

Katalytische, milde und selektive Oxyfunktionalisierung von linearen Alkanen: aktuelle Herausforderungen

Mélanie Bordeaux, Anne Galarneau und Jullien Drone*

Biomimetische Katalysatoren · Cytochrome ·
Methanmonooxygenasen · Nachhaltige Chemie

Es besteht eine große Nachfrage nach selektiven Katalysatoren für die nachhaltige Oxidation von Alkanen, denn die in der Umwelt sehr häufig vorkommenden Alkane können dadurch in höherwertige Verbindungen, z. B. Chemikalien oder synthetische Brennstoffe, umgewandelt werden. Für diese – kinetisch gesehen – schwierige Reaktion wurde in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl von chemischen und biologischen Katalysatoren entwickelt, was einen Überblick über das Gebiet erschwert. Dieser Kurzaufsatz gibt zunächst eine Definition des idealen Katalysators für die Alkan-Oxyfunktionalisierung und behandelt dann die heute verfügbaren Katalysatoren, die einem solchen idealen Katalysator am nächsten kommen.

1. Einleitung

Die Alkane sind gesättigte Kohlenwasserstoffe, die aus natürlichen Gas- oder Ölfeldern gewonnen werden können und weithin als chemische Rohmaterialien oder Brennstoffe verwendet werden.^[1] Ethan und Methan, die Hauptbestandteile von Erdgas, werden zum Beispiel hauptsächlich als Brennstoff in Privathaushalten und der Industrie verwendet. Im industriellen Sektor wird Methan, als Mischung mit Kohlendioxid und Wasserstoff, unter harschen Bedingungen in Chemikalien wie Methanol, Essigsäureanhydrid und Essigsäure umgewandelt.^[1] Andere Chemikalien, die aus Methan hergestellt werden, schließen die Chlormethane, Acetylen und Synthesegas ein.^[1] Ein weiteres Beispiel ist Cyclohexan, dessen hauptsächliche Verwendung (zu über 60 %) in der Herstellung von Nylonzwischenprodukten liegt.^[2] Längere Alkane können bei höheren Temperaturen (über 200 °C) gespalten werden, um eine zufällige Mischung von kürzeren Alkanen und Alkenen zu erhalten.^[3] Diese Reaktionen zielen auf die Funktionalisierung von Alkanen zur

Herstellung wichtiger Bausteine oder zur Erzeugung von Energie ab und werden entweder unter harschen Bedingungen durchgeführt oder erzeugen große Mengen Kohlendioxid. Somit sind alternative Methoden für die

Funktionalisierung von Alkanen, und hier besonders für ihre Oxyfunktionalisierung, sehr gefragt.

Die Oxyfunktionalisierung von linearen Alkanen sieht sich mehreren Problemen gegenüber, z. B. bezüglich Reaktivität, Regio- und Chemoselektivität.^[4] Die Trägheit der Alkane wird üblicherweise durch die Tatsache illustriert, dass *n*-Hexan nicht mit kochender Salpetersäure, konzentrierter Schwefelsäure, Kaliumpermanganat oder Chromsäure reagiert.^[1,5] Tatsächlich liegt die Energie einer nichtaktivierten C-H-Bindung bei fast 400 kJ mol⁻¹, und es ist problematisch, einen Katalysator zu finden, der ausreichend aktiv ist, eine solch starke Bindung zu brechen.^[6] In linearen Alkanen weisen die endständigen C-H-Bindungen eine ungefähr 15 kJ mol⁻¹ höhere Energie auf als die an den benachbarten Methylen-Positionen gelegenen.^[7] Wenn der Aktivierungsprozess nicht durch eine Art Substraterkennungsmechanismus gelenkt wird, dann wird die bevorzugte Oxidation durch die Bindungsstärke bestimmt. Daraus folgt, dass es eine noch größere Herausforderung ist, eine selektive terminale Oxidation zu erreichen. Da außerdem die bereits oxidierten Produkte reaktiver als das Startalkan sind, werden oft Mischungen von überoxidierten Verbindungen erhalten.

Wenn man all diese Aspekte in Betracht zieht, dann kann die folgende Definition eines idealen Katalysators für die Alkan-Oxyfunktionalisierung gegeben werden:^[8]

- 1) Er sollte einfach aus preiswerten und erneuerbaren Quellen wie Glucose, Glycerol oder sogar Stärke herstellbar sein.
- 2) Er sollte hohe Umsatzzahlen (turnover numbers, TON) für die sehr selektive Umsetzung von Alkanen zu oxi-

[*] M. Bordeaux, Dr. A. Galarneau, Dr. J. Drone
Institut Charles Gerhardt Montpellier
UMR 5253 CNRS/ENSCM/UM2/UM1
8 rue de l'Ecole Normale, 34296 Montpellier (Frankreich)
E-Mail: jullien.drone@enscm.fr
Dr. J. Drone
Ingénierie des Agropolymères et Technologies Emergentes
UMR 1208 SupAgro/INRA/CIRAD/UM2
2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier (Frankreich)

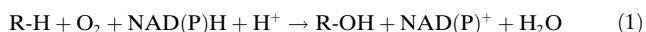
dierten Derivaten (Alkoholen, Aldehyden, Ketonen oder Carbonsäuren) aufweisen; das heißt, die Katalysatorstabilität ist ein wichtiger Punkt.

- 3) Für eine einfache Anwendung sollte der Katalysator unter normalen Temperatur- und Druckbedingungen wirksam sein. Die Aufreinigung der Produkte sollte minimal gehalten werden und die Verwendung von teuren und/oder toxischen Reagentien/Lösungsmitteln vermeiden.
- 4) Es sollte sich um einen atomökonomischen Prozess handeln, der eine minimale Menge an ungiftigem Abfall erzeugt, indem ein Oxidationsmittel wie molekularer Sauerstoff (aus Luft) verwendet wird. In einigen Fällen könnte auch das preisgünstige und umweltverträgliche H_2O_2 als Alternative zu O_2 in Betracht gezogen werden.

In Anlehnung an diese Definition haben Forscher für mehrere Jahrzehnte sowohl chemische als auch enzymatische Strategien verfolgt. Während dieser Untersuchungen wurde wichtiges Wissen gesammelt,^[9] aber es gibt nach wie vor ungelöste Probleme. Auf den folgenden Seiten werden die fortschrittlichsten Katalysatoren präsentiert und mögliche Entwicklungen im Bereich der Alkanhydroxylierung diskutiert.

2. Alkanhydroxylierungssysteme aus der Natur

Alkane sind eine ergiebige Quelle von Kohlenstoffatomen und/oder Energie für eine Vielzahl von prokaryotischen und eukaryotischen Mikroorganismen.^[10,11] Nach ihrem Eintritt in die Zelle durch passive Diffusion durch die Membran(en), verläuft der Metabolismus dieser hydrophoben Substrate normalerweise über einen allgemein bekannten Weg, in dem im ersten Schritt eine enzymatische Hydroxylierung stattfindet. Wenn sie dann in die terminalen oder subterminalen Alkohole (einschließlich terminaler Diole) transformiert worden sind, führt die weitere enzymatische Oxidation zu Carbonsäurederivaten, die in den Fettsäure- β -Oxidationsmetabolismus eintreten, um in der Zelle Energie zu erzeugen. Die enzymatischen Systeme, die an der Alkanhydroxylierung beteiligt sind, sind sehr vielseitig. Aufgrund der jüngsten Entdeckungen ist die Zahl bekannter Systeme gestiegen, und sie wurden regelmäßig in Übersichten abgehandelt.^[11] Ungeachtet der Vielfalt an enzymatischen Gerüsten und Mechanismen (Häm-Eisen-Cytochrom-P450-Enzyme, membrangebundene Nicht-Häm-Eisen-Alkanhydroxylasen (AlkB), lösliche Nicht-Häm-Eisen-Methanmonooxygenasen (sMMO) und membrangebundene kupferhaltige Nicht-Häm-Methanmonooxygenasen (pMMO)) können alle Systeme als Organoubergangsmetallkatalysatoren klassifiziert werden. Als Metalle liegen in diesen Alkanmonooxygenasen ausschließlich Eisen und Kupfer vor. Darüber hinaus haben sie drei Gemeinsamkeiten: Sie verwenden molekularen Disauerstoff aus der Luft als Oxidationsmittel, sie nutzen reduzierte Nicotinamiddinucleotide (NAD(P)H) als Elektronenlieferanten, und sie arbeiten unter milden, physiologischen Bedingungen [Gl. (1)].



Anne Galarneau wurde im Jahr 1967 in Les Sables d'Olonne (Frankreich) geboren und promovierte im Jahr 1993 an der Universität Nantes (Frankreich). Sie schloss sich der Gruppe von Prof. T. Pinnavaia an der University of Michigan (USA) an und ließ sich im Jahr 1995 als CNRS-Forscherin in Montpellier nieder. Ihre Forschungsinteressen schließen die Synthese poröser Silicate und ihre Anwendungen in der Biokatalyse, heterogenen Katalyse und Adsorption ein.



Mélanie Bordeaux wurde im Jahr 1984 geboren. Sie erhielt ihren BS in Biochemie von der Universität Tours und ihren MS in Biochemie und Biotechnologie im Jahr 2007 von der Universität Toulouse. Nach zweijähriger Tätigkeit für ein Biotechnologieunternehmen begann sie 2009 am Institute Charles Gerhardt in Montpellier (Frankreich) mit ihrer Doktorarbeit unter der Leitung von Jullien Drone und Anne Galarneau. Ihre Forschungsinteressen konzentrieren sich auf Protein-Engineering für die enzymatische Katalyse zur Herstellung von Feinchemikalien.



Jullien Drone wurde im Jahr 1979 in Blois (Frankreich) geboren. Er studierte organische Chemie an der Universität Nantes und promovierte im Jahr 2006. Er verbrachte seinen Postdoc bei Prof. Manfred T. Reetz am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim/Ruhr. Im Jahr 2007 nahm er eine Stelle als Assistenzprofessor an der National Graduate School of Chemistry in Montpellier (Frankreich) an. Seine Forschung konzentriert sich auf die P450-Biokatalyse und die Stoffwechselentwicklung für die Terpenbiosynthese in Mikroorganismen.

