

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
TUM Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit

Analyse und Anwendung elektro- enzymatischer Verfahren der NADH Cofaktor-Regeneration zur nachhaltigen Synthese von Chemikalien

Benjamin Begander

Vollständiger Abdruck der von der promotionsführenden Einrichtung TUM Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr.-Ing. Michael Zavrel

Prüfer*innen der Dissertation: 1. Prof. Dr. Volker Sieber

2. Prof. Dr. Nicolas Plumeré

Die Dissertation wurde am 27.07.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und von der promotionsführenden Einrichtung TUM Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit am 17.02.2023 angenommen.

für Beate und für Rainer

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation ohne Hilfe Dritter und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt wurde. Alle verwendeten Passagen wurden kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Benjamin Begander

Straubing, 27.07.2022

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Lehrstuhl für Chemie Biogener Rohstoffe der Technischen Universität München, Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit, bei Prof. Volker Sieber durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Prof. Volker Sieber herzlich für seine Unterstützung und sein Vertrauen danken.

Bei Dr. Josef Sperl möchte ich mich für die fachliche Betreuung bedanken.

Im Rahmen des Projekts bedanke ich mich bei meinem Mentor Dr. Michael Hofer sowie Dr. Luciana Vieira, Dr. Arne Roth, Julia Diener und dem weiteren Team für die gute Zusammenarbeit und die Möglichkeit der Nutzung der Labore am Fraunhofer IGB, Institutsteil Straubing.

Weiterhin möchte ich mich bei den von mir betreuten Studenten Anna Huber, Barbara Bohlen und Max Häussler für deren Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Finanzierung meiner Promotion.

Ein großes Dankeschön für die immer nette und hilfsbereite Zusammenarbeit gilt allen Mitgliedern des Lehrstuhls Chemie Biogener Rohstoffe.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Petra Lommes, Irmgard Urban, Anja Schmidt, Magdalena Haslbeck, Lena Würstl und Janine Huber für die Unterstützungen im Labor, sowie bei Elisabeth Aichner für die Unterstützung in administrativen Belangen. Weiterer Dank geht an das IGSSE Team mit Dr. Barbara Beer, Mariko Teshima und Vivian Willers.

Ganz besonders danke ich Ludwig, Johanna, Franz, Vroni und Melanie für ihre stete Unterstützung und Geduld.

Abschließend danke ich meinen Eltern sowie Uli und Simone für ihre Unterstützung.

Publikationsliste

Begander, B.; Huber, A.; Döring, M.; Sperl, J.; Sieber, V. Development of an Improved Peroxidase-Based High-Throughput Screening for the Optimization of D-Glycerate Dehydratase Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 335. <https://doi.org/10.3390/ijms21010335>

Begander, B.; Huber, A.; Sperl, J.; Sieber, V. Development of a Cofactor Balanced, Multi Enzymatic Cascade Reaction for the Simultaneous Production of L-Alanine and L-Serine from 2-Keto-3-deoxy-gluconate. *Catalysts* 2021, 11, 31. <https://doi.org/10.3390/catal11010031>

Hofer, M., Diener, J., **Begander, B.** et al. Engineering of a borneol dehydrogenase from *P. putida* for the enzymatic resolution of camphor. *Appl Microbiol Biotechnol* 105, 3159–3167 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11239-5>

Zusammenfassung

Die biokatalytische Nutzung von Enzymen nimmt eine immer zentralere Rolle bei der nachhaltigen Synthese von Chemikalien ein. Um die dafür benötigten Reaktionstypen abdecken zu können, wird ein großes Portfolio an verschiedenen Enzymklassen mit deren individuellen biokatalytischen Fähigkeiten benötigt. Die Klasse der Oxidoreduktasen stellt dabei eine diverse Enzymklasse dar, die mit den katalysierten Redoxreaktionen einen synthetisch sehr wichtigen Teil der benötigten Reaktionen abdeckt. Dennoch gibt es bei der Anwendung dieser Enzymklasse noch zahlreiche Herausforderungen. Einer der Hauptgründe hierfür liegt in der Notwendigkeit von Cofaktoren, die als Hilfsstoffe wichtige Bauteile zum Gelingen der katalysierten Reaktionen liefern. NAD, das in Redoxreaktionen formal Hydrid bereitstellt, gilt allgemein als wichtigster Cofaktor für die Klasse der Oxidoreduktasen.

Vor diesem Hintergrund ist die Optimierung der Verwendung von NAD für enzymkatalysierte *in vitro* Reaktionen ein wichtiges Ziel der industriellen Biokatalyse. Zum ökonomischen Einsatz von NAD bedarf es auf Grund seines hohen Preises und einer intrinsisch geringen Stabilität unterschiedlichster und individuell angepasster Regenerationsmethoden, um den Kreislauf von reduzierter und oxidierte Form zu schließen. Im Rahmen dieser Dissertation wurden daher verschiedene NAD-abhängige Enzym- und Regenerationssysteme untersucht. Die enzymatische Cofaktorregenerierung konnte erfolgreich zur Racematspaltung von Campher sowie zur Synthese von Aminosäuren über eine ausgeglichene, komplexe Enzymkaskade eingesetzt werden. Darüber hinaus wurde die rein elektrochemische Regeneration von NAD anhand eines Materialscreenings analysiert. Diese weniger geläufige Methode kann in der Theorie Elektronen aus dem Stromnetz direkt nutzen, um NAD zu seinem reduzierten Analogon NADH umzuwandeln. Allerdings bestehen hierbei noch deutliche Herausforderungen, wie die Verhinderung der Bildung von Dimeren, die nicht weiter für Enzymreaktionen verwendet werden können. Im letzten Teil dieser Arbeit wurden daher elektrische und enzymatische Verfahren kombiniert eingesetzt. Die Elektronen wurden dazu in einem Mediator, Formiat, zwischengespeichert, um anschließend in einer Enzymreaktion durch das Enzym Formiatdehydrogenase auf NAD übertragen zu werden. Das entwickelte System kann sowohl als unabhängiges Modul, als auch gekoppelt und in kontinuierlichem Betrieb zur ressourcenschonenden Regeneration von NADH für die nachhaltige Synthese von Chemikalien eingesetzt werden.

Abstract

Biocatalysis and thus the use of enzymes are playing an increasingly important role in the sustainable synthesis of chemicals. To be able to cover the required reaction types, a large portfolio of different enzyme classes with their individual biocatalytic abilities, is required. The class of oxidoreductases represents a diverse enzyme class, which covers an important part of synthetic reactions. Nevertheless, the usage shows some difficulties for large-scale application of this enzyme class. The need for cofactors, that supply important components for the success of the reactions, is one big drawback, which hampers more widespread application. Here, NAD is the most important cofactor for the formal provision of hydrides in redox reactions.

In the light of the above, optimizing the application of NAD in enzyme catalyzed *in vitro* reactions is an important goal of industrial biocatalysis. For more economic use, the high price and its intrinsic low stability ask for diverse and individually optimized regeneration methods. Hence, various NAD-dependent enzymes and regeneration systems were analyzed in this work. Enzymatic cofactor regeneration was successfully applied for the resolution of campher racemate as well as for the synthesis of amino acids via a self-sufficient, complex enzyme cascade. Moreover, also the pure electrochemical regeneration of NAD was analyzed, based on the screening of different electrode materials. This regeneration method can directly use electrons from the power grid to reduce NAD to its analogon NADH. However, significant challenges remain, such as the formation of dimers, which cannot serve as cofactors in enzyme reactions. The last part of this work thus focussed on the combination of electrical and enzymatic regeneration methods. There, electrons were cached to build formiate as mediator and were then transferred to NAD in an enzymatic reaction catalyzed by formiate dehydrogenase. The developed system was finally applied as single module as well as in a coupled and continuous fashion for the resource efficient regeneration of NADH and the green synthesis of chemicals.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	I
Danksagung	II
Publikationsliste	III
Zusammenfassung	IV
Abstract	V
Inhaltsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XII
Formelverzeichnis	XIII
Abkürzungen	XIV
1 Einleitung	1
1.1 Oxidoreduktasen und ihre Cofaktoren	1
1.2 Nicotinamidadenindinukleotide	3
1.3 Allgemeine Methoden zur Regeneration des Cofaktors NADH	5
1.3.1 Chemische Regeneration	6
1.3.2 Photokatalytische Regeneration	7
1.3.3 Enzymatische Regeneration	9
1.3.4 Elektrochemische Regeneration	11
1.4 Immobilisierung von NADH	14
1.5 Ziele dieser Arbeit	17
2 Material	18
2.1 Chemikalien	18
2.2 Geräte	19
2.3 Verbrauchsmaterialien	21
2.4 Säulen	22
2.5 Elektrochemie Materialien	23
2.6 Software	23

2.7	Kits.....	24
2.8	Nährmedien	24
2.9	Puffer	25
2.10	Mikroorganismen	27
2.11	Enzyme	27
2.12	Plasmide	28
2.13	Trennsysteme	28
3	Methoden	29
3.1	Mikrobiologische Methoden	29
3.1.1	Vorbereitung von Geräten und Lösungen.....	29
3.1.2	Bestimmung der optischen Dichte von <i>E. coli</i> Zellsuspensionen	29
3.1.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	29
3.1.4	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	30
3.1.5	Kultivierung.....	30
3.1.6	Heterologe Enzym-Expression	31
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	31
3.2.1	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
3.2.2	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	31
3.3	Proteinchemische Methoden.....	31
3.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	31
3.3.2	Proteinreinigung	32
3.4	Analytische Methoden.....	36
3.4.1	Aminosäureanalytik mittels HPLC	36
3.4.2	Formiatanalytik mittels HPLC	37
3.4.3	Campher- & Borneol-Analytik mittels GC.....	37
3.4.4	Acetophenon-Analytik mittels GC	37
3.4.5	Bestimmung Gesamt-NADH Konzentration.....	38
3.4.6	Bestimmung enzymatisch aktives NADH.....	38
3.4.7	Enzymatische Aktivitätsmessungen mittels Photometer.....	39

3.5	Elektrochemische Methoden	42
3.5.1	Elektrodenvorbereitung	42
3.5.2	Direkte elektrochemische NADH-Regeneration – Metall-Screening	43
3.5.3	Kombinationsversuche elektrochemische Formiat-Produktion mit enzymatischer Regeneration und Nutzung	43
3.6	Synthese PEG-NADH	45
4	Ergebnisse	47
4.1	Enzymatische Oxidation von (+)-Campher	47
4.1.1	Oxidation von (+)-Campher ohne Cofaktor-Regenerierung	47
4.1.2	Oxidation von (+)-Campher mit Cofaktor-Regenerierung	48
4.2	Enzymkaskade mit einer in sich ausgeglichenen Cofaktor-Nutzung zur Produktion von Aminosäuren aus Zuckerabbaustoffen	52
4.2.1	Bestimmung der Rahmenbedingungen	53
4.2.2	Optimierung der Enzymkaskade durch eine Titrationsstudie	55
4.3	Materialscreening mit konstanter Stromstärke für die direkte, elektrochemische NADH-Regeneration	58
4.4	Nutzung von elektrochemisch erzeugtem Formiat für die NADH-Regeneration	60
4.4.1	Auswahl von Molekülen auf Basis von CO ₂ für eine neue, enzymgekoppelte, elektrochemische Regeneration	60
4.4.2	Grundlegende Voraussetzungen für die Kombination der Module..	63
4.4.3	Statische Versuche.....	66
4.4.4	Kontinuierliche Versuche	69
5	Diskussion	76
5.1	Racematspaltung von (+/-)-Campher	76
5.2	Kombination von Dehydrogenasen zu Enzymkaskaden	79
5.3	Direkte elektrochemische NADH-Regenerierung	83
5.3.1	Reaktionsmechanismus direkte Regeneration.....	84
5.3.2	Verbesserungsmöglichkeiten.....	87
5.4	Enzym-gekoppelte, elektrochemische Regeneration	89

5.4.1	Vergleich und Weiterentwicklung der kontinuierlichen Betriebsart..	90
5.5	Fazit und Ausblick	93
6	Literaturverzeichnis	95
7	Anhang	113

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulare Struktur von NAD ⁺ (links) und NADH (Mitte).	3
Abbildung 2: Einteilung der enzymatischen Regeneration in zwei unterschiedliche Systeme.....	9
Abbildung 3: Allgemeine Unterteilung der drei verschiedenen elektrochemischen Regenerationsverfahren	11
Abbildung 4: Reaktion der drei Viologen-Hauptoxidationsstufen.....	13
Abbildung 5: Reaktionsgleichung der Campher-Racematspaltung durch das Enzym PpBDH_S146A/Y188T.....	47
Abbildung 6: Campher-Racemat Abbau mittels pPBDH_S146A/Y188T, ohne Cofaktor-Regeneration	48
Abbildung 7: Campher-Racemat Abbau mittels PpBDH_S146A/Y188T mit NADH-Cofaktor-Regeneration.....	49
Abbildung 8: Verhalten der PpBDH_S146A/Y188T (schwarz) sowie der CbFDH wt (hellgrau) bei unterschiedlichen pH-Werten und Puffer.....	50
Abbildung 9: Campher-Racemat Abbau mittels PpBDH_S146A/Y188T mit Cofaktor Regeneration durch CbFDH wt.....	51
Abbildung 10: Übersicht des Reaktionsverlaufes der Enzymkaskade zur Herstellung von L-Alanine und L-Serin aus 2-Keto-3-Deoxygluconate (KDG).....	53
Abbildung 11: Durch verschiedene Variationen der Enzymkaskade produzierte L-Alanin- und L-Serin-Konzentration.....	56
Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der L-Alanin- und L-Serin-Konzentrationen, produziert durch die verbesserte Enzymkaskade.	57
Abbildung 13: Aufbau der zwei-Kompartiment-Zelle für das Materialscreening	58
Abbildung 14: Übersicht der durch die direkte, elektrochemische Regeneration bei - 5 mA/cm ² erzeugten Gesamt-NADH sowie 1,4-NADH Konzentrationen.....	59
Abbildung 15: Elektrochemische CO ₂ -Reduktion zu eFormiat sowie weitere Nutzung dessen für die Regeneration von NADH durch die CbFDH.....	61
Abbildung 16: Umsetzung von 4-MAP zu 1-(p-Tolyl)-EtOH) unter NADH-Verbrauch durch die ReADH.....	63

Abbildung 17: pH-Verhalten der CbFDH_C23S/C262A (schwarz, linke y-Achse) und der ReADH (hellgrau, rechte y-Achse) in KP_i Puffer bei unterschiedlichen pH-Werten.....	64
Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der Reaktion der ReADH mit Cofaktor-Regeneration durch CbFDH_C23S/C262A.	67
Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf der Reaktion der ReADH mit Cofaktor-Regeneration durch CbFDH_C23S/C262A unter Verwendung von PEG-NADH.....	68
Abbildung 20: Schematischer Aufbau der Koppelung der elektrochemischen Reduktion von CO_2 zu eFormiat und der enzymatischen Nutzung dessen zur Cofaktor-Regeneration.	70
Abbildung 21: Gekoppelte, diskontinuierliche Kombination der elektrochemischen Erzeugung von eFormiat und enzymatische Nutzung.	71
Abbildung 22: Gekoppelte, diskontinuierliche Kombination der elektrochemischen Erzeugung von eFormiat und enzymatische Nutzung.....	73
Abbildung 23: Kontinuierliche Kombination von elektrochemischer Formiat-Erzeugung sowie enzymatischer Nutzung dieses zur Cofaktor-Regeneration.	74
Abbildung 24: Mechanismus der Reaktion von NAD^+ zu verschiedenen NADH-Isomeren und -Dimeren.	85
Abbildung 25: Auftragung der 1,4-NADH Regenerationsfähigkeit in Reihenfolge der Wasserstoffbindungsstärke.....	86
Abbildung 26, links: Aktivität der Formiatdehydrogenase C23S/C262A aus <i>Candida boidinii</i> (CbFDH_C23S/C262A) bei verschiedenen Formiat-Konzentrationen.....	114
Abbildung 27, rechts: Aktivität der Formiatdehydrogenase C23S/C262A aus <i>Candida boidinii</i> (CbFDH_C23S/C262A) bei verschiedenen NAD^+ -Konzentrationen.....	114

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeiner Überblick über Vor- und Nachteile von Cofaktor Regenerationsmethoden	6
Tabelle 2: Liste der wichtigsten Chemikalien, deren Anbieter und Best. Nr.	18
Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte	19
Tabelle 4: Liste mit ausgewählten Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 5: Liste mit den verwendeten Säulen.....	22
Tabelle 6: Liste der für das Materialscreening verwendeten Materialien	23
Tabelle 7: Liste mit den für die Bedienung oder Auswertung verwendeten Software	23
Tabelle 8: Liste der verwendeten Kits	24
Tabelle 9: Liste der Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien.....	24
Tabelle 10: Liste der verwendeten Antibiotika	25
Tabelle 11: Liste der verwendeten Puffer.....	25
Tabelle 12: Liste der verwendeten Mikroorganismen	27
Tabelle 13: Liste der verwendeten Enzyme	27
Tabelle 14: Liste der verwendeten Plasmide.....	28
Tabelle 15: Liste der verwendeten Gel-Trennsysteme und Färbelösungen.	28
Tabelle 16: Schema zum enzymatischen Campher-Abbau.....	35
Tabelle 17: Schema zur Nutzung von elektrochemischen Formiat, 4-Methylacetophenon limitierend	35
Tabelle 18: Schema zur Nutzung von elektrochemischen Formiat, Formiat limitierend .	36
Tabelle 19: Schema zur Aktivitätsbestimmung der PpBDH_S146A/Y188T bei unterschiedlichem Puffer und pH.....	39
Tabelle 20: Schema zur Aktivitätsbestimmung der CbFDH wt bei verschiedenem Puffer und pH	39
Tabelle 21: Schema zur Aktivitätsbestimmung der CbFDH_C23S/C262A bei verschiedenem pH	40
Tabelle 22: Schema zur Aktivitätsbestimmung der ReADH bei unterschiedlichem pH...	40

Tabelle 23: Schema zur Kinetik-Bestimmung von CbFDH_C23S7/C262A mit (e)Formiat in unterschiedlichen Konzentrationen	40
Tabelle 24: Schema zur Kinetik-Bestimmung von CbFDH_C23S/C262A mit NAD ⁺ in unterschiedlichen Konzentrationen	40
Tabelle 25: Puffer und deren pH bei 50 °C, die zur Bestimmung des Puffereffektes an der AS-Kaskade beteiligten Enzyme verwendet wurden	41
Tabelle 26: Schema zur Bestimmung des Puffereffektes der PtKDGA	41
Tabelle 27: Schema zur Bestimmung des Puffereffektes der MjAIDH.....	41
Tabelle 28: Schema zur Bestimmung des Puffereffektes der AfAlaDH mit Hydroxypyruvat als Substrat.....	42
Tabelle 29: Schema zur Bestimmung des Puffereffektes der AfAlaDH mit Pyruvat als Substrat.....	42
Tabelle 30: Zusammensetzung der enzymatischen Reaktion für den Puls-Betrieb.....	44
Tabelle 31: Zusammensetzung der enzymatischen Reaktion für den kontinuierlichen Betrieb.....	45
Tabelle 32: Gemessene Aktivität der Enzyme PtKDGA, MjAIDH und AfAlaDH mit den in der Kaskade vorkommenden Substraten in Abhängigkeit des Puffers bei unterschiedlichen pH-Werten	54
Tabelle 33: Vergleich der kinetischen Daten der CbFDH_C23S/C262A bei Verwendung von Formiat,	66

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der „total turnover number“ (TTN)	5
Formel 2: Berechnung der Transformationseffizienz.....	30
Formel 3: Konzentrationsbestimmung vom gesamten NADH	38
Formel 4: Konzentrationsbestimmung von enzymatisch aktiven 1,4-NADH.....	38

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
1-(p-Tol)-EtOH	1-(p-Tolyl)-Ethanol
1,4-NADH	enzymatisch aktives NADH
3-MPA	3-Mercaptopropionsäure
4-MAP	4-Methylacetophenon
Abb.	Abbildung
AfAlaDH	Alanin Dehydrogenase aus <i>Archaeoglobus fulgidus</i>
Ag/AgCl	Referenzelektrode, Silber/Silberchlorid
AS	Aminosäuren
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
CbFDH	Formiat Dehydrogenase aus <i>Candida boidinii</i>
CBR	Lehrstuhl für Chemie Biogener Rohstoffe
cm	Zentimeter
CV	column volume (= Säulenvolumen)
d	Schichtdicke
ddH ₂ O	MilliQ-Reinstwasser
MilliQ-H ₂ O	
DNA	Desoxyribonukleinacid (= Desoxyribonukleinsäure)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ee	enantiomeric excess (= Enantiomerenüberschuss)
eFormiat	Formiat aus elektrochemischer CO ₂ Reduktion
et al.	et alii bzw. et aliae (= und andere)
f	Verdünnungsfaktor
FHG-SR	Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Standort Straubing

Abkürzungen

FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GDE	Gasdiffusionselektrode
GDH	Glukose Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
h	hora (= Stunde(n))
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kana	Kanamycin
kDa	Kilodalton
KDG	2-Keto-3-Deoxygluconat
KP _i	Kalium-Phosphat Puffer
L	Liter
LDH	Lactat Dehydrogenase
M	molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MG	Molekular Gewicht
min	Minute(n)
MjAIDH	Aldehyd Dehydrogenase aus <i>Methanocaldococcus jannaschii</i>
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid – allgemein alle Formen
NAD ⁺	oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NHE	Referenzelektrode, Normal Wasserstoff Elektrode
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD _x	Optische Dichte bei x nm
OPA	o-Phthaldialdehyde
PpBDH	Borneol Dehydrogenase aus <i>Pseudomonas putida</i>
PtKDGA	KDG Aldolase aus <i>Picrophilus torridus</i>
ReADH	Alkohol Dehydrogenase aus <i>Rhodococcus erythropolis</i>

Abkürzungen

rpm	revolutions per minute (= Umdrehungen pro Minute)
RT	Raum Temperatur
s.	siehe
SCE	Referenzelektrode, Saturated Calomel Electrode
sec	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
T _E	Transformationseffizienz
TIGR	Glyoxylat Reductase aus <i>Thermococcus litorialis</i>
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
VAPO	Viologen accepting pyridine-nucleotide Oxidoreduktases
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Oxidoreduktasen und ihre Cofaktoren

Die zunehmende Verknappung fossiler Ressourcen sowie die dringende Forderung nach einer Reduzierung der globalen Erwärmung hat das Interesse an vollständig nachhaltigen Produkten erheblich verstärkt. Daraus resultierend werden neuartige Produktionsverfahren benötigt, die die Umwandlung von Biomasse in Bulk- und Feinchemikalien unter Beachtung der Bedingungen grüner Chemie ermöglichen (Anastas und Warner 1998). Die Katalyse und insbesondere die Biokatalyse sind hierfür ein zentraler Schlüssel, um solche Prozesse zu erreichen. In diesen Bereich gehören die Enzyme, die Grundpfeiler der Biokatalyse, welche unter energieeffizienten, sanften sowie nachhaltigen Reaktionsbedingungen mit hohen Umsatzzahlen und einer hohen Selektivität arbeiten und daher zunehmend in industriellen Prozessen eingesetzt werden (Singh et al. 2016).

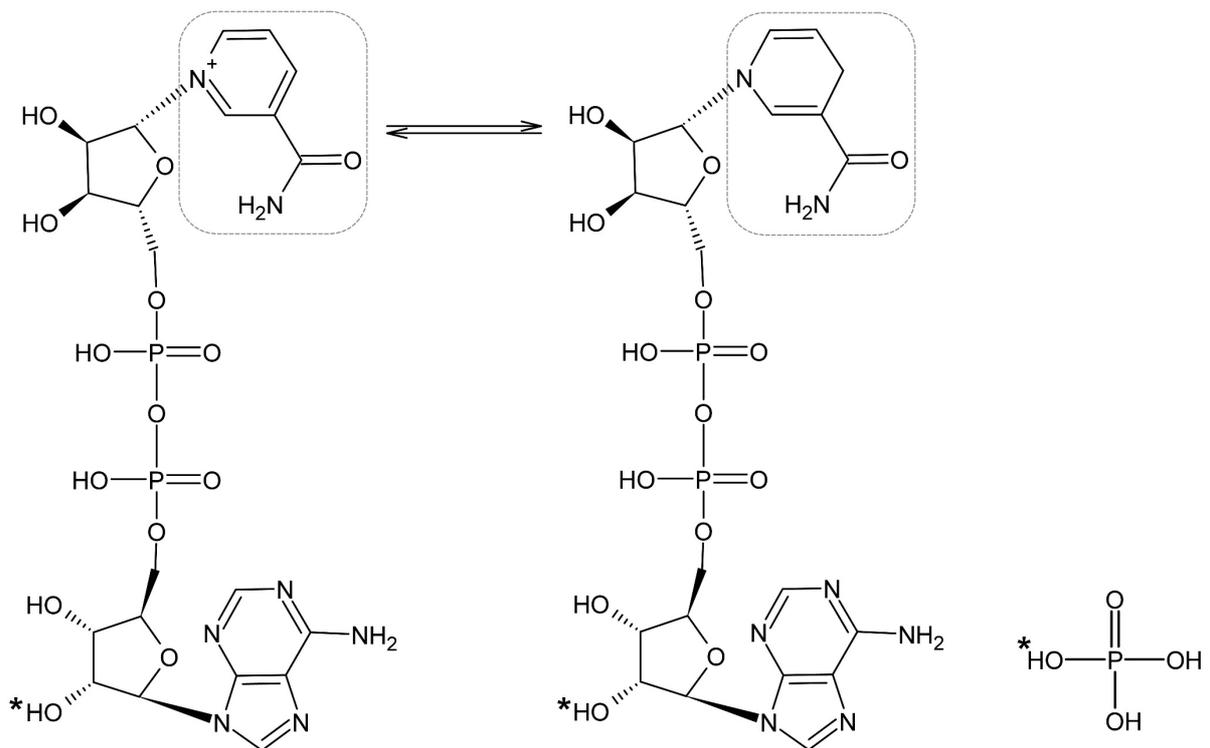
Enzyme werden, abhängig von der jeweiligen katalysierten Reaktionsart, in sieben verschiedene Klassen eingeteilt: Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen, Ligasen und Translokasen (Butterworth 2005; McDonald und Tipton 2021). Die Oxidoreduktasen werden in dieser Einteilung in der nominell ersten Gruppe klassifiziert und stellen mit einem Anteil von etwa 25 % die umfassendste Gruppe der Enzyme dar. In der Natur sind sie in zahlreichen Bereichen wie den Stoffwechselwegen der Glycolyse, dem Krebszyklus und der Photosynthese in den Chloroplasten zu finden. Außerdem sind sie an weiteren Elektronentransportketten, der oxidativen Phosphorylierung sowie Veränderungs- und Entgiftungsprozessen der Leber beteiligt. Durch die vielfältige Mitwirkung an beispielsweise asymmetrischen Reduktionen von Carbonylgruppen, Oxidationen von C-H Gruppen, Hydroxylierungen von Alkanen und Aromaten und Epoxidierungen von C=C Doppelbindungen ist diese Gruppe für die Synthese von Chemikalien von großem Interesse in Forschung und Industrie. Die Gruppe der Oxidoreduktasen kann noch weiter in u.a. Hydrogenasen, Dehydrogenasen, Oxygenasen und Oxidasen unterteilt werden. Hydrogenasen zählen zu den Metalloenzyme mit [NiFe], [FeFe] und [Fe] im aktiven Zentrum und katalysieren die reversible Oxidation von molekularem Wasserstoff (Lubitz et al. 2014). Dadurch bietet sich theoretisch ein Einsatz in Hydrogenase-Brennstoffzellen an, bei denen die chemisch gespeicherte Energie von Wasserstoff und Sauerstoff in elektrische Energie und Wasser umgewandelt wird. Das größte Problem stellt für diese Enzyme oxidativer Stress dar, beispielsweise verursacht durch die Gegenwart von Sauerstoff. Lösungsansätze für dieses Problem liegen hierbei in der kovalenten Bindung der Enzyme

direkt an der Elektrode sowie die Einbettung in spezielle Redox-Polymere (Hardt et al. 2021; Alonso-Lomillo et al. 2007; Rüdiger et al. 2005). Bei den Oxidoreduktasen stellen die Dehydrogenasen wiederum die umfangreichste Gruppe dar, die bezüglich der Struktur und Funktion divers auftreten, zahlreiche metabolische Schlüsselreaktionen katalysieren und für asymmetrische Synthesen sehr sinnvoll sind (May und Padgette 1983; Stewart 2001). In umgekehrten Dehydrierungsreaktionen können diese Enzyme die prochiralen Aldehyde und Ketone mit einer hohen Enantioselektivität von häufig mehr als 90 % zu chiralen Alkoholen, Hydroxygruppen, Aminosäuren und ähnlichem umwandeln (Stewart 2001).

Trotz ihrer vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten und den mannigfaltigen Enzymzentren sind die Oxidoreduktasen im Allgemeinen noch davon entfernt, den generellen Standard im großtechnischen Synthesebereich darzustellen (Hollmann et al. 2011; Wu et al. 2013; McDonald et al. 2009). Um ihren biokatalytischen Aufgaben wie dem Transport von Elektronen, Wasserstoff, Sauerstoff oder weiteren Atomen oder Molekülen nachzukommen, benötigen Oxidoreduktasen häufig Cofaktoren bzw. Coenzyme (Wichmann und Vasic-Racki 2005). Diese Aufgabe können unterschiedlichste Verbindungen wie beispielsweise Vitamine, Adenosin-5'-mono/di/tri-Phosphate (AMP/ADP/ATP), Ubiquinone (CoX), Flavin-nucleotide (FMN) oder Adenindinucleotide (NAD(P)(H)) übernehmen (McDonald et al. 2009). AMP/ADP/ATP sind für die Anwendung in industriellen *in vitro* Prozessen schwierig, da die daran beteiligten Reaktionsnetzwerke zu komplex für die großtechnische Anwendungen sind (Wichmann und Vasic-Racki 2005). Ebenso werden CoQ, FMN und die Vitamine nur vereinzelt im biosynthetischen Bereichen genutzt. Die Cosubstrate Nicotinamidadenindinucleotid (NAD(H)) und Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADP(H)) wiederum sind in ihrer Nutzung signifikant, wobei 10 % der Oxidoreduktasen die phosphorylierte und 80 % die nicht phosphorylierte Form verwenden (Wu et al. 2013). Insgesamt sind ca. 700 Redoxenzymklassen bekannt, welche NAD(P) als Cofaktor nutzen (Ullah et al. 2015). Die beiden Cofaktoren NAD(H) und NADP(H) besitzen hierbei das identische Redoxpotential und unterscheiden sich lediglich in einer zusätzlichen Phosphatgruppe am C2 des Riboserings des Adenosins. Die zentrale Reaktion findet an der C4 Pyridinringstelle statt, wobei es sich bei der oxidierten Form um NAD⁺ bzw. NADP⁺ und bei der reduzierten um NADH bzw. NADPH handelt.

1.2 Nicotinamidadenindinukleotide

Die Benennung der Nicotinamidadenindinukleotide ist in der Literatur nicht durchgehend konsistent. Sind beide Formen gleichwertig gemeint, so werden sie im Rahmen dieser Arbeit als NAD aufgeführt. Die oxidierte Form wird dabei als NAD⁺ bezeichnet, das reduzierte Pendant als NADH. Ist NADH nicht näher definiert, so ist die enzymatisch aktive Form, das 1,4-NADH, damit gemeint. Die davon abweichenden Isomere C2 und C6 werden als 1,2-NADH und 1,6-NADH bezeichnet, die möglichen Dimere im Gesamten als NADH-Dimer.



NAD⁺

C₂₁H₂₈N₇O₁₄P₂

CAS: 53-84-9

MG: 663,43 g/mol

1,4-NADH

C₂₁H₂₉N₇O₁₄P₂

CAS: 58-68-4

MG: 665,45 g/mol

NADP

C₂₁H₂₉N₇O₁₇P₃

CAS:53-59-8

MG: 744,41 g/mol

Abbildung 1: Molekulare Struktur von NAD⁺ (links) und NADH (Mitte).

Im Kasten ist das Pyridinringsystem markiert, an dem die zentrale Reaktion zwischen oxidiertem und reduziertem Form stattfindet. Wird die mit dem Stern* markierte OH-Gruppe durch eine Phosphatgruppe (rechts) ersetzt, so ergibt sich die molekulare Struktur von NADP⁺/NADPH.

NAD ist ein zwei Elektronen und ein Proton Redox-Überträger, dessen Zwischenstufen nicht isoliert verfügbar sind und das formal als Hydrid-Überträger betrachtet werden kann. Die molekularen Strukturen sind in Abbildung 1 dargestellt. Die Struktur besteht hierbei

aus zwei Teilen. Der Nicotinamid-Teil stellt die essenzielle Funktionalität für die Reaktion bereit, wobei der Adenosin-Dinucleotid-Teil die Rezeptor-Liganden-Erkennung beheimatet (Knaus et al. 2016; Wang et al. 2019). In der oxidierten Form ist NAD⁺ ein Elektronenakzeptor mit einer formalen positiven Ladung am quartären Stickstoff des Nicotinamid-Ringes und zwei ionisierbaren Hydroxylgruppen an der Diphosphat-Gruppe. Der pK_a dieser beiden Gruppen liegt bei 2,4 bzw. 6,6 (Morrison et al. 2018). *In vivo* durchläuft der Cofaktor auf Grund der vorherrschenden niedrigen NAD Konzentration einen reduziert-oxidierten Kreislauf in der Größenordnung von 10³ – 10⁵ Zyklen (Angelastro et al. 2017; Ströhle et al. 2016).

Die Verwendung von NAD bei *in vitro* Enzymreaktionen bringt verschiedene Herausforderungen mit sich. Die reduzierte Form NADH ist ein instabiles Reagens, sowohl in Bezug auf die Lager- oder Reaktionstemperatur als auch bei pH-Werten jenseits des neutralen Bereiches (Rover Júnior et al. 1998; Fawcett et al. 1961). Besonders gilt dies für den sauren Bereich, weshalb eine Lagerung des gelösten Reagenzes bei einem leicht basischen pH von 7,5 – 8,0 empfohlen wird (Wu et al. 1986; Gallati 1976). Insgesamt hat der pH einen höheren Einfluss auf den Zerfall als die Temperatur, wobei auch die Temperatur beispielsweise bei NADPH sich deutlich auswirkt (Wu et al. 1986; Burton und Kaplan 1963a; Burton und Kaplan 1963b). So nimmt die Halbwertszeit einer NADPH Lösung von acht Stunden bei 19 °C auf eine Stunde bei 41 °C deutlich ab (Wu et al. 1986). Eine umfassende Übersicht zur Stabilität von NAD gegenüber unterschiedlichster Puffer und Säuren zeigen Chenault et al. auf (Chenault und Whitesides 1987). Gerade in Bezug auf den Einsatz in isolierten Enzymreaktionen stellt der Cofaktor einen deutlichen Kostenfaktor dar. Zum einen ist der Preis für NADH etwa dreimal so hoch wie für NAD⁺, wodurch der direkte Starteinsatz der reduzierten Form in einer Reaktion unattraktiv wird. Des Weiteren zeigt der Vergleich der Kosten von Reaktion und Produkt die ökonomische Wichtigkeit der Regeneration nochmals deutlich auf. Der Großhandelspreis für ein Mol NADH liegt aktuell bei etwa 3000 €, während die Produkte häufig einen deutlich geringeren Wert besitzen, beispielsweise bei der Aminosäure L-Alanin nur 40 €/mol oder enantiomerenreines (-)-Campher 350 €/mol (Faber 2011; L-Alanine - Alfa Aesar 2022; (-)-Camphor - Alfa Aesar 2022). Die Regeneration muss somit in diesen beiden beispielhaften Fällen min. 85 mal bis 750 mal erfolgen, damit der benötigte Cofaktor theoretisch nur 10 % vom Produktwert ausmacht. Besonders aus diesem Grund der teuren und komplexeren Anwendung der Cofaktor-abhängigen Enzyme liegen diese in der industriellen Nutzung noch deutlich hinter den Cofaktor-unabhängigen Enzymen, wie beispielsweise Hydrolasen, zurück (Kirk et al. 2002; Beilen und Li 2002).

Um bei der Verwendung von NAD nutzenden Enzymen dennoch eine ausreichende Marge zu erreichen, finden sie vorzugsweise bei diagnostischen Tests Verwendung. Diese erreichen grundsätzlich einen ausreichend hohen Verkaufspreis und da es bei diesen häufig um die Messung der NADH Konzentration geht, ist eine Regeneration nicht nötig. Folglich liegt die Gewinnspanne in völlig anderen Bereichen als bei der Synthese von Feinchemikalien (Raja et al. 2010). Die Herausforderungen der künstlichen Regeneration kann man durch die Verwendung von Ganzzellkatalyse umgehen, da metabolisch aktive Zellen sich in gewisser Weise selbständig um die Nicotinamid-Cofaktoren kümmern (Straathof et al. 2002). Dem steht gegenüber, dass mögliche Nebenreaktionen durch andere Reduktasen mit einer unterschiedlichen Stereoselektivität durch die Verwendung von gereinigten Enzymen unterbunden werden und die Ganzzellkatalyse in manchen Fällen auch schlicht nicht möglich oder sinnvoll ist. Zusätzlich wird der beteiligte Mechanismus für die NAD-Reaktion als gut verstanden betrachtet, wodurch sich zahlreiche *in vitro* Regenerationsmöglichkeiten ergeben. Das allgemeine Ziel hierbei muss somit unter anderem in der möglichst häufigen Wiederverwendung des Cofaktors liegen, um den oben aufgezeigten Kostenanteil gering zu halten. Diese Wiederverwendung wird häufig in Form von beispielsweise der „total turnover number“ (Formel 1) angegeben, welcher für die kommerzielle Implementierung einen Wert von 1000 überschreiten sollte (Wandrey 2004).

$$\text{TTN} = \frac{\text{umgesetztes Substrat [mol]}}{\text{eingesetzten Katalysator [mol]}}$$

Formel 1: Berechnung der „total turnover number“ (TTN)

1.3 Allgemeine Methoden zur Regeneration des Cofaktors NADH

Aus den oben genannten Gründen sind Forschung und schlussendlich auch Industrie weiterhin stark an Cofaktor-Regenerierungsmethoden für das reduzierte Nicotinamidadenindinukleotid interessiert. Die klassisch zur Anwendung kommenden Verfahren werden im Allgemeinen in vier unterschiedliche Bereiche eingeteilt: enzymatische-, chemische-, photokatalytische- und elektrochemische Regenerationsmethoden. Einen allgemeinen Überblick der jeweiligen Vor- und Nachteile bietet hierfür Tabelle 1. Mittlerweile ist eine nahezu unüberschaubare Menge an Varianten beschrieben, die sich zum Teil klar einer Gruppe zuordnen lassen, zum Teil aber auch übergreifend eine Mischung innerhalb der vier großen Fachgebiete darstellen. Hierzu wurden bereits zahlreiche Übersichtsartikel veröffent-

licht, wovon manche alle Bereiche betrachten und andere sich gezielt auf ein Gebiet fokussieren (Wang et al. 2017; Hollmann et al. 2010; Weckbecker et al. 2010). Eine universale Lösung für die jeweilige produktgenerierende Enzymreaktion gibt es dabei nicht. Es ist immer eine Abwägung und Anpassung notwendig. Im Folgenden werden die wichtigsten Erkenntnisse aus den einzelnen Gebieten mit Beispielen aufgeführt, wobei das Hauptaugenmerk auf enzymatischen und elektrochemischen Methoden liegt.

