Inhibitors im E³MR gelingt die vollständige Racematspaltung ($U = 0,67$, $ee > 0,99$) durch Minimierung der InhibitorKonzentration.
 - Die lange Reaktionsdauer und die geringe *ttn* des Kofaktors ist auf Enzymdesaktivierung zurückzuführen.
- ABTS^{2-} | $\text{ABTS}^{\bullet-}$ hat sich als effektiver Mediator für die indirekte elektrochemische Regeneration von NAD^+ erwiesen.

„All the mathematics in the world is no substitute for a reasonable amount of common sense“

W. W. Cleland

11 Adaptive Simulation - E³MR⁶⁷

Im E³MR bestimmen viele Parameter wie Enzymkinetik, Kinetik der Kofaktoroxidation, die Bildung der aktiven Mediatorspezies und auch die Produktextraktion den Verlauf der enzymatischen Umsetzung. Diese Parameter sind nicht unabhängig voneinander sondern greifen wie die Räder eines Uhrwerks ineinander. Ohne ein komplettes kinetisches Modell ist es nicht möglich, die einzelnen Parameter nach ihrer Bedeutung für den Reaktionsverlauf zu wichten oder gar einen bestmöglichen Versuch zu entwickeln.

11.1 Einleitung

Nachdem im vorangegangenen Kapitel die Ergebnisse der Umsetzungen im E³MR vorgestellt wurden, sollen im nun folgenden Kapitel mit Hilfe einer adaptiven Simulation die „Rädchen im Uhrwerk“ bestimmt werden, die den größten Einfluss⁶⁸ auf das Gesamtsystem, insbesondere auf Umsatz und Enantiomerenüberschuss, der Racematspaltung haben. Dazu wird, basierend auf den vorangegangenen Untersuchungen der Teilschritte A-E, deren Charakterisierung unter gleichen Bedingungen wie im Gesamtversuch E³MR-2 erfolgte, ein modulares kinetisches Gesamtmodell erstellt. Mit Hilfe dieses Gesamtmodells und unter Berücksichtigung der experimentell bestimmten Enzymaktivitäten sowie den Nachdosierungen an Kofaktor, wird der Verlauf des zweiten E³MR-Versuchs simuliert und mit den tatsächlichen Reaktionsergebnissen verglichen. Basierend auf dem Modell wird dann durch Variation bestimmter Parameter deren Einfluss auf den möglichen Umsatz und Enantiomerenüberschuss ermittelt, und somit die Einflussmöglichkeiten durch Veränderungen des experimentellen Aufbaus beleuchtet. In diesen Gedankenexperimenten können somit

⁶⁷ Die adaptive Simulation wurde von *Daniela Degenring* unter Berücksichtigung der jeweils aktuellen Enzymaktivität und der Nachdosierungen mit dem Programm MAPLE 7.0 durchgeführt, siehe auch Kapitel 14.7, S. 151 ff.

⁶⁸ bildlich durch ihren Durchmesser und Reibungsverluste

GDH-katalysierte Racematspaltungen unter veränderten Reaktionsbedingungen extrapoliert werden, die zeigen, wie sich, um beim Bild des Uhrwerks zu bleiben, die Größenänderung oder die Beweglichkeit eines Rades auf das gesamte Uhrwerk auswirkt. Bei der Anzahl von Parametern und deren innerem Zusammenhang ist dies empirisch schwer zu leisten.

11.2 Vorbedingungen der Simulation

Die oxidative Racematspaltung von (*R,S*)-1-Phenyl-1,2-ethandiol ((*R,S*)-PED) mit *GDH* aus *Cellulomonas* species unter mediatisierter elektrochemischer Kofaktoroxidation kann insgesamt in fünf Teilschritte zerlegt werden (siehe Abbildung 11.2.1), die bereits ausführlich in separaten Kapiteln diskutiert wurden.

- A:** Heterogene anodische Generierung des Radikalkations $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (Kapitel 9, Seite 85 ff.)
- B:** Homogen-chemische Oxidation von NADH durch $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (Kapitel 8, Seite 77 ff.)
- C:** *GDH*-katalysierte Racematspaltung von (*R,S*)-PED (Kapitel 3.3, Seite 19 ff.)
- D:** Extraktion mit *iso*-Oktan (Kapitel 10.3.3, Seite 106 ff.)
- E:** Zerfall des Kofaktors (Kapitel 4.2, Seite 33 ff.) und Enzymdesaktivierung (Kapitel 10.3.4, Seite 107 ff.)

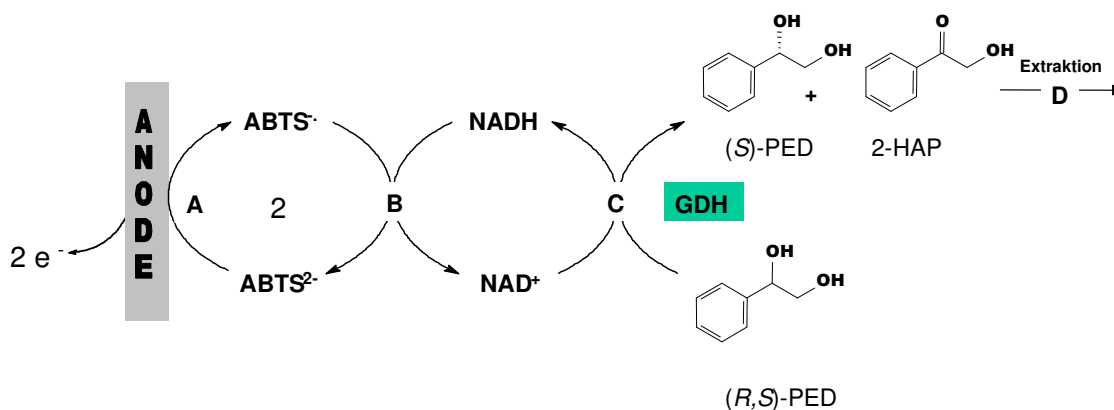


Abbildung 11.2.1: *GDH*-katalysierte Racematspaltung von (*R,S*)-PED, A-D stellen die einzelnen Teilreaktionen dar. Die Desaktivierung von Enzym und Kofaktor (E) ist nicht dargestellt.

11.2.1 A: Anodische Bildung des Radikalkations $\text{ABTS}^{\bullet+}$

Die direkte anodische Oxidation von ABTS^{2-} zum Radikalkation findet in einer Durchflusszelle statt.

Unter den experimentellen Bedingungen ($v_{fl} = 0,6 \text{ L min}^{-1}$, $[\text{ABTS}^{2-}]_0 = 0,19 \text{ mM}$) konnte gezeigt werden, dass die Reaktionsgeschwindigkeit linear von der eingesetzten Mediatorkonzentration abhängt. Die Bildung des Radikalkations kann daher mit einem Geschwindigkeitsgesetz pseudo-erster Ordnung beschrieben werden, welches in Tabelle 11.2.1, Seite 120 dargestellt ist. Die zugehörige Geschwindigkeitskonstante $k_{[\text{ABTS}^{\cdot-}]}$ findet sich in Tabelle 11.2.2, Seite 120.

11.2.2 B: Homogen-chemische Oxidation von NADH

Die homogene Oxidation des Kofaktors durch das Radikalkation entspricht im untersuchten Konzentrationsbereich einer Reaktion erster Ordnung bezüglich beider Reaktanden mit der kinetischen Konstante k_{NADH} (in Tabelle 11.2.1, Seite 120 und Tabelle 11.2.2, Seite 120.). Da das Radikalkation ein Ein-Elektronenüberträger ist und die Oxidation von NADH zu NAD^+ ein Zwei-Elektronenschritt ist, wird angenommen, dass zwei Mol $\text{ABTS}^{\cdot-}$ je Mol NADH verbraucht werden. Da es sich jedoch um eine Radikalreaktion handelt, ist die Reaktionsordnung bezüglich des Radikalkations ungewiss und die Stöchiometrie wurde nicht genau bestimmt. Wie bereits in Kapitel 8.1.1, Seite 77ff., diskutiert wurde, ist vermutlich der erste Oxidationsschritt, die Oxidation von NADH zum Radikal oder Radikalkation, unter den Reaktionsbedingungen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, was mit den gefundenen Ergebnissen übereinstimmt. Man kann daher annehmen, dass die Reaktionsordnung bezüglich $\text{ABTS}^{\cdot-}$ größer oder gleich eins ist.

11.2.3 C: GDH-katalysierte Racematspaltung von (R,S)-PED

Die enzymkatalysierte (R)-selektive Oxidation des racemischen 1-Phenyl-1,2-ethandiols ((R,S)-PED) zu 2-Hydroxyacetophenon (2-HAP) kann mit dem Doppel-Substrat Modell mit doppelter Produktinhibition nach *Michaelis* und *Menten* beschrieben werden, wie es in Kapitel 3.3.3, Seite 26 ff., bereits gezeigt wurde. Alle ermittelten kinetischen Konstanten wurden mit Hilfe nicht-linearer Regression aus den Anfangsgeschwindigkeiten bestimmt. Im Verlauf der Simulation für den E³MR zeigte sich jedoch, dass die Inhibition durch den reduzierten Kofaktor NADH keine Rolle spielt⁶⁹ und daher konnten die kinetischen Gleichungen vereinfacht werden. Die vereinfachten Gleichungen sind in Tabelle 11.2.1 auf

⁶⁹ siehe auch Abbildung 11.3.1, Seite 122

Seite 120 dargestellt und die zugehörige Grenzggeschwindigkeit v_{max} und die Komplexbindungskonstanten K_M sind für das Racemat und die einzelnen Enantiomere in Tabelle 11.2.2 auf Seite 120 angegeben. 2-HAP inhibiert die enzymatische Oxidation, die Inhibierungskonstante $K_{i,2-HAP}$ und die entsprechende kinetische Beschreibung sind in den beiden o.g. Tabellen aufgeführt.

11.2.4 D: Extraktion mit *iso*-Oktan

Die Konzentrationsabnahme von (R,S)-PED und 2-HAP in der wässrigen Phase infolge der Extraktion mit *iso*-Oktan kann jeweils mit einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung beschrieben werden (Tabelle 11.2.1, Seite 120). Die Geschwindigkeitskonstanten der Extraktion $k_{ex,PED}$ und $k_{ex,2-HAP}$ sind in Tabelle 11.2.2, Seite 120 aufgeführt.

11.2.5 E: Zerfall des Kofaktors und Abnahme der Enzymaktivität

Der Zerfall des Kofaktors in oxidierter wie reduzierter Form kann mit einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung beschrieben werden. Die Geschwindigkeitsgesetze und die kinetischen Konstanten k_{zerf,NAD^+} und $k_{zerf,NADH}$ sind in Tabelle 11.2.1, Seite 120 und Tabelle 11.2.2, Seite 120 aufgeführt. Obwohl die Lagerstabilität des Enzyms sowie die Stabilität unter Bedingungen der Elektrolyse ausreichend ist, können die so zuvor ermittelten Daten nicht für die Simulation der Racematspaltung im E³MR verwendet werden. Dies ist dadurch bedingt, dass die *GDH* unter Reaktionsbedingungen schneller deaktiviert. Vermutlich spielen dabei Adsorptionseffekte die Hauptrolle. Daher wird für die Simulation die jeweils gemessene enzymatische Aktivität während des Versuches E³MR-2 verwendet (Abbildung 11.2.2).

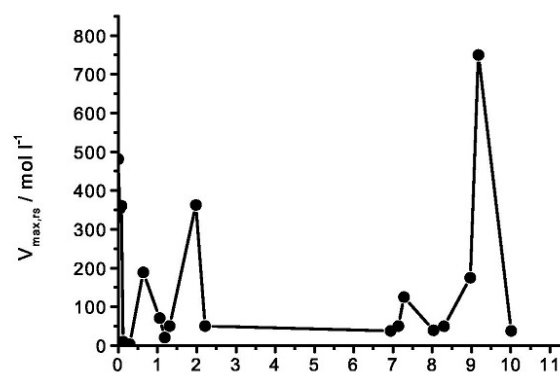


Abbildung 11.2.2: Aktivität der *GDH* während der Versuchsdauer (Versuch E³MR-2, siehe auch Kapitel 10.3.4.2, Seite 109 ff.)

Bezeichnung	Geschwindigkeitsgesetz	Reaktionsschritt
A	$k_{ABTS^{\bullet-}} \cdot [ABTS^{2-}]$	Radikalkation-Bildung
B	$k_{NADH} \cdot [NADH] \cdot [ABTS^{\bullet-}]$	homogene Oxidation
C-R	$\frac{v_{\max,R} \cdot [R - PED]}{(K_{M,R} \cdot (1 + [2 - HAP] / K_{ip}) + [R - PED])} \cdot \frac{[NAD^+]}{(K_{M,NAD^+} (1 + [NADH] / K_{i,NADH}) + [NAD^+])}$	enz. Oxidation (R)-PED
C-S	$\frac{v_{\max,S} \cdot [S - PED]}{(K_{M,S} \cdot (1 + [2 - HAP] / K_{ip}) + [S - PED])} \cdot \frac{[NAD^+]}{(K_{M,NAD^+} (1 + [NADH] / K_{i,NADH}) + [NAD^+])}$	enz. Oxidation (S)-PED
D-R	$k_{ex,PED} \cdot [R - PED]$	Diol Extraktion
D-S	$k_{ex,PED} \cdot [S - PED]$	Diol Extraktion
D-2-HAP	$k_{ex,2-HAP} \cdot [2 - HAP]$	Produktextraktion
E-NAD ⁺	$k_{zerf,NAD^+} \cdot [NAD^+]$	Zerfall NAD ⁺
E-NADH	$k_{zerf,NADH} \cdot [NADH]$	Zerfall NADH

Tabelle 11.2.1: Geschwindigkeitsgesetze der einzelnen Teilschritte der Gesamtreaktion

Parameter	Wert	Einheit
$v_{\max,S}$	$1,4 \cdot 10^{-3}$	mM s^{-1}
$v_{\max,R}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$	mM s^{-1}
$K_{M,R}$	16	mM
$K_{M,S}$	51	mM
K_{M,NAD^+}	0,7	mM
$K_{i,NADH}$	0,11	mM
K_{ip}	0,2	mM
$k_{ex,PED}$	$0,24 \cdot 10^{-6}$	s^{-1}
$k_{ex,2-HAP}$	$0,67 \cdot 10^{-5}$	s^{-1}
k_{zerf,NAD^+}	$0,59 \cdot 10^{-5}$	s^{-1}
$k_{zerf,NADH}$	$0,66 \cdot 10^{-6}$	s^{-1}
k_{NADH}	$6,4 \cdot 10^3$	$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
$k_{[ABTS^{\bullet-}]}$	$1,28 \cdot 10^{-2}$	s^{-1}

Tabelle 11.2.2: Zur Simulation verwendete kinetische Konstanten, die Konstanten wurden ohne Berücksichtigung der Standardabweichung eingesetzt. Für die Simulation wurde eine separate Sensitivitätsanalyse durchgeführt.

11.3 Simulation

11.3.1 Untersuchung der vorgelagerten Reaktionen

Zunächst wurde untersucht, inwiefern die vereinfachenden Annahmen sowohl für die anodische Bildung des Radikalkations als auch für die homogen-chemische Kofaktoroxidation basierend auf den ermittelten kinetischen Gesetzmäßigkeiten und Geschwindigkeitskonstanten Gültigkeit besitzen. Zu diesem Zweck wurde ein System von sieben Differentialgleichungen (Gleichung 11.3.1 bis Gleichung 11.3.7) aufgestellt. In erster Näherung wurde ein Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung bezüglich NADH und des Radikalkations postuliert.

$$\begin{array}{llll}
 \text{Gleichung 11.3.1} & \frac{d}{dt}[ABTS^{\bullet-}] & = & + A - B \\
 \text{Gleichung 11.3.2} & \frac{d}{dt}[ABTS^{2-}] & = & - A + B \\
 \text{Gleichung 11.3.3} & \frac{d}{dt}[NAD^+] & = & + B - C-R - C-S - E-NAD^+ \\
 \text{Gleichung 11.3.4} & \frac{d}{dt}[NADH] & = & - B + C-R + C-S - E-NADH \\
 \text{Gleichung 11.3.5} & \frac{d}{dt}[R-PED] & = & - C-R - D-R \\
 \text{Gleichung 11.3.6} & \frac{d}{dt}[S-PED] & = & - C-S - D-S \\
 \text{Gleichung 11.3.7} & \frac{d}{dt}[2-HAP] & = & + C-R + C-S - D-2-HAP
 \end{array}$$

Unter Verwendung der Parameter aus Tabelle 11.2.1 und Tabelle 11.2.2, Seite 120, und der in Tabelle 11.3.1 aufgeführten Anfangsbedingungen wurde das Gleichungssystem über den Zeitraum der ersten 2,8 h integriert.

Parameter	Wert / mM
$[R-PED]_0$	16,50
$[NAD^+]_0$	0,41
$[NADH]_0$	0,00
$[ABTS^{2-}]_0$	0,20
$[ABTS^{\bullet-}]_0$	0,00

Tabelle 11.3.1: Anfangsbedingungen

Die Ergebnisse dieser Simulation sind in Abbildung 11.3.1 dargestellt.

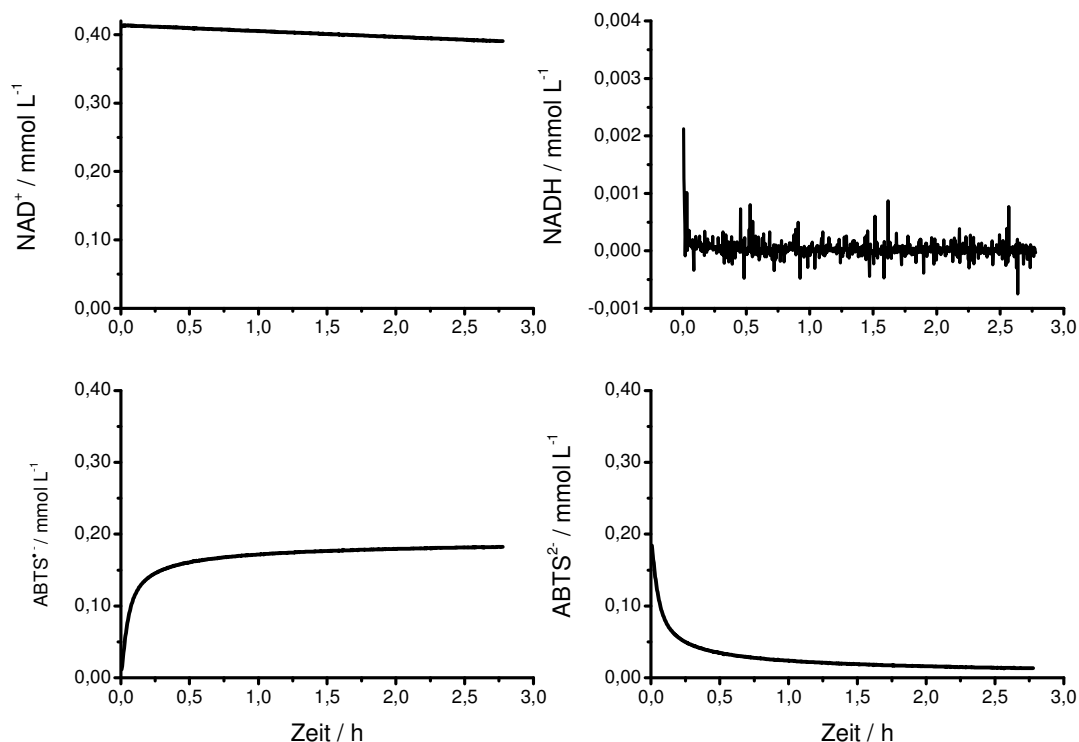


Abbildung 11.3.1: Simulierte Konzentrationsverläufe während der ersten 2,8 h unter Berücksichtigung der elektrochemischen Radikalkation-Bildung und der Kofaktoroxidation, links oben: NAD⁺, rechts oben: NADH, (Achtung andere Skala), unten links: ABTS^{•-}; unten rechts: ABTS²⁻

Auf Basis dieser Simulation konnte gezeigt werden, dass die Konzentration an NADH näherungsweise null ist. Die Konzentration an ABTS^{•-} erreicht nach etwa 2,5 h den Konzentrationsbereich, der der eingesetzten Menge an Mediator [ABTS²⁻]₀ entspricht. Eine zwischenzeitliche Bildung an NADH wurde erst bei einer 100-fach kleineren Geschwindigkeitskonstante der Kofaktoroxidation beobachtet. Daraus folgt, dass unter experimentellen Bedingungen NAD⁺ nicht limitierend ist und die Kofaktorregenerierung die bei weitem schnellste Teilreaktion darstellt. Zur NAD⁺-Konzentrationsänderung trägt lediglich der Zerfall bei.

11.3.2 Simulation des Experiments E³MR-2

Aufgrund der vorhergehenden Modellierung wurde das Differentialgleichungssystem (DGL) auf Seite 121 wie folgt vereinfacht:

Die Gleichungen für NADH (Gleichung 11.3.4) und für den Mediator (Gleichung 11.3.1 und Gleichung 11.3.2.) wurden weggelassen bzw. gleich Null gesetzt. Die Gleichung 11.3.3 für NAD⁺ wurde auf den Term für den exponentiellen Zerfall E-NAD⁺ reduziert. Für die Gesamtsimulation wurden die Parameter aus Tabelle 11.2.2, Seite 120 und die in Tabelle 11.3.1 auf Seite 121 aufgeführten Anfangsbedingungen verwendet. Das Dosierungsprofil für NAD⁺ ist in Tabelle 11.3.2 dargestellt.

Zeit / h	Menge / mM
28,4	0,20
53,2	1,30
166,5	0,45
199,2	0,34

Tabelle 11.3.2: Dosierung NAD⁺

Da sich die Enzymaktivität im Verlauf der Umsetzung im E³MR durch Desaktivierung und Nachdosierung ändert, wurden zur Simulation die experimentell bestimmten Aktivitäten verwendet (Abbildung 11.2.2, Seite 119). Da die Aktivitätsmessungen mit racemischem Diol durchgeführt wurden, wurden die v_{max} -Werte der Enantiomere unter Berücksichtigung der Assaybedingungen⁷⁰ (und der Enzymkinetik, Gleichung 3.3.1, Seite 26) berechnet.

Das Differentialgleichungssystem wurde über den gesamten Zeitraum der Elektrolyse in separaten Abschnitten, entsprechend der Nachdosierung an Kofaktor, numerisch integriert. Das simulierte zeitliche Konzentrationsprofil des Oxidationsprodukts 2-HAP ist in Abbildung 11.3.2 gezeigt.

⁷⁰ Die Berechnung erfolgte den Enantiomerenverhältnissen der Probe und den eingesetzten Konzentrationen des Standardassays angepasst; Kapitel, siehe auch 14.5.4, Seite 146.

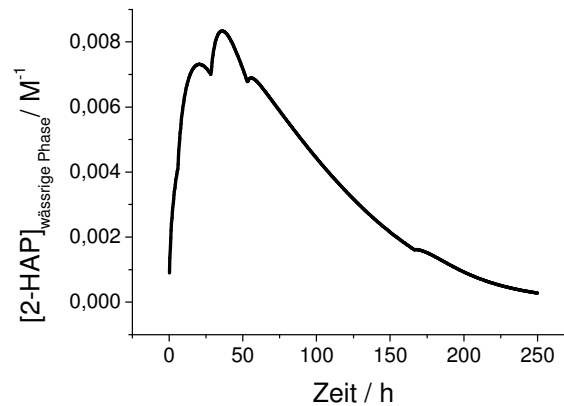


Abbildung 11.3.2: Simulierter Konzentrationsverlauf von 2-HAP in der wässrigen Phase

Zunächst steigt die Konzentration in der wässrigen Phase an, da die Extraktionsleistung zu gering ist. Mit abnehmender enzymatischer Aktivität nimmt die Konzentration gegen Null ab. Insgesamt bleibt die Konzentration während der ganzen Reaktion unterhalb des K_i . Tatsächlich konnte während der Reaktion in der wässrigen Phase lediglich bei 44 h 2-HAP nachgewiesen werden.

Der Konzentrationsverlauf für (*R*)-PED und (*S*)-PED ist in Abbildung 11.3.3, Seite 124 dargestellt.

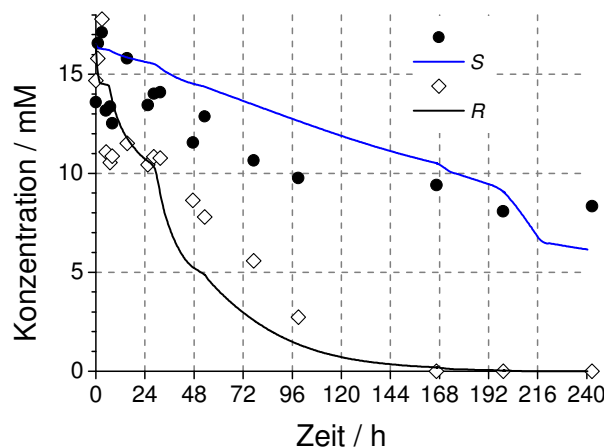


Abbildung 11.3.3: Konzentrationsprofil für (*R*)-PED und (*S*)-PED, Punkte und Rauten: experimentelle Daten, Linien: Simulation

Während die simulierte Kurve für (*R*)-PED zufriedenstellend mit den tatsächlichen experimentellen Daten übereinstimmt, weichen experimentelle Daten und simulierter Kurvenverlauf für das (*S*)-Enantiomer voneinander ab. Dies kann man dadurch erklären, dass $K_{i,2-HAP}$ und K_{M,NAD^+} nicht für beide Enantiomere separat sondern für das Racemat bestimmt

wurden. Daher war auch die Berechnung der $v_{max,R}$ und $v_{max,S}$ Werte über das Racemat ungenau. Der Verlauf des umsatzabhängigen Enantiomerenüberschusses stimmt wiederum gut mit den gemessenen Werten überein (Abbildung 11.3.4).

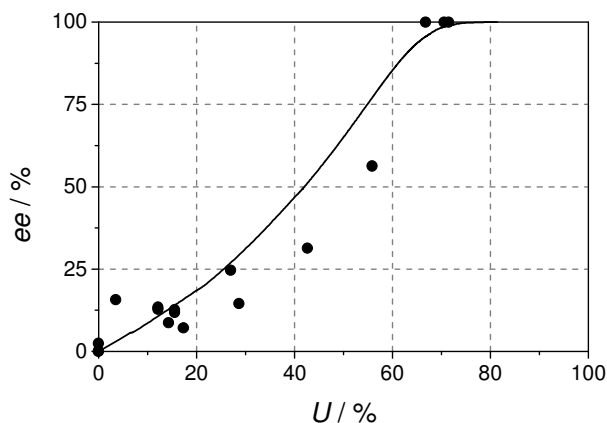


Abbildung 11.3.4: Umsatzabhängigkeit des Enantiomerenüberschusses, Punkte: Messwerte, Linie: Simulation

Die gute Übereinstimmung wird auch dadurch erzielt, dass bei dieser Auftragsung die Enzymkonzentration keine direkte Rolle spielt.

Trotz dieser vereinfachenden Annahmen und den daraus resultierenden Unbestimmtheiten, ist dieses Modell geeignet, die Parameter zu identifizieren, die sich auf Umsatz und Enantiomerenüberschuss auswirken.

11.4 Simulierte Experimente

Im folgenden werden, basierend auf dem Modell für die Simulation des Versuchs E³MR-2, Simulationen unter veränderten Reaktionsbedingungen durchgeführt, um Vorhersagen über den Einfluss auf das Enantiomerenverhältnis (engl. *er*) treffen zu können. Berechnet wurde die Veränderung des *er* bei einem Umsatz $U = 0,5$ in Relation zum durchgeführten Experiment E³MR-2. Es wurde jeweils nur ein Parameter geändert, um dessen Einfluss aufzeigen zu können, eine Extrapolation durch die Veränderung zweier Parameter ist in diesem Zusammenhang nicht sinnvoll. Es wurden nur diejenigen Parameter verändert, die auch tatsächlich variierbar wären, wie z.B. die Konzentrationen oder reaktorabhängigen Größen der Extraktion ($k_{ex,2-HAP}$, $k_{ex,PED}$). Die kinetischen Konstanten der *GDH* wurden als gegeben angenommen, um nur die durch reaktionstechnische Maßnahmen erzielbaren Veränderungen zu erhalten. Dazu zählt auch die Enzymdesaktivierung, die durch geeignete Versuchsbedingungen beeinflussbar sein sollte.

Die Ergebnisse dieser Simulationen sind in Abbildung 11.4.1 dargestellt.

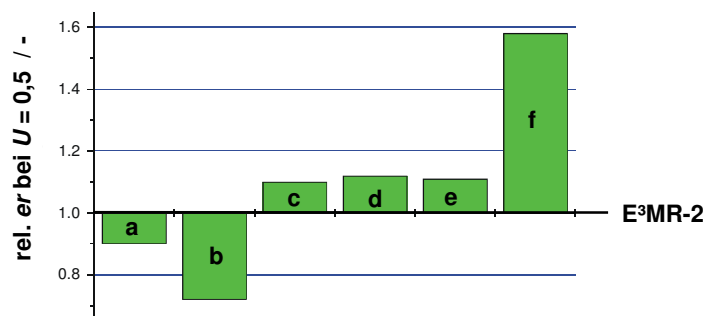


Abbildung 11.4.1: Veränderung des Enantiomerenverhältnisses (*er*) bei 50% Umsatz (U) in Vergleich zum Experiment E³MR-2; a) 66 mM (R,S)-PED, b) 132 mM (R,S)-PED, c) 3 mM Anfangskonzentration an NAD⁺, d) 3 mM NAD⁺ konstant, e) 10fach $k_{ex,2-HAP}$, f) keine Enzymdesaktivierung

Die Ergebnisse im Vergleich zum ursprünglichen Experiment zeigen insgesamt, dass eine Variation eines Parameters allein keine deutliche Verbesserung erzielt.

Dies wird vor allem aus der folgenden Tabelle ersichtlich, die die absoluten Werte der obigen Grafik zusammenfasst:

Parameter	er bei U = 0,5	ee bei U = 0,5
E ³ MR-2	4,7	0,65
66 mM (<i>R,S</i>)-PED	4,2	0,62
132 mM (<i>R,S</i>)-PED	3,6	0,57
3 mM NAD ⁺ Start	5,2	0,68
3 mM NAD ⁺ konstant	5,3	0,68
10 $k_{ex,2-HAP}$	5,3	0,68
keine Enzymdesaktivierung	5,5	0,69

Tabelle 11.4.1: Änderung von *ee* und *er* bei 50%igem Umsatz im Vergleich zum Ursprungsexperiment

Beobachtung:

- Anfangskonzentration des Substrats

Eine Verdopplung und eine Vervierfachung der anfänglichen Substratkonzentration von 33 mM wirken sich negativ auf das Enantiomerenverhältnis aus. Höhere Substratkonzentrationen führen zu geringerer Selektivität.

- NAD⁺-Dosierung

Zwei alternative Strategien im Vergleich zum Experiment wurden untersucht. Einerseits wurde eine höheren Anfangskonzentration ohne weitere Dosierung angenommen und andererseits wurde postuliert, dass die NAD⁺-Konzentration während der Versuchsdauer konstant gehalten wird. Der Einsatz einer höheren Anfangskonzentration von 3 mM gegenüber 0,41 mM wirkt sich auf das Enantiomerenverhältnis positiv aus, wird aber durch eine konstante Konzentration an Kofaktor übertroffen. Dieser Effekt beruht darauf, dass die höhere Kofaktorkonzentration zu einer erhöhten Geschwindigkeit der enzymatischen Umsetzung führt, so dass im gleichen Zeitraum mehr *R*-Enantiomer umgesetzt werden kann. Eine konstante, höhere Kofaktorkonzentration beeinflusst die Selektivität der enzymatischen Oxidation positiv.

- Extraktion

Für die Extraktion wurden zwei verschiedene Simulationen durchgeführt. Einerseits wurde eine zehnfach größere Geschwindigkeitskonstante der Extraktion von 2-HAP angenommen und andererseits wurde postuliert, dass die *GDH* nicht am UF-Modul deaktiviert.

Eine verbesserte Extraktion des Hydroxyketons, z.B. über eine verbesserte Destillation des Lösungsmittels, würde sich positiv auf das Enantiomerenverhältnis auswirken.

- Enzymstabilität

Den stärksten Einfluss hat jedoch die Enzymdesaktivierung. Ein stabileres Enzym würde also zu deutlich verbesserten Ergebnissen hinsichtlich der Selektivität und damit des Enantiomerenverhältnisses führen, vermutlich da der Kofaktor besser ausgenutzt werden kann, so dass im gleichen Zeitraum mehr *R*-Enantiomer umgesetzt wird.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Bild: Alle Veränderungen, die zu einer kürzeren Reaktionszeit führen wie etwa eine konstante Absättigung des Enzyms mit NAD⁺ oder eine ausreichend hohe Katalysatormenge, wirken sich positiv auf die Selektivität der Reaktion aus, da dann die langsamere Reaktion stärker diskriminiert wird.

Tatsächlich jedoch sollte der er unabhängig von der Katalysatorkonzentration sein.

Die Erklärung findet sich jedoch darin, dass neben der selektiven enzymatischen Umsetzung das Diol auch unselektiv extrahiert wird. Je schneller die selektive enzymatische Reaktion im Verhältnis zur unselektiven Extraktion erfolgt, desto besser wird daher der Enantiomerenüberschuss je Umsatz⁷¹.

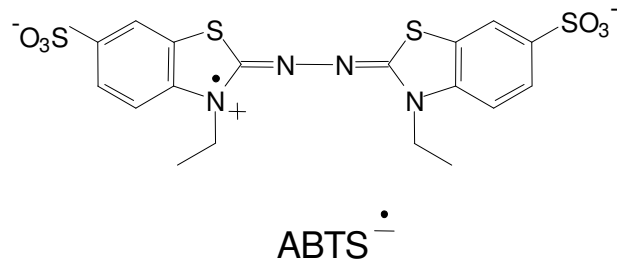
⁷¹ Der Umsatz wurde über die Abnahme des Edukts in der wässrigen Phase ermittelt.

11.5 Zusammenfassung

- Es gelang, basierend auf den separat ermittelten kinetischen Konstanten für die Teilreaktionen A-E, ein Modell der Gesamtreaktion zu entwickeln, welches den tatsächlichen Versuch E³MR-2 hinreichend genau beschreibt.
- Ausgehend von dieser Simulation wurden als entscheidende Parameter („Rädchen im Uhrwerk“) für eine Verbesserung die Erhöhung der Extraktionsleistung ($k_{ex,2-HAP}$) und die Vermeidung der Enzymdesaktivierung identifiziert.
- Da im Differentialgleichungssystem die Terme für die Bildung des Radikalkations und die homogene Oxidation von NADH vernachlässigt werden können gilt:
 - Die anodisch mediatisierte Kofaktorregenerierung ist zu keinem Zeitpunkt limitierend.
 - Die Bildung des Radikalkations ist zu keinem Zeitpunkt limitierend.
- Für den Verlauf der enzymatischen Racematspaltung wäre eine konstante Kofaktorkonzentration von 3 mM günstiger.
- Die *GDH* ist limitierend.
 - mangelnde Selektivität
 - mangelnde Stabilität

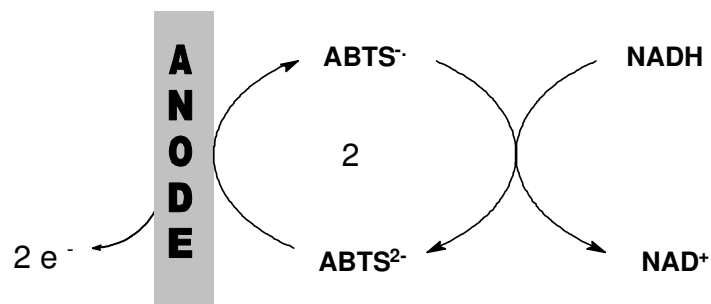
12 Zusammenfassung der Ergebnisse

12.1 Elektrochemische Bildung der aktiven Mediatorspezies



- Der Mediator wurde elektrochemisch charakterisiert.
- Die anodische Bildung des Radikalkations konnte kinetisch beschrieben werden.
- Die anodische Bildungsgeschwindigkeit des Radikalkations in der neu entwickelten Durchflusszelle ist durch die Wahl der Parameter (Elektrodengröße, Massentransport, Konzentration) durchstimmbare und kann daher der enzymatischen Umsetzung angepasst werden, ist also nicht limitierend.
- Der Mediator ist unter Reaktionsbedingungen stabil.

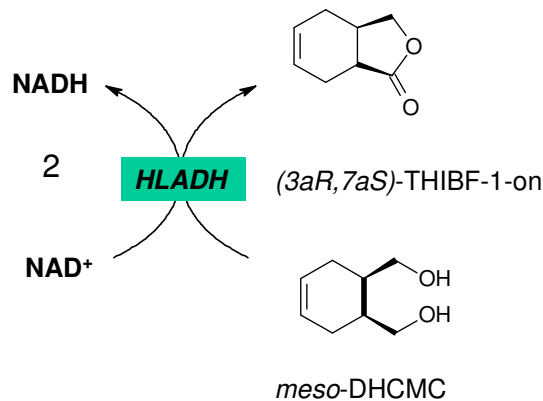
12.2 Anodische mediatisierte Kofaktoroxidation



- Die Reaktion zwischen dem reduzierten Nukleotidkofaktor und dem Radikalkation wurde photometrisch und elektrochemisch untersucht und kinetisch beschrieben.
- Als Reaktionsprodukt entsteht der biologisch aktive oxidierte Nukleotidkofaktor.

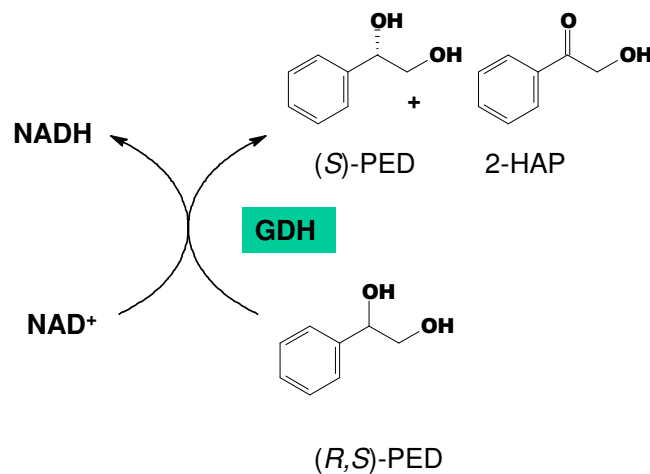
12.3 Dehydrogenasen

12.3.1 HLADH



- Als Modellreaktion wurde die enzymatische Oxidation von *meso*-DHMC zum chiralen Lacton (3a*R*,7a*S*)-THIBF-1-on ausgewählt.
- Das Enzym wurde unter Reaktionsbedingungen hinsichtlich Aktivität und Stabilität charakterisiert.

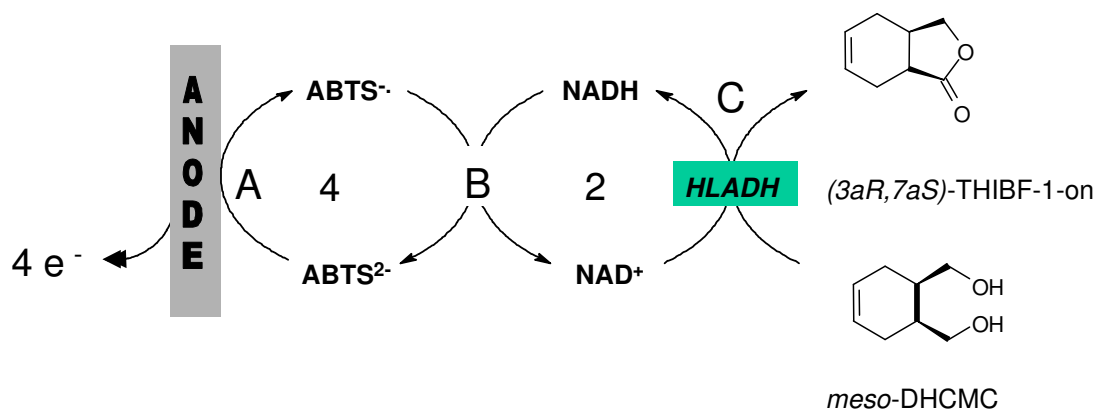
12.3.2 GDH



- Als Modellreaktion für die GDH aus *Cellulomonas* sp. wurde die oxidative Racematspaltung von (R,S)-1-Phenyl-1,2-ethandiol ((R,S)-PED) zum verbleibenden (S)-PED und dem Hydroxyketon 2-HAP ausgewählt.
- Die Reaktion wurde kinetisch charakterisiert. Stabilitätsmessungen von Enzym und Kofaktoren wurden durchgeführt.