2.1. Methanmonooxygenasen

Die Methanmonooxygenasen (MMOs) werden in methanotrophen Bakterien gefunden.^[12] In Abhängigkeit von der Kupferkonzentration während der Kultivierung einiger dieser Bakterien können zwei verschiedene Typen von MMOs exprimiert werden.^[13] Die lösliche MMO (sMMO, EC 1.14.13.25), die unter kupferarmen Bedingungen exprimiert wird, besteht aus einem gut charakterisierten carboxylatverbrückten Bis(μ -oxo)dieisen-Aktivitätszentrum^[14] (Abbildung 1). Die partikuläre MMO (pMMO, EC 1.14.18.3), die sonst exprimiert wird, enthält ein Dikupfer-Aktivitätszentrum, über das schon seit langem kontrovers diskutiert wird (Abbildung 2).^[15] Die Substratbandbreite der MMOs reicht von Methan bis Octan, aber sie können auch eine große Zahl anderer hydrophober Moleküle oxidieren.^[16] Diese Enzyme scheinen für In-vitro-Anwendungen sehr vielversprechend zu sein. Wie bereits erwähnt, sollte der ideale Biokatalysator aber einfach herzustellen sein, und es ist ein Problem der MMOs, dass sie aus mehreren Komponenten bestehen, denn die Herstellung solcher rekombinanter und funktionaler

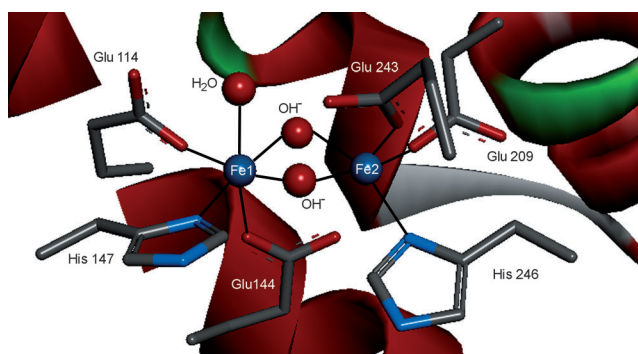


Abbildung 1. Der carboxylatverbrückte Dieisen(III)-Ruhezustand des aktiven Zentrums der löslichen Methanmonooxygenase von *Methylococcus capsulatus* (Bath), die in dem Hydroxylaseprotein MMOH_{ox} (PDB: 1MTY) gefunden wurde.

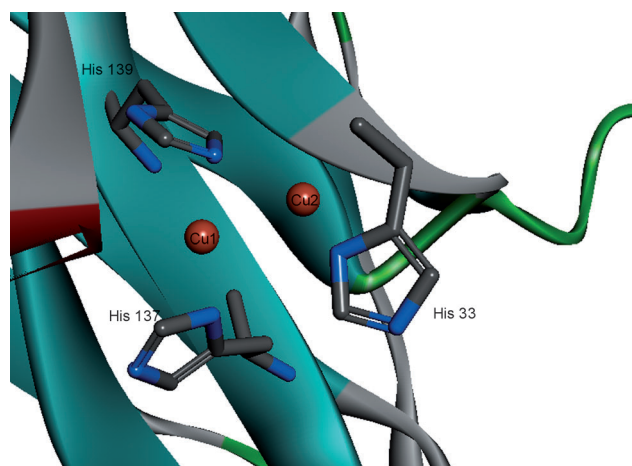


Abbildung 2. Das Dikupfer-Aktivitätszentrum der partikulären Monoxygenase von *M. capsulatus* (PDB: 1YEW).

Systeme ist sehr schwierig.^[17] Darüber hinaus ist pMMO membrangebunden. Wie kürzlich durch verschiedene In-vitro-Studien an diesen Enzymen gezeigt worden ist, bedeutet ein hoher Schwierigkeitsgrad nicht, dass die Aufgabe unlösbar wäre.^[15,18–22] Trotzdem werden In-vitro-Anwendungen durch diese Probleme stark eingeschränkt. Außerdem wurde bereits gezeigt, dass solche Enzyme ziemlich instabil sind und zur Produktinhibierung neigen, was wiederum zu einer dürf-

tigen Produktivität führt^[14] (Tabelle 1, Nr. 1 und 2). Obwohl sie weit vom idealen Katalysator entfernt sind, sind ihre zweikernigen Aktivitätszentren und die zugehörigen Mechanismen^[23,24] seit langer Zeit eine Inspirationsquelle für die Entwickler von chemischen Katalysatoren (siehe Abschnitt 5).^[25]

Tabelle 1: Ausgewählte Katalysatoren für die milde Oxyfunktionalisierung von linearen Alkanen.

Eintrag	Katalysator	Oxidationsmittel	Substrat ^[a]	Produkt (Selektivität)	TON/TOF ^[b]	Lit.
1	sMMO	O ₂	Methan	Methanol (100 %)	n.a. ^[c] /222	[26]
2	pMMO	O ₂	Methan	Methanol (100 %)	18 ^[d] /0.3	[15]
3	AlkB	O ₂	Octan	1-Octanol (100 %)	n.a. ^[c] /207	[27]
4	CYP4B1	O ₂	Heptan	1-Heptanol (96 %)	n.a. ^[c] /33	[28]
5	CYP52 A3	O ₂	Hexadecan	1-Hexadecanol (98 %)	n.a. ^[c] /27	[29]
6	CYP153 A6	O ₂	Octan	1-Octanol (> 95 %)	n.a. ^[c] /60	[30]
7	CYP153 A ^[e]	O ₂	Octan	1-Octanol (91 %)	55/n.a. ^[c]	[31]
8	APO1 AaP	H ₂ O ₂	Butan	1-Butanol (100 %)	1200 ^[d] /n.a. ^[c]	[32]
9	APO1 AaP	H ₂ O ₂	Hexan	1-Hexanol (53 %)	1900 ^[d] /n.a. ^[c]	[32]
10	LadA ^[f]	O ₂	Hexadecan	1-Hexadecanol (100 %)	n.a. ^[c] /4.4	[33]
11	P450 _{PMO} R2	O ₂	Propan	2-Propanol (90 %)	45 800/370	[34]
12	P450 _{PMO} R2	O ₂	Ethan	Ethanol (100 %)	2450/n.a. ^[c]	[35]
13	P450cam ^[g]	O ₂	Propan	2-Propanol (96 %)	n.a. ^[c] /505	[36]
14	P450cam ^[g]	O ₂	Ethan	Ethanol (100 %)	n.a. ^[c] /78	[36]
15	A13-Red	O ₂	Octan	1-Octanol (> 99 %)	410 ^[h] /57	[37]
16	WT BM3 ^[i]	O ₂	Propan	2-Propanol (100 %)	1020/n.a. ^[c]	[38]
17	WT BM3 ^[i]	O ₂	Methan	Methanol (100 %)	2500/n.a. ^[c]	[38]
18	Mn(TDCPP)Cl	H ₂ O ₂	Heptan	ω-1 (64 %), ω-2 (28 %) ^[j]	202 ^[d] /n.a. ^[c]	[39, 40]
19	(FePctBu ₄) ₂ N	H ₂ O ₂	Methan	Ameisensäure (64 %)	29/n.a. ^[c]	[41]
20	Vanadium POM ^[k]	H ₂ O ₂	Hexan	ω-1 (66 %), ω-2 (26 %) ^[l]	22/n.a. ^[c]	[42]
21	MnAlPO-18	O ₂	Hexan	ω (66 %), ω-1 (32 %) ^[m]	149/n.a. ^[c]	[43]
22	Cu-ZSM-5	O ₂	Methan	Methanol (> 98 %)	0.024 ^[d] /n.a. ^[c]	[44]

[a] Die Substrate sind lineare Alkane. [b] TON: Umsatzzahlen (μmol Produkt pro μmol Katalysator), TOF: Umsatzfrequenz (μmol Produkt pro μmol Katalysator pro min). [c] n.a.: keine Angaben. [d] Berechnet nach den Daten, die in der Literatur verfügbar sind. [e] CYP153A von *Polaromonas* sp., Stamm JS666. [f] LadA von *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 mit F146N- und N376I-Mutationen. [g] P450cam, das 9 Mutationen enthält: F87W, Y96F T101L, V247L, L1244M, L294M, T185M, L1358P und G248A. [h] Durch Verwendung eines NADPH-Regenerationssystems und in Gegenwart von Rinder-Katalase erreicht die TON von A13-Red für Octan Werte über 3000 (unveröffentlichte Ergebnisse). [i] Das Wildtyp-P450 BM3 wurde in Gegenwart von CF₃(CF₂)₈CO₂H für Methan bzw. CF₃(CF₂)₉CO₂H für Propan verwendet. [j] ω-1: die Summe von 2-Heptanol und 2-Heptanon, ω-2: die Summe von 3-Heptanol und 3-Heptanon. [k] Das Vanadium-Polyoxometallat [(n-C₄H₉)₄N]₄[γ-HPV₂W₁₀O₄₀]. [l] ω-1: 2-Hexanol, ω-2: 3-Hexanol. [m] ω: die Summe von 1-Hexanol, 1-Hexanal und Hexansäure, ω-1: die Summe von 2-Hexanol und 2-Hexanon.

2.2. Membranintegrierte Nicht-Häm-Dieisen-Alkan- ω -Hydroxylasen

Das Enzym AlkB (EC 1.14.15.3) wurde ursprünglich aus *Pseudomonas putida* GPo1 (*P. oleovorans*) isoliert, einem Bakterium, das in der Lage ist, auf *n*-Octan als einziger Kohlenstoffatom- und Energiequelle zu wachsen.^[45,46] AlkB-verwandte Enzyme können tatsächlich in verschiedenen *n*-Alkan-abbauenden Bakterien, *Alcanivorax*, *Acinetobacter*, *Gordonia* usw., gefunden werden.^[47–54] Sie nutzen einen Di-eisencluster zur regioselektiven Oxidation der terminalen Position von Substraten, die im allgemeinen von Pentan bis zu Dodecan reichen.^[27] Trotz der relativ hohen Umsatzfrequenz (turnover frequency, TOF; Tabelle 1, Nr. 3) sind AlKBs nicht gut für In-vitro-Anwendungen geeignet, weil sie membran-gebunden sind und aus mehreren Komponenten bestehen.^[55–57]

2.3. P450-Enzyme

Die Cytochrome P450 (CYPs) bilden eine Überfamilie von Enzymen, die von den Prokaryoten bis zu den höheren Eukaryoten reicht.^[58,59] Sie katalysieren die Monooxygenierung von C-H-Bindungen einer großen Auswahl von hydrophoben Substraten, z. B. Alkane, Xenobiotika, Steroide oder Prostaglandine.^[60] Die aktiven Zentren von CYPs bestehen

alle aus einem einzelnen Eisenatom, das von einem vierzähligen Porphyrin-N₄-Liganden und einem proximalen Cysteinat komplexiert ist: der prothetischen Häm-Gruppe.^[61] Die Hydroxylierung findet nach dem Häm-Modellmechanismus statt, in dem H vom Substrat (R-H) durch eine reaktive Oxoeisen(IV)-Spezies [(Por⁺)Fe^{IV}=O] abstrahiert wird, die auch als Verbindung I bekannt ist (Abbildung 3).^[60,62–66]

Die selektive Hydroxylierung von Alkanen an der terminalen Methylposition wurde für einige Säugetierleber-P450s beschrieben, einschließlich der Hasenleber-P450 CYP4B1^[28] und der *Candida*-Unterart P450 CYP52A3.^[29] Allerdings sind diese Enzyme, so wie auch AlkB und MMOs, membrangebunden und bestehen aus mehreren Komponenten und ihre katalytische Effizienz ist eher niedrig, was wiederum ihre In-vitro-Anwendungen stark einschränkt (Tabelle 1, Nr. 4 und 5).