Tabelle 1: Allgemeiner Überblick über Vor- und Nachteile von Cofaktor Regenerationsmethoden

Methode	Vorteile	Nachteile
Enzymatisch	<ul style="list-style-type: none">- Hohe TTN- Keine NADH-Nebenprodukte- Milde Reaktionsbedingungen- Kombination mit produktgenerierenden Enzymen gut möglich	<ul style="list-style-type: none">- Stabilität- Kosten- Ggf. Enzympräparation- Auftreten von Cosubstraten und Coprodukten
Elektrochemisch	<ul style="list-style-type: none">- Nutzung von erneuerbaren Energien- direkte Nutzung von Elektronen	<ul style="list-style-type: none">- Auftreten von NADH Nebenprodukte- Ggf. Notwendigkeit von zusätzlichen Mediatoren und Enzymen
Chemisch	<ul style="list-style-type: none">- Grundlage für andere Regenerationsmethoden	<ul style="list-style-type: none">- Enzyminaktivierung durch Salze- Niedrige TTN
Photokatalytisch	<ul style="list-style-type: none">- Direkte Nutzung von Solar-energie	<ul style="list-style-type: none">- Geringe TTN- Komplexer Aufbau durch zusätzliche Mediatoren und Photosensitizer

1.3.1 Chemische Regeneration

Bei der rein chemischen Regeneration werden Salze oder Cofaktor-Analoga genutzt, die durch ihr jeweils hohes Redoxpotential in der Lage sind, NAD^+ zu reduzieren, aber nicht in Form eines Katalysators verwendet werden können. Ermittelt wurden hierbei Substanzen wie die Salze Natriumdithionit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, Natriumborhydrid NaBH_4 oder verschieden funktionalisierte 1,4-Dihydropyridine (Jones et al. 1972; Taylor und Jones 1976). Da sie zusätzlich Nachteile wie eine geringe TTN oder eine notwendige hohe Salzfracht mit sich

bringen, die den Enzymen schaden, haben sie heute keinerlei Bedeutung mehr für die Regeneration (Wu et al. 2013).

Eine zweite Gruppe für die chemische Regeneration besteht aus homogenen Katalysatoren und Organometall-Komplexen, die häufig Wasserstoff als Hydrid-Quelle nutzen (Maenaka et al. 2012; Abril und Whitesides 1982). Die zentralen Elemente der Organometallkomplexe sind hierbei überwiegend Rhodium, Ruthenium, Indium und Platin, die in Strukturen wie beispielsweise in Pentamethylcyclopentadienylrhodiumbipyridin-Komplexen $[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{Cl}]^+$ oder in Pt-Carbonyl-Clustern eingelagert werden (Maenaka et al. 2012; Canivet et al. 2007; Abril und Whitesides 1982). Der große Vorteil der Rh-Komplexe, die im Bereich der spezifischen Katalysatoren am häufigsten zum Einsatz kommen, liegt in der ausschließlichen katalytischen Bildung von 1,4-NADH. Dies entspricht dem Anforderungsprofil an einen erfolgreichen NAD-Redox-Katalysator, keine frei verfügbaren Radikale zuzulassen, sondern zeitnah die beiden erforderlichen Elektronen übertragen zu können (Steckhan 1994). Auch Komplexe mit anderen Metallen und 1,10-Phenanthrolin als Chelatbildner könnten diese katalytische Fähigkeit aufweisen, allerdings mit niedrigen TTN (Canivet et al. 2007). Die häufig auftretende Toxizität der Organometall-Komplexe für Enzyme stellt hierbei eine weitere Herausforderung bei der Nutzung dar (Quinto et al. 2014). Aktuell werden die Rh-Komplexe als Katalysatoren am häufigsten eingesetzt und nehmen auch im Vergleich mit anderen Regenerationsmöglichkeiten eine zentrale Rolle ein. Allerdings ist die Stabilität dieser Katalysatoren noch zu niedrig, um sie als wirklichen Durchbruch bei der Anwendung als Regenerationsmediator zu feiern. Einen guten Überblick über diese Organometall-Komplexe in ihrer Aufgabe als Transfer-Hydrierungs-Katalysator bietet Noffke et al. und fokussiert auf verschiedenen Rh-Komplexe Hollmann et al. (Noffke et al. 2012; Hollmann et al. 2010).

1.3.2 Photokatalytische Regeneration

Im Vergleich zur rein chemischen Regeneration ist die photokatalytische Regeneration ein neueres Forschungsfeld. In der Natur besteht mit der Photosynthese der Pflanzen schon seit Millionen von Jahren ein ausgereiftes System, bei dem die Energie des Lichts eingelagert und als NADH gespeichert wird, um schlussendlich im Calvin Zyklus aus CO_2 und H_2O Kohlenhydrate zu erzeugen (Kim et al. 2012). Für die *in vitro* Regeneration kommen hierfür sowohl organische als auch anorganische Photosensitizer zur Anwendung. Dabei ist besonders deren Funktion bei sichtbarem Licht, deren Stabilität und die Funktion als Elektronenmediator ein wichtiges Auswahlkriterium (Jiang et al. 2005; Shi et al. 2006). Die

Photosensitizer nutzen das Licht, um Elektronen an einen Elektronen-Mediator weiterzugeben, der schlussendlich die NADH-Regenerierung durchführt. Für diese abschließende Aufgabe wird häufig auf die bei den chemischen Katalysatoren vorgestellten Organometallkomplexe, wie beispielsweise die Rh-Komplexe, zurückgegriffen.

1.3.2.1 Organische Photosensitizers

Für die organischen Photosensitizer gibt es einige Beispiele, die komplexe und aufwendige Molekülstrukturen aufweisen und häufig eine fehlende Haltbarkeit bei der Anwendung zeigen. Wienkamp et al. zeigten als eine der Ersten, dass sich der chemische Katalysator $[\text{Rh}(\text{byp})_3]^{2+}$ in Kombination mit Triethanolamin als Elektronenspender auch als photoaktiver Katalysator zur Regeneration einsetzen lässt (Wienkamp und Steckhan 1983). Ein aktuelleres Beispiel stammt von Kim et al., bei dem Diphenylalanine und Tetra(phyroxyphenyl) sich eigenständig zu Licht sammelnden Nanoröhrenpeptiden anordnen, welche Ähnlichkeit in der Struktur und elektrochemischen Funktion mit dem natürlichen Photosystem I aufweisen (Kim et al. 2012). Werden diese Nanoröhren an der Oberfläche noch mit Platin-Nanopartikeln versehen, so können die nötigen Elektronen auf einen $\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})$ -Komplex übertragen werden, der die Aufgabe als Elektronen-Mediator übernimmt und so das NADH regenerieren kann (Kim et al. 2012). Ein weiteres Beispiel für den Photosensitizer ist die kovalente Bindung zwischen chemisch veränderten Graphen und Multianthraquinon substituierten Porphyrin, welches wiederum die Elektronen auf einen Rh-Komplex übertragen kann (Yadav et al. 2012). Letztendlich wurde dieses NADH-Regenerationssystem genutzt, um mittels Formiatdehydrogenase (FDH) aus CO_2 Formiat zu bilden (Yadav et al. 2012).

1.3.2.2 Anorganische Photosensitizers

Titandioxid bildet die Grundlage einer größeren Gruppe an anorganischen Photokatalysatoren. In Kombination mit EDTA als Elektronenspender kann bereits die Grundsubstanz eingesetzt werden, um Elektronen auf einen Rh-Komplex zu übertragen und dadurch der Regeneration zur Verfügung zu stellen (Chen et al. 2006). Auf Basis dessen gibt es Weiterentwicklungen des TiO_2 , beispielsweise TiO_2 -CdS Nanoröhren oder eine mit Dopamin versehenen TiO_2 - Nanoporenfilm auf einer Indium-Zinnoxid Elektrode und noch einige weitere Modifikationen (Wang et al. 2009; Ryu et al. 2011). Auch die Verbindung mit Graphen wird aktiv erforscht (Xiang et al. 2012). Eine andere Möglichkeit bietet der Photokatalysator $\text{W}_2\text{Fe}_4\text{Ta}_2\text{O}_{17}$. Bei Einsatz mit EDTA als Elektronendonator kann dieser einen Rh-Komplex reduzieren. Diese Variante zeigt im Gegensatz zu TiO_2 eine bessere katalytische Effizienz und konnte bereits zur Bildung von L-Glutamat erfolgreich eingesetzt werden (Park et al. 2008).

1.3.3 Enzymatische Regeneration

Die Verwendung von Enzymen ist bislang die am häufigsten in der Literatur angewendete Methode und die einzige, die auch großtechnisch angewendet wird (Paul et al. 2018; Shin et al. 2006). Enzyme bieten den großen Vorteil, dass beim Regenerationsvorgang das Hydrid direkt ohne Mediator übertragen werden kann und immer nur das durch Enzyme nutzbare 1,4-NADH entsteht. Dennoch gibt es aber auch zahlreiche Herausforderungen, die vor allem in der für Enzyme typischen Eingrenzung der nutzbaren Medien, des pH-Bereiches, der Temperatur und ähnlichen Parametern liegt, wobei im Allgemeinen milde Bedingungen benötigt werden. Kommt es zur Kombination mehrere verschiedener Enzyme und Reaktionsschritte, so sind die individuell von den Enzymen vorgegeben Bedingungen ein gewichtiger Einflussfaktor (Wu et al. 2013; Hollmann et al. 2010; Faber 2011; Górecki 2015).

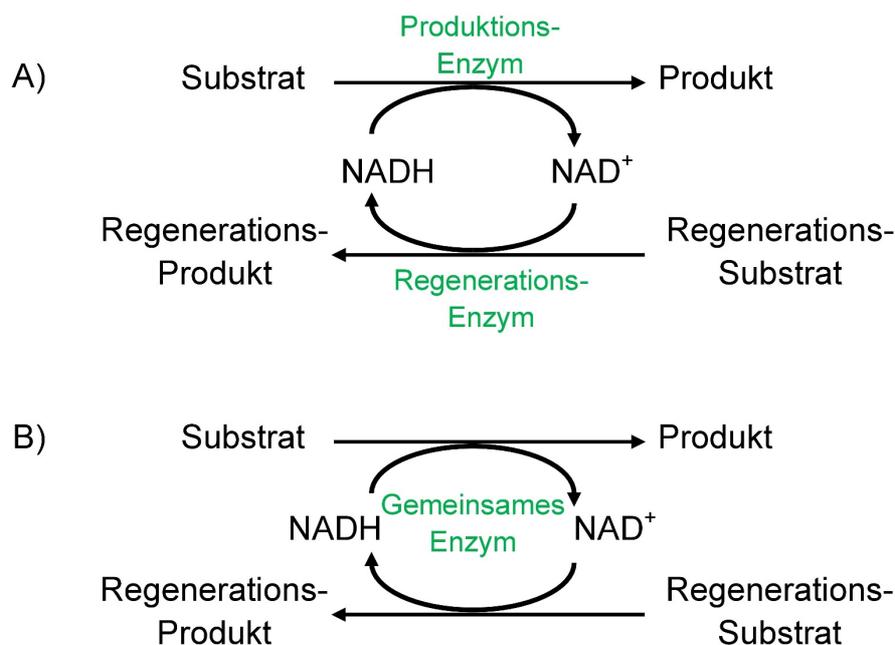


Abbildung 2: Einteilung der enzymatischen Regeneration in zwei unterschiedliche Systeme

Bei System A) wird zusätzlich zu der produktgenerierenden Enzymreaktion eine weitere, eigenständige Enzymreaktion mit eigenem Substrat und Enzym gekoppelt. Bei System B) übernimmt ein Enzym sowohl die produktgenerierende als auch regenerierende Reaktion.

Die enzymatische Regeneration kann in zwei Vorgehensweisen unterteilt werden. Bei der ersten Variante gibt es das produktbildende Enzym, welches NADH verbraucht und unabhängig davon das zweite, regenerierende Enzym mit eigenem, nicht primär benötigtem Produkt (s. Abbildung 2, A). Die zweite Variante besitzt nur ein einzelnes Enzym, welches mit unterschiedlichen Substraten arbeitet und somit gewissermaßen selbständig für die

NADH-Regeneration sorgt (s. Abbildung 2, B). Diese Nutzung des identischen Enzymes ist eine sehr elegante Möglichkeit, die allerdings nur selten zum Zug kommt. Ein Beispiel hierfür ist die Bildung der pharmazeutischen Vorstufe (S)-2-bromo-2-cyclohexen-1-ol mittels Alkoholdehydrogenase (ADH), bei der zur Regeneration 2-Propanol als Hydrid-Donor eingesetzt wird (Calvin et al. 2012). Die große Herausforderung bei dieser Methode liegt unter anderem im kinetischen Verhalten des gewählten Enzyms, um beide Reaktionen im benötigten Umfang stattfinden zu lassen.

Im Gegensatz zur Methode mit nur einem Enzym ist die Nutzung von zwei unterschiedlichen Enzymreaktionen in einem Reaktionsansatz weiter verbreitet. Hierbei wird häufig eine Dehydrogenase verwendet, die das benötigte Hydrid zur NAD^+ Reduktion aus einem günstigen Ausgangsmolekül herauslöst. Zu den ersten Verfahren der enzymatischen Herstellung von NADH aus NAD^+ gehört die Verwendung von einer ADH mit Ethanol als Substrat (Rafter und Colowick 1969). Die zur Regeneration in kommerziellen Prozessen verwendeten Enzyme sind aktuell die Glucose-Dehydrogenase (GDH) und favorisiert die Formiat-Dehydrogenase (FDH). Die FDH katalysiert die Oxidation von Formiat zu CO_2 unter gleichzeitiger Regeneration von NAD^+ zu NADH. Der bedeutende Vorteil dieser Reaktion liegt in der Bildung von CO_2 als Produkt, welches chemisch inert und gasförmig vorliegt und somit leicht aus dem Reaktionsansatz entfernt werden kann. Die Nutzung von Formiat zur Cofaktor-Regeneration durch die FDH wurde erstmals von Shaked et al. im größeren Maßstab beschrieben (Shaked und Whitesides 1980). Das Formiat als Substrat beeinflusst die meisten anderen Enzyme, die für die eigentliche Produktgenerierung eingesetzt werden, nicht. So wird die FDH zur NADH-Regeneration bereits industriell genutzt, um beispielsweise mittels Leucin-Dehydrogenase jährlich mehrere Tonnen an L-Leucin zu produzieren (Schmid et al. 2002). Für die Regeneration im Labormaßstab sind weiterhin beispielsweise die Phosphit-Dehydrogenase (PDH), Alkoholdehydrogenasen (ADH) und die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase erprobt (Hollmann et al. 2011; Shaked und Whitesides 1980). Eine komplexere Weiterentwicklung und somit eine weitere Variante liegt in dem „closed loop“ oder auch „self sufficient“ Aufbau der Regeneration. Hierbei sieht, auf die Regeneration allein fokussiert, die Aufteilung ebenfalls wie System A) aus, also mit zwei Enzymreaktionen und zwei Substraten. Betrachtet man allerdings das Gesamtsystem zeigt sich, dass für die Produktion des gewünschten Endproduktes beide Reaktionen benötigt werden und das Produkt der ersten enzymatischen Reaktion von der zweiten Reaktion als Substrat benötigt wird. Daher leiteten sich auch die beiden Bezeichnungen für diesen Aufbau ab, da im Laufe der Gesamtreaktion die Cofaktorregeneration in einem

geschlossenen Kreislauf selbständig erfolgt und kein zusätzliches Cosubstrat ausschließlich für die Regeneration benötigt wird (Sperl und Sieber 2018; Hummel und Gröger 2014).

1.3.4 Elektrochemische Regeneration

Die elektrochemische Regeneration wird als zukunftssträchtige Variante gesehen, da in der Theorie nur der benötigte Strom laufende Kosten verursacht, die Reaktion leicht zu verfolgen ist und das Redox-Potential und somit die ablaufenden Reaktionen kontrollierbar ist (Sheldon 2007; Wichmann und Vasic-Racki 2005). Da die Elektronen direkt zur Verfügung gestellt werden, wird kein Cosubstrat benötigt und der damit zusammenhängende E-Faktor fällt somit niedrig aus. Die elektrochemische Regeneration kann in drei Methoden unterschieden werden, die in Abbildung 3 dargestellt sind, wobei die benötigten Protonen jeweils aus dem Elektrolyten stammen (Quinto et al. 2014). Die Unterteilung erfolgt in eine direkte-, indirekte- und enzymatisch gekoppelte Regenerationsmethode (Immanuel et al. 2020; Lee et al. 2021).

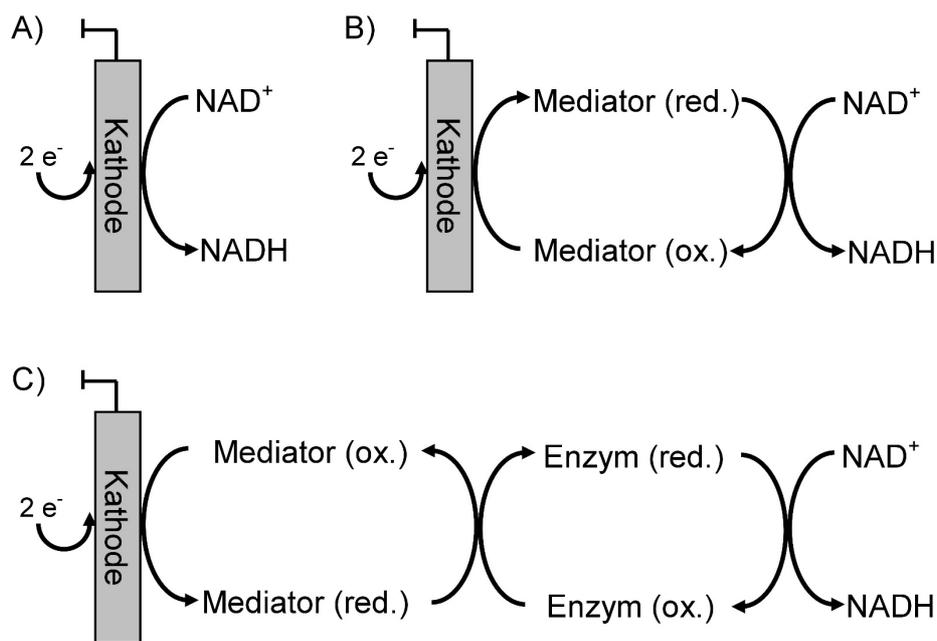


Abbildung 3: Allgemeine Unterteilung der drei verschiedenen elektrochemischen Regenerationsverfahren

A) direkte Regeneration; B) indirekte/ Mediator-gestützte Regeneration; C) enzymgekoppelte, indirekte Regeneration

Bei der direkten Regeneration (s. Abbildung 3, A)) werden die Elektronen direkt von der Elektrodenoberfläche auf das NAD⁺ übertragen. Dabei werden sowohl blanken als auch auf der Oberfläche modifizierte Elektroden aus unterschiedlichsten Metallen oder Kohlenstoffverbindungen genutzt. Der große Vorteil von blanken, nicht modifizierten Elektroden stellt

die leichte Anwendbarkeit zur Reduktion von NAD^+ dar. Es werden grundsätzlich außer einer obligatorischen Elektrodenreinigung hierfür keine weitere Aufarbeitungsschritte benötigt, wengleich sich in der Literatur bei Anwendung dieser Methode auch ein sehr breit gefächertes Bild ergibt. Kupfer als Arbeitselektrodenmaterial wurde beispielsweise mit 54 % aktivem NADH bei einer Spannung von $-1,1 V_{\text{Ag/AgCl}}$ getestet (Barin et al. 2017). Kupfer- und Gold-Elektroden in Phosphatpuffer pH 7,0 ergaben als Fazit, dass Ausbeute und Qualität entgegengesetzt korrelieren (Damian et al. 2007). So konnten die höchste Reduktion von NAD^+ bei hohen Überpotenzialen von $-1,2 V_{\text{SCE}}$ festgestellt werden, allerdings mit dem jeweils niedrigsten Anteil an 1,4-NADH von 27,7 % für die Goldelektrode und 51,8 % für Kupfer. Diese Anteile konnten bei $-1,0 V_{\text{SCE}}$ auf 75,2 % bzw. 70,9 % gesteigert werden, wohingegen der Umsatz laut den angegebenen Absorptionswerten beim Kupfer um etwa 50 % und beim Gold um sogar etwa 90 % sank. Bei $-1,1 V_{\text{SCE}}$ wurde ein Anteil an aktivem NADH an der Kupfer-Elektrode im selben Bereich wie bei Barin et al. angegeben. Mit Glaskohlenstoff konnte auch ein Nichtmetall untersucht werden (Ali et al. 2011). In dieser Publikation wurden nur Angaben zum 1,4-NADH-Anteil gemacht und entgegen der Beobachtung von Damian et. al stieg allerdings der Anteil mit einem höheren Überpotential auf bis zu 98 % bei $-2,3 V_{\text{MSE}}$. Beim Test der Edelmetalle Gold und Platin bei $-1,4 V_{\text{Ag/AgCl}}$ bzw. $-0,7 V_{\text{Ag/AgCl}}$ erfolgte das Resultat, dass Platin mit einem Anteil von etwa 50 % 1,4-NADH NAD^+ reduzierte und das Gold bei dem gewählten Potentialbereich keinerlei reduzierende Eigenschaften auf das NAD^+ ausübte (Baik et al. 1999). Titan gehört wiederum zu den Metallen, die ihre beste 1,4-NADH-Ausbeute bei niedrigen Überpotentialen wie 96 % +/- 2,6 % bei $-0,8 V_{\text{NHE}}$ zeigen (Ali et al. 2014). Bei Cadmium ist es gegenläufig, die beste Ausbeute liegt also bei einem höheren Überpotential von $-1,5 V_{\text{NHE}}$ mit ebenfalls hohen 93 % +/- 1,3 % (Ali et al. 2014). Bei den Metallen Cobalt und Nickel konnte dagegen kein linearer Zusammenhang festgestellt werden. Cobalt zeigt eine 1,4-NADH Spitze bei $-0,9 V_{\text{NHE}}$ mit einem ein Maximum von 82 % +/- 1,9 %. Für Nickel wurde eine Art Plateau zwischen $-0,9 V_{\text{NHE}}$ und $-1,3 V_{\text{NHE}}$ mit dem Maximum von 92 % bei $-1,3 V_{\text{NHE}}$ beschrieben (Ali et al. 2014). Es zeigt sich somit, dass die direkte Regeneration neben dem großen Vorteil des kostengünstigen Einsatzes allerdings auch einen Verlust des NAD zu enzymatisch inaktiven Nebenprodukten mit sich bringt.

Eine Weiterentwicklung bildet die indirekte (katalysierte) Regeneration (s. Abbildung 3, B)), bei der zum Senken des benötigten Überpotenzials für den Elektronenübertrag ein Mediator zwischengeschaltet wird. Dabei werden, analog zur chemischen Regeneration, zum Teil unterschiedliche Rh-Komplexe verwendet (Ganesan et al. 2017). Zu den zuerst verwendeten gehört ein $[\text{Rh}(\text{byp})_3]^{3+}$ -Komplex in Kombination mit einer Graphit-Elektrode,

wodurch das benötigte Überpotenzial um 250 mV gesenkt und so die Entstehung von unerwünschten Nebenprodukten verringert werden konnte (Wienkamp und Steckhan 1983). Die Kombination aus Silizium-Nanokabeln als Elektrode mit $\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{byp})$ senkte die Bildung inaktiver Produkte nochmals (Zhang et al. 2020). Die Rh-Katalysatoren dieser zweiten Generation wiesen allerdings nur eine Umsatzrate von 113 Umsätzen in der Stunde auf, wodurch eine Notwendigkeit zur fortführenden Entwicklung ersichtlich wird (Hildebrand et al. 2008). Weitere Varianten arbeiten mit anderen metallbasierenden Katalysatoren oder Elektroden wie unter anderem Eisen, Platin-Gold oder Indium und weiteren elektroaktiven Substanzen wie Tetracyanoquinodimethan, Tetrathiafulvalen und Dimethyl-Ferrocen (Damian et al. 2007; Fukuzumi et al. 2008; Maenaka et al. 2012; Pandey et al. 1998). Dies zeigt, dass die indirekte, elektrochemische Regeneration eigentlich auf der Grundlage der chemischen Katalyse aufbaut, die durch die elektrochemische Elektronenbereitstellung modifiziert wird.

Die letzte Ausbaustufe ist die enzymgekoppelte, indirekte, elektrochemische Regeneration (s. Abbildung 3, C)), bei der das indirekte elektrochemische Redoxsystem zusätzlich mit einem enzymatischen vereint wird. Verwendete Enzyme müssen für diese Anwendung dazu fähig sein, die beiden Elektronen einzeln vom Mediator zu empfangen und in nur einem Schritt an das NAD^+ abzugeben (Steckhan 1994). Durch den enzymatischen Schritt wird die Bildung von Nebenprodukten vermieden. Es werden Mediatoren mit einem geringen Molekulargewicht genutzt, die ein Elektron übertragen und dieses von der Kathode zur aktiven Seite des Enzyms transportieren (Bus et al. 1976). Ein Beispiel hierfür ist das Viologen, welches die drei Hauptoxidationsstufen $\text{V}^{2+} \rightleftharpoons \text{V}^{+\cdot} \rightleftharpoons \text{V}^0$ aufweist (siehe Abbildung 4). Der erste Reduktionsvorgang von $\text{V}^{2+} \rightleftharpoons \text{V}^{+\cdot}$ ist hierbei sehr gut und häufig wiederholbar reversibel und wird daher gerne als Mediator zur Elektronenübertragung eingesetzt (Bird und Kuhn 1981).

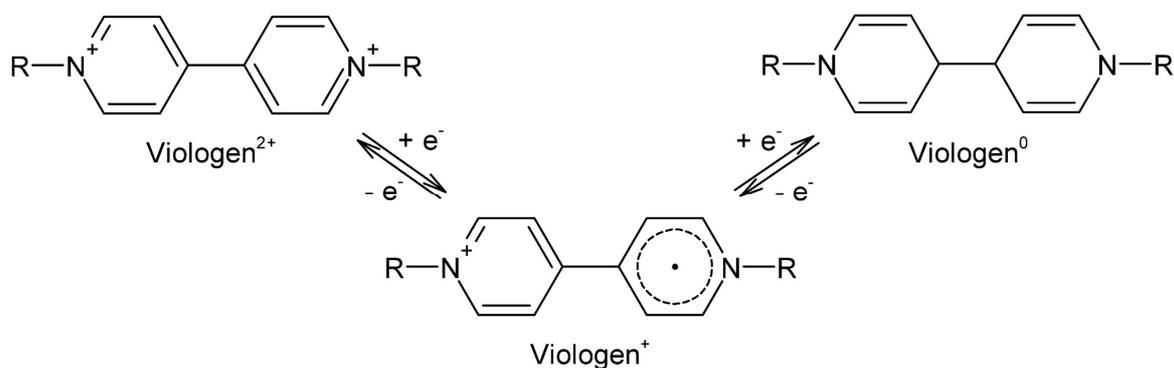


Abbildung 4: Reaktion der drei Viologen-Hauptoxidationsstufen

Bei den Enzymen wiederum kommen beispielsweise Lipoamid-Dehydrogenasen (Diaphorasen), Enolat-Reduktasen oder sogenannte VAPOR-Enzyme (Viologen accepting pyridine-nucleotide oxidoreductases) zur Anwendung (Dinh et al. 2016; Günther et al. 1990; Shaked et al. 1981; Thanos und Simon 1987). Erstmals erwähnt wurde eine elektroenzymatische Kombination zur NADH-Regeneration bereits im Jahr 1981, bei der die Elektronen auf u.a. Methylviologen und mittels Lipoamidedehydrogenase auf NAD⁺ übertragen wurden (Shaked et al. 1981). Eine der aktuell ausgereiftesten, enzymgekoppelten, elektrochemischen Regenerationen kombiniert eine Diaphorase mit einer veränderten Oberfläche, um den Mediator Ethylcarboxyethylviologen daran anzulagern (Dinh et al. 2016). Dadurch ist im Vergleich zur Variante ohne Oberflächenanlagerung eine erhöhte Umwandlung des NAD⁺ möglich. Die Probleme dieser Regenerationsmethode werden erneut hauptsächlich durch die verwendeten Mediatoren hervorgerufen, die eine komplexe Synthese zur Herstellung benötigen bzw. teuer in der Anschaffung sind und bei der Aufarbeitung Probleme hervorrufen können (Kim et al. 1999). Weiterhin ist die TTN noch zu gering für einen großflächigen Einsatz.

1.4 Immobilisierung von NADH

Neben den zahlreichen Herausforderungen, die bei der Anwendung von NADH zu beachten sind, stellt sich auch noch die Frage nach der einsetzbaren Menge. Wie bereits erwähnt, ist dieser Cofaktor hochpreisig und es wird versucht, durch möglichst häufige Regeneration mit hohen TTN die einzusetzende Menge so gering wie möglich zu halten. Trotzdem wird eine gewisse Konzentration benötigt, um die verwendeten Enzyme möglichst gut mit dem Cofaktor zu sättigen und die Reaktion dadurch nur wenig bis gar nicht zu limitieren. Daher wird beispielsweise versucht, das Reaktionsvolumen gering zu halten, um gleichzeitig eine ausreichend hohe Konzentration bei einer möglichst geringen eingesetzten Menge zu verwenden. In diesem Fall kommen häufig Reaktionen im Fluss zum Einsatz. Dabei muss versucht werden, die wertvollen Reaktionsteilnehmer in dem Reaktionsgefäß festzuhalten. Für die eingesetzten Enzyme werden zahlreiche unterschiedlichste Methoden erforscht, die an die jeweiligen Gegebenheiten individuell angepasst werden können. So können Enzyme unter anderem durch nicht-kovalente Adsorption und kovalente Anhänge, Verbindung untereinander oder unterschiedlichste Affinitäts-Tags daran gehindert werden, sich im gesamten System zu verteilen (Ravindran und Jaiswal 2019; Brady und Jordaan 2009).

Bei so einer Reaktion mit Oxidoreduktasen müssen allerdings nicht nur die Enzyme immobilisiert werden, auch der ggf. nötige Cofaktor, der normalerweise frei in der Lösung vorliegt, muss an der Verteilung im kompletten Reaktionsansatz gehindert werden. Vorteilhaft ist, dass es sich hierbei um strukturell und funktionell bekannte Substanzen handelt. Diese haben ihre fixe Aufgabe, die allerdings im Zusammenspiel mit dem Enzym stattfindet und die Cofaktoren hierfür spezielle Bindepositionen innerhalb des Enzyms besetzen müssen. Eine Änderung der Größe oder des Aussehens des Cofaktors kann somit auch sehr leicht zur dessen Inaktivierung führen. Daher sind die Möglichkeiten zur Immobilisierung des NAD deutlich eingeschränkt. So stehen beispielsweise Varianten wie die Komplexierung mit Sepharose, der Einschluss in Fibroinmembranen, die kovalente Bindung an Polystyrol-Nanopartikel oder die Vergrößerung des NAD durch wasserlösliche Polymere wie unter anderem Polyethylenglycol (PEG) zur Auswahl (Bückmann et al. 1981; Gestrelus et al. 1975; Yoshimura et al. 1988; Stengelin und Patel 2000).

Bei PEG-NADH handelt es sich um ein wasserlösliches, hochmolekulares Polyethylenglycol-N6-(2-Aminoethyl)-NADH, welches sich auf Grund der linearen, definierten Größe bei nur zwei gut erreichbaren terminalen Enden für die Verwendung mit Enzymen gut eignet (Bückmann et al. 1981; Wichmann und Vasic-Racki 2005). Die Nutzung dieser modifizierten NAD-Variante in Kombination mit der CbFDH zeigt keine signifikanten Unterschiede zum nicht modifizierten Cofaktor (Wichmann et al. 2000). Zur praktischen Einsatz bei der Produktgenerierung kam PEG-NADH in einem Enzym-Membran-Reaktor für einen Langzeitversuch, bei dem insgesamt bei einem Fluss von 2 mL/h eine NADH-Aktivität über 28 Tage feststellbar war, was einer Inaktivierungsrate von 16,8 % pro Tag entsprach (Wichmann et al. 2000; Steckhan et al. 1990). Des Weiteren wurde ein kontinuierliches Flusssystem zur Produktion von L-Leucin mit der Regeneration mittels FDH entwickelt, das mit fünfmaligem Zudosieren von frischem PEG-NADH über 90 Tage lief (Kragl et al. 1996). Für den Einsatz mit der ReADH wiederum gab es bisher nur theoretische Überlegungen (Kruse et al. 1996).

Eine weitere Variante ist die direkte Bindung des NAD an das Enzym mit PEG als Linker zwischen den beiden Enzymen. Mit diesem Konzept werden aktuell verschiedene Methoden entwickelt, um alle katalytischen Reaktionsteilnehmer miteinander zu kombinieren und dadurch eine Art „Nanomaschine“ zu bilden. So wurde die FDH dahingehend genutzt, um eine Biokonjugation aus dem enzymatischen Cystein und mit Maleimid funktionalisierten PEG-NADH zu bilden und so das NADH freischwiegend an die FDH zu binden (Ozba-

kir und Banta 2018). Das produktgenerierende Enzym Malatoxidoreduktase wurde wiederum mit Hilfe eines spy-catcher-Moduls an den FDH-PEG-NADH-Komplex gebunden, so dass alles zusammenhing und das gewünschte Endprodukt Malat generiert werden konnte (Ozbakir und Banta 2018). Eine andere Variante ist die Bildung eines Fusionsproteins, bei dem das produktgenerierende Enzym mittels Linker kovalent an das für die Regeneration zuständige Enzym gebunden wird (Hartley et al. 2019). Erneut kam PEG-NADH zur Anwendung, welches wiederum mit Maleimid modifiziert war und so an die in der Linker-Region enthaltenen Cysteine zwischen den beiden Enzymen gebunden werden konnte. Diese Reaktionskomplexe überzeugen als kompakte Gebilde, die alle für die katalytische Reaktion notwendigen Beteiligten enthalten. Allerdings sind diese Gebilde auch hochangepasste Konstrukte, sodass für jede gewünschte Reaktion der Aufbau und das Zusammenspiel zwischen den angedachten Enzymen, dem Regenerationssystem und dem schwingenden Cofaktor vollständig neu verstanden und aufgebaut werden muss und die Entwicklung somit äußerst aufwendig ist.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Der heutige Wandel zu einer nachhaltigen Lebensweise betrifft auch die Synthese von Chemikalien. Daher besteht das Bestreben, die hierbei angewendeten Verfahren hin zu grünen Methoden mit milden Bedingungen zu verändern. Aus diesem Grund stehen Enzyme stark im Fokus, die bereits *in vivo* vielfältige Reaktionsmöglichkeiten darstellen können. Eine wichtige Gruppe stellen hierbei die Oxidoreduktasen dar, die aktuell allerdings noch nicht zu den Standardenzymen für die industrielle Anwendung gehören. Ein Grund hierfür liegt in den je nach Reaktionstyp teilweise benötigten Cofaktoren, die einen erheblichen Kostenfaktor darstellen können.

Geht es bei enzymatisch katalysierten Redox-Reaktionen um den formalen Übertrag von Hydriden, so ist NAD der zentrale Cofaktor. Die Anwendung dieses Cofaktors gestaltet sich sehr unterschiedlich und muss für jede Gegebenheit individuell angepasst werden. Im großen bzw. industriellen Maßstab wird die Verwendung ausschließlich in Kombination mit einer Regenerierung des Cofaktors durchgeführt, was auch auf die extremen Kosten für einen stöchiometrischen Einsatz zurückzuführen ist. Für die Regeneration gibt es grundsätzlich zahllose beschriebene Varianten, in der Praxis findet jedoch nur eine Hand voll derer tatsächlich systemische Anwendung.

Daher liegt die Zielsetzung dieser Promotionsarbeit darin, verschiedene NADH Regenerationsverfahren zu entwickeln, an die jeweilige Hauptreaktion anzupassen und die Nutzbarkeit somit zu beurteilen. Dabei sollen auch Methoden aus unterschiedlichen Bereichen zum Einsatz kommen, wobei der Fokus auf den Themengebieten der enzymatischen und elektrochemischen Regeneration liegen wird.

2 Material

2.1 Chemikalien

Tabelle 2: Liste der wichtigsten Chemikalien, deren Anbieter und Best. Nr.