12.4 Enzymatische Umsetzungen mit anodischer mediatisierter Kofaktoroxidation

12.4.1 HLADH



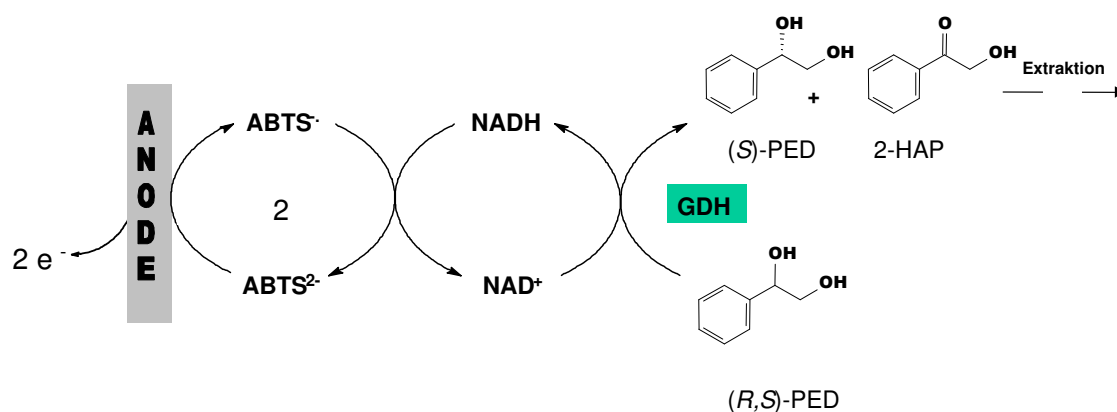
Die Reaktionen wurden erfolgreich als Batch-Elektrolysen in der Becherglaszelle durchgeführt. Die Ergebnisse der drei Elektrolysen sind in Tabelle 10.2.1 aufgelistet.

	1.Elektrolyse	2. Elektrolyse	3.Elektrolyse
<i>U</i> / -	0,53	0,78	0,935
<i>ee</i> / -	>0,99	>0,99	>0,99
<i>ttn</i> / -	NAD ⁺ : 106 ABTS ²⁻ : 2120	NAD ⁺ : 44 ABTS ²⁻ : 181	NAD ⁺ : 30 ABTS ²⁻ : 134
<i>sty</i> / g L ⁻¹ d ⁻¹	0,83	3,33	3,19

Tabelle 12.4.1: Ergebnisvergleich der HLADH-katalysierten elektroenzymatischen Oxidationen

- Die intramolekulare Cyclisierung der Hydroxycarbonylverbindung minimiert eine inhibierende Wirkung, so dass hohe Umsätze ($U > 93 \%$, ee (3aR,7aS)-THIBF-1-on $> 99 \%$) erzielt werden.
- Die Ergebnisse von Hilt mit PDMe als Mediator wurden mit *ttn* (Mediator) von bis zu 2120 und einer *sty* von bis zu $3,33 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ übertroffen.
- ABTS²⁻|ABTS^{•+} ist ein effektiver Mediator für die indirekte elektrochemische Regeneration von NAD⁺.

12.4.2 GDH



Die Ergebnisse der enzymatischen Umsetzung sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

	Becherglaszelle	Durchflusszelle	E ³ MR 1	E ³ MR 2
<i>U</i> / -	0,16	0,21	0,82	0,67 (0,7)
<i>ee</i> / -	0,13	0,18	0,86	> 0,99
<i>ttn</i> / -	NAD ⁺ : 16 ABTS ^{2•-} : 63	NAD ⁺ : 21 ABTS ^{2•-} : 469	NAD ⁺ : 6 ABTS ^{2•-} : 190	NAD ⁺ : 9 ABTS ^{2•-} : 144

Tabelle 12.4.2: Vergleich der Elektrolysen

- Ohne eine integrierte Abtrennung des Hydroxyketons stagnierten die enzymatischen Transformationen bei geringem Umsatz und Enantiomerenüberschuss.
- Für die *GDH* konnte die oxidative Racematspaltung von (R,S) -1-Phenyl-1,2-ethandiol ((R,S) -PED) zum verbleibenden (S) -PED und dem Hydroxyketon 2-HAP mit einer integrierten Produktextraktion erfolgreich durchgeführt werden (350 mg enantiomerenreines (S) -1-Phenyl-1,2-ethandiol, $ee > 0,99$)
- Dazu wurde ein neuer Reaktor, der elektrochemische extractive Enzym-Membran-Reaktor, **E³MR** entwickelt, der erfolgreich in einem wässrigen Kreislauf die elektrochemische Kofaktorregenerierung und die enzymatische Transformation vereint, während das inhibierende Produkt über eine Ultrafiltrationsmembran in die organische Phase extrahiert wird.
- Der gesamte Prozess wurde für alle Teilschritte kinetisch charakterisiert. In einer adaptiven Simulation wurden die Enzymdesaktivierung und die Extraktion als limitierende Parameter identifiziert.

13 Diskussion und Ausblick

Die Beobachtungen und Ergebnisse wurden bereits in den einzelnen Kapiteln diskutiert. Im nun folgenden Kapitel werden die Ergebnisse übergreifend diskutiert und ein Fazit der Arbeit wird gezogen. Anschließend werden Perspektiven für zukünftige Arbeiten auf dem Gebiet der Elektroenzymatik aufgezeigt.

13.1 Vergleich der elektroenzymatischen Synthesen

Die elektroenzymatischen Synthesen konnten erfolgreich durchgeführt werden. Bei der *HLADH*-katalysierten Lactonisierung zeigte sich, dass durch die intramolekulare Cyclisierung der intermediären Hydroxycarbonylverbindung, eine vollständige Umsetzung möglich ist. Die *GDH*-katalysierte oxidative Racematspaltung konnte erst dann erfolgreich durchgeführt werden, als das Hydroxyketon 2-HAP mittels einer integrierten Extraktion im E³MR abgetrennt wurde. Vergleicht man nun diese beiden Synthese-Strategien miteinander, so erscheint zunächst das bei der *HLADH* angewandte Konzept einer intramolekularen Abfangreaktion zur Überwindung der Inhibierungswirkung erfolgreicher, denn hier konnten sehr gute Ergebnisse mit minimalem apparativen Aufwand erzielt werden. Tatsächlich schränkt dieser Ansatz das Substratspektrum für die enzymatische Transformation stark ein, denn unter den Reaktionsbedingungen muss die intramolekulare Bildung des Cyclisierungsprodukts schnell erfolgen. Gleichzeitig gilt die Einschränkung, dass das cyclisierte Intermediat ebenfalls schnell enzymatisch oxidiert werden muss, da sonst das Zwischenprodukt akkumuliert. Daher stellt diese Methode kein generell anwendbares Konzept zur Überwindung einer Produktinhibierung dar, da diese Bedingungen nur von wenigen Diolen erfüllt werden.

Der bei der *GDH*-katalysierten oxidativen Racematspaltung verfolgte prozesstechnische Ansatz kann generell für verschiedene Enzyme und Substrat/Produktpaare eingesetzt werden. Nachteilig sind hier die apparativen Restriktionen, wie etwa die eingeschränkte Lösungsmittelstabilität der Extraktionsmodule.

Beide Reaktionen wurden bislang als Batch-Reaktionen durchgeführt. Eine kontinuierliche Reaktionsführung ist bei der *GDH*-katalysierten Racematspaltung nicht sinnvoll, da die Selektivität des Enzyms zu gering ist.

Im Laufe des kontinuierlichen Prozesses würde sich das (*S*)-Enantiomer immer mehr anreichern. Dieser Konzentrationseffekt würde schließlich dazu führen, dass beide Enantiomere mit vergleichbarer Geschwindigkeit umgesetzt würden und somit keine erfolgreiche Racematspaltung möglich wäre. Dieses Argument spricht auch gegen eine Nachdosierung von Substrat (Fed-Batch) und zusätzlich konnte in der adaptiven Simulation gezeigt werden, dass sich auch höhere Substratkonzentrationen negativ auf das Enantiomerenverhältnis auswirken.

Die adaptive Simulation des Versuchs im E³MR hat gezeigt, dass die Änderung eines Parameters allein nicht zu einer deutlichen Ergebnisverbesserung führt. Daher ist eine Fortführung des Projekts zur *GDH*-katalysierten Racematspaltung von (*R,S*)-1-Phenyl-1,2-ethandiol nicht sinnvoll.

Sinnvoll ist es jedoch, nach neuen Wegen zur Synthese chiraler Lactone zu suchen, da diese als Duftstoffe und Aromen von industriellem Interesse sind. Die *HLADH*-katalysierten Lactonisierungen stellen hier eine gute Ergänzung zu den Transformationen dar, die durch Bayer-Villiger-Oxidasen katalysiert werden. Eine prozesstechnische Bearbeitung wäre sinnvoll, da bislang nur elektroenzymatische Umsetzungen in der Becherglaszelle durchgeführt wurden. Diese lassen sich in ihrer Effizienz erheblich durch den Einsatz einer elektrochemischen Durchflusszelle steigern, wie für die *GDH* gezeigt werden konnte.

13.2 ABTS^{•+} als Mediator zur Oxidation von Nukleotidkofaktoren

Es konnte gezeigt werden, dass die elektrochemische Bildung des Radikalkations durch die Verwendung einer Durchflusszelle so gesteuert werden kann, dass zu jedem Zeitpunkt der enzymatischen Transformation ausreichend Radikalkation zur Oxidation von NADH zu Verfügung steht. Die Reaktion zwischen dem reduzierten Kofaktor und dem Radikalkation ist von allen in dieser Arbeit untersuchten Reaktionen die schnellste. Im Gegensatz zu einer enzymatischen Kofaktorregenerierung werden keine Kosubstrate benötigt und dementsprechend wird die Aufarbeitung stark vereinfacht.

Die bislang durchgeführten enzymatischen Synthesen können die Möglichkeiten des Mediatorsystems nicht ausschöpfen. Die *HLADH*-katalysierten Transformationen und insbesondere die *GDH*-katalysierte oxidative Racematspaltung begrenzen bislang die Möglichkeiten der elektrochemischen Reaktion. Dies konnte durch die adaptive Simulation gezeigt werden.

Da die Reaktion mit NADPH noch schneller erfolgt, als mit NADH und das Radikalkation damit im Bereich des schnellsten bisher beschriebenen Mediators für die Oxidation von Nukleotidkofaktoren arbeitet, erscheint es sinnvoll auf der Basis der hier vorgestellten Methoden und Ergebnisse, ein enzymatisches Modellsystem für die elektrochemische Regeneration von NADP^+ zu etablieren.

13.3 Weitere Anwendungsgebiete von $\text{ABTS}^{\bullet-}$

In Kapitel 7.2, Seite 63 ff. wurden verschiedene enzymatische Transformationen vorgestellt, die ebenfalls ABTS als Mediator verwenden. Ein solches Anwendungsgebiet von $\text{ABTS}^{\bullet-}$ ist die Verwendung als Mediator für Laccasen. In solchen Laccase-Mediator-Systemen (LMS) wirkt $\text{ABTS}^{\bullet-}$ als Reduktionsmittel für Laccasen. In Abbildung 13.3.2 und Abbildung 13.3.2) ist jeweils der Ersatz der Laccase-katalysierten Mediatoroxidation durch die in der vorliegenden Arbeit beschriebene anodische Bildung des Radikalkations $\text{ABTS}^{\bullet-}$ dargestellt.

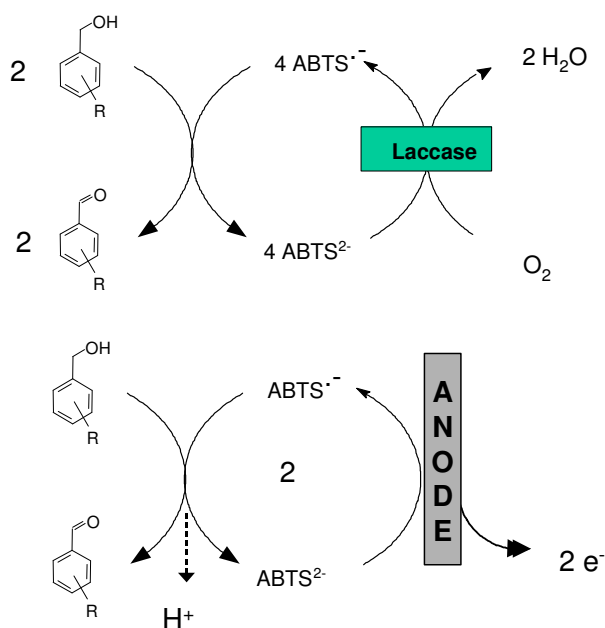


Abbildung 13.3.1: $\text{ABTS}^{\bullet-}$ -katalysierte Oxidation von Benzylalkoholen

Da die Laccasen lediglich dafür benötigt werden, das Radikalkation herzustellen, sollte es sehr vorteilhaft sein, die Laccase-katalysierte Oxidation durch die anodische Generierung des Radikalkations zu ersetzen. Darüber hinaus kann man dann diese Synthesen in organischen Lösungsmitteln und in wesentlich größeren Konzentrationen durchführen, was an Betracht der hydrophoben Substrate zu einer stark verbesserten *sty* führen sollte.

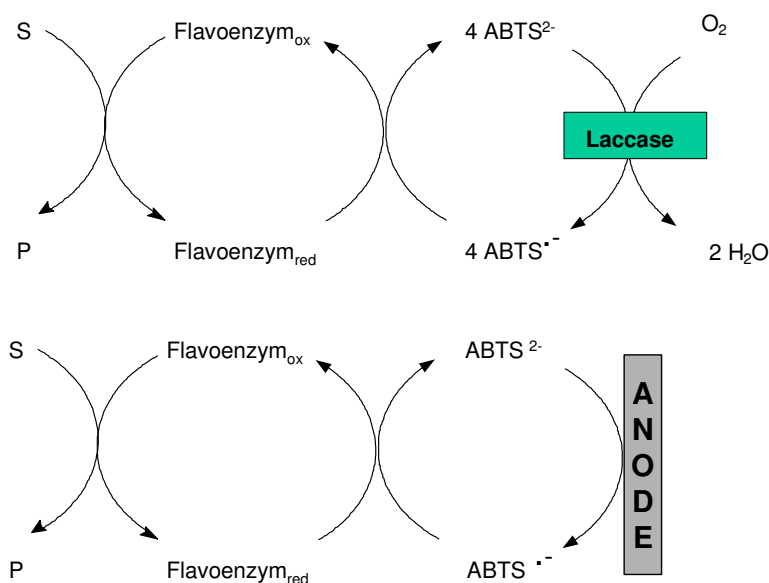


Abbildung 13.3.2: ABTS^{•-}-katalysierte Regenerierung von Flavoenzymen

Die Laccase-vermittelte Bildung von ABTS^{•-} wird auch in Flavoenzym-katalysierten Transformationen eingesetzt. Hier wirkt das Radikalkation als Mediator zur Regenerierung der oxidierten Form des Flavoenzyms. Da die Reaktionen dadurch limitiert sind, dass nicht genügend Sauerstoff für die Laccase-katalysierte Radikalkationbildung in die Reaktionslösung eingebracht werden kann, stellt die elektrochemische Bildung des Radikalkations eine elegante Methode zur Überwindung dieser Limitierung dar.

Bislang wurde die Radikalkationbildung als potentiostatische, also spannungskontrollierte Elektrolyse durchgeführt, um im Einsatz zur Regenerierung von Nukleotidkofaktoren Nebenreaktionen durch mögliche Bildung des Dikations ABTS zu vermeiden.

Wenn man nun die oben beschriebenen Oxidationen von Benzylalkoholen durchführt, dann könnten diese Reaktionen auch stromkontrolliert, also galvanostatisch und damit mit einer einfacheren Zwei-Elektrodenanordnung durchgeführt werden.

Ein weiteres reizvolles Gebiet ist der Einsatz von ABTS^{•-} als Mediator in Brennstoffzellen. Ein vielversprechendes System, welches sich aus bekannten Teilreaktionen zusammensetzt, ist in Abbildung 13.3.3 skizziert.

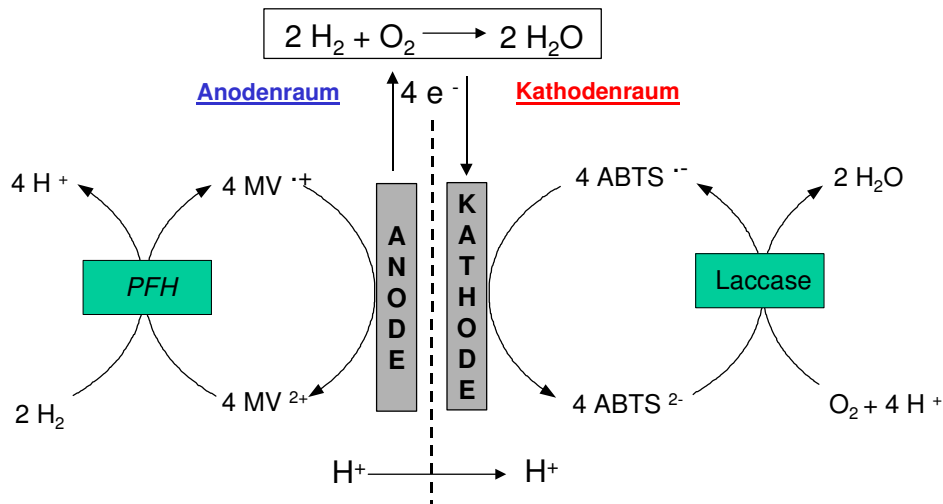


Abbildung 13.3.3: Kopplung der Laccase-ABTS-katalysierten Sauerstoffreduktion mit der *Pyrococcus furiosus* Hydrogenase (PFH) katalysierten Wasserstoffoxidation für den Betrieb einer Brennstoffzelle

So könnten die von Greiner untersuchte *Pyrococcus furiosus* Hydrogenase (PFH) und die ebenfalls von ihm charakterisierte Technik der Dosierung molekularen Wasserstoffs für die anodische Wasserstoffoxidation eingesetzt werden [96]. Die $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -katalysierte kathodische Sauerstoffreduktion könnte dann mit der von Rissom et al. verwendeten Technik der blasenfreien Begasung mit Sauerstoff kombiniert werden [253].

Als Fazit aller durchgeführten Experimente kann man abschließend sagen, dass das ABTS-Mediatorsystem ein gutes Oxidationsmittel darstellt, das immer je nach Bedarf *in situ* zur Verfügung gestellt werden kann und daher für eine Kofaktoroxidation nicht limitierend ist.

Seine Anwendung für enzymatische Synthesen ist besonders sinnvoll für die direkte Regenerierung von Flavoenzymen.

Für die Oxidation von Nukleotidkofaktoren, sollte in nachfolgenden Arbeiten ein Enzym/Substratsystem eingesetzt werden, welches in der Lage ist, mit der Effizienz und der Geschwindigkeit der elektrochemischen Reaktion und der angeschlossenen homogen-chemischen Kofaktoroxidation Schritt zu halten.

14 Material & Methoden

In diesem Kapitel nicht aufgeführte Versuchsbedingungen sind den Legenden der einzelnen Abbildungen zu entnehmen.

14.1 Firmen und Geräte

Agilent Technologies, Waldbronn

Gaschromatograph: HP6890

HPLC: HP1100

Amel, Mailand, Italien

Potentiostat: Modell 553

Avantes, Eerbeek, Niederlande

Durchfluss-Spektrophotometer

Bioanalytical Systems, West Lafayette,
Indiana, USA

Cyclovoltammetrie:

BAS 100B/W Version 2.3 Electrochemical
Workstation,

Software: DigiSim® 3.03,

Elektroden: Arbeitselektrode

Glaskohlenstoff 3 mm, Arbeitselektrode Pt
3 mm

Bruker Analytische Meßtechnik,

NMR-Spektrometer:

Rheinstetten

Bruker AMX 300, AC 200, AM 250, AC 400

CS Chromatographie-Service GmbH,

HPLC-Säule:

Langerwehe

Multosphere 100 RP18-5µm

Cypress Systems Inc.,

Elektroden:

Lawrence, Kansas, USA

Schlauchelektrode $\text{Ag} \mid \text{AgCl}_{3\text{M}} \text{ KCl}$

Gegenelektrode Pt-Draht 0,5 mm;

Polierpaste: Aluminiumoxid 0,05 µm

HAAKE GmbH, Karlsruhe

Kryostat

IKA Labortechnik, Staufen

diverse beheizbare Magnetrührer

Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH,

Peristaltikpumpe: MS-2/6-160

Wertheim-Mondfeld

Membrapure GmbH, Bodenheim

UF-Extraktionsmodul:

	5422142 Minikros, MWCO 10 kD, Membran PS, 8000 cm ²
Metrohm, Herisau, Schweiz	pH-Meter 691, pH-Elektrode
Molecular Devices, Heidelberg	Spectrophotometer: Thermomax microplate reader
Sartorius AG, Göttingen	Laborwaage Analytik AC 210 P
SGL Carbon, Bonn	Elektrodenmaterial: Sigraflex® , Sigratherm® 4mm, RVC
Shimadzu Europa, Duisburg	Spektrophotometer: UV 160
Swagelok, Bornheim	Schlauchverbindungen, Verschraubungen
telab GmbH, Moers	Pumpe: Membrandosierer BF414-5000
Varian, Darmstadt	GC-Säule: CP-Chirasil-Dex CB
Watson-Marlow GmbH, Rotterdam, Niederlande	Peristaltikpumpe: P 505 U
Werkstätten der Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich	Durchflussszelle UV, elektrochemische Durchflussszelle, diverse Glasgeräte, Kabel

14.2 Chemikalien und Enzyme

2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)diammoniumsalz (ABTS), Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase (HLADH, EC 1.1.1.1) und alle nicht näher aufgeführten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich, München, bezogen.

NADH sowie NADPH stammt von Biomol, Hamburg.

NAD⁺, Glycerin-Dehydrogenase (GDH, EC 1.1.1.6) aus *Cellulomonas* sp. sowie Formiat-Dehydrogenase (FDH, EC 1.2.1.2) aus *Candida boidinii* wurde von Jülich Fine Chemicals, Jülich, bezogen

GDH aus *Enterobacter aerogenes* stammt von Roche Diagnostics, Penzberg.

Alle verwendeten Chemikalien waren von bestmöglicher Qualität und wurden ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

Für alle Lösungen wurde vollentsalztes Wasser verwendet, welches durch Nanofiltration aufbereitet wurde (Milli-Q, académic, Millipore, Schwalbach).

14.3 Generelle Arbeitsvorschriften

14.3.1 Puffer

Kaliumcarbonat-Puffer (Das Kürzel „K-Carbonat“ bezieht sich auf diesen Puffer, wird kein spezieller Puffer angegeben ist ebenfalls immer dieser Puffer verwendet worden.):

Der pH-Wert einer Lösung von Kaliumhydrogencarbonat (0,1 M) wird mit einer 0,1 M Kaliumcarbonatlösung auf pH 9,0 eingestellt.

Triethanolamin-Puffer

Eine Lösung von 0,1 M Triethanolamin (TEA) bzw. des Hydrochlorids wird mit 4 M KOH auf pH 8,7 eingestellt.

Kaliumphosphat-Puffer (KPi):

Eine Lösung von 0,05 M Kaliumdihydrogenphosphat wird mit einer Lösung von 0,05 M Dikaliumhydrogenphosphat auf pH 8,0 eingestellt.

14.3.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt nach einer literaturbeschriebenen Methode [254].

14.3.3 Elektrolysen

Wenn nicht anders beschrieben, werden alle Elektrolysen nach diesen Anleitungen durchgeführt.

14.3.3.1 Becherglaszelle

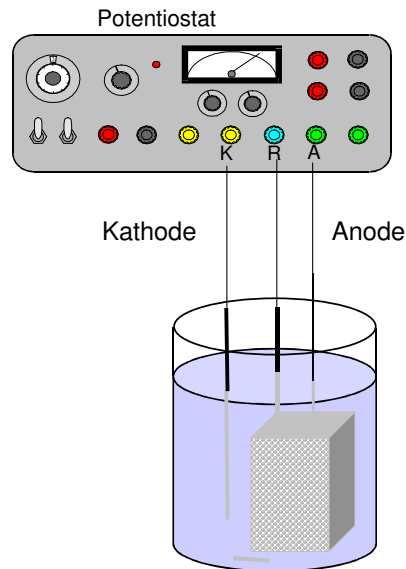


Abbildung 14.3.1: Becherglaszelle, hier mit Elektrodenanordnung für RVC-Anode

Die Elektrolysezelle besteht aus einem einfachen 10-100 mL Becherglas, bestückt mit einem Magnetrührstäbchen, einer Anode, einer Kathode und einer Referenzelektrode (Abbildung 14.3.1). Der Elektrolyt wird eingefüllt, gerührt und die Elektrolyse durch Anlegen eines konstanten Potentials von 550-585 mV gegen die Referenzelektrode gestartet. Als Elektroden werden Pt-kontaktierte Sigraflexfolie® oder Sigratherm®-Kohlefilz (Anode) mit Kathode (Pt-Draht) und Referenz (Ag|AgCl-Schlauchelektrode) in konzentrischer Anordnung verwendet. Mit glasartigem Kohlenstoff (RVC) als Anode werden die drei Elektroden in gleichem Abstand platziert. Keinesfalls dürfen sich die Anode und Kathode während der Elektrolyse berühren (Kurzschluss!).

14.3.3.2 Durchflussszelle⁷²

Für die Elektrolyse in der Durchflussszelle ($V = 150 \text{ mL}$) wird ein $8,5 \times 26,5 \text{ cm}$ ($\sim 4,55 \text{ g}$) großes Stück Sigratherm-Kohlefilz (Anode, A) derart konzentrisch um einen in Dialysemembran eingeschlossenen Ag-Draht (Pseudoreferenz, R) und einen ebenfalls in Dialysemembran gehüllten Pt-Draht (Kathode, K) gewickelt, dass das so erhaltene Elektrodenpäckchen mit Pt-Draht umwickelt in das Glasgefäß der Durchflussszelle passt (Abbildung 14.3.2). Die Pt- und Ag-Drähte werden am oberen Ende mit Teflon-Schlauch umhüllt (5 mm für Kontakt freilassen) und durch die vorgesehenen Öffnungen im Edelstahldeckel der Elektrolysezelle geführt. Das Glasgefäß wird nun oben und unten verschlossen und an die zentralen Anschlüsse von Boden und Deckel wird ein Teflonschlauch ($\varnothing 6 \text{ mm}$) angeschlossen. Nach Einfüllen des Elektrolyten wird die Elektrolyse durch Anheben des Potentials auf 585 mV gestartet. Der Massentransport erfolgt durch Umpumpen mittels einer Schlauchpumpe. Die Durchflussszelle wird von oben angeströmt und wirkt so gleichzeitig als Blasenfalle.

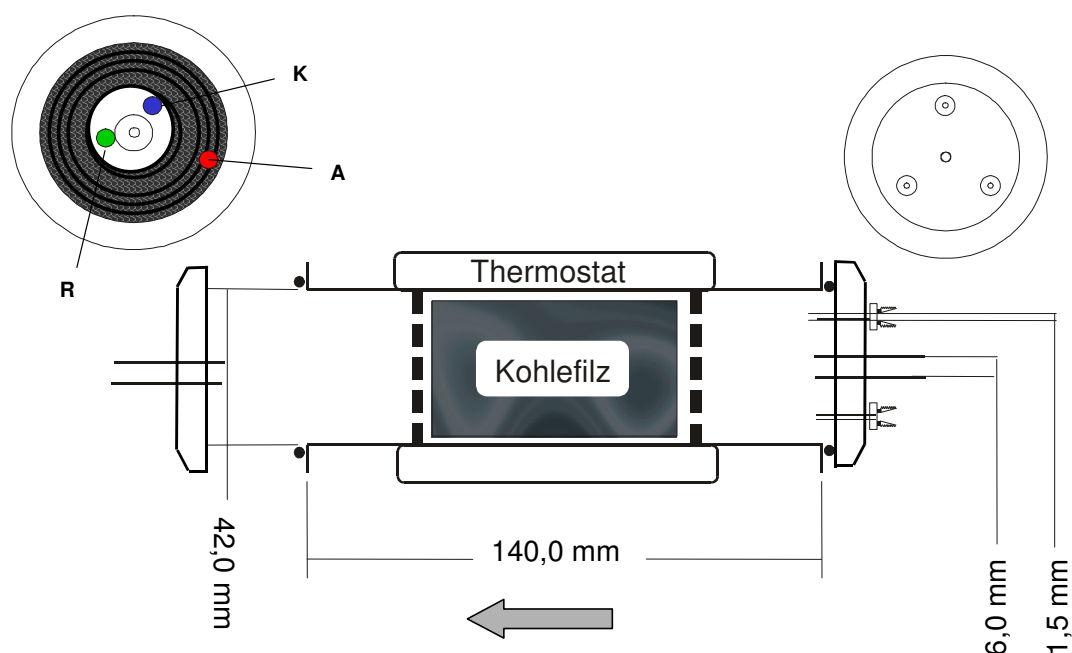


Abbildung 14.3.2: Bemaßung der Durchflussszelle, links oben Aufsicht auf die Wickelelektrode, rechts oben Deckel der Durchflussszelle in der Aufsicht; die Flussrichtung ist mit einem Pfeil angedeutet.

⁷² Die Durchflussszelle wurde zusammen mit *Lasse Greiner* entwickelt.

14.4 Chemische Synthesen

14.4.1 2-Hydroxyacetophenon (2-HAP) (2-Hydroxy-1-phenylpropanon)

2-HAP wurde nach Literaturvorschrift in einer zweistufigen Synthese dargestellt. Die Analytik entspricht den Literaturdaten [37, 86, 87, 255, 256].

14.4.2 *meso*-3,4-Dihydroxymethylcyclohexen (*meso*-DHMC)

Die Synthese von *meso*-DHMC erfolgt in einem Schritt ausgehend von *meso*-Cyclohexen-3,4-dicarbonsäureanhydrid nach Literaturvorschrift durch Reduktion mit LiAlH_4 [34, 257]. Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.

14.4.3 3a,4,7,7a-Tetrahydro-3H-isobenzofuran-1-on (THIBF-1-on)

Die Darstellung des Racemats erfolgt durch eine Braunsteinoxidation ausgehend vom *meso*-DHMC in einer einstufigen Synthese nach Literaturvorschrift [34, 258]. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturwerten überein.

14.5 Photometrische Untersuchungen

Im Folgenden wird entweder die Adsorption von NADH bei 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) oder in Gegenwart von $\text{ABTS}^{2-}|\text{ABTS}^{\bullet-}$ die Adsorption des Radikalkations bei 420 nm ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [199, 259]) vermessen. Nach *Lambert-Beer* kann dann aus der Extinktion bzw. der Extinktionsänderung je Zeiteinheit die Konzentration bzw. Konzentrationsänderung je Zeiteinheit berechnet werden. Alle Messungen wurden mindestens als Doppelbestimmung durchgeführt.

14.5.1 Bildungsgeschwindigkeit von $\text{ABTS}^{\bullet-}$

Zur Bestimmung der Bildungsgeschwindigkeit wird der Elektrolyt aus der elektrochemischen Zelle (Becherglaszelle/Durchflussszelle) direkt oder über einen Strömungsteiler durch einen UV-Durchflussszelle gepumpt (Abbildung 14.5.1). Die zeitliche Zunahme der Absorption des Radikalkations bei 420 nm, 25°C dient als Maß für eine zunehmende Radikalkationskonzentration. Die Messungen werden mit verschiedenen Ausgangskonzentration an ABTS^{2-}

in K-Carbonat bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten v_f bestimmt. Zur Bestimmung der Bildungsgeschwindigkeit wird lediglich der lineare Anstieg der Adsorption während der ersten 30 s der Elektrolyse ausgewertet.

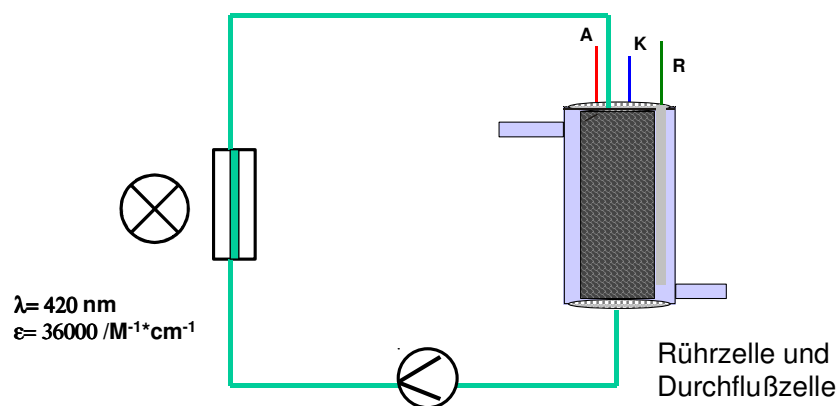


Abbildung 14.5.1: Schematischer Aufbau der Apparatur zur Bestimmung der Bildungsgeschwindigkeit von $\text{ABTS}^{\bullet-}$, A, K, R bezeichnen die Elektroden

Zwischen den einzelnen Messungen muss die Zelle gut mit 1 L des Elektrolyt-Puffers (K-Carbonat) gespült werden. Dann wird die Zelle mit etwa 300 mL des Elektrolyten gespült, bevor wieder eine Messung gestartet wird.

14.5.2 Oxidation von NADH durch $\text{ABTS}^{\bullet-}$

Zunächst wird eine Lösung von 10 mM Radikalkation in K-Carbonat elektrolytisch hergestellt. Die Konzentration der Lösung wird über die Adsorption bei 420 nm, 25°C, bestimmt. Die so hergestellte Stammlösung hält sich lichtgeschützt bei 4°C länger als eine Woche ohne messbare Abnahme an Radikalkation.

Die UV-Messungen werden bei 25°C in K-Carbonatpuffer in 1 cm Quartz-Küvetten durchgeführt. Für die kinetischen Messungen wurde jeweils eine Lösung des Radikalkations [5 mM] mit NADH-Lösung unterschiedlicher Konzentration versetzt, vermischt und die Abnahme der Adsorption bei 420 nm während der ersten 15 s verfolgt.

14.5.3 Nebenreaktionen von $\text{ABTS}^{\bullet-}$

Zum Nachweis einer Nebenreaktion von $\text{ABTS}^{\bullet-}$ mit Komponenten der Reaktionslösungen der enzymatischen Umsetzungen wurde ein qualitativer Entfärbungstest verwendet. Dazu

wurde eine Lösung von Radikalkation mit der zu untersuchenden Komponente versetzt und die Abnahme der Absorption wurde bei 420 nm verfolgt.

14.5.4 Aktivitätsvergleich der *GDH* aus zwei Quellen.

Sowohl von *GDH* aus *Enterobacter aerogenes* als auch aus *Cellulomonas sp.* wurden Stammlösungen von 20 µg/mL in 0,1 M Ammoniumsulfat hergestellt. So kann die *GDH* ohne Aktivitätsverlust mindestens eine Woche bei 4°C gelagert werden.

Eine Lösung von 40 mM Substrat und 2 mM NAD⁺ in TEA, 0,05 M, pH 8,7, 25°C wurde mit 5 µg/mL *GDH* versetzt. Als Maß für die Anfangsgeschwindigkeit wurde die Zunahme an NADH während der ersten zwei Minuten bestimmt. Die Aktivität beider Enzyme bezüglich des natürlichen Substrats Glycerin wurde als 100%-Wert definiert und die spezifische Aktivität gegenüber anderen Substraten immer auf Glycerin bezogen.

Aktivitätsassay für die GDH

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurde ein Assay im 200 µL-Maßstab durchgeführt. Als Maß für die Anfangsgeschwindigkeit wurde die Bildung von NADH bei nach Zugabe von *GDH* (3-5 µg/mL) während der ersten 60 s gemessen. Standardkonzentrationen waren: (*R,S*)-PED 40 mM oder Glycerin 20 mM, NAD⁺ 2 mM in K-Carbonat, 25°C.

14.5.5 Kinetische Charakterisierung der *GDH*-katalysierten Racematspaltung von (*R,S*)-PED

Der Assay wurde im 200 µL-Maßstab durchgeführt. Als Maß für die Anfangsgeschwindigkeit der Oxidation wurde die Bildung von NADH bei 340 nm nach Zugabe von *GDH* (5,2 µg/mL) während der ersten 60 s gemessen. Standardkonzentrationen waren (*R,S*)-PED 100 mM, (*R*)-PED, (*S*)-PED 50 mM, NAD⁺ 2 mM. Die Konzentrationen wurden variiert, um die kinetischen Daten zu erhalten. Die Messungen wurden bei Standardkonzentration an (*R,S*)-PED und NAD⁺ mit variierenden Mengen an 2-HAP bzw. NADH durchgeführt, um die entsprechenden Inhibierungskonstanten zu ermitteln.

Die kinetischen Konstanten wurden durch eine Optimierung mit Scientist ermittelt. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden für *GDH* = 5,3 µg mL⁻¹ im Assay berechnet.

Inhibierung durch 2-HAP

```

IndVars: P
DepVars: RP
Params: KMS,VMS,KMNAD,KINADH,KIP
//Function
RP=VMS*S/(KMS*(1+P/KIP)+S)*NAD/(KMNAD*
(1+NADH/KINADH)+NAD)
//Parameters value
VMS= 91.78
KMS=24.954
KMNAD=0.70493
KINADH=0.11185
KIP=0.19072
// Constant
S=100
NAD=2
NADH=0

```

Inhibierung durch NADH

```

IndVars: NADH
DepVars: RNADH
Params: KMS,VMS,KMNAD,KINADH,KIP
//Function
RNADH=VMS*S/(KMS*(1+P/KIP)+S)*NAD/
(KMNAD*(1+NADH/KINADH)+NAD)
//Parameters value
VMS= 114.91
KMS=24.9178
KMNAD=0.70493
KINADH=0.11185
KIP=0.2049
// Constant
S=100
NAD=2
P=0

```

(R,S)-PED bzw. (R)-PED, (S)-PED

```

IndVars: NADH
DepVars: RNADH
Params: KMS,VMS,KMNAD,KINADH,KIP
//Function
RNADH=VMS*S/(KMS*(1+P/KIP)+S)*
NAD/(KMNAD*(1+NADH/KINADH)+NAD)
//Parameters value
VMS= 93.553
KMS=24.9178
KMNAD=0.70493
KINADH=0.11185
KIP=0.2049
// Constant
S=100
NAD=2
P=0

```

NAD⁺

```

IndVars: NAD
DepVars: RNAD
Params: KMS,VMS,KMNAD,KINADH,KIP
//Function
RNAD=VMS*S/(KMS*(1+P/KIP)+S)*NAD/
(KMNAD*(1+NADH/KINADH)+NAD)
//Parameters value
VMS= 119.47
KMS=24.9178
KMNAD=0.70493
KINADH=0.11185
KIP=0.2049
// Constant
S=100
NADH=0
P=0

```

14.5.6 Aktivitätsmessung *HLADH*

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurde ein Assay im 200 µL-Maßstab durchgeführt. Als Maß für die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit wurde die Bildung von NADH nach Zugabe von *HLADH* (14,8 µg/mL) während der ersten 60 s gemessen. Standardkonzentrationen waren: *meso*-DHMC: 85,8 mM, NAD⁺: 1,7 mM. Die Messungen wurden in 0,05 M KPi-Puffer, pH 8.9 bei 25°C durchgeführt.