Die bahnbrechenden Entdeckungen von Maier,^[67] gefolgt von van Beilen^[68–70] und Witholt und Funhoff^[30] und Mitarbeitern, haben Aufschluss über eine neuartige Familie von monomeren, löslichen (aber aus mehreren Komponenten bestehenden) Proteinen gegeben, die regioselektiv mittelkettige Alkane (Pentan bis Dodecan) zu den entsprechenden primären Alkoholen umsetzen können. Diese Autoren haben eine bedeutende Menge an In-vitro-Daten für mehrere Mitglieder der CYP153-Familie gesammelt (Tabelle 1, Nr. 6). Die Alkanhydroxylasen der CYP153-Familie stehen im Zentrum mehrerer Studien, deren Ziel die Charakterisierung von

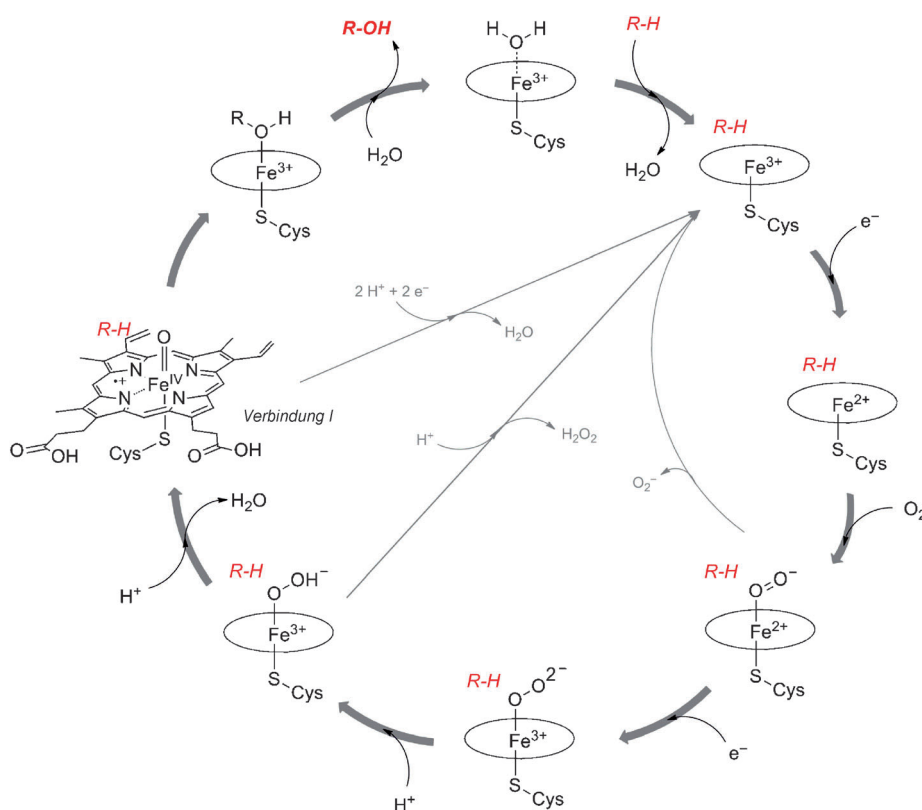


Abbildung 3. Der allgemeine Katalysezyklus des Cytochrom P450 mit der chemischen Formel der katalytisch aktiven Eisen-Häm-Spezies (Verbindung I). Die prothetische Häm-Gruppe wird durch ein Oval dargestellt und die proximalen Cysteinyliganden sind mit CysS abgekürzt.

existierenden oder neuen Mitglieder dieser Familie ist^[31, 71–74] (Tabelle 1, Nr. 7), um ihre Substratbandbreite zu ändern^[75] oder ihre Effizienz für In-vitro-Anwendungen zu verbessern.^[37] Diese neu entdeckte Familie von CYPs ist derzeit die effizienteste für die regioselektive Hydroxylierung der terminalen Position. Weitere Studien dieser Familie sollten sich auf die Auflösung der dreidimensionalen Strukturen konzentrieren, um unser Verständnis der Mechanismen zu verbessern, die auf molekularer Ebene für die hohe Regio- und Chemoselektivität verantwortlich sind.

2.4. Aromatische Peroxygenasen

Vor einigen Jahren wurden zwei neuartige extrazelluläre Pilzperoxidasen in den Blätterpilzen *Agrocybe aegerita* und *Coprinellus radians* entdeckt und als aromatische Peroxygenasen (APO) klassifiziert.^[76–83] Diese H₂O₂-abhängigen Häm-Eisenthioleproteine sind löslich, bestehen aus nur einer Komponente und vereinen die charakteristischen Eigenschaften von CYPs (Sauerstoffübertragung) mit denen der Peroxidasen, wie z.B. der Häm-Chlorperoxidase (CPO) des Schlauchpilzes *Caldariomyces fumago*^[84] (Phenoloxidation, Halogenoxidation usw.). Es wurde im Jahr 2011 gezeigt, dass die *A.-aegerita*-Peroxygenase (AaP) in der Lage ist, Alkane von Propan bis Hexadecan mit H₂O₂ als Oxidationsmittel zu hydroxylieren. Interessanterweise ist die Hydroxylierung von Propan zu 100 % selektiv für 1-Propanol, liefert aber mit höheren Alkanen 2- und 3-Alkohole. Darüber hinaus ist AaP ziemlich stabil in einer großen Zahl verschiedener organischer Lösungsmittel, z.B. Aceton, Dichlormethan oder Hexan.^[32] Bisher scheint dieses Enzym am nächsten an den idealen Biokatalysator für die (sub)terminale Hydroxylierung von kurz- und mittelkettigen Alkanen unter milden Bedingungen heranzureichen. Da das Enzym effizient (Tabelle 1, Nr. 8 und 9), stabil und autark ist und keine reduzierten Nicotinamid-Cofaktoren benötigt, könnte die direkte Anwendung ohne Protein-Engineering einfach umsetzbar sein. Einige Anstrengungen könnten bezüglich der rekombinanten Herstellung von AaP und homologer APOs, sowie bezüglich der Auflösung ihrer 3D-Strukturen unternommen werden.

2.5. Langkettige Alkan-Monooxygenasen

Das lösliche Enzym LadA wurde im Jahr 2007 aus *G. thermodenitrificans* NG80-2 (einem thermophilen Bakterium, das langkettige Alkane verstoffwechselt) isoliert und ermöglicht die selektive, wenn auch langsame Oxidation von C₁₅- bis C₃₆-Alkanen an der terminalen Position (Tabelle 1, Nr. 10) über einen metallfreien Flavoprotein-Monooxygenasemechanismus.^[85–87] Die Kristallstruktur von LadA wurde mit einer Auflösung von 2.7 Å in einem Komplex mit seinem Flavin-Mononucleotid-Cofaktor (FMN-Cofaktor) gelöst und zeigt eine homodimere Organisation, die auf einem (α/β)₈-Fass-Monomer beruht und eine sehr überraschende strukturelle Ähnlichkeit mit den Mitgliedern der bakteriellen Luciferase-Familie aufweist.^[87] Dieser thermostabile Biokatalysator benötigt entweder die reduzierte Form von FMN

(FMNH₂) oder NADPH (beide in stöchiometrischen Mengen), um die Substratoxidation zu ermöglichen.^[33] Somit ist LadA cofaktorabhängig und nicht autark, und Partnerenzyme, die bisher noch nicht identifiziert sind, werden für die FMNH₂- oder NADPH-Versorgung und/oder -regenerierung postuliert. Weitere biochemische Studien an LadA sollten sich auf die Aufklärung des Mechanismus seiner C-H-Bindungsaktivierung ohne Beteiligung eines Metallzentrums konzentrieren.

2.6. Schlussfolgerung zu den natürlichen Alkan-Monooxygenasen

Die enzymatischen Systeme, die sich auf natürliche Art für die Alkanhydroxylierung entwickelt haben, sind sehr spezialisiert und an die Katalyse in Zellen angepasst, wo Cofaktoren effizient durch Partnerreduktasen regeneriert werden können. Die Verwendung von cofaktorabhängigen Wildtyp-Monooxygenasen für In-vitro-Anwendungen ist dadurch stark eingeschränkt. Die Ganzzell-Biokatalyse bietet eine Alternative zu isolierten, zellfreien Systemen, aber die Realisierbarkeit dieser Strategie ist durch die zusätzliche und kostenintensive Aufarbeitung grundlegend eingeschränkt.^[88] Eine Ausnahme von dieser Regel könnte durch die vor kurzem aufgeklärten APOs gegeben sein, aber weitere Studien sind notwendig, um ihre dreidimensionalen Strukturen^[89] zu ermitteln und ihr biokatalytisches Potenzial komplett bewerten zu können. Unter Berücksichtigung dieser Probleme ist die Veränderung natürlicher Alkan-Monooxygenasen auf molekularer Ebene ein vernünftiger Ansatz, um den idealen Katalysator zu finden, wie wir im folgenden Abschnitt näher erläutern werden.

3. Biologische Alkan-Hydroxylierungssysteme – Optimierung durch molekulares Protein-Engineering

Das Protein-Engineering ist ein sehr leistungsfähiges Verfahren für die Biokatalyse. In der Tat bietet sie einen Weg zur Entwicklung von Enzymen mit neuartigen und gezielt einstellbaren Eigenschaften. Mehrere Strategien wurden in den letzten zwei Jahrzehnten entwickelt, und das Protein-Engineering wurde umfangreich in Übersichtsartikeln besprochen.^[90–101] Zusammenfassend können zwei verschiedene Strategien wiedergegeben werden: die zufällige (gerichtete molekulare Evolution) und die rationale Strategie.

