

Direktoxidation von Cycloalkanen zu Cycloalkanonen mit Sauerstoff in Wasser**

Svenja Staudt, Edyta Burda, Carolin Giese, Christina A. Müller, Jan Marienhagen, Ulrich Schwaneberg, Werner Hummel, Karlheinz Drauz und Harald Gröger*

Professor Heribert Offermanns zum 75. Geburtstag gewidmet

Die Direktfunktionalisierung von Alkanen zu Alkanonen mithilfe von molekularem Sauerstoff stellt eine der so genannten „Dream Reactions“ dar.^[1] Als besonders attraktiver Reaktionstyp gilt in diesem Zusammenhang die Oxidation von (höheren homologen) Cycloalkanen zu den entsprechenden Cycloalkanonen gemäß Schema 1. Aufgrund der



Schema 1. Reaktionstyp der Direktoxidation von Cycloalkanen zu Cycloalkanonen mit Sauerstoff.

wirtschaftlichen Bedeutung von Cyclohexanon (**2a**), Cyclooctanon (**2b**) und Cyclododecanon ist insbesondere die Synthese dieser Verbindungen auf diesem Wege interessant (wobei allerdings auch andere Synthesezugänge existieren).^[2] Cyclohexanon (**2a**) findet als Baustein für die Herstellung von ϵ -Caprolactam zur Produktion von Nylon-6 und für die Synthese von Adipinsäure zur Produktion von Nylon-6.6 in-

dustrielle Anwendung im großtechnischen Maßstab, Cyclooctanon (**2b**) ist als Monomer-Baustein ein wichtiges Ausgangsprodukt für die Polymerproduktion, und Cyclododecanon wird für die Produktion von Laurinlactam und Polyamiden (Nylon-12, Nylon-6.12) benötigt und bei der Produktion von Duftstoffen und UV-Absorbern industriell eingesetzt.

Ein heutiges Verfahren zur großtechnischen Herstellung von Cycloalkanonen, insbesondere höheren homologen Cycloalkanonen mit acht oder mehr C-Atomen, erfolgt unter Verwendung von molekularem Sauerstoff als Oxidationsmittel gemäß dem Bashkirov-Prozess.^[3] Nachteile dieses mehrstufigen Verfahrens sind allerdings unter anderem der Bedarf an stöchiometrischen Mengen an Borsäure, die nur bei geringen Umsätzen (< 40%) akzeptable Selektivität der Cycloalkanoxidation sowie der durch den niedrigen Umsatz bedingte aufwändige destillative Trennprozess des Produktgemisches.^[3] Alternativ wurde in den vergangenen Jahren die Verwendung von Distickstoffmonoxid statt Sauerstoff als Oxidationsmittel für die Umwandlung von Cycloalkenen zu Cycloalkanonen als effizientes industrielles Verfahren beschrieben.^[4]

Im Nachfolgenden berichten wir über ein biotechnologisches Prozesskonzept, bei dem in einem Eintopfverfahren ausgehend von einem Cycloalkan (**1**) direkt das gewünschte Cycloalkanon (**2**) erhalten wird, wobei die Reaktion in Wasser stattfindet, molekularer Sauerstoff als Oxidationsmittel eingesetzt wird und kein weiteres Cosubstrat erforderlich ist.^[5] Dieses Verfahren erfüllt somit die Kriterien der „Dream Reaction“ gemäß dem Synthesekonzept in Schema 1. Bei diesem neuen Verfahren wird im ersten Schritt durch die P450-Monooxygenase das Cycloalkan (**1**) unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff zum entsprechenden Cycloalkanol (**3**) hydroxyliert (Schema 2). Für diesen Schritt wird NAD(P)H, die reduzierte Form des Cofaktors, benötigt, die hierbei zu NAD(P)⁺ oxidiert wird. Ohne Isolierung des Zwischenprodukts **3** erfolgt nun *in situ* die Alkoholdehydrogenase-katalysierte Weiteroxidation des Cycloalkanols (**3**) zum gewünschten Cycloalkanon (**2**), wobei gleichzeitig die (aus dem ersten Schritt resultierende) oxidierte Form des Cofaktors mithilfe der Alkoholdehydrogenase wieder in die reduzierte Form NAD(P)H überführt wird. Die so regenerierte reduzierte Form des Cofaktors NAD(P)H steht nun für einen erneuten Monooxygenase-katalysierten Hydroxylierungsschritt zur Verfügung. Entsprechend werden als Reagenzien lediglich Cycloalkan und molekularer Sauerstoff benötigt. Als katalytische Komponenten kommen eine P450-Monooxygenase, eine Alkoholdehydrogenase sowie der Co-