Chemikalie	Anbieter	Best. Nr.
(-)-Borneol 97 %	Sigma Aldrich	139114-100G
(1R)-(+)-Campher 98 %	Sigma Aldrich	857300-100G
(1S)-(-)-Campher 98 %	Sigma Aldrich	279676-5G
1-(p-Tolyl)ethanol	TCI Deutschland GmbH	M0448
2-Keto-3-Deoxygluconat	CBR	Eigenproduktion nach (Carsten et al. 2015)
4-Methylacetophenon 95 %	Acros Organics	10636902
AS-Standard	Dr. Maisch GmbH	9000001
Ammoniumsulfat	AppliChem GmbH	A1032,5000
Borat Puffer 1 M	Dr. Maisch GmbH	4041901
D/L-Campher	VWR International	A10936.22
D/L-Glyceraldehyd	Sigma-Aldrich	A2153
D/L-Glycerat	TCI Deutschland GmbH	D0602
di-Kaliumhydrogenphosphat 99 %	Carl Roth GmbH	P749.3
DMSO Rotipure > 99,8 %	Carl Roth GmbH	4720.1
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH	2363.5
Helium 5.0	Westfalen AG	A06740150
HEPES	Carl Roth GmbH	HM78.3
Hexan, Reagent Plus > 99 %	Sigma Aldrich	139386-500
Hydroxypyruvat	Sigma-Aldrich	6367
Isoborneol	VWR International	B20632.14
Kaliumdihydrogenphosphat 99 %	Carl Roth GmbH	3904.3
Kanamycin	Carl Roth GmbH	T832.3
L-Norvalin	Dr. Maisch GmbH	9000101
Methylisobutylketon	Sigma Aldrich	293261-1L
Monofunktionales PEG Succinamidsäure, 20 kD	Otto Nordwald	PSB-2135
MOPS	Carl Roth GmbH	6979.4

Material

NAD ⁺ (freie Säure)	Roche	10210230
NADH	VWR International	J61638.06
	Carl Roth GmbH	AE12.2
Natrium Formiat	Merck KGaA	1.06443.0500
Nickelsulfat Hexahydrat	Merck KGaA	1.06727
OPA/3-MPA Reagenz	Dr. Maisch GmbH	9800600
Pyruvat	Carl Roth GmbH	8793.1
Synthetische Luft	Westfalen AG	A09110150
TRIS-Base	Carl Roth GmbH	AE15.2
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH	8952.5
Wasserstoff 5.0	Westfalen AG	A09540150

2.2 Geräte

Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte

	Gerätebezeichnung	Hersteller
Autoklav	Varioklav S135	Thermo Scientific™
Bioreaktor für die Koppelung Elektro - Biochemie	Lösungsmittelbeständige Rührzelle mit Filtrationsein- heit für 47 mm Filter	Millipore SAS
GC-Anlage mit Autosampler	GC-2010 plus AOC-20i	Shimadzu Corporation
Gefrierschrank -20 °C	G5126	Liebherr Hausgeräte GmbH
Gefrierschrank -80 °C	Forma 900 series	Thermo Scientific™
Gefriertrocknungsanlage	Alpha2-4 LD plus	Martin Christ GmbH
Gel-Dokumentationssystem	Gel iX Imager	Intas Science GmbH
Gießkammer für SDS-Gele	Mini-Protean® 3Multi-Casting Chamber	Bio-Rad Laboratories GmbH
Heizschrank	Function line T12	Thermo Scientific™
HPLC- Anlage mit Entgaser Pumpen	UltiMate-3000 HPLC-System SRD 3400 HPG 3400RS	Thermo Scientific™

Material

Autosampler	WPS 3000TRS	
Säulenofen	TCC 3000RS	
Detektor	DAD 3000RS	
Inkubatorschüttler	KS4000 ic control	IKA Labortechnik
Inkubatorschüttler	Innova 44 Shaker	New Brunswick
Inkubatorschüttler	Multitron Standard	Inforc HP
Inkubatorschüttler	Schüttler TH15	Edmund Bühler GmbH
Laufkammer für SDS-Gele	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH
Magnetrührer	Variomag Telesystem	Thermo Scientific™
Magnetrührer mit	MR 3001 K	Heidolph Instruments
Multireaktionssystem	StarFish	
NMR	JOEL ECS 400	Joel Ltd.
pH Meter (tragbar)	pH 100	VWR International
pH-Meter mit	Five Easy	Mettler-Toledo GmbH
Elektrode	InLab® Expert pro	
Pipetten	Transferpetten	Brand GmbH & Co KG
Potentiostat Materialscreening	Autolab	Deutsche Metrohm GmbH & Co. KG
Proteinreinigung mit	Äkta™ pure 25L	GE Healthcare
Fraktionssammler	Fraction collector F9-L	
Pumpe mit	Masterflex L/S	Cole Parma GmbH
Pumpenkopf	easy load Model 7518-00	
Reinstwasser-Aufbereitungsanlage	Milli-Q® Reference	Millipore SAS
Spannungsgeber für SDS-Gele	PowerPAC™ Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH
Spektralphotometer (tragbar)	Ultraspec 10	Amersham Biosciences GmbH
Spektralphotometer für Mikrotiterplatten	Epoch 2	BioTek Instruments, Inc.
Spektralphotometer für Mikrotiterplatten	Multiskan Spektrum	Thermo Scientific™
Spektralphotometer für Mikrotiterplatten	Varioscan Flash	Thermo Scientific™

Material

Spektralphotometer für Nanoanwendungen	Nanophotometer P-330	Implen GmbH
Sterilwerkbank	MSC-Advantage	Thermo Scientific™
Sterilwerkbank	Hera safe	Heraeus Industries
Thermoblock	Thermo Mixer C	Eppendorf AG
Tischzentrifuge	Pico 17 centrifuge	Thermo Scientific™
Tischzentrifuge	Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific™
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc
Vortex	Disruptor Genie Digital	Scientific Industries Inc
Waage	TE1502S	Sartorius AG
Waage	TE6101	Sartorius AG
Waage	Entris 224i-1S	Sartorius AG
Wasserbad	CC1	Huber Kältemaschinenbau AG
Zentrifuge	Rotana 460R	Hettich
Zentrifuge mit wechselbaren Rotoren	Sorval RC 6+ Rotor SS-34 Rotor F9S-4x1000y	Thermo Scientific™

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Liste mit ausgewählten Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller	Verwendung
Ag/AgCl-Referenzelektrode (Länge 12,5 cm)	Metrohm AG	Referenzelektrode
Bio-One™ PP 96-Well F-bottom Microplate	Greiner Bio-One GmbH	Mikrotiterplatten
Leakless Mini Ag/AgCl Referenzelektrode	Mengel Engineering	Minireferenzelektrode
Masterflex Pumpenschlauch LS13, Norprene	Masterflex SE	Schlauch für die Koppelung Elektro - Biochemie

Material

Membranfilter 0,2 µm regenerierte Cellulose	Sartorius AG	Sterilfiltration von Puffer
PTV Liner mit Glaswolle, premium deact. für Thermo GC	Restek GmbH	GC Liner
Septa, Thermolite, Shimadzu plug	Restek GmbH	GC Septe
Sterilfilter Celluloseacetat, 500 µL; 10 kDa	VWR International GmbH	Filtration von Analytikproben
Ultrafiltrationsmembranen, Typ PBGC, 10.000 NMGG, Biomax	Millipore SAS	Bioreaktor Filter
Vivaspin 20, 10 kDa	Sartorius AG	Konzentrierung von Proteinlösungen
Vivaspin 20, 3 kDa	Sartorius AG	Konzentrierung von PEG-NADH

2.4 Säulen

Tabelle 5: Liste mit den verwendeten Säulen

Säule	Hersteller	Verwendung
Gromsil OPA-3	Dr. Maisch GmbH	HPLC Säule – AS Analytik
HiPrep 26/10	GE Healthcare	Äkta- Entsalzungssäule
HisTrap™ FF crude 5 mL Säulen	GE Healthcare	Säulen zur His-tag Reinigung mittels Äkta™ pure
MEGA-DEX-DAC 25 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm df	MEGA	GC Säule – Campher Methode
PD 10 Desalting Columns (Sephadex G-25)	GE Healthcare	Hand- Entsalzungssäule
Stabilwax 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm df	Restek GmbH	GC Säule – Acetophenon Methode
Superdex 75 10/300 Increase	GE Healthcare	Analytische Gelfiltration

2.5 Elektrochemie Materialien

Tabelle 6: Liste der für das Materialscreening verwendeten Materialien

Material	Anbieter	Best. Nr.
Blei	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG	834 K
Eisen	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG	834 K
Glassy Carbon	Deutsche Metrohm GmbH & Co. KG	6.1248.040
Gold 99,99 %	Evochem Advanced Materials GmbH	Au-00007
Indium 99,99 %	Evochem Advanced Materials GmbH	In-00013
Kupfer 99,9 %	Advent Research Materials Ltd	CU130839
Molybdän 99,95 %	Evochem Advanced Materials GmbH	Mo-00004150x150
Nickel 99+ %	MaTeck Material-Technologie & Kristalle GmbH	902663
Palladium 99,95	Evochem Advanced Materials GmbH	Pd-00013
Platin 99,99 %	MaTeck Material-Technologie & Kristalle GmbH	009344
Silber	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG	834 K
Titan 99,5 %	ThermoFisher GmbH	10385
Wolfram 99,96 %	MaTeck Material-Technologie & Kristalle GmbH	009482
Zink 99,99 %	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG	ZN564311
Zinn 99,95 %	Advent Research Materials Ltd	SN552911

2.6 Software

Tabelle 7: Liste mit den für die Bedienung oder Auswertung verwendeten Software

Software	Version	Hersteller	Verwendungsbereich
ChemSketch	2020.1.2	ACDLabs	Erstellung Strukturformeln
Chromeleon™	6.80	Thermo Scientific™	Bedienung HPLC
Clonemanager	9 Professional Edition	Scientific & Educational Software	Verwaltung Gensequenzen

Material

GCsolution Analysis	2.42.00	Shimadzu	Bedienung GC
Gen5	2.09	BioTek	Steuerung Photometer Epoch2
Nova	1.11 und 2.1.2	Metrohm	Bedienung Potentiostat
ScanIt RE for Varioscans	2.4.3	Thermo Electron Corporation	Bedienung Varioscans & Multiscans Photometer
SigmaPlot	13	Systat Software GmbH	Erstellung Graphiken
Unicorn	5.11	GE Life Science	Bedienung Äkta

2.7 Kits

Tabelle 8: Liste der verwendeten Kits

Kit-Name	Hersteller	Anwendungsbereich	Best. Nr.
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fischer Scientific	Isolierung von Plasmiden	K0503
Roti®-Quant	Carl Roth GmbH	Proteinkonzentrationsbestimmung	K015.1

2.8 Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert und vor Verwendung gemischt. Die in Tabelle 10 aufgeführten Antibiotika-Stammlösungen wurden als kurz vor Verwendung in dem Verhältnis 1:1000 zugegeben.

Tabelle 9: Liste der Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

Medium	Inhaltsstoffe	c/ L
LB-Agar (pH 7,0)	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	Agar-Agar	15 g

Material

LB-Medium (pH 7,0)	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g

Tabelle 10: Liste der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	C _{Stammisg} [mg/mL]	C _{verwendet} [µg/mL]
Kanamycin	100	100
Kanamycin	30	30

2.9 Puffer

Alle in Tabelle 11 aufgeführten Puffer wurden mit Milli-Q-Wasser hergestellt. Die Puffer wurden ggf. mit Milli-Q-Wasser auf die beim jeweiligen Versuch angegebenen Konzentration verdünnt. Wenn nicht anders angegeben, bezieht sich die pH Angabe auf RT. Im Falle vom Phosphat-Puffer wurden die angegebenen Bestandteile einzeln hergestellt und der pH-Wert durch Mischung dieser in unterschiedlichen Verhältnissen eingestellt. Der pH-Wert bei anderen Puffern wurde durch Zugabe von Natriumhydroxid oder Salzsäure eingestellt.

Tabelle 11: Liste der verwendeten Puffer

Puffer	Inhaltsstoffe	Konzentration	pH-Werte
Bindungspuffer (KPi)	Kaliumdihydrogenphosphat	100 mM	6,0; 7,5
	Dikaliumhydrogenphosphat		
	Natriumchlorid	150 mM	
	Imidazol	20 mM	
Bindungspuffer (TRIS)	TRIS-Base	50 mM	7,5
	Natriumchlorid	500 mM	
	Imidazol	20 mM	
Boratpuffer	Borsäure	1000 mM	10,7
Elutionspuffer (TRIS)	TRIS-Base	50 mM	7,5
	Natriumchlorid	500 mM	
	Imidazol	500 mM	

Material

Elutionsspuffer (KPi)	Kaliumdihydrogenphosphat	100 mM	6,0; 7,5
	Dikaliumhydrogenphosphat		
	Natriumchlorid	150 mM	
	Imidazol	500 mM	
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)	500 mM	6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5
Kaliumphosphat Puffer (KPi)	Kaliumdihydrogenphosphat	100 mM	7,4; 7,5; 8,0
	Dikaliumhydrogenphosphat		
Kaliumphosphat Puffer (KPi)	Kaliumdihydrogenphosphat	500 mM	6,0; 6,5; 7,0; 7,5;
	Dikaliumhydrogenphosphat		8,0
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure	500 mM	6,5; 7,0; 7,5; 8,0
NP _i A	Natriumdihydrogenphosphat	12,5 mM	7,2
	Dinatriumhydrogenphosphat	12,5 mM	
	Acetonitril	3 % (v/v)	
NP _i B	Natriumdihydrogenphosphat	12,5 mM	7,2
	Dinatriumhydrogenphosphat	12,5 mM	
	Acetonitril	50 % (v/v)	
Phosphat-Citrat Puffer nach Mc Ilvaine	Dinatriumhydrogenphosphat	200 mM	5,0; 5,6; 6,0
	Citronensäure	100 mM	
TRIS-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	500 mM	7,0; 7,5; 8,0; 8,5

2.10 Mikroorganismen

Tabelle 12: Liste der verwendeten Mikroorganismen

Spezies	Stamm	Relevanter Genotyp
<i>Escherichia coli</i>	NEB Turbo Competent	F' proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Δ lacZ M15/ fhuA2 Δ(lac-proAB) glnV gal R(zgb- 210::Tn10)TetS endA1 thi- 1 Δ(hsdS-mcrB)5
<i>Escherichia coli</i>	BL21(DE3)	fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5

2.11 Enzyme

Tabelle 13: Liste der verwendeten Enzyme

Enzym	Ursprungsorganismus	Anbieter	Chargen- nummer
AfAlaDH	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Eigenproduktion	
CbFDH wt	<i>Candida boidinii</i>	Megazyme	Lot 180710b
CbFDH_C23S/C262A	<i>Candida boidinii</i>	Eigenproduktion	
LDH	Isoliert aus Schweineherz	Roth	153199333, 017252576
MjAIDH	<i>Methanocaldococcus jan- naschii</i>	Eigenproduktion	
PpBDH_S146A/Y188T	<i>Pseudomonas putida</i>	Eigenproduktion	
PtKDGA	<i>Picrophilus torridus</i>	Eigenproduktion	
ReADH	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Eigenproduktion	
TIGR	<i>Thermococcus litorialis</i>	Eigenproduktion	

2.12 Plasmide

Tabelle 14: Liste der verwendeten Plasmide

CBR interne Nr.	Resistenz	Vektor + Insert/ Funktion	Herkunft
P_708	Kanamycin	pET24a-Leervektor	CBR
P_709	Kanamycin	pET24a_TIGR	CBR (Begander et al. 2021)
P_818	Kanamycin	pET24a_PtKDGA	CBR (Gmelch et al. 2019)
P_931	Kanamycin	pET24a_AfAlaDH	CBR (Gmelch et al. 2019)
P_1021	Kanamycin	pET28a_MjAIDH	CBR (Gmelch et al. 2019)
P_1642	Kanamycin	pET28a_PpBDH_S146A/ Y188T	FhG-SR (Hofer et al. 2021)
P_1691	Kanamycin	pET24a_ReADH	ATG:biosynthetics GmbH, mittels NdeI und XhoI in pET24a kloniert
P_1710	Kanamycin	pET28a_CbFDH_C23S/ C262A	ATG:biosynthetics GmbH, mittels NcoI und XhoI in pET28a kloniert

2.13 Trennsysteme

Tabelle 15: Liste der verwendeten Gel-Trennsysteme und Färbelösungen.

	Inhaltsstoffe	Konzentration
Protein-Färbelösung	Coomassie G250	87 mg/L
	HCl	3 mL/L
SDS-Sammelgel	Acrylamid	5,0 %
	Tris-HCl	4,5 %
	SDS	0,1 %
	APS	0,1 %
	TEMED	0,1 %
SDS-Trenngel	Acrylamid	12,0 %
	Tris-Base	1,0 %
	SDS	0,1 %
	APS	0,1 %
	TEMED	0,1 %

3 Methoden

Die hier aufgeführten Methoden wurden teilweise aus der Standardmethodensammlung des Lehrstuhls für Chemie Biogener Rohstoffe übernommen.

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Glaswaren wurden zur Sterilisation vier Stunden bei 200 °C ausgebacken. Medien und hitzestabile Lösungen wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert, während hitzelabile Lösungen mit Hilfe eines Spritzenfilters (0,22 µm Porengröße) steril filtriert wurden.

3.1.2 Bestimmung der optischen Dichte von *E. coli* Zellsuspensionen

Die optische Dichte (OD_{600}) von *E. coli* Kulturen wurde bei 600 nm in Küvetten bestimmt. Vermessen wurden dabei 1 ml Zellsuspension in der jeweils geeigneten Verdünnung.

3.1.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Als Vorkultur wurde eine Übernachtskultur von *E. coli* Turbo in LB-Medium bei 37 °C/ 170 rpm angesetzt. Am darauffolgenden Tag fand das Animpfen von 500 mL LB-Medium auf etwa OD_{600} von 0,1 in einem 1 L Schikanekolben statt und eine Inkubation bei 37 °C/ 150 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,5 – 0,6. Die Kultur kam anschließend für 20 min zur Abkühlung auf Eis und erfuhr daraufhin eine Zentrifugation für 15 min/ 4 °C/ 4000 rpm. Das Zellpellet wurde mit 50 mL eiskalter $CaCl_2$ -Lsg 50 mM resuspendiert und für 1,5 h unter regelmäßigem Schwenken ohne Lufteintrag auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneutes Zentrifugieren bei 4 °C/ 15 min/ 4000 rpm und ein Resuspendieren des Pellets in 10 mL eiskalter Lösung aus 85 % $CaCl_2$ -Lsg (50 mM) und 15 % Glycerin (v/v). Nach einer Lagerung auf Eis für eine Stunde unter gelegentlichem Schwenken ohne Lufteintrag wurden die Zellen zu je 100 µL in Mikroreaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei – 80 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz (T_E) wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen mit 1 ng Plasmid-DNA transformiert (s. Kapitel 3.1.4). Nach der Regenerationsphase von 60 min/ 37 °C wurden je 100 µL einer Verdünnungsreihe auf Selektivagar ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Die Transformationseffizienz wurde nach folgender Formel 2 berechnet.

$$T_E = \frac{n_{Kolonien} \times f}{m_{DNA}}$$

Formel 2: Berechnung der Transformationseffizienz.

T_E : Transformationseffizient (Kolonien pro µg DNA)

$n_{Kolonien}$: Anzahl der Kolonien auf eine Platte

f: Verdünnungsfaktor auf 1 mL

m_{DNA} : eingesetzte DNA-Menge in µg

3.1.4 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Ein Aliquot der jeweiligen kompetenten Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 1 µL des für die Transformation gewünschten Plasmides versetzt und für etwa 30 min auf Eis gelagert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec wurden 900 µL LB-Medium hinzugefügt und es fand eine Regenerationsphase bei 60 min/ 37 °C/ 180 rpm statt. Für den Erhalt von Einzelkolonien wurden die Zellen auf LB-Agar mit dem zugehörigen Antibiotikum ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

3.1.5 Kultivierung

Bei der Bearbeitung von z. B. durch eine Transformation veränderten Mikroorganismen richtete sich die Auswahl des während der gesamten Kultivierung zugesetzten Antibiotikums nach der im Plasmid enthaltenen Resistenz (s. Tabelle 13).

Für den Erhalt einer Flüssigkultur/ Vorkultur des jeweiligen Mikroorganismus wurde eine einzelne Kolonie von der Agarplatte entnommen, LB-Medium inklusive des geeigneten Antibiotikums beimpft und ü. N./ 37 °C/ 120 - 150 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

3.1.6 Heterologe Enzym-Expression

Nach der erfolgreichen Transformation von *E. coli* BL21(DE3) und dem Erstellen der Vorkultur (s. Kapitel 3.1.5), wurde aus dieser Flüssigkultur die Hauptkultur im Medium LB + Antibiotikum durch Animpfen mit ca. OD₆₀₀ 0,1 hergestellt. Bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6 erfolgte das Wachstum bei 37 °C/ 90 rpm. Die Induktion erfolgte durch 1 mM IPTG in der Endkonzentration, worauf sich die Inkubation bei ü. N./ 16 °C/ 90 rpm anschloss. Nach Ende des Wachstums ging man dazu über, die Kulturen bei 10 min/ RT/ 3000 g zu zentrifugieren und das entstandene Zellpellet entweder direkt weiter zu verwenden oder bei -20 °C einzufrieren.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Turbo wurde das GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit verwendet. Die Isolierung erfolgte jeweils nach Herstellerangaben, wobei 5 mL einer frischen ü. N. Kultur verwendet wurden. Die DNA wurde abweichend mit 40 - 50 µL ddH₂O eluiert. Anschließend wurde die Plasmidpräparation bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz entspricht eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm und einer Schichtdicke von $d = 1$ cm einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/mL. Eine DNA-Lösung gilt als rein, wenn sie keine Extinktion oberhalb von 300 nm und einen Quotienten aus A_{260}/A_{280} von mindestens 1,8 aufweist.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bradford Assay „Rotiquant“ verwendet. Die Durchführung erfolge nach den Herstellerangaben, Kapitel „Proteinbestimmung in Mikrotiterplatten“. Für die Kalibrierung wurde Rinderserumalbumin verwendet, die

zu bestimmenden Proben wurden entsprechend mit ddH₂O verdünnt. Die Absorptionsmessung erfolgte mittels Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm.

3.3.2 Proteinreinigung

3.3.2.1 Zellaufschluss mittels Ultraschalles

Die Zellen aus Expressionskulturen wurden in einem Verhältnis von 1:20 (w/v) in Bindepuffer resuspendiert und im Eisbad mittels Ultraschall bei 75 % Amplitude, 0,5 ms Puls/ 0,5 ms Pause zwei mal fünf Minuten aufgeschlossen. Nach dem Zellaufschluss wurden Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation bei 45 min/ 4 °C/ 14.000 g abgetrennt. Aus dem Überstand wurden im Anschluss die Proteine mit einem His₆-Tag über Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt.

3.3.2.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Die Metallchelate-Affinitätschromatographie wurde mit HisTrap™ FF Säulen durchgeführt. Diese Säulen sind mit Sepharose 6 Fast Flow befüllt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt durch die Anlegung eines Imidazolgradienten, wodurch die strukturell ähnlichen Imidazolmoleküle mit den Histidinseitenketten des Proteins um die Bindestellen an der Säule konkurrieren und diese somit vom Säulenmaterial verdrängen.

Als Puffer wurden die in Tabelle 11 aufgeführten Binde- und Elutionspuffer verwendet. Bei diesen fand direkt vor der Anwendung eine Sterilfiltration statt. Die Reinigung wurde an der Chromatographie-Anlage ÄKTA™ pure 25L mit folgender Methode durchgeführt:

Flussrate: 5 mL/ min

Äquilibriumierung: 3 CV Bindepuffer

Beladen: löslicher Anteil des Zelllysats, filtriert durch einen 0,2 µM Spritzenfilter, vorbereitet nach Kapitel 3.3.2.1

Waschen: 10 CV Bindepuffer

Elution: 10 CV Gradient 0 %-100 % Elutionspuffer

Es wurden 1 mL Fraktionen über den Fraktionensammler F9-C gesammelt.

Reinigung der Säule: 5 CV 100 % Elutionspuffer

Spülen und Lagerung der Säule: 5 CV ddH₂O; 3 CV 20 % Ethanol

Die Elution der Proteine wurde durch eine *online*-Messung der Extinktion bei 280 nm überwacht. Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereinigt und über eine HiPrep 26/10 Desalting-Säule umgepuffert (s. Kapitel 3.3.2.3).

3.3.2.3 Größenausschlusschromatographie von Proteinlösungen

Zum schnellen Austausch von Puffersubstanzen und Salzen wurde die Größenausschlussssäule HiPrep 26/10 Desalting verwendet. In der Regel wurde mit folgender Methode entsalzt bzw. der Puffer ausgetauscht:

Flussrate: 5 – 7,5 mL/ min

Äquilibrierung: 2 CV Austauschpuffer

Beladen: 15 mL Proteinlösung

Elution: 2 CV Austauschpuffer; mit manueller Fraktionierung anhand des Chromatogramms

Reinigung der Säule: 2 CV Austauschpuffer

Spülen und Lagerung der Säule: 2 CV ddH₂O, 2 CV 20 % Ethanol

Zur Durchführung der manuellen Fraktionierung wurde die Extinktion bei 280 nm gemessen. Die gereinigten Proteinlösungen wurden in flüssigen Stickstoff eingetroppt und als gefrorene Kügelchen bei -80 °C gelagert.

3.3.2.4 Konzentrieren von Proteinlösungen

Bei Bedarf wurden die Proteinlösungen mit Hilfe von „Vivaspin Zentrifugationsfilter“ durch Ultrafiltration bei 4 °C/ 3000 g bis zum gewünschten Volumen konzentriert. Die Zentrifugation wurde alle 10 min unterbrochen und die Enzymlösung mittels Pipettierens homogenisieren. Die Dauer der Zentrifugation hing von der Ausgangskonzentration und dem Ausgangsvolumen sowie von der gewünschten Endkonzentration der Proteinlösung ab.

3.3.2.5 Puffertausch bei Enzymlösungen

Um im kleinen Maßstab bei gereinigten Enzymlösungen den Puffer zu tauschen, wurden PD-10 Entsalzungshandsäulen verwendet. Diese wurden mit dem jeweils neuen Puffer mit drei Säulenvolumen equilibriert und mit 2,5 mL der umzupuffernden Enzymlösung versetzt. Anschließend wurde die Säule mit 3,5 mL des neuen Puffers gewaschen und dieser Durchfluss aufgefangen.

3.3.2.6 SDS-Gelelektrophorese

Die Proben wurden mit Ladepuffer 2,5x versetzt und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Das 12 %ige SDS-Polyacrylamidgel wurde mit SDS-Laufpuffer in die Laufkammer eingebaut und mit den Proben (Volumen ca. 10 - 20 µL) beladen. Die Auftrennung erfolgte bei 45 mA/Gel mit maximaler Spannung für etwa 50 min, bis der enthaltene Farbstoff das Ende des Gels erreicht hat. Für das Färben der entstandenen Banden wurde das Gel in Coomassie Blau G250 Lösung gelegt, für ca. 4 min in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und anschließend in ddH₂O gelagert. Für eine ggf. nötige Entfärbung diente die Lagerung ü. N. in ddH₂O. Die Dokumentation und Auswertung der erhaltenen Banden erfolgte mittels Durchlicht über das vorhandene Geldokumentationssystem.

3.3.2.7 Kaskadenaufbau für die Produktion von Aminosäuren

Im Allgemeinen enthielten die unterschiedlichen AS-Kaskaden zu Beginn 5 mM NAD⁺, 25 mM KDG, 150 mM Ammoniumsulfat, KP_i-Puffer 100 mM pH 8,0 und, wenn nicht anders beschrieben, jedes der beteiligten Enzyme (PtKDGA, TIGR, MjAIDH und AIAIaDH) mit 0,5 U Aktivität. Das KDG wurde mittels SsDHAD nach vorhandenen Vorschriften aus Gluconat hergestellt (Carsten et al. 2015). Die Reaktion fand bei 50 °C und 300 rpm/min für 21 h statt. Für die Titrationsstudie wurde jeweils ein Enzym mit 20 % (0,1 U) oder 200 % (1,0 U) Aktivität verwendet, wobei die Aktivität der weiteren Enzyme bei 0,5 U beibehalten wurde. Für die verbesserte Kaskadenvariante wurde die Aktivität von PtKDGA bei 0,5 U beibehalten, wohingegen die drei restlichen Enzyme auf 1,0 U erhöht wurden. Hierbei fand eine Probennahme in gewissen zeitlichen Abständen statt. Für die Analytik der gebildeten Aminosäuren wurde ein Teil der Reaktion entnommen und mittels 10 kDa Zentrifugationsfilter aufbereitet und passend verdünnt. Anschließend kam die OPA/3-MPE Derivatisierung mittels HPLC zur Anwendung (s. Kapitel 3.4.1).

3.3.2.8 Campher Racematspaltung mit PpBDH_S146A/Y188T

Für die Enzymreaktion der PpBDH_S146A/Y188T wurde frisch gereinigtes Enzym verwendet, welches bis zur zeitnahen Verwendung anstelle von -80 °C ungefroren bei 4 °C gelagert wurde. Das verwendete (+/-)-Campher wurde selbst hergestellt, d.h. (+)-Campher und (-)-Campher wurden zu gleichen Teilen eingewogen und in DMSO gelöst. Die gesamte Reaktion war wie in Tabelle 16 dargestellt zusammengestellt. Für die Messung ohne Regenerationssystem wurde das Enzym CbFDH wt durch ddH₂O ersetzt und die NADH Konzentration auf 1 mM erhöht. Die Probenahme erfolgte stündlich bis zur angegebenen Zeit nach Versuchsbeginn. Für die Campher/Borneol Analytik wurde die in Kapitel 3.4.3 beschriebene GC-Methode verwendet.

Tabelle 16: Schema zum enzymatischen Campher-Abbau

		Endkonzentration
Enzym für den Abbau	PpBDH_S146A/Y188T	500 µg/mL
Substrat	(+/-)-Campher, gelöst in DMSO	1 mM
Cofaktor	NADH	250 µM
Enzym für die Cofaktor Re- generierung	CbFDH wt	0,5 U/mL
Substrat Cofaktor Regene- rierung	Na-Formiat	10 mM
Puffer	Phosphat-Citrat Puffer nach McIl- vaine	pH 6,0

3.3.2.9 ADH Batch Reaktionen

Für die Nutzung von elektrochemisch erzeugtem Formiat wurden zwei verschiedene Versuchsvarianten verwendet. Zum einen war das Substrat der ReADH, das 4-Methylacetophenon, limitierend ausgelegt (s. Tabelle 17). Zum anderen war das Formiat, welches für die NADH-Regeneration mittels CbFDH notwendig ist, im Unterschuss (s.

Tabelle 18). Die Reaktion fand unter Rühren bei RT statt. Proben wurden direkt vom Überstand genommen und mittels GC analysiert (s. Kapitel 3.4.4). Proben für die Formiatmessung wurden aus der wässrigen Phase entnommen und mittels HPLC (s. Kapitel 3.4.2) analysiert.

Tabelle 17: Schema zur Nutzung von elektrochemischen Formiat, 4-Methylacetophenon limitierend

		Endkonzentration
Enzym für die NADH Nutzung	ReADH	1 U
Enzym für die Cofaktor- Regenerierung	CbFDH_C23S/C262A	2 U
Cofaktor	NAD ⁺	2,5 µmol / 1 mM
Substrat Cofaktor-Rege- nerierung	eFormiat, eingebracht über den Puffer	540 µmol
Substrat	4-Methylacetophenon	400 µmol
Puffer	KP _i 0,5 M pH 7,5	

Tabelle 18: Schema zur Nutzung von elektrochemischen Formiat, Formiat limitierend

		Endkonzentration
Enzym für die NADH Nutzung	ReADH	0,5 U
Enzym für die Cofaktor-Regenerierung	CbFDH_C23S/C262A	0,75 U
Cofaktor	PEG-NADH	0,3 µmol/ 150 µM
Substrat Cofaktoregenerierung	eFormiat, eingebracht über den Puffer	200 µmol
Substrat	4-Methylacetophenon	1,25 mmol
Puffer	KP _i 0,5 M pH 7,5	

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 Aminosäureanalytik mittels HPLC

Zur Konzentrationsbestimmung von den Aminosäuren L-Alanin und L-Serin wurden diese mittels OPA/3-MPA derivatisiert, durch die High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) getrennt und das UV-Extinktionssignal des Dioden-Array Detektor detektiert. Die hierfür verwendete Methode und Materialien beruhen auf Vorgaben der Dr. Maisch GmbH und sind in der Tabelle 2 und Tabelle 5 aufgeführt. Die eingesetzten HPLC-Puffer NP_i A und NP_i B sind in Tabelle 11 aufgelistet. Für die Probenvorbereitung wurden 4 µL L-Norvalin (2,5 mM) als Interner Standard, 92 µL ddH₂O und 10 µL Boratpuffer 1 M pH 10,7 mit 4 µL ggf. verdünnter Probe vermischt. Für die Derivatisierung reagierte für 90 sec unter Mischen eine Mischung aus 14 µL vorbereiteter Probe mit 6 µL 1:10 mit 1 M Boratpuffer pH 10.7 verdünntes OPA-Reagenz. Die Mischung wurde bei einer Flussrate von 1,1 mL/min auf die Säule aufgetragen. In den ersten 8 min stieg der Anteil von Puffer B von 0 auf 20 % an, in den folgenden 8 min auf 55 % und fiel in den abschließenden 3 min wieder auf 0 % ab. Die Detektion der Aminosäuren fand bei 330 nm statt. Mittels Standardgerade konnten die jeweiligen Aminosäuren quantifiziert werden.

3.4.2 Formiatanalytik mittels HPLC

Zur Vorbereitung der Proben wurden diese durch einen 0,25 µm Spritzenvorsatzfilter filtriert. Zur Entfernung von ggf. gelösten 4-MAP/1-(p-Tol)-EtOH fand eine Extraktion mit Hexan statt. Hierfür wurde die wässrige Phase zweimal mit insgesamt dem identischen Volumen an Hexan ausgeschüttelt und die beiden Phasen voneinander getrennt. Die Analyse der wässrigen Phase fand mittels HPLC am FhG-SR statt. Zur Trennung wurde dort eine Rezex™ „ROA-Organic Acid H⁺ (8 %)“ Ionentauschersäule mit 0.005 N H₂SO₄ als Eluent verwendet.

3.4.3 Campher- & Borneol-Analytik mittels GC

Mittels Gaschromatographie (GC) konnten Substanzen aus der Reaktion Campher – Borneol analysiert werden. Hierfür war zuvor eine Extraktion der zu untersuchenden Stoffe aus der wässrigen Reaktionsphase nötig. Die zu untersuchende Lösung wurde zweimal mit insgesamt der identischen Menge Methylisobutylketon bei 1 min/ 2500 rpm extrahiert. Das zusammengeführte Extraktionsmittel wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und zur Analyse geeignet verdünnt. Für die Auftrennung arbeitete die GC mit einer Säule für die chirale Trennung von Substanzen bei 17 mL/min Helium als Trägergas (DEX-DAC-B-025-025-25, Mega). Die aufgetragenen Proben wurden mit 1 µL flüssig injiziert, bei 250 °C verdampft, mit einem Verhältnis von 1/13 gesplittet und bei 80 °C auf die Säule aufgetragen. Die Temperatur stieg darauffolgend mit 10 °C/min auf 110 °C, wurde 2 min gehalten, stieg mit 10 °C/min auf 200 °C und wurde für 5 min gehalten. Die Detektion erfolgte mittels FID bei 250 °C bei einem H₂-Fluss von 40 mL/min, einem Synth. Luft Fluss von 400 mL/min und N₂ als Make-up Gas mit 30 mL/min. Durch Vergleich mit dem Elutionsprofil der reinen Substanzen konnten 7,88 min für (-)-Campher, 8,03 min für (+)-Campher, 8,12 min für Isoborneol und 8,45 min für (+/-)-Borneol zugeordnet und mittels einer Standardgerade quantifiziert werden.

3.4.4 Acetophenon-Analytik mittels GC

Mittels Gaschromatographie wurden Substanzen aus der Reaktion 4-Methylacetophenon - 1-(p-Toluen)ethanol analysiert. Auf Grund der schlechten Wasserlöslichkeit konnten diese Substanzen häufig ohne weitere Aufarbeitung in der geeigneten Verdünnung direkt analysiert werden. Für die Analytik von im Wasser gelösten Stoffen war das Vorgehen wie folgt. Die zu untersuchende Lösung wurde zweimal mit insgesamt der identischen Menge Hexan bei 1 min/ 2500 rpm extrahiert und zur Analyse geeignet verdünnt. Für die Auftrennung arbeitete die GC mit einer polaren Stabilwax® Säule bei 1 mL/min

Helium als Trägergas (Stabilwax® 0,25-0,25-30, Restec). Die aufgetragenen Proben wurden mit 1 µL flüssig injiziert, bei 250 °C verdampft, mit einem Verhältnis von 1/10 gesplittet und bei 150 °C auf die Säule aufgetragen. Die Temperatur stieg darauffolgend mit 5 °C/min auf 200 °C und abschließend mit 10 °C/min auf ihre Endtemperatur von 220 °C, welche 5 min gehalten wurde. Die Detektion erfolgte mittels FID bei 250 °C bei einem H₂-Fluss von 40 mL/min, einem Synth. Luft Fluss von 400 mL/min und N₂ als Make-up Gas mit 30 mL/min. Durch Vergleich mit dem Elutionsprofil der reinen Substanzen konnten 4,71 min für 4-Methylacetophenon und 5,78 min für 1-(p-Toluen)ethanol zugeordnet und mittels einer Standardgerade quantifiziert werden.

3.4.5 Bestimmung Gesamt-NADH Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung aller bei 340 nm absorbierenden NADH-Varianten fand mittels UV-Spektrometer bei 340 nm in einer 96-well Multitierplatte statt. Die Bestimmungen fanden in Triplikaten statt. Vermessen wurden 200 µL in der jeweils geeigneten Verdünnung. Als Blindwert wurde unbehandelter Puffer verwendet.

$$c_{NADH}[mM] = \frac{Abs - Abs_{Blind}}{6,3 \frac{L}{mmol} * 0,59 cm} * f$$

Formel 3: Konzentrationsbestimmung vom gesamten NADH

Abs.: Absorptionsmesswert bei 340 nm

f: Verdünnungsfaktor auf 1 mL

3.4.6 Bestimmung enzymatisch aktives NADH

Die Bestimmung der enzymatisch aktiven NADH-Form fand mittels UV-Spektrometer bei 340 nm in einer 96-well Multitierplatte bei RT mit einem Gesamtvolumen von 200 µL statt. Die Bestimmungen fanden in Triplikaten statt. Der zu messenden Lösung werden 5 mM Pyruvat zugesetzt und der Startwert ermittelt. Mit 1 U Lactatdehydrogenase (LDH) startete der Abbau von NADH, wobei bis zu einem stabilen Endwert gewartet wurde. Als Blindwert fand eine Mischung aus unbehandeltem Puffer, 5 mM Pyruvat und 1 U LDH Anwendung.

$$c_{1,4NADH} [\%] = 1 - \frac{Abs_{Ende} - Abs_{Blind}}{Abs_{Start} - Abs_{Blind}}$$

Formel 4: Konzentrationsbestimmung von enzymatisch aktiven 1,4-NADH

Abs.: Absorptionsmesswert bei 340 nm

3.4.7 Enzymatische Aktivitätsmessungen mittels Photometer

Die Aktivitäten aller Enzyme wurden photometrisch durch die Bildung oder durch den Verbrauch von NADH bei 340 nm ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6.22 \text{ mM/cm}$) in einer 96-well Multitierplatte mit einem Füllvolumen von 200 μL bestimmt (Ausnahme PtKDGA: Hierbei wurde ein gekoppelter Assay über das Produkt Pyruvat und dem Enzym LDH verwendet). Die Bestimmungen fanden in Triplikaten statt. Die Temperatur betrug für die an der Aminosäure-Kaskade beteiligten Enzyme (PtKDGA, MjAIDH, TIGR und AfAlaDH) 50 °C, für alle anderen Enzyme (PpBDH, CbFDH und ReADH) RT. Die Enzyme wurden jeweils geeignet verdünnt eingesetzt und dienten zum Start der Reaktion. Die Aktivitäten wurden unter den beim jeweiligen Enzym/ Versuch aufgeführten Bedingungen ermittelt. Michaelis-Menten Kinetiken wurden durch Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen und der daraus resultierenden Anfangssteigung gemessen. Zur Auswertung fand Sigma Plot mit der Programmerweiterung „enzymes“ Anwendung. Ein Unit (1 U) ist als die Menge Enzym definiert, die 1 μmol Substrat pro Minute verbraucht.