In einem Experiment der gerichteten Evolution wird eine Bibliothek von zufällig mutierten Genen erzeugt und auf der Proteinebene auf gewünschte Eigenschaften durchsucht. Mehrere Runden von Randomisierung und Screening werden durchgeführt, wodurch der natürliche Prozess der Darwin'schen Evolution imitiert wird. Bei dieser Strategie ist keine Information bezüglich der Proteinstruktur vonnöten.

Auch die rationale Entwicklung von Enzymen hat sich als eine sehr effiziente Strategie erwiesen. Sie beruht auf Informationen über die dreidimensionale Struktur des Zielproteins. Mutationen werden vollkommen gezielt eingeführt, aber dies erfordert ein gutes Wissen über die Zusammenhänge zwischen Sequenz und Aktivität.

3.1. Die gerichtete Evolution von P450 BM3

Das Cytochrom P450 BM3 ist eine lösliche und aus einer Komponente bestehende Fettsäurehydroxylase, die aus *Bacillus megaterium* (CYP102A1) isoliert wurde. Sie ist das aktivste aller P450-Enzyme, was vermutlich daran liegt, dass die normalerweise getrennten Komponenten (die hydroxylierenden und die Elektronenübertragungseinheiten) in einem einzigen Polypeptid vereinigt sind. Die besondere Architektur erklärt, warum dieses CYP autark ist. BM3 katalysiert die subterminale Hydroxylierung von mittel- bis langkettigen Fettsäuren.^[102,103] Arnold und Mitarbeiter haben beachtliche Anstrengungen unternommen, um mithilfe der molekularen gerichteten Evolution die Spezifität von P450 BM3 bezüglich Fettsäuren auch auf kurzkettige Alkane zu übertragen.^[8,34,104–107] Die am besten entwickelten Varianten enthalten Mutationen in beiden Subdomänen und zeigen eine hohe Aktivität für gasförmige Alkane und endlich auch für Ethan (Tabelle 1, Nr. 11 und 12). Während der Evolution wurden die langen, großen und hydrophoben Trichter, die natürlicherweise für das Andocken von Fettsäuren entwickelt worden sind, zunehmend verkleinert, um eine bessere Wechselwirkung mit sehr kleinen Molekülen zu ermöglichen.^[35] Obwohl sie immer noch NADPH-abhängig sind, sind diese Mutanten von BM3 fast die idealen Biokatalysatoren für die subterminale Alkanhydroxylierung, auch wenn sie überraschend inaktiv gegenüber Methan sind. Es könnte interessant sein, die Kombination der Mutationen der H_2O_2 -abhängigen Mutante 21B3^[108] (NAD(P)H-unabhängig) mit der Häm-Domäne der Propan umsetzenden Mutante 35-E11^[8] oder P450_{PMO}R2^[34] zu untersuchen, um einen autarken Biokatalysator für die Hydroxylierung von Propan mit Wasserstoffperoxid und somit ein Äquivalent zu den APOs zu erhalten.

3.2. Die schrittweise und rationale Entwicklung von P450cam

Das Cytochrom P450cam von *P. putida* (auch bekannt als CYP101) ist ein lösliches Mehrkomponentenenzym, das natürlicherweise Campher oxidiert.^[109–111] Basierend auf der Röntgenkristallstruktur des Enzyms und einiger Mutanten, beschrieben Wong und Mitarbeiter das schrittweise Schrumpfen der großen Campher-Bindungstasche, um durch Ersetzen der ursprünglichen Reste durch größere oder hydrophobere Gruppen die Alkanbindung und -hydroxylierung zu ermöglichen. Diese Publikationsreihe führte im Jahr 2005 zur Beschreibung einer relativ effizienten Ethanhydroxylase (Tabelle 1, Nr. 13 und 14).^[36,112–115] Während diese Varianten grundsätzlich sehr interessant sind, sind sie wahrscheinlich nur schwer für In-vitro-Anwendungen einzusetzen, da P450cam kein natürlich autarkes CYP ist.

3.3. Künstliche P450-Fusionsenzyme

Eine Einschränkung für die Verwendung von CYPs in vitro ist die Beteiligung von Redoxproteinen, die für die Verschiebung von Elektronen von NAD(P)H zur Häm-

Gruppe während des Katalysezyklus notwendig sind.^[116] Inspiriert durch die Architektur des autarken BM3 und ermutigt durch die Realisierbarkeit der künstlichen Fusion zwischen der P450-Hydroxylase und Elektronentransferuntereinheiten,^[72,117–121] haben Drone und Mitarbeiter ein künstliches Einkomponenten-P450 für die regioselektive In-vitro-Hydroxylierung von Alkanen an der terminalen Position unter milden Bedingungen hergestellt, indem sie die sehr gute Regioselektivität einer CYP153-Hydroxylierungseinheit mit der katalytischen Effizienz einer BM3-Struktur kombinierten (Abbildung 4). Besonders interessant an der P450-Einheit

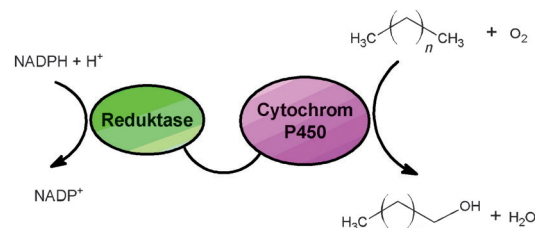


Abbildung 4. Das Prinzip der künstlichen Fusion einer CYP-Domäne (verantwortlich für die Hydroxylierung) und einer Reduktasedomäne (verantwortlich für den Elektronentransfer von NAD(P)H zu CYP), die zu einem autarken CYP führt.

(CYP153A13a aus *Alcanivorax borkumensis* SK2) ist ihre hohe Selektivität für die terminale Hydroxylierung ohne jegliche Überoxidation.^[37] Diese Monooxygenase ist die effizienteste Alkan- ω -Hydroxylase, die bisher beschrieben worden ist (Tabelle 1, Nr. 15) und erweitert die verfügbaren Methoden zur Alkanaktivierung.^[122]

Diese Strategie, die die Konstruktion von autarken Systemen ermöglicht, wurde zur Erzeugung eines funktionalen Dreifachfusionsproteins aus Putida-Redoxreduktase, Putida-Redoxin und Cytochrom P450cam verwendet,^[121] Jahre bevor P450cam in eine Ethanmonooxygenase umgewandelt wurde. Darum ist es überraschend, dass bis heute keine Versuche zur Erzeugung einer ähnlichen Dreifachfusion mit der Propan oder Ethan umsetzenden Mutante beschrieben worden sind. Solche Versuche könnten einen interessanten Biokatalysator hervorbringen.

In Anlehnung an die Strategie mit Baeyer-Villiger-Monooxygenasen,^[123] die von Fraaije und Mitarbeitern entwickelt worden ist, könnten andere Arten von Hybridsystemen, einschließlich der Häm-, der Reduktase- und einer NAD(P)H-Regenerierungsdomäne auf einem einzigen Polypeptid, einen Zugang zu einer neuen Art brauchbarer autarker Alkanhydroxylasen eröffnen.

3.4. Schlussfolgerung zum Protein-Engineering von Alkanhydroxylasen

Wildtyp-Enzymsysteme sind vielseitig und haben sich als bemerkenswerte Plattform für die Entwicklung der idealen Alkanhydroxylierungskatalysatoren unter Verwendung von

Protein-Engineering erwiesen. In-vitro-Anwendungen sind nicht länger durch das Fehlen passender Enzyme eingeschränkt, sondern eher durch die Kosten von NAD(P)H für die Elektronenversorgung.^[124] Dieser Engpass kann durch die Erzeugung von Hybridenzymen umgangen werden, die die Aktivität von mutierten oder Wildtyp-Häm-Domänen (von P450cam, P450 BM3 oder der CYP153-Familie) und die Vorteile der H₂O₂-abhängigen APOs kombinieren. Das wäre ein interessanter Weg, um ideale Enzyme für die Hydroxylierung von C₂- bis C₁₂-Substraten zu erhalten. Basierend auf diesen Hybriden kann das Protein-Engineering wahrscheinlich zukünftig Cofaktor-unabhängige Enzyme bereitstellen, die Aktivität gegenüber Methan zeigen.

4. Die Verwendung von Additiven für die Feineinstellung der CYP-Aktivität

Das „Substrat-Falscherkennungssystem“ ist ein neues Konzept, das im Jahr 2007 zum ersten Mal von Watanabe und Mitarbeitern beschrieben worden ist.^[125–127] Bei dieser Vorgehensweise wird der Biokatalysator durch Ködermoleküle getäuscht, sodass er nichtnatürliche Substrate oxidiert. Zwei unabhängige Gruppen haben kürzlich die effiziente und selektive Hydroxylierung von Alkanen mit dem Wildtyp-P450 BM3 beschrieben, bei der perfluorierte Fettsäuren als Ködermoleküle eingesetzt werden (Tabelle 1, Nr. 16).^[38,128] Die lange, große und hydrophobe Substratbindungstasche wird mit einer inerten perfluorierten Säure mit geeigneter Kettenlänge gefüllt, die ausreichend Platz für das Andocken des Alkansubstrats lässt, das anschließend mit Verbindung I reagiert. Der Hauptunterschied zwischen diesen Studien besteht darin, dass Reetz und Mitarbeiter effizient und selektiv Methan zu Methanol oxidieren^[38] (Tabelle 1, Nr. 17), während Watanabe und Mitarbeiter keine Aktivität für Alkane kleiner als Propan beobachteten.^[128] Das ist bemerkenswerterweise das erste Beispiel einer selektiven Oxidation von Methan, die von einem P450-Enzym katalysiert wird. Sie stellt einen richtigen Durchbruch dar, weil man für viele Jahre der Ansicht war, dass CYPs nicht in der Lage sind, diese Reaktion zu katalysieren. Dieser Unterschied zwischen den beiden Studien rührt wahrscheinlich von den verschiedenen experimentellen Anordnungen her. Tatsächlich hat Reetz einen Hochdruckreaktor (10 bar) und ein NADPH-Recyclingsystem verwendet, während Watanabe die katalytischen Tests in einem alkangesättigten wässrigen Puffer ohne NADPH-Regenerationssystem durchgeführt hat. Somit ist es sehr interessant, auch die Strategie des „Substrat-Falscherkennungssystems“ in Betracht zu ziehen, weil es eine experimentell weniger aufwendige Art darstellt als die gerichtete Evolution, um die Substratbandbreite eines Enzyms zu ändern. Trotzdem wäre eine großtechnische Anwendung problematisch, weil die Anwesenheit von perfluorierten Ködermolekülen am Ende der Reaktion zusätzliche Aufarbeitungsschritte zur Produktreinigung erforderlich macht. Letztlich zeigt der Vergleich dieser beiden Studien, dass die experimentellen Bedingungen für einen großen Unterschied zwischen fast identischen Enzymen sorgen können. Die Verwendung der P450_{PMO}-Mutanten^[34] von P450 BM3 in einem

Druckreaktor (mit oder vielleicht ohne Ködermoleküle) könnte somit für Methan zu unerwarteten Ergebnissen führen.