14.5.7 Stabilitätsmessungen

Um die Stabilität der Kofaktoren und der Enzyme zu untersuchen, wurden Stammlösungen hergestellt und, wenn nicht anders angegeben, bei 25°C Raumtemperatur im jeweiligen Puffer (*GDH*, NAD^+ , NADH in 0,1 M K-Carbonat, pH 9,0; *HLADH* in 0,02 M K-Carbonat, pH 9,0) gelagert. In regelmäßigen Intervallen wurden Proben genommen und der Gehalt an aktivem Kofaktor bzw. nativem Enzym über die Adsorption bei 340 nm bestimmt.

NAD⁺

Als NAD^+ -Stammlösung wurde eine 1 mM-Lösung hergestellt. Der Gehalt an aktivem Kofaktor wurde nach Reduktion durch Formiat-Dehydrogenase (*FDH*, EC 1.2.1.2) wie folgt bestimmt:

Zu einer Lösung von NAD^+ (0,1 mM) in Kaliumformiat (0,1 M), pH 7,0, 25°C wurde *FDH* (0,06 mg/mL) gegeben. Diese Reaktionslösung wurde 10 min geschüttelt und anschließend wurde der NADH -Gehalt photometrisch bestimmt.

NADH

Als Stammlösung wurde eine 0,5 mM Lösung hergestellt. Der NADH -Gehalt wurde photometrisch bestimmt.

GDH

Als Stammlösung wurde eine Lösung von 22 µg/mL *GDH* in K-Carbonat pH 9,0 hergestellt. Diese Stammlösung wurde aliquotiert und je zwei Proben wurden bei 20, 25, 30 und 37°C gelagert. Die Aktivität wurde wie folgt bestimmt:

Eine Lösung von 20 mM Glycerin und 2 mM NAD^+ in K-Carbonatpuffer, pH 9,0, 25°C wurde mit 5 µg/mL *GDH* versetzt. Als Maß für die Anfangsgeschwindigkeit wurde die Zunahme an NADH bestimmt.

HLADH

Als Stammlösung wurde eine Lösung von 0,073 mg/mL *HLADH* in KPi pH 8,0 hergestellt. Diese Stammlösung wurde aliquotiert und je zwei Proben wurden bei 20, 25, 30 und 37°C gelagert. Die Aktivitätsmessung entspricht der unter Kapitel 0, Seite 147 beschriebenen Vorgehensweise.

14.5.8 Temperaturabhängigkeit der enzymatische Oxidation

Zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit wurden die Proben zwischen 10 und 45°C in Temperaturschritten von fünf °C vermessen. Gemessen wurde jeweils die Zunahme an NADH infolge der Enzymzugabe während der ersten 60 s als Maß für die enzymatische Aktivität.

HLADH

Eine Lösung von 85 mM *meso*-DHMC und 2 mM NAD⁺ in 20 mM KPi, pH 8,0 wurde mit 14,5 µg/ml HLADH versetzt und die NADH-Zunahme vermessen.

GDH

Eine Lösung von 20 mM Glycerin und 2 mM NAD⁺ in 50 mM K-Carbonat, pH 9,0 wurde mit 4 µg/mL GDH versetzt und die NADH-Zunahme vermessen.

14.5.9 Einfluss des pH-Werts auf die Enzymaktivität

Die Enzymaktivität wurde im pH-Bereich von 6-13 untersucht bei 25°C. Für pH 6 und pH 7 wurde ein KPi-Puffer verwendet, ansonsten K-Carbonat. Für die GDH war die Pufferlösung 100 mM, für die HLADH 20 mM. Gemessen wurde jeweils die Zunahme an NADH infolge der Enzymzugabe während der ersten 60 s als Maß für die enzymatische Aktivität.

HLADH

Eine Lösung von 85 mM *meso*-DHMC und 2 mM NAD⁺ in 20 mM Puffer wurde mit 14,5 µg/mL HLADH versetzt und die NADH-Zunahme vermessen.

GDH

Eine Lösung von 20 mM Glycerin und 2 mM NAD⁺ in 100 mM Puffer wurde mit 5 µg/mL GDH versetzt und die NADH-Zunahme vermessen.

14.5.10 Einfluss monovalenter Kationen auf die Enzymaktivität

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der Enzymaktivität von Na⁺ bzw. K⁺ -Ionen wurden K-Carbonat und Na-Carbonatpuffer, pH 9,0 sowie Kpi-Puffer pH 8,0 unterschiedlicher Konzentration hergestellt. Der jeweilige Kationengehalt wurde über eine Titrationskurve berechnet. Die Enzymreaktionen wurden bei 25°C durchgeführt. Gemessen wurde jeweils die

Zunahme an NADH infolge der Enzymzugabe während der ersten 60 s als Maß für die enzymatische Aktivität.

HLADH

Eine Lösung von 85 mM *meso*-DHMC und 2 mM NAD⁺ in Puffer pH 8,0 wurde mit 14,5 µg/mL HLADH versetzt und die NADH-Zunahme vermessen.

GDH

Eine Lösung von 5 µg/mL *GDH* und 2 mM NAD⁺ in Puffer pH 9,0 wurde mit 20 mM Glycerin versetzt und die NADH-Zunahme vermessen.

14.5.11 *GDH*-Aktivität in Gegenwart von *iso*-Oktan

500 µL einer Lösung von 14,7 µg/mL *GDH* in K-Carbonat werden mit 500 µL *iso*-Oktan überschichtet, das Glasgefäß wird verschlossen und bei RT 24 h geschüttelt. Die Proben der wässrigen Phase werden wie folgt analysiert:

Eine Lösung von 40 mM Glycerin und 2 mM NAD⁺ in K-Carbonat, 0,1 M, pH 9,0, 25°C wird mit 3 µg/mL *GDH* versetzt. Gemessen wurde jeweils die Zunahme an NADH infolge der Enzymzugabe während der ersten 60 s als Maß für die enzymatische Aktivität.

14.6 Cyclovoltammetrie

Für die Messungen der Cyclovoltammogramme (CV) wurde eine BAS 100B/W Version 2.3 Electrochemical Workstation der Firma Bioanalytical Systems, West Lafayette, Indiana, USA verwendet. Als Reaktionsgefäß diente ein 5 ml Becherglas, bzw. eine ungeteilte Becherglaszelle. Als Arbeitselektrode wurde Glaskohlenstoff verwendet (Ø 3 mm), als Gegenelektrode ein Platindraht. Die Cyclovoltammogramme wurden bei 25°C gegen Ag|AgCl als Referenz aufgenommen. Alle Elektroden wurden von der Firma Bioanalytical Systems, West Lafayette, Indiana, USA bezogen. Alle Reaktionslösungen wurden in 0,1 M K-Carbonatpuffer, pH 9,0 angesetzt. Alle Messungen wurden bei 25°C durchgeführt, die Lösungsmittel wurden vor Verwendung mit Helium entgast.

Vor jedem Experiment wurde die Arbeitselektrode mit Aluminiumoxid poliert und anschließend zunächst mit vollentsalztem Wasser und dann mit dem Elektrolyt-Puffer gespült. Die Methoden zur Auswertung werden im Kapitel B, Seite 201ff. eingehend erläutert.

14.6.1 Untersuchung des Mediatorsystems

Für die Untersuchung des Mediatorsystems wurde eine 1 mM Lösung von 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)diammoniumsalz (ABTS^{2-}) hergestellt. Die CVs wurden mit unterschiedlichen Vorschubgeschwindigkeiten im Bereich von 200 bis 950 mV gegen die Referenz aufgenommen.

14.6.2 Nebenreaktionen von $\text{ABTS}^{\cdot-}$ und ABTS^{2-}

Für die qualitative Untersuchung möglicher Nebenreaktionen während einer Elektrolyse wurden Cyclovoltammogramme einer 0,05-0,5 mM Lösung von ABTS^{2-} in K-Carbonat, 0,1 M, pH 9,0 bei 25°C im Potentialbereich zwischen 200-950 mV bei unterschiedlichen Vorschubgeschwindigkeiten vermessen. Die zu untersuchende Substanz wurde in Konzentrationen von ~0,5 mg/mL zugesetzt und im gleichen Potential- und Vorschubbereich wie die reine Mediatorlösung vermessen.

14.6.3 Oxidation von NADH durch $\text{ABTS}^{\cdot-}$

Zur Untersuchung der Reaktion des Mediators mit NADH wurde eine 0,071 mM ABTS^{2-} Lösung hergestellt und mit steigenden Konzentrationen an NADH (als Feststoff) versetzt. Die NADH-haltige Lösung wurde 30 s gerührt und dann sofort vermessen.

Die Cyclovoltammogramme wurden mit unterschiedlichen Vorschubgeschwindigkeiten von 200 bis 600 mV gegen die Referenz aufgenommen.

14.7 Digitale Simulation

Für die digitale Simulation wurden tatsächlich vermessene Cyclovoltammogramme des Mediators eingelesen und nicht-linear angepasst.

Um die Anzahl der unbekannten Parameter einzuschränken, wurde entweder auf Literaturwerte oder zuvor ermittelte Ergebnisse zurückgegriffen.

Die Diffusionskoeffizienten von ABTS in allen Oxidationsstufen wurde in guter Übereinstimmung von selbst ermittelten Werten und Literaturdaten ($3,2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) auf $3,3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ festgelegt [157, 260, 261]. Für ABTS^{2-} wurden als Redoxpotentiale 462 mV und 852mV (vs. Ag/AgCl) für die erste bzw. zweite Elektronenübertragung ermittelt.

Als Elektronentransferrate k_s wurde für ABTS^{2-} 0,01 cm/s verwendet [157, 227, 261].

Die Durchtrittskoeffizienten α wurden für alle Substanzen als 0,5 angenommen. Alle übrigen Werte, wie sie in das Arbeitsformular eingetragen wurden, sind in den Bildunterschriften erwähnt. Die zugehörigen Mechanismen sind jeweils angegeben.

Simulation E³MR

Die Simulationen wurden mit dem Program Maple 7.0 nach folgendem Algorithmus von Daniela Degenring durchgeführt:

Lösen E3MR-Modell für zweiterVersuchKorrektur.xls: Enzymaktivität wird eingelesen

Einlesen von Vmax_r, Vmax_s (Berücksichtigung der zeitabhängigen Deaktivierung)

```
vmax_zeit_werte := seq(vmax_zeitachse[i], i=1..870):
vmaxs_werte := seq(vmaxs[i], i=1..870):
vmaxr_werte := seq(vmaxr[i], i=1..870):
input := fopen(cat(verzeichnis, "vmaxsr_assaykor.csv"), READ):
for i from 1 to 870 do
vmax_zeitachse[i] := fscanf(input, "%f"):
vmaxs[i] := fscanf(input, "%f"):
vmaxr[i] := fscanf(input, "%f"):
end do:
fclose(input):
```

Eingabe der zeitunabhängigen Parameter

```
Km:=0.01557:Km1:=0.00071:Kms:=0.05096:Kms1:=0.00071:Ki:=0.615:Kip:=0.0001902:
k_ex_PED:=2.4E-7:k_ex_Acyloin:=6.74531e-5:k_NAD_zerfall:=5.88129e-6:
```

Setzen der Startbedingungen

```
ini:= RPED(0)=0.0165, SPED(0)=0.0165, Acyloin(0)=0, Acyloinorg(0)=0, NAD(0)=0.000414, RPEDorg(0)=0, SPEDorg(0)=0:
```

Parametrisieren des DGL-Lösers

```
C := array(1..30):
for i from 1 to 30 do
C[i] := 0:
end do:
C[2] := 1.0e-15: C[1]:=1.0e-8: C[2] := 1.0e-8: C[10] := 150000:
```

Speichern der Startbedingungen in Ergebnisarray

```
for j from 0 by 1 to 0 do
RPEDarray[j]:=0.0165:zeit[j]:=0:Acyloinarray[j]:=0:
Acyloinorgarray[j]:=0:NADarray[j]:=0.000414:RPEDorgarray[j]:=0:SPEDarray[j]:=0.0165:SPEDorgarray[j]:=0: end do:
```

Lösen des DGL-Systems innerhalb 0-102000 Sekunden

```
for i from 1 by 1 to 102 do
de:=diff(RPED(t),t)=vmaxr_werte[i,1]*RPED(t)/(Km*(1+Acyloin(t)/Kip)+RPED(t)*(1+RPED(t)/Ki))*NAD(t)/(Km1+NAD(t))-
k_ex_PED*RPED(t),diff(SPED(t),t)=vmaxs_werte[i,1]*SPED(t)/(Kms*(1+Acyloin(t)/Kip)+SPED(t))*NAD(t)/(Kms1+NAD(t))-
k_ex_PED*SPED(t),diff(Acyloin(t),t)=vmaxr_werte[i,1]*RPED(t)/(Km*(1+Acyloin(t)/Kip)+RPED(t)*(1+RPED(t)/Ki))*NAD(t)/(Km1+NAD(t))+vmaxs_w
erte[i,1]*SPED(t)/(Kms*(1+Acyloin(t)/Kip)+SPED(t))*NAD(t)/(Kms1+NAD(t))-
k_ex_Acyloin*Acyloin(t),diff(Acyloinorg(t),t)=+k_ex_Acyloin*Acyloin(t),diff(NAD(t),t)=
k_NAD_zerfall*NAD(t),diff(RPEDorg(t),t)=k_ex_PED*RPED(t),diff(SPEDorg(t),t)=k_ex_PED*SPED(t):
sol[i] := dsolve({de,ini},{RPED(t),SPED(t),Acyloin(t),Acyloinorg(t),NAD(t),SPEDorg(t),RPEDorg(t)},type=numeric, method=lsode, ctrl=C):
ini:=RPED((i*1000)=rhs(sol[i]((i*1000))[5]),SPED((i*1000)=rhs(sol[i]((i*1000))[7]),Acyloin((i*1000)=rhs(sol[i]((i*1000))[2]),Acyloinorg((i*1000)
=rhs(sol[i]((i*1000))[3]),NAD((i*1000)=rhs(sol[i]((i*1000))[4]),RPEDorg((i*1000)=rhs(sol[i]((i*1000))[6]),SPEDorg((i*1000)=rhs(sol[i]((i*1000)
)[8]):
end do:
```

Speichern in Ergebnisarray

```
for j from 1 to 102 do RPEDarray[j]:=rhs(sol[j](j*1000)[5]):zeit[j]:=j*1000:Acyloinarray[j]:=rhs(sol[j](j*1000)[2]):
Acyloinorgarray[j]:=rhs(sol[j](j*1000)[3]):NADarray[j]:=rhs(sol[j](j*1000)[4]):RPEDorgarray[j]:=rhs(sol[j](j*1000)[6]):SPEDarray[j]:=rhs(sol[j](j*1000)[7
]):SPEDorgarray[j]:=rhs(sol[j](j*1000)[8]): end do:
```

Lösen des DGL für Zeitintervall 102000-102312s:

```
sol[i] := dsolve({de,ini},{RPED(t),SPED(t),Acyloin(t),Acyloinorg(t),NAD(t),SPEDorg(t),RPEDorg(t)},type=numeric, method=lsode, ctrl=C):
```

Abspeichern der Ergebnisse

```
for j from 103 by 1 to 103 do RPEDarray[j]:=rhs(sol[j])(102312)[5];zeit[j]:=102312; Acyloinarray[j]:=rhs(sol[j])(102312)[2];
Acyloinorgarray[j]:=rhs(sol[j])(102312)[3];NADarray[j]:=rhs(sol[j])(102312)[4])+2e-
4;RPEDorgarray[j]:=rhs(sol[j])(102312)[6];SPEDarray[j]:=rhs(sol[j])(102312)[7];SPEDorgarray[j]:=rhs(sol[j])(102312)[8]); end do:
```

Zudosierung von NAD+ bei Zeit 102312s

```
ini:=RPED(102312)=rhs(sol[i])(102312)[5],SPED(102312)=rhs(sol[i])(102312)[7],Acyloin(102312)=rhs(sol[i])(102312)[2],Acyloinorg(102312)=rhs(s
ol[i])(102312)[3],NAD(102312)=rhs(sol[i])(102312)[4])+2e-4,RPEDorg(102312)=rhs(sol[i])(102312)[6],SPEDorg(102312)=rhs(sol[i])(102312)[8]):
```

Lösen des DGL innerhalb von 102312-191000

```
for i from 104 by 1 to 192 do de:=diff(RPED(t),t)=
vmaxr_werte[i,1]*RPED(t)/(Km*(1+Acyloin(t)/Kip)+RPED(t)*(1+RPED(t)/Ki))*NAD(t)/(Km1+NAD(t))-k_ex_PED*RPED(t),diff(SPED(t),t)=
vmaxs_werte[i,1]*SPED(t)/(Kms*(1+Acyloin(t)/Kip)+SPED(t))*NAD(t)/(Kms1+NAD(t))-
k_ex_PED*SPED(t),diff(Acyloin(t),t)=vmaxr_werte[i,1]*RPED(t)/(Km*(1+Acyloin(t)/Kip)+RPED(t)*(1+RPED(t)/Ki))*NAD(t)/(Km1+NAD(t))+vmaxs_w
erte[i,1]*SPED(t)/(Kms*(1+Acyloin(t)/Kip)+SPED(t))*NAD(t)/(Kms1+NAD(t))-
k_ex_Acyloin*Acyloin(t),diff(Acyloinorg(t),t)=+k_ex_Acyloin*Acyloin(t),diff(NAD(t),t)=
k_NAD_zerfall*NAD(t),diff(RPEDorg(t),t)=k_ex_PED*RPED(t),diff(SPEDorg(t),t)=k_ex_PED*SPED(t):
sol[i] := dsolve({de,ini},{RPED(t),SPED(t),Acyloin(t),Acyloinorg(t),NAD(t),SPEDorg(t),RPEDorg(t)},type=numeric, method=lsode, ctrl=C):
ini:=RPED((i-1)*1000)=rhs(sol[i-1])(1000)[5],SPED((i-1)*1000)=rhs(sol[i-1])(1000)[7],Acyloin((i-1)*1000)=rhs(sol[i-1])(1000)[2],Acyloinorg((i-1)*1000)=rhs(sol[i-1])(1000)[3],NAD((i-1)*1000)=rhs(sol[i-1])(1000)[4],RPEDorg((i-1)*1000)=rhs(sol[i-1])(1000)[6],SPEDorg((i-1)*1000)=rhs(sol[i-1])(1000)[8]):
end do:
```

Abspeichern der Ergebnisse

```
for j from 104 by 1 to 192 do RPEDarray[j]:=rhs(sol[j])(j*1000)[5];zeit[j]:=j*1000; Acyloinarray[j]:=rhs(sol[j])(j*1000)[2];
Acyloinorgarray[j]:=rhs(sol[j])(j*1000)[3];NADarray[j]:=rhs(sol[j])(j*1000)[4];RPEDorgarray[j]:=rhs(sol[j])(j*1000)[6];SPEDarray[j]:=rhs(sol[j])(j*1000)[7
];SPEDorgarray[j]:=rhs(sol[j])(j*1000)[8]); end do:
```

Lösen des DGL für Zeitintervall 191000-191412s

```
de:=diff(RPED(t),t)=vmaxr_werte[i,1]*RPED(t)/(Km*(1+Acyloin(t)/Kip)+RPED(t)*(1+RPED(t)/Ki))*NAD(t)/(Km1+NAD(t))-
k_ex_PED*RPED(t),diff(SPED(t),t)=vmaxs_werte[i,1]*SPED(t)/(Kms*(1+Acyloin(t)/Kip)+SPED(t))*NAD(t)/(Kms1+NAD(t))-
k_ex_PED*SPED(t),diff(Acyloin(t),t)=vmaxr_werte[i,1]*RPED(t)/(Km*(1+Acyloin(t)/Kip)+RPED(t)*(1+RPED(t)/Ki))*NAD(t)/(Km1+NAD(t))+vmaxs_w
erte[i,1]*SPED(t)/(Kms*(1+Acyloin(t)/Kip)+SPED(t))*NAD(t)/(Kms1+NAD(t))-
k_ex_Acyloin*Acyloin(t),diff(Acyloinorg(t),t)=+k_ex_Acyloin*Acyloin(t),diff(NAD(t),t)=
k_NAD_zerfall*NAD(t),diff(RPEDorg(t),t)=k_ex_PED*RPED(t),diff(SPEDorg(t),t)=k_ex_PED*SPED(t):
sol[i] := dsolve({de,ini},{RPED(t),SPED(t),Acyloin(t),Acyloinorg(t),NAD(t),SPEDorg(t),RPEDorg(t)},type=numeric, method=lsode, ctrl=C):
Abspeichern der Ergebnisse for j from 193 by 1 to 193 do RPEDarray[j]:=rhs(sol[j])(191412)[5];zeit[j]:=191412;
Acyloinarray[j]:=rhs(sol[j])(191412)[2]; Acyloinorgarray[j]:=rhs(sol[j])(191412)[3];NADarray[j]:=rhs(sol[j])(191412)[4])+1.3e-
3;RPEDorgarray[j]:=rhs(sol[j])(191412)[6];SPEDarray[j]:=rhs(sol[j])(191412)[7];SPEDorgarray[j]:=rhs(sol[j])(191412)[8]); end do:
```

Zudosierung von NAD+ bei Zeit 191412s

```
ini:=RPED(191412)=rhs(sol[i])(191412)[5],SPED(191412)=rhs(sol[i])(191412)[7],Acyloin(191412)=rhs(sol[i])(191412)[2],Acyloinorg(191412)=rhs(s
ol[i])(191412)[3],NAD(191412)=rhs(sol[i])(191412)[4])+1.3e-3,RPEDorg(191412)=rhs(sol[i])(191412)[6],SPEDorg(191412)=rhs(sol[i])(191412)[8]):
```

Lösen des DGL innerhalb von 191412-599000

```
for i from 194 by 1 to 601 do
de:=diff(RPED(t),t)=vmaxr_werte[i,1]*RPED(t)/(Km*(1+Acyloin(t)/Kip)+RPED(t)*(1+RPED(t)/Ki))*NAD(t)/(Km1+NAD(t))-
k_ex_PED*RPED(t),diff(SPED(t),t)=vmaxs_werte[i,1]*SPED(t)/(Kms*(1+Acyloin(t)/Kip)+SPED(t))*NAD(t)/(Kms1+NAD(t))-
k_ex_PED*SPED(t),diff(Acyloin(t),t)=vmaxr_werte[i,1]*RPED(t)/(Km*(1+Acyloin(t)/Kip)+RPED(t)*(1+RPED(t)/Ki))*NAD(t)/(Km1+NAD(t))+vmaxs_w
erte[i,1]*SPED(t)/(Kms*(1+Acyloin(t)/Kip)+SPED(t))*NAD(t)/(Kms1+NAD(t))-
k_ex_Acyloin*Acyloin(t),diff(Acyloinorg(t),t)=+k_ex_Acyloin*Acyloin(t),diff(NAD(t),t)=
k_NAD_zerfall*NAD(t),diff(RPEDorg(t),t)=k_ex_PED*RPED(t),diff(SPEDorg(t),t)=k_ex_PED*SPED(t):
sol[i] := dsolve({de,ini},{RPED(t),SPED(t),Acyloin(t),Acyloinorg(t),NAD(t),SPEDorg(t),RPEDorg(t)},type=numeric, method=lsode, ctrl=C):
ini:=RPED((i-2)*1000)=rhs(sol[i-2])(1000)[5],SPED((i-2)*1000)=rhs(sol[i-2])(1000)[7],Acyloin((i-2)*1000)=rhs(sol[i-2])(1000)[2],Acyloinorg((i-2)*1000)=rhs(sol[i-2])(1000)[3],NAD((i-2)*1000)=rhs(sol[i-2])(1000)[4],RPEDorg((i-2)*1000)=rhs(sol[i-2])(1000)[6],SPEDorg((i-2)*1000)=rhs(sol[i-2])(1000)[8]):
end do:
```

Abspeichern der Ergebnisse

des DGL für Zeitintervall 599000-599400s

```
de:=diff(RPED(t),t)=vmaxr_werte[i,1]*RPED(t)/(Km*(1+Acyloin(t)/Kip)+RPED(t)*(1+RPED(t)/Ki))*NAD(t)/(Km1+NAD(t))-
k_ex_PED*RPED(t),diff(SPED(t),t)=vmaxs_werte[i,1]*SPED(t)/(Kms*(1+Acyloin(t)/Kip)+SPED(t))*NAD(t)/(Kms1+NAD(t))-
```

```

k_ex_PED*SPED(t),diff(Acyloin(t),t)=vmaxr_werte[i,1]*RPED(t)/(Km*(1+Acyloin(t)/Kip)+RPED(t)*(1+RPED(t)/Ki))*NAD(t)/(Km1+NAD(t))+vmaxs_w
erte[i,1]*SPED(t)/(Kms*(1+Acyloin(t)/Kip)+SPED(t))*NAD(t)/(Kms1+NAD(t))-
k_ex_Acyloin*Acyloin(t),diff(Acyloinorg(t),t)=+k_ex_Acyloin*Acyloin(t),diff(NAD(t),t)=-
k_NAD_zerfall*NAD(t),diff(RPEDorg(t),t)=k_ex_PED*RPED(t),diff(SPEDorg(t),t)=k_ex_PED*SPED(t):
sol[i] := dsolve({de,ini},{RPED(t),SPED(t),Acyloin(t),Acyloinorg(t),NAD(t),SPEDorg(t),RPEDorg(t)},type=numeric, method=lsode, ctrl=C):

```

Abspeichern der Ergebnisse

```

for j from 602 by 1 to 602 do RPEDarray[j]:=rhs(sol[j](599400)[5]);zeit[j]:=599400; Acyloinarray[j]:=rhs(sol[j](599400)[2]);
Acyloinorgarray[j]:=rhs(sol[j](599400)[3]);NADarray[j]:=rhs(sol[j](599400)[4])+4.5e-
4;RPEDorgarray[j]:=rhs(sol[j](599400)[6]);SPEDarray[j]:=rhs(sol[j](599400)[7]);SPEDorgarray[j]:=rhs(sol[j](599400)[8]); end do:

```

Zudosierung von NAD+ bei Zeit 599400s

```

ini:=RPED(599400)=rhs(sol[i](599400)[5]),SPED(599400)=rhs(sol[i](599400)[7]),Acyloin(599400)=rhs(sol[i](599400)[2]),Acyloinorg(599400)=rhs(s
ol[i](599400)[3]),NAD(599400)=rhs(sol[i](599400)[4])+4.5e-4,RPEDorg(599400)=rhs(sol[i](599400)[6]),SPEDorg(599400)=rhs(sol[i](599400)[8]):

```

Lösen des DGL innerhalb von 599400-717000s

```

for i from 603 by 1 to 720 do
de:=diff(RPED(t),t)=vmaxr_werte[i,1]*RPED(t)/(Km*(1+Acyloin(t)/Kip)+RPED(t)*(1+RPED(t)/Ki))*NAD(t)/(Km1+NAD(t))-
k_ex_PED*RPED(t),diff(SPED(t),t)=vmaxs_werte[i,1]*SPED(t)/(Kms*(1+Acyloin(t)/Kip)+SPED(t))*NAD(t)/(Kms1+NAD(t))-
k_ex_PED*SPED(t),diff(Acyloin(t),t)=vmaxr_werte[i,1]*RPED(t)/(Km*(1+Acyloin(t)/Kip)+RPED(t)*(1+RPED(t)/Ki))*NAD(t)/(Km1+NAD(t))+vmaxs_w
erte[i,1]*SPED(t)/(Kms*(1+Acyloin(t)/Kip)+SPED(t))*NAD(t)/(Kms1+NAD(t))-
k_ex_Acyloin*Acyloin(t),diff(Acyloinorg(t),t)=+k_ex_Acyloin*Acyloin(t),diff(NAD(t),t)=-
k_NAD_zerfall*NAD(t),diff(RPEDorg(t),t)=k_ex_PED*RPED(t),diff(SPEDorg(t),t)=k_ex_PED*SPED(t):
sol[i] := dsolve({de,ini},{RPED(t),SPED(t),Acyloin(t),Acyloinorg(t),NAD(t),SPEDorg(t),RPEDorg(t)},type=numeric, method=lsode, ctrl=C):
ini:=RPED((i-3)*1000)=rhs(sol[i](((i-3)*1000)[5]),SPED((i-3)*1000)=rhs(sol[i](((i-3)*1000)[7]),Acyloin((i-3)*1000)=rhs(sol[i](((i-
3)*1000)[2]),Acyloinorg((i-3)*1000)=rhs(sol[i](((i-3)*1000)[3]),NAD((i-3)*1000)=rhs(sol[i](((i-3)*1000)[4]),RPEDorg((i-3)*1000)=rhs(sol[i](((i-
3)*1000)[6]),SPEDorg((i-3)*1000)=rhs(sol[i](((i-3)*1000)[8]):
end do:

```

Abspeichern der Ergebnisse

```

or j from 603 by 1 to 720 do RPEDarray[j]:=rhs(sol[j](j*1000)[5]);zeit[j]:=j*1000; Acyloinarray[j]:=rhs(sol[j](j*1000)[2]);
acyloinorgarray[j]:=rhs(sol[j](j*1000)[3]);NADarray[j]:=rhs(sol[j](j*1000)[4]);RPEDorgarray[j]:=rhs(sol[j](j*1000)[6]);SPEDarray[j]:=rhs(sol[j](j*1000)[7
]);SPEDorgarray[j]:=rhs(sol[j](j*1000)[8]); end do:

```

Lösen des DGL für Zeitintervall 717000-717012s

```

de:=diff(RPED(t),t)=vmaxr_werte[i,1]*RPED(t)/(Km*(1+Acyloin(t)/Kip)+RPED(t)*(1+RPED(t)/Ki))*NAD(t)/(Km1+NAD(t))-
k_ex_PED*RPED(t),diff(SPED(t),t)=vmaxs_werte[i,1]*SPED(t)/(Kms*(1+Acyloin(t)/Kip)+SPED(t))*NAD(t)/(Kms1+NAD(t))-
k_ex_PED*SPED(t),diff(Acyloin(t),t)=vmaxr_werte[i,1]*RPED(t)/(Km*(1+Acyloin(t)/Kip)+RPED(t)*(1+RPED(t)/Ki))*NAD(t)/(Km1+NAD(t))+vmaxs_w
erte[i,1]*SPED(t)/(Kms*(1+Acyloin(t)/Kip)+SPED(t))*NAD(t)/(Kms1+NAD(t))-
k_ex_Acyloin*Acyloin(t),diff(Acyloinorg(t),t)=+k_ex_Acyloin*Acyloin(t),diff(NAD(t),t)=-
k_NAD_zerfall*NAD(t),diff(RPEDorg(t),t)=k_ex_PED*RPED(t),diff(SPEDorg(t),t)=k_ex_PED*SPED(t):
sol[i] := dsolve({de,ini},{RPED(t),SPED(t),Acyloin(t),Acyloinorg(t),NAD(t),SPEDorg(t),RPEDorg(t)},type=numeric, method=lsode, ctrl=C):

```

Abspeichern der Ergebnisse

```

for j from 721 by 1 to 721 do RPEDarray[j]:=rhs(sol[j](717012)[5]);zeit[j]:=717012; Acyloinarray[j]:=rhs(sol[j](717012)[2]);
Acyloinorgarray[j]:=rhs(sol[j](717012)[3]);NADarray[j]:=rhs(sol[j](717012)[4])+3.4e-
4;RPEDorgarray[j]:=rhs(sol[j](717012)[6]);SPEDarray[j]:=rhs(sol[j](717012)[7]);SPEDorgarray[j]:=rhs(sol[j](717012)[8]); end do:

```

Zudosierung von NAD+ bei Zeit 717012s

```

ini:=RPED(717012)=rhs(sol[i](717012)[5]),SPED(717012)=rhs(sol[i](717012)[7]),Acyloin(717012)=rhs(sol[i](717012)[2]),Acyloinorg(717012)=rhs(s
ol[i](717012)[3]),NAD(717012)=rhs(sol[i](717012)[4])+3.4e-4,RPEDorg(717012)=rhs(sol[i](717012)[6]),SPEDorg(717012)=rhs(sol[i](717012)[8]):

```

Lösen des DGL innerhalb von 717012-864000

```

for i from 722 by 1 to 869 do
de:=diff(RPED(t),t)=vmaxr_werte[i,1]*RPED(t)/(Km*(1+Acyloin(t)/Kip)+RPED(t)*(1+RPED(t)/Ki))*NAD(t)/(Km1+NAD(t))-
k_ex_PED*RPED(t),diff(SPED(t),t)=vmaxs_werte[i,1]*SPED(t)/(Kms*(1+Acyloin(t)/Kip)+SPED(t))*NAD(t)/(Kms1+NAD(t))-
k_ex_PED*SPED(t),diff(Acyloin(t),t)=vmaxr_werte[i,1]*RPED(t)/(Km*(1+Acyloin(t)/Kip)+RPED(t)*(1+RPED(t)/Ki))*NAD(t)/(Km1+NAD(t))+vmaxs_w
erte[i,1]*SPED(t)/(Kms*(1+Acyloin(t)/Kip)+SPED(t))*NAD(t)/(Kms1+NAD(t))-
k_ex_Acyloin*Acyloin(t),diff(Acyloinorg(t),t)=+k_ex_Acyloin*Acyloin(t),diff(NAD(t),t)=-
k_NAD_zerfall*NAD(t),diff(RPEDorg(t),t)=k_ex_PED*RPED(t),diff(SPEDorg(t),t)=k_ex_PED*SPED(t):
sol[i] := dsolve({de,ini},{RPED(t),SPED(t),Acyloin(t),Acyloinorg(t),NAD(t),SPEDorg(t),RPEDorg(t)},type=numeric, method=lsode, ctrl=C):
ini:=RPED((i-4)*1000)=rhs(sol[i](((i-4)*1000)[5]),SPED((i-4)*1000)=rhs(sol[i](((i-4)*1000)[7]),Acyloin((i-4)*1000)=rhs(sol[i](((i-
4)*1000)[2]),Acyloinorg((i-4)*1000)=rhs(sol[i](((i-4)*1000)[3]),NAD((i-4)*1000)=rhs(sol[i](((i-4)*1000)[4]),RPEDorg((i-4)*1000)=rhs(sol[i](((i-
4)*1000)[6]),SPEDorg((i-4)*1000)=rhs(sol[i](((i-4)*1000)[8]):end do:

```

Abspeichern der Ergebnisse

```
for j from 722 by 1 to 869 do RPEDarray[j]:=rhs(sol[j])(j*1000)[5];zeit[j]:=j*1000; Acyloinarray[j]:=rhs(sol[j])(j*1000)[2];
Acyloinorgarray[j]:=rhs(sol[j])(j*1000)[3];NADarray[j]:=rhs(sol[j])(j*1000)[4];RPEDorgarray[j]:=rhs(sol[j])(j*1000)[6];SPEDarray[j]:=rhs(sol[j])(j*1000)[7];
SPEDorgarray[j]:=rhs(sol[j])(j*1000)[8]; end do:
```

Berechnung Umsatz,ee, sowie Eintragen des Umsatz,ee aus Versuch in Array

```
Acyloinorgseq:=[seq([zeit[i], Acyloinorgarray[i]], i=0..869)];
for i from 0 to 869 do ee[i]:=(SPEDarray[i]-RPEDarray[i])/(SPEDarray[i]+RPEDarray[i])*100; end do:
versuchee:=[[0,0],[3600,2.414],[10800,0],[18000,8.621],[25200,11.816],[28800,7.114],[55188,15.701],[91512,12.642],[102312,12.809],[113112,13.386],
[17100,14.450],[191397.6,24.627],[277920,31.267],[356400,56.293],[599400,100],[717000.12,100],[873612,100]]:
ee1:=[seq([zeit[i],ee[i]], i=0..869)];
for i from 0 to 869 do umsatz[i]:=(0.033-(RPEDarray[i]+SPEDarray[i])/0.0331)*100; end do:
versuchumsatz:=[[0,0],[3600,0],[10800,0],[1800,14.31],[25200,15.514],[28800,17.364],[55.188,3.509],[91512,15.575],[102312,12.141],[113112,12.150],
[17100,28.672],[191397.6,26.993],[277920,42.625],[356400,55.8522],[599400,66.753],[717000.12,71.461],[873612,70.570]]:
umsatz1:=[seq([zeit[i],umsatz[i]],i=0..869)];
umsatzee:=[seq([umsatz[i],ee[i]],i=0..869)];
versuch:=[[0,0],[0,2.41],[0,0],[14.309,8.621],[15.514,11.816],[17.364,7.114],[15.575,12.642],[12.141,12.809],[12.151,13.387],[28.762,14.45],[26.993,24.626],
[42.652,31.267],[55.852,56.293],[66.753,100],[71.461,100],[70.571,100]]:
```

14.8 Analytik der Enzym-katalysierten Oxidationen

14.8.1 (*R,S*)-1-Phenyl-1,2-ethandiol

Bestimmung von Umsatz und Enantiomerenüberschuss der *GDH*-katalysierten Racematspaltung erfolgt gaschromatographisch an einer CP-Chirasil-Dex CB-Säule. (Trärgas Wasserstoff, 140 mL/min, 0.5 bar, isotherm 130°C, 31 min).

Chromatogramme mit typischen Retentionszeiten sind in Abbildung 14.8.1 dargestellt.

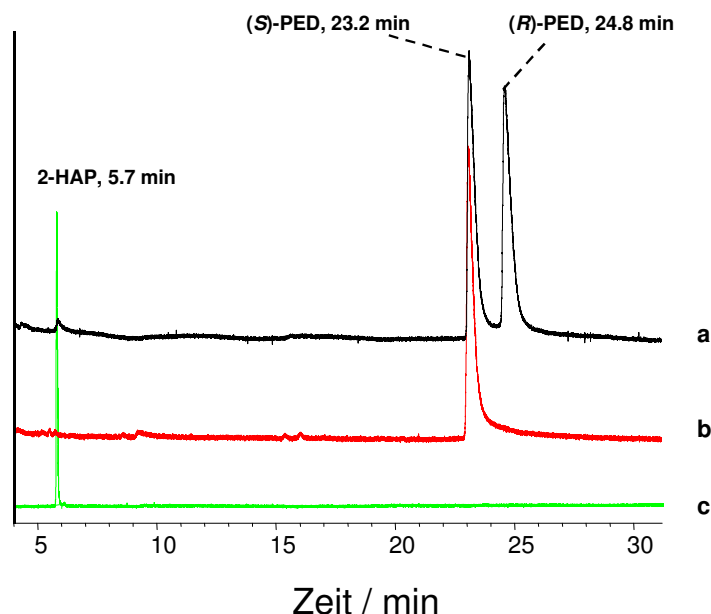


Abbildung 14.8.1: Chromatogramme einer *GDH*-katalysierten Racematspaltung im E³MR, a) Startprobe der wässrigen Phase, (*R,S*)-PED, b) Endprobe der wässrigen Phase nach erfolgreicher Umsetzung, enantiomerenreines (*S*)-PED, c) organische Phase mit 2-Hydroxyacetophenon (2-HAP)

14.8.2 (3*aR*,7*aS*)-3*a*,4,7,7*a*-Tetrahydro-3*H*-isobenzofuran-1-on

Die *HLADH*-katalysierte Oxidation von *meso*-3,4-Dihydroxymethylcyclohexen (*meso*-DHMC) über das Lactol 3*a*,4,7,7*a*-Tetrahydro-3*H*-isobenzofuran-1-ol (THIBF-1-ol) zum chiralen Lacton (3*aR*,7*aS*)-THIBF-1-on wird gaschromatographisch an einer CP-Chirasil-Dex CB-Säule verfolgt.

- Umsatzbestimmung: Trärgas Wasserstoff, 130 mL/min, 0,5 bar, Anfangstemperatur: 130°C, 5°C/min bis 190°C.

Ein Chromatogramm einer Lösung von Diol, Lactol und Lacton ist in Abbildung 14.8.2 dargestellt, die typischen Retentionszeiten sind angegeben.