[*] S. Staudt, E. Burda, Prof. Dr. H. Gröger
Department Chemie und Pharmazie
Universität Erlangen-Nürnberg
Henkestraße 42, 91054 Erlangen (Deutschland)

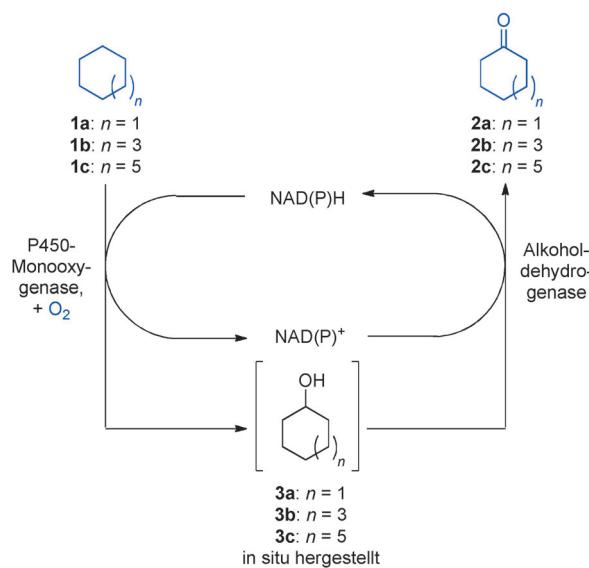
C. Giese, Prof. Dr. H. Gröger
Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)
E-Mail: harald.groeger@uni-bielefeld.de

C. A. Müller, Dr. J. Marienhagen, Prof. Dr. U. Schwaneberg
Lehrstuhl für Biotechnologie, RWTH Aachen
Worringerweg 1, 52074 Aachen (Deutschland)

Prof. Dr. W. Hummel
Institut für Molekulare Enzymtechnologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Forschungszentrum Jülich
Stettener Forst, 52426 Jülich (Deutschland)

Prof. Dr. K. Drauz
Innovation Management Chemicals
International Scientific Relations, Evonik Degussa GmbH
Rodenhäuser Chaussee 4, 63457 Hanau-Wolfgang (Deutschland)

[**] Für die großzügige Unterstützung und Förderung dieser Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereichs SFB583 „Redoxaktive Metallkomplexe“ sei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gedankt. E.B. dankt der Graduate School of Molecular Science der Universität Erlangen-Nürnberg für die Unterstützung ihrer Forschungsarbeiten.



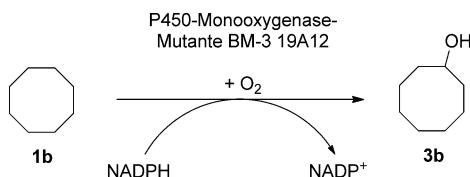
Schema 2. Konzept einer enzymatischen Direktoxidation von Cycloalkanen zu Cycloalkanonen mit Sauerstoff.

faktor NAD(P)H zum Einsatz. Die sonst bei enzymatischen Redoxreaktionen mit Monoxygenasen und Dehydrogenasen typische Zugabe von stöchiometrischen Mengen an („externen“) Cosubstraten ist bei diesem Konzept der Doppeloxidation (mit Ausnahme von O_2) nicht erforderlich. Das beschriebene Reaktionssystem ist graphisch in Schema 2 dargestellt. Ein anderer Reaktionstyp einer Doppeloxidation, bestehend aus einer Kombination einer Alkoholdehydrogenase mit einer Baeyer-Villiger-Monoxygenase, hat sich bei Willetts et al. in einer früheren Arbeit bereits als geeignet für die Herstellung von Lactonen erwiesen.^[6]