5. Chemische Katalysatoren für die Alkanhydroxylierung unter milden Bedingungen

Während die Anzahl und Vielfalt von Berichten zu chemischen Katalysatoren für die homogen- oder heterogenkatalysierte Alkanhydroxylierung beträchtlich ist,^[129] können nur wenige von ihnen als ideal betrachtet werden, und es gibt immer noch große Lücken in unserem grundlegenden Verständnis darüber, wie solche Katalysatoren rationell entwickelt werden sollten. Tatsächlich erzeugen alle diese Systeme hochwertige Metall-Oxo-Komplexe, die aktiv genug sind, um mit C-H-Bindungen zu reagieren.^[61,130,131] Vier Kategorien von chemischen Katalysatoren für die Niedertemperatur-Hydroxylierung (unter 60 °C) von Alkanen mit Disauerstoff oder Wasserstoffperoxid als eigentlichem Oxidationsmittel können unterschieden werden: Metalloporphyrine, einkernige Nicht-Häm-Eisenkomplexe, Polyoxometallate und mikroporöse Systeme. Die in diesem Abschnitt besprochenen Beispiele werden bewusst auf die Fälle beschränkt, in denen keine aggressiven und/oder umweltschädlichen Oxidationsmittel^[2] (z. B. K₂Cr₂O₇, CrO₃, KMnO₄, PhIO, Persäuren, Alkylhydroperoxide, OsO₄, SeO₂ oder Oxone) oder besonders teuren Metalle (Au, Pt, Pd, Ru, Ir usw.) verwendet werden.

5.1. Metalloporphyrine: biomimetische Häm-Eisen-Komplexe

Das Verständnis der Mechanismen, die von den CYPs verwendet werden, hat seit vielen Jahren die Entwicklung von biomimetischen Häm-Katalysatoren inspiriert, und Metalloporphyrine sind eine Klasse dieser Katalysatoren.^[130,132] Über verschiedene Generationen von Katalysesystemen hinweg wurde die chemische Stabilität der Porphyringruppe zunehmend verbessert.^[133] Tatsächlich sind die Porphyrinliganden für den oxidativen Selbstabbau anfällig.^[134] Es wurden stabile Eisen- und Manganporphyrine entwickelt, die TONs über 200 erreichen, z. B. *meso*-Tetra(2,6-dichlorphenyl)porphyrin (TDCPP, Abbildung 5); sie verwenden H₂O₂ und sind in der Lage, Alkane zu hydroxylieren. Als Modellreaktionen dien-

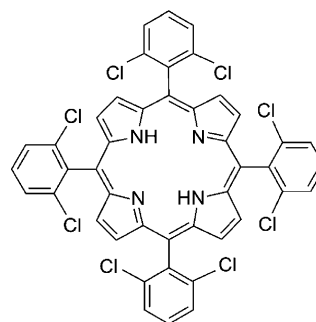


Abbildung 5. Die Struktur des biomimetischen N₄-vierzähligen *meso*-Tetra(2,6-dichlorphenyl)porphyrin oder TDCPP-Liganden.

ten aber keine Umsetzungen von linearen Alkanen, sondern fast ausschließlich die Hydroxylierung von Cyclohexan und Adamantan. Unter milden Bedingungen wurden bescheidene Umsätze von Heptan (11.5% bezogen auf H_2O_2) mit Mn-(TDCPP)Cl und H_2O_2 beschrieben, die Mischungen der 2- und 3-Alkohole und der 2- und 3-Ketone liefern (Tabelle 1, Nr. 18).^[39,40]

Für die nach wie vor herausfordernde Methanoxidation haben Sorokin und Mitarbeitern kürzlich stabile Porphyrin-Zweikernkomplexe beschrieben.^[135] Ihre Katalysatoren sind lösliche N-verbrückte Dieisen-Phtalocyanine (Abbildung 6), die relativ einfach herzustellen sind.^[135–137] Interessanterweise

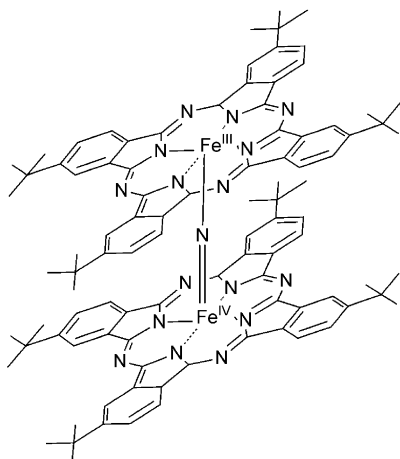


Abbildung 6. Die Struktur des N-verbrückten Dieisen-Phtalocyanins (FePctBu_4)₂N, das von Sorokin für die Methanoxidation unter milden Bedingungen beschrieben wurde.^[41]

vereinigen diese chemischen Katalysatoren den Porphyrin-Charakter der CYP-aktiven Zentren mit dem Dieisen-Charakter des sMMO-Aktivitätszentrums. Die Autoren berichteten über beispiellose katalytische Aktivitäten für die Oxidation von Methan zu Ameisensäure mit hoher Selektivität^[41] (Tabelle 1, Nr. 19) sowie für die Propanoxidation^[138] unter Verwendung von H_2O_2 und unter milden Bedingungen (25–60 °C).

5.2. Biomimetische einkernige Nicht-Häm-Eisenkomplexe

Auf ähnliche Art und Weise wurden nach dem Vorbild der aktiven Zentren von einkernigen Nicht-Häm-Monooxygenasen (z.B. Rieske-Dioxygenasen) Nicht-Häm-Eisenkomplexe entwickelt.^[139,140] Eisen wird entweder mit dem tripodalen vierzähligen N_4 -Liganden Tris(2-pyridylmethyl)amin (TPA)^[134] oder durch das lineare N,N' -Bis(2-pyridylmethyl)- N,N' -dimethyl-1,2-diaminoethan^[141] (BPMEN, Abbildung 7) komplexiert und zur Alkanhydroxylierung in Gegenwart von H_2O_2 bei Raumtemperatur eingesetzt. Zum Beispiel ist Fe^{II} -BPMEN/ H_2O_2 zu 89% chemoselektiv für Cyclohexanol und erreicht 6.3 TONs.^[140,142–144] Für diese Katalysatoren gibt es fast keine Daten zur Oxidation anderer Substrate als Cyclohexan und Adamantan.

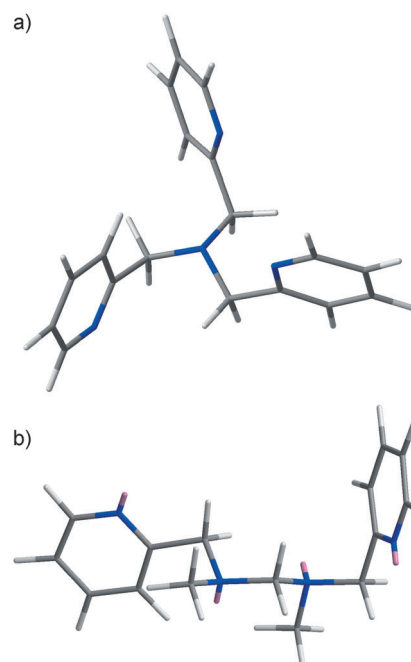


Abbildung 7. Dreidimensionale Darstellung von vierzähligen N_4 -Liganden: a) tripodales TPA und b) lineares BPMEN.

Da die C-H-Bindungsdissoziationsenergie von Cyclohexan mit 99 kcal mol^{-1} ^[145] vergleichbar ist mit der von sekundären C-H-Bindungen in linearen Alkanen,^[146] macht eine Extrapolation der katalytischen Aktivität dieser Substrate trotzdem Sinn.

Die Katalyse mit Fe^{II} -TPA/ H_2O_2 wurde des Weiteren theoretisch untersucht.^[146] Bei der Modellierung der Reaktivität der hochwertigen Eisen-Oxo-Spezies $[\text{HO}-(\text{TPA})\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}]$ mit Propan und Methan nach dem Häm-Mechanismus^[147] ist die berechnete Aktivierungsenergie für die Wasserstoffabspaltung von der primären C-H-Bindung in Methan zu hoch für diesen Katalysator. Dagegen wäre die homolytische Spaltung von sekundären C-H-Bindungen in Propan durch die reaktive Spezies, die zu 2-Propanol führen würde, experimentell machbar.

Eine neuere Arbeit konzentrierte sich auf den Katalysator Fe^{II} -TPA und zielte auf die Verbesserung seiner Selektivität für die terminale Hydroxylierung ab. Die Entwicklung von TPA-Derivaten mit langen n -Alkylketten scheint eine elegante Strategie zu sein, um die hydrophoben Bindungstaschen von Enzymen zu imitieren, da die linearen Alkane erkannt und durch einen nachfolgenden Tunneleffekt in die korrekte Orientierung gebracht werden können. Leider erzeugte keiner dieser Katalysatoren mehr als 10% der oxidierten Produkte.^[148]

5.3. Vanadium-Polyoxometallate

Polyoxometallate (POMs) sind stabile Cluster von frühen Übergangsmetallen und Sauerstoffanionen, die zuerst im Jahr 1826 von Berzelius beschrieben wurden.^[149] Wegen einiger ihrer generellen Eigenschaften, z.B. die Möglichkeit, ein

Übergangsmetall in ihr Gerüst einzuführen, sind POMs eine attraktive Verbindungsklasse für die Katalyse.^[150] Vanadium-POMs sind in der Lage, in Gegenwart von HClO_4 und H_2O_2 stark elektrophile, oxidierende Spezies zu bilden (Abbildung 8, Spezies C).^[151] Diese Eigenschaft wurde kürzlich mit einem Divanadium-substituierten Phosphorwolframatkatalysator

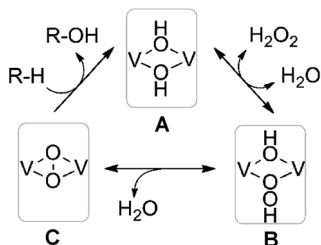


Abbildung 8. Der vorgeschlagene Mechanismus der Alkanhydroxylierung mit H_2O_2 , die von vanadiumdotierten POMs katalysiert wird. In Gegenwart von H^+ und Wasserstoffperoxid wird der Ruhezustand A [Bis(μ -hydroxo)divanadium] zur Spezies B [(μ -Hydroperoxo, μ -hydroxo)divanadium] oxidiert, die weiter zu C ([[(μ - η^2 : η^2 -Peroxo)divanadium]) dehydriert, das für die Oxidation verantwortlich gemacht wird.

lysator für die effiziente, milde und selektive Oxidation von *n*-Propan, *n*-Butan und *n*-Hexan genutzt (Tabelle 1, Nr. 20).^[42,151] Trotz der bescheidenen TONs ist dieser Katalysator sehr chemoselektiv, weil er die erzeugten Alkohole nicht überoxidiert.