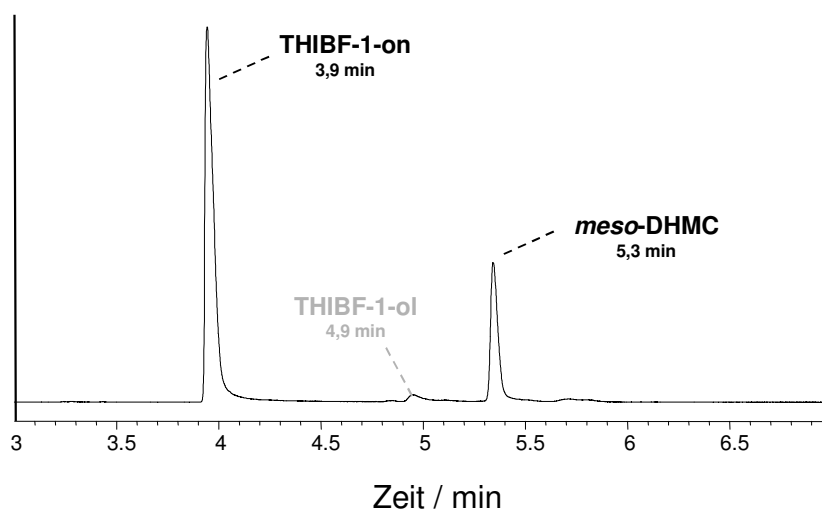


Abbildung 14.8.2: Chromatogramm von *meso*-DHMC, THIBF-1-ol und THIBF-1-on

- Enantiomerenüberschuss: Zur Bestimmung des *ee* wurde die Reaktionslösung bzw. das aufgearbeitete enzymatisch hergestellte Lacton gegen das chemisch hergestellte Racemat vermessen. Trägergas Wasserstoff, 450 mL/min, 1.8 bar, Anfangstemperatur 85°C, 3°C/min bis 120 °C, dann 50 °C/min bis 190 °C. Typische Chromatogramme von racemischem und enantiomerenreinem Lacton sind in Abbildung 14.8.3 dargestellt

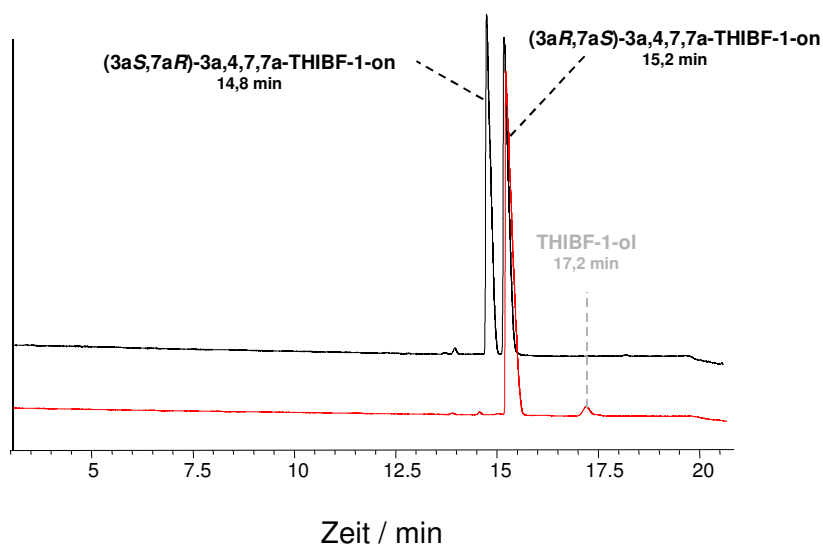


Abbildung 14.8.3: Bestimmung des *ee*: oben racemisches Lacton, unten: Endprobe einer *HLADH*-katalysierten Lactonisierung

14.9 HPLC-Analytik der Oxidation von NADH durch ABTS^{•-}

Die Reaktion wird qualitativ untersucht, um zu zeigen, dass NAD⁺ als Reaktionsprodukt gebildet wird. Die Analytik erfolgt mit chromatographisch an einer Multisphere 100 RP 18-5µm-Säule (40°C). Es werden zwei Wellenlängen (254 und 262 nm) vermessen. Als Laufmittel werden folgende mit Helium entgaste Lösungen verwendet:

- A Acetonitril mit 5 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBA)
- B KPi 30 mM, pH 6, 5 mM TBA mit 2% Acetonitril

Der Lösungsmittelfluss beträgt 1 mL/min.

Gradientenmethode: 0 min: 0% A, 100% B, 20 min: 20 % A, 80 % B, 25-30 min: 0% A, 100% B

Abbildung 14.9.1 zeigt Chromatogramme von NAD⁺ und NADH mit typischen Retentionszeiten.

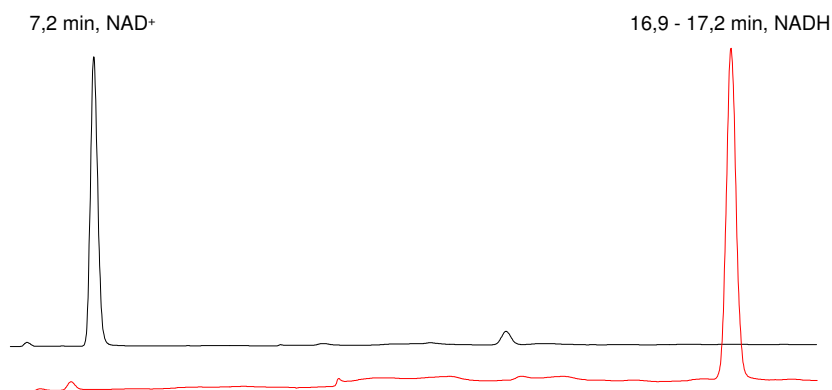


Abbildung 14.9.1: Chromatogramm von NAD⁺ (oben) und NADH (unten).

Es werden folgende Lösungen in vollentsalztem Wasser hergestellt:

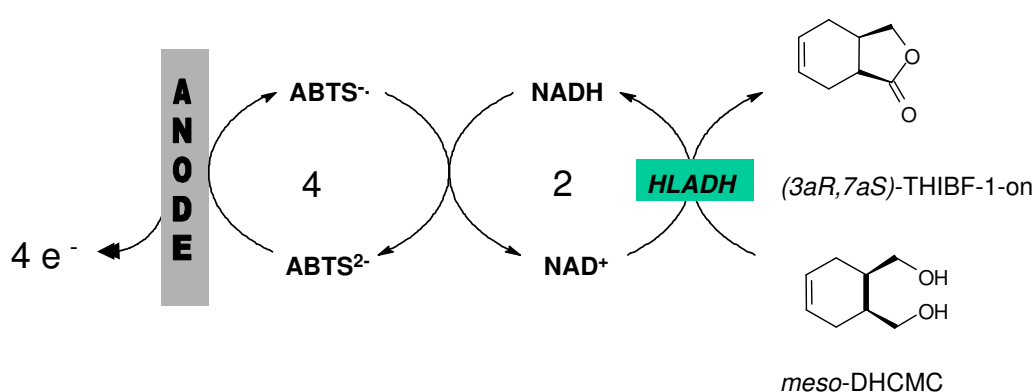
NADH: ~0,5 mg / mL, NAD⁺: ~ 0,5 mg/mL, ABTS^{•-}: die unter 14.5.2, Seite 145 beschriebene Stammlösung wird 1:20 mit vollentsalztem Wasser verdünnt, ABTS²⁻: ~ 0,5 mg / mL

Jede Lösung wird getrennt vermessen. Dann wird eine Lösung von Radikalkation mit NADH (1:10) versetzt und vermessen. Dieselbe Lösung wird unter Zusatz von NAD⁺ vermessen, um zu zeigen, dass das Oxidationsprodukt mit NAD⁺ identisch ist.

14.10 Enzymatische Synthesen

Die Reaktionsbedingungen der enzymatischen Synthesen sind in Tabelle 14.10.1 bis Tabelle 14.10.3 dargestellt. Die Reaktionen werden nach Enzymzugabe durch Anheben des Potentials auf 585 mV gegen Ag | AgCl gestartet. Ansonsten gelten die unter 14.3.3.1, Seite 142 und 14.3.3.2, Seite 143 beschriebenen Bedingungen. Die Analytik ist in Kapitel 14.8 auf Seite 156 beschrieben.

14.10.1 HLADH-katalysierte Lactonisierung



	1.Elektrolyse	2. Elektrolyse	3.Elektrolyse
Puffer	100 mM KPi, pH 8,0, RT	50 mM KPi, pH 8,0, RT	50 mM KPi, pH 8,0, RT
meso-DHMC / mM	59	56,4	48
NAD ⁺ / mM	0,59	1,	3
Nachdosierung		1 nach 20 h	
ABTS ²⁻ / mM	0,059	0,48	1,34
Nachdosierung		0,48 nach 22,8 h	
HLADH / U mL ⁻¹	0,2	0,23	0,2
Nachdosierung		0,03 nach 22,8 h	0,2 nach 20,5 h

Tabelle 14.10.1: HLADH-katalysierte Lactonisierung

Exemplarisch wurde eine geringe Menge an Produkt durch Extraktion mit Diethylether und anschließender Trocknung über wasserfreiem Na_2SO_4 aufgereinigt. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur ($ee > 0,99$) [34, 258].

14.10.2 GDH-katalysierte Racematspaltung von (*R,S*)-PED ohne Extraktion des Hydroxyketons

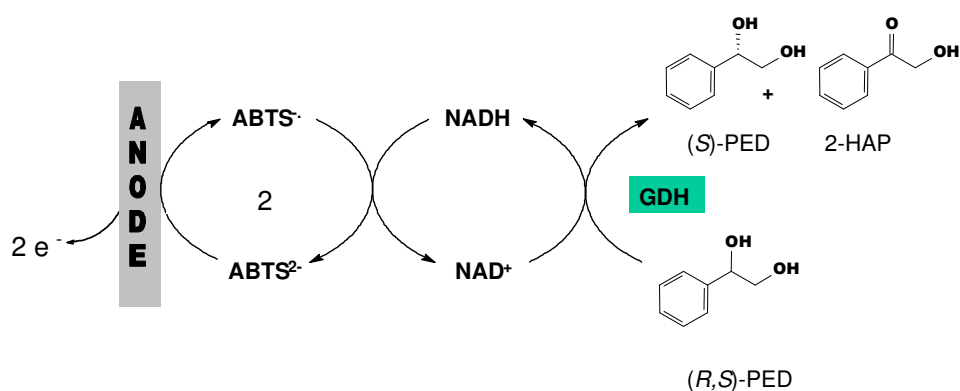


Abbildung 14.10.1: Reaktionsschema der Racematspaltung

	Becherglaszelle	Durchflussszelle
Puffer	100 mM K-Carbonat, pH 9,0, 25 °C	100 mM K-Carbonat, pH 9,0, 25 °C
(<i>R,S</i>)-PED / mM	40	100
NAD^+ / mM	4	1
ABTS^{2-} / mM	0,2	0,09
GDH / U mL^{-1}	0,36	0,63

Tabelle 14.10.2: GDH-katalysierte Oxidation ohne Entfernung von 2-HAP

14.10.3 E³MR- GDH-katalysierte Racematspaltung mit integrierter Produktextraktion

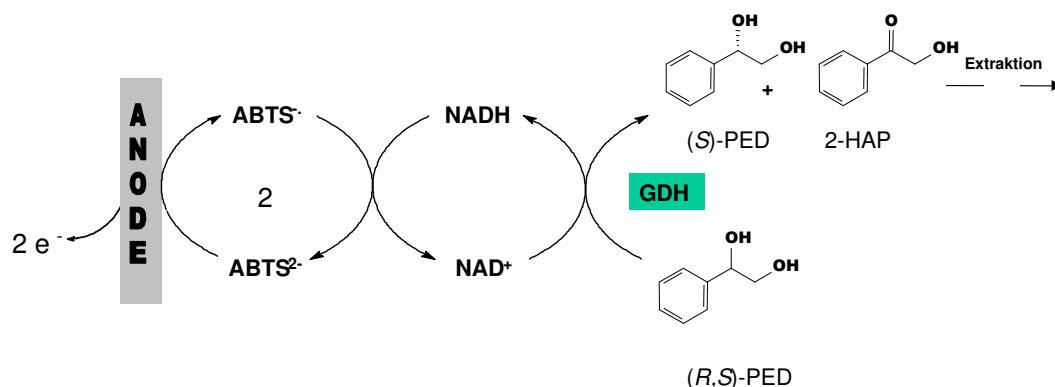


Abbildung 14.10.2: Reaktionsschema der Racematspaltung mit Produktextraktion

14.10.3.1 Reaktoraufbau und Reaktionsdurchführung

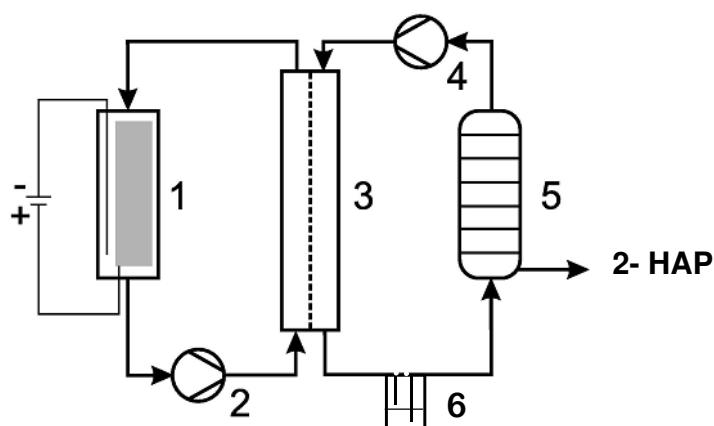


Abbildung 14.10.3: Schematische Aufbau des E³MR: 1) Elektrochemische Zelle (thermostatisierbar, siehe Abbildung 14.3.2, Seite 143), 2) wässrige Kreislaufröhre, 3) Ultrafiltrationshohlfasermodul (Extraktion), 4) organische Kreislaufröhre (iso-Oktan), 5) Rotationsverdampfer, 6) Druckausgleichgefäß

Aufbau:

wässriger Kreislauf: : $V \sim 300 \text{ mL}$ Reaktionslösung, $v_{fl.} = 492 \text{ mL min}^{-1}$, 25°C

organischer Kreislauf: $V \sim 300 \text{ mL}$ iso-Oktan, $v_{fl.} = 13\text{-}20 \text{ mL min}^{-1}$, Rezyklierung des Lösungsmittels: 60°C , 180 mbar, Wasserkühlung Rotationsverdampfer $\sim 10^\circ\text{C}$

Die Kreisläufe werden im Gegenstrom betrieben.

Durchführung:

Der Reaktor wird mit beiden Phasen gleichzeitig befüllt. Vor jedem Versuch wird der wässrige Kreislauf mit 1000 mL Kaliumcarbonatpuffer und anschließend mit 1000 mL der Reaktionslösung (ohne Kofaktor und Enzym) gespült, bis schließlich etwa 300 mL wässrige Reaktionslösung im Reaktor verbleiben. Die Elektrolyse wird durch Anlegen einer Gleichspannung von 0,585 V gegen Ag|AgCl gestartet. Dann wird die enzymatische Umsetzung durch Zugabe von Kofaktor und Enzym gestartet. Für Proben werden jeweils 800 μL der wässrigen Phase abgenommen. Der Umsatz und der Enantiomerenüberschuss werden gaschromatographisch ermittelt. Außerdem wird der Proteingehalt und die Enzymaktivität bestimmt.

Reaktionsbedingungen:

a)

Reaktionslösung	1. Elektrolyse	2. Elektrolyse
Puffer	0,1 M Kaliumcarbonat, pH 9,0	0,1 M Kaliumcarbonat, pH 9,0
(<i>R,S</i>)-PED / mM	17,4	33
NAD ⁺ / mM	0,37	0,4
ABTS ²⁻ / mM	0,025	0,2
GDH / U mL^{-1}	0,77	0,4

b)

Nachdosierung Elektrolyse 1			
Zeit / h	NAD ⁺ / mM	ABTS ²⁻ / mM	GDH / U mL^{-1}
7,75	0,26	0,125	0,19
44	0,364	-	0,37
68,75	0,44	-	-
164,17	0,312	-	0,11
214,75	0,44	-	-
240,25	0,312	-	-

c)

Nachdosierung Elektrolyse 2			
Zeit / h	NAD ⁺ / mM	ABTS ²⁻ / mM	GDH / U _{mL} ⁻¹
6	-	-	0,72
28,42	0,2	-	2,52
53,17	1,3	0,13	0,9
166,5	0,45	-	6,12
199,17	0,34	-	0,54

Tabelle 14.10.3 a-c: Reaktionsbedingungen und Nachdosierungen der Versuche im E³MR

Aufarbeitung des (S)-1-Phenyl-1,2-ethandiols:

Nach Beendigung der Reaktion wird die wässrige Phase dreifach mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird zunächst über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet. Anschließend versetzt man die Ethylacetat-Lösung tropfenweise mit *iso*-Oktan, bis sich eine dauerhafte Opaleszenz der Lösung zeigt. Nach ein bis zwei Tagen bei 4°C wird die Lösung filtriert. Das so gewonnene plättchen- bis nadelförmige farblose (S)-PED wird unter vermindertem Druck getrocknet.

Ausbeute 350 mg, $\eta = 26.5 \%$ bezogen auf das Racemat, ee > 0,99

Die analytischen Daten entsprechen literaturbekannten Werten [37].

ANHANG

A Elektrochemie - eine allgemeine Einführung

„Von der Steckdose bis zur Elektrolyse“

In den folgenden Kapiteln wird gezeigt, welchen Beitrag elektrochemische Untersuchungsmethoden zur Ermittlung kinetischer Daten, nicht nur von Elektrodenprozessen sondern auch von daran anschließenden homogen-chemischen Reaktionen, leisten. Zum grundlegenden Verständnis werden zunächst die allgemeinen Prinzipien der Elektrochemie und der verwendeten elektroanalytischen sowie präparativen Methoden erläutert [155, 262-266].

A.1 Definitionen und grundlegende Gesetze

Bevor man sich der Elektrolyse oder den elektroanalytischen Methoden zuwenden kann, müssen zunächst einige Begrifflichkeiten geklärt werden.

Alle elektrochemischen Reaktionen sind Redoxreaktionen. Wie bei allen Redoxreaktionen treten Oxidation und Reduktionsreaktion stets gemeinsam auf. Definitionsgemäß bezeichnet man die Elektrode, an der eine Reduktion stattfindet als Kathode, und die Elektrode, an der eine Oxidation stattfindet als Anode.

Elektrodenreaktionen sind im allgemeinen durch einen heterogenen Ladungstransfer zwischen der festen Elektrode und einer benachbarten flüssigen Phase gekennzeichnet.

Der Strom⁷³ I oder die Stromdichte J eines anodischen Prozesses ist immer mit positivem Vorzeichen definiert [267-269]. Entsprechend sind I und J für eine Kathodenreaktion mit negativem Vorzeichen behaftet. Damit eine elektrochemische Umsetzung ablaufen kann, muss ein Ladungsausgleich erfolgen, denn sonst würde sich die Anode negativ und die Kathode positiv aufladen und somit würde die Triebkraft der Reaktion immer kleiner. Der Ladungsausgleich, den das Gesetz von der Erhaltung der Ladung fordert,⁷⁴ findet in der Lösung durch Ionenwanderung und zwischen den Elektroden über einen messbaren Stromfluss statt. Als Beispiel ist hier die Reaktion

⁷³ $I = J A$

⁷⁴ Ladung kann weder erzeugt noch zerstört werden.



dargestellt. Diese setzt sich aus den Teilreaktionen



also der Oxidation von Zink und der Reduktion von Kupfer zusammen. Ein solches galvanisches Element ist in Abbildung A.1.1 dargestellt.

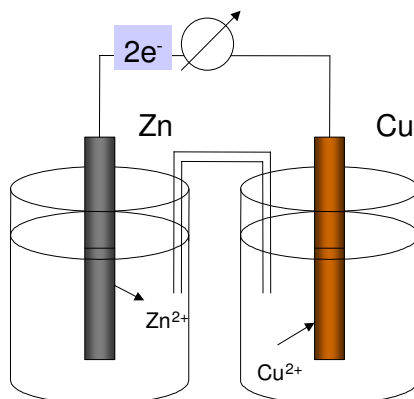


Abbildung A.1.1: Galvanisches Element aus Zn/Cu

Jede Lösung bildet mit der in sie eintauchenden Elektrode eine Halbzelle. Die beiden Halbzellen werden mit einer Salzbrücke (Stromschlüssel), z.B. mit konzentrierter Kaliumnitratlösung gefüllt, verbunden. Wenn in der linken Halbzelle Zn^{2+} in Lösung geht, erhöht sich die Konzentration der Kationen; gleichzeitig entsteht in der rechten Lösung durch Entladung von Cu^{2+} ein Anionenüberschuss. Der Ladungsausgleich erfolgt mit Hilfe der Salzbrücke, indem gleichzeitig Kationen von links nach rechts und Anionen von rechts nach links wandern. Zwischen den beiden Halbzellen kann eine Spannung gemessen werden. Verbindet man Zink- und Kupferblech leitend miteinander, so fließen über den Leitungsdraht Elektronen vom Zink zum Kupfer. Bei dieser Versuchsanordnung kann ein Teil der Reaktionsenthalpie als elektrische Arbeit genutzt werden.

Die Kombination von zwei Halbzellen bezeichnet man als galvanische Zelle, galvanische Kette oder galvanisches Element. Beispiele für galvanische Elemente sind Batterien oder Brennstoffzellen. Die Zellspannung ΔE (Potentialdifferenz zwischen den Halbzellen) wird auch EMK (elektromotorische Kraft) genannt. Triebkraft der freiwillig ablaufenden Redoxreaktion ist die Potentialdifferenz. Da man diese Potentialdifferenzen zwischen unterschiedlichen Halbzellen messen kann, sollte man jeder Halbzelle ein Redoxpotential zuordnen können. Dies kann allerdings nicht absolut geschehen, es wird ein willkürlicher

Standard als Nullpunkt festgelegt. Hierzu dient die Normalwasserstoffelektrode (NHE) oder auch Standardwasserstoffelektrode (SHE) als Bezugssystem. Die Normalwasserstoffelektrode ist eine Halbzelle bei 25°C, in der eine Elektrode aus platinisiertem Platin, die von Wasserstoff von 1013 mbar Druck umspült wird, in eine Lösung eintaucht, die Hydroxoniumionen mit der Aktivität 1 mol L⁻¹ enthält (pH 1).

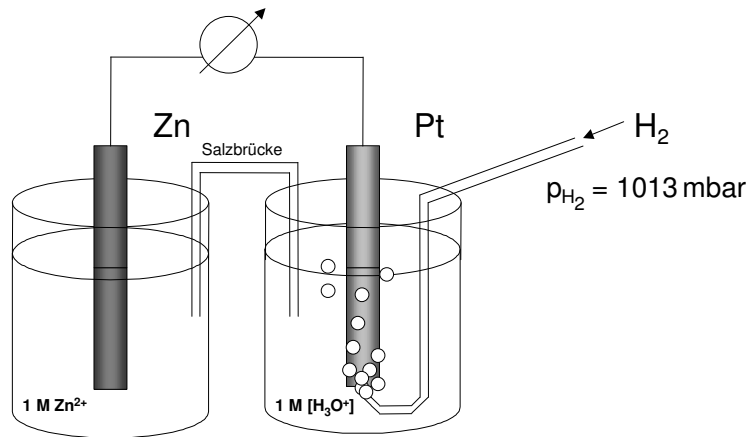


Abbildung A.1.2: Die Bestimmung des Normalpotentials von Zn gegen NHE

Ordnet man die Redoxpaare nach der Spannungsdifferenz, so erhält man die Tabelle der sogenannten Standard- oder Normalpotentiale, die auch als elektrochemische Spannungsreihe bezeichnet wird. Die in der Spannungsreihe aufgeführten Redoxpotentiale gelten für Standardbedingungen, d.h. neben Standarddruck und -temperatur, dass die Aktivitäten in Lösung 1 mol L⁻¹ betragen. Üblicherweise liegen aber von 1 mol L⁻¹ abweichende Aktivitäten bzw. angenähert Konzentrationen vor.

A.1.1 Die Nernstsche Gleichung

Die Konzentrationsabhängigkeit des Gleichgewichtsredoxpotentiale wird beschrieben durch die Gleichung von *Nernst* (1889) [270-272]. Verbindet man zwei elektrochemische Halbzellen miteinander, so wird eine elektrochemische Umsetzung nur dann spontan stattfinden, wenn die *Gibbssche* freie Reaktionsenergie ΔG negativ ist.

Gleichung A.1.1

$$\Delta G = -nFE$$

 n = Anzahl der übertragenen Elektronen F = Faraday-Konstante E = elektrochemisches Potential

Es gilt in Verknüpfung der *van't Hoff*schen Reaktionsisotherme mit der freien Standard-Reaktionsenergie ΔG^0 :

Gleichung A.1.2

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{[O]}{[R]}$$

oder auch in der Exponentialschreibweise:

Gleichung A.1.3

$$\exp \left[\frac{nF(E - E^0)}{RT} \right] = \frac{[O]}{[R]}$$

 R = allgemeine Gaskonstante F = Faraday-Konstante E^0 = Normalpotential $[O]$ = Konzentration der oxidierten Spezies $[R]$ = Konzentration der reduzierten Spezies n = Anzahl der übertragenen Elektronen

Mit Hilfe der *Nernst*-Gleichung kann also das Elektrodenpotential bei Konzentrationen, die von der Standardkonzentration 1 mol L^{-1} abweichen, berechnet werden.

Für 25°C erhält man durch Einsetzen und Umrechnen auf den dekadischen Logarithmus

Gleichung A.1.4

$$E = E^0 + \frac{0,059 \text{ V}}{n} \cdot \lg \frac{[O]}{[R]}$$

A.1.2 Referenzelektroden

Sowohl in der analytischen als auch in der präparativen Elektrochemie werden andere Bezugssysteme verwendet als die NHE, die experimentell einfacher zu handhaben sind. Bei dieser Art der Referenzelektroden handelt es sich um Elektroden zweiter Art. Elektroden zweiter Art sind Elektroden, bei denen nicht nur eine feste Phase (Metall) und eine flüssige Phase (Elektrolyt) vorliegen, sondern es gibt eine weitere feste Phase (Metallsalz). Das Potential einer solchen Halbzelle hängt in der gesättigten Lösung des Metallsalzes über das

Löslichkeitsprodukt von der Konzentration der Anionen ab. Damit ist das Potential einer Elektrode zweiter Art letztlich durch die Konzentration der Anionen gegeben. Die Beziehung für das Potential einer Elektrode zweiter Art soll am Beispiel der Silberchloridelektrode verdeutlicht werden. Diese Elektrode kann hergestellt werden, indem man ein Silberblech oder einen Silberdraht durch anodische Oxidation in chloridionenhaltiger Lösung mit einer AgCl-Schicht überzieht. Das Potential dieser Elektrode hängt von der Chloridionenkonzentration ab.

Gleichung A.1.5

$$E^\circ(\text{AgCl}) = E^\circ(\text{Ag} | \text{Ag}^+) + \frac{RT}{F} \cdot \ln L$$

mit $L = [\text{Ag}^+] \cdot [\text{Cl}^-]$

Gleichung A.1.6

$$E(\text{AgCl}) = E^\circ(\text{AgCl}) - \frac{RT}{F} \cdot \ln[\text{Cl}^-]$$

Legt man $[\text{Cl}^-]$ fest, so besitzt die Elektrode ein bestimmtes Potential, so dass man sie ebenso wie die Standardwasserstoffelektrode als Bezugselektrode für Potentialmessungen verwenden kann. Weitere häufig benutzte Referenzelektroden sind die SCE (Standard-Calomel-Elektrode, $\text{Hg}|\text{Hg}_2\text{Cl}_2$) und für organische Lösungsmittel eine $\text{Ag}|\text{AgNO}_3$ -Elektrode. Diese Bezugselektroden werden in der präparativen Elektrochemie dazu eingesetzt, um bei potentialkontrollierten Elektrolysen zu gewährleisten, dass der während der Elektrolyse fließende Strom nicht das angelegte Potential beeinflusst. Bei der Aufnahme von Cyclovoltammogrammen misst man den Stromfluss in Abhängigkeit von zeitlich variierenden Potentiale.

A.1.3 Das Faradaysche Gesetz

Dass ein quantitativer Zusammenhang zwischen der bei einer elektrochemischen Reaktion fließenden Ladungsmenge und den chemischen Umsetzungen an den Elektroden besteht, war von *Faraday* 1832/33 gezeigt worden. Das *Faradaysche Gesetz* besagt, dass die durch eine bestimmte Ladungsmenge abgeschiedene Masse verschiedener Stoffe deren molaren Massen eines Äquivalents (Äquivalentmasse) entspricht, d.h. die Ladungsmenge Q ist dabei proportional der umgesetzten Stoffmenge m und der Anzahl der übertragenen Elektronen n .

Gleichung A.1.7

$$Q = mnF$$

$F = \text{Faraday-Konstante}^{75}$

⁷⁵ $F = 96486,5 \text{ C mol}^{-1}$

A.2 Elektrolyse

Nun sind alle wesentliche Begriffe und Gesetze erklärt, um den grundlegenden Unterschied zwischen galvanischem Element und Elektrolyse erläutern zu können.

Im Gegensatz zum galvanischen Element ist eine Elektrolyse eine erzwungene Reaktion, die die *Nernstsche* Gleichung umkehrt und für die man mindestens die Energiemenge ΔG aufbringen muss, die im entsprechenden galvanischen Element freigesetzt wird.

Unter einer Elektrolyse versteht man die Zersetzung bzw. Umsetzung eines Stoffes durch den elektrischen Strom. Die minimale Elektrolyseapparatur besteht aus zwei Elektroden, einer äußeren Gleichstromquelle und dem Reaktionsgefäß (Abbildung A.2.1). Die Gleichstromquelle liefert dabei die Triebkraft für die Reaktion. Einfach dargestellt sind die Elektroden das Reagens mit dem die Oxidation und die Reduktion durchgeführt werden.⁷⁶

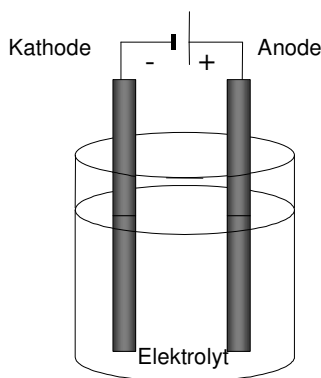


Abbildung A.2.1: Schematische Darstellung einer Elektrolyseapparatur

Zur Durchführung einer Elektrolyse ist eine bestimmte Mindestspannung erforderlich, die durch die Potentiale der an Kathode und Anode vorliegenden Redoxpaare gegeben ist.

Als Beispiel soll die Elektrolyse von Salzsäure mit $c = 1 \text{ mol L}^{-1}$ an Platinelektroden betrachtet werden (Abbildung A.2.2). Man beobachtet an der Kathode Wasserstoff- und an der Anode Chlorgasentwicklung. An der Kathode bildet sich das Redoxsystem $\text{H}_2|\text{H}_3\text{O}^+$, an der Anode $\text{Cl}|\text{Cl}_2$. Die beiden Systeme stellen die Halbzellen eines galvanischen Elements dar, dessen EMK der Elektrolysespannung entgegengesetzt ist. Die galvanische Zelle besteht also aus einer Wasserstoff- und einer Chlorelektrode, in der Wasserstoff und Chlor das Bestreben haben, wieder in Form ihrer Ionen in Lösung zu gehen.

⁷⁶ zur Erinnerung: Keine Oxidation ohne Reduktion; Gesetz der Ladungserhaltung

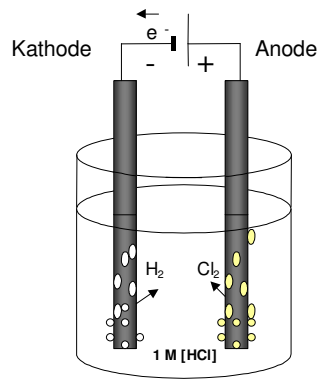


Abbildung A.2.2: Elektrolyse von 1M Salzsäure in Umkehrung der Chlorknallgasreaktion

Die Gegenspannung nennt man Polarisationsspannung. Ein am Beginn der Elektrolyse bei geringer Spannung fließender Elektrolysestrom (Diffusionsstrom) kommt durch Ausbildung der Gegen-EMK bald wieder zum Erliegen. Erst wenn bei Erhöhung der Klemmenspannung der Partialdruck der abgeschiedenen Gase den äußeren Druck erreicht und die Gase in Form von Bläschen entweichen können (sie sind bei geringen Spannungen lediglich vom Elektrodenmaterial ad- bzw. absorbiert), beginnt ein dauernder Strom zu fließen; der Elektrolyt wird zersetzt (Abbildung A.2.3). Die hierzu notwendige Spannung heißt Zersetzungsspannung (U_z).

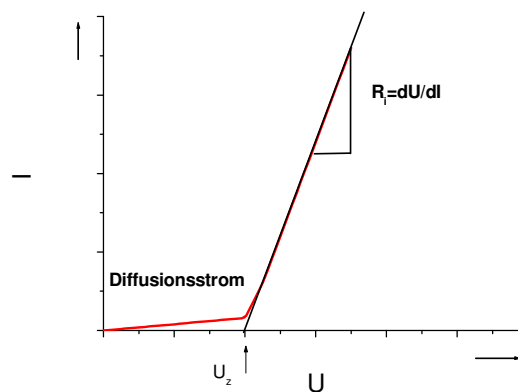


Abbildung A.2.3: Strom-Spannungs-Diagramm

Die Zersetzungsspannung entspricht bei Standardbedingungen der Differenz der Standardpotentiale der beiden Redoxsysteme. Da das Standardpotential des Systems $\text{H}_2|\text{H}_3\text{O}^+$ definitionsgemäß Null beträgt, ergibt sich für die Zersetzungsspannung $U_z = 1,36 \text{ V}$. Bei weiterer Steigerung der Klemmenspannung (U_{kl}) wächst der Strom nach dem *Ohmschen* Gesetz.

Gleichung A.2.1

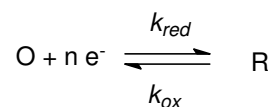
$$IR_i = I_{kl} + U_z$$

Dabei stellt der Term IR_i den Spannungsabfall in der Lösung dar, der durch den Lösungswiderstand (R_i) hervorgerufen wird. Diesen Spannungsabfall (Drop) kann man minimieren, indem man einerseits die Leitfähigkeit der Lösung erhöht, etwa durch Zusatz eines Leitsalzes, oder die Elektrodenabstände verringert. Da sowohl die Überspannung als auch der IR_i -Drop spannungsabhängig sind, würde die Strom-Spannungs-Kurve in einer Zwei-Elektroden-Anordnung keinen Aufschluß über die Elektronentransferprozesse geben. Daher wird für analytische Zwecke eine Drei-Elektroden Anordnung benutzt, wobei das Potential der Arbeitselektrode über eine stromlose Referenzelektrode kontrolliert wird und durch die räumliche Anordnung der Spannungsabfall über den Lösungswiderstand minimiert wird. Die Wahl der Elektrodenanordnung für eine präparative Umsetzung hängt auch davon ab, ob man galvanostatisch (konstanter Strom) oder potentiostatisch (konstante Spannung) arbeitet. Aus den o.g. Gründen ist für die potentiostatische Arbeitsweise auch eine Bezugselektrode notwendig. Für galvanostatische Elektrolysen wird die Zwei-Elektroden Anordnung verwendet, da der fließende Strom direkt gemessen werden kann.

Es ist niemals möglich, gleichzeitig die Freiheitsgrade Spannung und Strom bei einer Elektrolyse festzulegen, da der Lösungswiderstand ebenfalls vorgegeben ist.

Das angelegte Potential bei einer potentiostatische Elektrolyse steuert die thermodynamische Triebkraft und gleichzeitig die Reaktionsgeschwindigkeit, also die Kinetik der Elektrodenreaktion und damit auch den Stromfluss. Gibt man hingegen bei der galvanostatischen Elektrolyse einen Strom vor, so stellt sich automatisch das entsprechende Potential ein. Bei einer elektrochemischen Umsetzung muss man mehrere Faktoren berücksichtigen, die den Stromfluss und die Geschwindigkeit der Elektrodenreaktion beeinflussen (Abbildung A.2.4). Im allgemeinen ist der Stromfluss oder die Geschwindigkeit einer elektrochemische Reaktion

Gleichung A.2.2



abhängig von der Geschwindigkeit folgender Prozesse:

1. Massentransport von der Reaktionslösung zur Elektrode und zurück
2. Elektronentransfer an der Elektrodenoberfläche

3. Chemische Reaktionen, die der elektrochemischen Reaktion vorausgehen oder angeschlossen sind, z.B. Protonierungen oder Dimerisierungen
4. Oberflächenreaktionen wie Ad- und Desorption oder Kristallisationsprozesse (Elektrodeposition).

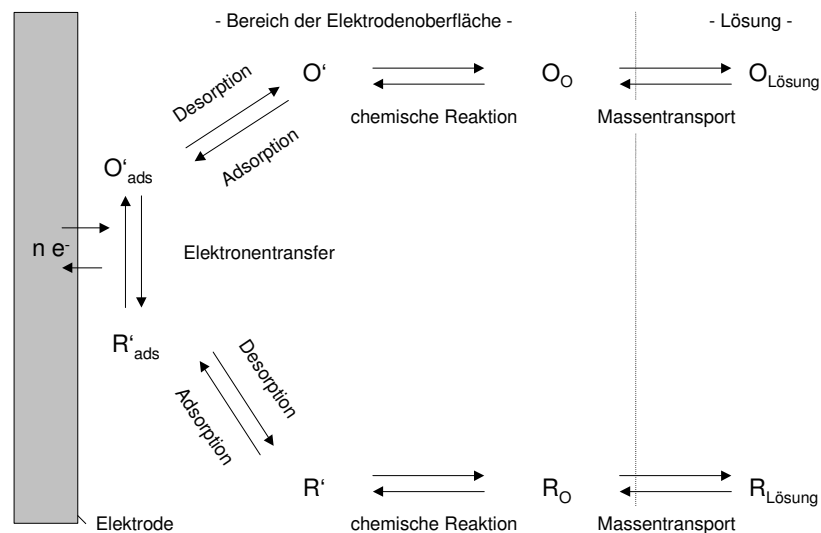


Abbildung A.2.4: Allgemeines Reaktionsschema einer Elektrolyse

A.2.1 Überspannung

Will man eine Elektrolyse durchführen, so muss man eine Zellspannung anlegen, die größer ist, als die Differenz der Standardpotentiale von anodischer und kathodischer Reaktion. Würde allein die Thermodynamik einen Elektrodenprozeß bestimmen, so müßte eine Elektrolyse stattfinden, sowie das nach der *Nernstschen* Gleichung berechnete Potential angelegt würde. Tatsächlich muss zusätzliche Spannung angelegt werden, sog. Überspannung. Diese Überspannung⁷⁷ $|\eta|$ muss aufgebracht werden, um die Elektrodenreaktion zu beschleunigen. Die Überspannung ist damit also ein Phänomen, für dessen Erklärung man die Kinetik der Elektrodenreaktion näher betrachten muss. Die gesamte Zellspannung U , die für die Durchführung einer Elektrolyse angelegt werden muss, setzt sich wie folgt zusammen:

Gleichung A.2.3
$$U = E_k^0 - E_a^0 - |\eta_a| - |\eta_k| - IR_i$$

⁷⁷ Für eine Oxidation ist die Überspannung positiv, für eine Reduktion negativ.

E^0 bezeichnet die Normalpotentiale der Anode bzw. Kathode.

Während die Gleichgewichtspotentiale wie oben gezeigt, durch die Thermodynamik bestimmt sind, und der IR_i -Drop über das Ohmsche Gesetz vom Lösungswiderstand R_i und letztlich damit von der Leitfähigkeit des Elektrolyten abhängt, spielt die Kinetik insbesondere eine Rolle bei der Elektrodenreaktion und äußert sich durch die Überspannung.