3.4.7.1 pH-Optimum Bestimmung PpBDH_S146A/Y188T

Tabelle 19: Schema zur Aktivitätsbestimmung der PpBDH_S146A/Y188T bei unterschiedlichem Puffer und pH

		Endkonzentration
Substrat	(+)- oder (-)-Campher	1 mM
Cofaktor	NADH	250 μM
Puffer, ad. 200 μL	Mcllvaine	pH 5,0; 5,4 und 6,0
	KP _i 0,1 M	pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 und 8,0

3.4.7.2 pH-Optimum Bestimmung Formiatdehydrogenase wt

Tabelle 20: Schema zur Aktivitätsbestimmung der CbFDH wt bei verschiedenem Puffer und pH

		Endkonzentration
Substrat	Na-Formiat	10 mM
Cofaktor	NAD ⁺	1 mM
Puffer, ad. 200 μL	Mcllvaine	pH 5,0; 5,4 und 6,0
	KP _i 0,1 M	pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 und 8,0

3.4.7.3 pH-Optimum Bestimmung Formiatdehydrogenase C23S/C262A

Tabelle 21: Schema zur Aktivitätsbestimmung der CbFDH_C23S/C262A bei verschiedenem pH

		Endkonzentration
Substrat	Na-Formiat	50 mM
Cofaktor	NAD ⁺	1 mM
Puffer, ad. 200 µL	KP _i Puffer 0,1 M	pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 und 8,0

3.4.7.4 pH-Optimum Bestimmung Alkoholdehydrogenase

Tabelle 22: Schema zur Aktivitätsbestimmung der ReADH bei unterschiedlichem pH

		Endkonzentration
Substrat	4-Methylacetophenon	1 mM
Cofaktor	NADH	250 µM
Puffer, ad. 200 µL	KP _i 0,1 M	pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 und 8,0

3.4.7.5 Kinetik-Bestimmung Formiatdehydrogenase C23S/C262A

Die Zusammensetzung der Kinetik-Messung vom Enzym CbFDH_C23S/C262A mit Natriumformiat und eFormiat mit variierten Konzentrationen ist in Tabelle 23 dargestellt und mit variierten NAD⁺ Konzentrationen in Tabelle 24.

Tabelle 23: Schema zur Kinetik-Bestimmung von CbFDH_C23S7/C262A mit (e)Formiat in unterschiedlichen Konzentrationen

		Endkonzentration
Substrat (variiert)	Na-Formiat/ eFormiat	0 – 50 mM
Cofaktor	NAD ⁺	1 mM
Puffer	KP _i 500 mM, pH 7,5	ad. 200 µL

Tabelle 24: Schema zur Kinetik-Bestimmung von CbFDH_C23S/C262A mit NAD⁺ in unterschiedlichen Konzentrationen

		Endkonzentration
Substrat	Na-Formiat/ eFormiat	50 mM
Cofaktor (variiert)	NAD ⁺	0 – 2 mM
Puffer	KP _i 500 mM, pH 7,5	ad. 200 µL

3.4.7.6 Puffereffekt der an der AS-Kaskade beteiligten Enzyme

Tabelle 25: Puffer und deren pH bei 50 °C, die zur Bestimmung des Puffereffektes an der AS-Kaskade beteiligten Enzyme verwendet wurden

Puffer	pH
HEPES, 500 mM	6,5; 7,0; 7,5; 8,0 und 8,5
KP _i , 500 mM	6,5; 7,0; 7,5 und 8,0
MOPS, 500 mM	6,5; 7,0; 7,5 und 8,0
TRIS-HCl, 500 mM	7,0; 7,5; 8,0 und 8,5

Für das Enzym PtKDGA wurde der in Tabelle 26 dargestellte, indirekte Assay verwendet, da bei der eigentlichen Enzymreaktion kein photometrisch aktives Produkt entsteht. Daher wurde das Produkt Pyruvat mittels LDH über die Reaktion Pyruvat und NADH reagieren zu Lactat und NAD⁺ bestimmt, wobei die Abnahme von NADH bestimmt wurde.

Tabelle 26: Schema zur Bestimmung des Puffereffektes der PtKDGA

		Endkonzentration
Substrat	KDG	10 mM
	Ammoniumsulfat	150 mM
Cofaktor	NADH	0,5 mM
Hilfsenzym	LDH	5 U
Puffer	siehe Tabelle 25	100 mM

Tabelle 27: Schema zur Bestimmung des Puffereffektes der MjAIDH

		Endkonzentration
Substrat	D-/L-Glyceraldehyd	2 mM
	Ammoniumsulfat	150 mM
Cofaktor	NAD ⁺	1 mM
Puffer	siehe Tabelle 25	100 mM

Tabelle 28: Schema zur Bestimmung des Puffereffektes der AfAlaDH mit Hydroxypyruvat als Substrat

		Endkonzentration
Substrat	Hydroxypyruvat	5 mM
Substrat	Ammoniumsulfat	150 mM
Cofaktor	NADH	0,2 mM
Puffer	siehe Tabelle 25	100 mM

Tabelle 29: Schema zur Bestimmung des Puffereffektes der AfAlaDH mit Pyruvat als Substrat

		Endkonzentration
Substrat	Pyruvat	10 mM
Substrat	Ammoniumsulfat	150 mM
Cofaktor	NADH	0,2 mM
Puffer	siehe Tabelle 25	100 mM

3.5 Elektrochemische Methoden

3.5.1 Elektrodenvorbereitung

Die Elektroden müssen vor der Verwendung gereinigt werden, um vorhandene Anhaftungen sorgfältig zu entfernen. Hierfür werden sie auf die notwendige Größe geschnitten, mit Ethanol gewaschen und an der Luft trocknen gelassen. Anschließend fand ein Waschgang mit einer 1 M HCl-Lösung sowie MilliQ-H₂O statt. Um die Arbeitsfläche zu definieren, wurde die Rückseite mit Isolierlack beschichtet. Der Aufbau für die Elektropolitur der Elektroden war wie folgt:

- Elektrochemische Zelle mit einer Kammer
- Elektrolyt: 85 %iges H₃PO₄
- Referenzelektrode: Ag/AgCl (Metrohm)
- Gegenelektrode: Ti-Ir Gitter
- Arbeitselektrode: jeweils zu reinigen Elektrode
- Angewendeter Strom: +260 mA/cm für 60 sek

Nach der Elektropolitur wurde die Elektrode mit MilliQ-H₂O abgewaschen und für den Versuch eingesetzt.

3.5.2 Direkte elektrochemische NADH-Regeneration – Metall-Screening

Der Aufbau für das elektrochemische Elektrodenscreening war wie folgt:

- Elektrochemische H-Zelle mit zwei Kammern, getrennt über eine Nafion® N117 Membran
- Elektrolyt: entgaster KPi -Puffer 0,1 M, pH 7,4; im katalytischen Teil der Zelle mit NAD^+ 1 mM bei 750 rpm
- Referenzelektrode: Ag/AgCl (Minireferenzelektrode)
- Gegenelektrode: Ti-Ir Gitter
- Arbeitselektrode: jeweils zu messende Elektrode, Reinigung s. Kapitel 3.5.1

Die Elektrozele wurde aufgebaut und mit den Elektrolyten befüllt. Diese wurden mit Argon für 15 min entgast und anschließend die Gasphase mit Argon dauerhaft begast. Zur Vergleichbarkeit der Elektroden wurde für das Screening eine konstante Stromdichte von -5 mA/cm^2 verwendet. Die Gesamtlaufzeit betrug 30 min bei RT. Die Probenahme erfolgte direkt nach dem Versuch, die Analytik des gebildeten NADH ist in Kapitel 3.4.5 und Kapitel 3.4.6 aufgeführt. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt.

3.5.3 Kombinationsversuche elektrochemische Formiat-Produktion mit enzymatischer Regeneration und Nutzung

3.5.3.1 Allgemeiner Aufbau

Für diesen Versuchsaufbau wurde die elektrochemische Formiatproduktion mit den enzymatischen Reaktionen verbunden. Die Erzeugung von Formiat fand in einer elektrochemischen 2-Kompartiment Flusszelle mit einer Gasdiffusionskathode statt, an der das Substrat CO_2 umgesetzt wurde. Dieses System wurde durch das FhG SR entwickelt und für den Versuch bereitgestellt (Bohlen 2021)). Die CO_2 -Reduktion findet an der Kathoden-Seite statt, wo als Kathode eine Gasdiffusionselektrode, beschichtet mit Sn-NP als Katalysator, eingesetzt war. Als Katholyt diente KPi 0,5 M pH 7,5, welcher bei der Flusszelle eine Ag/AgCl Minireferenzelektrode umfloss. Die Flussgeschwindigkeit der Elektrolyten betrug 100 mL/min und führte in ein Übergabefäß. Als Reaktionsgefäß für das enzymatische 2-Phasensystem diente eine lösungsmittelfeste, gerührte Filtrationszelle mit einem 10 kDa Filter. Darin befand sich jeweils der in Tabelle 30 bzw. Tabelle 31 aufgeführte Enzymansatz bei RT und 110 rpm. Dieses wurde kontinuierlich mit ca. 1 mL/min Katholyt aus dem Übergabefäß befüllt bzw. gefiltert dorthin zurückgeführt. Zur Bestimmung der Formiatkonzentration erfolgte eine Entnahme aus der wässrigen Phase des Bioreaktors sowie dem Übergabefäß. Entnommenes Katholytvolumen wurde durch KPi 0,5 M pH 7,5 er-

setzt. Die Analytik wurde nach Kapitel 3.4.2 durchgeführt. Die Probenahme zur Bestimmung des Verhältnisses von 4-MAP/1-(p-Tol)-EtOH erfolgte aus der organischen Phase, die Analytik nach Kapitel 3.4.4. zur Bestimmung von im Puffer gelösten Mengen 4-MAP/1-(p-Tol)-EtOH diente die bei der Aufbereitung der wässrigen Phase aus dem Übergabegeräß anfallende organische Hexan-Phase. Das spezifische Vorgehen ist in Kapitel 3.5.3.2 und Kapitel 3.5.3.3 aufgeführt.

3.5.3.2 Puls-Betrieb

Zum Start der Reaktion wurde die Formiatproduktion bei -100 mA für 20 min durchgeführt. Dies wurde etwa alle 24 h mit an den Verbrauch angepassten Zeiten wiederholt (nach 24 h: 6 min; nach 48 h: 15 min und nach 72 h: 20 min), wobei bei 72 h ein Elektrodenwechsel stattfand. In den Zwischenzeiten ohne Spannung wurde der elektrochemische Teil vollständig inkl. Fluss abgeschaltet. Der biochemische Teil hingegen befand sich durchgehend im Fluss mit dem Übergabegeräß. Der pH-Wert in diesem Enzymgefäß wurde über einen Titrator (gefüllt mit H₃PO₄ 1 M) kontrolliert. Das Gesamtvolumen des gesamten Aufbaues betrug 150 mL, wovon sich etwa 35 mL im Bioreaktor befanden.

Tabelle 30: Zusammensetzung der enzymatischen Reaktion für den Puls-Betrieb

		Endkonzentration
Enzym für die NADH-Nutzung	ReADH	10 U
Enzym für die Cofaktor-Regenerierung	CbFDH_C23S/C262A	15 U
Cofaktor	PEG-NADH	5 µmol
Substrat Cofaktor-Regenerierung	Formiat, eingebracht über den Katholyt	variabel
Substrat	4-Methylacetophenon	25 mmol
Puffer/ Katholyt	KP _i 0,5 M pH 7,5	

3.5.3.3 Kontinuierlicher Betrieb

Zum Start der Reaktion wurde die Formiatproduktion bei -100 mA für 25 min durchgeführt. Anschließend wurde das elektrochemische System dauerhaft bei -5 mA weiter betrieben. Das Gesamtvolumen des gesamten Aufbaues betrug 150 mL, wovon sich etwa 35 mL im Bioreaktor befanden.

Tabelle 31: Zusammensetzung der enzymatischen Reaktion für den kontinuierlichen Betrieb

		Endkonzentration
Enzym für die NADH-Nutzung	ReADH	10 U
Enzym für die Cofaktor-Regenerierung	CbFDH_C23S/C262A	15 U
Cofaktor	PEG-NADH	4,2 μ mol
Substrat Cofaktor-Regenerierung	Formiat, eingebracht über den Katholyt	variabel
Substrat	4-Methylacetophenon	20 mmol
Puffer/ Katholyt	KP _i 0,5 M pH 7,5	

3.6 Synthese PEG-NADH

Die Synthese des PEG-NADH erfolgte angelehnt an Bückmann et al. 1987. Zur vorbereitenden Funktionalisierung wurden 15 mmol NAD⁺ in 30 mL ddH₂O bei 20 °C aufgeschlämmt und 27,5 mmol Ethylenimine zugetropft. Dabei wurde der pH-Wert mit 70 %iger Perchlorsäure bei 3,5 gehalten und die Reaktion für 48 h bei 30 °C im Dunklen gerührt. Anschließend wurde der Ansatz auf 20 °C abgekühlt, auf 50 mL verdünnt und in 500 mL kaltem Ethanol gefällt. Der entstandene Niederschlag wurde mit weiteren 500 mL kaltem Ethanol über einen Büchnertrichter gewaschen und mittels evakuierten Exsikkators über Gelbgele im Dunklen getrocknet. Die Lagerung des entstandenen N-(1)-(2-aminoethyl)-NAD⁺ fand in einem Schutzgaskolben unter einer N₂-Atmosphäre bei -20 °C statt.

1 g PEG-COOH wurde mit 5 mL ddH₂O gelöst und mit 48 mg N-(1)-(2-aminoethyl)-NAD⁺ vereinigt. Innerhalb von 10 min erfolgte die Zugabe von EDC, wobei der pH mit NaOH 125 mM oder HCl 60 mM über 4,5 h unter Rühren bei RT konstant bei 4,6 – 4,7 gehalten wurden. Anschließend fand eine Lagerung ü. N. bei 4 °C statt. Abschließend wurde diese Stufe über den zuvor mehrmals mit ddH₂O gewaschenen, Ionentauscher Dowex50Wx4 gereinigt und der pH-Wert auf pH 6,0 eingestellt. Dieses Kopplungsprodukt wurde im Wasserbad auf 45 °C erwärmt und unter Rühren 5,3 mmol NaHCO₃ zugegeben, was einen pH-Anstieg auf pH 8,1 bedingt. Es folgte die Zugabe von 0,18 mmol Na₂S₂O₄ mit einer Reaktionszeit von 15 min bei 45 °C und einem konstant gehaltenen pH von 8,1 – 8,2 mit NaOH 125 mM oder HCl 60 mM. Nach dem Stoppen der Reaktion durch Abkühlen auf Eis folgte eine 20-minütige Begasung mit O₂, um überschüssiges Dithionit zu oxidieren, und

eine Reinigung mittels PD10 Entsalzungssäule. Das Eluat wurde für die Dimrothumlagerung mit NaOH 2,5 M bzw. 0,5 M auf pH 11 eingestellt und für 2 h unter Rühren bei 65 °C erhitzt. Anschließend wurde es abgekühlt und mit HCl 1 M auf pH 7,5 eingestellt. Das entstandene PEG-NADH wurde mittels Vivaspin 20, 3 kDa mit ddH₂O gewaschen und konzentriert. Die Konzentration des enzymatisch aktiven PEG-NADH wurde nach Kapitel 3.4.6 bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Enzymatische Oxidation von (+)-Campher

4.1.1 Oxidation von (+)-Campher ohne Cofaktor-Regenerierung

Auf Grund der aktuellen Wandlung der chemischen Industrie hin zur Nachhaltigkeit ist es von Nutzen, für die Auftrennung von Campher-Racematen auf Enzyme und somit auf grüne Methoden zurückzugreifen. Da für diese Reaktion bisher noch kein exakt passendes Enzym bekannt ist, wurde von Hofer et al. eine Borneoldehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. ATCC 17453 dahingehend modifiziert, (-)-Campher anreichern zu können (Hofer et al. 2021). Dieses Enzym wurde mit Hilfe eines rationellen „enzyme engineering“ Ansatzes in die Richtung verändert, dass die selektive Variante PpBDH_S146A/Y188T unter NADH-Verbrauch (+)-Campher zu (+)-Borneol mit einem Enantiomerenverhältnis von >100 reduzieren kann (s. Abbildung 5). Dadurch entsteht als Produkt ein Gemisch aus zwei verschiedenen Molekülen, die in nachfolgenden Schritten voneinander trennbar sind und somit das (-)-Campher direkt isoliert in reiner Form vorliegt. Sollte der (+)-Campher nach dieser Trennung ebenfalls ein Endprodukt darstellen, so kann dieser durch Nutzung von Rückreaktionen erneut erzeugt werden.

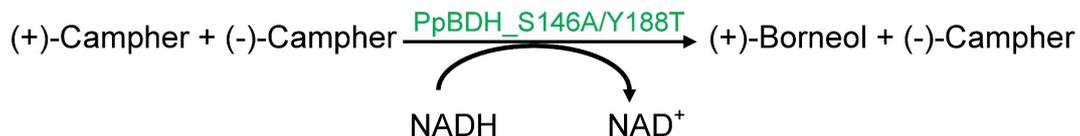


Abbildung 5: Reaktionsgleichung der Campher-Racematspaltung durch das Enzym PpBDH_S146A/Y188T.

Dieses katalysiert die racemische Spaltung von (+/-)-Campher durch Umwandlung von (+)-Campher zur (+)-Borneol und oxidiert hierbei gleichzeitig NADH zu NAD⁺.

Analog zur theoretischen Reaktionsgleichung (Abbildung 5) wurde in einem Experiment ein (+/-)-Campher-Racematgemisch zusammen mit einem auf das Zielmolekül (+)-Campher bezogenen, doppelten Überschuss an NADH dem Enzym PpBDH_S146A/Y188T ausgesetzt und die Umwandlung von Campher zu Borneol über eine Zeitdauer von 6 h beobachtet.

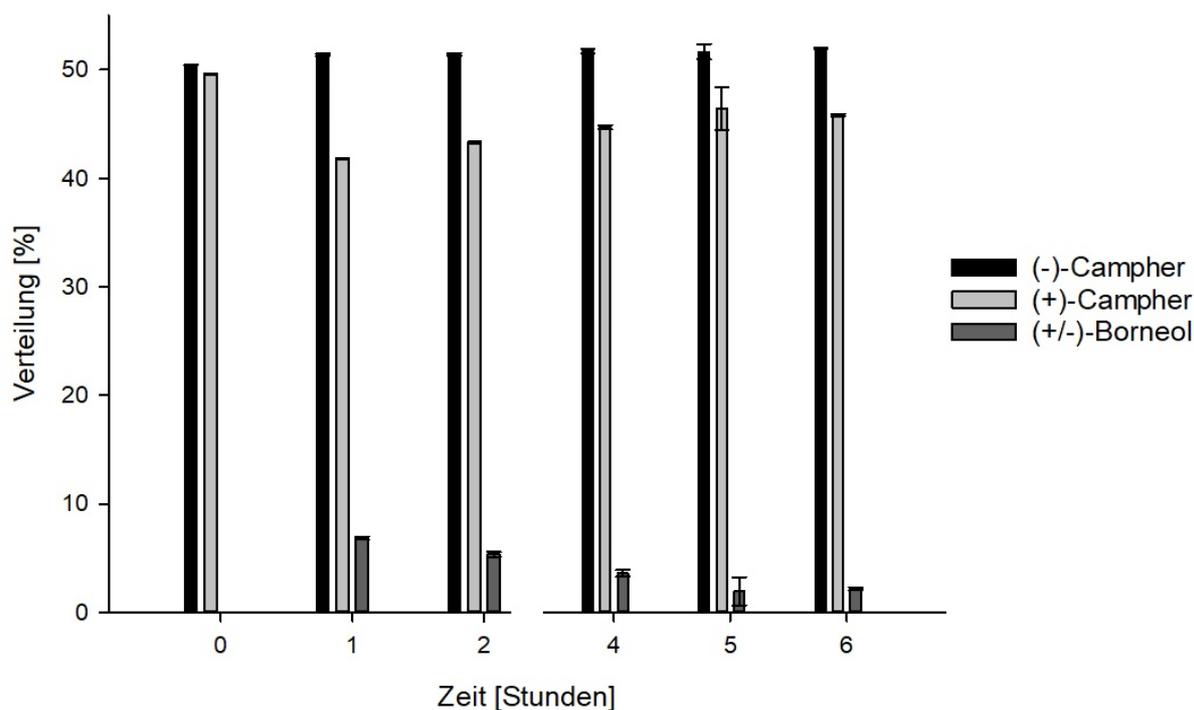


Abbildung 6: Campher-Racemat Abbau mittels pPBDH_S146A/Y188T, ohne Cofaktor-Regeneration

Die Reaktionsansätze enthielten 1 mM (+/-)-Campher (gelöst in DMSO), 1 mM NADH sowie Phosphat-Citrat Puffer nach McIlvain pH 6,0. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung nach drei voneinander unabhängigen Messungen an.

In Abbildung 6 ist diese enzymatische Racematspaltung ohne Cofaktor-Regeneration dargestellt. Dabei kann man erkennen, dass der Anteil an Borneol nach einer Stunde mit 6,9 % +/- 0,1 % den höchsten Wert darstellte. Wie der Vergleich der beiden Campher-Enantiomere zeigt, wurde mit der neuen Enzymmutante hierbei auch wie gewünscht selektiv das (+)-Campher abgebaut. Mit fortschreitender Reaktionszeit wird ersichtlich, dass der erlangte Borneol-Anteil auf etwa 2 % fällt und der (+)-Campher-Anteil erneut zunimmt. Der prozentuale (-)-Campher-Anteil bleibt wie erwartet über die gesamte Versuchsdauer von 6 h unangetastet im Bereich des Ausgangswertes.

4.1.2 Oxidation von (+)-Campher mit Cofaktor-Regenerierung

Ein Lösungsansatz zur Steigerung des (+)-Campher-Umsatzes lag in der Nutzung einer NADH-Regenerationsmethode. Häufig wird für eine solche Regeneration die produktgenerierende Enzymreaktion mit einer weiteren, NADH recycelnden Enzymreaktion gekoppelt. Mögliche und hierfür häufig genutzte Verfahren wurden bereits in der Einleitung in Kapitel 1.3 aufgeführt. In diesem Fall fand die enzymatische Regeneration mit der Formiatdehydrogenase (FDH) Anwendung. Dabei wird das Formiat mittels der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* zu CO₂ oxidiert und gleichzeitig das in der eigentlich gewünschten BDH Reaktion anfallende NAD⁺ zurück zu NADH reduziert (s. Abbildung 7).

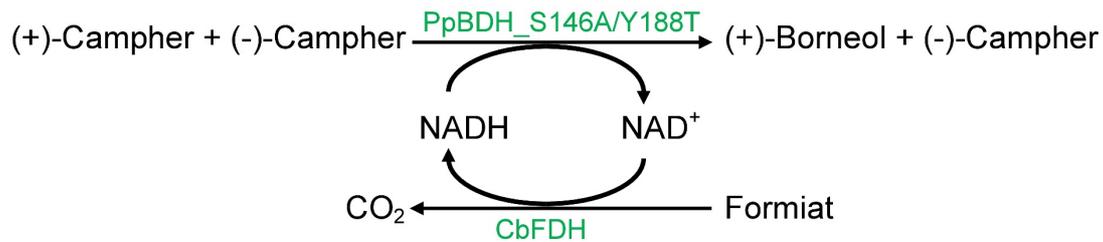


Abbildung 7: Campher-Racemat Abbau mittels PpBDH_S146A/Y188T mit NADH-Cofaktor-Regeneration.

Dabei wird die racemische Spaltung von (+/-)-Campher durch Umwandlung von (+)-Campher zur (+)-Borneol katalysiert. Hierbei wird NADH zu NAD⁺ oxidiert. Die Regeneration von NAD⁺ zu NADH erfolgt über die Reaktion der CbFDH wt, bei der Formiat zu CO₂ oxidiert wird.

Sollen bei einer Produktsynthese mehrere enzymatische Reaktionen gleichzeitig in einem Gefäß abgehalten werden, so ist man hierbei bedacht, einen Arbeitsbereich zu definieren, bei dem alle beteiligten Enzyme in einem möglichst optimalen Bereich ihre katalytische Arbeit vollziehen können. In Hinblick auf eine mögliche Kombination mit weiteren, andersartigen Regenerationssystemen, wurde für die Zusammenarbeit der PpBDH Mutante und CbFDH ein Phosphat-Puffer gewählt. Um für das pH-Screening einen pH-Bereich von 5,0 – 8,0 abdecken zu können, geschah dies im sauren Bereich bis pH 6,0 mit einem Phosphat-Citrat Puffer nach McIlvaine und ab einem pH-Wert von oberhalb 6,0 mit einem Kaliumphosphatpuffer. Für den Vergleich wurde jeweils die spezifische Aktivität der Enzyme bei den jeweiligen Gegebenheiten bestimmt. Dies konnte auch für die PpBDH, trotz des geringen Umsatzes ohne Cofaktor-Regenerationssystem, erfolgreich mittels UV-Absorptionsabnahme von NADH durchgeführt werden.

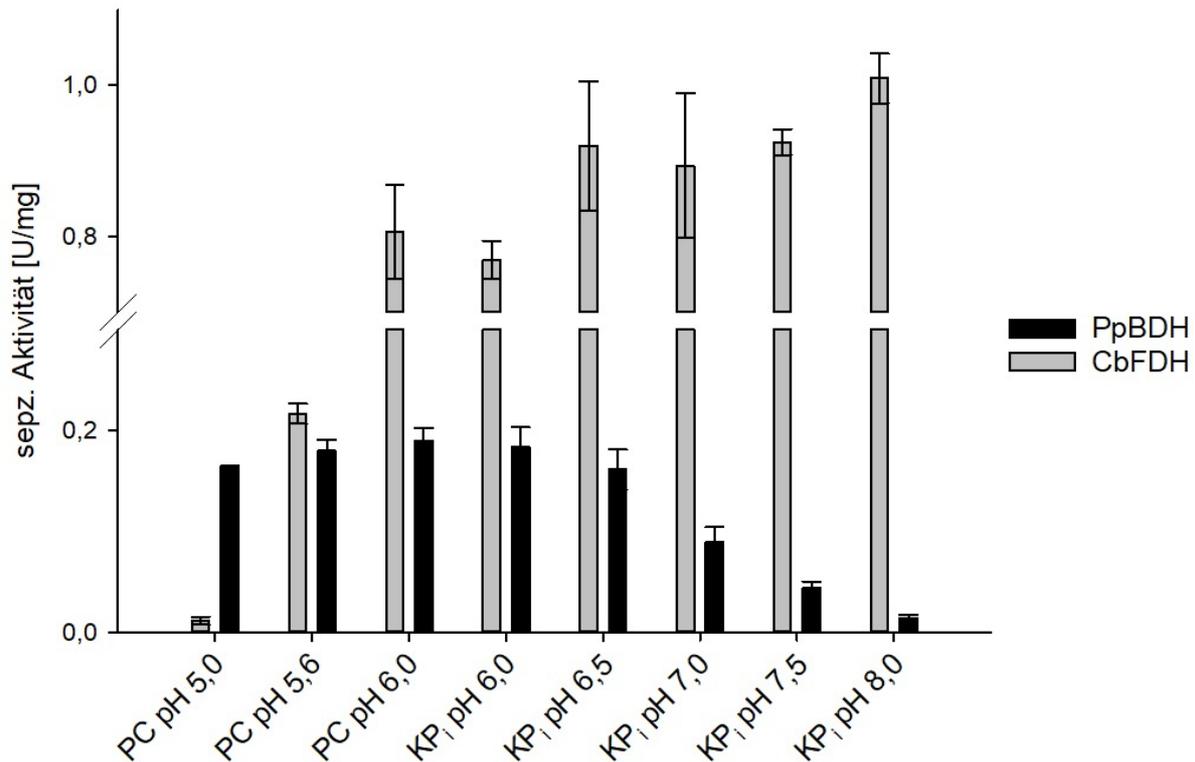


Abbildung 8: Verhalten der PpBDH_S146A/Y188T (schwarz) sowie der CbFDH wt (hellgrau) bei unterschiedlichen pH-Werten und Puffer.

Die Reaktionsansätze für die PpBDH enthielten 1 mM (+)-Campher (gelöst in DMSO) und 0,25 mM NADH sowie den jeweils angegebenen Puffer in 100 mM. Die Reaktionsansätze für die CbFDH enthielten 1 mM Na-Formiat, 0,25 mM NAD⁺ sowie 100 mM des jeweils angegebenen Puffers. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung nach drei voneinander unabhängigen Messungen an. PC = Phosphat- Citrat Puffer, KP_i = Kalium-Phosphat Puffer.

Wie aus Abbildung 8 zu entnehmen ist, verhalten sich die beiden Reaktionen im gewählten pH-Bereich gegenläufig. Die PpBDH ist im sauren Bereich mit \leq pH 6,5 am aktivsten, wobei die spezifische Aktivität von max. 0,2 U/mg insgesamt als niedrig einzustufen ist. Bei Verwendung eines bereits leicht basischen Puffer mit pH 7,5 kommt die Reaktion von (+)-Campher zu (+)-Borneol quasi vollständig zum Erliegen. Im Gegensatz dazu ist die CbFDH bei einem sauren pH von 5,0 inaktiv und zeigt ihre höchste katalytische Leistung von bis zu 1,0 +/- 0,0 U/mg bei pH 8,0. Hierbei ist zu beachten, dass eine gute Aktivität von mehr als 0,8 U/mg ab einem pH von 6,0 bei beiden Puffern erreicht wird. Für das Zusammenspiel der beiden Enzyme bestimmt somit auf Grund der geringeren Aktivität hauptsächlich die PpBDH den notwendigen pH, wobei ein pH unterhalb von 6,0 durch das Verhalten der CbFDH ausgeschlossen wurde. Aus diesem Grund wurde für die Zusammenarbeit beider Enzyme der Phosphat-Citrat-Puffer pH 6,0 festgelegt, bei dem die PpBDH mit 0,2 +/- 0,0 U/mg ihre höchste Aktivität und die CbFDH mit 0,8 +/- 0,1 U/mg eine gute Aktivität im Test aufwies.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde mit dem gewählten Puffersystem Phosphat-Citrat-Puffer pH 6,0 eine enzymatische (+/-)-Campher-Racematspaltung mit Cofaktor-Regenerierung durchgeführt (Abbildung 9). Bei diesem Versuch betrug die NADH-Konzentration nur $\frac{1}{4}$ des Vergleichsversuchs aus Abbildung 8, d. h. mit dieser NADH-Konzentration wäre ohne NADH-Regeneration auch stöchiometrisch kein Vollumsatz des (+)-Camphers möglich gewesen. Bereits nach der ersten Stunde war mit 51,2 % +/- 1,4 % die Hälfte des vorhandenen (+)-Campher umgewandelt, wodurch der Unterschied zum Versuch ohne Regeneration, bei dem ein Umsatz von 6,9 % +/- 0,1 % erfolgte, bereits zu diesem frühen Zeitpunkt sehr deutlich wird. Im weiteren Verlauf nahm der Anteil an (+)-Campher immer weiter ab und war nach 6 h mit einem Anteil an allen gemessenen Substanzen von 1,0 % +/- 0,0 % nahezu vollständig aufgebraucht. Der Enantiomeren-Überschuss (ee) lag hierbei bei 95,8 %. Über die Messdauer verringerte sich auch die Konzentration des (-)-Campher geringfügig und lag nach den 6 h noch bei 94,8 % +/- 0,8 % der anfänglichen 500 μ M.

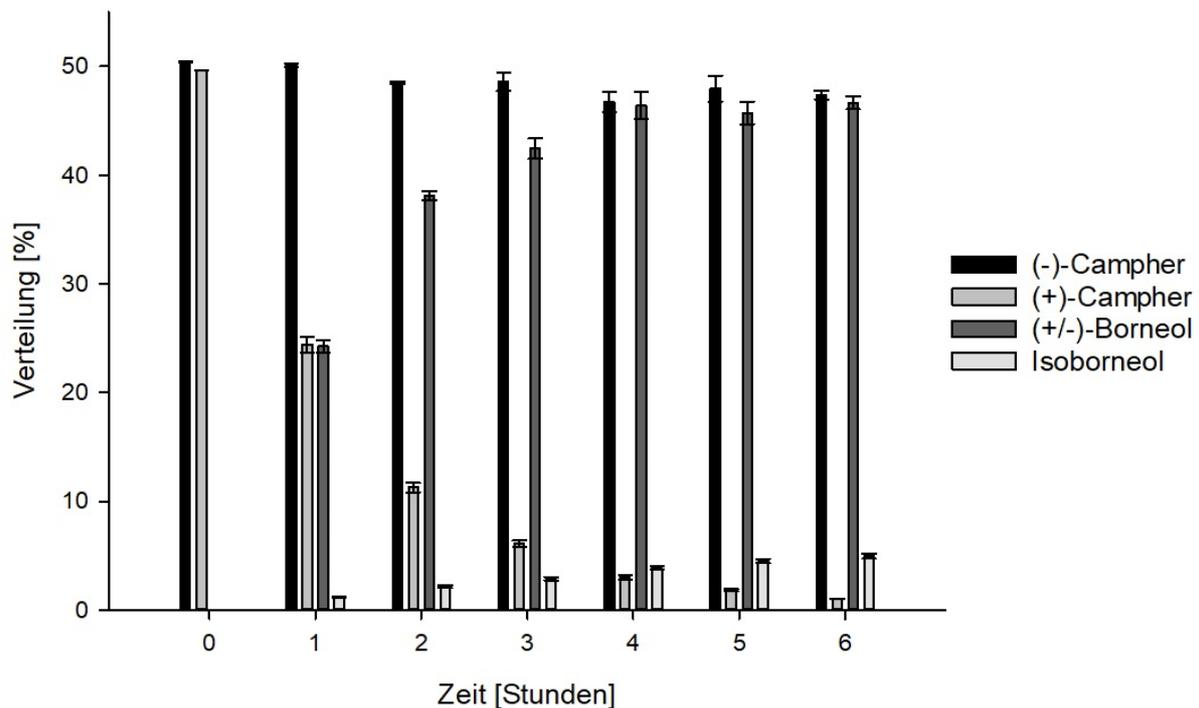


Abbildung 9: Campher-Racemat Abbau mittels PpBDH_S146A/Y188T mit Cofaktor Regeneration durch CbFDH wt.

Die Reaktionsansätze enthielten 1 mM (+/-)-Campher (gelöst in DMSO), 0,25 mM NADH, 500 μ g/mL PpBDH sowie Phosphat-Citrat Puffer pH 6,0 100 mM. Als Regenerationssystem für den Cofaktor waren weiterhin 10 mM Na-Formiat und 0,5 U/mL FDH wt zugesetzt. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung nach drei voneinander unabhängigen Messungen an.

4.2 Enzymkaskade mit einer in sich ausgeglichenen Cofaktor-Nutzung zur Produktion von Aminosäuren aus Zuckerabbaustoffen

Mit dem Ziel einer bioökonomischen Zukunft mit Bioraffinerien, die die Umwandlung von Molekülen unterschiedlicher Oxidationsstufen ermöglichen, wurde eine neuartige Enzymkaskade entwickelt. Die Kaskade hierfür wurde so designt, dass im ersten Schritt der Ausgangsstoff 2-KDG mittels der 2-Keto-3-Deoxygluconataldolase von *Picrophilus torridus* (PtKDGA) in Pyruvat und D-Glyceraldehyd gespalten und dadurch die Wege für die zwei verschiedenen Produkte ermöglicht werden. Das Pyruvat wiederum wird dann direkt mit Ammonium und unter der Oxidation von NADH durch die Alanindehydrogenase aus *Archaeoglobus fulgidus* (AfAlaDH) zu dem ersten Endprodukt L-Alanin umgesetzt. Dem gegenüber wird das gebildete D-Glyceraldehyd durch die Aldehyddehydrogenase aus *Methanocaldococcus jannaschii* (MjAIDH) zu D-Glycerat umgewandelt, wobei NAD⁺ zu NADH reduziert wird und somit der erste NAD-Kreislauf zusammen mit der Reaktion zu L-Alanin formal geschlossen wird. Der weitere Weg des D-Glycerats, angelehnt an Li et al., bildet den zweiten formalen NAD-Kreislauf dieser Kaskade. Dabei wird das D-Glycerat mittels der Glyoxylatreduktase aus *Thermococcus litorialis* (TIGR) zu Hydroxypyruvat und weiter, erneut durch die AfAlaDH, mit Ammonium zu L-Serin umgewandelt. Somit weist diese Kaskade zwei sich selbst ausgleichende NAD-Kreisläufe auf, um die Produkte L-Serin und L-Alanin im gleichen Verhältnis herzustellen.

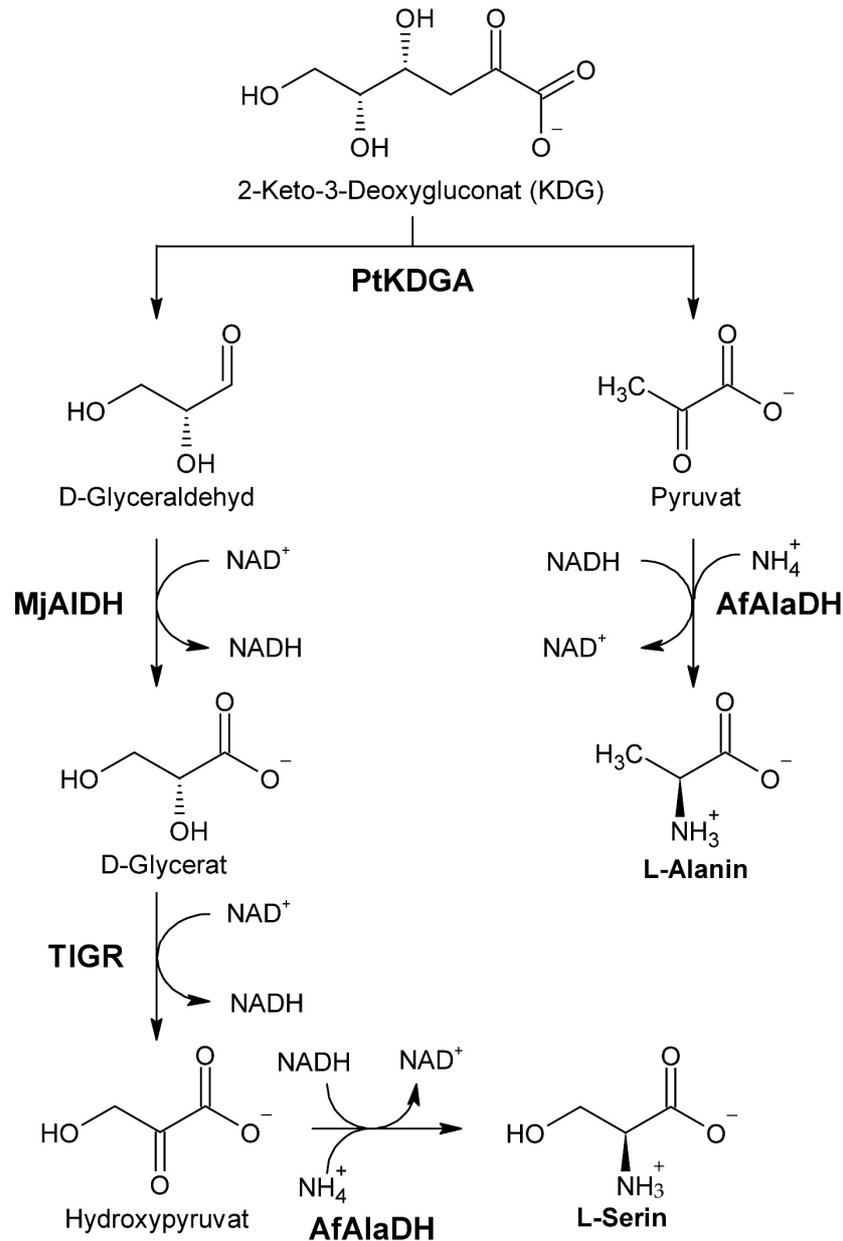


Abbildung 10: Übersicht des Reaktionsverlaufes der Enzymkaskade zur Herstellung von L-Alanine und L-Serin aus 2-Keto-3-Deoxygluconate (KDG).