In unseren einleitenden Arbeiten erfolgte zunächst eine Durchmusterung von Enzymen (P450-Monoxygenasen und Alkoholdehydrogenasen) für die beiden einzelnen Oxidationsschritte. Den Startpunkt für den einleitenden Hydroxylierungsschritt bildete dabei die rekombinante P450-Monoxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium*.^[7-9] Über die gezielte Verbesserung der katalytischen Eigenschaften dieses in nativer Form nur wenig aktiven Enzyms für Hydroxylierungen durch entsprechende Mutationen wurde in jüngster Zeit mehrfach berichtet, wobei durch „Protein-Engineering“ beispielsweise von Urlacher et al. Umsatzfrequenzen (turnover frequency, TOF; entspricht hier der Oxidationsrate) bis 230 min^{-1} für Cycloalkane^[10] von Drone et al. Gesamtumsatzfrequenzen (total turnover numbers, TTN) bis 410 für Alkane,^[11] von Arnold et al. TTN sogar bis 33400 für Alkane^[12] sowie von Reetz et al. Produktbildungen bis 8.4 mm und Umsatzzahlen (turnover numbers, TON) bis 3632 für *n*-Butan erzielt wurden.^[13] In all diesen Umsetzungen wird jedoch ein „externes“ Cosubstrat benötigt, oder der Cofaktor wird in stöchiometrischen Mengen zugesetzt.

Um eine auf die Hydroxylierung von Cycloalkanen hin optimierte Monoxygenase-Mutante zu finden, wurde von uns eine BM-3-Mutantenbank durchmuster, wobei Cyclooctan (**1b**) als Substrat ausgewählt wurde. Hierzu wurde zunächst der molare Anteil an der jeweiligen P450-Mono-

oxygenase im Lyophilisat (in μmol pro g an lyophilisiertem Rohextrakt) bestimmt und anschließend die spezifische Aktivität in Form der jeweiligen Oxidationsrate (angegeben als TOF in min^{-1}) bezogen auf umgesetzten Cofaktor NADPH spektrophotometrisch ermittelt. Für die bereits literaturbekannte Mutante 19A12,^[14] für deren Herstellung wir vor kurzem ein Expressionssystem berichteten,^[15] wurde in der von uns durchgeführten photometrischen Aktivitätsbestimmung für Cyclooctan eine erfreulich hohe spezifische Aktivität mit 174.9 U/g Lyophilisat bei einem P450-Monoxygenase-Anteil von $0.123\text{ }\mu\text{mol}$ pro g an lyophilisiertem Rohextrakt, daraus resultierend eine TOF von 1422 min^{-1} , gemessen (Schema 3). Entsprechend wurde diese BM-3-Mutante 19A12 neben der bereits in früheren Arbeiten^[10,16] als geeig-



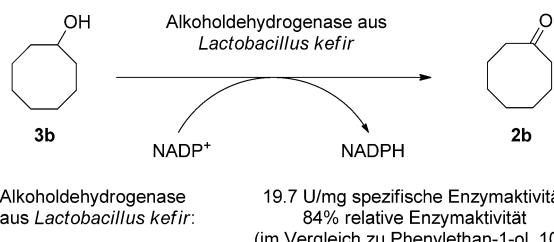
P450-Monoxygenase-Mutante BM-3 19A12: Aktivität: 174.9 U/g Lyophilisat (Gehalt: $0.123\text{ }\mu\text{mol/g}$ Lyophilisat) TOF: 1422 min^{-1}

Schema 3. P450-Monoxygenase-katalysierte Hydroxylierung von Cyclooctan.

net identifizierten BM-3-F87V-Variante, für die spektrophotometrisch von uns eine TOF von 14 min^{-1} bestimmt wurde, für die nachfolgenden Untersuchungen zur Cosubstrat-freien Doppeloxidation herangezogen.

Als eine geeignete Alkoholdehydrogenase (ADH) für die Umwandlung von Cycloalkanolen (**3**) in Cycloalkanone (**2**) unter Überführung des Cofaktors NADP^+ in NADPH identifizierten wir unter anderem eine ADH aus *Lactobacillus kefir* (Schema 4).^[17,18] Die hierbei erhaltene Enzymaktivität für die Umwandlung von Cyclooctanol (**3b**) in Cyclooctanon (**2b**) bewegte sich mit 84 % (entsprechend einer spezifischen Aktivität von 19.7 U mg^{-1}) im ähnlichen Bereich wie für die Oxidation des Referenzsubstrats 1-Phenylethanol (100 %, entsprechend 23.4 U mg^{-1}).^[17]

Anschließend erfolgte der Einsatz der aufgefundenen P450-Monoxygenasen und Alkoholdehydrogenase in präparativen Umsetzungen gemäß dem obigen Synthesekonzept der Doppeloxidation (Schema 2), wobei als Zielreaktion zu-