A.3 Elektrodenprozesse

Sowohl bei der präparativen Elektrolyse als auch elektroanalytischen Messungen wie der Cyclovoltammetrie (Kapitel 6, S. 51 ff) spielt der heterogene Ladungstransfer zwischen Elektrode und gelöster Spezies eine entscheidende Rolle. Durch Anlegen einer geeigneten Spannung an eine Elektrode wird die thermodynamische Triebkraft für die Durchführung einer Oxidation oder Reduktion zur Verfügung gestellt. Die Triebkraft einer elektrochemischen Reaktion wird also vom Potential beeinflusst. Darüber hinaus ist auch die Geschwindigkeit des Elektronentransfers, der sogenannten Durchtrittsreaktion, spannungsabhängig. Damit bestimmt das Potential auch die Kinetik einer Elektrodenreaktion. Um diese Zusammenhänge darstellen zu können, benötigt man eine modellhafte Beschreibung der Elektrodenoberfläche und ihrer Umgebung.

A.3.1 Die elektrische Doppelschicht

Generell tendieren geladenen Teilchen dazu, an der Grenzschicht zwischen Elektrode und umgebender Lösung entweder angezogen oder abgestoßen zu werden. Dies führt zu einer Ladungstrennung und dabei bildet sich eine Schicht heraus, deren Zusammensetzung sich von der übrigen Elektrolytlösung unterscheidet. *Helmholtz* (1853) war der erste, der Mitte des 19. Jahrhunderts ein Modell entwickelte und den Ausdruck "elektrische Doppelschicht" für diese polarisierte Grenzschicht einführte. Als Grundlage dieses Modells nahm er an, dass an der Elektrode kein Elektronentransfer stattfindet und die Reaktionslösung ausschließlich aus dem Elektrolyten besteht. Eine weitere Voraussetzung ist, dass die Interaktionen zwischen den gelösten Teilchen und der Elektrodenoberfläche rein elektrostatischer Natur sind. Diese elektrostatische Wechselwirkung ist auf die Ladungsdichte an der Elektrode zurückzuführen, die entweder auf einem Elektronenüberfluss oder auf einem Elektronenmangel beruht. Diese Ladung wird ausgeglichen, indem sich die geladenen Teilchen oder Dipole in der unmittelbaren Nähe der Elektrode orientieren.

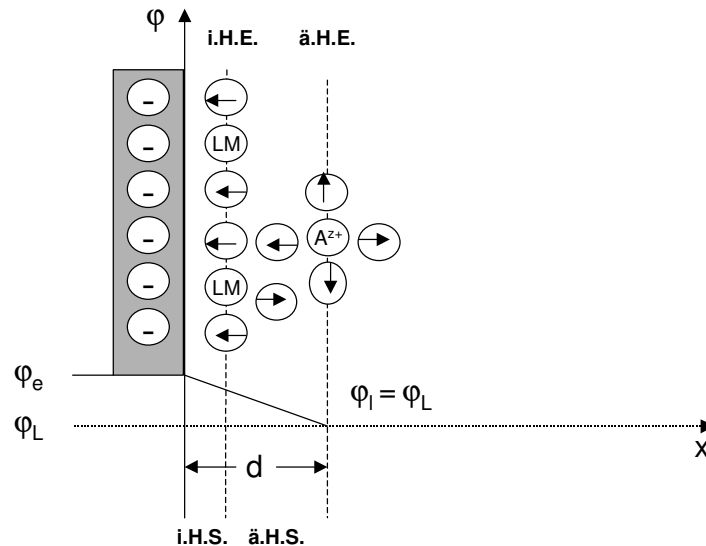


Abbildung A.3.1: *Helmholtz*-Modell der elektrischen Doppelschicht; i.H.E. = innere *Helmholtz*-Ebene, i.H.S. = innere *Helmholtz*-Schicht; ä.H.E. = äußere *Helmholtz*-Ebene, ä.H.S. = äußere *Helmholtz*-Schicht

Man nimmt an, dass die polaren Teilchen sich der Elektrodenoberfläche nähern, wobei der Abstand der polaren Teilchen zur Elektrodenoberfläche von der Solvathülle bestimmt wird. Entgegengesetzt geladene Teilchen nähern sich nun wiederum und bilden eine zweite Schicht. Insgesamt liegt eine Doppelschicht von gegensätzlich geladenen Teilchen vor. Nach dem *Helmholtz*-Modell der starren Doppelschicht (streng genommen ohne Solvathülle) führt dies zu einem Potentialabfall ($\Delta\phi$) zwischen dem Elektrodenpotential ϕ_e und dem Potential der äußeren *Helmholtz*-Ebene ϕ_l , wobei dies bei *Helmholtz* gleich dem Potential ϕ_L der Lösung ist (starre Doppelschicht).

Diese Doppelschicht verhält sich wie einem Kondensator, bei dem die Ladungen über einen Abstand d voneinander getrennt sind. Das *Helmholtz*-Modell der starren Doppelschicht (Abbildung A.3.2a) trägt jedoch Phänomenen wie etwa der Diffusion keine Rechnung.

Gouy (1910) und *Chapman* (1913) führten die diffuse Doppelschicht ein und *Stern* (1924) vereinte schließlich die beiden Konzepte (Abbildung A.3.2b). Daraus resultiert eine Schicht nahe der Elektrode, in der es zu einem linearen Potentialabfall kommt (*Helmholtz*) und einer diffusen Schicht, in der der Potentialabfall nicht mehr linear erfolgt.

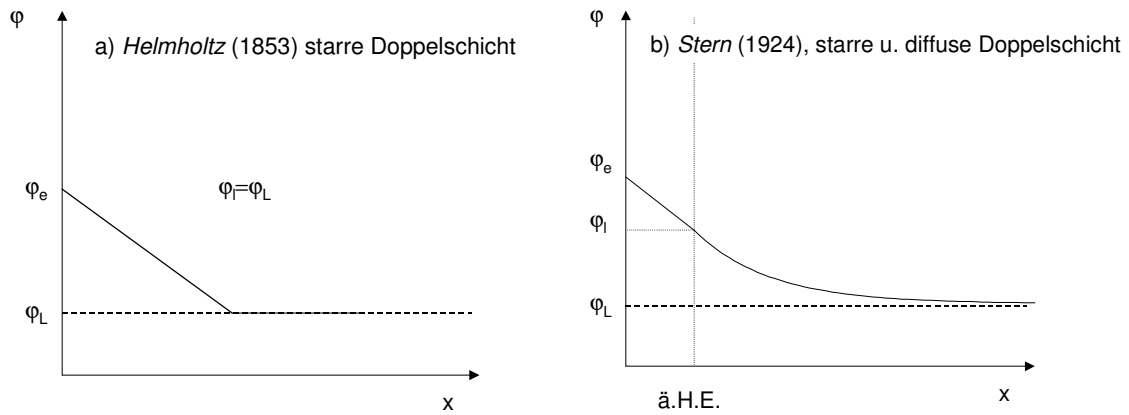


Abbildung A.3.2: Modelle der elektrischen Doppelschicht in chronologischer Reihenfolge

Die elektrische Doppelschicht und insbesondere ihre Eigenschaft, als Kondensator zu wirken, beeinträchtigt die Genauigkeit elektrochemischer Messungen. Immer, wenn bei einer Messung die Oberfläche, das Potential oder die Kapazität der Elektrode in Abhängigkeit von der Zeit verändert wird, fließt ein nicht-*faradayischer* Strom, der sog. Ladungsstrom des Doppelschichtkondensators, der das Meßergebnis verfälscht. Dies ist wiederum ein Grund für die Verwendung von Referenzelektroden, die nicht polarisiert werden, also stromlos sind.

A.4 Zusammenfassung

- In einem galvanischen Element oder in einer Brennstoffzelle läuft eine Redoxreaktion freiwillig ab, wohingegen eine Elektrolyse eine erzwungene Reaktion darstellt.
- Die *Nernst*-Gleichung beschreibt den logarithmischen Zusammenhang zwischen dem elektrochemischen Potential und der Konzentration, während das *Faradaysche* Gesetz den linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Ladungsmenge darstellt.
- Durch elektrostatische Anziehungskräfte bildet sich auf der Elektrodenoberfläche eine elektrische Doppelschicht, die durch Ladungstrennung wie ein Kondensator wirkt (*Helmholtz*). Spätere Modelle berücksichtigen Diffusionseffekte (*Gouy-Chapmann*, *Stern*).
- Eine Referenzelektrode wird in einer Drei-Elektroden-Anordnung einerseits verwendet, weil man für die potentiostatische Arbeitsweise einen fixen Bezugspunkt benötigt und andererseits, um Doppelschichteffekte zu minimieren.
- Zur Durchführung einer Elektrolyse muss eine Spannung angelegt werden, die um $|\eta|$ größer ist als nach *Nernst* berechnete Spannung. Diese Überspannung ist eine Folge der Durchtrittskinetik.

A.5 Die Durchtrittsreaktion

Betrachtet man die Energetik des Ladungsübertritts, so zeigt sich eine Abhängigkeit der Durchtrittsgeschwindigkeit vom Potential. Tatsächlich ist das angelegte Potential die Haupttriebkraft der Elektrodenreaktion. Diese angelegte Spannung verändert nun das Energieniveau eines Elektrons innerhalb der Elektrode.

Dieses Verhalten kann erklärt werden, wenn man das Fermi-Niveau (E_F) eines Elektrons in einem metallischen Leiter näher betrachtet. Metalle besitzen keine wohl-definierten Energieniveaus sondern die Entartung der Energieniveaus ergibt ein Leitungsband, welches die Elektronen enthält. Das Fermi-Niveau, das oberste besetzte Niveau des Leitungsbandes, wird durch Anlegen einer Spannung verschoben (Abbildung A.5.1).

Hebt man das Fermi-Niveau über das niedrigste unbesetzte Niveau des Reaktanden (LUMO) an, so kann ein Elektron vom Metall auf den Reaktanden übergehen (Reduktion). Die Kathode ist daher positiv polarisiert. Bei der Anode kommt es durch Absenken des Fermi-Niveaus zu einer Übertragung von Elektronen aus dem obersten besetzten Niveau (HOMO) des Reagens auf die Elektrode (Oxidation). Somit lässt sich durch das Anlegen einer äußeren Spannung die Elektrode als Oxidationsmittel oder als Reduktionsmittel einzusetzen.

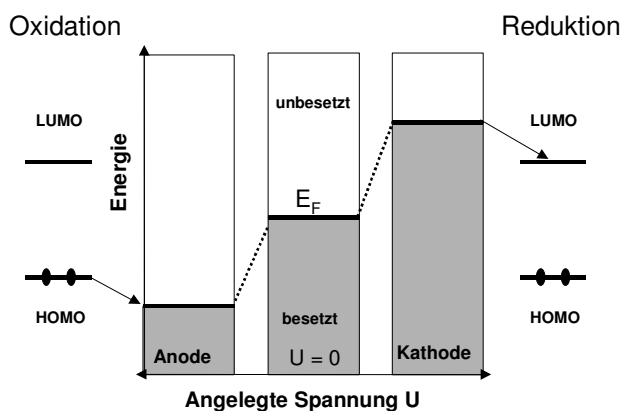


Abbildung A.5.1: Die Elektrode als Redoxreagens

Die Kinetik des Elektronentransfers entscheidet nun, ob die thermodynamisch vorteilhafte Reaktion mit messbarer Geschwindigkeit abläuft.

A.6 Kinetik des Elektronentransfers

A.6.1 Theorie des aktivierten Komplexes

Der Strom, der bei einer Elektrolyse fließt wird im Wesentlichen von zwei Faktoren bestimmt. Dies ist einerseits die Geschwindigkeit des Elektronentransfers der gelösten Spezies zur Elektrode (Oxidation) bzw. auch umgekehrt (Reduktion) und andererseits der Massentransport zwischen Elektrode und Lösung.⁷⁸ Ein quantitatives Modell des Zusammenhangs zwischen der angelegten Spannung und der Geschwindigkeit des Elektronentransfers kann hergeleitet werden [262, 263, 266, 273], wobei vereinfachend ein Ein-Elektronen-Transfer zwischen zwei Spezies (O) und (R) betrachtet wird (Gleichung A.2.2, $n = 1$). Unter Verwendung der aus der chemischen Reaktionskinetik bekannten Theorie des Übergangszustands nach *Eyring* lässt sich nun herleiten, wie die Geschwindigkeitskonstanten k_{ox} und k_{red} von der angelegten Spannung abhängen. Jede Reaktion verläuft hierbei über eine Energiebarriere, die als Übergangszustand (ÜZ) bezeichnet wird.

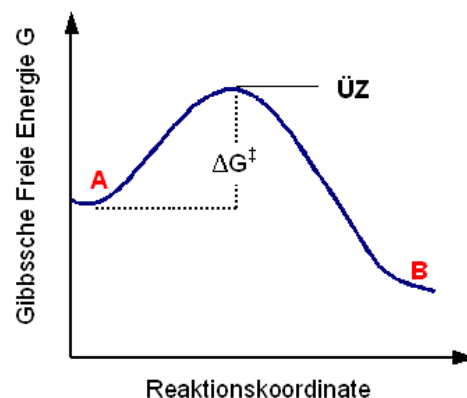


Abbildung A.6.1 Diagramm der *Gibbsschen* Freien Energie als Funktion der Reaktionskoordinate

Für eine Reaktion



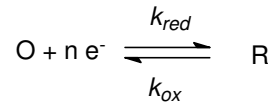
lässt sich die Geschwindigkeitskonstante k wie folgt berechnen

Gleichung A.6.2
$$k = \frac{RT}{N_A h} \cdot \exp\left[\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}\right], \quad h = \text{Frequenzfaktor.}$$

⁷⁸ Vergleiche hierzu Kapitel A.9., Seite 193 ff.

Der Exponent stellt die Änderung in der freien Energie dar, die benötigt wird, um den Reaktanden aus dem Anfangszustand in den Übergangs- oder auch aktivierten Zustand zu überführen. Für einen Elektronentransfer der Form ($n = 1$)

Gleichung A.2.2



erhält man ein ähnliches Diagramm und kann analog formulieren

Gleichung A.6.3

$$\Delta G_{red}^\ddagger = G^\ddagger - G^{ox}$$

Gleichung A.6.4

$$\Delta G_{ox}^\ddagger = G^\ddagger - G^{red}.$$

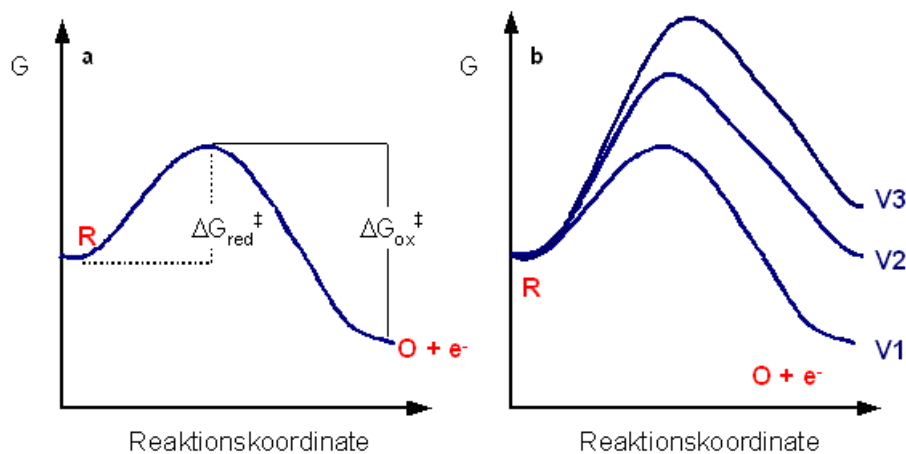


Abbildung A.6.2: Änderung der Freien Energie G (a) im Verlauf eines Elektronentransfers und in Abhängigkeit von angelegten Potential $V1$ - $V3$ (b)

Die in Abbildung A.6.2 gezeigte Änderung der freien Energie von $O + e^-$ infolge einer äußeren Spannung spiegelt sich in der in Abbildung A.5.1 gezeigten Änderung der potentiellen Energie des Elektrons mit der Spannung wider. Unter Berücksichtigung von Gleichung A.6.2 ergibt sich für die Geschwindigkeitskonstanten der Oxidation bzw. Reduktion:

Gleichung A.6.5

$$k_{ox} = \frac{RT}{N_A h} \cdot \exp \left[\frac{-\Delta G_{ox}^\ddagger}{RT} \right]$$

Gleichung A.6.6

$$k_{red} = \frac{RT}{N_A h} \cdot \exp \left[\frac{-\Delta G_{red}^\ddagger}{RT} \right].$$

Im Unterschied zur chemischen Reaktionskinetik kann man das Energieprofil einer elektrochemischen Reaktion durch Anlegen einer Spannung beeinflussen. Dabei bleibt die freie Energie des Edukts (R) konstant, wohingegen die freie Energie auf der rechten Seite der Reaktionskoordinate (O + e⁻) mit der Spannung variiert. Dies kann bedeuten, dass bei einer angelegten Spannung V1 die Reaktion in Oxidationsrichtung verläuft, hingegen bei Anlegen einer Spannung V3 die Vorzugsreaktion zu R führt. Erklären kann man dies durch die Änderung des Fermi-Niveaus mit der angelegten Spannung (Abbildung A.5.1). Die Elektrode ist also mit der Spannung durchstimmbare in ihrer Oxidations- bzw. Reduktionswirkung. Tatsächlich sind nicht nur die thermodynamischen Aspekte dieser Reaktion abhängig von der angelegten Spannung, sondern auch die Aktivierungsenergie variiert mit der Spannung. Daher kann man vorhersagen, dass sich auch die Reaktionsgeschwindigkeiten und damit der Strom von Oxidations- und Reduktionsreaktion mit der Spannung ändern. Empirisch zeigt sich dabei ein exponentieller Zusammenhang zwischen dem Strom I und der Überspannung η

Gleichung A.6.7
$$I = a' \exp \left[\frac{\eta}{b'} \right].$$

Dieser Zusammenhang wurde von *Tafel* (1905) beschrieben und ist als **Tafel-Gleichung** bekannt

Gleichung A.6.8
$$\eta = a + b \cdot \log I.$$

Dabei kann der Strom für eine Oxidation oder eine Reduktion wie folgt beschrieben werden:

Gleichung A.6.9
$$I_A = -nF A k_{ox} \cdot [R](0,t).$$

Gleichung A.6.10
$$I_K = -nF A k_{red} \cdot [O](0,t).$$

Dies lässt sich auch schreiben als

Gleichung A.6.11
$$\frac{I}{nFA} = k_{red} \cdot [O](0,t) - k_{ox} \cdot [R](0,t).$$

Der Strom I_k , der bei einer Reduktion fließt, ist verknüpft mit der Elektrodenoberfläche (A), der Oberflächenkonzentration des Reaktanden $[O](0,t)$, der Faraday-Konstante (F) und schließlich der Geschwindigkeitskonstante k_{red} . Eine analoge Beziehung lässt sich auch für eine Oxidation formulieren.

A.6.2 Der Durchtrittsfaktor α und die Strom-Spannungsbeziehung

Abbildung A.6.3 stellt das Energieprofil einer Ein-Elektronen-Transferreaktion dar, wobei die Schnittpunkte der Kurven jeweils den ÜZ repräsentieren.

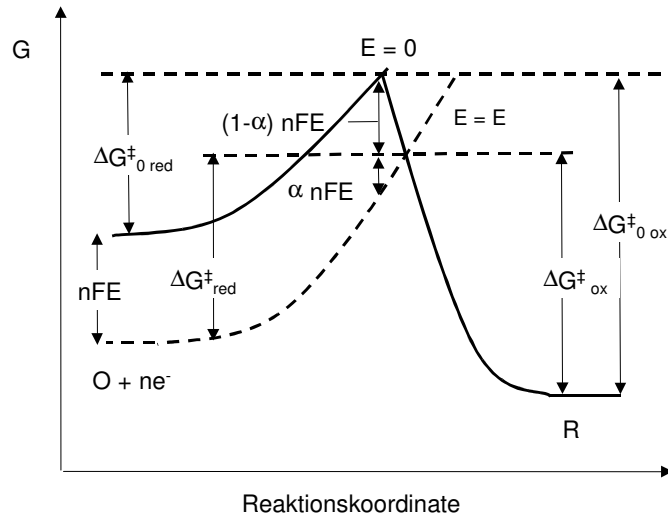


Abbildung A.6.3: Auswirkung einer Potentialänderung auf die freie Aktivierungsenergie von Oxidation und Reduktion

Die Energiebarriere für die Oxidation $\Delta G_{ox}^{\ddagger}$ wird um einen Anteil $(1-\alpha)$ der gesamten Energieänderung kleiner als $\Delta G_{0ox}^{\ddagger}$. Der Wert von α kann von null bis eins variieren in Abhängigkeit von der Überschneidung der Kurven. Der Transferkoeffizient oder auch Durchtrittsfaktor α ist ein Maß für die Symmetrie der Energiebarriere. Für $\alpha = 0,5$ ist die Überschneidung (siehe auch Abbildung A.6.3) symmetrisch. In der Regel liegen die Werte für α zwischen 0,2 und 0,7. Wenn es sich um ein einfaches Redoxsystem handelt, kann man 0,5 annehmen (siehe auch Abschnitt A.7, Seite 189 ff.). Eine Veränderung des angelegten Potentials E von ursprünglich 0 V zu einem Potential E ändert die relative Energie eines Elektrons in der Elektrode um $-nFE$. Dementsprechend verändert sich die $O + ne^-$ -Kurve, wie auch in der Abbildung A.6.2 b gezeigt. Die gestrichelte Linie in Abbildung A.6.3 zeigt den Effekt für ein positives E .

Gleichung A.6.12

$$\Delta G_{ox}^{\ddagger} = \Delta G_{0ox}^{\ddagger} - (1-\alpha) \cdot nFE$$

Analog ist die kathodische Energiebarriere $\Delta G_{red}^{\ddagger}$ um αnFE höher als $\Delta G_{0red}^{\ddagger}$.

Gleichung A.6.13

$$\Delta G_{red}^{\ddagger} = \Delta G_{0red}^{\ddagger} + \alpha nFE$$

Mit Gleichung A.6.5, Gleichung A.6.6 und unter Zusammenfassen des Präexponentialterms zum Frequenzfaktor A ergibt sich durch Einsetzen von Gleichung A.6.12 bzw. Gleichung A.6.13:

Gleichung A.6.14
$$k_{red} = A_{red} \cdot \exp\left[\frac{-\Delta G_{red}^\ddagger}{RT}\right] \cdot \exp\left[\frac{-\alpha nFE}{RT}\right]$$

Gleichung A.6.15
$$k_{ox} = A_{ox} \cdot \exp\left[\frac{-\Delta G_{ox}^\ddagger}{RT}\right] \cdot \exp\left[\frac{(1-\alpha)nFE}{RT}\right]$$

Die ersten beiden Faktoren sind unabhängig vom Potential und entsprechen k_{red}^0 bzw. k_{ox}^0 .

Die beiden Gleichungen vereinfachen sich damit zu

Gleichung A.6.16
$$k_{red} = k_{red}^0 \cdot \exp\left[\frac{-\alpha nFE}{RT}\right]$$

Gleichung A.6.17
$$k_{ox} = k_{ox}^0 \cdot \exp\left[\frac{(1-\alpha)nFE}{RT}\right].$$

In einer Lösung mit gleicher Konzentration an oxidiert und reduzierter Spezies im Gleichgewicht, die mit der Elektrodenoberfläche steht, ist auch $E = E^{0'}$ (wegen $\ln(1)=0$, $E^{0'}$ ist das konzentrationsabhängige Normalpotential) und damit auch $k_{red} = k_{ox}$. Dies ist die Standard-Geschwindigkeitskonstante k^0 , die im weiteren auch als k_s bezeichnet wird. Ein Redoxsystem mit großem k_s ($k_s > 10^{-1} \text{ cm s}^{-1}$) erreicht Gleichgewichtszustand sehr viel schneller, als ein System mit kleinem k_s ($k_s < 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$). In der Cyclovoltammetrie k_s entsprechend ein Maß für die Reversibilität des Elektronentransfers (Kapitel B.1.1, Seite 202 ff.). Somit erhält man aus Gleichung A.6.16 und Gleichung A.6.17

Gleichung A.6.18
$$k_{red} = k^0 \cdot \exp\left[\frac{-\alpha nF(E - E^{0'})}{RT}\right]$$

Gleichung A.6.19
$$k_{ox} = k^0 \cdot \exp\left[\frac{(1-\alpha)nF(E - E^{0'})}{RT}\right].$$

Setzt man diese Beziehungen in Gleichung A.6.11 ein, so ergibt sich die

Strom-Spannungs-Beziehung:

Gleichung A.6.20

$I = nFA \cdot k^0 \cdot \left[[O](0,t) \cdot \exp\left[\frac{-\alpha nF(E - E^{0'})}{RT}\right] - [R](0,t) \cdot \exp\left[\frac{(1-\alpha)nF(E - E^{0'})}{RT}\right] \right]$
--

Einen Sonderfall stellt das Gleichgewicht dar, bei welchem kein meßbarer Strom mehr fließt und das Potential durch die *Nernst*-Gleichung bestimmt wird. Es findet im Gleichgewicht ein Ladungsaustausch, der Austausch-Strom I_0 statt, für den gilt (* bezeichnet die Konzentration in der Lösung):

Gleichung A.6.21
$$I_0 = n \cdot F \cdot A \cdot k_s \cdot [O]^{*(1-\alpha)} \cdot [R]^{*\alpha}, \text{ mit}$$

Gleichung A.6.22
$$\exp\left[\frac{-\alpha n F (E_{eq} - E^{0'})}{RT}\right] = \left(\frac{[O]^*}{[R]^*}\right)^{-\alpha}.$$

Den auf die Elektrodenfläche normierten Strom bezeichnet man als Austauschstromdichte J_0 . Sowohl Austauschstrom als auch die Austauschstromdichte sind proportional zu k_s . Man kann also in kinetischen Gleichungen k_s durch die Austauschstromdichte oder den Austauschstrom ersetzen.

A.6.3 Die Strom-Überspannungs-Beziehung und die *Butler-Volmer*-Gleichung

Dividiert man die Strom-Spannungs-Gleichung (Gleichung A.6.20) durch die Gleichung für den Austauschstrom (Gleichung A.6.21) so erhält man mit $a = \frac{F}{RT}$:

Gleichung A.6.23
$$\frac{I}{I_0} = \frac{[O](0,t) \cdot \exp[-\alpha n a (E - E^{0'})]}{[O]^{*(1-\alpha)} \cdot [R]^{*\alpha}} - \frac{[R](0,t) \cdot \exp[(1-\alpha) n a (E - E^{0'})]}{[O]^{*(1-\alpha)} \cdot [R]^{*\alpha}}.$$

Unter Berücksichtigung von Gleichung A.6.22 erhält man daraus die Strom-Überspannungsbeziehung

Gleichung A.6.24

$$I = I_0 \left[\frac{[O](0,t)}{[O]^*} \cdot \exp[-\alpha n a (E - E_{eq})] - \frac{[R](0,t)}{[R]^*} \cdot \exp[(1-\alpha) n a (E - E_{eq})] \right]$$

Der erste Term beschreibt den kathodischen Anteil, der zweite den anodischen Teil, wobei hier keine Doppelschicht-Effekte berücksichtigt wurden. Die Überspannung η ist hier gleich der Potentialdifferenz $E - E_{eq}$.

Die Strom-Überspannungsbeziehung ist graphisch in Abbildung A.6.4 dargestellt. Die durchgezogene Linie gibt den gesamten Strom an, der sich aus der anodischen I_a und der kathodischen Komponente I_k ergibt. Bei sehr großer negativer Überspannung ist der

anodische Anteil vernachlässigbar, der Gesamtstrom entspricht I_k . Umgekehrt entspricht der Gesamtstrom I_a für sehr große positive Überspannungen. Bewegt man sich entlang der Abszisse, so entfernt man sich vom Gleichgewichtspotential E_{eq} , welches im Ursprung liegt. Dabei steigt der Strom, dominiert vom Exponentialterm, zunächst steil an. In Regionen sehr großer Überspannung wird jedoch der Strom vom Massentransport limitiert und der Strom wird dann über die Konzentrationsverhältnisse kontrolliert, die wiederum von Transportphänomenen gesteuert sind.

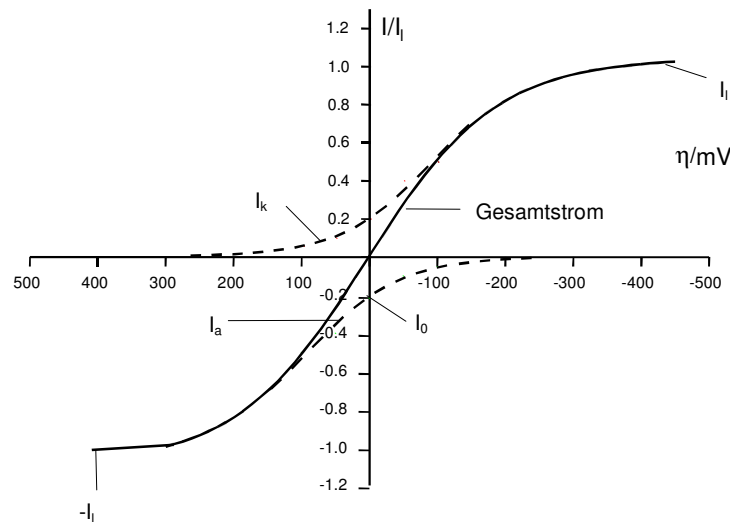


Abbildung A.6.4: Strom-Überspannungskurve ($\alpha = 0,5$, $n = 1$, $T = 25^\circ\text{C}$, Grenzstrom $I_l = I_{la} = I_{lk}$)

Wenn Massentransportphänomene vernachlässigbar sind, also bei hoher Überströmungsgeschwindigkeit an der Elektrode oder kleinem Strom, kann man annehmen, dass sich die Oberflächenkonzentrationen $[O](0,t)$ und $[R](0,t)$ nicht von den Konzentrationen in der Lösung $[O]^*$ und $[R]^*$ unterscheiden.

Daher vereinfacht sich Gleichung A.6.24 zur **Butler-Volmer-Gleichung**:

Gleichung A.6.25

$$I = I_0 [\exp[-\alpha n a \eta] - \exp[(1 - \alpha) n a \eta]]$$

mit $a = \frac{F}{RT}$

Diese Gleichung findet Anwendung, wenn I kleiner als 10 % des jeweiligen Grenzstroms ist und damit das Konzentrationsverhältnis zwischen 0,9 und 1,1 liegt.

Für sehr kleine Überspannungen $|\eta| < 6 \text{ mV}$ ($T = 298 \text{ K}$) ist der Strom I linear abhängig von der Überspannung. Dieses Verhalten lässt sich mathematisch durch die Taylor-Reihenentwicklung der Exponentialfunktion bis zum linearen Glied erklären.

Gleichung A.6.26

$$I = I_0 \cdot (-na\eta)$$

Nach dem Ohmschen Gesetz (Gleichung A.2.1) ist der Quotient $\frac{-\eta}{I}$ ein Widerstand, den man genauer als Durchtrittswiderstand R_D bezeichnet

Gleichung A.6.27

$$R_D = \frac{RT}{nFI_0}$$

Für sehr große Werte k_s konvergiert der Durchtrittswiderstand gegen null.

Für große Überspannungswerte $|\eta| > 60 \text{ mV}$ wird einer der beiden Teilströme vernachlässigbar und es gilt :

a) kathodische Überspannung

Gleichung A.6.28

$$\begin{aligned} \exp[(1-\alpha)na\eta] &\Rightarrow 0 \\ I = I_0 \cdot \exp[-\alpha na\eta] &\Rightarrow \ln I = \ln I_0 - \alpha na\eta \end{aligned}$$

b) anodische Überspannung, analog:

Gleichung A.6.29

$$I = -I_0 \cdot \exp[(1-\alpha)na\eta] \Rightarrow \ln |I| = \ln I_0 + (1-\alpha)na\eta$$

mit $a = \frac{F}{RT}$ erhält man dann eine Gerade der *Tafel*-Form

Gleichung A.6.30

$$\eta = a + b \cdot \log |I|$$

Gleichung A.6.31

$$\eta = \frac{RT}{\alpha nF} \cdot \ln I_0 - \frac{RT}{\alpha nF} \cdot \ln I$$

mit den Koeffizienten (für 25°C)

Gleichung A.6.32

$$a = \frac{2,3RT}{\alpha nF} \cdot \log I_0 = \frac{0,059}{\alpha n} \cdot \log I_0$$

Gleichung A.6.33

$$b = \frac{2,3RT}{\alpha nF} = \frac{0,059}{\alpha n}$$

Die *Tafel*-Gleichung trifft immer dann zu, wenn die Rückreaktion (d.h., der Anoden-Prozeß, wenn man eine kathodische Reduktion betrachtet) nur zu weniger als einem Prozent zum Gesamtstrom beiträgt, d.h., wenn man eine irreversible Reaktion betrachtet.

Dann gilt nämlich für 25°C,

Gleichung A.6.34

$$\frac{\exp[(1-\alpha)na\eta]}{\exp[-\alpha na\eta]} = \exp[na\eta] \leq 0,01$$

Damit ist die Überspannung $|\eta| \geq 0,188/n \text{ V}$ für $\alpha = 0,5$.

Ein letzter zu diskutierender Grenzfall ist das sogenannte reversible Redoxsystem (Kapitel 6.3.1), bei dem, wie schon erwähnt, k_s sehr groß ist.

Für diesen Fall kann man die Strom-Überspannungsgleichung umformulieren

Gleichung A.6.35

$$\frac{I}{I_0} = \left[\frac{[O](0,t)}{[O]^*} \cdot \exp[-\alpha n a \eta] \right] - \left[\frac{[R](0,t)}{[R]^*} \cdot \exp[(1-\alpha) n a \eta] \right].$$

Für den Fall eines sehr großen k_s wird auch I_0 sehr groß (Gleichung A.6.21) und der Quotient I/I_0 konvergiert gegen null. Dementsprechend ergibt sich dann unter Berücksichtigung der Gleichung A.1.3

Gleichung A.6.36

$$\frac{[O](0,t)}{[R](0,t)} = \exp \left[\frac{nF(E - E^{0'})}{RT} \right],$$

welche eine Form der *Nernst*-Gleichung darstellt, die Elektrodenpotential und Oberflächenkonzentration miteinander verknüpft. Für diesen Fall gilt also, dass sich das Gleichgewicht so schnell über Ladungstransferreaktionen einstellt, so dass die kinetische Parameter keine Rolle spielen. Man nennt solche Systeme dementsprechend auch *Nernst*-Systeme oder reversible Systeme.

A.7 Exkurs: Marcus-Theorie

Die *Marcus*-Theorie verbindet die Geschwindigkeit des Elektronentransfers mit der Gesamtänderung der freien Energie unter Berücksichtigung einer sogenannten adiabatischen Reorganisationsenergie λ . Diese Reorganisationsenergie trägt der Tatsache Rechnung, dass sich beim Elektronentransfer die Solvathülle des Edukts ändert und auch strukturelle Änderung beim Übergang vom Edukt zum Produkt erfolgen. Die mikroskopische Betrachtung des Elektronentransfers, die vor allem von *R. A. Marcus* entwickelt wurde und für die er 1992 den Nobel-Preis erhielt [274], kann in diesem Rahmen nicht ausführlich dargestellt werden. Da jedoch die *Butler-Volmer*-Gleichung eine vereinfachte Form der *Marcus*-Theorie darstellt, soll diese zumindest ansatzweise erläutert werden. Eine detailliertere Betrachtung findet man in der entsprechenden Literatur [275, 276].

Die Butler-Volmer-Gleichung berücksichtigt keine strukturellen Änderungen vom Edukt zum Produkt und vernachlässigt insbesondere den Effekt, dass Lösungsmittel durch unterschiedliche Solvatationsenergien die Energie des Übergangszustands und den Durchtrittsfaktor α ändern können.

Die energetische Zustandsänderung eines zweiatomigen Moleküls ist am einfachsten mit dem Modell des harmonischen Oszillators zu beschreiben. Die Änderung der Bindungslänge zwischen beiden Atomen ändert sich mit der Energie. Diesen Zusammenhang beschreibt das *Hooksche Gesetz*.

Gleichung A.7.1

$$F = -Dx$$

F = einwirkende Auslenkungskraft

D = Proportionalitätskonstante

x = Auslenkung

Überträgt man dies auf die Energie des zweiatomigen Moleküls, so ergibt sich ein Zusammenhang, der sich graphisch als Parabel darstellen (siehe auch Abbildung A.7.1):

Gleichung A.7.2

$$E = E_0 + \frac{1}{2} m \omega^2 (x - x_0)^2$$

E = Gesamtenergie

E_0 = potentielle Energie

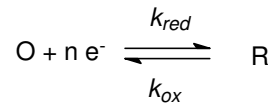
m = Masse des schwingenden Systems

ω = Schwingungsfrequenz

$m\omega^2 = k$ = Kraftkonstante (entspricht D)

Wenn man nun dieses Modell auf die Elektronentransferreaktion

Gleichung A.2.2



überträgt und voraussetzt, dass O und R eine annähernd gleich große Masse und gleiche Schwingungsfrequenz besitzen, ergibt sich für die freie Energie in Abhängigkeit von der Reaktionskoordinate das in Abbildung A.7.1 dargestellte Bild.

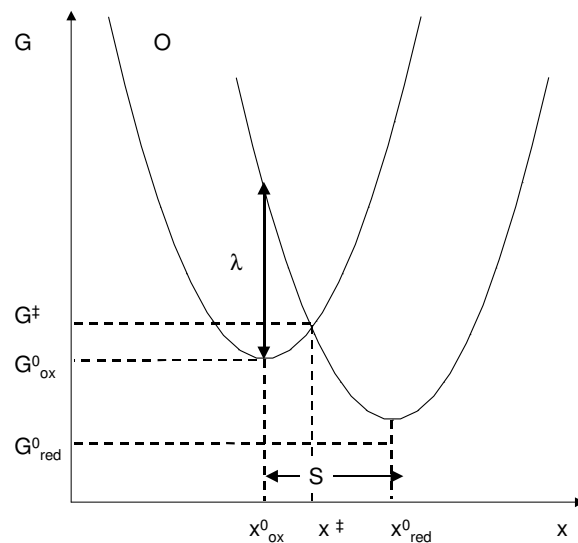


Abbildung A.7.1: Übergangszustandsdiagramm nach der *Marcus*-Theorie

Die adiabatische Reorganisationsenergie λ ergibt sich gemäß dem *Hookschen* Gesetz:

Gleichung A.7.3
$$\lambda = \frac{1}{2} k S^2.$$

$$S = x_{\text{ox}}^0 - x_{\text{red}}^0$$

Nach der *Marcus*-Theorie erhält man für die *Gibbssche* Energie des Übergangskomplexes:

Gleichung A.7.4
$$G_{\text{ox}} = G_{\text{ox}}^0 + \frac{1}{2} k S^2, \text{ analoges gilt für } G_{\text{red}}.$$

Im Unterschied zur obigen Herleitung der Strom-Spannungsbeziehung (Gleichung A.6.13) muss hier noch ein quadratischer Term berücksichtigt werden. Daher kann man die sich aus der Strom-Spannungsbeziehung ableitende *Butler-Volmer*-Gleichung auch als eine lineare Näherungsform der *Marcus*-Theorie betrachten.