PtKDGA = KDG-Aldolase aus *Picrophilus torridus*, MjAIDH = Aldehyddehydrogenase aus *Methanocaldococcus jannaschii*, AfAlaDH = Alanindehydrogenase aus *Archaeoglobus fulgidus*, TIGR = Glyoxylatreduktase aus *Thermococcus litorialis*.

4.2.1 Bestimmung der Rahmenbedingungen

Um ein besseres Verständnis für die einzelnen Enzyme zu erlangen, konnte auf kinetische Daten aus der Literatur zurückgegriffen werden (Li et al. 2018; Gmelch et al. 2019). Diese zeigen, dass das beginnende Enzym KDGA mit 1,1 mM den höchsten K_m aufweist. Die K_m -Werte für die restlichen Enzym-Substratkombinationen sind 0,07 mM für AfAlaDH Hydroxypyruvat, 0,2 mM für AfAlaDH - Pyruvat und 0,3 mM bei MjAIDH - Glyceraldehyd. Für

Ergebnisse

die TIGR mit der Reaktion D-Glycerat zu Hydroxypyruvat konnten keine Daten erlangt werden. Um ein möglichst optimales Zusammenspiel der verschiedenen Enzyme innerhalb eines Gefäßes zu ermöglichen, wurden die einzelnen Reaktionen der Kaskade in Gegenwart unterschiedlicher Puffer und pH-Werte betrachtet. Die verwendeten pH-Werte der Puffer hingen von den jeweiligen pKs-Werten ab, wodurch ein gesamter pH-Bereich von 6,5 – 8,5 abgedeckt wurde (Asimov 1960). Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 32 abgebildet. Zur besseren Übersichtlichkeit sind diese mit einem Ampelsystem dargestellt, welches sich nach der höchsten gemessenen spezifischen Aktivität richtet, bezogen auf das jeweilige Enzym.

Tabelle 32: Gemessene Aktivität der Enzyme PtkDGA, MjAIDH und AfAlaDH mit den in der Kaskade vorkommenden Substraten in Abhängigkeit des Puffers bei unterschiedlichen pH-Werten

Die Farbeinteilung basiert auf der jeweils höchsten spezifischen Aktivität der dargestellten Enzym-Substrat Kombination. Rot = 0 % – 50 %, Gelb = 51 % – 75 % und Grün >75 %

Enzym	Substrat	TRIS-HCl				MOPS				HEPES					KPi			
		7,0	7,5	8,0	8,5	6,5	7,0	7,5	8,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	6,5	7,0	7,5	8,0
PtkDGA	KDG	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
MjAIDH	D-Glyceraldehyd	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
AfAlaDH	Hydroxypyruvat	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
AfAlaDH	Pyruvat	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Laut diesen Ergebnissen bevorzugt die PtkDGA ein eher saures Milieu. So liegt die Aktivität beispielsweise in HEPES pH 6,5 bei 8,2 U/mg und beim pH-Wert von 8,5 nur noch bei 2,5 U/mg. TRIS-HCl wiederum zeigt sich insgesamt als eher ungeeignet. Möchte man mit einem höheren pH-Wert arbeiten, so ist der KPi-Puffer am besten geeignet. Bei Verwendung der MjAIDH wiederum scheidet der TRIS-HCl –Puffer vollständig aus, vermutlich wegen einer Interaktion des Substrats D-Glyceraldehyd mit dem Puffer (Bubb et al. 1995). MOPS ist insgesamt mittel geeignet und bei HEPES und KPi zeigt sich eine Präferenz für basische pH-Werte. Für die Reaktionen der AfAlaDH wäre wiederum insgesamt ein eher basischer TRIS-HCl Puffer am besten geeignet. TRIS-HCl fiel auf Grund der Inaktivität der MjAIDH komplett aus der Auswahl. Bei MOPS und HEPES wiederum fand die Diskrepanz zwischen der PtkDGA, die im sauren deutlich aktiver als im basischen ist, und der AfAlaDH, welche gerade für die reduktive Aminierung von des Hydroxypyruvat zu L-Serin einen basischen pH benötigt, Beachtung. Somit fiel die Auswahl für die folgenden Gesamt-

kaskadenversuche auf den KP_i -Puffer pH 8,0. Bei diesem war die MjAIDH bei Glyceraldehyd sowie die AfAlaDH für Pyruvat im grünen Aktivitätsbereich. Für das Substrat Hydroxyypyruvat zeigte sich eine gute Aktivität, wobei eine höhere nur durch TRIS-HCl erreichbar wäre, welcher aus oben genannten Grund der Inaktivierung nicht möglich ist. Die PtKDGA zeigt bei KP_i pH 8,0 ebenfalls nicht die beste Aktivität. Da dieses Enzym allerdings am Anfang der Kaskade steht und die höchste spezifische Aktivität aller Enzyme aufzeigte, konnte dies vernachlässigt werden. In einem ersten Vergleichsansatz, bei dem alle Enzyme mit der gleichen Aktivität eingesetzt wurden, erreichte L-Alanin mit $23,3 \pm 0,4$ mM beinahe Vollumsatz, wohingegen das L-Serin nach dieser Zeit nur auf $5,3 \pm 0,3$ mM kam (s. Abbildung 11, Referenz).

4.2.2 Optimierung der Enzymkaskade durch eine Titrationsstudie

Bereits der Puffertest zeigte auf, welche Schwierigkeiten bei dem Zusammenspiel mehrerer Enzyme auftreten können und welche Kompromisse daher nötig sind. Nichtsdestotrotz beruhten die bisherigen Erfahrungen nur auf Einzelmessungen und nicht auf dem gemeinsamen Zusammenspiel aller Enzyme. Um den Einfluss der jeweiligen Enzyme im kompletten Zusammenhang der Kaskade zu ermitteln, fand eine Titrationsstudie statt. Dabei wird das zu untersuchende Enzym in seiner Aktivität variiert, wohingegen der restliche Kaskadenaufbau unverändert blieb. Durch den Vergleich mit der Referenzkaskade mit gleicher Aktivität aller Enzyme können anhand unterschiedlicher erhaltener Produktkonzentration Engpässe bei den Kaskadenreaktionen sichtbar werden (s. Abbildung 11). Bei der Referenz mit gleicher Enzymaktivität erreicht L-Alanin mit $23,3 \pm 0,4$ mM beinahe Vollumsatz, wohingegen das L-Serin nur auf $5,3 \pm 0,3$ mM kommt. Für die Variationen wurden Ansätze verwendet, bei denen das entsprechende Enzym entweder mit nur 20 % dieser Vergleichsaktivität eingesetzt wurden oder es wurde auf 200 % erhöht. Wie in Abbildung 11 zu entnehmen ist, zeigen alle Kaskadenvarianten eine L-Alanin-Konzentration von über 85 %. Für diese Produktion, die lediglich zwei Reaktionsschritte umfasst, reicht es also aus, alle Enzyme im gleichen Verhältnis zu verwenden, um einen Vollumsatz zu erreichen. Lediglich die Verringerung der MjAIDH auf 20 % lässt mit $8,5 \pm 0,6$ mM deutlich weniger L-Alanin entstehen. Einen deutlichen Effekt der MjAIDH lässt sich ebenso für das L-Serin ausmachen, welches bei Verringerung des Enzyms gar nicht mehr gebildet wird. Bei der AfAlaDH entstand durch die geringere vorhandene Aktivität mit $1,3 \pm 0,1$ mM L-Serin nur noch ein Viertel der Vergleichsmenge von $5,3 \pm 0,3$ mM. Eine Verdoppelung dieser beiden limitierenden Enzyme AfAlaDH sowie MjAIDH einzeln führt in beiden Fällen jeweils lediglich zu einer leichten Erhöhung der L-Serin Konzentration auf $6,7 \pm 0,2$ mM beziehungsweise $6,3 \pm 0,5$ mM. Bei den beiden verbleibenden Enzymen TIGR und PtKDGA

zeigt sich bei der Variation der Aktivität kein Einfluss auf die Konzentration der beiden Aminosäuren.

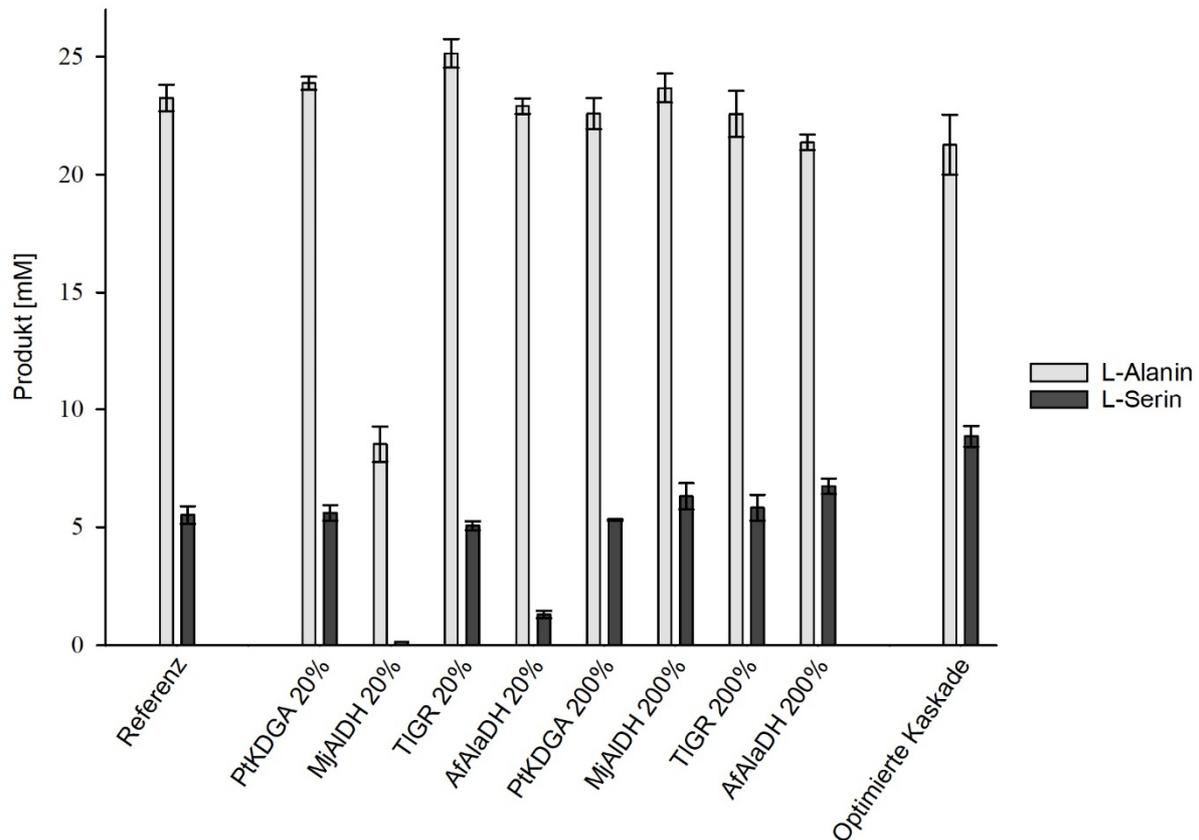


Abbildung 11: Durch verschiedene Variationen der Enzymkaskade produzierte L-Alanin- und L-Serin-Konzentration.

Die Ansätze enthielten 150 mM Ammoniumsulfat, 5 mM NAD⁺, 25 mM KDG in KP_i-Puffer 100 mM pH 8,0. Die Reaktionen fanden bei 50 °C für 21 h statt. Die Enzyme wurden im Allgemeinen mit 0,5 U zugegeben, unter Beachtung der jeweils angegebenen prozentualen Erniedrigung/Erhöhung. Bei der verbesserten Kaskade wurde die Enzymaktivität mit Ausnahme der PtKDGA auf 1,0 U erhöht. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung nach drei voneinander unabhängigen Messungen an.

Als Resultat aus dieser Titrationsstudie wurde ersichtlich, dass die MjAIDH und auch AfAlaDH in der Kaskade für eine verbesserte L-Serin-Ausbeute mit einer höheren Aktivität vorliegen müssen. Die TIGR zeigte in dem Test zwar keinen Einfluss, wurde aber ebenso für die verbesserte Kaskade erhöht, da es das zentrale Enzym in dem Weg zu L-Serin darstellt und hier, auf Grund der fehlenden Charakterisierung durch die nicht möglichen Einzelmessungen, keine neue Schwachstelle entstehen sollte. Von der PtKDGA wiederum wurden weiterhin 0,5 U eingesetzt. Verglichen mit der Referenzkaskade blieb die Produktion von L-Alanin mit 21,3 +/- 1,0 mM in einem ähnlich hohen Bereich. Die L-Serin Konzentration stieg hingegen auf 8,9 +/- 0,4 mM. Nach der Laufzeit von 21 h konnten somit

Ergebnisse

die 25 mM 2-KDG als Ausgangstoff zu 30,2 mM gesamt Aminosäuren gewandelt werden. Stöchiometrisch gesehen entspricht dies einem Umsatz von 85 % +/- 4 % zu L-Alanine und 35 % +/- 1 % zu L-Serin.

Zusätzlich kann der zeitliche Ablauf Aufschluss darüber geben, wie sich die einzelnen Kaskadenabschnitte zueinander verhalten (s. Abbildung 12). Die L-Alanin-Bildung verlief dabei sehr zügig und war bereits nach 2 h mit 98 % +/- 1,3 % beim Vollumsatz angekommen. Anschließend fällt die L-Alanine-Konzentration wieder langsam ab. Die L-Serin-Konzentration hingegen stieg deutlich langsamer und erreichte nach 2 h lediglich 1,0 mM +/- 0,1 mM. Diese Konzentrationssteigerung erfolgte allerdings über die gesamte Messdauer linear.

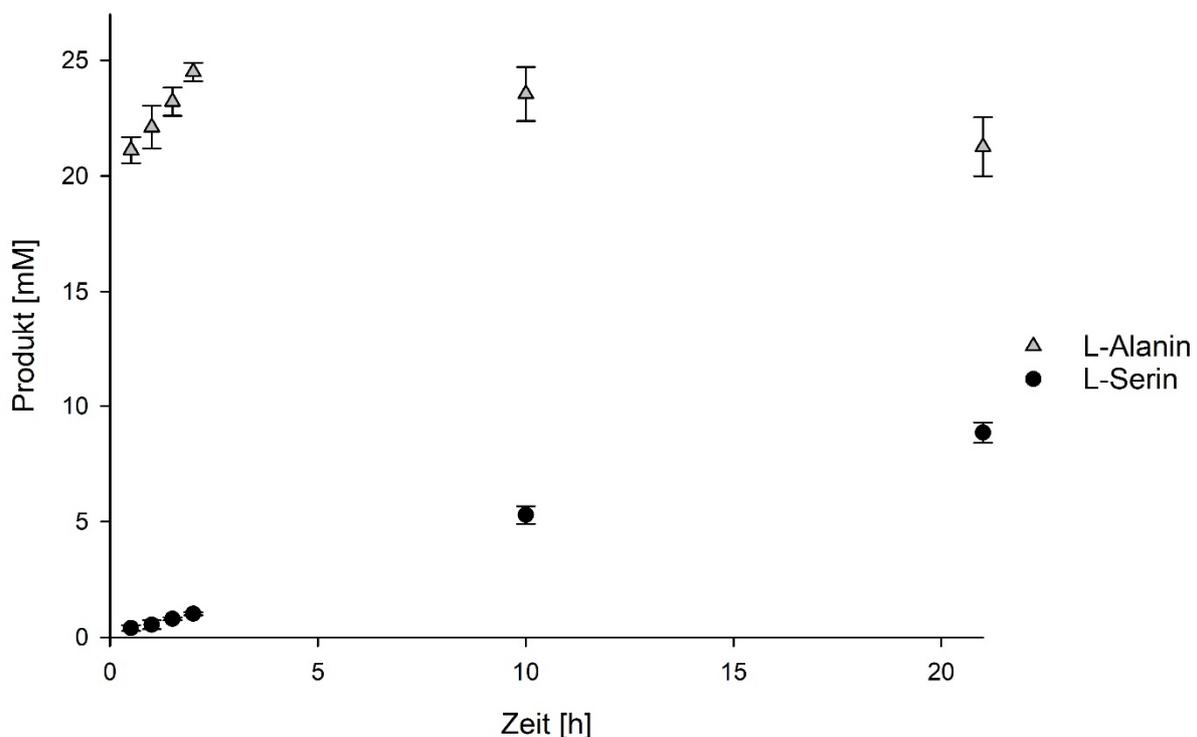


Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der L-Alanin- und L-Serin-Konzentrationen, produziert durch die verbesserte Enzymkaskade.

Der Ansatz enthielt 150 mM Ammoniumsulfat, 5 mM NAD⁺, 25 mM KDG und fand in KP_i-Puffer 100 mM pH 8,0 statt. Die Enzyme wurden mit 1,0 U zugegeben, mit Ausnahme der PtKDGA, welche mit 0,5 U ihre Reaktion katalysierte. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung nach drei voneinander unabhängigen Messungen an.

4.3 Materialscreening mit konstanter Stromstärke für die direkte, elektrochemische NADH-Regeneration

Nebst der Möglichkeit, Enzyme für die Regeneration von NADH einzusetzen, gibt es noch weitere Varianten, die in der Einleitung in Kapitel 1.3 vorgestellt werden. Zu der Methode mit dem geringsten Materialeinsatz gehört die direkte, elektrochemische Regeneration, bei der der Cofaktor direkt an der Elektrodenoberfläche durch den nötigen Elektronenübertrag regeneriert wird. Dabei ist einer der entscheidenden Einflussfaktoren das gewählte Elektrodenmaterial, für das bisherig veröffentlichte Ergebnisse in Kapitel 1.3.4 aufgeführt werden. Die direkte Vergleichbarkeit von Elektrodenmaterialien untereinander ist durch die übliche Variation des Potentials bezüglich der Effizienz allerdings nur unzureichend möglich. Daher wurde das Materialscreening in dieser Arbeit bei einer festgelegten Stromstärke durchgeführt, wodurch den getesteten Elektroden die gleiche Anzahl an Elektronen während der Regenerationsdauer zugeführt wurde und die Ergebnisse verschiedener Materialien zueinander vergleichbar werden. Das Ziel dieser Methode war es somit, umfangreiche Daten bezüglich der allgemeinen und spezifischen Regenerationsleistung der Elektrodenmaterialien zu sammeln.

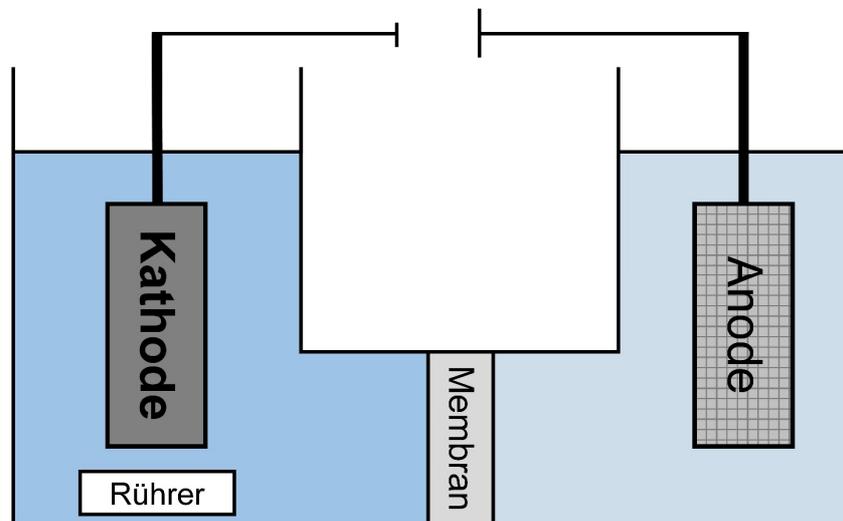


Abbildung 13: Aufbau der zwei-Kompartiment-Zelle für das Materialscreening

Die Regeneration von NAD^+ fand unter Verwendung von gereinigten, blanken Kathoden aus dem jeweils zu testenden Material in entgastem KPi -Puffer 100 mM pH 7,4 mit 1 mM NAD^+ für 30 min bei RT statt.

Für das Screening wurden fünfzehn verschiedene Materialien auf Ihre Eignung als Regenerationskathode getestet. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 13 zu sehen. Als Elektrolyt fand ein Kaliumphosphat-Puffer Anwendung, der mit zahlreichen Test-Enzymen gut harmonisierte und auch bei elektrochemischer Anwendung stabil ist. Das Screening fand

Ergebnisse

in einer zwei-Kompartiment-Zelle mit entgastem Puffer statt, um unerwünschten Nebenreaktionen vorzubeugen. Durch Zugabe von NAD^+ wurde die Reaktion gestartet und entstandenes NADH mittels UV-Messung bestimmt. Abbildung 14 zeigt NADH gesamt, d.h. alle, bei 340 nm absorbierenden NADH -Varianten, sowie den Anteil an enzymatisch aktivem 1,4- NADH , der durch den enzymatischen Abbau mittels LDH-Reaktion von Pyruvat und NADH zu Lactat und NAD^+ ermittelt wurde.

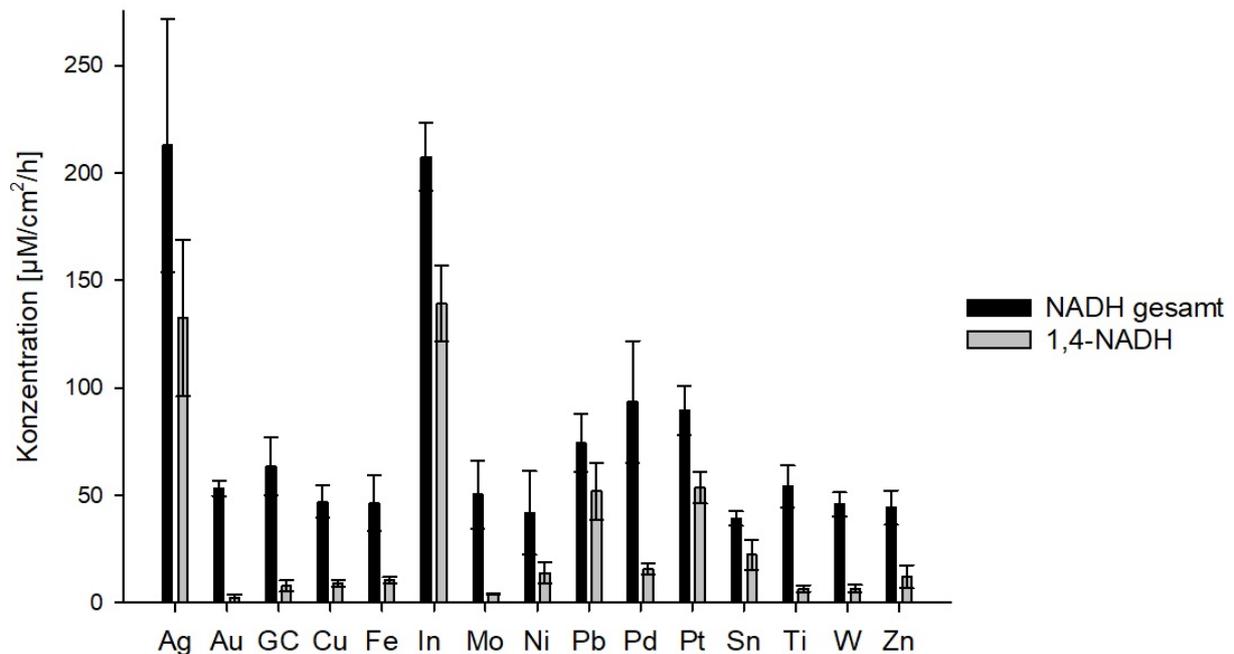


Abbildung 14: Übersicht der durch die direkte, elektrochemische Regeneration bei $-5 \text{ mA}/\text{cm}^2$ erzeugten Gesamt-NADH sowie 1,4-NADH Konzentrationen.

Die Reaktion fand unter Verwendung von gereinigten, blanken Elektroden in entgastem KPi -Puffer 100 mM pH 7,4 mit 1 mM NAD^+ für 30 min bei RT in einer zwei-Kompartiment-Zelle statt. Es wurde eine Ag/AgCl Referenzelektrode verwendet. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung nach drei voneinander unabhängigen Messungen an.

Wie aus Abbildung 14 zu entnehmen ist, bildeten die beiden Metalle Silber und Indium mit $212 \pm 48 \mu\text{M}/\text{cm}^2/\text{h}$ bzw. $207 \pm 13 \mu\text{M}/\text{cm}^2/\text{h}$ in diesem Vergleich mit Abstand das meiste gesamte NADH . Alle weiteren getesteten Materialien lagen unter diesen Bedingungen im Bereich von etwa 50 – 100 $\mu\text{M}/\text{cm}^2/\text{h}$ oder darunter. Im besten Fall wird somit eine faradaysche Effizienz für die Reduktion von NAD^+ zu NADH gesamt bei Silber von 14 % \pm 3 % erreicht. Entscheidend für die Qualität der Reduktion ist nebst der Gesamtmenge an NADH -Varianten vor allem der Anteil des 1,4- NADH , welcher sehr deutlich variiert. So gelingt es bei der Verwendung von Gold bei dem aus der Stromstärke für dieses Metall resultierenden Potential von $-1,6 V_{\text{Ag}/\text{AgCl}}$ mit 4 % \pm 3 % kaum, die aktive Variante zu erzeugen. Blei wiederum zeigt mit 69 % \pm 4 % den höchsten prozentualen Anteil, was

bei einer Gesamtmenge von $75 \pm 11 \mu\text{M}/\text{cm}^2/\text{h}$ allerdings nur in einer Konzentration von $52 \pm 11 \mu\text{M}/\text{h}/\text{cm}^2$ resultiert. Weitere Metalle mit einem Anteil von mehr als 50 % der aktiven Form sind Silber mit $62 \pm 1 \%$, Indium mit $67 \pm 4 \%$, Platin mit $60 \pm 1 \%$ und Zinn mit $56 \pm 11 \%$. Abhängig von der Gesamt-NADH-Konzentration konnten diese Metalle somit von $22 \pm 6 \mu\text{M}/\text{cm}^2/\text{h}$ bis zu $139 \pm 14 \mu\text{M}/\text{cm}^2/\text{h}$ der benötigten aktiven NADH-Form bilden. Keines der verwendeten Metalle konnte eine Quote von mehr als 70 % erreichen, wodurch diese unmodifizierten, blanken Elektroden für die Anwendung zur Regeneration von NADH als ungeeignet angesehen werden können.

4.4 Nutzung von elektrochemisch erzeugtem Formiat für die NADH-Regeneration

Da die direkte Anwendung von Elektroden für die Oxidation des Cofaktor NAD möglich ist, aber auf Grund der Regenerationsrate für die aktive Form nicht effizient einsetzbar ist, ist die Anwendung einer komplexer aufgebauten Variante sinnvoll. So fand eine Variante der indirekten, enzymgekoppelten, elektrochemischen Regeneration Anwendung, bei der unter Einsatz von Power to X ein Substrat für die enzymatische Regeneration gebildet wird.

4.4.1 Auswahl von Molekülen auf Basis von CO_2 für eine neue, enzymgekoppelte, elektrochemische Regeneration

Mit Hinblick auf den, durch unter anderem die zu hohe CO_2 -Konzentrationen in der Atmosphäre mit verursachten Klimawandel, ist es ein großes Forschungsinteresse, CO_2 erneut zu binden und so zu entfernen. Daher wird versucht, CO_2 elektrochemisch zu unterschiedlich komplexen und nützlichen Kohlenstoffverbindungen zu reduzieren und dieses somit einerseits in den Verbindungen zu fixieren und andererseits wertsteigende Substanzen zur Energiespeicherung oder als Ausgangsstoff für komplexere Chemikalien zu bilden (Nitopi et al. 2019). Ein interessantes Produkt ist hierbei das durch einfache erfolgte Reduktion entstehende Formiat (Al-Tamreh et al. 2021; Philips et al. 2020). Dem CO_2 wird zunächst ein Elektron zugeführt, wodurch ein CO_2 Radikal als Intermediat entsteht. Durch ein weiteres Elektron sowie Proton bildet sich das Endprodukt (Al-Tamreh et al. 2021) (s. Abbildung 15). Befindet sich der pH im Bereich von $< 3 - 4$, so liegt es in Form von Ameisensäure vor, darüber bis in den leicht basischen Bereich hauptsächlich als Formiat (Al-Tamreh et al. 2021; Lu et al. 2014). Ist der pH zu hoch, so sinkt der Anteil an produzierten Formiat und Bicarbonat bzw. Hydrogencarbonat entsteht als Hauptbestandteil (Lu et al.

2014). In dem verwendeten Elektrolyten kann das Formiat so angereichert und einer enzymatischen Reaktion zur Verfügung gestellt werden.

Wie bereits in Kapitel 4.1.2 gezeigt und angewandt, besteht mit der Formiatdehydrogenase ein enzymatisches Regenerationssystem, welches Formiat als Substrat verwendet und dabei NAD^+ zu NADH reduziert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das elektrochemisch gebildete Formiat (zur Unterscheidung im Folgenden als eFormiat bezeichnet) für diese Regenerationsweise als Modell genutzt werden. Durch die elektrochemische Reduktion von CO_2 zu Formiat und die enzymatische Oxidation zurück von Formiat zu CO_2 kann das Formiat in der Aufgabe des Redox-Überträgers als Mediator angesehen werden. Auf Grund des fehlenden Kreislaufsystems für das CO_2 ist diese Bezeichnung allerdings eher von theoretischer Natur (s. Abbildung 15).

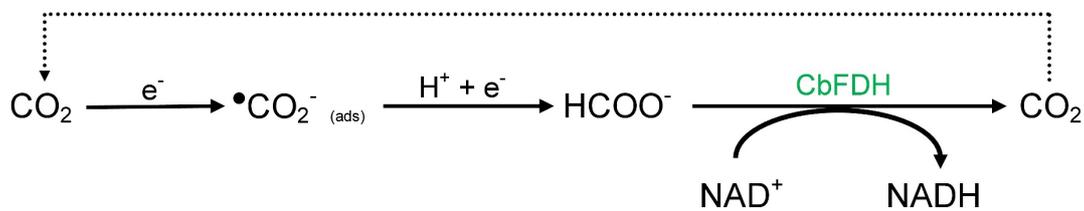


Abbildung 15: Elektrochemische CO_2 -Reduktion zu eFormiat sowie weitere Nutzung dessen für die Regeneration von NADH durch die CbFDH.

Um die Funktionalität dieses Modells für die Cofaktor-Regeneration zu demonstrieren, wird ein weiteres, NADH -verbrauchendes und produktgenerierendes enzymatisches Modell benötigt. Als mögliches Beispiel wurde bereits in Kapitel 4.1 die PpBDH für die Campher-Racematspaltung gezeigt und die Reaktion im Zusammenspiel mit der FDH-Regeneration charakterisiert. Dabei bestehen zahlreiche Herausforderungen für das Gelingen der Reaktion, wie beispielsweise eine geringe Enzymaktivität und -stabilität. Auch das Substrat (+/-)-Campher ist bei Temperaturen im Bereich der RT als Feststoff nur schlecht im Medium löslich und stellt dadurch eine weitere Schwierigkeit für eine homogene Reaktionsführung dar. Die Verwendung von organischen (Co-)Lösungsmitteln kann z. B. Enzyme deaktivieren oder, wie das in Kapitel 4.1 zur Lösung des dort genutzten Campher angewendete DMSO, an der Elektrode zersetzt werden (Wood 1981).

Als neues und aussichtsreiches, produktgenerierendes Kombinationsenzym wurde daher die (S)-spezifische, NAD -abhängige Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis* DSM43297 (ReADH) gewählt, welche bereits für eine heterologe Expression beschrieben wurde (Abokitse und Hummel 2003). Das Enzym ist 348 Aminosäuren lang, bis 50°C

thermostabil und gehört zu der Gruppe der zinkabhängigen, mittelkettigen ADHs (Abokitse und Hummel 2003). Substratuntersuchungen mit unterschiedlichen Ketonen zeigten gute Aktivitäten des Enzyms gegenüber zahlreichen mono-, di- und trisubstituierten Acetophenonderivaten sowie aliphatischen Ketonen mit einer, soweit getestet, Enantiomerenreinheit von $> 97\%$ (Gröger et al. 2003; Gröger et al. 2004). Zusätzlich besitzt die ReADH eine hohe Lösungsmitteltoleranz von mehreren Tagen gegenüber $\leq 10\%$ Heptan und $\leq 20\%$ n-Hexan, wodurch eine stabile Anwendung in einem Zweiphasensystem ermöglicht wird (Gröger et al. 2003; Gröger et al. 2004; Hummel et al. 2003). Um nun in einem Zweiphasensystem die Cofaktor-Regenerierung zu ermöglichen, muss eine ebenfalls stabile FDH-Variante genutzt werden. Hierfür wurde eine stabilisierte Formiatdehydrogenase-Mutante entwickelt, bei der zwei freie Cysteine zu Serin bzw. Alanin mutiert wurden, was unter anderem eine Verbesserung der Halbwertszeit dieser CbFDH_C23S/C262A von etwa 60 h auf 500 h zur Folge hatte (Slusarczyk et al. 2000). Auch war diese Mutante ebenfalls gegenüber den Lösungsmitteln n-Hexan und n-Heptan über mehrere Tage stabil (Gröger et al. 2003).

Der Reaktionsablauf für die Nutzung von elektrochemisch produzierten Formiat (eFomiat) zur Regenerierung von NADH ist in Abbildung 16 zu sehen. Als schlussendlich umzusetzendes Substrat wurde auf Grund vorausgehender Untersuchungen 4-Methylacetophenon gewählt. Diese monosubstituierte Variante zeigt eine 6,4fach höhere Umsatzrate als das zu Grunde liegende Acetophenon und liegt bei RT als Flüssigkeit vor. Die Löslichkeit in Wasser ist mit 0,37 g/L sehr gering und es entsteht dadurch selbständig ein Zweiphasengemisch, welches sich auf Grund der Dichte von 1,005 g/mL trotzdem unter Rühren gut in der wässrigen Phase tropfenförmig und somit mit einer großen Reaktionsoberfläche verteilen kann (4'-Methylacetophenon - Thermo Scientific™ 2022). Das durch diese Reaktion entstehende 1-(p-Tolyl)ethanol ist wie das Edukt in Wasser unlöslich und setzt sich dadurch ebenfalls von der wässrigen Phase ab (Food and Agriculture Organization of the United Nations 2022). Anwendung findet das Produkt als Aromastoff oder als Monomer, um mittels chemoenzymatischer Synthese Polymere daraus zu bilden (32012R0872 - EUR-Lex 2022; Raku und Tokiwa 2004).

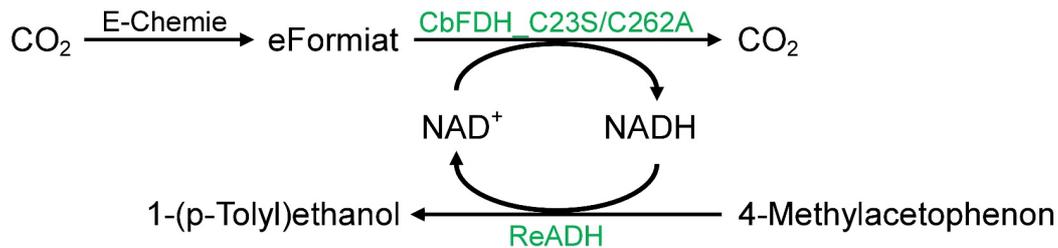


Abbildung 16: Umsetzung von 4-MAP zu 1-(p-Tolyl)-EtOH) unter NADH-Verbrauch durch die ReADH. Zur NADH-Regeneration wird eine Kombination aus elektrochemisch hergestellten eFormiat und einer FDH-Mutante genutzt.

4.4.2 Grundlegende Voraussetzungen für die Kombination der Module

Für den Zusammenschluss der unterschiedlichen Module müssen verschiedene Faktoren erprobt und im Voraus einzeln überprüft werden, um Parameter festzulegen und ggf. auftretende Störungen vor der gemeinsamen Koppelung zu identifizieren und beheben zu können.

Für die Übertragung der für die Bildung des eFormiat nötigen zwei Elektronen werden zahlreiche Elektrokatalysatoren erforscht, wobei die besten Ergebnisse bisher auf Basis der Metalle Blei, Quecksilber, Indium, Zinn, Cadmium und Tellur erreicht werden (Hori et al. 1994; Zhang et al. 2018). In der Abschlussarbeit von B. Bohlen wurde für diesen Zweck eine Sn-NP Elektrode für Durchflusszellen entwickelt, deren Herstellung durch Auftragen der Sn-NP Lösung auf die Gasdiffusionselektrode möglich ist (Bohlen 2021). Eine Gasdiffusionselektrode kann mit den drei Aggregatzuständen fest, flüssig und gasförmig gleichzeitig arbeiten, d.h. das gasförmige Substrat CO₂ trifft auf der einen Seite auf die poröse, mit festem Katalysator versehene Elektrode. Es folgt die Diffusion durch das feinporige Elektroden-Katalysator-Gitter, reagiert hierbei zu dem gewünschten Produkt Formiat und kann auf der Seite mit dem Elektrolyten von diesem aufgenommen werden. Durch die Durchflusszelle ist der Elektrolyt durchgängig in Bewegung und das entstandene Produkt wird sofort von der Elektrodenoberfläche abtransportiert und im gesamten Elektrolytvolumen und Reaktionssystem verteilt. Bei der elektrochemischen Formiatbildung aus CO₂ werden aktuell zahlreiche verschiedene Elektrolytlösungen verwendet, wie z.B. Kaliumhydrogencarbonat, Kaliumhydroxid, ionische Flüssigkeiten oder deionisiertes Wasser (Al-Tamreh et al. 2021; Zhang et al. 2017). Enzymatische Reaktionen hingegen finden zur Stabilisierung des pH-Wertes in wässrigen, gepufferten Lösungen statt. Daher galt es zuerst einen geeigneten Puffer für die Verbindung beider Systeme zu identifizieren. In einem

Pufferscreening wurde Phosphatpuffer als für die elektrochemische Formiatproduktion geeignet identifiziert (Bohlen 2021). Da die Elektrochemie für einen guten Elektronentransport auf höher konzentrierte Puffer und somit eine besser leitende Salzfracht angewiesen ist, fiel die Entscheidung auf Grund der besseren Löslichkeit auf den Kalium-Phosphatpuffer mit einer Konzentration von 500 mM. Eine weitere Bedingung für diesen Reaktionsteil stellte sich mit einem Puffer pH-Wert von > 3 , um Formiat und nicht Ameisensäure zu erzeugen (Al-Tamreh et al. 2021). Da ein KP_i Puffer bereits bei einem pH von < 6 keine puffernden Eigenschaften mehr besitzt, brauchte diese Forderung nicht weiter fokussiert zu werden (Asimov 1960).