5.4. Formselektive Oxidation mit mikroporösen Katalysatoren

Mikroporöse Feststoffe enthalten Käfige und Kanäle von variierender Größe und Form und werden im Allgemeinen als Adsorptionsmittel und Katalysatoren verwendet.^[152–154] Unter bestimmten Bedingungen kann ein Teil der Al^{III} -Gerüstionen von Aluminiumphosphat-Molekularsieb (AIPO) durch andere Metalle ersetzt werden, ohne dass sich die Morphologie merklich ändert.^[155] Es konnte gezeigt werden, dass Mn^{III} -substituiertes AIPO (und hier besonders Mn-Al-PO-18, $\text{Al}_{24}\text{P}_{24}\text{O}_{96}$) mit 3.8 Å großen Poren die terminale Oxidation von *n*-Pentan (39 % Regioselektivität), *n*-Hexan (65 %), *n*-Octan (62 %) und *n*-Dodecan (47 %) mit Luft (oder O_2) als einziger Sauerstoffquelle ermöglicht (Tabelle 1, Nr. 21).^[43,156] In diesem Fall wird die Regioselektivität hauptsächlich durch die Umgebung der terminalen Methylposition innerhalb des Käfiggerüsts bestimmt (Abbildung 9). Somit besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Porengröße der achteckigen Ringe des Katalysators und der Größe des Alkanmoleküls. Es sollte aber erwähnt werden, dass die Chemoselektivität schwierig zu kontrollieren war und überoxidierte Verbindungen erhalten wurden.^[5] Darüber hinaus musste die Umsatzrate unter 10 % gehalten werden, um eine Desaktivierung des Katalysators durch Nebenprodukte zu vermeiden. Diesen Ergebnissen wurde von einer anderen Gruppe widersprochen, die die gleichen Katalysatoren hergestellt und ihre Regioselektivitätsprofile unter den gleichen Bedingungen bestimmt haben. Diese zweite

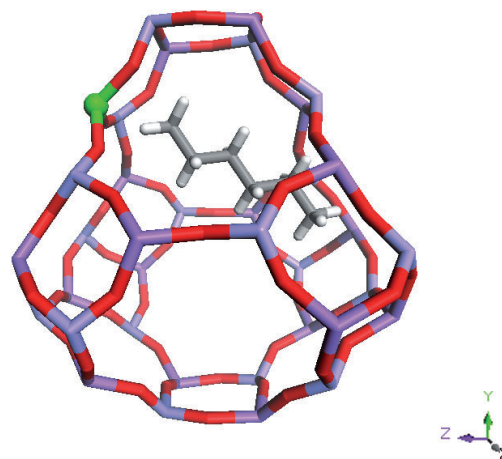


Abbildung 9. Das Andocken von *n*-Hexan an das Mn^{III} -substituierte AIPO-18-Gerüst.

Studie zeigte, dass die terminale Oxidation in ihren Händen in weniger als 5 % zu den Produkten führte, während die ω -1- bzw. ω -2-Oxidation für 28 bzw. 33 % des Umsatzes verantwortlich war.^[7]

Einige Zeolithkatalysatoren wurden für die selektive Methanoxidation zu Methanol beschrieben.^[44] Das Alumosilicat Cu-ZSM-5 ($\text{Si}/\text{Al} = 12$, $\text{Cu}/\text{Al} = 0.58$) wurde mit O_2 aktiviert und dann wurde Methan bei Raumtemperatur durch den Katalysator geleitet und selektiv zu Methanol umgesetzt. Dieser Katalysator wurde auch für Ethan getestet und lieferte eine Ethanol/Acetaldehyd-Mischung im Verhältnis 4:1. Dieselben Autoren beschrieben auch einen Mordenit-Zeolith ($\text{Si}/\text{Al} = 8.8$, $\text{Cu}/\text{Al} = 0.43$), der unter identischen Bedingungen äquivalente Mengen Methanol pro Gramm Katalysator lieferte. Es wurde angenommen, dass beide Katalysatoren die passende Architektur haben, um durch Imitation des Bis(μ -oxo)dieisen-sMMO-Aktivitätszentrums die Bildung eines Bis(μ -oxo)dikupfer-Kerns zu ermöglichen. Dessen ungeachtet wurde vor kurzem eine gebogene Mono(μ -oxo)dikupfer-Verbindung ($[\text{Cu}_2\text{O}]^{2+}$ oder $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-O-Cu}^{\text{II}}$) überzeugend als die entscheidende Spezies für die C-H-Bindungsspaltung nachgewiesen.^[157] Auch wenn diese Systeme nicht katalytisch wirken (TON unter eins, Tabelle 1, Nr. 22), brachten sie doch beachtliche Erkenntnisse über die Mechanismen der kupferbasierten Methanaktivierung.

5.5. Schlussfolgerung zu chemischen Katalysatoren

Die Entwicklung von biomimetischen/bioinspirierten chemischen Katalysatoren für die Alkanhydroxylierung hat unser Verständnis der Alkanmonooxygenasen verbessert. Es zeigte sich, dass es wichtig ist, diese komplementären Ansätze zu verbinden, statt zu versuchen, einen von ihnen attraktiver als den anderen zu gestalten. Die chemischen Katalysatoren sind entweder regioselektiv oder chemoselektiv, aber beide Eigenschaften können beispielsweise nicht im gleichen Katalysator gefunden werden. Interessanterweise wurde das Problem der direkten, milden und selektiven Aktivierung von Methan, die die schwierigste Reaktion ist, mit den chemi-

schen Katalysatoren so gut wie gelöst, während die selektive Umsetzung von längeren Alkanen immer noch problematisch ist. Letztlich bleibt die Entwicklung von Methoden für die selektive Oxidation von Alkanen mit O₂ immer noch eine der größten Herausforderungen.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Natur verwendet und entwickelt metallorganische Alkanmonooxygenasen seit mindestens mehreren hundert Millionen Jahren^[158,159] und ermöglicht es spezialisierten Bakterien, unabhängig von der Photosynthese zu wachsen, z. B. durch Ernährung mit Methan in der Nähe von Erdgasausströmungen und hydrothermalen Öffnungen in Ozeanen.^[12] Obwohl membrangebundene und/oder Mehrkomponentenenzyme eindeutig nicht die richtige Wahl für die Entwicklung des idealen Katalysators sind, wurden intensive Bemühungen hinsichtlich der Entdeckung und/oder Entwicklung von löslichen und Einkomponentenenzymen für die C(sp³)-H-Bindungsaktivierung unternommen. Einige von ihnen erfüllen fast alle Kriterien der Idealität. Andererseits werden chemische Katalysatoren immer noch untersucht, entwickelt und charakterisiert. Noch heute können nur wenige von ihnen als den Prinzipien der „grünen“ Chemie genügend betrachtet werden, und es gibt noch viel zu tun, bevor dieses Endziel erreicht ist. Der Vergleich zwischen chemischen und enzymatischen Katalysatoren für die Alkan-Oxyfunktionalisierung ist eine sehr praktische Strategie, um einen Einblick in die grundlegenden Mechanismen dieser Chemie zu gewinnen. Sie hilft bei der Entwicklung von neuartigen Katalysatoren, die in der Lage sind, die Herausforderungen eines nachhaltigen Oxidationsprozesses anzugehen.^[2,160] Es ist wahrscheinlich, dass die effiziente, milde und chemoselektive Oxidation von Methan in den nächsten Jahren zum ersten Mal mit chemischen Katalysatoren erreicht werden kann. Die regioselektive Oxyfunktionalisierung von längeren Alkanen wird nicht ohne den Rahmen einer Substratbindungstasche möglich sein, die sowohl die Erkennung als auch die Orientierung der Alkane kontrolliert. Lösliche und H₂O₂-abhängige Einkomponenten-Biokatalysatoren werden eine wichtige Rolle in diesen Umsetzungen spielen, und es besteht eine große Chance, dass solche Biokatalysatoren auf dem APO/CYP-Gerüst basieren werden. Neben dem Biokatalysatordesign sollten auch verschiedene praktische Probleme gelöst werden, z. B. schlechte Substratlöslichkeit, eingeschränkter Sauerstofftransport und Produktinhibierung. Wie es schon in Übersichten erklärt worden ist,^[58,161–166] wird die Optimierung der Reaktionsparameter zur Verbesserung der Produktivität, Ausbeute und somit ökonomischer Realisierbarkeit führen, sodass industrielle präparative Umsetzungen auf Basis dieser Enzyme möglich werden.

Die Arbeit an den CYP153-Fusionsproteinen wurde durch das Ministère de l'Éducation nationale, den CNRS, die l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier (ENSCM) und die Université Montpellier 2 gefördert. Wir danken E. Du-

breucq, A.-H. Jan und M. Subileau für fruchtbare Diskussionen und das Korrekturlesen des Manuskriptes.