Unter Berücksichtigung der Koordinate des Übergangskomplexes

Gleichung A.7.5
$$x^\ddagger = \frac{1}{2}(x_{ox}^0 + x_{red}^0) + \frac{G_{ox}^0 - G_{red}^0}{kS}$$

erhält man zunächst

Gleichung A.7.6
$$\Delta G^\ddagger = \frac{1}{8}kS^2 - \frac{1}{2}(G_{ox}^0 - G_{red}^0) + \frac{(G_{ox}^0 - G_{red}^0)^2}{2kS^2}$$

und dann nach Einsetzen von Gleichung A.7.3 schließlich:

Gleichung A.7.7
$$\Delta G^\ddagger = \frac{1}{4}\lambda - \frac{1}{2}(G_{ox}^0 - G_{red}^0) + \frac{(G_{ox}^0 - G_{red}^0)^2}{4\lambda}.$$

Die Energie der Übergangszustands ist also nicht nur von der Energiedifferenz zwischen oxidierten und reduzierter Spezies abhängig, sondern ist von der Reorganisationsenergie λ abhängig.⁷⁹ Nun betrachtet man G_{ox}^0 als Arbeit, die aufgebracht werden muss, um O zur Koordinate x_{ox}^0 zu bringen. Es entspricht also der Energie von O und der Energiebeiträge aus Konformationsänderungen der Solvathülle. Des weiteren erfolgt die Elektronenübertragung auf O strahlungslos; G_{red}^0 entspricht also der Energie des Teilchens R und seiner Solvathülle zuzüglich der potentiellen Energie des Elektrons, wobei zur Reduktion kathodische Aktivierungsarbeit aufgebracht werden muss.

Damit ergibt sich für $\Delta G^\ddagger$:

Gleichung A.7.8

$$\Delta G^\ddagger = \frac{1}{4}\lambda - \frac{1}{2}(w_{ox} - w_{red} - nF(E - E^{0'})) + \frac{(w_{ox} - w_{red} - nF(E - E^{0'}))^2}{4\lambda}.$$

Hiermit ist wieder die Potentialabhängigkeit der freien Energie wie in Abbildung A.6.2 dargestellt, gezeigt. Verfährt man mit dieser Gleichung analog der Herleitung der Strom-Spannungsbeziehung und der *Butler-Volmer*-Gleichung, so erhält man für α

Gleichung A.7.9
$$\alpha = \frac{1}{2} \left(\frac{nF - (w_{ox} - w_{red})}{\lambda} + 1 \right).$$

⁷⁹ Daher kann die Wahl des Lösungsmittels den Verlauf einer elektrochemischen Reaktion entscheidend beeinflussen.

Der Durchtrittsfaktor α hängt also von den Energien w_{ox} und w_{red} ab. Da $nF \cdot (w_{ox} - w_{red})$ meist sehr klein gegenüber λ ist, konvergiert der Wert gegen 0,5. Daher kann man ohne genauere Messung dies annehmen. Dies unterstreicht, simplifizierend, den Einfluss der Solvatisierungsenergie und damit des Lösungsmittels.

A.8 Zusammenfassung

- Das Anlegen einer Spannung an eine Elektrode ändert die potentielle Energie des Elektrons und ermöglicht, dass eine Elektrode je nach angelegter Spannung als Oxidations- oder Reduktionsmittel wirken kann.
- Die Strom-Spannungsbeziehung zeigt, dass auch die heterogene Durchtrittskinetik abhängig von der angelegten Spannung ist.
- Dabei bewirkt das Anlegen einer Spannung eine Änderung der Energiebarriere um einen Anteil α , den sog. Transferkoeffizienten oder auch Durchtrittsfaktor. Dieser variiert ca. zwischen 0,2 und 0,7 und ist ein Maß für die Symmetrie der Energiebarriere (0,5 = symmetrisch).
- Aus der Strom-Spannungs-Beziehung leitet sich die *Butler-Volmer*-Gleichung her, die den Zusammenhang zwischen Überspannung und Strom darstellt. Die *Butler-Volmer*-Gleichung ist eine lineare Näherungsform der *Marcus*-Theorie.
- Die *Marcus*-Theorie berücksichtigt im Gegensatz zur *Butler-Volmer*-Gleichung Energiedifferenzen durch Änderung der Konformation und der Solvathülle beim Übergang vom Edukt zum Produkt der Elektronentransferreaktion.
- Ein elektrochemischer Mediator weist idealerweise eine geringe adiabatische Reorganisationsenergie λ auf, da so ein schneller Elektronentransfer möglich ist.

A.9 Massentransport

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, wie der Ladungstransfer zwischen Elektrode und gelöster elektrochemisch aktiver Spezies den Verlauf einer elektrochemischen Reaktion bestimmt. Dabei wurde entweder wie für die *Butler-Volmer*-Gleichung ein ideales System ohne Massentransport betrachtet, oder der Stofftransport zwischen Elektrodenoberfläche und Reaktionslösung wurde als ideal vorausgesetzt. Für eine Elektrolyse spielen jedoch Massentransportphänomene eine wesentliche und häufig limitierende Rolle wie auch in Abbildung A.6.4 gezeigt wird. Die nach dem Modell (*Butler-Volmer*) erwartete exponentielle Stromzunahme konvergiert gegen einen Grenzstrom I_l , wenn der Massentransport der Spezies O den Ladungstransport begrenzt (Massentransportlimitierung).

Für eine Elektrode der Oberfläche A wird die Reaktion durch zwei Faktoren kontrolliert, nämlich einerseits durch die Geschwindigkeitskonstante k_{red} und andererseits durch die Oberflächenkonzentration $[O](0,t)$ des Edukts

Gleichung A.6.10
$$I_K = -nFAk_{red} \cdot [O](0,t)$$

Wenn nun die Geschwindigkeitskonstante k_{red} sehr groß gegen die Geschwindigkeit des Stofftransports ist, wird jedes Edukt-Molekül an der Elektrodenoberfläche so schnell zum Produkt $[R](0,t)$ umgesetzt, dass die effektive Konzentration von O an der Elektrodenoberfläche null ist. In diesem Fall wird der Strom dann kontrolliert über die Menge an Edukt, das aus der Lösung an die Elektrodenoberfläche transportiert wird. Folglich limitiert also die Geschwindigkeit des Edukt-Transports den maximalen Stromfluss. Der Grenzfall eines irreversiblen Ladungstransfers, der den Massentransport dominiert wird später diskutiert.

In diesem Kapitel wird nun dargestellt, wie sich die Transportphänomene unterteilen lassen und welche Auswirkung sie auf den Stromfluss haben (Abbildung A.9.1).

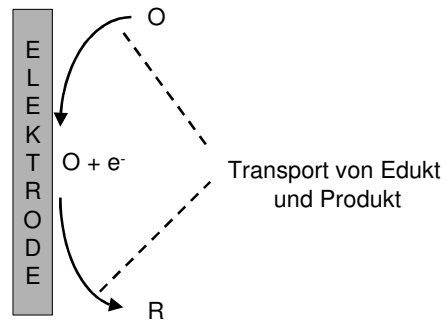


Abbildung A.9.1: Der Einfluss von Massentransportphänomene auf elektrochemische Reaktionen

Generell unterscheidet man die drei Phänomene: *Diffusion*, *Konvektion* und *Migration*.

Um nun den Stromfluss für jeden Zeitpunkt einer elektrochemischen Messung zu beschreiben, benötigt man für jede dieser drei Formen des Massentransports ein quantitatives Modell, welches das Modell des Elektronentransfers ergänzt.

A.10 Diffusion

Diffusion tritt immer dann auf, wenn innerhalb eines geschlossenen Systems ein Konzentrationsgradient existiert. Triebkraft der Diffusion ist die Entropiemaximierung.

Diffusion beruht auf der *Brownschen* Molekularbewegung und ist daher auf mikroskopischer Ebene zufällig. Statistische Modelle können vorhersagen, wie weit sich ein Stoff innerhalb einer bestimmten Zeit bewegen kann. Dies wird häufig auch als random-walk-Modell⁸⁰ bezeichnet. Gerade für elektrochemische Experimente spielt die Diffusion eine große Rolle, da die elektrochemische Umsetzung ausschließlich an der Elektrodenoberfläche erfolgt. Infolgedessen unterscheidet sich die Zusammensetzung an der Oberfläche von der in der Reaktionslösung. Die Konzentration des Edukts ist kleiner und die Konzentration des Produkts der Elektronentransfer-Reaktion an der Elektrodenoberfläche größer als im Elektrolyten, vorausgesetzt, die Elektrodenreaktion ist so schnell, dass man das Redoxsystem als reversibel⁸¹ bezeichnen kann (Gleichung A.6.36, Seite 188).

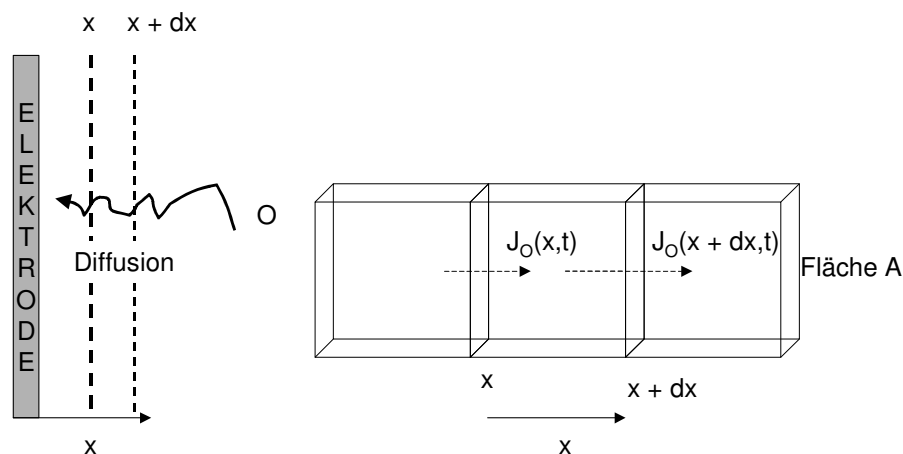


Abbildung A.10.1: Diffusion des Edukts zur Elektrodenoberfläche

Die Geschwindigkeit des Stofftransports durch Diffusion wird mathematisch durch die *Fickschen* Gesetze beschrieben. Das erste Gesetz

Gleichung A.10.1

$$J_O(x,t) = -D_O \cdot \frac{\partial [O](x,t)}{\partial x}$$

verknüpft den diffusiven Stofffluss des Edukts O , J_O , mit dem Konzentrationsgradienten und dem Diffusionskoeffizienten D_O . Das negative Vorzeichen gibt lediglich an, dass der

⁸⁰ oder auch drunken-sailor-Modell

⁸¹ siehe dazu Kapitel B.1.1, Seite 202

diffusive Stofftransport entlang eines Konzentrationsgefälles stattfindet.⁸² Das einfachste Modell der linearen Diffusion an planaren Elektroden setzt voraus, dass die Elektrode eine einheitliche Oberfläche mit unendlicher Ausdehnung aufweist. Daher kann die Diffusion an den Ecken und Kanten der Elektrode vernachlässigt werden.⁸³ Die Diffusion erfolgt senkrecht zur Elektrodenoberfläche. Wenn man dies nun auf eine elektrochemische Reduktion einer Spezies O an einer Elektrodenoberfläche überträgt, ist die Konzentration an der Elektrodenoberfläche geringer als in der Lösung. Die Geschwindigkeit, mit der O aus der Lösung zur Elektrodenoberfläche diffundiert, $J_O(0,t)$, entspricht der Geschwindigkeit der Reduktion. Analoges gilt für das Produkt [R].

Setzt man nun für die Geschwindigkeitskonstante analog Gleichung A.6.11 $\frac{I}{nFA}$ ein, so erhält man anstelle von Gleichung A.10.1:

Gleichung A.10.2
$$\frac{I}{nFA} = D_O \frac{\partial [O](x,t)}{\partial t} \Big|_{x=0} = -D_R \frac{\partial [R](x,t)}{\partial t} \Big|_{x=0} .$$

Die Veränderung der Konzentration mit der Zeit wird durch das zweite *Ficksche* Gesetz beschrieben

Gleichung A.10.3
$$\frac{\partial [O](x,t)}{\partial t} = D_O \left(\frac{\partial^2 [O](x,t)}{\partial x^2} \right)$$

Man kann also einerseits den Stromfluss als eine Funktion der Zeit und andererseits die Konzentration als eine Funktion des Ortes darstellen.

Das zweite Ficksche Gesetz ist für die elektrochemische Analytik sehr wichtig, da es die Voraussage von zeitlichen Konzentrationsverläufen während eines Experiments erlaubt.

Man kann jeweils für Edukt und Produkt der Elektronentransferreaktion eine partielle Differentialgleichung analog zu Gleichung A.10.3 aufstellen. Diese stellen zentrale Gleichungen zur Beschreibung aller elektrochemischer Experimente außerhalb des Gleichgewichts dar. Die Art der numerischen Lösungen sind bestimmt durch die Art und die Durchführung des elektrochemischen Experiments.

⁸² In diesem Zusammenhang wird nur lineare Diffusion diskutiert, sphärische Diffusion (Polarographie) wird vernachlässigt.

⁸³ Dieses Modell kann näherungsweise auf alle realen planaren Elektroden übertragen werden mit Ausnahme von Mikroelektroden, bei denen die Ecken und Kanten groß im Vergleich zur planaren Fläche sind.

A.11 Konvektion

Der in Kapitel A.10 beschriebene diffusive Stofftransport ist für präparative elektrochemische Reaktionen nicht ausreichend, da die Transportgeschwindigkeit mit abnehmendem Konzentrationsgradienten immer weiter absinkt. Dies würde bei einer Elektrolyse zu einem raschen Stromabfall und damit zu einer sehr geringen Reaktionsgeschwindigkeit führen, weil die Diffusion in der Lösung langsam im Vergleich zur Elektrodenreaktion ist.

Generell gibt es zwei Arten der Konvektion, die natürliche Konvektion die in jeder Lösung vorkommt und die durch eine äußere Kraft erzwungene Konvektion.

Die natürliche Konvektion erfolgt durch Dichteunterschiede und läuft in zufälliger und damit nicht mit makroskopischen Modellen quantifizierbarer Weise ab. Da die erzwungene Konvektion mehrere Größenordnungen stärker als die natürliche Konvektion ist, kann diese vernachlässigt werden. Die erzwungene Konvektion wird unterteilt in laminare und turbulente Strömung. Eine laminare Strömung ist dadurch charakterisiert, dass keine Geschwindigkeitskomponenten vertikal zur Strömungsrichtung vorhanden sind, wie dies bei der turbulenten Strömung der Fall ist.

Dies wird durch die dimensionslose Reynoldszahl Re charakterisiert. Die Reynoldszahl spiegelt das Verhältnis von innerer zur äußerer Reibung wider.

Gleichung A.11.1

$$Re = \frac{\rho v l_c}{\eta}$$

v = Strömungsgeschwindigkeit

η = dynamische Viskosität

ρ = Dichte

l_c = kritische Länge

Für beispielsweise die Strömung einer wässrigen Lösung zwischen zwei planaren Elektroden ist die kritische Re 2320 für den Übergang zwischen laminarer und turbulenter Strömung [277]. Turbulente Konvektion⁸⁴ gewährleistet einen effektiveren Stofftransport als laminare Konvektion⁸⁵. Diese ist jedoch für hydrodynamische Messungen Untersuchungen (z. B. rotierende Scheibenelektrode oder Durchflusszellen) vorteilhaft, da sich der Flüssigkeitstransport einfach berechnen lässt [278].

⁸⁴ Turbulenter Strömung kann mit Hilfe von *Navier-Stokes*-Gleichungen beschrieben werden, für die es jedoch nur numerische Lösungen für bestimmte Randbedingungen gibt.

⁸⁵ Laminare Strömung kann durch das *Hagen-Poiseuille*-Gesetz berechnet werden.

A.12 Migration

Migration bedeutet in diesem Kontext die Wanderung geladener Teilchen oder Dipole in einem elektrischen Feld aufgrund von Coulombkräften. Dieses Phänomen kann bei genügend hoher Leitsalzkonzentration (oder Puffer) vernachlässigt werden und wird hier daher nur knapp behandelt.

In der Nähe der Elektrodenoberfläche werden elektroaktive Substanzen sowohl diffusiv als auch über Migration transportiert, d.h., der fließende Strom I setzt sich aus beiden Anteilen zusammen:

Gleichung A.12.1
$$I = I_d + I_m$$

Dabei können der diffusive Stromanteil (I_d) und migrative Anteil (I_m) gleichgerichtet oder entgegengesetzt sein, je nach Ladung des Teilchens und der Elektrode.

Im Elektrolyten (von der Elektrode entfernt), sind die Konzentrationsgradienten generell gering und der diffusive Stromanteil ist vernachlässigbar klein. Für eine Substanz O in einem Elektrolyten in einem Bereich linearen Massentransports mit dem Querschnitt A gilt:

Gleichung A.12.2
$$I_o = |n_o| F A u_o [O] \frac{\partial \varphi}{\partial x}.$$

n_o = Ladung von O

u_o = Ionenmobilität

φ = elektrostatisches Potential

x = Distanz zur Elektrode

Für ein lineares elektrisches Feld gilt:

Gleichung A.12.3
$$\frac{\partial \varphi}{\partial x} = \frac{\Delta E}{l}.$$

Dabei ist $\frac{\Delta E}{l}$ der Gradient [$V\text{cm}^{-1}$], der sich durch die Potentialdifferenz ΔE über die Distanz

l ergibt. Die migrationsbedingte Konzentrationsänderung von O ergibt sich damit nach

Gleichung A.12.4
$$\frac{\partial [O]}{\partial t} = -u_o [O] \frac{\partial \varphi}{\partial x}.$$

Tatsächlich ist es infolge von Solvatisierungseffekten und Wechselwirkungen mit der Diffusionsschicht (siehe auch Kapitel A.3.1) schwierig, Migrationseffekte zu berechnen.

Daher versucht man immer, genügend große Leitsalzkonzentrationen oder Puffersalze zu verwenden, um die Migration der Reaktanden zu minimieren und den Stromfluss zu maximieren.

A.13 Zusammenfassung

Zunächst ist ein Überblick über die verschiedenen Arten des Massentransports in Tabelle A.13.1 zusammengefaßt.

Massentransport	Triebkraft	Art
Diffusion	Konzentrationsgradient $\frac{dc}{dx}$	physikalische Kraft Entropieänderung
Konvektion	Geschwindigkeitsgradient $\frac{dv}{dx}$	Dichte-/ Temperaturdifferenz (natürliche Konvektion) äußere mechanische Kraft (erzwungene Konvektion)
Migration	Potentialgradient $\frac{dE}{dx}$	elektrostatische Kräfte

Tabelle A.13.1: Arten von Massentransport

- Um ein quantitatives Modell der Konzentrationsverläufe eines elektrochemischen Experiments zu erstellen, muss man die Elektrodenkinetik, die dreidimensionale Diffusion, Konvektion und Migration für alle elektroaktiven und elektrostatisch zugänglichen Komponenten des Elektrolyten berechnen. Dies ist selbst mit den leistungsstärksten Computern nicht möglich.
- Daher muss man versuchen, möglichst viele Parameter zu fixieren, etwa den Migrationseffekt durch Leitsalzzugabe zu minimieren und z.B. diffusionskontrolliert zu arbeiten.
- Für elektroanalytische Methoden werden entweder berechenbare Diffusionsbedingungen oder laminare Strömungsbedingungen gewählt werden.
- Turbulente Strömung gewährleistet einen effektiveren Stofftransport und wird daher bei präparativen Anwendungen bevorzugt. Es ist vorteilhaft, wenn man den Stofftransport experimentell bestimmen kann, da dieser nur schwer zu berechnen ist und oft eine apparative Konstante darstellt.

B Cyclovoltammetrie

B.1 Heterogener Elektronentransfer- Die Elektrodenreaktion

Tabelle B.1.1 gibt einen Überblick über Elektronentransfer-Mechanismen sowie verschiedene vorgelagerte bzw. angeschlossene Reaktionsmechanismen. Komplexere Mechanismen lassen sich aus den beschriebenen Elementarreaktionen zusammensetzen.

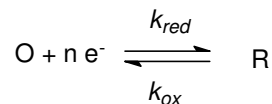
Mechanismus	Abk.	Beschreibung	Beispiel
$O + n e^- \xrightleftharpoons[k_{ox}]{k_{red}} R$	<i>E</i>	Einstufiges Redoxsystem, einfacher Elektronentransfer	$Fe^{2+} Fe^{3+}$ [106]
$O + e^- \xrightleftharpoons[k_{ox1}]{E^0_1, k_{red1}} R_1$ $R_1 + e^- \xrightleftharpoons[k_{ox2}]{E^0_2, k_{red2}} R_2$	<i>EE</i>	mehrstufiges Redoxsystem mehrere Elektronentransfer-schritte	$Cp_2Rh_2(COD) [Cp_2Rh_2(COD)]^{2+}$ [163]; ABTS [237, 260]
$N \xrightleftharpoons{k_1} O$ $O + e^- \xrightleftharpoons{k_s} R$	<i>CE</i>	vorgelagerte chemische Reaktion	Wasserstoffaktivierung einer Hydrogenase [168]; $[Rh(COD)] [Rh(COD)]^+$ [161]
$O + e^- \xrightleftharpoons{k_s} R$ $R \xrightleftharpoons{k_1} S$	<i>EC</i>	Zerfall des Elektronentransferprodukts. (Reaktion von R mit nicht elektrochemisch aktiver Substanz)	$Mn(III) Mn(IV)$ [279] ; $SO_2 S_2O_4^{2-} S_4O_8^{2-}$ [280]
$O + e^- \xrightleftharpoons{k_s} R$ $R + P \xrightleftharpoons[k]{k_1} O + S$ oder $O + P \xrightleftharpoons[k]{k_1} R + S$	<i>EC'</i>	katalytische Reaktion	Diaphorase/Methylviologen-kat. NAD^+ -Reduktion [170] ABTS-katalysierte $NAD(P)H$ -Oxidation [120, 158];

Tabelle B.1.1: Elektronentransfer- und homogen-chemische Reaktionen

B.1.1 Ein-Elektronentransferreaktionen

Die einfachste faradaysche Elektrodenreaktion ist ein Ein-Elektronen-Transfer ($n = 1$)

Gleichung A.2.2, Seite 173



zwischen Elektrode und Redoxpaar. Dies bezeichnet man als *E*-Mechanismus.

Dieser Elektronentransfer wird durch die *Butler-Volmer*-Gleichung (Gleichung A.6.25, Seite 186) und durch Gleichung A.6.20, Seite 184, die Strom-Spannungsgleichung,

$$I = nFA \cdot k^0 \cdot \left[[\text{O}](0, t) \cdot \exp\left[\frac{-\alpha nF(E - E^0)}{RT}\right] - [\text{R}](0, t) \cdot \exp\left[\frac{(1 - \alpha)nF(E - E^0)}{RT}\right] \right]$$

beschrieben. Der heterogene Ladungsfluss $J = \frac{I}{nFA}$, also die meßbare Stromdichte, hängt somit von den Oberflächenkonzentrationen von O und R, dem angelegten Elektrodenpotential E und dem Normalpotential E^0 sowie von der Standardgeschwindigkeitskonstante k_s ab.

Das Normalpotential beschreibt einen Zustand, bei dem unter thermodynamischen Gleichgewichtsbedingungen die Oberflächenkonzentrationen von R und O gleich sind. Dabei liegt jeweils ein Konzentrationsunterschied zwischen Oberfläche und Lösung vor, der zu einem diffusionskontrollierten Massentransport führt (Kapitel A.3.1, Seite 175 ff.). Wie in Kapitel A.10, Seite 195 ff., beschrieben, lässt sich das zeitabhängige Konzentrationsprofil in der Diffusionsschicht mit dem zweiten *Fickschen* Gesetz (Gleichung A.10.3, Seite 196) berechnen. Vergleicht man nun das erste *Fickschen* Gesetz (hier für O und R)

Gleichung A.10.1, Seite 195

$$J_O(x, t) = -D_O \cdot \frac{\partial [\text{O}](x, t)}{\partial x} = D_R \cdot \frac{\partial [\text{R}](x, t)}{\partial x}$$

$$X = 0$$

mit der Strom-Spannungsgleichung (Gleichung A.6.20, Seite 184) zeigt sich, dass sich der gemessene Strom eines CVs aus einem Anteil für den heterogenen Ladungstransfer und einem Massentransport-Anteil zusammensetzt.

Dies gilt allerdings nicht für zwei Fälle, nämlich einmal den reversiblen Fall (Abbildung B.1.1, a,) und einmal den irreversiblen Fall (Abbildung B.1.1, c).

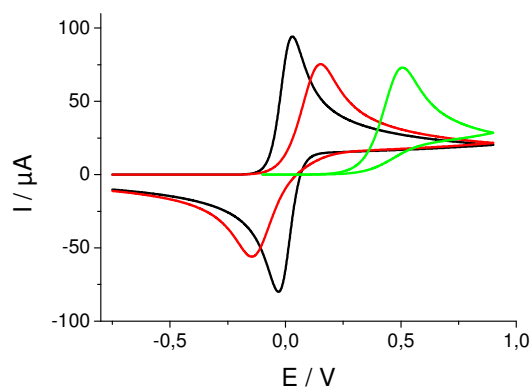


Abbildung B.1.1: Mit DigiSim 3.03 simulierte Cyclovoltammogramme; a) reversibel $k_s = 0,1 \text{ cm s}^{-1}$, b) quasi-reversibel $k_s = 5 \cdot 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$, c) irreversibel $k_s = 5 \cdot 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$; Randbedingungen: $A = 0,07068 \text{ cm}^2$, $\alpha = 0,5$, $E^0 = 0 \text{ V}$, $D(\text{O}, \text{R}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $T = 298,2 \text{ K}$, $[\text{R}] = 5 \text{ mM}$, Vorschubgeschwindigkeit $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$

1) Abbildung B.1.1 a: reversibler Fall $k_s \geq 10^{-1} \text{ cm s}^{-1}$

Für den reversiblen Fall vereinfacht sich die *Butler-Volmer*-Gleichung zur *Nernst*-Gleichung

Gleichung A.6.36, S. 188

$$\frac{[\text{O}](0,t)}{[\text{R}](0,t)} = \exp\left[\frac{nF(E - E^0)}{RT}\right].$$

Damit sind die Oberflächenkonzentrationen nur noch potentialabhängig und frei vom Einfluss der heterogenen Durchtrittskinetik. Da an den Phasengrenzflächen ein thermodynamisches Gleichgewicht herrscht, bezeichnet man diesen Grenzfall als reversibel. Ein CV für den reversiblen Fall ist auch in Abbildung 6.2.2 gezeigt. Der Strom als Meßgröße für den Ladungsfluss an der Elektrodenoberfläche wird ausschließlich durch den Massentransport als langsamsten Schritt kontrolliert (Gleichung B.1.1, Diffusionskontrolle). Es gelten also *Nernst*-Gleichung und *Ficksche* Diffusionsgesetze nebeneinander.

Gleichung B.1.1

$$-J = nFD \left(\frac{\partial [\text{O}]}{\partial x} \right)_{x=0}$$

Es gelten folgende Rand- bzw. Anfangsbedingungen⁸⁶

$$D_O = D_R = D, t = 0, x > 0, [\text{O}] = [\text{O}^*] \text{ und } [\text{R}] = 0$$

$$t > 0, x = \infty, [\text{O}] = [\text{O}^*] \text{ und } [\text{R}] = 0$$

$$t > 0, x = 0, D \left(\frac{\partial [\text{O}]}{\partial x} \right) + D \left(\frac{\partial [\text{R}]}{\partial x} \right) = 0$$

⁸⁶ $[\text{O}^*]$ gibt die Konzentration von O in der Reaktionslösung an.

Nun betrachtet man eine Vorschubgeschwindigkeit v , ein Anfangspotential E_I und einen Umkehrzeitpunkt λ , für die gilt:

$$0 < t < \lambda, E = E_I - vt$$

$$t > \lambda, E = E_I - 2v\lambda + vt.$$

Eine geschlossene Lösung von Gleichung A.6.36 und Gleichung B.1.1 ist sehr kompliziert und wenig aussagekräftig, jedoch konnte gezeigt werden, dass unter Bedingungen der planaren Diffusion die **Randles-Sevcik-Gleichung** für reversiblen Elektronentransfer

Gleichung B.1.2
$$J_p = -0,4463nF[O^*]\sqrt{\frac{DvnF}{RT}}$$

gilt, die sich bei 25°C zu

Gleichung B.1.3	$J_p = -(2,69 \cdot 10^5)[O^*]\sqrt{n\sqrt{Dv}}$
-----------------	--

vereinfacht [189, 281, 282].⁸⁷ Die Reversibilität eines Redoxsystems lässt sich also sehr leicht an der linearen Abhängigkeit des Peakstroms von der Wurzel der Vorschubgeschwindigkeit erkennen (Abbildung B.1.2) und aus der Steigung dieser Auftragung kann dann der Diffusionskoeffizient bestimmt werden.

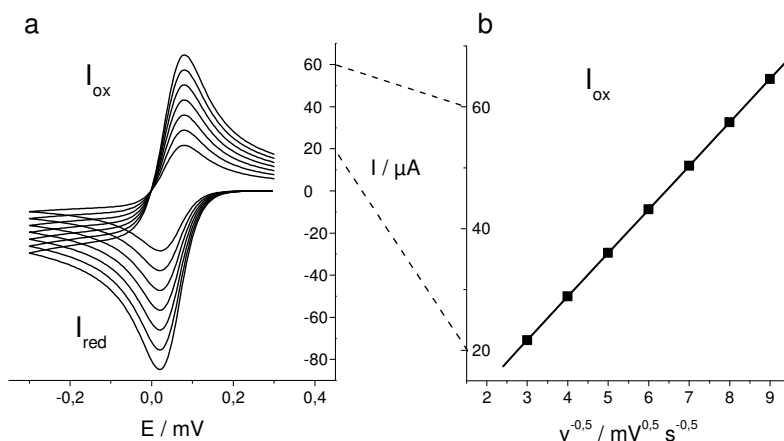


Abbildung B.1.2 a) simulierte Cyclovoltammogramme, v (von innen nach außen) [mVs^{-1}]: 9, 16, 25, 36, 49, 64, 81, Randbedingungen Simulation: $k_s = 0,1 \text{ cms}^{-1}$, $A = 0,07068 \text{ cm}^2$, $\alpha = 0,5$, $E^0 = 50 \text{ mV}$, $D(O, R) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $T = 298,2 \text{ K}$, $[O] = 5 \text{ mM}$; b) Lineare Abhängigkeit I_{ox} von $\sqrt{v}$ nach Randles und Sevcik.

Die Peakpotentiale sind hingegen unabhängig von der Vorschubgeschwindigkeit. Die Anzahl der übertragenen Elektronen kann aus der Differenz zwischen Oxidations- und

⁸⁷ Abweichend von der normalen Notation ist hier $[O^*]$ in mol cm^{-3} angegeben.

Reduktionspeakpotential abgelesen werden, welches sich aus der Nernst-Gleichung zu $59/n$ ergibt. Die Peakströme sind betragsmäßig gleich.

2) Abbildung B.1.1c: irreversibler Fall $k_s \leq 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$

Im irreversiblen Fall ist der Ladungstransfer an der Elektrode extrem verlangsamt. In Abhängigkeit vom Potential hat nur die kathodische (Abbildung B.1.3 a) oder nur die anodische (Abbildung B.1.1 c) Durchtrittsreaktion eine meßbare Geschwindigkeit. Man spricht von Durchtrittskontrolle, da der Ladungstransfer den Strom kontrolliert. Infolgedessen hängen die Oberflächenkonzentrationen von O und R ebenfalls vom Ladungstransfer ab und sind wegen der sehr stark unterschiedlichen Durchtrittsgeschwindigkeiten für Oxidation und Reduktion weit vom thermodynamischen Gleichgewicht entfernt. Dies bezeichnet man als einen irreversiblen Elektronentransfer, für den die *Nernst*-Gleichung nicht mehr anwendbar ist. Damit entsprechen auch die gemessenen Potentiale nicht den Gleichgewichtspotentialen nach *Nernst*.

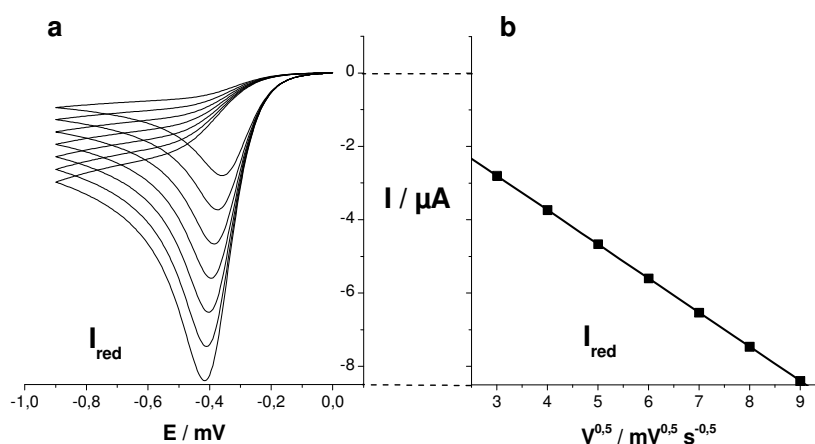


Abbildung B.1.3 a) simulierte Cyclovoltammogramme, v (von innen nach außen) [mVs^{-1}]: 9, 16, 25, 36, 49, 64, 81, Randbedingungen Simulation: $k_s = 1 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, $A = 0,07068 \text{ cm}^2$, $\alpha = 0,5$, $E^0 = 50 \text{ mV}$, $D(\text{O}, \text{R}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $T = 298,2 \text{ K}$, $[\text{O}] = 5 \text{ mM}$; b) Lineare Abhängigkeit I_{red} von $\sqrt{v}$ nach *Randles* und *Sevcik*.

Für den Peakstrom ergibt sich ebenfalls ein linearer Zusammenhang mit der Wurzel der Vorschubgeschwindigkeit (Abbildung B.1.3 b) und zusätzlich der Wurzel des Transferkoeffizienten α (Abbildung B.1.4 b) [189].

Gleichung B.1.4

$$J_p = -(2,99 \cdot 10^5) n [O^*] \sqrt{\alpha n D v}$$

Aus Abbildung B.1.4 geht hervor, dass der Strom insgesamt deutlich geringer ist, als beim reversiblen Redoxsystem.

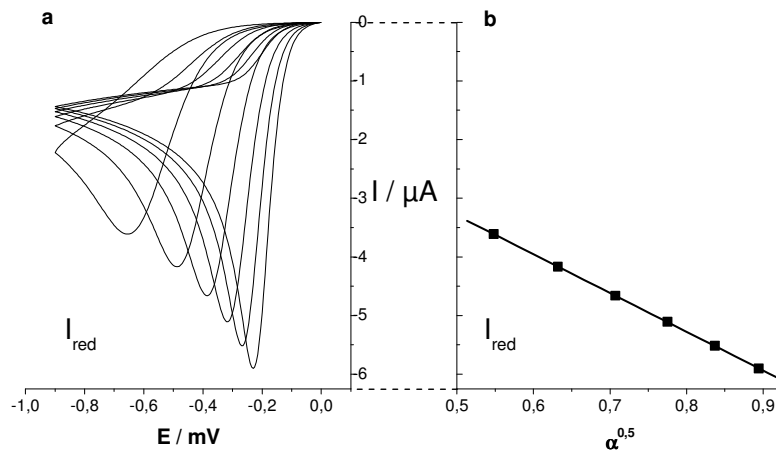


Abbildung B.1.4 a) simulierte Cyclovoltammogramme, α (von links nach rechts) 0,3-0,8; Randbedingungen Simulation: $\nu = 36 \text{ mV s}^{-1}$, $k_s = 1 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, $A = 0,07068 \text{ cm}^2$, $\alpha = 0,5$, $E^0 = 50 \text{ mV}$, $D(O, R) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $T = 298,2 \text{ K}$, $[O] = 5 \text{ mM}$; b) Lineare Abhängigkeit des I_{red} von der $\sqrt{\alpha}$

Da hier eine gleichzeitige Abhängigkeit von zwei Parametern gegeben ist, kann der Diffusionskoeffizient nur bei bekanntem Transferkoeffizienten direkt aus der Auftragung des Peakstroms gegen die Wurzel der Vorschubgeschwindigkeit bestimmt werden.

Im Gegensatz zum reversiblen Verhalten ist hier das Peakpotential abhängig von der Vorschubgeschwindigkeit (Abbildung B.1.3a) [189]

Gleichung B.1.5

$$E_{red} = K - \frac{2,3RT}{2\alpha nF} \log \nu$$

mit

Gleichung B.1.6

$$K = E^0 \frac{RT}{\alpha nF} \left[0,78 - \frac{2,3}{2} \log \left(\frac{\alpha nFD}{k_s^2 RT} \right) \right].$$

Demnach verschiebt sich bei 25°C das Peakpotential um $\frac{30}{\alpha n}$ mV, bei Steigerung der Vorschubgeschwindigkeit um eine Zehnerpotenz, wobei bei Steigerung von ν das reduktive Peakpotential in negative Richtung wandert.

Um aus Gleichung B.1.4 und Gleichung B.1.5 den Diffusionskoeffizienten und die Geschwindigkeitskonstante der Ladungstransfers bestimmen zu können, muss $n\alpha$ zuvor abgeschätzt werden. Bei 25°C gelingt dies nach

Gleichung B.1.7
$$\left| E_p - E_{\frac{p}{2}} \right| = \frac{48}{n\alpha}.$$

3) Abbildung B.1.1 : quasi-reversibler Fall $10^{-1} > k_s > 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$

Im quasi-reversiblen Fall bestimmen sowohl der Massentransport als auch der Ladungstransfer den Strom. Die Bedingungen der *Nernst*-Gleichung sind jedoch nur näherungsweise erfüllt, da Elektronentransfer und Massentransport das Gleichgewicht an der Elektrodenoberfläche nicht aufrechterhalten können; daher die Bezeichnung quasi-reversibel. Die vereinfachenden Annahmen wie für reversiblen und irreversiblen Ladungstransfer können hier nicht gemacht werden. Im Gegensatz zum reversiblen Ladungstransfer ändert sich der Abstand der Peakpotentiale mit der Vorschubgeschwindigkeit v . Die Geschwindigkeitskonstante des heterogenen Ladungstransfers lässt sich aus dem Abstand der Peakpotentiale mit Hilfe einer Arbeitskurve nach *Nicholson* bestimmen [245].

Für die Arbeitskurve zur Bestimmung von k_s gilt folgender Zusammenhang

Gleichung B.1.8
$$\Psi = \frac{k_s \sqrt{RT}}{\sqrt{nFD\pi v}}.$$

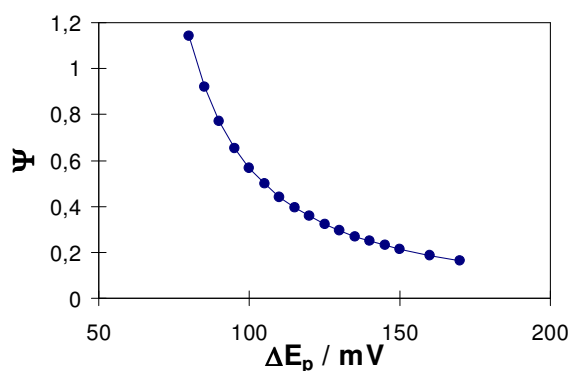
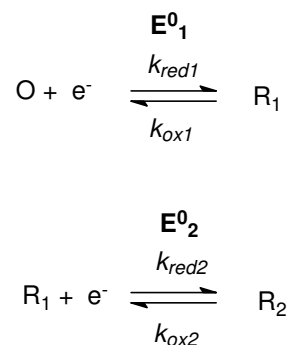


Abbildung B.1.5: Arbeitskurve zur Bestimmung der heterogenen Geschwindigkeitskonstante k_s nach *Nicholson*

B.1.2 Mehrstufige Redoxsysteme

(siehe auch Kapitel 6.3.1.1 Seite 56 ff)

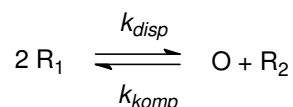


In Abhängigkeit von der Differenz der theoretischen Potentiale unterscheidet man mehrere Fälle. Mehr als zweistufige Redoxsysteme weisen in der Regel keine separaten Oxidations- oder Reduktionspeaks auf [150] und spielen für die hier betrachteten Reaktionen keine Rolle.

1) $E^0_1 > E^0_2$

Jeder *EE*-Mechanismus ist prinzipiell ein *EE_{Disp}*-Mechanismus [150, 188].