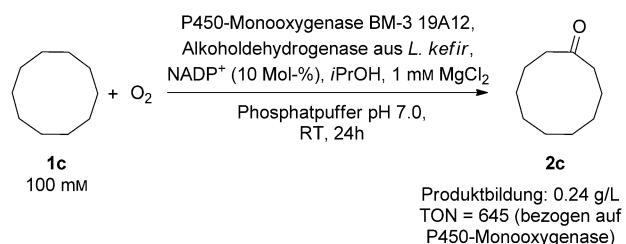


Schema 4. Alkoholdehydrogenase-katalysierte Oxidation von Cyclooctanol.

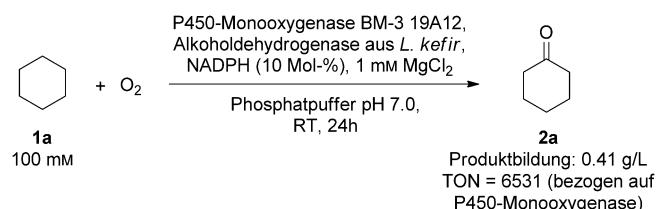
nächst die Direktoxidation von Cyclooctan (**1b**) zu Cyclooctanon (**2b**) ausgewählt wurde. Hierbei konnte erfreulicherweise die Gültigkeit des neuen Synthesekonzepts der biokatalytischen Direktoxidation von Cycloalkanen (**1**) zu Cycloalkanonen (**2**) mit molekularem Sauerstoff in Wasser gemäß Schema 2 bestätigt werden. Bei der analytischen Bestimmung von Cyclooctanon orientierten wir uns an Arbeiten von Schmid und Urlacher et al.,^[7c] die über die Messung der Produktkonzentration/Produktmenge (mm bzw. g pro L) Aussagen zur Produktivität treffen konnten. Da während der Reaktion (und der Aufarbeitung) grundsätzlich signifikante Mengen des Substrats Cyclooctan entweichen können, erscheint diese Analysemethode zur Bestimmung der Produktmenge eine treffendere Messgröße für den Reaktionsverlauf zu liefern als eine Umsatzbestimmung. Die Versuche wurden (statt direkt mit NADPH) vorzugsweise unter Verwendung von NADP⁺ als Cofaktor sowie 2-Propanol zur Initiierung der Reaktion durch In-situ-Bildung der für den ersten Schritt der Hydroxylierung benötigten reduzierten Cofaktormenge NADPH durchgeführt.^[19] Bei einer bereits in diesen einleitenden Versuchen erhöhten Substratkonzentration von 100 mm Cyclooctan (**1b**) und selbst unter Einsatz der weniger aktiven Mutante BM-3 F87V konnte ein erster Gültigkeitsnachweis für das neue Synthesekonzept der Doppeloxidation erzielt und das gewünschte Produkt Cyclooctanon (**2b**) mit einer Produktkonzentration von 3.9 mm, entsprechend einer Produktmenge von 0.49 g L⁻¹ und einer TON von 72, gebildet werden (Tabelle 1, Nr. 1). Noch erfreulicher verlief die Doppeloxidation von Cyclooctan bei Verwendung der P450-Mutante BM-3 19A12 in Kombination mit der Alkoholdehydrogenase aus *L. kefir*: Hierbei wurde mit deutlich verminderter P450-Monooxygenase-Menge Cyclooctanon (**2b**) mit einer hohen Produktkonzentration von 6.3 mm, entsprechend einer Produktmenge 0.80 g L⁻¹ und einer TON von 11 641, gebildet (Nr. 2). Sowohl diese Produktkonzen-

tration als auch dieser TON-Wert gehören zu den höchsten bislang für P450-Monooxygenasen in synthetischen Biotransformationen unter In-situ-Cofaktorregenerierung berichteten Werten.^[7-15]

Zudem zeigte sich das enzymatische Doppeloxidationsverfahren geeignet für die Synthese von Cyclodecanon (**2c**). So erfolgte die direkte Oxidation von Cyclodecan (**1c**) unter Bildung des gewünschten Produkts **2c** mit einer Produktmenge von 0.24 g L⁻¹ (Schema 5). Da die bisherigen Versuche zudem mit einer (relativ hohen) „Standardmenge“ von 10 Mol-% an Cofaktor erfolgten, wurde die Möglichkeit der Verwendung geringerer Cofaktormengen untersucht. Hierbei verlief die Doppeloxidation von **1c** auch in Gegenwart von



Schema 5. Enzymatische Doppeloxidation von Cyclodecan.