Eingegangen am 28. April 2012

Online veröffentlicht am 20. September 2012

Übersetzt von Dr. Juliane Keilitz, Toronto

- [1] H. Arakawa, M. Aresta, J. N. Armor, M. A. Barteau, E. J. Beckman, A. T. Bell, J. E. Bercaw, C. Creutz, E. Dinjus, D. A. Dixon, et al., *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 953–996.
- [2] J. M. Thomas, R. Raja, *Catal. Today* **2006**, *117*, 22–31.
- [3] K. P. de Jong, J. Zečević, H. Friedrich, P. E. de Jongh, M. Bulut, S. van Donk, R. Kenmogne, A. Finiels, V. Hulea, F. Fajula, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 10272–10276; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 10074–10078.
- [4] R. H. Crabtree, *Dalton Trans.* **2001**, 2437–2450.
- [5] R. Raja, G. Sankar, J. M. Thomas, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2403–2406; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2313–2316.
- [6] A. E. Shilov, G. B. Shul'pin, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2879–2932.
- [7] B. Modén, B.-Z. Zhan, J. Dakka, J. G. Santiesteban, E. Iglesia, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 1402–1411.
- [8] P. Meinhold, M. W. Peters, M. M. Y. Chen, K. Takahashi, F. H. Arnold, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1765–1768.
- [9] J. A. Labinger, J. E. Bercaw, *Nature* **2002**, *417*, 507–514.
- [10] J. B. Van Beilen, Z. Li, W. A. Duetz, T. H. M. Smits, B. Witholt, *Oil Gas Sci. Technol.* **2003**, *58*, 427–440.
- [11] J. B. van Beilen, E. G. Funhoff, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 308–314.
- [12] R. S. Hanson, T. E. Hanson, *Microbiol. Rev.* **1996**, *60*, 439–471.
- [13] J. C. Murrell, I. R. McDonald, B. Gilbert, *Trends Microbiol.* **2000**, *8*, 221–225.
- [14] M. Merckx, D. A. Kopp, M. H. Sazinsky, J. L. Blazyk, J. Müller, S. J. Lippard, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2860–2888; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2782–2807.
- [15] R. Balasubramanian, S. M. Smith, S. Rawat, L. A. Yatsunyk, T. L. Stemmler, A. C. Rosenzweig, *Nature* **2010**, *465*, 115–119.
- [16] J. Green, H. Dalton, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 17698–17703.
- [17] J. Colby, H. Dalton, *Biochem. J.* **1978**, *171*, 461–468.
- [18] S. M. Smith, S. Rawat, J. Telsner, B. M. Hoffman, T. L. Stemmler, A. C. Rosenzweig, *Biochemistry* **2011**, *50*, 10231–10240.
- [19] R. L. Lieberman, D. B. Shrestha, P. E. Doan, B. M. Hoffman, T. L. Stemmler, A. C. Rosenzweig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3820–3825.
- [20] A. Kitmitto, N. Myronova, P. Basu, H. Dalton, *Biochemistry* **2005**, *44*, 10954–10965.
- [21] J. S. Lloyd, P. De Marco, H. Dalton, J. C. Murrell, *Arch. Microbiol.* **1999**, *171*, 364–370.
- [22] R. L. Lieberman, A. C. Rosenzweig, *Nature* **2005**, *434*, 177–182.
- [23] S. J. Lippard, *Philos. Trans. R. Soc.* **2005**, *363*, 861–877.
- [24] J. D. Lipscomb, B. J. Brazeau, B. J. Wallar, *Int. Congr. Ser.* **2002**, *1233*, 205–212.
- [25] E. Y. Tshuva, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 987–1012.
- [26] B. G. Fox, W. A. Froland, D. R. Jollie, J. D. Lipscomb, *Methods Enzymol.* **1990**, *188*, 191–202.
- [27] J. Shanklin, C. Achim, H. Schmidt, B. G. Fox, E. Münck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 2981–2986.
- [28] M. B. Fisher, Y.-M. Zheng, A. E. Rettie, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *248*, 352–355.
- [29] U. Scheller, T. Zimmer, D. Becher, F. Schauer, W.-H. Schunck, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32528–32534.
- [30] E. G. Funhoff, J. Salzmann, U. Bauer, B. Witholt, J. B. van Beilen, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 806–812.
- [31] D. Scheps, S. Honda Malca, H. Hoffmann, B. M. Nestl, B. Hauer, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 6727–6733.

- [32] S. Peter, M. Kinne, X. Wang, R. Ullrich, G. Kayser, J. T. Groves, M. Hofrichter, *FEBS J.* **2011**, 278, 3667–3675.
- [33] Y. Dong, J. Yan, H. Du, M. Chen, T. Ma, L. Feng, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 94, 1019–1029.
- [34] R. Fasan, M. M. Chen, N. C. Crook, F. H. Arnold, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 8566–8570; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 8414–8418.
- [35] R. Fasan, Y. T. Meharenn, C. D. Snow, T. L. Poulos, F. H. Arnold, *J. Mol. Biol.* **2008**, 383, 1069–1080.
- [36] F. Xu, S. G. Bell, J. Lednik, A. Insley, Z. Rao, L.-L. Wong, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 4097–4100; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 4029–4032.
- [37] M. Bordeaux, A. Galarneau, F. Fajula, J. Drone, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 2123–2127; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 2075–2079.
- [38] F. E. Zilly, J. P. Acevedo, W. Augustyniak, A. Deege, U. W. Häusig, M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 2772–2776; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 2720–2724.
- [39] P. Battioni, J. P. Renaud, J. F. Bartoli, M. Reina-Artiles, M. Fort, D. Mansuy, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 8462–8470.
- [40] A. Thellend, P. Battioni, D. Mansuy, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1035.
- [41] A. B. Sorokin, E. V. Kudrik, L. X. Alvarez, P. Afanasiev, J. M. M. Millet, D. Bouchu, *Catal. Today* **2010**, 157, 149–154.
- [42] K. Kamata, K. Yonehara, Y. Nakagawa, K. Uehara, N. Mizuno, *Nat. Chem.* **2010**, 2, 478–483.
- [43] J. M. Thomas, R. Raja, G. Sankar, R. G. Bell, *Nature* **1999**, 398, 227–230.
- [44] M. H. Groothaert, P. J. Smeets, B. F. Sels, P. A. Jacobs, R. A. Schoonheydt, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1394–1395.
- [45] I. E. Staijen, V. Hatzimanikatis, B. Witholt, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 244, 462–470.
- [46] J. N. Baptist, R. K. Gholson, M. J. Coon, *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, 69, 40–47.
- [47] A. Tani, T. Ishige, Y. Sakai, N. Kato, *J. Bacteriol.* **2001**, 183, 1819–1823.
- [48] L. G. Whyte, T. H. M. Smits, D. Labbe, B. Witholt, C. W. Greer, J. B. van Beilen, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, 68, 5933–5942.
- [49] M. M. Marín, L. Yuste, F. Rojo, *J. Bacteriol.* **2003**, 185, 3232–3237.
- [50] J. B. van Beilen, T. H. M. Smits, L. G. Whyte, S. Schorcht, M. Röthlisberger, T. Plaggemeier, K.-H. Engesser, B. Witholt, *Environ. Microbiol.* **2002**, 4, 676–682.
- [51] J. B. van Beilen, M. M. Marín, T. H. M. Smits, M. Rothlisberger, A. G. Franchini, B. Witholt, F. Rojo, *Environ. Microbiol.* **2004**, 6, 264–273.
- [52] T. Fujii, T. Narikawa, K. Takeda, J. Kato, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, 68, 2171–2177.
- [53] M. Throne-Holst, S. Markussen, A. Winnberg, T. E. Ellingsen, H.-K. Kotlar, S. B. Zotchev, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 72, 353–360.
- [54] K. Kloos, J. C. Munch, M. Schlöter, *J. Microbiol. Methods* **2006**, 66, 486–496.
- [55] I. E. Staijen, J. B. van Beilen, B. Witholt, *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 1957–1965.
- [56] Lit. [45].
- [57] G. Eggink, R. G. Lageveen, B. Altenburg, B. Witholt, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 17712–17718.
- [58] R. Bernhardt, *J. Biotechnol.* **2006**, 124, 128–145.
- [59] G. Grogan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 15, 241–248.
- [60] M. Sono, M. P. Roach, E. D. Coulter, J. H. Dawson, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2841–2888.
- [61] B. Meunier, S. P. de Visser, S. Shaik, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 3947–3980.
- [62] J. T. Groves, *J. Chem. Educ.* **1985**, 62, 928–931.
- [63] F. Ogliaro, N. Harris, S. Cohen, M. Filatov, S. P. de Visser, S. Shaik, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8977–8989.
- [64] J. Rittle, M. T. Green, *Science* **2010**, 330, 933–937.
- [65] S. Shaik, W. Lai, H. Chen, Y. Wang, *Acc. Chem. Res.* **2010**, 43, 1154–1165.
- [66] S. Shaik, S. Cohen, Y. Wang, H. Chen, D. Kumar, W. Thiel, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 949–1017.
- [67] T. Maier, H. H. Förster, O. Asperger, U. Hahn, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 286, 652–658.
- [68] E. G. Funhoff, U. Bauer, I. García-Rubio, B. Witholt, J. B. van Beilen, *J. Bacteriol.* **2006**, 188, 5220–5227.
- [69] J. B. van Beilen, E. G. Funhoff, A. V. Loon, A. Just, L. Kaysser, M. Bouza, M. Ro, Z. Li, B. Witholt, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72, 59–65.
- [70] J. B. van Beilen, D. Lu, U. Bauer, B. Witholt, W. A. Duetz, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, 71, 1737–1744.
- [71] R. Zhou, C. Huang, A. Zhang, S. G. Bell, W. Zhou, L.-L. Wong, *Acta Crystallogr. Sect. F* **2011**, 67, 964–967.
- [72] M. Kubota, M. Nodate, M. Yasumoto-Hirose, T. Uchiyama, O. Kagami, Y. Shizuri, N. Misawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, 69, 2421–2430.
- [73] S. G. Bell, L.-L. Wong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, 360, 666–672.
- [74] R. N. Austin, D. Deng, Y. Jiang, K. Luddy, J. B. van Beilen, P. R. Ortiz de Montellano, J. T. Groves, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 8372–8374; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 8192–8194.
- [75] D. J. Koch, M. M. Chen, J. B. van Beilen, F. H. Arnold, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 75, 337–344.
- [76] D. H. Anh, R. Ullrich, D. Benndorf, A. Svatos, A. Muck, M. Hofrichter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 73, 5477–5485.
- [77] E. Aranda, M. Kinne, M. Kluge, R. Ullrich, M. Hofrichter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 82, 1057–1066.
- [78] M. Hofrichter, R. Ullrich, M. J. Pecyna, C. Liers, T. Lundell, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 87, 871–897.
- [79] M. Kinne, M. Poraj-Kobielska, S. A. Ralph, R. Ullrich, M. Hofrichter, K. E. Hammel, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 29343–29349.
- [80] M. J. Pecyna, R. Ullrich, B. Bittner, A. Clemens, K. Scheibner, R. Schubert, M. Hofrichter, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 84, 885–897.
- [81] R. Ullrich, J. Nüsse, K. Scheibner, J. Spantzel, M. Hofrichter, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70, 4575–4581.
- [82] R. Ullrich, M. Hofrichter, *FEBS Lett.* **2005**, 579, 6247–6250.
- [83] R. Ullrich, C. Liers, S. Schimpke, M. Hofrichter, *Biotechnol. J.* **2009**, 4, 1619–1626.
- [84] D. R. Morris, L. P. Hager, *J. Biol. Chem.* **1966**, 241, 1763–1768.
- [85] L. Wang, Y. Tang, S. Wang, R.-L. Liu, M.-Z. Liu, Y. Zhang, F.-L. Liang, *Extremophiles* **2006**, 10, 347–356.
- [86] L. Feng, W. Wang, J. Cheng, Y. Ren, G. Zhao, C. Gao, Y. Tang, X. Liu, W. Han, X. Peng, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 5602–5607.
- [87] L. Li, X. Liu, W. Yang, F. Xu, W. Wang, L. Feng, M. Bartlam, L. Wang, Z. Rao, *J. Mol. Biol.* **2008**, 376, 453–465.
- [88] R. Mathys, A. Schmid, B. Witholt, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, 64, 459–477.
- [89] K. Piontek, R. Ullrich, C. Liers, K. Diederichs, D. A. Plattner, M. Hofrichter, *Acta Crystallogr. Sect. F* **2010**, 66, 693–698.
- [90] P. A. Dalby, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, 21, 473–480.
- [91] E. M. Brustad, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 15, 201–210.
- [92] M. T. Reetz, J. D. Carballeira, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 891–903.
- [93] T. W. Johannes, H. Zhao, *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, 9, 261–267.
- [94] V. G. H. Eijssink, S. Gåseidnes, T. V. Borchert, B. van den Burg, *Biomol. Eng.* **2005**, 22, 21–30.
- [95] E. G. Hibbert, F. Baganz, H. C. Hailes, J. M. Ward, G. J. Lye, J. M. Woodley, P. A. Dalby, *Biomol. Eng.* **2005**, 22, 11–19.