Gleichung B.1.9



Die Disproportionierungskonstante K_{Disp} lässt sich nach Gleichung B.1.10 aus den Standardpotentialen ermitteln

Gleichung B.1.10

$$\ln K_{\text{Disp}} = -\frac{nF}{RT} (E^0_1 - E^0_2)$$

mit

$$K_{\text{Disp}} = \frac{[\text{O}][\text{R}_2]}{[\text{R}_1]^2}$$

2) $E^0_1 \geq E^0_2$

Wenn sich die Standardpotentiale der beiden Redoxstufen um weniger als 100 mV unterscheiden, dann sind sie im Cyclovoltammogramm nicht mehr aufgelöst sondern erscheinen wie in Abbildung B.1.6 als ein einziges Signal, jedoch ist der Strom in etwa doppelt so hoch (bis 2,41fach) wie bei einer Einelektronenübertragung (Abbildung B.1.8 a).

Der Abstand von Oxidationspotential und Reduktionspotential ΔE_p liegt bei $\Delta E^0 = 0$ mV bei 42 mV.

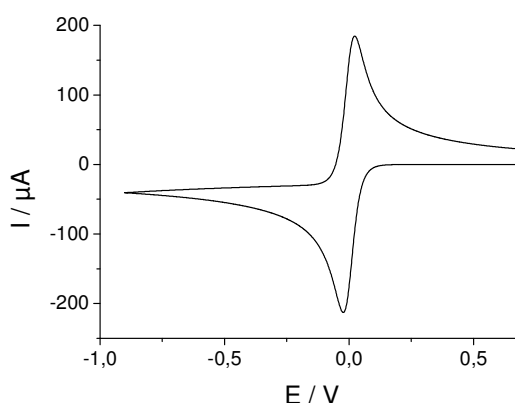


Abbildung B.1.6: Simuliertes CV einer Zwei-Elektronentransferreaktion, Simulation: EE_{Disp} -Mechanismus, $E^0_1 = 0$ V, $E^0_2 = -0,08$ V, $\nu = 0,1$ V s⁻¹, $k_s = 1 \cdot 10^{-1}$ cm s⁻¹, $A = 0,07068$ cm², $\alpha = 0,5$, D (O, R) = $1 \cdot 10^{-5}$ cm² s⁻¹, $T = 298,2$ K, [O] = 5 mM

3) $E^0_1 < E^0_2$

In diesem Fall muss für den zweiten Elektronentransferschritt weniger Energie aufgewandt werden wie für den ersten. Bei einer Differenz der Normalpotentiale $< |180|$ mV sinkt die E_p -Aufspaltung bis auf 28,5 mV (25°C) (Abbildung B.1.7).

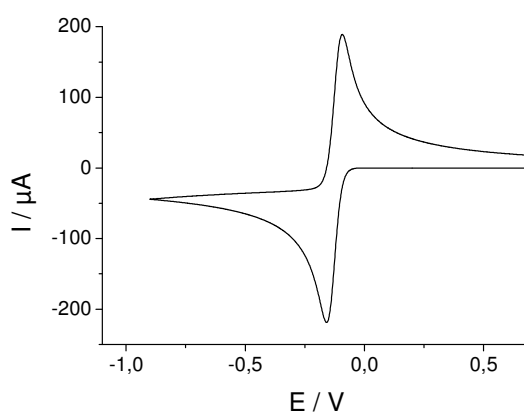


Abbildung B.1.7: Simuliertes CV einer Zwei-Elektronentransferreaktion, Simulation: EE_{Disp} -Mechanismus, $E^0_1 = -0,25$ V, $E^0_2 = 0$ V, $\nu = 0,1$ V s⁻¹, $k_s = 1 \cdot 10^{-1}$ cm s⁻¹, $A = 0,07068$ cm², $\alpha = 0,5$, D (O, R) = $1 \cdot 10^{-5}$ cm² s⁻¹, $T = 298,2$ K, [O] = 5 mM

Der meßbare Strom ist sogar noch größer (bis 2,8 fach) als bei der entsprechenden Einelektronentransferreaktion. Dies ist auch in Abbildung B.1.8 c dargestellt. Die

Bestimmung der Einzelstandardpotentiale ist erschwert, da das formal messbare Halbstufenpotential

Gleichung B.1.11

$$E_{\frac{1}{2}} = \frac{E_1^0 + E_2^0}{2}$$

dem Mittelwert der beiden Standardpotentiale entspricht.

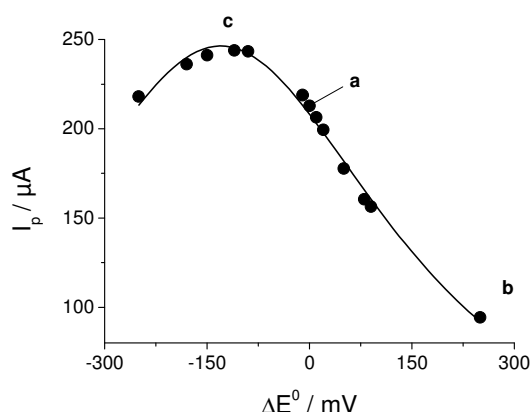


Abbildung B.1.8: Stromstärke der reduktiven Peakströme (b: des ersten Redoxsystems) in Abhängigkeit von der Differenz der Standardpotentiale der Redoxpaare; alle übrigen Simulationsparameter wie bei Abbildung B.1.7, durchgezogene Linie als Visualisierungshilfe

B.1.3 Zusammenfassung heterogener Elektronentransfer

In Abhängigkeit von der Vorschubgeschwindigkeit erhält man entweder einen reversiblen, einen quasi-reversiblen oder einen irreversiblen Elektronentransfer. Da hierfür das Verhältnis der Geschwindigkeit des Massentransports zur Elektronentransfergeschwindigkeit ausschlaggebend ist, ist es möglich, über eine Änderung der Vorschubgeschwindigkeit und damit einer Änderung des Massentransports, ein reversibles in ein irreversibles System und umgekehrt zu überführen. Für mehrstufige Redoxsysteme gelten die in Tabelle B.1.2 aufgeführten Kriterien nur bedingt, deutlichstes Kriterium ist ein erhöhter Peakstrom (~doppelt so hoch wie bei einem Einelektronentransfer) bei nur einem Peak und sonst das Auftreten mehrere ineinander verschobener Peaks. Disproportionierung und Komproportionierung treten immer auf.

Einige diagnostische Kriterien ermöglichen die Bestimmung der Art des Elektronentransfers und sind in Tabelle B.1.2 dargestellt.

Kriterium (bei 25 °C)	reversibel	quasi-reversibel	irreversibel
Form des CVs	E_{ox}, E_{red} symmetrisch	E_{ox}, E_{red}	nur ein Peak
E_p	unabhängig von v	ändert sich je $\lg v$ um um $\left \frac{30}{n\alpha} \right \text{ mV}$	ändert sich mit v
$\left \Delta E_p - \Delta E_{\frac{p}{2}} \right \text{ mV}$ ΔE_p	$\frac{59}{n} \text{ mV}$	$\Delta EP > \frac{59}{n} \text{ mV}$ steigt mit v	$\frac{48}{n\alpha} \text{ mV}$
I_p	$I_p \propto \sqrt{v}$	wächst mit $\sqrt{v}$, nicht proportional	$I_p \propto \sqrt{v}$
$\left \frac{I_{red}}{I_{ox}} \right $	$\left \frac{I_{red}}{I_{ox}} \right = 1$	$\left \frac{I_{red}}{I_{ox}} \right = 1$ für $\alpha = 1$	

Tabelle B.1.2: Diagnostische Kriterien zur Bestimmung der Art des heterogenen Elektronentransfers

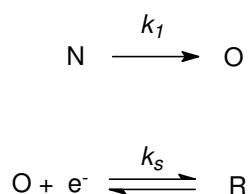
- Reversibilität: Aus der *Randles-Sevcik*-Gleichung kann der Diffusionskoeffizient D bestimmt werden.
- Irreversibilität: $n\alpha$ kann aus $\left| \Delta E_p - \Delta E_{\frac{p}{2}} \right|$ abgeschätzt werden und damit kann die Geschwindigkeitskonstante der Elektrodenreaktion k_s und der Diffusionskoeffizient D und gegebenenfalls der Transferkoeffizient α bestimmt werden.
- Quasi-Reversibilität: Mit Hilfe einer Arbeitskurve kann aus der Differenz der Peakpotentiale die Geschwindigkeitskonstante der Elektrodenreaktion k_s bestimmt werden.

B.2 Homogen-chemische Reaktionen

B.2.1 Der CE-Mechanismus

Bei diesem Mechanismus nimmt man an, dass eine homogen-chemische Reaktion dem heterogenen elektrochemischen Ladungstransfer vorangeht. Die elektrochemisch aktive Spezies wird entweder chemisch gebildet (z.B. durch Oxidation mit Luftsauerstoff) oder durch eine Konkurrenzreaktion abgefangen. Betrachtet man als einfachstes System eine irreversible Bildungsreaktion erster Ordnung so ergeben sich die in

Gleichung B.2.1



beschriebenen Elementarreaktionen, wobei zu Beginn der Messung nur N vorliegt, welches selbst nicht elektrochemisch aktiv ist. Ist die Bildungsgeschwindigkeit langsam im Vergleich zur Elektronentransferreaktion ($k_I < k_s$), dann kontrolliert die vorgelagerte Bildung von O den Strom und das CV hat nicht die Form eines reversiblen Elektronentransfers (Abbildung B.2.1 innen). Ist die Bildungsgeschwindigkeit von O hingegen schneller als der Elektronentransfer ($k_I > k_s$), dann bestimmt dieser den Strom und das CV entspricht dem für reversibles Verhalten (Abbildung B.2.1 außen).

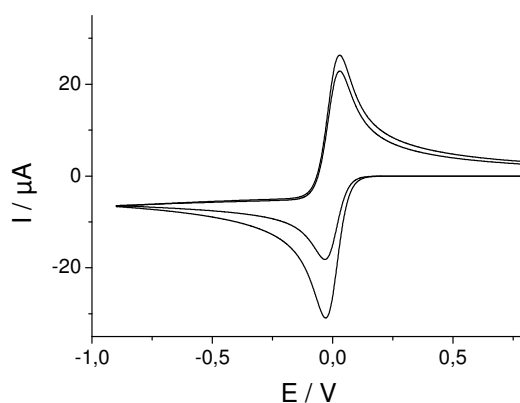


Abbildung B.2.1: CE-Mechanismus, vorgelagerte Reaktion bildet die elektrochemisch aktive Spezies; Simulation: $\nu = 0,01 \text{ V s}^{-1}$, $k_s = 0,1 \text{ cm s}^{-1}$, $A = 0,07068 \text{ cm}^2$, $\alpha = 0,5$, $E^0 = 0 \text{ mV}$, $D(\text{O}, \text{R}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $T = 298,2 \text{ K}$, $[\text{N}] = 5 \text{ mM}$, $K = 1000$; innen: $k_I = 0,01 \text{ s}^{-1}$, außen $k_I = 1000 \text{ s}^{-1}$

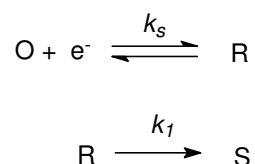
Andere Beispiele für vorgelagerte Reaktionen sind Konkurrenzreaktionen, die die elektrochemisch aktive Komponente in einer Nebenreaktion entfernen. Das erhaltene CV gleicht dem eines *EC*-Mechanismus (Abbildung B.2.2).

B.2.2 Der *EC*-Mechanismus

Viele elektrochemisch gebildete Spezies wie etwa Radikale sind relativ kurzlebig und die Zerfallszeit liegt noch im Bereich der Meßzeit. Ein solcher Fall ist in

Gleichung B.2.2 dargestellt, wobei man hier als einfachsten Fall annimmt, dass der Elektronentransferschritt reversibel, die chemische Reaktion hingegen irreversibel verläuft.⁸⁸

Gleichung B.2.2



Die Massentransportgleichungen sind für O analog dem zweiten *Fickschen* Gesetz (Gleichung A.10.3), für R gilt zusätzlich noch ein weiterer Term

Gleichung B.2.3

$$\frac{\partial [\text{R}]}{\partial t} = D_R \cdot \left(\frac{\partial^2 [\text{R}]}{\partial x^2} \right) - k_f [\text{R}]$$

Letzterer trägt der Tatsache Rechnung, dass R nach elektrochemischer Bildung mit k_f zerfällt.

Im CV zeigt sich dies durch Wegfallen des Oxidationspeaks mit zunehmender Geschwindigkeit k_f (Abbildung B.2.2 von außen nach innen).

⁸⁸ Das Produkt der Elektronentransferreaktion kann auch in chemischen Folgereaktionen höherer Ordnung abreagieren.

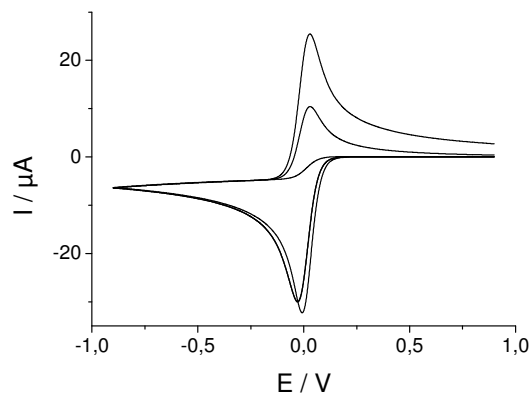


Abbildung B.2.2: *EC*-Mechanismus, angeschlossene Reaktion entfernt das elektrochemisch gebildete Produkt; Randbedingungen Simulation: $\nu = 0,01 \text{ V s}^{-1}$, $k_s = 0,1 \text{ cm s}^{-1}$, $A = 0,07068 \text{ cm}^2$, $\alpha = 0,5$, $E^0 = 0 \text{ mV}$, $D(\text{O}, \text{R}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $T = 298,2 \text{ K}$, $[\text{O}] = 5 \text{ mM}$, $K = 1000$, k_f von innen nach außen $[\text{s}^{-1}]$: 0, 0,01, 1

Die chemische Reaktion verschiebt das kathodische Peakpotential in positiver Richtung im Vergleich zum reversiblen Elektronentransfer. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Oberflächenkonzentration von R geringer ist als bei der reversiblen Reaktion ohne Folgeschritt und so verschiebt sich das Potential, um das *Nernstsche* Gleichgewicht aufrecht zu erhalten. Erhöht man die Vorschubgeschwindigkeit, so verschiebt sich der Peak in umgekehrter Richtung um $-30/n \text{ mV}$ bei 25°C je dekadischer Erhöhung von ν für eine Reaktion erster Ordnung.⁸⁹ Das Peakstromverhältnis wächst mit der Vorschubgeschwindigkeit, bis wieder reversibles Verhalten erreicht wird, aber der Wert eins wird nicht erreicht. Diesen Unterschied im Peakstromverhältnis macht man sich zunutze, um daraus die Geschwindigkeitskonstante der angeschlossenen chemischen Reaktion zu ermitteln. Dazu benutzt man die Methode nach *Nicholson* und *Shain*, die im folgenden Kapitel über katalytische Reaktionen näher erläutert wird [189].

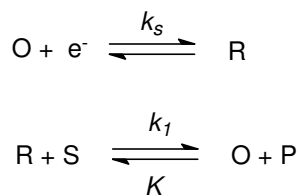
B.2.3 Katalytischer *EC'*-Mechanismus

Betrachten wir nun wieder die Elektronentransferreaktion, bei der O zur R reduziert wird, so bezeichnet man eine Reaktion als katalytischen *EC'*-Mechanismus, bei der das elektrochemisch gebildete Produkt R in einer homogen-chemischen Reaktion zum Edukt O zurückgeführt wird (Gleichung B.2.4

Gleichung 6.3.3, Abbildung B.2.3)

⁸⁹ Für eine Reaktion zweiter Ordnung ist diese Änderung kleiner, $-19,6/n \text{ mV}$.

Gleichung B.2.4



Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der katalytischen Reaktion k_1 nutzt man die Methode nach *Nicholson* und *Shain* [189]. Dies ist bereits in Kapitel 6.3.2.1, S. 58 beschrieben.

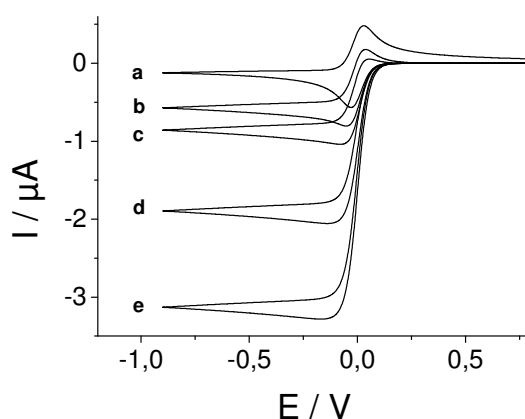


Abbildung B.2.3: Simulierte Cyclovoltammogramme für den EC' -Mechanismus; Randbedingungen Simulation: $\nu = 0,036 \text{ V s}^{-1}$, $k_s = 0,1 \text{ cm s}^{-1}$, $A = 0,07068 \text{ cm}^2$, $\alpha = 0,5$, $E^0 = 0 \text{ mV}$, $D(\text{O}, \text{R}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $T = 298,2 \text{ K}$, $[\text{O}] = 50 \text{ } \mu\text{M}$, $K = 10000$, $k_1 = 2000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $\text{P} [\text{mM}]$: a) 0, b) 0,25, c) 0,5, d) 2, e) 5

Für Peakstromquotienten größer eins ergibt sich ein linearer Zusammenhang wie in Abbildung B.2.4 gezeigt. Trägt man k_f in Abhängigkeit von $[\text{P}]$ auf, so erhält man aus der Steigung die Geschwindigkeitskonstante k_1 .

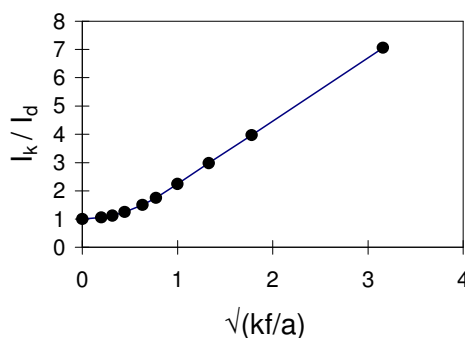


Abbildung B.2.4: Arbeitskurve nach *Nicholson* und *Shain*, mit $a = \frac{nF\nu}{RT}$, $F = 96484,6 \text{ C mol}^{-1}$, $R = 8314,4 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $T = 298,2 \text{ K}$, ν / mVs^{-1}

B.2.4 Zusammenfassung homogen-chemische Reaktionen

In diesem Kapitel wurden drei Mechanismen vorgestellt. Die wesentlichen Charakteristika für eine Reduktion sind in Tabelle B.2.1 zusammengefaßt (Umgekehrtes gilt für eine Oxidation).

Kriterium	CE-Mechanismus	EC-Mechanismus	EC'-Mechanismus
$\frac{ I_{red} }{\sqrt{v}}$	nimmt mit steigendem v ab	nimmt mit steigendem v leicht ab	nimmt mit abnehmendem v stark zu
$\frac{ I_{ox} }{ I_{red} }$	≥ 1 , nimmt mit v zu	≤ 1 , nimmt mit v zu	$\ll 1$
$ I_{red} $			kann einen Plateauwert erreichen; Werte $> Randles-Sevcik$
E_{red}		$> \text{reversibel}, -\frac{30}{n} \text{ mV je lg } v$	

Tabelle B.2.1: Charakteristika für CE-, EC- und EC'-Mechanismen

- CE-Mechanismus: Geht eine homogen-chemische Reaktion einem Ladungstransfer voraus, hat bei einer Bildungsreaktion das CV nicht die reversible Form, wenn $k_1 > k_s$.
- EC-Mechanismus: Zerfällt das elektrochemische Produkt oder wird es durch eine chemische Reaktion abgefangen, dann weicht das CV mit steigendem k_1 stärker vom reversiblen Verhalten ab, bis das CV nur einen Peak aufweist.
- EC'-Mechanismus: Wird eine elektroaktive Spezies durch eine chemische Reaktion zurückgebildet, so verschieben sich die Konzentrationsverhältnisse und damit auch die Peakströme. Je stärker ausgeprägt die katalytische Geschwindigkeit k_1 , desto größer der katalytische Effekt, bis hin zu einem sigmoidalen Verlauf.

Literaturverzeichnis

- [1] www.transgen.de/Nachhaltigkeit/webguide_nachhaltigkeit.html
- [2] S. U. O' Hara, *Toward a sustaining production theory*, Ecological Economics **1997**, 20, 141-154.
- [3] A. Bosshard, *A methodology and terminology of sustainability assessment and its perspectives for rural planning*, Agriculture, Ecosystems & Environment **2000**, 77, 29-41.
- [4] www.un.org/esa/sustdev/agenda21text.htm
- [5] www.zeit.de/Schwerpunkte/Wissen/Nachhaltigkeit/Beschreibung.html
- [6] *Proceedings of the OECD workshop on sustainable chemistry*, OECD Environmental Health and Safety Publications; Series on Risk Management N°10, **1999**.
- [7] www.nachhaltigkeit.aachener-stiftung.de
- [8] P. Tundo, P. T. Anastas, D. St. C. Black, J. J. Breen, T. Collins, S. Memoli, J. Miyamoto, M. Polyakoff, W. Tumas, *Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview*, Pure and Applied Chemistry **2000**, 72, 1207-1228.
- [9] D. L. Hjeresen, P. T. Anastas, S. Ware, M. M. Kirchhoff, *Green chemistry progress & challenges*, Environ Sci Technol **2001**, 35, 114A-119A.
- [10] P. T. Anastas, J. J. Breen, *Design for the environment and Green Chemistry: the heart and soul of industrial ecology*, Journal of Cleaner Production **1997**, 5, 97-102.
- [11] J. N. Armor, *Striving for catalytically green process in the 21st century*, Applied Catalysis A: General **1999**, 189, 153-162.
- [12] P. T. Anastas, M. M. Kirchhoff, T. C. Williamson, *Catalysis as a foundational pillar of green chemistry*, Applied Catalysis A: General **2001**, 221, 3-13.
- [13] W.-D. Fessner, J. B. Jones, *Biocatalysis and Biotransformation - From discovery to application*, Current Opinion in Chemical Biology **2001**, 5, 103-105.
- [14] S. M. Thomas, R. Di Cosimo, V. Nagarajan, *Biocatalysis: application and potentials for the chemical industry*, TIBTECH **2002**, 20, 238-242.
- [15] K. Faber, R. Patel, *Chemical biotechnology. A happy marriage between chemistry and biotechnology: asymmetric synthesis via green chemistry.*, Current Opinion in Biotechnology **2000**, 11, 517-519.
- [16] R. Azerad, *Editorial overview: Better enzymes for green chemistry*, Current Opinion in Biotechnology **2001**, 12, 553-554.
- [17] K. M. Manoj, A. Archelas, J. Baratti, R. Furstoss, *Microbiological transformations. Part 45: A green chemistry preparative synthesis of the enantiopure building blocks of Eliprodil*, Tetrahedron **2001**, 57, 695-702.
- [18] Y. Genzel, A. Archelas, Q. B. Broxterman, B. Schulze, R. Furstoss, *Microbiological Transformations. 47. A Step toward a green chemistry preparation of enantiopure (S)-2-, -3-, and -4-pyridyloxirane via a hydrolase catalyzed kinetic resolution*, J Org Chem **2001**, 66, 538-543.
- [19] A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, VCH-Wiley, Weinheim, **2000**.
- [20] L. W. Wackett, *Environmental biotechnology*, TIBTECH **2000**, 18, 19-21.
- [21] K. D. Moeller, *Synthetic applications of anodic electrochemistry*, Tetrahedron **2000**, 56, 9527-9554.

- [22] H. Lund, M. M. Baizer, *Organic Electrochemistry, An Introduction and a Guide*, 3rd ed., Marcel Dekker, New York, **1991**.
- [23] E. Steckhan, *Organic syntheses with electrochemically regenerable redox systems*, Top Curr Chem **1987**, *142*, 1-69.
- [24] E. Steckhan, M. Frede, S. Herrmann, R. Ruppert, E. Spika, E. Dietz, *Enzymatische Synthesen durch indirekte elektrochemische Prozesse*, Dechema-Monographien **1992**, *125*, 723-752.
- [25] E. Steckhan, T. Arns, W. R. Heineman, G. Hilt, D. Hoormann, J. Jörissen, L. Kröner, B. Lewall, H. Pütter, *Environmental protection and economization of resources by electroorganic and electroenzymatic synthesis*, Chemosphere **2001**, *43*, 63-73.
- [26] H. Herbst, K. Petz, J. Stenzel, *Die elektrochemische Regenerierung von Chromschwefelsäure in einer modifizierten HOECHST-UHDE-Membranzelle*, Dechema-Monographien **1992**, *125*, 243-273.
- [27] K. Barry Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K.-S. Jeong, H.-L. Kwong, K. Morikawa, Z.-M. Wang, D. Xu, X.-L. Zhang, *The osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation: a new ligand class and a process improvement*, J Org Chem **1992**, *57*, 2768-2771.
- [28] A. R. Amundsen, E. N. Balko, *Preparation of chiral diols by the osmium-catalyzed, indirect anodic oxidation of olefins*, Journal of Applied Electrochemistry **1992**, *22*, 810-816.
- [29] T. Bechtold, E. Burtscher, A. Turcanu, O. Bobleter, *Indirect electrochemical reduction of dispersed indigo dyestuff*, J Electrochem Soc **1996**, *143*, 2411-2416.
- [30] T. Bechtold, E. Burtscher, A. Turcanu, O. Bobleter, *Multi-cathode cell with flow-through electrodes for the production of iron(II)-triethanolamine complexes*, Journal of Applied Electrochemistry **1997**, *27*, 1021-1028.
- [31] H. Pütter, H. Hannebaum, *Production of phthalides by cathodic reduction of phthalic acid or its derivatives*, DE618854, BASF AG, Ludwigshafen, **1997**.
- [32] B. Brielbeck, M. Frede, E. Steckhan, *Continuous electroenzymatic synthesis employing the electrochemical enzyme membrane reactor*, Biocatal **1994**, *10*, 49-64.
- [33] E. Steckhan, *Electroenzymatic synthesis*, Top Curr Chem **1994**, *170*, 83-111.
- [34] G. Hilt, Dissertation: "Elektrochemische und chemische Untersuchungen an 1,10-Phenanthrolin-5,6-dion Systemen und deren Anwendung als Redoxkatalysatoren in enzymatischen Oxidationen", Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, **1996**.
- [35] G. Hilt, B. Lewall, G. Montero, J. H. P. Utley, E. Steckhan, *Efficient in situ redox catalytic NAD(P)⁺ regeneration in enzymatic synthesis using transition-metal complexes of 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its monomethylated derivative as catalysts*, Liebigs Ann /Recueil **1997**, 2289-2296.
- [36] A. Liese, T. Zelinski, M. R. Kula, H. Kierkels, M. Karutz, U. Kragl, C. Wandrey, *A novel reactor concept for the enzymatic reduction of poorly soluble ketones*, J Mol Catal B-Enzym **1998**, *4*, 91-99.
- [37] A. Liese, M. Karutz, J. Kamphuis, C. Wandrey, U. Kragl, *Enzymatic resolution of 1-phenyl-1,2-ethanediol by enantioselective oxidation: overcoming product inhibition by continuous extraction*, Biotech Bioeng **1996**, *51*, 544-550.
- [38] K. Seelbach, B. Riebel, W. Hummel, M.-R. Kula, V. I. Tishkov, A. M. Egorov, C. Wandrey, U. Kragl, *A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase*, Tetrahedron Lett **1996**, *37*, 1377-1380.

-
- [39] Werner Hummel, *Enzyme-catalyzed synthesis of optically pure R(+)-phenylethanol*, Biotechnol Lett **1990**, 12, 403-408.
- [40] W. Kruse, W. Hummel, U. Kragl, *Alcohol-dehydrogenase-catalyzed production of chiral hydrophobic alcohols. A new approach leading to a nearly waste-free process*, Recl Trav Chim Pays-Bas **1996**, 115, 239-243.
- [41] R. Wolfenden, M. J. Snider, *The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts*, Acc Chem Res **2001**, 34, 938-945.
- [42] W. Hummel, *Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments*, TIBTECH **1999**, 17, 487-492.
- [43] U. Kragl, W. Kruse, W. Hummel, C. Wandrey, *Enzyme engineering aspects of biocatalysis: cofactor regeneration as example*, Biotech Bioeng **1996**, 52, 309-319.
- [44] H.W. Adolph, P. Maurer, H. Schneider-Bernlohr, C. Sartorius, M. Zeppezauer, *Substrate specificity and stereoselectivity of horse liver alcohol dehydrogenase. Kinetic evaluation of binding and activation parameters controlling the catalytic cycles of unbranched, acyclic secondary alcohols and ketones as substrates of the native and active-site-specific Co(II)-substituted enzyme.*, Eur J Biochem **1991**, 201, 615-625.
- [45] C.-I. Brändén, H. Jörnvall, H. Eklund, B. Furugren, *The enzymes*, 3th Ed, Vol. XI, Academic Press, New York, **1975**.
- [46] J. B. Jones, K. E. Taylor, *Nicotinamide coenzyme regeneration. Flavin mononucleotide (riboflavin phosphate) as an efficient, economical, and enzyme-compatible recycling agent.*, Can J Chem **1976**, 54, 2969-2973.
- [47] J.B. Jones, *An illustrative example of a synthetically useful enzyme: horse liver alcohol dehydrogenase.*, Ciba Found Symp **1985**, 111, 3-21.
- [48] H. Eklund, C.I. Branden, *Structural differences between apo- and holoenzyme of horse liver alcohol dehydrogenase.*, J Biol Chem **1979**, 254, 3458-3461.
- [49] L. Andersson, H. Jörnvall, A. Akeson, K. Mosbach, *Separation of isoenzymes of horse liver alcohol dehydrogenase and purification of the enzyme by affinity chromatography on an immobilized AMP-analogue*, Biochim Biophys Acta **1974**, 364, 1-8.
- [50] V.K. Chadha, B.V. Plapp, *Inactivation of horse liver alcohol dehydrogenase by modification of cysteine residue 174 with 3-bromopropionic acid.*, Biochem **1984**, 23, 216-221.
- [51] A. Kohen, J. P. Klinman, *Hydrogen tunneling in biology*, Chemistry & Biology **1999**, 6, R191-R198.
- [52] S. P. Webb, P. K. Agarwal, S. Hammes-Schiffer, *Combining electronic structure methods with the calculation of hydrogen vibrational wavefunctions: application to hydride transfer in liver alcohol dehydrogenase*, J Phys Chem B **2000**, 104, 8884-8894.
- [53] P. K. Agarwal, S. P. Webb, S. Hammes-Schiffer, *Computational studies on the mechanism for proton and hydride transfer in liver alcohol dehydrogenase*, J Am Chem Soc **2000**, 122, 4803-4812.
- [54] S. Subramanian, P.D. Ross, *The enthalpy of protolysis of liver alcohol dehydrogenase upon binding nicotinamide adenine dinucleotide.*, J Biol Chem **1979**, 254, 7826-7830.
- [55] H. Gutfreund, *The consequences of nucleotide binding to liver alcohol dehydrogenase.*, Ciba Found Symp **1977**, 81-88.

- [56] J. Luo, T.C. Bruice, *Dynamic structures of horse liver alcohol dehydrogenase (HLADH): results of molecular dynamics simulations of HLADH-NAD(+)-PhCH(2)OH, HLADH-NAD(+)-PhCH(2)O(-), and HLADH-NADH-PhCHO.*, J Am Chem Soc **2001**, 123, 11952-11959.
- [57] H. Eklund, *Structural studies of horse liver alcohol dehydrogenase: coenzyme, substrate and inhibitor binding.*, Pharmacol Biochem Behav **1983**, 18 Suppl 1, 73-81.
- [58] H. Eklund, *Coenzyme binding in alcohol dehydrogenase.*, Biochem Soc Trans **1989**, 17, 293-296.
- [59] E. Bignetti, *Binding of NADH to horse liver alcohol dehydrogenase: dependence on concentration of benzaldehyde and benzyl alcohol.*, Physiol Chem Phys Med NMR **1984**, 16, 21-27.
- [60] H. Eklund, S. Ramaswamy, B.V. Plapp, M. El-Ahmad, O. Danielsson, J.O. Hoog, H. Jornvall, *Crystallographic investigations of alcohol dehydrogenases.*, **1994**, 71, 269-277.
- [61] S. Ramaswamy, H. Eklund, B.V. Plapp, *Structures of horse liver alcohol dehydrogenase complexed with NAD⁺ and substituted benzyl alcohols.*, Biochem **1994**, 33, 5230-5237.
- [62] M. Hennecke, B.V. Plapp, *Involvement of histidine residues in the activity of horse liver alcohol dehydrogenase.*, Biochem **1983**, 22, 3721-3728.
- [63] S. A. M. Vanhommerig, R. J. Meier, L. A. Ae. Sluyterman, E. M. Meijer, *Semiempirical AM1 and PM3 studies of the enzymatic mechanism of horse liver alcohol dehydrogenase*, J Mol Struct Theochem **1996**, 364, 33-43.
- [64] P. Gosselin, A. Perrotin, S. Mille, *New preparation of (3aR*,6S*,7aR*)-6,7,7-trimethylhexahydro-2-benzofuran-1(3H)-one: formal synthesis of (+)- γ -irone*, Tetrahedron **2001**, 57, 733-738.
- [65] R. Kaiser, P. Kraft, *Überraschende Dufterlebnisse - Neue und ungewöhnliche Naturstoffe faszinierender Blütendüfte*, Chem i u Zeit **2001**, 35, 8-22.
- [66] J. B. Jones, *Enzymes in organic synthesis*, Tetrahedron **1986**, 42, 3351-3403.
- [67] J. B. Jones, C. J. Francis, *Enzymes in organic synthesis. 32. Stereospecific HLADH-catalyzed oxidations of exo-oxabicyclic and endo-oxabicyclic meso-diols*, Can J Chem **1984**, 62, 2578-2582.
- [68] I. J. Jakovac, H. B. Godbrand, K. P. Lok, J. B. Jones, *Enzymes in organic synthesis 24. Preparation of enantiomerically pure chiral lactones via stereospecific HLADH catalyzed oxidations of monocyclic meso-diols*, J Am Chem Soc **1982**, 104, 4659-4665.
- [69] I. J. Jakovac, G. Ng, K. P. Lok, J. B. Jones, *Preparation of useful chiral lacton synthons via stereospecific enzyme-catalyzed oxidations of meso-diols*, Journal of the Chemical Society, Chemical Communications **1980**, 515-516.
- [70] G. Hilt, T. Jarbawi, W. R. Heineman, E. Steckhan, *An analytical study of the redox behaviour of 1,10-phenanthroline-5,6-dione, its transition-metal complexes, and its N-monomethylated derivative with regard to their efficiency as mediators of NAD(P)⁺ regeneration*, Chem Eur J **1997**, 3, 79-88.
- [71] G. Feron, P. Bonnarme, A. Durand, *Prospects for the microbial production of food flavours*, Trends Food Sci Technol **1996**, 7, 285-293.
- [72] J.-M. Gaudin, *Synthesis and organoleptic properties of p-menthane lactones*, Tetrahedron **2000**, 56, 4769-4776.
- [73] T. B. Adams, D. B. Greer, J. Doull, I. C. Munro, P. Newberne, P. S. Portoghese, R. L. Smith, B. M. Wagner, C. S. Weil, L. A. Woods, R. A. Ford, *The FEMA GRAS assesment of lactones used as flavour ingredients*, Food Chem Toxicol **1998**, 36, 249-278.

-
- [74] G. Fitzgerald, K. J. James, K. Mc Namara, M. A. Stack, *Characterisation of whiskeys using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry*, J Chromat A **2000**, 896, 351-359.
- [75] F. Benedetti, C. Forzato, P. Nitti, G. Pitacco, E. Valentin, M. Vicario, *Synthesis of all stereoisomers of cognac lactones via microbial reduction and enzymatic resolution strategies*, Tetrahedron: Asymmetry **2001**, 12, 505-511.
- [76] H. Johnson, *Der große Johnson- Die Enzyklopädie der Weine, Weinbaugebiete und Weinerzeuger der Welt*, Hallwag Verlag, Stuttgart, **1998**.
- [77] A. P. Pollnitz, G. P. Jones, M. A. Sefton, *Determination of oak lactones in barrel-aged wines and in oak extracts by stable isotope dilution analysis*, J Chromat A **1999**, 857, 239-246.
- [78] L. G. Lee, G. M. Whitesides, *Preparation of optically active 1,2-diols and α -hydroxy ketones using glycerol dehydrogenase as catalyst: limits to enzyme-catalyzed synthesis due to noncompetitive and mixed inhibition by product*, J Org Chem **1986**, 51, 25-36.
- [79] E. Steckhan, B.6.2 Oxidation of alcohol, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis Vol. II*, VCH, Weinheim, **1995**; 705-739.
- [80] H. Nishise, Y. Tani, H. Yamada, *Alternation of the dissimilation pathway for glycerol and amplification of glycerol dehydrogenase in mutant strains of Cellulomonas sp. NT3060*, Agric Biol Chem **1985**, 49, 3115-3122.
- [81] H. Nishise, A. Nagao, Y. Tani, H. Yamada, *Further characterization of glycerol dehydrogenase from Cellulomonas sp. NT3060*, Agric Biol Chem **1984**, 48, 1603-1609.
- [82] H. Nishise, A. Ogawa, Y. Tani, H. Yamada, *Glycerol dehydrogenase and glycerol dissimilation in Cellulomonas sp. NT3060*, Agric Biol Chem **1985**, 49, 629-636.
- [83] S. Kondruweit, B. A. A. Dremel, R. D. Schmid, *A new chemiluminometric method for the determination of glycerol in wine by flow injection analysis with immobilized glycerol dehydrogenase in combination with NADH oxidase*, Analytical Letters **1994**, 27, 1489-1505.
- [84] A. O. S. S. Rangel, I. V. Tóth, *Enzymatic determination of ethanol and glycerol by flow-injection parallel multi-site detection*, Analytica Chimica Acta **2000**, 416, 205-210.
- [85] E. Mataix, M. D. L. De Castro, *Simultaneous detection of ethanol and glycerol in wines by a flow injection-pervaporation approach with in parallel photometric and fluorometric detection*, Talanta **2000**, 51, 489-496.
- [86] I. Axer, Diplomarbeit: "Indirekte aerobe und elektrochemische NAD^+ -Regeneration mit Glycerindehydrogenase aus Enterobacter aerogenes als Produktionsenzym", Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, **1996**
- [87] A. Liese, **1994**
- [88] E. Lin, B. Magasanik, *The activation of glycerol dehydrogenase from Aerobacter aerogenes by monovalent cations*, Journal of Biological Chemistry **1960**, 235, 1820-1823.
- [89] W. G. Mc Gregor, J. Phillips, H. Suelter, *Purification and kinetic characterization of a monovalent cation-activated glycerol dehydrogenase from Aerobacter aerogenes*, Journal of Biological Chemistry **1974**, 249, 3132-3139.
- [90] A. Liese, T. Zelinski, M.-R. Kula, H. Kierkels, M. Karutz, U. Kragl, C. Wandrey, *A novel reactor concept for the enzymatic reduction of poorly soluble ketones*, J Mol Cat B: Enzymatic **1998**, 4, 91-99.