Schema 6. Enzymatische Doppeloxidation von Cyclohexan.

Tabelle 1: Doppeloxidation von Cyclooctan in Abhängigkeit von der eingesetzten Mutante.

| Nr. ^[a] | Mutante | Produktivität bezogen auf die Bildung von Cyclooctanon (2b) [g L ⁻¹] | [mmol L ⁻¹] | TON ^[b] |
|--------------------|---------|--|-------------------------|--------------------|
| 1 | F87V | 0.49 | 3.9 | 72 |
| 2 | 19A12 | 0.80 | 6.3 | 11 641 |

[a] Versuchsdurchführung und Bestimmung der gebildeten Produktmenge, siehe Experimentelles. Blau: eingesetzte Reagenzien und resultierendes Produkt, violett: Enzyme, Cofaktor und 2-Propanol (zur Bildung der für den ersten Schritt erforderlichen Cofaktormenge NADPH). [b] TON-Werte beziehen sich auf die P450-Monooxygenase und wurden berechnet aus der Menge an gebildetem Produkt **2b** und der eingesetzten Menge an P450-Monooxygenase.

einer geringeren (und ebenfalls noch nicht optimierten) Cofaktormenge von 1 Mol-% mit ähnlichem Ergebnis.^[20]

Darüber hinaus gelang auch die direkte Oxidation von Cyclohexan (**1a**) in Cyclohexanon (**2a**), wobei sich für diese Synthese erneut die P450-Monooxygenase-Mutante BM-3 19A12 als am effizientesten erwies und das gewünschte Produkt **2a** in einer Menge von 0.41 g L⁻¹ gebildet wurde (Schema 6).^[21]

Zusammenfassend haben wir über ein enzymatisches Eintopf-Zweistufen-Verfahren berichtet, bei dem ausgehend von einem Cycloalkan (**1**) direkt das entsprechende Cycloalkanon (**2**) erhalten wird. Dieser Prozess findet in Wasser statt und benötigt lediglich

molekularen Sauerstoff als Oxidationsmittel. Als Katalysatoren werden mit einer P450-Monooxygenase und einer Alkoholdehydrogenase zwei bezüglich des benötigten Cofaktors (NADPH, NADP⁺) komplementäre Enzyme eingesetzt und die Produkte **2** werden mit für P450-Monooxygenasen guten Produktkonzentrationen, Produktmengen und TON-Werten erhalten. Ein Fokus unserer aktuellen Arbeiten auf diesem Gebiet liegt auf der Prozessoptimierung unter Einsatz verbesserter rekombinanter Biokatalysatoren mit dem Ziel der Erhöhung von TON (insbesondere in Bezug auf Monooxygenase und Cofaktor) und gebildeter Produktmenge. Zudem stellt die molekularbiologische Optimierung der P450-Monooxygenase im Hinblick auf Aktivität, Stabilität und Verbesserung der Kopplungseffizienz für den Cofaktor („coupling efficiency“) eine derzeitige Herausforderung dar. Auch die Ausdehnung dieses Konzepts der biokatalytischen Doppeloxidation auf die Synthese weiterer Ketone ist derzeit in Arbeit.