Wie bereits in vorherigen Kapiteln gezeigt, hängt die jeweilige Enzymaktivität in der Regel vom gewählten Puffer und insbesondere dem zugehörigen pH-Wert ab. Durch den durch die Elektrochemie festgelegten KP_i -Puffer 500 mM galt es nun, bei unterschiedlichen pH-Werten die jeweils zugehörigen spezifischen Aktivitäten der beiden zu verwendenden Enzyme ReADH und CbFDH_C23S/C262A festzustellen und einen, für beide Enzyme nutzbaren, pH-Wert zu ermitteln.

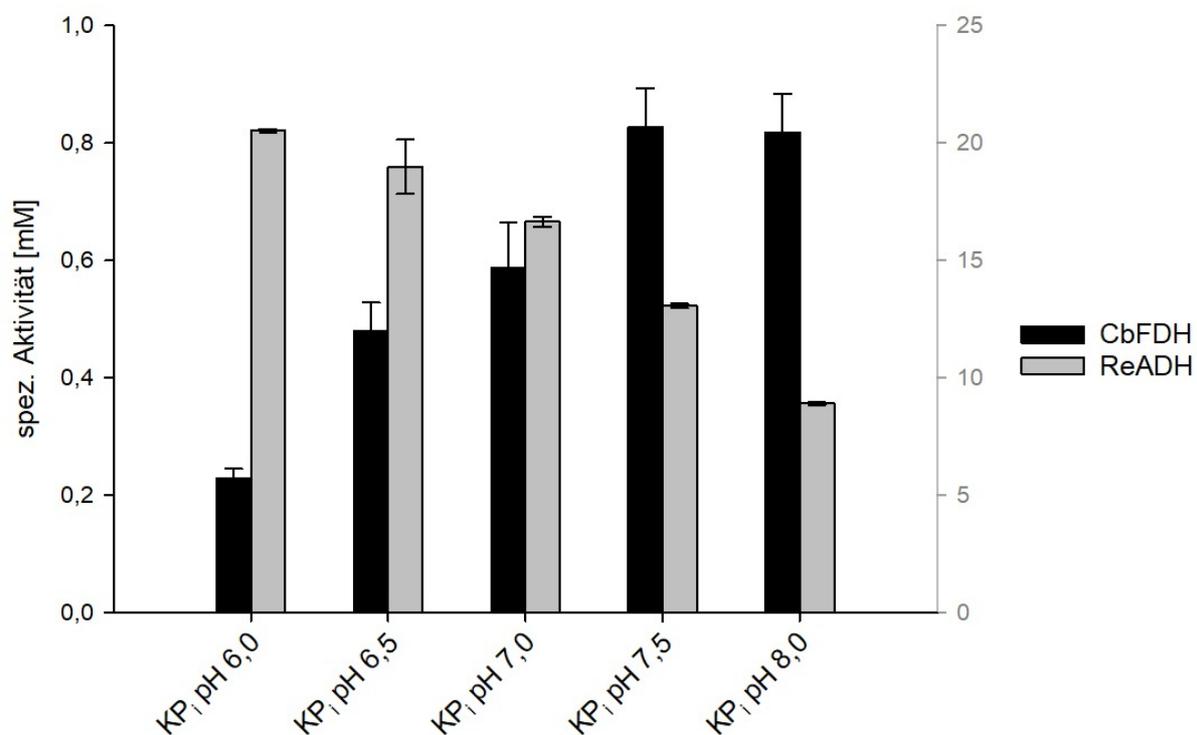


Abbildung 17: pH-Verhalten der CbFDH_C23S/C262A (schwarz, linke y-Achse) und der ReADH (hellgrau, rechte y-Achse) in KP_i Puffer bei unterschiedlichen pH-Werten.

Die Reaktionsansätze enthielten für die ReADH 1 mM 4-Methylacetophenon und 0,25 mM NADH sowie den jeweils angegebenen Puffer mit 100 mM. Für die CbFDH_C23S/C262A enthielten die Reaktionsansätze 50 mM Na-Formiat und 1 mM NAD^+ sowie den jeweils angegebenen Puffer mit 100 mM. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung nach drei voneinander unabhängigen Messungen an.

In Abbildung 17 ist zu erkennen, dass sich die spezifischen Aktivitäten der beiden Enzyme im gemessenen pH-Bereich von 6,0 - 8,0 gegenläufig verhalten. Die ReADH zeigt im Sauren bei pH 6,0 mit $20,6 \pm 0,1$ U/mg ihre höchste Aktivität und bei pH 8,0 mit $9,0 \pm 0,1$ U/mg ihre niedrigste Aktivität. Dagegen hat die CbFDH_C23S/C262A bei pH 6,0 eine Aktivität von $0,2 \pm 0,0$ U/mg und bei pH 8,0 zusammen mit pH 7,5 ihr Aktivitätsmaximum von $0,8 \pm 0,1$ U/mg. Somit zeigt die ReADH bei pH 6,0 eine fast 100fach höhere spezifische Aktivität als die CbFDH. In der Reaktion ist die CbFDH allerdings für die Regenerierung des notwendigen Cofaktors NADH zuständig, ohne den die Reaktion zum Erliegen kommt. Daher sollte die CbFDH in der Reaktion mindestens die gleiche Aktivität ausweisen wie die ReADH. Da die ReADH im pH-Bereich von 6-8 unabhängig vom jeweiligen pH-Wert eine spezifische Aktivität von mehreren Units aufweist, kann die pH-Abhängigkeit in diesem Fall im Vergleich vernachlässigt und sich allein nach der CbFDH_C23S/C262A gerichtet werden. Somit wurde ein pH-Wert von 7,5 für alle weiteren Versuche ausgewählt, um eine möglichst hohe Aktivität zu garantieren und gleichzeitig nicht direkt am oberen Ende der Pufferkapazität des KP_i -Puffers bei der Kopplung zu arbeiten (Chance et al. 1969). Bei diesem Wert weist die ReADH eine spezifische Aktivität von $13,0 \pm 0,2$ U/mg auf und die CbFDH_C23S/C262A eine fast identische Aktivität wie bei pH 8,0 mit $0,8 \pm 0,1$ U/mg.

Basierend auf dem nun festgelegten Puffer wurde zusätzlich noch die Fragestellung untersucht, ob es Unterschiede im kinetischen Verhalten der CbFDH_C23S/C262A bei Verwendung von Formiat mit unterschiedlicher Herkunft gibt. Dazu wurde zum einen KP_i -Puffer chemisch erzeugtes Na-Formiat als Substrat zugegeben und zum anderen der KP_i -Puffer als Elektrolyt eingesetzt, um diesen in der elektrochemischen Reaktion mit Formiat anzureichern. Die vollständigen Kinetiken für die beiden verschiedenen Formiatarten sind im Anhang zu finden. Bei den in Tabelle 33 dargestellten Werten lassen sich keine deutlichen Unterschiede bei den Messungen der kinetischen Daten für Formiat und NAD^+ feststellen.

Tabelle 33: Vergleich der kinetischen Daten der CbFDH_C23S/C262A bei Verwendung von Formiat, sowohl aus kommerzieller Produktion als auch aus der elektrochemischen Reduktion von CO₂.

Als Puffer wurde KP; 500 mM pH 7,5 verwendet. Für die Messung von variierten Formiatkonzentrationen wurden 1 mM NAD⁺ eingesetzt, für variierte NAD⁺ Konzentrationen jeweils 50 mM Formiat.

Formiatherkunft	Messwerte für Formiat		Messwerte für NAD ⁺	
	K _m [mM]	V _{max} [U/mg]	K _m [mM]	V _{max} [U/mg]
chemisch	1,6 +/- 0,1	1,2 +/- 0,0	0,15 +/- 0,0	1,1 +/- 0,0
elektrochemisch	3,2 +/- 0,3	1,2 +/- 0,0	0,15 +/- 0,0	1,2 +/- 0,0

4.4.3 Statische Versuche

Dieser mit elektrochemisch erzeugten eFormiat angereicherte Katholyt wurde nun im Folgenden in unterschiedlich aufgebauten Experimenten angewendet und z.T. verglichen. Die enzymatischen Reaktionen können auf Grund der angewendeten Enzyme, dem Zusammenspiel dieser und der Komplexität der Reaktionsführung in verschiedene Gruppen bzw. Generationen aufgeteilt werden (Yuryev et al. 2011). Dabei gehört das Batch-Verfahren zu den historisch ersten angewendeten Verfahren, bei dem alle benötigten Stoffe wie Enzyme, Substrat und ggf. Cofaktoren in einem Gefäß vorliegen und im Folgenden zur Produktbildung kein kontinuierlicher Austausch erfolgt (Schmid et al. 2001; Hou 2005).

Auf Grund des recht einfachen Aufbaues und der geringen äußeren Einflussfaktoren wurde dieser Batchaufbau hier dazu genutzt, unterschiedliche Varianten näher zu betrachten und Erfahrungen mit diesen Reaktionen zu sammeln. So war zum einen das Substrat der Regenerationsreaktion der CbFDH, das eFormiat, als auch bei einem weiteren Versuch das Substrat der produktbildenden Reaktion, das 4-MAP, im Unterschuss, d.h. limitierend für den Versuch ausgelegt. Dadurch konnte bei der Nutzung von Katholyt mit eFormiat sowohl ermittelt werden, welcher Umsatz mit den zwei statischen Systemen an sich möglich ist, sowie ein Vergleich zu bereits in der Literatur beschriebenen Experimenten gezogen werden.

Die Reaktion an sich baut auf zwei voneinander abhängigen Reaktionen auf. Entsteht durch die Regeneration nicht genügend NADH, so kommt die produktbildende Reaktion zum Erliegen. Wird hingegen nicht genügend NAD⁺ gebildet, so verlangsamt sich lediglich die Regeneration zum NADH, welches die eigentlich produktbildende Reaktion nur im Folgenden beeinflusst, wenn insgesamt zu wenig NADH dem System zur Verfügung steht.

Weitergehend wurden auch bei der BDH-Reaktion in Kapitel 4.1.2 die Vorteile einer stärkeren Regeneration gezeigt, worauf hin auch bei diesen Batchexperimenten die CbFDH im Überschuss eingesetzt wurde. Das gewählte Substrat 4-MAP bildet selbständig ein Zweiphasensystem aus, wodurch hierfür kein zusätzliches Lösungsmittel notwendig ist. Durch dieses Fehlen des optionalen Lösungsmittels werden weitere Verteilungseffekte zwischen der enzymatisch aktiven und wässrigen Phase sowie der organischen Phase mit dem Substrat auf ein Minimum beschränkt. Jeweils vorausgehend war die Anreicherung von eFormiat durch die beschriebene elektrochemische Reduktion von CO₂ in dem verwendeten Puffer.

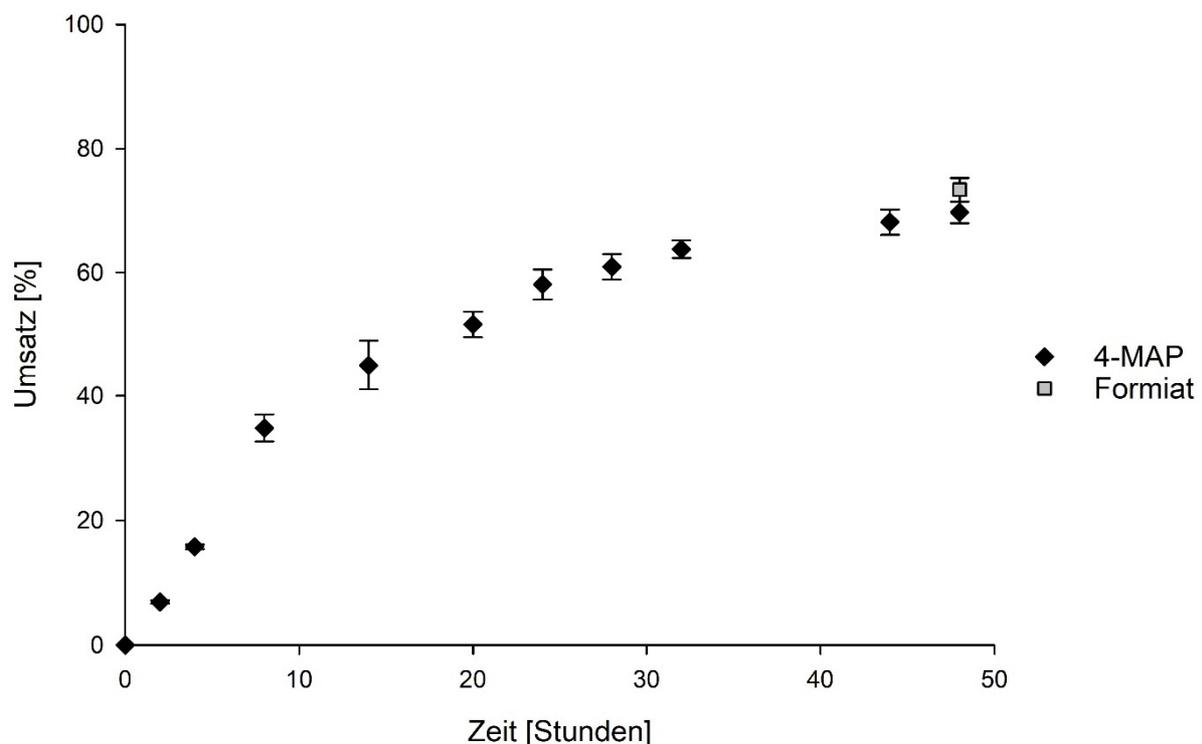


Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der Reaktion der ReADH mit Cofaktor-Regeneration durch CbFDH_C23S/C262A.

Das limitierende Substrat war 4-Methylacetophenon (4-MAP) mit 400 μmol . Für die Regeneration diente elektrochemisch hergestelltes Formiat (540 μmol). Der Cofaktor NAD⁺ wurde mit 2,5 μmol (1 mM) eingesetzt, als Puffer diente KPi 0,5 M pH 7,5. Der prozentuale Umsatz ist bezogen auf das eingesetzte 4-MAP. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung nach drei voneinander unabhängigen Messungen an.

Liegt das 4-MAP als limitierender Faktor für die Reaktion vor, ergibt sich innerhalb der ersten 8 h ein 4-MAP-Umsatz von 33,4 % \pm 3,3 %, welcher nach 48 h mit 69,7 % \pm 1,7 % die Plateau-Phase erreicht, in der sich kein weiteres Produkt mehr bildet. Das verbrauchte eFormiat liegt nach 48 h mit einem Umsatz von 72,0 % \pm 2,5 % nahezu

im identischen Bereich, d.h. es wurde kein Formiat z.B. durch eine unerwünschte Nebenreaktion zusätzlich verbraucht. Weiterhin konnten nach der Reaktion noch $0,84 \pm 0,07 \mu\text{mol NADH}$ ($0,3 \text{ mM}$) gemessen werden.

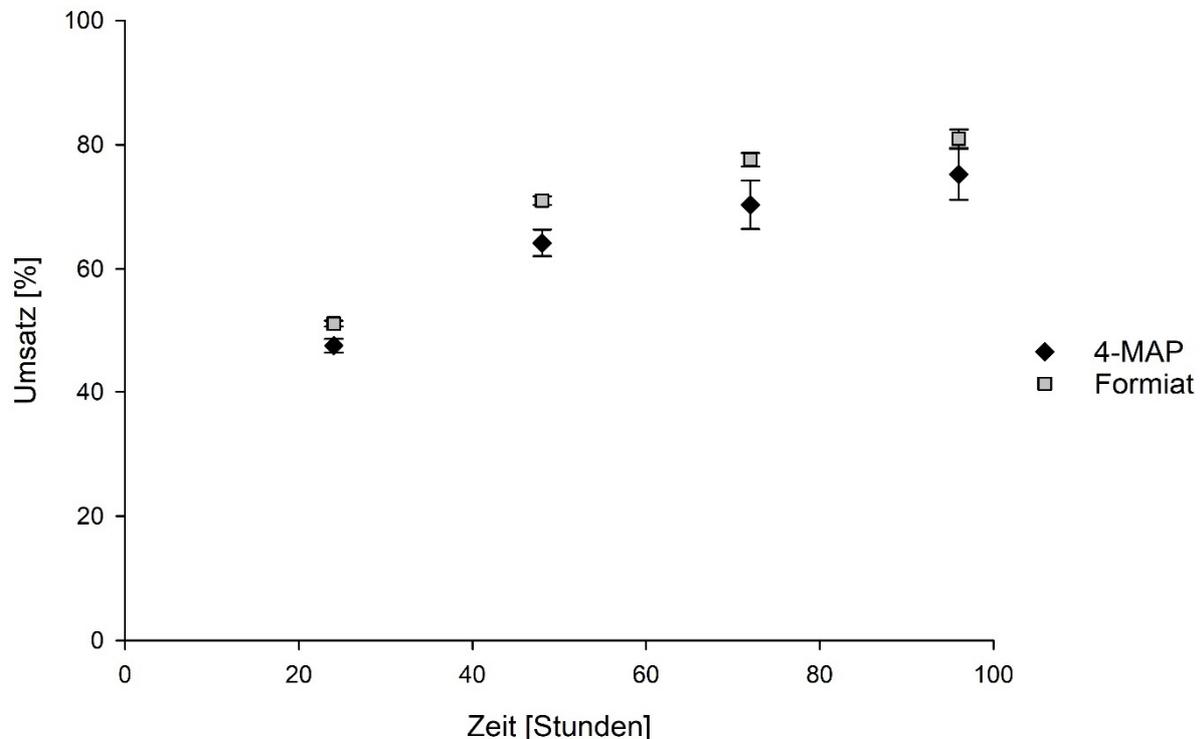


Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf der Reaktion der ReADH mit Cofaktor-Regeneration durch CbFDH_C23S/C262A unter Verwendung von PEG-NADH.

Das limitierende Substrat war elektrochemisch hergestelltes eFormiat mit $200 \mu\text{mol}$. Als Substrat der ReADH diente 4-Methylacetophenon (4-MAP) mit $1,25 \text{ mmol}$. Der Cofaktor PEG-NADH wurde mit $0,3 \mu\text{mol}$ eingesetzt, als Puffer diente KPi $0,5 \text{ M}$ pH $7,5$. Der prozentuale Umsatz ist bezogen auf das eingesetzte Formiat. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung nach drei voneinander unabhängigen Messungen an.

Ein weiterer statischer Ansatz wurde mit eFormiat als limitierendem Faktor durchgeführt. Das Substrat der Alkoholdehydrogenase 4-MAP lag im mehr als 6-fachen Überschuss vor und als Cofaktor fand mit PEG-NADH ein modifizierter Cofaktor Anwendung (näheres zu diesem Cofaktor siehe Kapitel 1.4). Auch hier wird der Großteil des Gesamtumsatzes in den ersten 24 h mit einem Wert von $47,7 \% \pm 1,1 \%$ erreicht. In den folgenden 72 h stieg der Umsatz noch bis auf $75,2 \% \pm 4,1 \%$ an. Der Formiatverbrauch lag bei diesem Versuch um bis zu 6 % höher als das erzeugte Produkt, was an einer schlechteren Reinheit der verwendeten Enzyme und somit am Vorhandensein von unbeabsichtigten NOX-Aktivitäten liegen kann.

4.4.4 Kontinuierliche Versuche

Die statischen Versuche (Kapitel 4.4.3) zeigten, dass die Nutzung von elektrochemischem eFormiat möglich ist. Die technische Weiterentwicklung eines statischen Systems besteht in der Anwendung der Reaktion unter Fluss. Im Folgenden wurde nun versucht, das elektrochemische System direkt mit dem biochemischen zu koppeln und beide simultan als Hybrid-System zu betreiben. Durch die hier praktizierte, aufeinander angepasste Kopplung kann verbrauchtes Formiat kontinuierlich nachproduziert werden, wodurch dem biologischen System immer ausreichend Reduktionsmediator zur Verfügung steht. Gleichzeitig kann die Formiatkonzentration auch in einem niedrigeren und individuell an die eigentliche Reaktion angepassten Bereich gehalten werden, wodurch dieses für die eigentliche Reaktion nicht benötigte und in der Aufbereitung als Abfallstoff geltende Nebensubstrat in deutlich geringeren Mengen anfällt, als wenn man es in einem statischen Prozess am Anfang auf einmal im sehr großen Überschuss auf Verdacht einbringt.

Der elektrochemische Teil für diese Kombination bestand unverändert aus einer 2-Kompartiment-Durchflusszelle, bei der durch eine mit Sn-Nanopartikel beschichteten Gasdiffusionskathode das CO_2 zu eFormiat reduziert wird (Bohlen 2021). Der Katholyt wird hierbei an der Elektrode vorbei in ein Übergabegefäß gepumpt. Für die Bioreaktion mussten allerdings im Vergleich zu den statischen Versuchen einige Veränderungen vorgenommen werden, um diese im Fluss in einer Art Fließbettreaktor bzw. Enzym-Membran-Reaktor vollziehen zu können. So handelt es sich beim Bioreaktor nun um eine Filtrationseinheit, bei der durch eine Ultrafiltrationsmembran mit einer Porengröße von 10 kDa über den Gefäßboden Pufferflüssigkeit entnommen und die eigentliche Bioreaktion im Vergleich zur Gesamtanlage in einem kleinen Volumen kontrolliert abgehalten werden konnte. Dadurch werden zum einen weniger Enzyme und Cofaktor benötigt und zum anderen werden die beiden Module der Enzymreaktion und elektrochemischen CO_2 -Reduktion aktiv voneinander getrennt, so dass sowohl die Enzyme und das NAD als auch die Kathode sich nicht gegenseitig beeinträchtigen können. Die ReADH und CbFDH sind mit jeweils ca. 36 kDa bzw. 40 kDa groß genug, um von dem 10 kDa Filter effektiv im Gefäß zurückgehalten zu werden. Normales NADH wäre mit etwa 0,7 kDa allerdings deutlich zu klein, würde den Filter ungehindert passieren und sich im Gesamtsystem und somit auch im elektrochemischen Modul mit kaum vorhersehbaren Folgen verteilen können. Daher wurde mit PEG-NADH ein modifizierter Cofaktor mit einer molaren Masse von ca. 20 kDa verwendet, wobei die Größe des PEGs an sich variabel einsetzbar ist.

Ein weiterer Vorteil zur Trennung der Module ergab sich in der Wasserunlöslichkeit der Edukte und Produkte der ReADH, wodurch sich mit angepasster Rührgeschwindigkeit sowie Volumina selbständig ein deutliches zwei-Phasen-System im Bioreaktor entwickelte. Dadurch reichert sich das gewünschte Produkt in der oben liegenden Phase an und kann vom wässrigen Teil abgetrennt bzw. in einem eigenen zusätzlichen Kreislauf geführt und extrahiert werden (Kragl et al. 1996). Durch diesen Versuchsaufbau konnten daher sowohl Edukt/ Produkt durch das zwei Phasengemisch als auch die Bestandteile der Enzymreaktion durch den Filter von der elektrochemischen Reaktion abgetrennt vorliegen. Lediglich der Puffer/ Elektrolyt mit dem angereicherten Formiat zirkulierte so im Fluss zwischen den beiden Reaktionsmodulen (s. Abbildung 20).

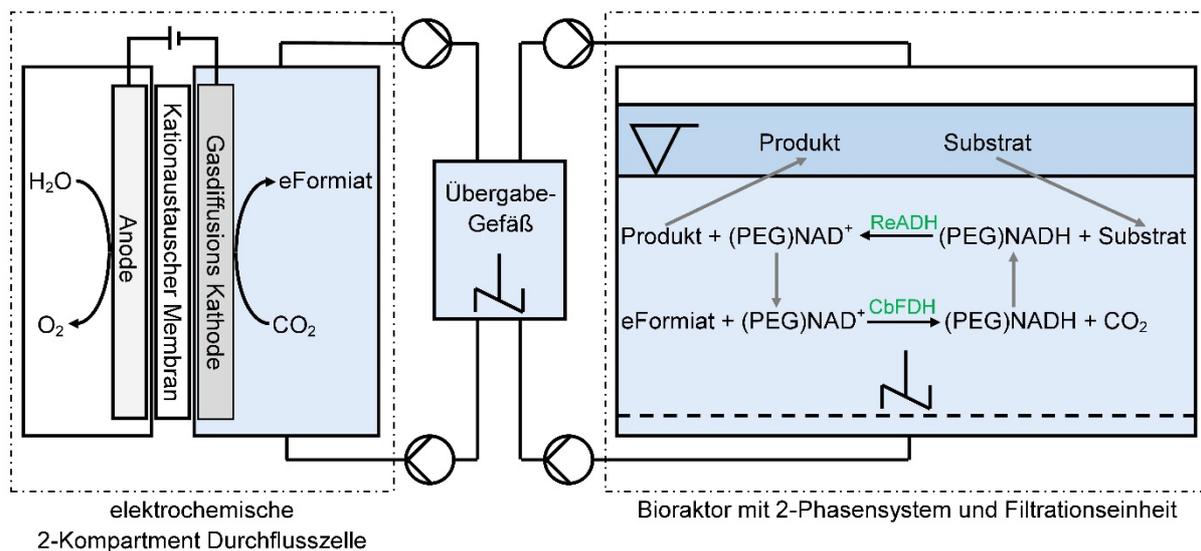


Abbildung 20: Schematischer Aufbau der Koppelung der elektrochemischen Reduktion von CO₂ zu eFormiat und der enzymatischen Nutzung dessen zur Cofaktor-Regeneration.

In einer 2-Kompartiment-Durchflusszelle wird CO₂ mittels Gasdiffusions-Kathode (Sn-NP als Katalysator) zu eFormiat reduziert. Als Elektrolyt dient KP_i-Puffer 0,5 M pH 7,5. Mittels Übergabefäß, welches den Ausgleich der unterschiedlichen Pumpgeschwindigkeiten des elektrochemischen- (100 mL/min) und enzymatischen- (1 mL/min) Moduls ausgleicht, wurden beide verbunden und dadurch das enzymatische System mit eFormiat versorgt. Dieses eFormiat wurde von der CbFDH_C23S/C262A zur Cofaktor-Regeneration von PEG-NADH genutzt. Die ReADH wiederum verwendete dieses PEG-NADH, um das Substrat (4-MAP) in einem Zwei-Phasen-System zum Produkt (1-(p-Tolyl)-EtOH) umzuwandeln.

4.4.4.1 Puls-Betrieb

Für die erste Kombination der beiden Systeme wurde die elektrochemische Formiat-Erzeugung in einem Puls-Betrieb eingesetzt, also immer nur kurzzeitig zugeschaltet. Dabei war das elektrochemische CO₂-Reduktionsmodul zu Beginn tätig, um einen Formiat-Grundstock zu bilden. Dieser orientierte sich an den kinetischen Daten der CbFDH und lag im Bereich um etwa die 10fache K_m-Konzentration für das Substrat Formiat. Dies geschah mit einer Stromstärke von -100 mA. Der Formiat angereicherte Puffer wurde dann kontinuierlich über den Bioreaktor gepumpt, wodurch das enzymatische Reaktionssystem startete. Jeweils nach 24 h wurde der elektrochemische Teil erneut für eine an den bisherigen Formiat-Verbrauch angepasste Zeit bei -100 mA betrieben. Der Verlauf des Umsatzes von eFormiat und 4-MAP über eine Messdauer von 96 h ist in Abbildung 21 zu sehen.

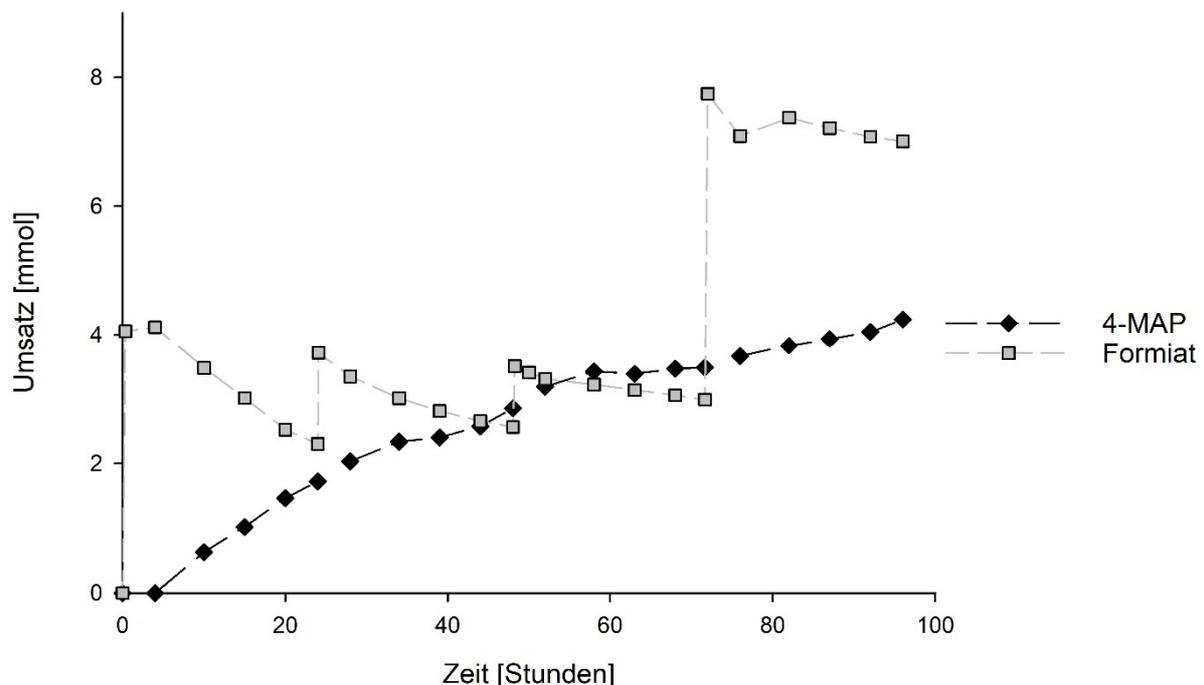


Abbildung 21: Gekoppelte, diskontinuierliche Kombination der elektrochemischen Erzeugung von eFormiat und enzymatische Nutzung.

Aufgetragen ist die gemessene eFormiat-Konzentration sowie der Verbrauch von 4-MAP gegenüber der Versuchsdauer von 96 h. Der Versuchsaufbau ist Abbildung 20 zu entnehmen. Die Reaktion wurde mit der elektrochemischen Produktion von eFormiat gestartet. Dies wiederholte sich alle 24 h, dazwischen war der elektrochemische Teil abgeschaltet.

Zu erkennen ist der, durch die verwendete Stromstärke bedingte, schnelle Anstieg der eFormiat-Konzentration im elektrochemischen Reaktionsteil. Hierbei betrug bei den ersten beiden Pulsen die Bildungsrate wie aus Vorversuchen erwartet 1,3 – 1,4 mmol/cm²/h. Auf Grund eines Produktionsleistungsabfalles der Elektrode bei dem dritten Puls nach 48 h auf 0,4 mmol/cm²/h, ausgelöst durch abgelösten Katalysator, fand ein Elektrodenwechsel

statt, wodurch die Produktion beim letzten Puls zu der gewohnten Rate zurückkehrte. Mit einer kurzen zeitlichen Verzögerung kann die Abnahme des 4-MAP bzw. Bildung des 1-(p-Tolyl)-EtOH beobachtet werden. Bedingt durch die Pumpgeschwindigkeit von 1 mL/min zwischen dem Übergabegefäß und dem Bioreaktor dauerte es eine gewisse Zeit, ehe die eFormiat-Konzentration im biochemischen Reaktionsteil so weit anstieg, dass die Enzymreaktionen merkliche Geschwindigkeit aufnahmen. Danach ist eine kontinuierliche Produktgenerierung ersichtlich, die innerhalb der Messdauer langsamer wurde. Trotz der abnehmenden Geschwindigkeit zeigt es, dass das Enzymsystem im Ganzen über diese Dauer funktionsfähig blieb. Am Ende des Versuchs waren nach 96 h 4,24 mmol 1-(p-Tolyl)-EtOH gebildet worden. Bezogen auf die zum Start des Versuchsaufbaus erzeugten 4,1 mmol eFormiat wurde dieses vollständig aufgebraucht und somit auch nachweislich in den späteren Durchgängen gebildetes Formiat verbraucht. Sowohl die Enzyme als auch das PEG-NADH blieben in diesem Zweiphasensystem über die Versuchsdauer aktiv. Mit einer eingesetzten Konzentration von 5 μmol ergab sich für das PEG-NADH bei diesem Versuch eine TTN von 850.

Betrachtet man die Konzentration sowohl des verbrauchten eFormiats als auch 3-MAP direkt übereinanderliegend so sieht man, dass diese beiden Kurven miteinander korrelieren (s. Abbildung 22). Dies bedeutet, dass kein Formiat durch mögliche Nebenreaktionen verloren ging und es somit vollständig zur Produktbildung beitrug. Durch den nicht vorhandenen höheren Verbrauch konnten beispielsweise NOX-Aktivitäten durch Verunreinigungen der Enzymaufbereitungen, die regeneriertes PEG-NADH unbeabsichtigt durch NOX-Enzyme zurück zu PEG-NAD⁺ oxidieren würden, ohne 1-(p-Tolyl)-EtOH zu produzieren, ausgeschlossen werden.

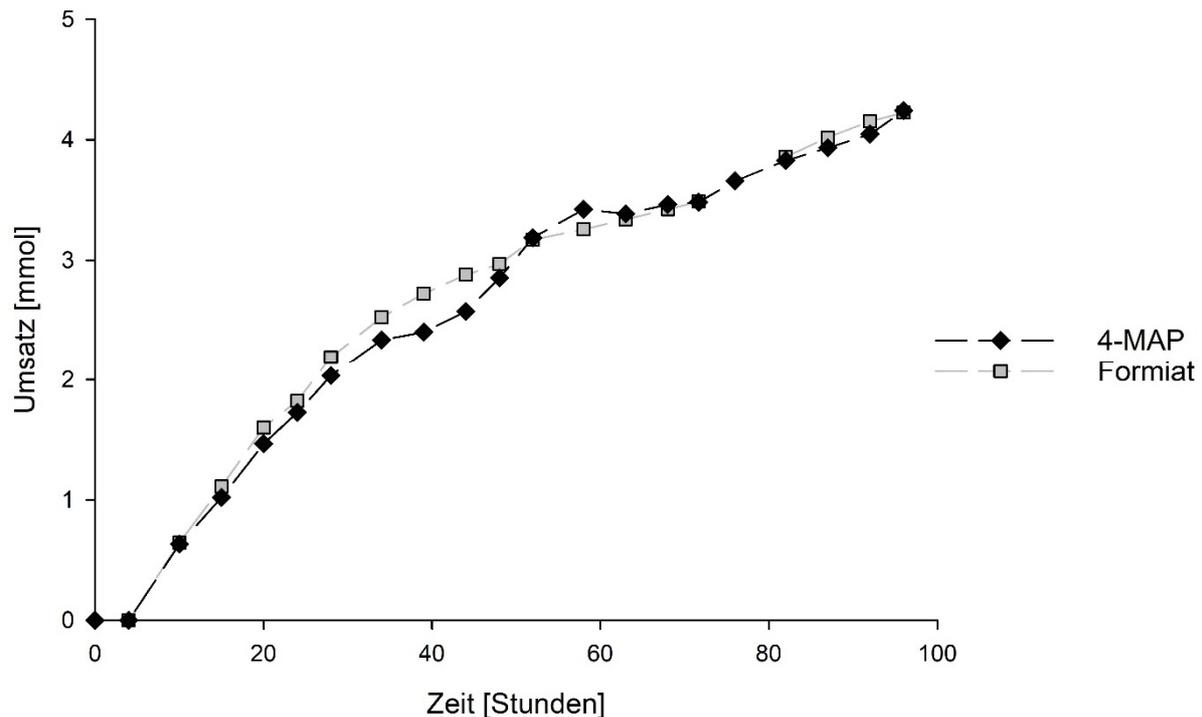


Abbildung 22: Gekoppelte, diskontinuierliche Kombination der elektrochemischen Erzeugung von eFormiat und enzymatische Nutzung.

Gezeigt ist der Verbrauch von 4-MAP sowie das verbrauchte eFormiat.

4.4.4.2 Kontinuierlicher Betrieb

Anstelle des gepulsten Betriebs des elektrochemischen Moduls kann auch ein vollständig kontinuierlicher Betrieb realisiert werden. Die Herausforderung liegt dabei im dauerhaften, möglichst zueinander identisch ablaufenden Zusammenspiel sowohl des elektrochemischen als auch des biologischen Systems. Bei einer Laufzeit von mehreren Stunden verliert die Elektrode kontinuierlich an Formiat-Produktionsleistung, beispielsweise durch Verlust von angehefteten Sn-NP Katalysator. Der gleiche Effekt ist beim biologischen Teil zu beobachten. Auch wenn im Puls-Betrieb in Kapitel 3.5.3.2 das enzymatische System insgesamt über einen Zeitraum von 4 Tagen eine Aktivität aufwies, so nahm diese mit der Zeit ebenfalls deutlich ab.

Ziel war es daher, auf Grundlage von eigenen Erfahrungswerten, diese beiden abnehmenden Kurven entsprechend aneinander anzupassen. Da die elektrochemische Formiatbildung kontrollierter zu beeinflussen ist, sollte diese im Versuchsaufbau moduliert werden. Unverändert zum Puls-Versuch wurde auch hier erst einmal ein Formiat-Grundstock mit -100 mA gebildet, der erneut bei etwa der 10fachen K_m -Konzentration der CbFDH für Formiat lag. Anschließend galt es die Leistung so weit zu reduzieren, dass die Neubildung von Formiat in etwa mit dessen biochemischem Verbrauch korrelierte, wobei -5 mA durch

Vorversuche mit der eFormiat Bildungsgeschwindigkeit als am geeignetsten angesehen wurde.

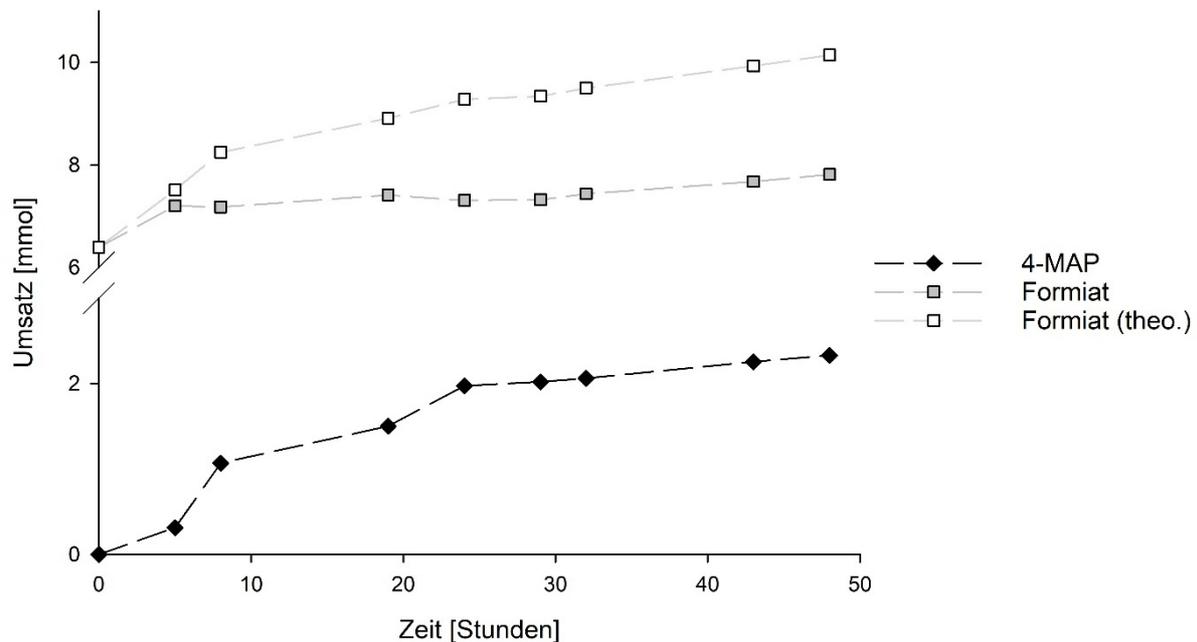


Abbildung 23: Kontinuierliche Kombination von elektrochemischer Formiat-Erzeugung sowie enzymatischer Nutzung dieses zur Cofaktor-Regeneration.