- [96] B. Höcker, *Biomol. Eng.* **2005**, *22*, 31–38.
- [97] J.-L. Jestin, S. Vichier-Guerre, *Res. Microbiol.* **2005**, *156*, 961–969.
- [98] N. E. Labrou, *Biomol. Eng.* **2005**, *22*, vii–ix.
- [99] L. G. Otten, W. J. Quax, *Biomol. Eng.* **2005**, *22*, 1–9.
- [100] C. Roodveldt, A. Aharoni, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 50–56.
- [101] L. Yuan, I. Kurek, J. English, R. Keenan, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2005**, *69*, 373–392.
- [102] L. O. Narhi, A. J. Fulco, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 6683–6690.
- [103] L. O. Narhi, A. J. Fulco, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 7160–7169.
- [104] E. T. Farinas, U. Schwaneberg, A. Glieder, F. H. Arnold, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 601–606.
- [105] A. Glieder, E. T. Farinas, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1135–1139.
- [106] M. W. Peters, P. Meinhold, A. Glieder, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13442–13443.
- [107] P. Meinhold, M. W. Peters, A. Hartwick, A. R. Hernandez, F. H. Arnold, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 763–772.
- [108] P. C. Cirino, F. H. Arnold, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3421–3423; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3299–3301.
- [109] M. Haniu, K. T. Yasunobus, I. C. Gunsalus, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 12657–12663.
- [110] M. Haniu, L. G. Armes, C. Gunsalus, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 12664–12671.
- [111] B. P. Unger, I. C. Gunsalus, S. G. Sligar, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 1158–1163.
- [112] J.-A. Stevenson, A. C. G. Westlake, C. Whittcock, L.-L. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12846–12847.
- [113] J.-A. Stevenson, J. K. Bearpark, L.-L. Wong, *New J. Chem.* **1998**, *22*, 551–552.
- [114] S. G. Bell, J.-A. Stevenson, H. D. Boyd, S. Campbell, A. D. Riddle, E. L. Orton, L.-L. Wong, *Chem. Commun.* **2002**, 490–491.
- [115] S. G. Bell, E. Orton, H. Boyd, J.-A. Stevenson, A. Riddle, S. Campbell, L.-L. Wong, *Dalton Trans.* **2003**, 2133–2140.
- [116] A. W. Munro, H. M. Girvan, K. J. McLean, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2007**, *1770*, 345–359.
- [117] M. Nodate, M. Kubota, N. Misawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *71*, 455–462.
- [118] M. S. Shet, C. W. Fisher, P. L. Holmans, R. W. Estabrook, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 11748–11752.
- [119] S. Li, L. M. Podust, D. H. Sherman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12940–12941.
- [120] S. Fuziwar, I. Sagami, E. Rozhkova, D. Craig, M. A. Noble, A. W. Munro, S. K. Chapman, T. Shimizu, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 515–526.
- [121] O. Sibbesen, J. J. D. Voss, P. R. Ortiz de Montellano, *Biochemistry* **1996**, *271*, 22462–22469.
- [122] Lit. [11].
- [123] D. E. Torres Pazmiño, R. Snajdrova, B.-J. Baas, M. Ghobrial, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2307–2310; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2275–2278.
- [124] V. B. Urlacher, M. Girhard, *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 26–36.
- [125] D.-S. Lee, A. Yamada, H. Sugimoto, I. Matsunaga, H. Ogura, K. Ichihara, S.-I. Adachi, S.-Y. Park, Y. Shiro, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 9761–9767.
- [126] I. Matsunaga, T. Sumimoto, M. Ayata, H. Ogura, *FEBS Lett.* **2002**, *528*, 90–94.
- [127] O. Shoji, T. Fujishiro, H. Nakajima, M. Kim, S. Nagano, Y. Shiro, Y. Watanabe, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3730–3733; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3656–3659.
- [128] N. Kawakami, O. Shoji, Y. Watanabe, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5427–5430; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5315–5318.
- [129] M. V. Kirillova, A. M. Kirillov, P. M. Reis, J. A. L. Silva, J. J. R. Frausto da Silva, A. J. L. Pombeiro, *J. Catal.* **2007**, *248*, 130–136.
- [130] D. Mansuy, *C. R. Chim.* **2007**, *10*, 392–413.
- [131] J. T. Groves, *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 434–447.
- [132] M. Costas, *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2912–2932.
- [133] J. T. Groves, P. R. Ortiz de Montellano, *Chem. Rev.* **2005**, *110*, 949–1017.
- [134] C. Kim, K. Chen, J. Kim, L. J. Que, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5964–5965.
- [135] A. B. Sorokin, E. V. Kudrik, D. Bouchu, *Chem. Commun.* **2008**, 2562–2564.
- [136] D. A. Summerville, I. A. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1747–1752.
- [137] L. A. Bottomley, J. N. Gorce, V. L. Goedken, C. Ercolani, *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 3733–3737.
- [138] A. B. Sorokin, E. V. Kudrik, *Catal. Today* **2011**, *159*, 37–46.
- [139] M. M. Abu-Omar, A. Loaiza, N. Hontzeas, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2227–2252.
- [140] M. Costas, K. Chen, L. J. Que, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *200*, 202–202, 517–544.
- [141] K. Chen, L. J. Que, *Chem. Commun.* **1999**, 1375–1376.
- [142] Y. Mekmouche, C. Toia-Duboc, M. Fontecave, J.-B. Galey, C. Lebrun, J. Pe, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 975–978; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 949–952.
- [143] G. J. P. Britovsek, J. England, A. J. P. White, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 8125–8134.
- [144] K. Chen, L. J. Que, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6327–6337.
- [145] J. Kaizer, E. J. Klinker, N. Y. Oh, J.-U. Rohde, W. J. Song, A. Stubna, J. Kim, E. Münck, W. Nam, L. Que, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 472–473.
- [146] A. Bassan, M. R. A. Blomberg, P. E. M. Siegbahn, L. Que, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 692–705.
- [147] A. Company, L. Gómez, M. Güell, X. Ribas, J. M. Luis, L. Que, M. Costas, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15766–15767.
- [148] G. Guisado-Barrios, A. Slawin, D. Richens, *J. Coord. Chem.* **2010**, *63*, 2642–2658.
- [149] C. L. Hill, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1–2.
- [150] Themenheft über Polyoxometallate: *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1–390.
- [151] N. Mizuno, K. Kamata, K. Yamaguchi, *Catal. Today* **2012**, *185*, 157–161.
- [152] R. Gounder, E. Iglesia, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1958–1971.
- [153] B. Zhan, B. Moden, J. Dakka, J. Santiesteban, E. Iglesia, *J. Catal.* **2007**, *245*, 316–325.
- [154] J. M. Thomas, R. Raja, G. Sankar, R. G. Bell, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 191–200.
- [155] M. Hartmann, L. Kevan, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 635–664.
- [156] R. Raja, J. M. Thomas, *Chem. Commun.* **1998**, 1841–1842.
- [157] J. S. Woertink, P. J. Smeets, M. H. Groothaert, M. A. Vance, B. F. Sels, R. A. Schoonheydt, E. I. Solomon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 18908–18913.
- [158] E. Notomista, A. Lahm, A. Di Donato, A. Tramontano, *J. Mol. Evol.* **2003**, *56*, 435–445.
- [159] J. G. Leahy, P. J. Batchelor, S. M. Morcomb, *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 449–479.
- [160] F. Cavani, J. H. Teles, *ChemSusChem* **2009**, *2*, 508–534.
- [161] Z. Li, J. B. van Beilen, W. A. Duetz, A. Schmid, A. de Raadt, H. Griengl, B. Witholt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 136–144.
- [162] J. B. van Beilen, W. A. Duetz, A. Schmid, B. Witholt, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 170–177.
- [163] B. Bühler, I. Bollhalder, B. Hauer, B. Witholt, A. Schmid, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *82*, 833–842.
- [164] B. Bühler, A. Schmid, *J. Biotechnol.* **2004**, *113*, 183–210.
- [165] S. Staudt, C. A. Mueller, J. Marienhagen, C. Boeig, S. Buchholz, U. Schwaneberg, H. Groeger, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 186–190.
- [166] S. A. Rothen, M. Sauer, B. Sonleitner, B. Witholt, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *58*, 356–365.