Experimentelles

In einem 25-mL-Rundhalskolben wurde das jeweilige Cycloalkan (**1**, 0.1 mmol) in einer Mischung aus 997.5 μ L Phosphatpuffer (pH 7.0, 50 mM, 1 mM MgCl₂) und 2.5 μ L 2-Propanol aufgenommen, und anschließend wurden nacheinander die P450-Monooxygenase-Mutante vom Typ BM-3 19A12 oder BM-3 F87V (jeweils als lyophilisierter Rohextrakt, 0.764 U bezogen auf Cycloalkan, **1**), Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* (LK-ADH, Rohextrakt, verdünnt mit Glycerol (1:1), 200 U mmol⁻¹ Cycloalkanol, **3**) hinzugefügt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Cofaktors NADP⁺ (0.01 mmol) gestartet und die Reaktionsmischung für 24 Stunden bei Raumtemperatur im geschlossenen Rundkolben geführt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit 3 \times 1 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zur Umsatzbestimmung weiter aufgearbeitet, wobei diese in Abhängigkeit von der Cycloalkankomponente entweder durch (1) Überführen in einen 5-mL-Messkolben und Aufstocken mit Dichlormethan sowie anschließende Bestimmung der absoluten Menge an Cycloalkanon mithilfe einer Eichkurve durch Gaschromatographie (GC-Gerät: Shimadzu GC-2010; Kapillarsäule: Rt-BDEXm; Trägergas: molekularer Stickstoff (N₂), 100 kPa; Detektor: Flammenionisationsdetektor) oder (2) durch vorsichtiges Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum (bei 900 mbar) und anschließende Bestimmung der absoluten Menge an Cycloalkanon durch ¹H-NMR-spektroskopischer Analyse des Rohprodukts unter Zuhilfenahme eines externen Standards (Pyridin) oder der Auswaage erfolgt. Die Methode (1) wurde bei der Synthese von **2a,c** und die Methode (2) bei der Synthese von **2b** angewendet. Die bestimmte absolute Produktmenge an Cycloalkanon (**2**) wurde in Bezug zum Volumen des eingesetzten Lösungsmittels (1 mL) gesetzt und in mmol L⁻¹ bzw. g L⁻¹ angegeben.

Eingegangen am 8. Juni 2012,
veränderte Fassung am 31. August 2012
Online veröffentlicht am 21. Januar 2013

Stichwörter: Alkane · Enzymkatalyse · Ketone · Oxidationen

[1] Als „Dream Reactions“ werden nachhaltige Synthesemethoden mit hoher Atomökonomie und Effizienz bezeichnet. Übersichten zu nachhaltigen Synthesemethoden: a) P. Anastas, J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, Oxford, 1998; b) R. A. Sheldon, I. Arends, U.

Hanefeld, *Green Chemistry and Catalysis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.

- [2] Übersicht über die industrielle Herstellung von Bulkchemikalien: K. Weissermel, H.-J. Arpe, *Industrial Organic Chemistry*, 4. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- [3] T. Schiffer, G. Oenbrink, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6. Aufl., Elektronische Fassung, Wiley-VCH, 2000.
- [4] a) J. Teles, B. Rößler, R. Pinkos, T. Genger, T. Preiss (BASF SE), Eur. Patent EP 1663932, 2008; b) J. Teles, B. Rößler, R. Pinkos, G. Tebben, C. Müller (BASF SE), Eur. Patent EP 2041060, 2009.
- [5] Vorab zu dieser Veröffentlichung wurde von einigen von uns auch eine Patentanmeldung zu diesem Konzept der Doppeloxidation (mit einigen sehr frühen, einleitenden Experimenten) eingereicht: H. Gröger, E. Burda, U. Schwaneberg, J. Marienhagen, K. Drauz (Evonik Degussa GmbH), PCT Patentanm. WO2010/070086A2, 2010.
- [6] A. J. Willetts, C. J. Knowles, M. S. Levitt, S. M. Roberts, H. Sandeya, N. F. Shipston, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 1608–1610.
- [7] In bahnbrechenden Arbeiten der Gruppen von Adam, Schmid, Schwaneberg, Urlacher und Arnold wurde die Eignung einer P450-Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* und entsprechender Mutanten für Hydroxylierungen von Alkanen und Cycloalkanen demonstriert. Ausgewählte Arbeiten: a) W. Adam, Z. Lukacs, C. R. Saha-Möller, B. Weckerle, P. Schreier, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2923–2926; b) D. Appel, S. Lutz-Wahl, P. Fischer, U. Schwaneberg, R. D. Schmid, *J. Biotechnol.* **2001**, 88, 167–171; c) E. T. Farinas, U. Schwaneberg, A. Glieder, F. H. Arnold, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, 343, 601–606; d) S. C. Maurer, H. Schulze, R. D. Schmid, V. Urlacher, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345, 802–810; e) S. C. Maurer, K. Kühnel, L. A. Kaysser, S. Eiben, R. D. Schmid, V. B. Urlacher, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, 347, 1090–1098; f) J. Kuper, T. S. Wong, D. Roccatano, M. Wilmanns, U. Schwaneberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 5786–5788.
- [8] Übersichtsartikel: a) V. B. Urlacher, R. D. Schmid, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 156–161; b) V. B. Urlacher, S. Eiben, *Trends Biotechnol.* **2006**, 24, 324–330; c) V. B. Urlacher, M. Girhard in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Band 3*, 3. Aufl. (Hrsg.: K. Drauz, H. Gröger, O. May), Wiley-VCH, Weinheim, 2012, Kap. 30, S. 1227–1267; d) R. Fasan, *ACS Catal.* **2012**, 2, 647–666.
- [9] Übersichten mit industriellen Beispielen enzymatischer Oxidationen: a) A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, 2006; b) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, 485, 185–194.
- [10] E. Weber, A. Seifert, M. Antonovici, C. Geinitz, J. Pleiss, V. B. Urlacher, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 944–946.
- [11] M. Bordeaux, A. Galarneau, F. Fajula, J. Drone, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 2123–2127; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 2075–2079.
- [12] R. Fasan, Y. T. Meharennna, C. D. Snow, T. L. Poulos, F. H. Arnold, *J. Mol. Biol.* **2008**, 383, 1069–1080.
- [13] F. E. Zilly, J. P. Acevedo, W. Augustyniak, A. Dege, U. W. Häusig, M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 2772–2776; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 2720–2724.
- [14] 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.
- [15] S. Staudt, C. A. Müller, J. Marienhagen, C. Böing, S. Buchholz, U. Schwaneberg, H. Gröger, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, 8, 186–191.
- [16] Zudem zeigte sich diese Mutante, bei der in Position 87 L-Phenylalanin durch L-Valin ersetzt wurde, in früheren Arbeiten bereits als vorteilhaft bei folgenden weiteren Anwendungen: a) Umwandlung der P450-Monooxygenase BM-3 in eine regio-