Gestartet wurde mit einer schnellen CO_2 -Reduktion bei -100 mA. Darauf folgend wurde die elektrochemische Formiatproduktion für die gesamte Versuchsdauer bei -5 mA fortgesetzt. Der Versuchsaufbau ist Abbildung 20 zu entnehmen. Dargestellt ist der Verbrauch an „4-MAP“ sowie die gemessene Formiatmenge („Formiat“). „Formiat theo.“ ist die Summe aus der gemessenen Formiatmenge und dem verbrauchten Edukt 4-MAP.

In Abbildung 23 ist der Verlauf dieses Versuchsaufbaus über 48 h zu sehen. Wie geplant wurden durch eine schnelle Produktion 6,4 mmol Formiat vorgelegt. In den direkt darauffolgenden Stunden stieg bei geringerer Leistung die Formiatkonzentration weiter bis auf 7,2 mmol. Dies liegt, analog zum Puls-Versuch, an der Verteilung des Formiat-Puffers über das Übergabefäß in den Bioreaktor, wodurch das Formiat erst nach und nach dem Enzymsystem zur Verfügung steht. Nach wenigen Stunden konnten die Enzyme mit ihrer vollen Leistung die gewünschte Reaktion katalysieren und bis zum Schluss nach 48 h 2,3 mmol 1-(p-Tolyl)-EtOH bilden. In diesem Zeitraum stieg die messbare Formiatmenge allerdings um zusätzlich 0,6 mmol, was eine leicht stärkere eFormiat-Bildung im Vergleich zum enzymatischen Verbrauch zeigt. Vergleicht man die ersten 24 h mit aktivem Enzymsystem, so sieht man eine gute Ausgeglichenheit in Produktion bzw. Verbrauch der beiden Systeme. In dieser Zeit wurden 1,7 mmol 1-(p-Tolyl)-EtOH produziert, wobei die gemessene Formiatmenge nur um 0,1 mmol stieg. Formiat (theo.) in der Abbildung 23

zeigt die Summe aus dem gemessenen Formiat sowie dem produzierten 1-(p-Tolyl)-EtOH, also der gesamt produzierten eFormiatmenge. Wie erwartet zeigt dieser Verlauf am Anfang einen starken Anstieg, der mit der Zeit immer weiter abflacht. Dies entspricht den in Vorversuchen erhaltenen Ergebnissen und zeigt somit eine gute Vorhersagbarkeit des elektrochemischen Systems. Nach 48 h lag der TTN für das PEG-NADH hier bei 550.

5 Diskussion

5.1 Racematspaltung von (+/-)-Campher

Campher ist ein natürliches, bicyklisches Monoterpenoid, welches in Form der beiden Enantiomere (+)-Campher sowie (-)-Campher vorkommt. Insgesamt weckt Campher in Bereichen der chemischen und pharmazeutischen Industrie immer mehr Interesse, beispielsweise auf Grund seiner analgetischen Wirkung in Salben, der möglichen Nutzung als biobasiertes Monomer, als Bestandteil von Antifouling-Polymeren und als chiraler Ausgangsstoff für unterschiedlichsten Synthesen (Xu et al. 2005; Selescu et al. 2013; Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB 2021; Hu et al. 2020; Money 1985). Für diese Nutzungsformen liegen im Idealfall beide Campher-Enantiomere getrennt voneinander vor, um die auftretenden Eigenschaften klar definieren zu können. In der Natur in ausreichender Menge vorkommend und kommerziell nutzbar ist aktuell lediglich (+)-Campher, der hauptsächlich aus dem Holz des Campherbaums (*Cinnamomum camphora*) extrahiert wird. Die stereochemisch reine Form des (-)-Campher hingegen ist nur aufwendig erhältlich. In der reinen Form kann es beispielsweise durch die Synthese aus (-)-Borneol erzeugt werden oder es findet eine chemische Racematspaltung mittels chiraler Katalysatoren statt (Lang et al. 2011; Pearson 1991). Das für die Spaltung nötige Campher-Racemat wiederum kann aus α -Pinen gewonnen werden, welches beispielsweise in der Papierindustrie als Abfallstoff zur Verfügung steht (Ritter 1933).

Die Idee hinter der selektiven, enzymatischen Oxidation von (+)-Campher lag darin, aus diesem als Abfallstoff anfallenden Campher-Racemat wertige und reine Campher-Enantiomere für die Weiterverarbeitung zu gewinnen. Durch die stoffliche Umwandlung des (+)-Camphers zu (+)-Borneol bei gleichzeitigem Zurücklassen des (-)-Campher wird es leichter möglich, die beiden Substanzen voneinander zu trennen, beispielsweise durch eine Gegenstromverteilungschromatographie (Yang et al. 2018). Anschließend kann entschieden werden, ob die Rückreaktion des (+)-Borneol zu (+)-Campher und somit auch die schlussendlich formelle Campher-Racematspaltung oder die direkte Nutzung des anfallenden (+)-Borneol für das weitere Vorhaben sinnvoller und wirtschaftlicher ist.

Diese enzymatisch katalysierte und NADH-abhängige Oxidation von Campher zu Borneol benötigt bei Verwendung der PpBDH_S146A/Y188T nicht nur die in Abbildung 4 dargestellten Ausgangsstoffe, sondern auch noch eine besonders gehandhabte Reaktionsführung. Wie es sich bei der praktischen Durchführung der Racematspaltung in Abbildung 6

zeigt, reagiert zwar beim Zusammenführen der Reaktanten der (+)-Campher an sich selektiv weiter, doch kann nach der ersten Stunde nur ein geringer Umsatz von 6,9 % +/- 0,1 % erreicht werden. Dieser Wert lässt sich allerdings nicht mit einer zu kurzen Reaktionszeit begründen, da sich dieser auch nach der längeren Laufzeit nicht verbesserte. Es zeigt sich somit, dass das natürliche Gleichgewicht dieser enzymkatalysierten Reaktion deutlich auf Seiten des Camphers liegt und eine ausreichende Racematspaltung mit diesem Vorgehen auch nicht mit dem modifizierten Enzym ohne weitere Veränderungen der Reaktionsbedingungen erfolgen kann. Diese Beobachtung deckt sich auch mit der Literatur, in der das Gleichgewicht bei Reaktionen mit cyclische Alkohole eher auf der Ketonseite liegt (Goldberg et al. 1993). Bei anderen, linearen Alkoholen liegt dieses Gleichgewicht eher auf der Seite der Alkohole, was die Annahme zulässt, dass dieser Effekt an den axial-axialen Wechselwirkungen im Ring liegt, welche bei der Oxidation zum Keton wegfallen und sich so die natürliche Abstoßung der Kohlenstoff-Atome verringern würde. Zuletzt fällt auch noch die Abnahme der Borneol-Konzentration auf etwa 2 % bei gleichzeitiger Zunahme des (+)-Camphers über den Versuchszeitraum von sechs Stunden ins Auge. Dies bedeutet, dass sich in dem System die Konzentration eines Reaktionspartners derart geändert haben muss, dass die Rückreaktion wieder verstärkt und somit Borneol wieder verbraucht wurde. Hierfür infrage kommt der Cofaktor und dabei das instabile NADH, welches bei der Reaktion bei RT in einem wässrigen Phosphatpuffer für mehrere Stunden gelöst vorlag. Diese Reaktionsparameter sind bekannterweise für die Stabilität von NADH als ungünstig anzusehen und wirken sich durch die lange Reaktionsdauer deutlich aus (Rover Júnior et al. 1998; Fawcett et al. 1961).

Möchte man nun einen höheren Umsatz oder gar eine vollständige Racematspaltung erreichen, muss zum einen das Gleichgewicht dieser Reaktion verschoben werden. Dies kann beispielsweise durch die Entfernung eines der Reaktionsprodukte erfolgen, wofür sich die Cofaktor-Regeneration anbietet. Entfernt man das NAD⁺ vollständig aus dem System, ist die Rückreaktion automatisch unterbunden. Gleichzeitig wird durch die Regeneration das NADH nicht mehr im stöchiometrischen Verhältnis benötigt. Ein weiterer, dadurch erhaltener Vorteil ist die Stabilisierung des NADH, um längere Reaktionszeiten zu ermöglichen. Dieser Effekt ist bei einer NADH-Regeneration ebenfalls mit inbegriffen. Das NADH liegt hierbei nicht mehr dauerhaft direkt unter dem Einfluss der Umgebungsparameter vor, sondern befindet sich im Wechsel mit der oxidierten Form NAD⁺. Durch diese Kreislaufreaktion wird das NADH ständig neu gebildet und der Einfluss der Umgebung, der zur Inaktivierung des NADHs führt, deutlich verringert. Durch diese Maßnahme sollte die gewünschte Reaktion der Racematspaltung zum einen überhaupt ermöglicht und

zum anderen durch die gesenkte Cofaktor-Konzentration diesen Punkt betreffend wirtschaftlich sinnvoll werden.

Das Experiment zur Campher-Racematspaltung mit Cofaktorregeneration aus Abbildung 7 zeigt, dass durch diesen veränderten Reaktionsaufbau mit dem zusätzlichen Einsatz eines NADH-Regenerationssystems das angestrebte Ziel des selektiven und vollständigen Oxidierens des (+)-Camphers erreicht werden konnte. Zum einen wurde im allgemeinen genügend NADH nachfolgend gebildet, um den Vollumsatz des (+)-Camphers überhaupt zu erreichen, da es zu Beginn stöchiometrisch im Unterschuss vorlag. Zum anderen erfolgte durch die sofortige und dauerhafte Entfernung von NAD^+ aus der Reaktion die postulierte Verschiebung des Gleichgewichtes, was ebenfalls einen wichtigen Beitrag zum Erreichen des Vollumsatzes beitrug.

Zur Einschätzung der Eignung des gewählten FDH-Regenerationssystems zur Kopplung mit der BDH-Reaktion kann ein vergleichendes Experiment mit der Glucosedehydrogenase (GDH), ein weiteres enzymatisches Regenerationssystem zur Rate gezogen werden. Diese beiden Versuche waren vom Versuchsaufbau analog zueinander aufgebaut (Hofer et al. 2021). Die GDH setzt NAD^+ mit dem Substrat Glucose zu NADH und Gluconolacton um und vollzieht dadurch die Cofaktor-Regeneration. Im Unterschied zur FDH zeigt die GDH auch noch bei pH-Werten unterhalb von 6,0 weiterhin Aktivität. Die Voruntersuchungen in diesem Zusammenhang zeigten, dass mit einem sinkenden pH eine Aktivitätserhöhung der BDH erwartbar ist und dass diese sich durch eine Reaktionstemperaturerhöhung auf 30 °C nochmals steigern ließ. Dies hatte zur Folge, dass die Racemat-Trennung von 1 mM (+/-)-Campher in Kombination mit dem GDH-System mit zweieinhalb Stunden schneller erfolgt als bei der Verwendung der FDH mit sechs Stunden. Allerdings lässt sich auch festhalten, dass gleichzeitig mit der Erhöhung der Geschwindigkeit die Selektivität des Enzymes abnahm und auch (-)-Campher zu Borneol umgewandelt wurde. Schlussendlich kann als Fazit gezogen werden, dass auch mit einem anderen enzymatischen Regenerationssystem und einer weitergehenden Reaktionsoptimierung die Umsetzung von (+)-Campher rechnerisch mit einer Enzymaktivität von wenigen mU/mg und somit sehr langsam erfolgt. Eine deutliche Erhöhung der Enzymkonzentration stellte sich auf Grund einer geringen Expression und der Eigenheit der BDH, bei zu hohen Enzymmengen auszuflocken, als herausfordernd dar. Die enzymatische Campherracemat-Spaltung ist somit experimentell möglich. Für ein langfristiges Ziel, diese Spaltung für die Anwendung im größeren Umfang, beispielsweise in Rahmen einer Bioraffinerie, zu ermöglichen, wären

allerdings noch deutlich weitergehende Optimierungen der verwendeten Enzyme und des gesamten Verfahrens notwendig.

5.2 Kombination von Dehydrogenasen zu Enzymkaskaden

Der Weg von einem anfallenden Ausgangsstoff zum gewünschten wertbringenden Produkt, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, erfolgt nur in seltenen Fällen über einen einzelnen, enzymatisch katalysierten Schritt, der gegebenenfalls noch zusätzlich mit einer Cofaktor-Regenerierung gekoppelt werden muss. Kann das gewünschte Produkt somit nur mittels mehrerer aufeinanderfolgender Reaktionsschritte erreicht werden, so ist es teilweise möglich, die nötigen Enzyme zu einer gemeinsamen Enzymkaskade zu kombinieren und dadurch Reaktionen mit einem NADH-Verbrauch und Reaktionen mit einem NADH-Überschuss zu koppeln. Dabei stellt sich die Herausforderung, diese Kaskade in einer Art und Weise zu designen, dass unter anderem möglichst wenig verschiedene Cofaktoren benötigt werden. Des Weiteren sollten nach Möglichkeit diese Cofaktoren innerhalb der Kaskade ausgeglichen vorkommen. Im optimalen Fall gelingt dies allein durch die benötigten Reaktionsschritte und die zugehörigen Enzyme. Als Vorbildgeber können hierfür verschiedenste natürliche Stoffwechselwege dienen. Wird bei der designten Kaskade auf NAD zurückgegriffen und dieses intrinsisch regeneriert, so wird dieses Zusammenspiel auch als „hydrogen borrowing cascades“ bezeichnet (Sperl und Sieber 2018). Ist allerdings ein entsprechendes Design, auf Grund von nicht vorhandener Redoxneutralität zwischen Edukten und Produkten, nicht möglich, so muss auf ein zusätzliches Regenerationssystem zurückgegriffen werden. Alternativ können diese unausgeglichene Kaskaden auch so geführt werden, dass Produkte unterschiedlicher Oxidationsstufen gebildet werden und die Umsetzung dadurch Cofaktor neutral durchgeführt werden kann.

Das in der hier vorgestellten Enzymkaskade verwendete Ausgangssubstrat 2-KDG ist ein Zuckerabbauprodukt und zentrales Intermediat unterschiedlicher Stoffwechselwege von Entner-Doudoroff, Dahms und Weimberg (Entner und Doudoroff 1952; Dahms und Anderson 1969; Weimberg und Doudoroff 1955). Dieses ist kommerziell nicht erhältlich, kann allerdings beispielsweise in einer heterogenen, chemoenzymatische Katalyse aus Glukose cofaktorfrei über eine Gold-katalysierte Oxidation und eine Dehydratation mittels DHAD hergestellt werden (Sperl et al. 2016). Die nun für die Umwandlung vom Zuckerabbauprodukt zu vermarktbareren Aminosäuren ausgewählten Enzyme eignen sich aus verschiedenen Gründen gut für die entwickelte Kaskade. Zum einen bauen sie in der Weise aufeinander, dass lediglich ein Cofaktor zur Nutzung kommt, der zusätzlich vollständig

intrinsisch regeneriert wird und somit nicht stöchiometrisch und unrentabel eingesetzt werden muss. Des Weiteren wird durch die verfügbaren kinetischen Daten der gewählten Enzyme ersichtlich, dass diese sich gut für eine Kaskade mit den aufeinanderfolgenden Reaktionen eignen. Nur die KDGA als Startenzym weist einen K_m im mM Bereich auf, welcher aber durch die gute Substratsättigung durch die Startkonzentration des Substrates 2-KDG nicht stark ins Gewicht fällt. Die weiteren sind alle als sehr niedrig einzustufen und dadurch gut für eine Kaskade geeignet, da sich die gebildeten Substrate im Fluss befinden und somit theoretisch gleich weiter reagieren, wodurch sich keine Zwischenprodukte anreichern und die jeweiligen Substrat-Konzentrationen niedrig bleiben sollten. Aus dem Rahmen fällt die TIGR, bei der das Gleichgewicht der Oxidoreduktasereaktion beinahe vollständig auf der Seite des D-Glycerats liegt, wodurch eine Bestimmung der enzymatischen Daten für die gewünschte Reaktion nicht möglich war. Die Umgebung von Enzymen hat einen großen Einfluss auf die enzymkinetischen Parameter und ist insbesondere beim Zusammenspiel mehrerer Enzyme und unterschiedlicher Reaktionsarten in nur einem Gefäß entscheidend (Schrittwieser et al. 2018; Sperl und Sieber 2018; Lorillière et al. 2020). Aus diesem Grund wurde die Aktivität der Enzyme einzeln mit unterschiedlichen Puffern und pH-Werten getestet. Jeder Puffer oder pH-Wert zeigte Vor- und Nachteile für den Einsatz in der Kaskade, weshalb eine Abwägung notwendig war. Einen Überblick der Wirkung des Puffers auf die einzelnen enzymatischen Reaktionen gibt Tabelle 32. Teilweise konnten Puffer direkt als ungeeignet ausgeschlossen werden oder es musste zwischen Möglichkeiten abgewogen werden, was schlussendlich zu der Entscheidung für den KP_i -Puffer mit einem pH von 8,0 führte.

Das Zusammenspiel der unterschiedlichen Enzyme bietet noch weitere Herausforderungen. Als Referenz diente der Kaskadenansatz, bei dem alle Enzyme mit der gleichen Aktivität eingesetzt wurden. Bereits hier erreichte die L-Alanine-Konzentration einen fast vollständigen Umsatz, wohingegen beim L-Serin nur etwa 1/5 des möglichen zu detektieren war. Somit rückte besonders die Verbesserung der L-Serin-Ausbeute in den Fokus der Optimierung. Um mögliche Schwachstellen im Zusammenspiel der Enzyme herauszufinden, fand eine Titrationsstudie statt, bei der jeweils ein Enzym in der zugegebenen Aktivität durch Verringerung bzw. Erhöhung variiert wird. Für die L-Alanine-Produktion wurde mit der MjAIDU ein Enzym, welches nicht direkt an der L-Alanin-Produktion beteiligt ist, sondern indirekt durch die Regeneration von NADH eingreift und so die Bildung von L-Alanin überhaupt erst ermöglicht, als Engstelle detektiert. Die L-Serin-Produktion wiederum umfasst vier Reaktionsschritte und startet bei der Referenz mit einer Konzentration von

5,3 +/- 0,3 mM. Dies kann unter anderem am größeren Einfluss von NAD durch die notwendige, intrinsische Regenerierung sowie der erschwerten Kalkulierbarkeit für das Enzym TIGR liegen. Betrachtet man bei dieser Titrationsstudie die erreichten L-Serin-Konzentrationen insgesamt, so fallen einem zwei Enzyme mit einem deutlichen Einfluss auf, insbesondere dann, wenn deren Aktivität gesenkt wird. Eine Senkung der Aktivität der MjAIDH sorgt für einen vollständigen Produktionsausfall von L-Serin. Am Start war in dem Ansatz der Kaskade ausschließlich NAD⁺ vorhanden. Da für die Produktion von L-Alanin allerdings NADH benötigt wird, bedeutet die Bildung von L-Alanin im Umkehrschluss, dass durch die MjAIDH gleich viel D-Glyceraldehyd zu D-Glycerat umgesetzt wurde. Es scheint somit, dass diese D-Glycerat-Konzentration nicht ausreicht, um die weitere Reaktion zum L-Serin durch die TIGR voranzutreiben. Für diese Enzym-Substrat-Kombination liegen aus technischen Gründen keine kinetischen Daten vor, weshalb die Vermutung naheliegt, dass der zugehörige K_m im Vergleich zu den restlichen Enzymen deutlich höher liegt. Als weiteres limitierendes Enzym für die L-Serin-Produktion stellte sich die AfAlaDH heraus. Hierfür kann eine Erklärung in der im Vergleich zu den anderen Enzymen niedrigen maximalen spezifischen Aktivität der AfAlaDH für das Substrat Hydroxypyruvat mit nur 0,5 U/mg gefunden werden. Da die Verdopplung eines einzelnen der limitierenden Enzyme keinen deutlich höheren Umsatz bedingt, kann angenommen werden, dass nicht nur ein einzelnes Enzym diesen bedingt. Dies kann sich auch durch eine Variante belegen, bei der nebst den beiden als Engstelle identifizierten Enzyme MjAIDH und AfAlaDH mit der TIGR auch das dritte, für die Produktion von L-Serin notwendige Enzym erhöht wurde. Lag die Verbesserung mit einem erhöhten Enzym bei L-Serin noch bei einer Steigerung von 19 % +/- 9 % bzw. zu 26 % +/- 4 %, so brachte die Enzymaktivitätserhöhung der beiden als Engpass identifizierten Enzyme eine höhere Steigerung um 68 % +/- 7 % im Vergleich zur Referenz.

Basierend auf den für die Beurteilung der kinetischen Daten der verwendeten Enzyme herangezogenen Veröffentlichungen dienten die Enzyme dort ebenfalls für die Produktion von Aminosäuren. So wurde zum einen aus Glukose in einem präzise aufeinander abgestimmten Enzymverhältnis über KDG als Zwischenprodukt ein vergleichbarer L-Alanin-Umsatz von 95 % erreicht (Gmelch et al. 2019). Das L-Serin wiederum wurde aus Glycerol erzeugt, welches durch eine Enzymkaskade mit drei Enzymen umgesetzt wurde. Dabei wurden nach 18 h zwar mit 71,3 % prozentual deutlich mehr L-Serin erzeugt als durch die hier vorgestellte Kaskade, auf Grund der geringeren Ausgangskonzentration waren es in der Gesamtkonzentration allerdings mit 7,1 mM weniger als die hier erreichten 8,9 +/- 0,4 mM nach 21 h.

Neben der Bestimmung von Endkonzentrationen nach einer gewissen Zeit können auch noch weitere Erkenntnisse über die zeitliche Betrachtung Einblicke in die Vorgänge der Kaskade bieten. Die zügige L-Alanin-Bildung passt zur Beobachtung in der Titrationsstudie, dass eine Variation der KDGA keinen signifikanten Einfluss auf den Gesamtumsatz hat. Dieser Vollumsatz bedeutet gleichzeitig, dass durch den benötigten Cofaktor auch der Umsatz von Glycerinaldehyd zu D-Glycerat vollständig abgelaufen sein muss. Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass die darauffolgenden Reaktionen den limitierenden Faktor für die Bildung des L-Serin darstellen. Diese L-Serin-Produktion unterliegt zahlreichen Einflüssen, die zu der geringeren Ausbeute führen. Zum einen hängt die Bildung direkt mit dem zweiten Produkt L-Alanin zusammen, welche mit den vorausgehenden Edukten Pyruvat und Hydroxypyruvat in einem zusammenhängenden Gleichgewicht verbunden sind. So ist es möglich, dass das L-Alanin über die Messdauer deswegen zurück zu Pyruvat reagiert, um für die Reaktion zu L-Serin nötiges NADH vermehrt zu liefern (Sallach 1956). Dieser Effekt scheint allerdings erst mit steigender L-Serin- bzw. Hydroxypyruvat-Konzentration einzutreten. Des Weiteren liegt das Gleichgewicht der TIGR-Reaktion von D-Glycerat und NAD^+ zu Hydroxypyruvat und NADH deutlich auf der Eduktseite, was durch die nicht mögliche Messung dieser Reaktion ersichtlich wird. Auch zeigt das darauffolgende Enzym AfAlaDH eine geringe Aktivität gegenüber Hydroxypyruvat auf, wodurch die Reduktion zu Serin gering ist. Die Verwendung einer optimierten AlaDH mit einem niedrigeren K_m sowie höheren v_{\max} für Hydroxypyruvat und NADH wäre daher vorteilhaft.

Nebst modifizierten Enzymen könnte auch eine Selbststeuerung der jeweils vorhandenen Cofaktorkonzentrationen eine höhere Ausbeute erbringen. Um durch dieses Eingreifen dem System nicht eine Redox-Variante vollständig zu entziehen und somit manchen Reaktionen den notwendigen Cofaktor zu entfernen, sollte dieses Regulationssystem erst ab einer bestimmten Konzentration eingreifen. Eine solche Möglichkeit haben Opgenorth et al. mit einem „purge valve Modul“ für NADPH entwickelt und für die Produktion von PHB und Isopren erfolgreich demonstriert (Opgenorth et al. 2014). Bei dem purge valve Modul handelt es sich um eine selbständige Regulierung der NADPH-Konzentration, abhängig von der bereits vorliegenden Konzentration des Cofaktors. Dadurch wird es möglich, beispielweise auch nicht in sich ausgeglichene Kaskaden zu betreiben, was für diese Kaskade die Möglichkeit eröffnen würde, direkt vollständig enzymatisch bei dem leicht verfügbaren Substrat Glukose zu starten. Dabei wird die Glukose anstelle mit dem Gold-Katalysator mit einer GDH unter NADH-Bildung zu D-Gluconat oxidiert und anschließend wird daraus das 2-KDG bei beiden Methoden identisch mittels DHAD gebildet. Weiterhin wird durch das purge valve Modul auch die spontane Hydrolyse von NADH durch Nachbildung

ausgeglichen, welche gerade durch die hohe Temperatur der Kaskade von 50 °C beschleunigt wird oder auch eine möglicherweise vorhandene NOX-Aktivität, die unbeabsichtigt NADH zurück zu NAD⁺ oxidiert (Rover Júnior et al. 1998; Fawcett et al. 1961).

5.3 Direkte elektrochemische NADH-Regenerierung

Neben der enzymatischen Cofaktor-Regeneration gibt es noch zahlreiche weitere Varianten, bei denen versucht wird, die Wiedergewinnung des NADHs ohne Enzyme zu ermöglichen. Die elektrochemische Methode gehört hierbei auf Grund der direkten Verwendung von Elektronen für die Regeneration mit zu den Interessantesten. Die direkte, elektrochemische Regeneration für den Cofaktor NADH ist grundsätzlich eine sehr elegante Variante, bei der das NAD⁺ direkt an der Elektrodenoberfläche mit den nötigen Elektronen versorgt wird. Des Weiteren stellen die niedrigen Betriebskosten eine gute Möglichkeit zum Screening der Elektrodenmaterialien und eine gute Produktaufbereitung, die sich aus fehlenden Opfersubstraten oder Mediatoren bedingt, überzeugende Argumente für den Einsatz dieser Methode in Forschung und Industrie dar. Daher werden an dieser Anwendung auch seit mehreren Jahrzehnten immer wieder unterschiedliche Forschungsarbeiten vorgenommen mit dem Ziel, eine umsetzbare Anwendung zu erreichen. Für eine zukünftig sinnvolle Nutzung dieser Regenerationsart ist es wichtig, dass es sich um stabile, günstige und effiziente Elektroden handelt, die hohe TTN ermöglichen. Bislang bekannte Experimente fokussierten sich allesamt jeweils auf ein oder wenige Metalle, wobei bei den Messungen häufig für die Optimierung das Potential variiert wurde. Dies hat den Zweck, die gewählte Elektrode für die NADH-Regeneration zu charakterisieren und für das einzelne Metall die bestmögliche Einstellung zu finden. Ein Materialvergleich mehrerer Elektroden untereinander sowie eine Aussage zu der Effizienz, mit dem die gewählten Elektroden das NAD⁺ zu NADH reduzieren, kann dadurch nur schwer getroffen werden. Dies liegt an der teilweise stark schwankenden Stromstärke und somit der zugeführten Elektronenanzahl, die bei Messungen mit konstantem Potential variabel sind und auch vom Versuchsaufbau abhängen. Weiterhin sind die bisher beschriebenen Experimente hauptsächlich allein auf die Bildung von NADH fokussiert, ohne die weiteren Anwendungsbereiche in Kombination mit Enzymen im Blick zu haben. So kann es vorkommen, dass hierfür wichtige Angaben wie die Ausbeute oder Qualität des NADH fehlen.

Das hier durchgeführte Screening mit konstanter Stromstärke ergab ein sehr breit gefächertes Bild. Bei der gewählten Stromstärke von -5 mA/cm² konnten zahlreiche Materialien wie Gold, Glaskohlenstoff, Molybdän oder Titan mit einem 1,4-NADH Anteil um die 10 %

direkt als ungeeignet für die Kombination mit Enzymen ausgeschlossen werden. Weitere Metalle regenerierten das NADH zwar in einer besseren Qualität, lagen aber bereits mit der gebildeten Gesamtkonzentrationen unter $50 \mu\text{M}/\text{h}/\text{cm}^2$ im sehr niedrigen Bereich. Betroffen hiervon waren unter anderem Eisen, Kupfer, Nickel, Wolfram und Zink. Auch Zinn mit einer im Vergleich guten 1,4-NADH-Quote von ca. 56 % regenerierte nur wenig NADH insgesamt. Die beiden in dem Vergleich herausstechenden Materialien stellen Silber und Indium dar, bei denen sich ca. $130 - 140 \mu\text{M}/\text{cm}^2/\text{h}$ aktives NADH bildeten.

5.3.1 Reaktionsmechanismus direkte Regeneration

Um ein Verständnis für die Unterschiede bei der Regeneration zu bilden, ist es zuerst von Nöten, einen genaueren Blick auf den Reaktionsmechanismus vom Cosubstrat NAD zu werfen. Dies ist bei der indirekten Regeneration von zentraler Bedeutung, da diese Methode besonders anfällig für die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten ist. Dabei stellt eines der Probleme der direkten Regeneration die Notwendigkeit dar, mehrere Elektronen nacheinander auf das NAD^+ -Molekül zu übertragen und dabei trotzdem nur die 1,4-NADH-Variante zu bilden. Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, verliert im ersten Schritt der Pyridinring durch einen Elektronentransfer bei etwa $-1,1 V_{\text{SCE}}$ seine positive Ladung und ein Radikal bildet sich (Damian et al. 2007; Burnett und Underwood 1965). Zur Bildung des gewünschten 1,4-NADH, welches als einziges Isomer enzymatisch aktiv ist, ist ein weiterer Elektronentransfer bei etwa $-1,7 V_{\text{SCE}}$ (Schritt 2a) sowie eine Protonierung (Schritt 3) notwendig (Burnett und Underwood 1965). Dies stellt allerdings den langsameren Schritt der möglichen Reaktionen dar (Damian et al. 2007). Treffen hingegen zwei Radikale aufeinander (Schritt 2b), so verbinden sich diese wesentlich schneller und bilden eine enzymatisch inaktive Dimer-Variante (Moiroux et al. 1985). Insgesamt wären 21 verschiedene Stereoisomere dieser Dimer-Varianten möglich, wobei in der Praxis bisher zu 90 % drei 4,4-Dimere, drei 4,6-Dimere und keine C2-Variante gefunden wurde (Jaegfeldt 1981; Chenault und Whitesides 1987). Des Weiteren kann es durch Elektronentransfer oder Migration zu den ebenfalls enzymatisch inaktiven 1,2-NADH oder 1,6-NADH kommen (hellgrau) (Jaegfeldt 1981; Chenault und Whitesides 1987). 1,2-NADH besitzt allerdings nur eine Halbwertszeit von 30 min, wodurch es in der Anwendung eine untergeordnete Rolle spielt, bei Entstehung und folgendem Zerfall allerdings auch trotzdem die Gesamt-NADH-Konzentration der Reaktion senkt (Morrison et al. 2018; Beaupre et al. 2015).

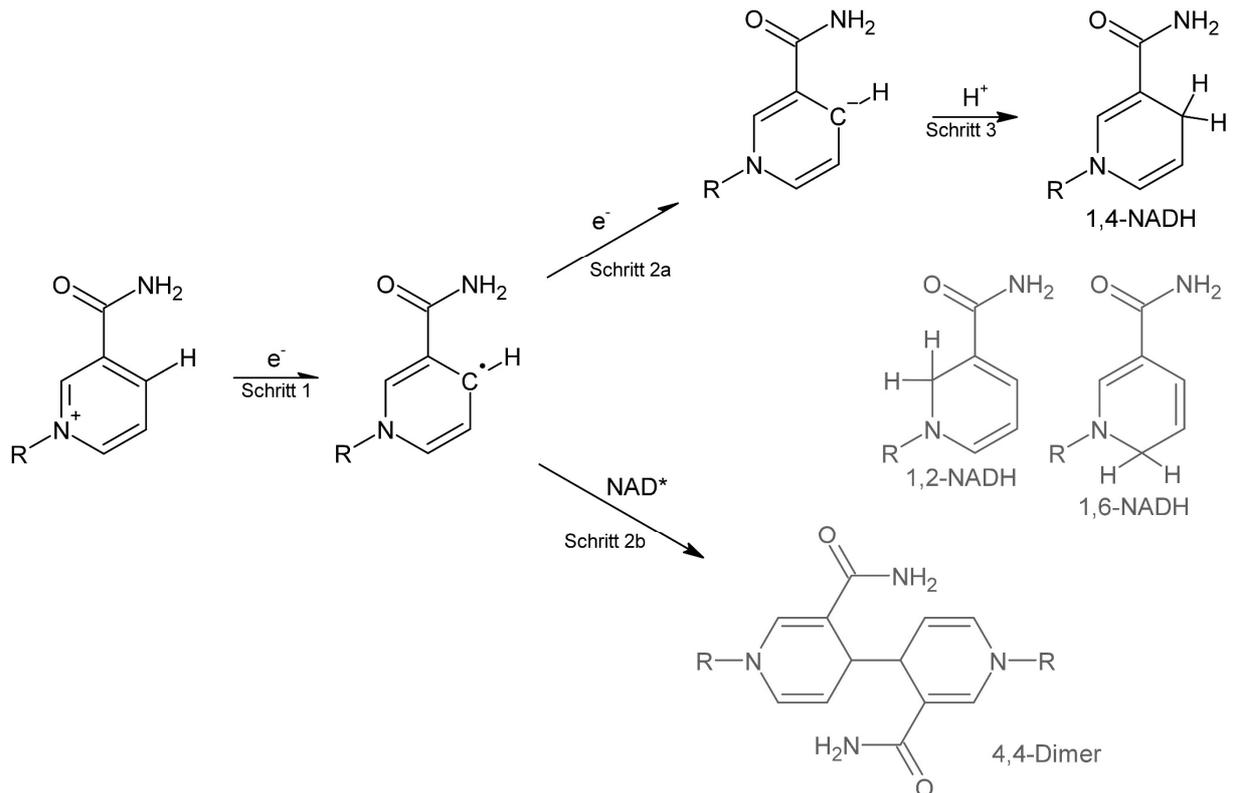


Abbildung 24: Mechanismus der Reaktion von NAD⁺ zu verschiedenen NADH-Isomeren und -Dimeren.

Dargestellt ist der in der Reaktion aktiv involvierte Nicotinamide-Teil. Der anhängende Rest (R) kann der Abbildung 1 (außerhalb des Rahmens liegend) entnommen werden. Nur die 1,4-NADH Form kann von Enzymen verwertet werden, alle anderen Formen (grau) sind inaktiv. Das 4,4-Dimer steht exemplarisch für alle weiteren möglichen Dimer-Varianten. 1,2-NADH und 1,6-NADH entstammen bereits ab Schritt 1 anderen Vorstufen, die der Übersichtlichkeit halber hier nicht dargestellt wurden.

Durch die Kenntnis der entscheidenden Schritte wurde versucht, eine Erklärung für die Nutzbarkeit von reinen, metallischen Elektroden zu postulieren. Für den Erhalt von 1,4-NADH wird im zweiten Schritt möglichst schnell sowohl ein Elektron als auch ein Proton benötigt. Daher wurde versucht, für die Metalle Cadmium, Cobalt, Nickel und Titan einen Zusammenhang zwischen dem Potenzial mit der besten Regenerationsleistung und der Bindungsstärke zwischen dem Metall und einem aktivierten Wasserstoff zu erklären (Ali et al. 2014). So hatte Titan mit der höchsten Metall-Wasserstoff Bindungsenergie von 348 kJ/mol beim niedrigsten Potenzial sein Maximum, dahingehend zeigte Cadmium mit 120 kJ/mol dieses bei -1,5 V_{NHE} mit einem Abfall bei noch niedrigeren Potenzialen. Metalle mit einer dazwischen liegenden Bindungsstärke im Bereich von 190 kJ/mol zeigen für Cobalt einen 1,4-NADH Peak bei -0,9 V_{NHE} und für Ni sogar einen Bereich zwischen -0,9 V - -1,3 V_{NHE}. Für diese dort getesteten Metalle zeichnet sich somit ein Zusammenhang ab.

Bezogen auf die im Screening mit konstanter Stromstärke erhaltenen Ergebnisse lässt sich diese Überlegung ebenfalls als Tendenz übertragen. Bei -5 mA/cm^2 liegt tendenziell ein eher höheres, negatives Potenzial vor, wodurch Metalle mit geringer Bindungsstärke bevorzugt sein sollten. In der Gruppe mit der im Test geringsten Bindungsstärke von $125 - 175 \text{ kJ/mol}$ befinden sich mit Blei, Indium, Zinn und Silber auch beinahe ausschließlich Metalle mit einer Regenerationsfähigkeit von $> 50 \%$ aktiven NADH. Nur Zink stört diese Einstufung, indem es ebenfalls in diese Gruppe fällt, aber nur $27 \pm 6 \%$ 1,4-NADH produziert. Alle anderen getesteten Metalle liegen im höheren Bereich von $175 - 340 \text{ kJ/mol}$ und zeigen nur eine Regenerationsleistung von $< 35 \%$. Auch hierbei gibt es mit Platin eine Ausnahme, welches bei etwa 260 kJ/mol und 60% liegt. Es zeigt sich somit, dass die Wasserstoffbildungsreaktion (HER) einen großen und dadurch auch tendenziell vorhersagbaren Einfluss auf Grund der stattfindenden Reaktionsmechanismen auf die Regeneration zu NADH hat.