- [91] L. G. Lee, G. M. Whitesides, *Enzyme-catalyzed organic synthesis. A comparison of strategies for in situ regeneration of NAD from NADH*, J Am Chem Soc **1985**, 107, 6999-7008.
- [92] R. A. Copeland, *Enzymes- A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*, VCH Publishers, Inc., New York, **1996**.
- [93] Cj. A. Duine, *Cofactor diversity in biological oxidations: implications and applications*, Chem Rec **2000**, 74-83.
- [94] E. C. Webb, *Enzyme Nomenclature*, Academic Press, Inc., New York, **1992**.
- [95] H. K. Chenault, G. M. Whitesides, *Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis*, Appl Biochem Biotechnol **1987**, 14, 147-197.
- [96] L. Greiner, Dissertation, *Prozessentwicklung für die katalytische Reduktion mit molekularem Wasserstoff*, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn, **2002**
- [97] M. D. Leonida, *Redox enzymes used in chiral syntheses coupled to coenzyme regeneration*, Current Medicinal Chemistry **2001**, 8, 345-369.
- [98] G. Alagona, C. Ghio, A. Agresti, *A theoretical study on reaction pathways to carbanions.*, Comput Chem **2000**, 24, 311-324.
- [99] H. K. Chenault, E. S. Simon, G. M. Whitesides, *Cofactor regeneration for enzyme-catalysed synthesis*, Biotechnol Gen Engin Rev **1988**, 6, 221-266.
- [100] J. W. Burgner, W. J. Ray, *Lactate dehydrogenase catalyzed pyruvate adduct reaction: simulation general acid-base catalysis involving an enzyme and an external catalyst*, Biochem **1984**, 23, 3626 - 3635.
- [101] J. W. Burgner, W. J. Ray, *On the origin of the lactate dehydrogenase induced rate effect*, Biochem **1984**, 23, 3636 - 3648.
- [102] J. H. Griffin, R. S. Criddle, *Substrate-inhibited lactate dehydrogenase. Reaction mechanism and essential role of dissociated subunits*, Biochem **1970**, 9, 1195 - 1205.
- [103] A. Huwig, S. Emmel, G. Jäkel, F. Giffhorn, *Enzymatic synthesis of L-tagatose from galactitol with galactitol dehydrogenase from Rhodobacter sphaeroides D*, Carb Res **1998**, 305, 337-339.
- [104] H. R. Christen, *Grundlagen der allgemeinen und anorganischen Chemie*, Salle und Sauerländer, Frankfurt, **1988**.
- [105] S. L. Scott, W.-J. Chen, A. Bakac, J. H. Espenson, *Spectroscopic parameters, electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rates of 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions*, J Phys Chem **1993**, 97, 6710-6714.
- [106] A. W. Bott, *Study of ferricyanide by cyclic voltammetry using the CV-50W*, Curr Sep **1996**, 15, 25-30.
- [107] K. Hirano, H. Yamamoto, K. Kunimoto, *Novel electron transfer mediators based on dichloroindophenol derivatives for lactate oxidase*, J Electroanal Chem **2001**, 510, 149-152.
- [108] N. Mano, A. Kuhn, *Electrodes modified with nitrofluorenone derivatives as a basis for new biosensors*, Biosensors & Bioelectronics **2001**, 16, 653-660.
- [109] N. Mano, A. Thienpont, A. Kuhn, *Adsorption and catalytic activity of trinitro-fluorenone derivatives towards NADH oxidation on different electrode materials*, Electrochem Commun **2001**, 3, 585-589.
- [110] N. Mano, A. Kuhn, *Affinity assembled multilayers for new dehydrogenase biosensors*, Bioelectrochem **2002**, 56, 123-126.

-
- [111] F. D. Munteanu, N. Mano, A. Kuhn, L. Gorton, *Mediator-modified electrodes for catalytic NADH oxidation: high rate constant at interesting overpotentials*, *Bioelectrochem* **2002**, 56, 67-72.
- [112] O. Miyawaki, T. Yano, *Electrochemical bioreactor with regeneration of NAD⁺ by rotating graphite electrode with PMS adsorbed*, *Enz Microbiol Tech* **1992**, 14, 474-478.
- [113] F. G. Halaka, G. T. Babcock, J. L. Dye, *Properties of 5-methylphenazinium methyl sulfate*, *J Biol Chem* **1982**, 257, 1458-1461.
- [114] J. F. J. Engbersen, A. Koudijs, H. C. Van Der Plas, *Solvent and micellar effects upon the reaction of NADH models with methylene blue*, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1986**, 105, 494-502.
- [115] A. A. Karayakin, E. A. Karayakina, W. Schuhmann, H.-L. Schmidt, *Electropolymerized azines: Part II. In a search of the best electrocatalyst of NADH oxidation*, *Electroanal* **1999**, 11, 553-557.
- [116] L. Gorton, *Chemically modified electrodes for the electrocatalytic oxidation of nicotinamide coenzymes*, *J Chem Soc, Faraday Trans* **1986**, 82, 1245-1258.
- [117] F. Torabi, K. Ramanathan, P.-O. Larsson, L. Gorton, K. Svanberg, Y. Okamoto, B. Danielsson, M. Khayyami, *Coulometric determination of NAD⁺ and NADH in normal and cancer cells using LDH, RVC and a polymer mediator*, *Talanta* **1999**, 50, 787-797.
- [118] P. M. Allen, W. R. Bowen, *Electrochemical regeneration of redox cofactors and mediators-the key to bioelectrosynthesis*, *TIBTECH* **1985**, 3, 145-149.
- [119] S. Itoh, N. Mita, Y. Ohshiro, *Efficient NAD⁺-regenerating system with heterocyclic o-quinones and molecular oxygen catalyzed by diaphorase*, *Chem Lett* **1990**, 1949-1952.
- [120] I. Schröder, D. Vasic-Racki, C. Wandrey, A. Liese, *Enantioselective enzymatic oxidation with indirect electrochemical NAD⁺ regeneration*, *Proceedings of the Electrochemical Society* **2001**, 14, 109-112.
- [121] B. W. Carlson, L. L. Miller, P. Neta, J. Grodkowski, *Oxidation of NADH involving rate-limiting one-electron transfer*, *J Am Chem Soc* **1984**, 106, 7233-7239.
- [122] I. C. Popescu, E. Domínguez, A. Narváez, V. Pavlov, I. Katakis, *Electrocatalytic oxidation of NADH at graphite electrodes modified with osmium phenanthroline dione*, *J Electroanal Chem* **1999**, 464, 208-214.
- [123] Y. Ogino, K. Takagi, K. Kano, T. Ikeda, *Reactions between diaphorase and quinone compounds in bioelectrocatalytic redox reactions of NADH and NAD⁺*, *J Electroanal Chem* **1995**, 396, 517-524.
- [124] Z. Liu, O. Niwa, T. Horiuchi, R. Kurita, K. Torimitsu, *NADH and glutamate on-line sensors using Os-gel-HRP/GC electrodes modified with NADH oxidase and glutamate dehydrogenase*, *Biosensors & Bioelectronics* **1999**, 14, 631-638.
- [125] W. Adam, M. Lazarus, C. R. Saha-Möller, P. Schreier, *Biocatalytic synthesis of optically active α -oxyfunctionalized carbonyl compounds*, *Acc Chem Res* **1999**, 32, 837-845.
- [126] S. H. Gwak, Y. Ota, O. Yagi, Y. Minoda, *Immobilization of an NADH oxidizing complex and its use as a regenerator of NAD*, *J Ferment Technol* **1982**, 60, 205-210.
- [127] R. P. Chambers, J. R. Ford, J. H. Allender, W. H. Baricos, W. Cohen, *Continuous processing with cofactor requiring enzymes: coenzyme retention and regeneration*, *Enzyme Engineering* **1974**, 2, 195-202.

- [128] N. Kiba, N. Azuma, M. Furusawa, *Chemiluminometric method for the determination of glycerol in wine by flow-injection analysis with co-immobilized glycerol dehydrogenase/NADH-oxidase*, *Talanta* **1996**, *43*, 1761-1766.
- [129] S.-I. Yamazaki, K. Kano, T. Ikeda, K. Isawa, T. Kaneko, *Role of 2-amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone, a strong growth stimulator for bifidobacteria, as an electron transfer mediator for NAD(P)⁺ regeneration in Bifidobacterium longum*, *Biochim Biophys Acta* **1999**, *1428*, 241-250.
- [130] W. H. Baricos, R. P. Chambers, W. Cohen, *Practical processing with cofactor-requiring enzymes*, *Analytical Letters* **1976**, *9*, 257-276.
- [131] F. Ergan, D. Thomas, *Immobilization of the bacterium Leuconostoc mesenteroides with NADH-oxidase function in matrix-supported microcapsules for continuous cofactor regeneration*, *Annals New York Academy of Sciences* **1987**, *501*, 372-376.
- [132] D. G. Drueckhammer, *FMN reductase catalyzed regeneration of NAD(P) for use in enzymatic synthesis*, *J Org Chem* **1985**, *50*, 5387-5389.
- [133] J.-M. Laval, C. Bourdillon, J. Moiroux, *The electrochemical regeneration of NAD⁺ revisited*, *Biotech Bioeng* **1987**, *30*, 157-159.
- [134] L. Gorton, E. Domínguez, *Electrocatalytic oxidation of NAD(P)H at mediator-modified electrodes*, *Rev Mol Biotechnol* **2002**, *82*, 371-392.
- [135] F. G. Drakesmith, B. Gibson, *A combined electrochemical process for the regeneration of coenzymes*, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1988**, 1493-1494.
- [136] S. B. Saidman, J. B. Bessone, *The influence of electrode material on NAD⁺ oxidation*, *Electrochimica Acta* **2000**, *45*, 3151-3156.
- [137] A. Fassoune, J. M. Laval, J. Moiroux, C. Bourdillon, *Electrochemical regeneration of NAD in a plug-flow reactor*, *Biotech Bioeng* **1990**, *35*, 935-939.
- [138] J. M. Laval, C. Bourdillon, J. Moiroux, *Electrochemical regeneration of NAD⁺. A new evaluation of its actual yield*, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions I* **1988**, *84*, 941-950.
- [139] M. R. Montoya, R. M. Galvín, J. M. R. Mellado, J. D. Mozo, *Mechanistic aspects of the electrochemical oxidation of diethyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-3,5-pyridinedicarboxylate on a glassy carbon electrode*, *Electroanal* **1999**, *11*, 1241-1244.
- [140] A. G. Rosales, M. R. Montoya, R. M. Galvín, J. M. R. Mellado, *Electrochemical oxidation of diethyl 1,4-dihydro-2,4,6-trimethyl-3,5-pyridinedicarboxylate on a glassy carbon electrode as model compound of NADH.*, *Electroanalysis* **1999**, *11*, 32-36.
- [141] C. R. Raj, T. Ohsaka, *Facilitated electrochemical oxidation of NADH and its model compound at gold electrode modified with terminally substituted electroinactive self-assembled monolayers*, *Bioelectrochem* **2001**, *53*, 251-256.
- [142] M. Angulo, R. M. Galvín, M. R. Montoya, J. M. R. Mellado, *Reduction of the pyridine ring of niazid and isoniazid on mercury electrodes. Comparison with other NAD⁺-model compounds.*, *J Electroanal Chem* **1993**, *348*, 303-315.
- [143] N. De Los Santos Álvarez, P. M. Ortea, A. M. Paneda, M. J. L. Castanon, A. J. M. Ordieres, P. T. Blanco, *A comparative study of different adenine derivatives for the electrocatalytic oxidation of β -nicotinamide adenine dinucleotide*, *J Electroanal Chem* **2001**, *502*, 109-117.

- [144] B. Persson, L. Gorton, *A comparative study of some 3,7-diaminophenoxazine derivatives and related compounds for electrocatalytic oxidation of NADH*, J Electroanal Chem **1990**, 292, 115-138.
- [145] J. Komoschinski, E. Steckhan, *Efficient indirect electrochemical in situ regeneration of NAD⁺ and NADP⁺ for enzymatic oxidations using iron bipyridine and phenanthroline complexes as redox catalysts*, Tetrahedron Lett **1988**, 29, 3299-3300.
- [146] S. Itoh, H. Fukushima, M. Komatsu, Y. Ohshiro, *Heterocyclic o-quinones. Mediator for electrochemical oxidation of NADH*, Chem Lett **1992**.
- [147] D. Dicu, L. Muresan, I. C. Popescu, C. Cristea, I. A. Silberg, P. Brooouant, *Modified electrodes with new phenothiazine derivatives electrocatalytic oxidation of NADH*, Electrochimica Acta **2000**, 45, 3951-3957.
- [148] S. B. Saidman, M. J. Lobo-Castanón, A. J. Miranda-Ordieres, P. Tunón-Blanco, *Amperometric detection of D-sorbitol with NAD⁺-D-sorbitol dehydrogenase modified carbon paste electrode*, Analytica Chimica Acta **2000**, 424, 45-50.
- [149] P. N. Bartlett, E. Simon, C. S. Toh, *Modified electrodes for NADH oxidation and dehydrogenase-based biosensors.*, Bioelectrochem **2002**, 56, 117-122.
- [150] J. Heinze, *Cyclovoltammetrie- die "Spektroskopie" des Elektrochemikers*, Angew Chem **1984**, 96, 823-916.
- [151] D. H. Evans, *Voltammetry. Doing chemistry with electrodes*, Acc Chem Res **1977**, 9, 313-319.
- [152] P. T. Kissinger, W. R. Heineman, *Cyclic Voltammetry*, J Chem Ed **1983**, 60, 702-706.
- [153] P. T. Kissinger, D. A. Roston, J. J Van Benschoten, W. R. Heineman, J. Y. Lewis, *Cyclic Voltammetry experiment*, J Chem Ed **1983**, 60, 772_776.
- [154] Jr. D. K. Gosser, *Cyclic voltammetry - simulation and analysis of reaction mechanisms*, VCH Publishers, Inc., New York, USA, **1993**.
- [155] R. Greef, R. Peat, L. M. Peter, D. Pletcher, J. Robinson, *Instrumental methods in electrochemistry*. In *Ellis Horwood Series in Physical Chemistry*; T. J. Kemp Ed., Ellis Horwood Limited: Chichester, England, **1990**
- [156] F. A. Armstrong, G. S. Wilson, *Recent developments in faradaic bioelectrochemistry*, Electrochimica Acta **2000**, 45, 2623-2645.
- [157] R. Antiochia, I. Lavagnini, F. Magno, *A general method for the electrochemical evaluation of the bimolecular rate constant in enzyme catalyzed reaction kinetics*, Electroanal **2001**, 13, 601-602.
- [158] I. Schröder, E. Steckhan, A. Liese, *In situ NAD(P)⁺ regeneration using 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) as an electron transfer mediator*, J Electroanal Chem **2002**, eingereicht.
- [159] K. A. Rubinson, J. Caja, R. W. Hurst, E. Itabashi, T. M. Kenyhercz, W. R. Heineman, H. B. Mark, *The unusual, slow redox properties of Cu, Ni, and Rh cobalamins*, Journal of the Chemical Society, Chemical Communications **1980**, 47-48.
- [160] M. D. Ryan, *The effect of slow two-electron transfers and disproportionation on cyclic voltammograms*, J Electrochem Soc **1978**, 125, 547-555.

- [161] J. Orsini, W. E. Geiger, *Electrochemical characterization of equilibria involving catalyst precursors: cyclic voltammetry of labile organorhodium complexes in coordinating solvents*, *Organometallics* **1999**, *18*, 1854-1861.
- [162] Y.-T. Long, H.-Y. Chen, *Electrochemical regeneration of coenzyme NADH on a histidine modified silver electrode*, *J Electroanal Chem* **1997**, *440*, 239-242.
- [163] A. W. Bott, *The study of multiple electron transfer reactions by cyclic voltammetry*, *Curr Sep* **1997**, *16*, 61-65.
- [164] A. S. N. Murthy, K. S. Reddy, *Cyclic-voltammetric studies of some phenothiazine dyes*, *J Chem Soc, Faraday Trans* **1984**, *80*, 2745-2750.
- [165] J. L. Rodríguez, E. Pastor, *A comparative study on the adsorption of benzyl alcohol, toluene and benzene on platinum*, *Electrochimica Acta* **2000**, *45*, 4279-4289.
- [166] C. De Alwis, J. A. Crayston, T. Cromie, T. Eisenblätter, R. W. Hay, Y. D. Lampeka, L. V. Tsymbal, *Cyclic voltammetry study of the electrocatalysis of carbon dioxide reduction by bis(polyazamacrocyclic) nickel complexes*, *Electrochimica Acta* **2000**, *45*, 2061-2074.
- [167] A. J. Roman, J. M. Sevilla, T. Pineda, M. Blázquez, *A study on maxima and inverted peaks in cyclic voltammetry. Electrochemical reduction of pyridine-4-aldoxime at an HMDE*, *J Electroanal Chem* **2001**, *517*, 15-19.
- [168] L. Greiner, I. Schröder, D. H. Müller, A. Liese, *Utilization of adsorption effects for the continuous reduction of NADP⁺ with molecular hydrogen by Pyrococcus furiosus hydrogenase I*, *Journal of Molecular Catalysis B* **2002**, *eingereicht*.
- [169] P. Gründler, D. Degenring, *Temperature calculation for pulse-heated hot-wire electrodes*, *J Electroanal Chem* **2001**, *512*, 74-82.
- [170] S. Kim, S.-E. Yun, C. Kang, *Electrochemical evaluation of the reaction rate between methyl viologen mediator and diaphorase enzyme for the electrocatalytic reduction of NAD⁺ and digital simulation for its voltammetric responses*, *J Electroanal Chem* **1999**, *465*, 153-159.
- [171] K. Yokoyama, Y. Kayanuma, *Cyclic voltammetric simulation for electrochemically mediated enzyme reaction and determination of enzymatic kinetic constants*, *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 3368-3376.
- [172] M. C. Durrant, S. A. Fairhurst, D. L. Hughes, S. K. Ibrahim, M. Passos, A. Queiros, C. J. Pickett, *Ligand rotamers and redox isomerism: metallo-pseudo-prolines*, *Chem Commun* **1997**, 2379-2380.
- [173] A. W. Bott, S. W. Feldberg, M. Rudolph, *Fitting experimental cyclic voltammetry data with theoretical simulations using DigiSim 2.1*, *Curr Sep* **1996**, *15*, 67-71.
- [174] S. H. Hong, D. H. Evans, S. F. Nelsen, R. F. Ismagilov, *Evidence for a two-step electron-transfer process in the electrode reactions of tetraisopropylhydrazine, tetracyclohexylhydrazine and their radical cation salts*, *J Electroanal Chem* **2000**, *486*, 75-84.
- [175] Z. Rongfeng, D. H. Evans, *The current for a two-electron reaction is not necessarily twice that of a one-electron reaction*, *J Electroanal Chem* **1995**, *385*, 201-207.
- [176] A. W. Bott, *Characterization of chemical reactions coupled to electron transfer reactions using cyclic voltammetry*, *Curr Sep* **1999**, *18*, 9-16.
- [177] A. W. Bott, *Simulation of cyclic voltammetry using finite difference methods*, *Curr Sep* **2000**, *19*, 45-48.

- [178] A. W. Bott, *A comparison of cyclic voltammetry and cyclic staircase voltammetry*, Curr Sep **1997**, 16, 23-26.
- [179] F. Garay, M. Lovric, *Square-wave voltammetry of quasi-reversible electrode processes with coupled homogenous chemical reactions*, J Electroanal Chem **2002**, 518, 91-102.
- [180] A. Neudeck, F. Marken, R. G. Compton, *Complex electron transfer kinetic data from convolution analysis of cyclic voltammograms. Theory and application to diamond electrodes.*, Electroanal **1999**, 11, 1149-1154.
- [181] J. L. Anderson, E. F. Bowden, P. G. Pickup, *Dynamic electrochemistry: methodology and application*, Analytical Chemistry **1996**, 68, 379-444.
- [182] R. Jiang, D. Chu, *Multiple small potential steps at a rotating disk electrode and applications*, Electrochimica Acta **2000**, 45, 4025-4030.
- [183] E. Howard, J. F. Cassidy, J. O'gorman, *Electroanalysis using different pulse methods at a rotating disk electrode*, Electroanalysis **1999**, 11, 577-581.
- [184] H. R. Pershad, J. L. C. Duff, H. A. Heering, E. C. Duin, S. P. J. Albracht, F. A. Armstrong, *Catalytic electron transport in Chromatium vinosum [NiFe]-hydrogenase: Application of voltammetry in detecting redox-active centers and establishing that hydrogen oxidation is very fast even at potentials close to H^+/H_2 value*, Biochem **1999**, 38, 8992-8999.
- [185] A. G. Gehring, J. D. Brewster, P. L. Irwin, S.-I. Tu, L. J. Van Houten, *1-Naphthyl phosphate as an enzymatic substrate for enzyme-linked immunomagnetic electrochemistry*, J Electroanal Chem **1999**, 469, 27-33.
- [186] J. A. Jeevarajan, L. D. Kispert, *Electrochemical oxidation of carotinoids containing donor/acceptor substituents*, J Electroanal Chem **1996**, 411, 57-66.
- [187] B. E. Conway, J. O'm. Bockris, *On the calculation of potential energy profile diagrams for processes in electrolytic metal deposition*, Electrochimica Acta **1961**, 3, 340-366.
- [188] E. Laviron, *Theoretical study of the kinetics of the homogeneous EE electrochemical reaction*, J Electroanal Chem **1983**, 148, 1-16.
- [189] R. S. Nicholson, I. Shain, *Theory of stationary electrode polarography- Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems*, Analytical Chemistry **1964**, 36, 706-723.
- [190] L. Nadjo, J. M. Saveant, *Linear sweep voltammetry: kinetic control by charge transfer and / or secondary chemical reactions.-I. Formal kinetics*, J Electroanal Chem **1973**, 48, 113-145.
- [191] B. Limoges, J. Moiroux, J.-M. Savéant, *Kinetic control by the substrate and the cosubstrate in electrochemically monitored redox enzymatic immobilized systems. Catalytic responses in cyclic voltammetry and steady state techniques*, J Electroanal Chem **2002**, 521, 8-15.
- [192] B. Limoges, J. Moiroux, J.-M. Savéant, *Kinetic control by the substrate and/or the cosubstrate in electrochemically monitored enzymatic homogeneous systems. Catalytic responses in cyclic voltammetry.*, J Electroanal Chem **2002**, 521, 1-7.
- [193] D. Ose, S. T. Eck, T. Suelz, *Chirality from air and electricity*, Journal of Applied Electrochemistry **2002**, 41, 411-415.

- [194] S. Hünig, H. Balli, H. Conrad, A. Schott, *Über zweistufige Redoxsysteme III. 2,2'-Azine aromatischer Heterocyclen und ihre höheren Oxidationsstufen*, Justus Liebigs Ann Chem **1964**, 676, 52-67.
- [195] S. Hünig, H. Balli, H. Conrad, A. Schott, *Über zweistufige Redoxsysteme II. 2,2'-Azine aromatischer Heterocyclen und ihre höheren Oxidationsstufen*, Justus Liebigs Ann Chem **1964**, 676, 36-51.
- [196] K. Staniek, H. Nohl, *H₂O₂ detection from intact mitochondria as a measure for one-electron reduction of dioxygen requires a non-invasive assay system*, Biochim Biophys Acta **1999**, 1413, 70-80.
- [197] J. C. Espín, H. J. Wichers, *Study of the oxidation of resveratrol catalyzed by polyphenol oxidase. Effect of polyphenol oxidase, laccase and peroxidase on the antiradical capacity of resveratrol*, J Food Biochem **2000**, 24, 225-250.
- [198] J. Burfeind, B. Weigel, G. Kretzmer, K. Schügerl, A. Huwig, F. Giffhorn, *Determination of the concentration of higher alcohols with enzyme coupled flow-injection analysis in model system*, Analytica Chimica Acta **1996**, 322, 131-139.
- [199] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*, Free Radical Biology and Medicine **1999**, 26, 1231-1237.
- [200] A. Potthast, T. Rosenau, C. L. Chen, J. S. Gratzl, *A novel method for the conversion of benzyl alcohols to benzaldehydes by laccase-catalyzed oxidation*, J Mol Catal A **1996**, 5-9.
- [201] A. Majcherczyk, C. Johannes, A. Hüttermann, *Oxidation of aromatic alcohols by laccase from Trametes versicolor mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication*, Appl Microbiol Biotechnol **1999**, 51, 267-276.
- [202] E. Fritz-Langhals, J. Freudenreich, N. Hampp, A. Candussio, *Verfahren zur Herstellung von aromatischen und heteroaromatischen Aldehyden und Ketonen*, DE0019723961A1, Consortium für elektrochemische Industrie GmbH, München, **1997**.
- [203] M. -L. Niku-Paavola, L. Viikari, *Enzymatic oxidation of alkenes*, J Mol Cat B: Enzymatic **2000**, 10, 435-444.
- [204] U. Jonas, E. Hammer, E. T. K. Haupt, F. Schauer, *Characterisation of coupling products formed by biotransformation of biphenyl and diphenyl ether by the white rot fungus Pycnoporus cinnabarinus*, Arch Microbiol **2000**, 174, 393-398.
- [205] A. Potthast, T. Rosenau, C.-L. Chen, J. S. Gratzl, *Selective enzymatic oxidation of aromatic methyl groups to aldehydes*, J Org Chem **1995**, 60, 4320-4321.
- [206] Y. Wong, J. Yu, *Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes*, Wat Res **1999**, 33, 3512-3520.
- [207] C.-L. Chen, A. Potthast, T. Rosenau, J. S. Gratzl, A. G. Kirkman, D. Nagai, T. Miyakoshi, *Laccase-catalyzed oxidation of 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-propene using ABTS as mediator*, J Mol Cat B: Enzymatic **2000**, 8, 231-219.
- [208] K. Call, *Enzymatic bleaching system containing new compounds for intensifying enzymatic action*, EP000098334A1, H. P. Call, **1998**.
- [209] P. Schyns, J. König, R. Jürgen, *Enzymatische Methode zum oxidativen Abbau von fluoreszierenden Verbindungen*, DE0019523389A1, Bayer AG, Leverkusen, **1995**.
- [210] N. Durán, E. Esposito, *Potential application of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review*, Appl Catal B: Environ **2000**, 28, 83-99.

- [211] S. L. Liochev, I. Fridovich, *On the role of bicarbonate in peroxidations catalyzed by Cu,Zn superoxide dismutase*, Free Radical Biology and Medicine **1999**, 27, 1444-1447.
- [212] L. Schick-Zapanta, M. Tien, *The role of veratryl alcohol and the oxalate in fungal lignin degradation*, J Biotech **1997**, 53, 93-102.
- [213] N. Deighton, G. McDougall, *Coniferyl alcohol oxidase operates through a bound free-radical intermediate*, Phytochem **1998**, 48, 601-606.
- [214] D. Convents, R. W. P. Van Drunen, C. Verrips, *Enzymatisches Oxidationsverfahren*, DE0069706434T2, Unilever, N.V., Rotterdam, Unilever PLC, London, **1997**.
- [215] W. Antheunisse, R. Hage, J. Hora, A. Swarthoff, S. Twisker, *Verfahren zur Verbesserung der Enzymaktivität*, DE0069802204T2, Unilever N.V., Rotterdam, Unilever PLC, London, **1998**.
- [216] *Forschungszentrum Jülich GmbH - Brennstoffzellen in Jülich*, <http://www.fuel-cell.de>
- [217] S. Hirano, J. Kim, S. Srinivasan, *High performance proton exchange membrane fuel cells with sputter-deposited Pt layer electrodes*, Electrochimica Acta **1997**, 42, 1587-1593.
- [218] J. Fournier, G. Faubert, J. Y. Tilquin, R. Côté, D. Guay, J. P. Dodelet, *High-performance, low Pt content catalysts for the electroreduction of oxygen in polymer-electrolyte fuel cells*, J Electrochem Soc **1997**, 144, 145-154.
- [219] K. T. Kim, Y. G. Kim, J. S. Chung, *Effect of surface roughening on the catalytic activity of Pt-Cr electrocatalysts for the oxygen reduction in phosphoric acid fuel cell*, J Electrochem Soc **1995**, 142, 1531-1538.
- [220] J. P. Collman, M. Marrocco, P. Denisevich, C. Koval, F. C. Anson, *Potent catalysis of the electroreduction of oxygen to water by dicobalt porphyrin dimers adsorbed on graphite electrodes*, J Electroanal Chem **1979**, 101, 117-122.
- [221] J. P. Collman, M. Rapt, M. Broering, L. Raptova, R. Schwenninger, B. Boitrel, L. Fu, M. L'her, *Close structural analogues of the cytochrome c oxidase Fe_a/Cu_B center show clean $4e^-$ electroreduction of O_2 to H_2O at physiological pH*, J Am Chem Soc **1999**, 121, 1387-1388.
- [222] M. R. Tarasevich, A. I. Yaropolov, V. A. Bogdanovskaya, S. D. Varfolomeef, *Electrocatalysis of a cathodic oxygen reduction by laccase*, Bioelectrochemistry and Bioengineering **1979**, 6, 393-403.
- [223] C. W. Lee, H. B. Gray, F. C. Anson, B. G. Malmstrom, *Catalysis of the reduction of dioxygen at graphite electrodes coated with fungal laccase*, J Electroanal Chem **1984**, 172, 289-300.
- [224] A. I. Yaropolov, A. N. Kharybin, J. Emneus, G. Marko-Varga, L. Gorton, *Electrochemical properties of some copper-containing oxidases*, Bioelectrochemistry and Bioengineering **1996**, 40, 49-57.
- [225] T. Ikeda, K. Takagi, H. Tatsumi, K. Kano, *Electrochemical control of hydrogenase action of Desulfovibrio vulgaris (Hildenborough)*, Chem Lett **1997**, 5-6.
- [226] G. Tayhas, R. Palmore, H.-H. Kim, *Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell*, J Electroanal Chem **1999**, 464, 110-117.
- [227] S. Tsujimura, H. Tatsumi, J. Ogawa, S. Shimizu, K. Kano, T. Ikeda, *Bioelectrocatalytic reduction of dioxygen to water at neutral pH using bilirubin oxidase as enzyme and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) as an electron transfer mediator*, J Electroanal Chem **2001**, 496, 69-75.

- [228] U. Baminger, R. Ludwig, C. Galhaup, C. Leitner, K. D. Kulbe, D. Haltrich, *Continuous enzymatic regeneration of redox mediators used in biotransformation reactions employing flavoproteins*, J Mol Cat B: Enzymatic **2001**, 11, 541-550.
- [229] H. Jakob, M. Delgrosso, A. Küver, Verfahren zum Bleichen von Indigo-Jeansstoffen unter Verwendung elektrochemisch oxidierter organischer Verbindungen, DE0019843571A1, Degussa AG, Düsseldorf, **1998**.
- [230] N. Hampp, System zur elektrochemischen Delignifizierung ligninhaltiger Materialien sowie Verfahren zu seiner Anwendung, DE0019723889A1, Consortium für elektrochemische Industrie GmbH, München, **1997**.
- [231] H. Jakob, N. Nimmerfroh, M. Delgrosso, A. Küver, Verfahren zur Delignifizierung und Bleichen von Zellstoffen unter Verwendung elektrochemisch oxidierbarer organischer Verbindungen, DE0019742748A1, Degussa AG, Frankfurt, **1997**.
- [232] *Paper improves by taking more proteins*, Pulp & Paper International online **1996**, 4, http://www.paperloop.com/db_area/archive/ppi_mag/1996/9604/enzyme.htm.
- [233] R. Grant, J. Grant, *Another year brings advances in biotechnology*, Pulp & Paper International online **2000**, 8, http://www.paperloop.com/db_area/archive/ppi_mag/2000/2008/ppi2004.htm.
- [234] T. Dyer, A. J. Ragauskas, *Developments in bleaching technology focus on reducing capital, operating costs*, Pulp & Paper online **2002**, 3, http://www.paperloop.com/db_area/archive/p_p_mag/2002/0003/pulping_bleaching.htm.
- [235] R. Grant, J. Grant, *Biotechnology brings benefits to mills*, Pulp & Paper International online **2001**, 8, http://www.paperloop.com/db_area/archive/ppi_mag/2001/0108/ppi2006.htm.
- [236] P. Maruthamuthu, L. Venkasubramanian, P. Dharmalingam, *A fast kinetic study of formation and decay of 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazole-6-sulfonate) radical cation in aqueous solution*, Bull Chem Soc Jpn **1987**, 60, 113-117.
- [237] R. Bourbonnais, D. Leech, M. G. Paice, *Electrochemical analysis of the interaction of laccase mediators with lignin model compounds*, Biochim Biophys Acta **1998**, 1379, 381-390.
- [238] A. Robles, R. Lucas, G. A. De Cienfuegos, A. Gálvez, *Phenol-oxidase (laccase) activity in strains of the hyphomycete Chalara paradoxa isolated from olive mill wastewater disposal ponds*, Enz Microbiol Tech **2000**, 26, 484-490.
- [239] C. Johannes, A. Majcherczyk, *Laccase activity tests and laccase inhibitors*, J Biotech **2000**, 78, 193-199.
- [240] R. F. H. Dekker, A. M. Barbosa, *The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete Bortryosphaeria sp.*, Enz Microbiol Tech **2001**, 28, 81-88.
- [241] H. B. Ten Brink, H. L. Dekker, H. E. Schoemaker, R. Wever, *Oxidation reactions catalyzed by vanadium chloroperoxidase from Curvularia inaequalis*, J Inorg Biochem **2000**, 80, 91-98.
- [242] C. Aliaga, E. A. Lissi, *Reactions of the radical cation derived from ABTS with amino acids. Kinetics and mechanism*, Can J Chem **2000**, 78, 1052-1059.
- [243] A. M. Campos, E. A. Lissi, *Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) derived radical cations and phenols*, Int J Chem Kinet **1997**, 29, 219-224.

- [244] C. Aliaga, E. A. Lissi, *Reaction of 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ABTS derived radicals with hydroperoxides. Kinetics and mechanism*, Int J Chem Kinet **1998**, 30, 565-570.
- [245] R. S. Nicholson, *Theory and application of cyclic voltammetry for measurement of electrode reaction kinetics*, Analytical Chemistry **1965**, 37, 1351-1355.
- [246] A. D. Ryabov, V. N. Goral, L. Gorton, E. Csöregi, *Electrochemically and catalytically active reconstituted horseradish peroxidase with ferrocene-modified hemin and an artificial binding site*, Chem Eur J **1999**, 5, 961-967.
- [247] W. Kruse, U. Kragl, C. Wandrey, *Verfahren zur kontinuierlichen extraktiven enzymatischen Gewinnung hydrophober Produkte, DE4436149 A1*, Forschungszentrum Jülich GmbH, **1998**.
- [248] W. Kruse, Dissertation: "*Enantioselektive enzymkatalysierte Reduktion von Ketonen im Enzym-Membran-Reaktor mit membrangestützter extraktiver Produktabtrennung- Verfahren zur Produktion chiraler hydrophober Alkohole*", Rheinsche- Friedrich-Wilhelms Universität, **1995**
- [249] S. Rissom, Dissertation: "*Membranverfahren für Redoxenzyme, Gasversorgung, Reaktion, Produktextraktion*", Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, **1999**
- [250] J. Haberland, persönliche Mitteilung, **2001**
- [251] C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *Quantitative analysis of biochemical kinetic resolutions of enantiomers*, J Am Chem Soc **1982**, 104, 7294-7299.
- [252] A. Liese, Dissertation: "*Reaktorkonzepte für Biotransformationen im Zweiphasensystem*", Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, **1998**
- [253] S. Rissom, U. Schwarz-Linek, M. Volgel, V. I. Tishkov, U. Kragl, *Synthesis of chiral ϵ -lactones in a two-enzyme system of cyclohexanone mono-oxygenase and formate dehydrogenase with integrated bubble-free aeration*, Tetrahedron: Asymmetry **1997**, 8, 2523-2526.
- [254] J. J. Sedmark, S. E. Grossberg, *A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Comassie Brilliant Blue G 250*, Anal Biochem **1977**, 79, 544-552.
- [255] W. Madelung, M. E. Oberwegner, *α -Keto-Aldehyde*, Chem Ber **1932**, 65, 931-941.
- [256] G. R. Cebrián, *the synthesis of benzoyl- and naphthoylcarbinol (experimental note)*, An Soc Espan [B] **1948**, 44, 587-592.
- [257] W. J. Bailey, J. Rosenberg, *Cyclic dienes. IX. Synthesis of 1,2-Dimethylene-4-cyclohexene*, J Am Chem Soc **1955**, 77, 73-77.
- [258] F. -J. Marner, L. Jaenicke, *Totalsynthese von Aucanten [trans-4-(trans-1-Propenyl)-5-vinylcyclohexen], einem Inhaltsstoff der Braunalge Cutleria multifida sowie seiner Isomeren*, Chem Ber **1975**, 108, 2202-2211.
- [259] U. Pinkernell, B. Nowack, H. Gallard, U. Von Gunten, *Methods for the photometric determination of reactive bromine and chlorine species with ABTS*, Wat Res **2000**, 34, 4343-4350.
- [260] J. Janata, M. B. Williams, *Oxidation pathways of 2,2'-Benzothiazolinone azines. I. Electrochemistry*, J Phys Chem **1972**, 76, 1178-1183.
- [261] R. Antiochia, I. Lavagnini, F. Magno, *Determination of enzyme kinetic constants for electrochemically mediated enzyme reactions. Application to the Diaphorase-nicotinamide adenin dinucleotide system with p-methylaminophenolsulfate as the electron carrier*, Electroanal **2001**, 13, 582-586.

- [262] D. Pletcher, *A first course in electrode processes*, The Electrochemical Consultancy, Romsey, England, **1991**.
- [263] Z. Galus, *Fundamentals of Electrochemical Analysis*, Ellis Horwood Limited, Chichester, England, **1976**.
- [264] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, Verlag Chemie VCH, Weinheim, **1990**.
- [265] G. Wedler, *Lehrbuch der physikalischen Chemie*, Verlag Chemie VCH, Weinheim, Germany, **1987**.
- [266] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, **1980**.
- [267] Iupac, *Reports on the IUPAC convention on electrochemistry*, Pure and Applied Chemistry **1974**, 37, 503-.
- [268] Iupac, *Reports on the IUPAC convention on electrochemistry*, Pure and Applied Chemistry **1979**, 51, 1159-.
- [269] Iupac, *Reports on the IUPAC convention on electrochemistry*, Electrochimica Acta **1982**, 27, 629-.
- [270] W. Nernst, *Die electromotorische Wirksamkeit der Ionen*, Zeitschrift für Physikalische Chemie **1889**, 4, 129-181.
- [271] W. Nernst, R. Pauli, *Weiteres zur electromotorischen Wirksamkeit der Ionen*, Wied Ann **1892**, 45, 353-359.
- [272] W. Nernst, *Über die Potenzialdifferenz verdünnter Lösungen*, Wied Ann **1892**, 45, 360-369.
- [273] G. Schmeer, Vorlesung: Elektrochemie - Elektrodenreaktionen und Elektrodenprozesse: Universität Regensburg, **2000**
- [274] R. A. Marcus, *Elektronentransferreaktionen in der Chemie-Theorie und Experiment (Nobel-Vortrag)*, Angew Chem **1993**, 105, 1161-1172.
- [275] M. Patz, S. Fukuzumi, *Critical Review-Electron transfer in organic reactions*, Journal of Physical and Organic Chemistry **1997**, 10, 129-137.
- [276] J. K. Kochi, *Elektronen- und Ladungsübertragung: zur Vereinheitlichung der Mechanismen organischer und metallorganischer Reaktionen*, Angew Chem **1988**, 100, 1331-1372.
- [277] K. Gieck, R. Gieck, *Technische Formelsammlung*, 30. ed., Gieck Verlag, Germering, **1995**.
- [278] H. Wendt, G. Kreysa, *Electrochemical Engineering -Science and technology in Chemical and Other Industries*, Springer, Berlin, **1999**.
- [279] F. Létumier, G. Broeker, J.-M. Barbe, R. Guillard, D. Lucas, V. Dahaoui-Gindrey, C. Lecomte, L. Thoiun, C. Amatore, *Dichloro(1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane)manganese(III) chloride: cis-trans isomerization evidenced by infrared and electrochemical studies*, J Chem Soc , Dalton Trans **1998**, 2233-2239.
- [280] E. Potteau, E. Levillain, J.-P. Lelieur, *Mechanism of the electrochemical reduction of sulfur dioxide in non-aqueous solvents*, J Electroanal Chem **1999**, 476, 15-25.
- [281] A. Sevcik, *Oscillographic polarography with periodical triangular voltage*, Coll Czech Chem **1958**, 13, 349-377.
- [282] J. E. B. Randles, *A Cathode ray polarograph. Part II.- The current-voltage curves*, Trans, Faraday Soc **1948**, 44, 327-338.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4064
Juni 2003
ISSN 0944-2952