- und stereoselektive Arachidonsäure-Epoxygenase: S. Graham-Lorence, G. Truan, J. A. Peterson, J. R. Falck, S. Wei, C. Helvig, J. H. Capdevila, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 1127–1135; b) Hydroxylierung von aromatischen Substraten mit gesteigerter Enzymaktivität: W. T. Sulistyaningdyah, J. Ogawa, Q.-S. Li, C. Maeda, Y. Yano, R. D. Schmid, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 556–562.
- [17] Zur Herstellung der *R*-Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir*: A. Weckbecker, W. Hummel, *Biocatal. Biotransform.* **2006**, *24*, 380–389.
- [18] Ausgewählte Beispiele für Anwendungen der *R*-Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* in der asymmetrischen Ketonreduktion: a) C. W. Bradshaw, W. Hummel, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1532–1536; b) H. Gröger, F. Chamouleau, N. Orologas, C. Rollmann, K. Drauz, W. Hummel, A. Weckbecker, O. May, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5806–5809; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5677–5681.
- [19] Alternativ kann auch direkt NADPH eingesetzt werden, wobei hier leicht verminderte Produktbildungen erhalten wurden: S. Staudt, E. Burda, C. Giese, H. Gröger, unveröffentlichte Ergebnisse. Eine Erklärung für die höhere Produktbildung in Anwesenheit der (geringen) 2-Propanol-Mengen von 0.25 Vol.-% könnte sein, dass dadurch Verluste an NADPH infolge der bekannten ungewünschten Nebenreaktion von P450-Monoxygenasen (NADPH-Verbrauch unter Bildung von H_2O_2 und $NADP^+$; diese NADPH-Verluste können durch die so genannte „coupling efficiency“ auch beschrieben und quantifiziert werden) durch die Regenerierung von NADPH mit 2-Propanol kompensiert werden können.
- [20] Bei Verwendung von 10 Mol-% an Cofaktor als (hohe) „Standardmenge“ wurden bezogen auf den Cofaktor nur niedrige Umsatzzahlen (Cofaktor-bezogene TON) von <1 erhalten, während beim Einsatz von 1 Mol-% Cofaktor diese Umsatzzahl bereits bei >1 liegt (Cofaktor-bezogene TON mit Cyclodecan als Substrat: 2). Die weitere Optimierung der Cofaktormenge und Erhöhung der Cofaktor-bezogenen TON ist Gegenstand aktueller Arbeiten zur Prozessentwicklung.
- [21] In diesem Versuch wurde direkt der Cofaktor NADPH eingesetzt, während in den anderen, in Tabelle 1 und Schema 5 dargestellten Versuchen, dieser *in situ* aus $NADP^+$ und 2-Propanol für die einleitende Hydroxylierung erzeugt wurde.