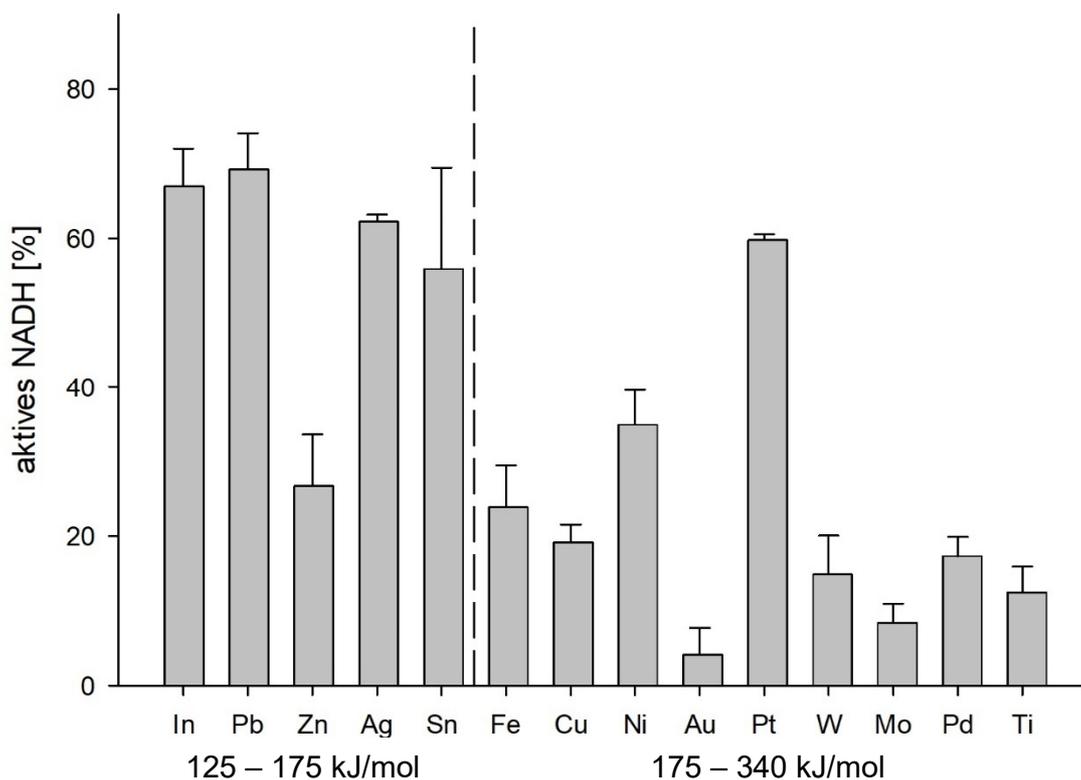


Abbildung 25: Auftragung der 1,4-NADH Regenerationsfähigkeit in Reihenfolge der Wasserstoffbindungsstärke.

Eine praktische Anwendung der direkten Regeneration von NADH in Kombination mit einer enzymatischen Reaktion ist bisher noch kaum in der Literatur vertreten. Ein Beispiel für die Entwicklung einer Elektrode sowie die Nutzung dieser in Kombination mit Enzymen bearbeitete Barin et al. (Barin et al. 2017). Hierbei wurde mit Kupfer als Elektrodenmaterial

gestartet, welches bei $1,1 V_{Ag/AgCl}$ eine Regenerationsleistung von 54 % 1,4-NADH zeigte. Durch die Beschichtung des Kupfers mit Kupfer entstand ein poröser Kupferschaum im nanoskaligen Bereich, der die elektrochemischen Eigenschaften dahingehend beeinflusste, dass der Anteil der aktiven Form auf 80 % anstieg. Weiterhin waren auch Kombinationen mit anderen Metallen hierbei besser als eine blanke Kupferelektrode, jedoch weniger effizient als Kupfer auf Kupfer (Barin et al. 2017). Dies zeigt, dass es nebst dem Material selbst noch zahlreiche weitere Einflussfaktoren auf die Funktionsfähigkeit der Elektroden gibt. Zur praktischen Anwendung kam dieses elektrochemische Regenerationssystem, um mittels dem Enzym FDH CO_2 in Form von Formiat zu binden (Barin et al. 2018, 2019). Allerdings konnten hierbei nur wenige Regenerationszyklen vollzogen werden.

5.3.2 Verbesserungsmöglichkeiten

Es lässt sich somit festhalten, dass die Literatur anwendbare und glaubwürdige Beispiele für die direkte NADH-Regeneration bereithält, bei dem auch die Möglichkeit der Kombination mit Enzymreaktionen gezeigt werden konnte (Barin et al. 2018, 2019). Durch die Bindungsstärke zwischen dem Metall und Wasserstoff lässt sich grob vorhersagen, in welchem Potentialbereich, das meiste aktive NADH erwartbar ist und somit auch, welche Stromstärke anwendbar sein könnte. Häufig können die besten Regenerationsleistungen allerdings nur bei einem eng eingegrenzten Potential erreicht werden, die selbst dann einen Anteil an 1,4-NADH von größer 90 % nur spärlich überschreiten. In dem hier durchgeführten Screening bei -5 mA lagen die maximalen Werte für Blei und Indium lediglich bei etwa 70 % aktiven NADH. Dies bedeutet, dass nach nur sieben Regenerationsrunden gerade einmal weniger als 10 % und nach zwölf weniger als 1 % des anfänglich eingesetzten NADH theoretisch vorhanden sind. Geringe TTN sind die Folge, was, wie bereits erwähnt, ein Ausschlusskriterium für den erfolgreichen Einsatz bei der Cofaktor-Regeneration und der Nutzung im industriellen Bereich darstellt (Wandrey 2004). Ein Lösungsansatz für die Vermeidung des Verlustes von NADH durch die Bildung der beiden Isomere 1,2-NADH und 1,6-NADH könnte durch die Renalasen erfolgen (Beaupre et al. 2015). Diese Enzyme sind in der Lage, sowohl 1,2-NADH als auch 1,6-NADH zurück zu NAD^+ zu oxidieren und so dem Kreislauf wieder zur Verfügung zu stellen. Dadurch würde die Bildung dieser beiden Isomeren bei den unerwünschten Nebenprodukten faktisch keine Rolle mehr spielen, was zu einer häufigeren Verwendung des eingesetzten NAD und so zu höheren TTN führt. Die häufig gebildeten Dimere können allerdings durch die Renalasen nicht zurück zu NAD^+ katalysiert werden, so dass diese für das System dauerhaft nicht mehr zur Verfügung stehen.

Nebst der Reaktivierung von inaktiven Cofaktorformen wird auch versucht, durch Ausnutzung des Unterlageneffektes neue nanoskalierte Strukturen zu bilden, die einen höheren Anteil des enzymatisch aktiven NADH ermöglichen. So ist es beispielsweise möglich die 1,4-NADH-Ausbeute einer Goldelektrode, welche bei einem niedrigen negativen Potential kaum, aber nutzbares NADH und bei einem hohen negativen Potential deutlich mehr, aber unbrauchbares NADH bildet, mit Platin Nanopartikeln zu beschichten (Damian et al. 2007). Dadurch konnte die Menge an aktivem NADH verdoppelt werden. Durch das Platin war ein besserer wasserstoffbildender Katalysator beteiligt, der die Protonierung des Radikals beschleunigt und gleichzeitig eine physikalische Barriere auf der Oberfläche bildet, so dass zwei benachbarte Radikale sich nicht so leicht treffen können. Der gleiche Effekt konnte auch sowohl mit Platin als auch Nickel, abgeschieden auf einer Glaskohlenstoffelektrode, beobachtet werden (Ali et al. 2012). Bei dieser Kombination sollen sogar bis zu 100 % aktives NADH entstehen, was sie aus der Perspektive der Reinheit zu guten Kandidaten werden lässt. Allerdings werden dabei keine entstandenen Konzentrationen erwähnt. Weiterhin kommt es bei der Beschichtung der Elektroden neben dem Material auch stark von der entstehende Größe und Form der Partikel an, wie beispielsweise Rahman et al. für Ru auf GC oder Barin et al. bei der oben bereits erwähnten Cu-Cu-Beschichtung aufzeigen (Rahman et al. 2016; Barin et al. 2017).

Die direkte elektrochemische Cofaktor-Regenerierung zeigt für die Anwendung im großtechnischen Bereich grundsätzlich Potenzial, besonders in Hinblick auf die zur Anwendung benötigten Materialien und die unmittelbare Verwendung der notwendigen Elektronen. In dieser Arbeit konnte die Datenlage der Literatur mit einer abweichenden Herangehensweise erweitert werden und die Elektrodenmaterialien dadurch für eine bestimmte Stromstärke direkt miteinander verglichen werden. Bei diesem Screening stellten sich mit um die 200 $\mu\text{M}/\text{cm}^2/\text{h}$ und an die 70 % aktiven NADH die Metalle Indium und Silber als besonders geeignet heraus. Trotz dieser klaren Favoriten reicht die Leistung noch bei weitem nicht aus, um eine sinnvolle Anwendung dieser in Verbindung mit enzymatischen Reaktionen zu ermöglichen. Daher muss auch weiterhin an veränderten Elektrodenmaterialien und Systemen gearbeitet werden, um die Produktion von Nebenprodukten zu minimieren und dadurch eine häufige Wiederverwertung der Coenzyme zu gewähren und die direkte elektrochemische Regenerierung zur Produktreife zu bringen.

5.4 Enzym-gekoppelte, elektrochemische Regeneration

Regenerierungen ohne enzymatische Beteiligung, wie beispielsweise die im vorherigen Kapitel 5.3 angesprochene direkte elektrochemische Regeneration, führen leicht zu unerwünschten Nebenprodukten und somit zu geringen Wiederverwendungsraten der Cofaktoren (Bückmann et al. 1981). Um den Vorteil der Elektrochemie, das günstige Ausgangsmaterial Strom, weiterhin zu nutzen, gibt es die Methode der enzymgekoppelten, indirekten Regeneration. Hierbei werden die benötigten Elektronen zuerst auf einen Mediator übertragen, der diese anschließend an das regenerierende Enzym weitergibt, worüber die Regeneration zum NADH zielgerichtet durchgeführt wird. Für diesen Elektronenübertrag wurde mit Formiat das Edukt der FDH ausgewählt. Die elektrochemische Erzeugung des Formiat wird sowohl im Zuge von Power to X Strategien, d.h. von Energiespeicherung in Form von Bildung von Chemikalien, als auch im Bereich der Bindung von CO₂ intensiv erforscht.

Für die Formiatbildung aus CO₂ wurde auf ein System mit einer Sn-NP beschichteten Gasdiffusionselektrode, eingebaut in eine Durchflusszelle, zurückgegriffen. Bei der Formiat-Produktion mittels Sn-Elektrode sind lediglich die gasförmigen Nebenprodukte CO und H₂ bekannt (Feaster et al. 2017; Nitopi et al. 2019). Davon abweichend könnten etwaige Elektrodenbestandteile, die durch die elektrochemische Reaktion abgelöst und dadurch in den Elektrolyten abgegeben werden, auf eine Kopplung mit Enzymreaktionen einen Einfluss aufweisen und eine Hemmung der Enzyme bewirken. Der Vergleich der kinetischen Daten durch die Gegenüberstellung aus von kommerziellem bzw. chemischen Formiat und dem elektrochemisch produzierten wies für die verwendete CbFDH-Mutante keine größeren Abweichungen untereinander auf und liegt auch im Vergleich mit der Literatur mit einem K_m für das Formiat von 5,0 +/- 0,3 mM sowie für NAD⁺ von 45 +/- 3 μ M in einer ähnlichen Größenordnung (Slusarczyk et al. 2000). Lediglich v_{max} liegt in der Literatur mit 5,1 U/mg deutlich höher, wobei der hier erhaltene Wert mit einer spezifischen Aktivität bis zu 1,2 U/mg mit dem Wert von dem kommerziell erhältlichen Wildtyp korreliert, der bei 25 °C bei etwa 2 U/mg liegt (Megazyme 2021). Der Vergleich der erhaltenen Werte deutet somit nicht auf eine offensichtliche Hemmung der Enzyme hin, die durch die Verwendung des mit elektrochemisch erzeugten Formiat versetzten Katholyt bedingt wäre.

Dies zeigte sich ebenso bei den beiden als Batch-Reaktion angesetzten Versuchen mit unterschiedlichen Limitierungen. Die bei diesen beiden statischen Varianten erzielten Ausbeuten im „Steady State“ Bereich beim Ansatz mit limitierendem Formiat von 75,2 % +/- 4,1 % und bei 4-MAP limitierend von 69,7 % +/- 1,7 % liegen in einer ähnlichen

Größenordnung. Weiterhin decken sie sich mit den in der Literatur erzielten Ergebnissen, bei denen mit der ReADH und einem FDH-Regenerationssystem verschiedene 4-Chlor-Acetophenon-Konzentrationen auf den max. Umsatz getestet wurden und für die höchste Variation mit 200 mM Ausgangskonzentration der Umsatz bei 63 % lag (Gröger et al. 2003; Gröger et al. 2004). Auch die Verwendung der in der Einleitung in Kapitel 1.4 vorgestellten Modifikation des NADHs mit Hilfe von PEG ließ sich bei dem Batch-Versuch mit limitierendem eFormiat für die Reaktion einsetzen mit einem TTN von etwa 500. Es lässt sich somit als Fazit festhalten, dass auch bei der Anwendung über einen längeren Zeitraum und in Kombination aller Enzyme der elektrochemisch mit Formiat angereicherte Phosphatpuffer problemlos für den Einsatz des enzymatischen Modellsystems geeignet ist.

5.4.1 Vergleich und Weiterentwicklung der kontinuierlichen Betriebsart

Werden Batchreaktionen noch zu den ersten beiden Reaktionsgenerationen gezählt, so ist das hier vorgestellte Hybridsystem, welches gleichzeitig die elektrochemische- und enzymatischen- Reaktionen miteinander kombiniert sowie den Betrieb im Fluss ermöglicht, in der vierten und komplexesten Generation für den Betrieb von enzymatischen Reaktionen anzusiedeln (Pàmies und Bäckvall 2003). Das Interesse an solchen Systemen ist auf Grund ihrer ökonomischen Vorteile steigend. Aufreinigungen von Zwischenprodukten entfallen, *in situ* Regenerationen von Cofaktoren wie dem NAD sind möglich und nötige Downstream-Prozesse verringern sich (Findrik und Vasić-Rački 2009; Santacoloma et al. 2011). Zusätzlich wird von ihnen im Allgemeinen ein höherer grüner Faktor, d.h. eine geringe Einflussnahme auf die Umwelt, erwartet, beispielsweise auf Grund des geringeren Abfallaufkommens (Sheldon 2008; OECD 2001). Bei dieser Kombination speist die elektrochemische CO₂-Reduktion in unterschiedlichen Betriebsweisen das biologische System, welches sich separiert in einem Enzym-Membran-Reaktor (EMR) mit Ultrafiltrationsmembran befindet, mit dem entstehenden Formiat. Identisch war hierbei bei beiden Varianten am Anfang das Ziel, durch eine hohe Stromstärke in möglichst kurzer Zeit die Formiatkonzentration in einen Bereich zu bringen, bei dem die FDH für die maximale Geschwindigkeit mit Formiat gesättigt vorliegt.

Ein Experiment mit kontinuierlicher Betriebsweise wurde mit einer kontinuierlichen elektrochemischen Formiatproduktion bei -5 mA betrieben. Die Stromstärke entstammt Erkenntnissen durch Vorexperimente und war daher auf die enzymatische Produktion angepasst, so dass in den ersten 20 h die Formiatbildung mit dem enzymatischen Verbrauch

sehr gut übereinstimmte. Diese Betriebsart ergibt besonders Vorteile für den elektrochemischen Teil. Durch die fehlenden Ein/Ausschaltvorgänge sowie der niedrige Stromdichte und der dadurch bedingten geringeren Gasentwicklung an der Oberfläche unterliegt die modifizierte Gasdiffusionselektrode einer geringeren Belastung, was zu einer längeren Haltbarkeit des aufgetragenen Katalysators und so zu geringeren Kosten für neue Elektroden führt. Gleichzeitig steht dem biologischen System eine gleichbleibende Formiatkonzentration zur Verfügung, wodurch die Enzyme immer mit maximaler Geschwindigkeit arbeiten können.

Die zweite Betriebsart mit dem Pulsbetrieb der Elektrochemie birgt einen Vorteil einer komplett anderen Richtung, da dieser Pulsbetrieb zur Stabilisierung des Stromnetzes beitragen kann. Durch die auf Grund der Energiewende zukünftig vermehrte Verwendung von nicht bedarfsgerecht produzierenden Energieträgern wird es deutlich häufiger zu Situationen kommen, in denen die Stromproduktion höher liegt als der Verbrauch und zusätzliche Speicher und Verbraucher zugeschaltet werden müssen. Diese Aufgabe kann, vor allem im größeren Maßstab, die elektrochemische Formiat-Produktion einnehmen. Wie hier in dem Experiment Kapitel 3.5.3.2 gezeigt werden konnte, verlaufen die beteiligten Reaktionen in einem gewissen Rahmen unabhängig voneinander. So lange dauerhaft genügend Formiat für das Regenerationsenzym FDH vorhanden ist, kann die Nutzung der elektrochemischen Produktion nach dem Stromnetz und dessen Bedürfnisse ausgerichtet werden. So wird die elektrochemische Reaktion bei einem Stromüberschuss eingeschaltet und bringt dadurch die Energie in das System. Ist das Stromnetz ausgeglichen oder herrscht ein Strommangel, so kann das elektrochemische System abgeregelt werden, es wird kein Formiat produziert und die biologische Produkterzeugung kann trotzdem für eine gewisse Zeit weiterarbeiten.

Eine allgemeine Einschränkung bietet der verwendete Enzymreaktor bzw. die Methode des Zurückhaltens der Reaktionskomponenten durch Filtration. Um eine möglichst vollständige Filtration der Enzyme und des PEG-NADHs sicher zu stellen, wurde auf einen Filter mit kleinen Poren von 10 kDa Durchmesser zurückgegriffen. Um ein Verstopfen des Filters zu verhindern und ihn über mehrere Tage mit der vergleichsweise hoher Durchflussrate durchgängig zu halten, fiel hier die Konzentration der Enzyme und des PEG-NADHs niedrig angereichert aus. Im Vergleich verwendete Gröger et al. jeweils 10 U (ca. 11 mg) Enzyme in 4 ml wässriger Phase, wohingegen sich bei dem hier vorgestellten Experimenten 25 U Enzyme (ca. 16 mg) auf das etwa 8fache Volumen verteilten (Gröger et al. 2004). Abhilfe könnte die Immobilisierung der Enzyme und des NADH schaffen. Für die

FDH wurden schon verschiedene Versuche mit unterschiedlichen Ergebnissen erprobt. Beispielsweise eignete sich die Verwendung von kommerziellen Polymerkugeln nur bedingt, da hierbei die Aktivität bereits nach zehn Zyklen auf unter 70 % absinkt (Binay et al. 2016). Eher in Frage kommt das Anheften an magnetische, Amin-funktionalisierte Nanopartikel mittels His(6)-tag modifizierter FDH, bei der kein Aktivitätsverlust feststellbar war (Demir et al. 2011). Möglichkeiten, das NAD zusammen mit den Enzymen in einer Art Nanomaschinen zu immobilisieren, wurden bereits in der Einleitung in Kapitel 1.4 dargestellt. Der Nachteil an diesen Systemen ist die dauerhaft kovalente Bindung der beteiligten Komponenten. Eine eigene, weiterführende Idee, die auf dem System von Hartley et al. aufbaut, liegt daher in der Trennbarkeit der Fusionsproteine und des Cofaktors. Anstelle der dort verwendeten Thiol-Konjugation wäre auch eine Bindung denkbar, die auf der Metallchelate-Affinität von Histidin und Nickel beruht. Wie bereits eigene Tests zeigten, ist es möglich, das freie Ende des PEG-NADHs mit Aminen zu modifizieren und so in dieser Funktionalität ein Metallion einzubetten. Mittels Kernspinresonanz und energiedispersiver Röntgenfluoreszenzanalyse konnte bereits nachgewiesen werden, dass ein solches modifiziertes PEG-NADH synthetisierbar ist und dieses in der Lage ist, Ni^{2+} Ionen zu binden (Daten hier nicht gezeigt). Wird der Linker zwischen dem katalysierenden und regenerierenden Enzym nun mit einer Kette aus mehreren Histidin-Resten versehen, so sollte es möglich sein, das Ni^{2+} -endständig modifizierte PEG-NADH daran zu binden und eine Gesamtfunktionalität des Komplexes, analog zu den oben publizierten Varianten, zu erhalten. Das Ni-PEG-NADH wäre universell anwendbar und durch ein Vorgehen wie der Metall-Affinitätschromatografie beispielsweise durch Imidazol vom Fusionsprotein ablösbar.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die kontinuierliche Betriebsart bereits ohne den hier diskutierten Modifikationen Potenzial aufweist, in Bioraffinerien Anwendung zu finden. Die Nutzung von getrennten Prozessen ergibt die Möglichkeit, beispielsweise die CO_2 -Fixierung in Form von Formiat zum einem als Power to X Prozess in gewisser Weise zur Energiespeicherung einzusetzen, aber auch direkt und kontinuierlich mit dem Formiat einen Elektronen-Mediator für die enzymatischen Cofaktor-Regeneration zu erzeugen. Im Gesamten resultiert ein neuartiges Verfahren, welches auf bereits bekannten Methoden und Reaktionen beruht. Dadurch ist es möglich, diese enzymgekoppelte, indirekte Regeneration zügig auf neue Gegebenheiten anzupassen, in dem auf bereits bekanntes zurückgegriffen werden kann bzw. durch den modularen Aufbau nur einzelne Teile erneut getestet werden müssen, ohne das komplette System neu aufzustellen.

5.5 Fazit und Ausblick

Verschiedene Verfahren aus dem Bereich der enzymatischen und elektrochemischen NADH-Regeneration wurden in dieser Arbeit vorgestellt und anhand praktischer Beispiele auf ihre Anwendbarkeit hin in Augenschein genommen. Dabei fand bei der Verwendung der Borneoldehydrogenase zur Campher-Racematspaltung ein weit verbreitetes, enzymatisches System auf Basis der FDH und dem zugehörigen Substrat Formiat Anwendung. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass Regenerationssysteme nicht nur zur Rückgewinnung des benötigten Cofaktors dienen, sondern in diesem Bereich auch noch weitere Aufgaben wie die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes übernehmen können und somit in diesem Fall das Reaktionsziel überhaupt erst ermöglichen. Bei der Racematspaltung konnte erfolgreich gezeigt werden, dass diese mit dem entworfenen System im kleinen Labormaßstab praktisch möglich ist. Für eine Anwendung im größeren Maßstab bereitet allerdings die für die eigentliche Reaktion verantwortliche Borneoldehydrogenase noch einige Herausforderungen wie die Aktivität und Stabilität.

Besteht die Möglichkeit und werden mehrere aufeinander aufbauende Reaktionen benötigt, so bietet sich die Bildung einer „close loop“ Enzymkaskade an. Da es sich bei der Racematspaltung nur um eine einzelne, isolierte Reaktion handelte, war dies dort nicht möglich. Bei der Umsetzung des Zuckerabbaustoffes 2-KDG zu den Aminosäuren L-Alanine und L-Serin war jedoch eine derartige Verzahnung der Reaktionen möglich, so dass sich schlussendlich in der Theorie zwei voneinander abhängige NAD-Regenerationskreisläufe bildeten. Durch die Komplexität der Kaskade war ein Vollumsatz allerdings nur für das L-Alanine möglich, welches einen kürzeren Reaktionsweg absolviert. Das L-Serin benötigt bei der Bildung deutlich länger, wodurch die Schwierigkeit bei der Verwendung und Einstellung von mehreren aufeinander folgenden Reaktionen mit gleichzeitiger Abhängigkeit bei der Nutzung eines gemeinsamen Cofaktors deutlich wird. Abhilfe kann hierbei ein umfassendes Verständnis der Vorgänge innerhalb der Kaskade schaffen, wodurch auch der Wechsel von Enzymen hin zu anderen Ursprungsorganismen oder künstlichen Mutationen erforderlich werden kann.

In manchen Fällen möchte man auch auf eine ggf. zusätzliche Enzymreaktion verzichten, um die Aufarbeitung durch eben das zusätzliche Regenerationsenzym sowie einem weiteren Substrat und Produkt nicht zusätzlich zu erschweren. Eine Variante, bei der keine weiteren, in der Reaktion verbleibenden Sachen zum Einsatz kommen, bildet die direkte elektrochemische Regeneration. Hierbei werden in der Theorie lediglich die für die Reaktion von NAD^+ zu NADH benötigten Elektronen direkt von der Elektrode zur Verfügung

gestellt. Diese müssen allerdings an einem eher komplexen Molekül nacheinander an der richtigen Position Anwendung finden, da von den möglichen NADH-Varianten nur 1,4-NADH auch anschließend von Enzymen genutzt werden kann. Weitere gebildete Isomere und Dimere sind für die enzymatische Nutzung unbrauchbar und beschränken die Regenerationszyklen zum Teil deutlich. Bei der Verwendung von blanken Elektroden zeigen sich, wenn überhaupt, häufig nur enge Einstellungsfenster, bei denen die Regeneration zielführend durchgeführt werden kann. Die Nebenprodukterzeugung ist allerdings bei diesen für einen langanhaltenden und sinnvollen Einsatz in Kombination mit Enzymen zu hoch. Komplexere Elektroden-Strukturen und Aufbauten sind somit nötig, um in Zukunft diese Methode für die großtechnische Anwendung realisieren zu können.

Um trotzdem den Vorteil der direkten Verwendung von Elektronen aus der Elektrochemie nutzen zu können, kann ein Schritt zurück gegangen werden und damit ein einfaches Substrat für Enzyme erzeugt werden. Es bietet sich Formiat für die bekannte NADH-Regeneration durch die Formiatdehydrogenase an. Das hier entwickelte System kombiniert dies und wurde auch in unterschiedlichsten Betriebsstufen wie dem Batch-Verfahren, einem kontinuierlichen Puls-Betrieb und einem vollständig kontinuierlichen Verfahren vorgeführt. Durch die PEG-Immobilisierung des NADH kann es zusammen mit den Enzymen in einem abgegrenzten Bioreaktor zurückgehalten werden, wodurch sowohl die elektrochemische als auch biologische Reaktion gleichzeitig miteinander gekoppelt als auch derartig voneinander getrennt sind, um negative gegenseitige Beeinflussungen zu minimieren. Dadurch ist die Anwendung in einem großen Milliliter-System bereits erfolgreich durchgeführt worden und eine Skalierung in noch größere Maßstäbe ist mit Verbesserungen im Bereich der Langzeitstabilität gut möglich. Der als kritischer Faktor angesehene Bereich von mehreren tausend TTN für die Regeneration ist bei dieser Kombination mit einem fehlenden Faktor von mindestens zwei in greifbarer Nähe.

Es hat sich somit gezeigt, dass mit allen getesteten Verfahren eine NADH Regeneration möglich ist. Bevor allerdings hierbei auf die Nutzung von Enzymen für den großtechnischen Einsatz vollständig verzichtet werden kann, bedarf es noch weiterer intensiver Forschung und Entwicklung. Bis dahin kann auf bewährte und neu kombinierte Varianten zurückgegriffen werden, um auch für Grundchemikalien die notwendigen Prozesse schnellstmöglich nachhaltiger und umweltverträglicher auf Basis von Enzymreaktionen umzustellen.

6 Literaturverzeichnis

(-)-Camphor - Alfa Aesar. 464-48-2 - (1S)-(-)-Camphor, 97% - L-2-Bornanone - B23469 - Alfa Aesar (2022). Online verfügbar unter <https://www.alfa.com/de/catalog/B23469/>, zuletzt aktualisiert am 02.01.2022, zuletzt geprüft am 02.01.2022.

32012R0872 - EUR-Lex. Nr. 02.080 (2022). Online verfügbar unter https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2012/872/oj, zuletzt aktualisiert am 02.01.2022, zuletzt geprüft am 02.01.2022.

4'-Methylacetophenon - Thermo Scientific™ (2022). Online verfügbar unter <https://www.fishersci.de/shop/products/4-methylacetophenone-95-acros-organics/10215320/en>, zuletzt aktualisiert am 02.01.2022, zuletzt geprüft am 02.01.2022.

Abokitse, K.; Hummel, W. (2003): Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of the gene encoding a (S)-specific alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 43297. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 62 (4), S. 380–386. DOI: 10.1007/s00253-003-1310-y.

Abril, Obsidiana; Whitesides, George M. (1982): Hybrid organometallic/enzymic catalyst systems: regeneration of NADH using dihydrogen. In: *J. Am. Chem. Soc.* 104 (6), S. 1552–1554. DOI: 10.1021/ja00370a017.

Ali, Irshad; Gill, Amardeep; Omanovic, Sasha (2012): Direct electrochemical regeneration of the enzymatic cofactor 1,4-NADH employing nano-patterned glassy carbon/Pt and glassy carbon/Ni electrodes. In: *Chemical Engineering Journal* 188, S. 173–180. DOI: 10.1016/j.cej.2012.02.005.

Ali, Irshad; Khan, Tariq; Omanovic, Sasha (2014): Direct electrochemical regeneration of the cofactor NADH on bare Ti, Ni, Co and Cd electrodes: The influence of electrode potential and electrode material. In: *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 387, S. 86–91. DOI: 10.1016/j.molcata.2014.02.029.

Ali, Irshad; Soomro, Bebul; Omanovic, Sasha (2011): Electrochemical regeneration of NADH on a glassy carbon electrode surface: The influence of electrolysis potential. In: *Electrochemistry Communications* 13 (6), S. 562–565. DOI: 10.1016/j.elecom.2011.03.010.

Alonso-Lomillo, M. Asunción; Rüdiger, Olaf; Maroto-Valiente, Angel; Velez, Marisela; Rodríguez-Ramos, Inmaculada; Muñoz, F. Javier et al. (2007): Hydrogenase-coated carbon nanotubes for efficient H₂ oxidation. In: *Nano letters* 7 (6), S. 1603–1608. DOI: 10.1021/nl070519u.

Al-Tamreh, Shaima A.; Ibrahim, Mohamed H.; El-Naas, Muftah H.; Vaes, Jan; Pant, Deepak; Benamor, Abdelbaki; Amhamed, Abdulkarem (2021): Electroreduction of Carbon Dioxide into Formate: A Comprehensive Review. In: *ChemElectroChem* 8 (17), S. 3207–3220. DOI: 10.1002/celec.202100438.

Anastas, Paul T.; Warner, John C. (1998): Green chemistry: Theory and practice. Oxford. Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0635/98036292-d.html>.

Angelastro, Antonio; Dawson, William M.; Luk, Louis Y. P.; Allemann, Rudolf K. (2017): A Versatile Disulfide-Driven Recycling System for NADP⁺ with High Cofactor Turnover Number. In: *ACS Catalysis* 7 (2), S. 1025–1029. DOI: 10.1021/acscatal.6b03061.

Asimov, Isaac (1960): Data for Biochemical Research (Dawson, R. M. C.; Elliott, Daphne C.; Elliott, W. H.; Jones, K. M.; eds.). In: *J. Chem. Educ.* 37 (8), A490. DOI: 10.1021/ed037pA490.3.

Baik, Sang Ho; Kang, Chan; Jeon, Cheol, II; Yun, Sei Eok (1999): Direct electrochemical regeneration of NADH from NAD⁺ using cholesterol-modified gold amalgam electrode. In: *Biotechnology Techniques* 13 (1), S. 1–5. DOI: 10.1023/A:1008865212773.

Barin, Razieh; Biria, Davoud; Rashid-Nadimi, Sahar; Asadollahi, Mohammad Ali (2018): Enzymatic CO₂ reduction to formate by formate dehydrogenase from *Candida boidinii* coupling with direct electrochemical regeneration of NADH. In: *Journal of CO₂ Utilization* 28, S. 117–125. DOI: 10.1016/j.jcou.2018.09.020.

Barin, Razieh; Biria, Davoud; Rashid-Nadimi, Sahar; Asadollahi, Mohammad Ali (2019): Investigating the enzymatic CO₂ reduction to formate with electrochemical NADH regeneration in batch and semi-continuous operations. In: *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification* 140, S. 78–84. DOI: 10.1016/j.cep.2019.04.020.

Barin, Razieh; Rashid-Nadimi, Sahar; Biria, Davoud; Asadollahi, Mohammad Ali (2017): Direct electrochemical regeneration of 1,4-NADH at the copper foam and bimetallic copper foam. In: *Electrochimica Acta* 247, S. 1095–1102. DOI: 10.1016/j.electacta.2017.07.096.

- Beaupre, Brett A.; Hoag, Matt R.; Roman, Joseph; Försterling, F. Holger; Moran, Graham R. (2015): Metabolic function for human renalase: oxidation of isomeric forms of β -NAD(P)H that are inhibitory to primary metabolism. In: *Biochemistry* 54 (3), S. 795–806. DOI: 10.1021/bi5013436.
- Begander, Benjamin; Huber, Anna; Sperl, Josef; Sieber, Volker (2021): Development of a Cofactor Balanced, Multi Enzymatic Cascade Reaction for the Simultaneous Production of L-Alanine and L-Serine from 2-Keto-3-deoxy-gluconate. In: *Catalysts* 11 (1), S. 31. DOI: 10.3390/catal11010031.
- Beilen, Jan B.van; Li, Zhi (2002): Enzyme technology: an overview. In: *Current Opinion in Biotechnology* 13 (4), S. 338–344. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00334-8.
- Binay, Barış; Alagöz, Dilek; Yildirim, Deniz; Çelik, Ayhan; Tükel, S. Seyhan (2016): Highly stable and reusable immobilized formate dehydrogenases: Promising biocatalysts for in situ regeneration of NADH. In: *Beilstein journal of organic chemistry* 12, S. 271–277. DOI: 10.3762/bjoc.12.29.
- Bird, C. L.; Kuhn, A. T. (1981): Electrochemistry of the viologens. In: *Chem. Soc. Rev.* 10 (1), S. 49. DOI: 10.1039/cs9811000049.
- Bohlen, Barbara (2021): Electrochemical reduction of CO₂ to formate on tin-based catalysts for coupling with biocatalytic reactions. Master Abschlussarbeit. Technische Hochschule München, Straubing. Fraunhofer IGB.
- Brady, Dean; Jordaan, Justin (2009): Advances in enzyme immobilisation. In: *Biotechnology Letters* 31 (11), S. 1639–1650. DOI: 10.1007/s10529-009-0076-4.
- Bubb, W. A.; Berthon, H. A.; Kuchel, P. W. (1995): Tris Buffer Reactivity with Low-Molecular-Weight Aldehydes: NMR Characterization of the Reactions of Glyceraldehyde-3-Phosphate. In: *Bioorganic Chemistry* 23 (2), S. 119–130. DOI: 10.1006/bioo.1995.1010.
- Bückmann, Andreas F.; Maria-Regina Kula; Rolf Wichmann, Christian Wandrey (1981): An efficient synthesis of high molecular weight NAD(H) derivatives suitable for continuous operations with coenzyme-dependent enzyme systems. In: *Journal of applied Biochemistry* 3, S. 301–315.
- Bückmann, Andreas F.; Morr, Michael; Kula, Maria-Regina (1987): Preparation of Technical Grade Polyethylene Glycol (PEG) (Mr 20,000)- N⁶-(2-Aminoethyl)-NADH by a Procedure Adaptable to Large-Scale Synthesis. In: *Biotechnology and Applied Biochemistry* 9 (3), S. 258–268. DOI: 10.1111/j.1470-8744.1987.tb00407.x.

Burnett, John N.; Underwood, A. L. (1965): Electrochemical Reduction of Diphosphopyridine Nucleotide *. In: *Biochemistry* 4 (10), S. 2060–2064. DOI: 10.1021/bi00886a021.

Burton, Robert M.; Kaplan, Nathan O. (1963a): The reaction of reduced pyridine nucleotides with acid. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 101 (1), S. 150–159. DOI: 10.1016/0003-9861(63)90545-9.

Burton, Robert Main; Kaplan, Nathan O. (1963b): The reaction of diphosphopyridine nucleotide and related pyridinium salts with alkali. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 101 (1), S. 139–149. DOI: 10.1016/0003-9861(63)90544-7.

Bus, J. S.; Aust, S. D.; Gibson, J. E. (1976): Paraquat toxicity: proposed mechanism of action involving lipid peroxidation. In: *Environmental health perspectives* 16, S. 139–146. DOI: 10.1289/ehp.7616139.

Butterworth, P. J. (2005): Lehninger: principles of biochemistry (4th edn) D. L. Nelson and M. C. Cox, W. H. Freeman & Co., New York, 1119 pp (plus 17 pp glossary), ISBN 0-7167-4339-6 (2004). In: *Cell Biochem. Funct.* 23 (4), S. 293–294. DOI: 10.1002/cbf.1216.

Calvin, Susan J.; Mangan, David; Miskelly, Iain; Moody, Thomas S.; Stevenson, Paul J. (2012): Overcoming Equilibrium Issues with Carbonyl Reductase Enzymes. In: *Org. Process Res. Dev.* 16 (1), S. 82–86. DOI: 10.1021/op200241u.

Canivet, Jérôme; Süß-Fink, Georg; Štěpnička, Petr (2007): Water-Soluble Phenanthroline Complexes of Rhodium, Iridium and Ruthenium for the Regeneration of NADH in the Enzymatic Reduction of Ketones. In: *Eur. J. Inorg. Chem.* 2007 (30), S. 4736–4742. DOI: 10.1002/ejic.200700505.

Carsten, Jörg M.; Schmidt, Anja; Sieber, Volker (2015): Characterization of recombinantly expressed dihydroxy-acid dehydratase from *Sulfobus solfataricus*-A key enzyme for the conversion of carbohydrates into chemicals. In: *Journal of Biotechnology* 211, S. 31–41. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.06.384.

Chance, Britton; Colowick, Sidney Paul; Kaplan, Nathan Oram (Hg.) (1969): Preparation and assay of substrates. 5. printing. New York, NY: Academic Press (Methods in enzymology / edited by Sidney P. Colowick and Nathan O. Kaplan, Vol. 3).

Chen, Daimei; Yang, Dong; Wang, Qun; Jiang, Zhongyi (2006): Effects of Boron Doping on Photocatalytic Activity and Microstructure of Titanium Dioxide Nanoparticles. In: *Ind. Eng. Chem. Res.* 45 (12), S. 4110–4116. DOI: 10.1021/ie0600902.

- Chenault, H. K.; Whitesides, G. M. (1987): Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. In: *Applied biochemistry and biotechnology* 14 (2), S. 147–197. DOI: 10.1007/BF02798431.
- Dahms, A. Stephen; Anderson, R. L. (1969): 2-Keto-3-deoxy-L-arabonate aldolase and its role in A new pathway of L-arabinose degradation. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 36 (5), S. 809–814. DOI: 10.1016/0006-291X(69)90681-0.
- Damian, A.; Maloo, K.; Omanović, Saša (2007): Direct electrochemical regeneration of NADH on Au, Cu and Pt-Au electrodes. In: *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 21 (1), S. 21–32. Online verfügbar unter <https://www.bib.irb.hr/292544?rad=292544>.
- Demir, Ayhan S.; Talpur, Farah N.; Betul Sopaci, S.; Kohring, Gert-W; Celik, Ayhan (2011): Selective oxidation and reduction reactions with cofactor regeneration mediated by galactitol-, lactate-, and formate dehydrogenases immobilized on magnetic nanoparticles. In: *Journal of Biotechnology* 152 (4), S. 176–183. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.03.002.
- Dinh, Thu Huong; Lee, Sang Cheon; Hou, Chen Yuan; Won, Keehoon (2016): Diaphorase-Viologen Conjugates as Bioelectrocatalysts for NADH Regeneration. In: *J. Electrochem. Soc.* 163 (6), H440-H444. DOI: 10.1149/2.1211606jes.
- Entner, Nathan; Doudoroff, Michael (1952): Glucose and Gluconic acid oxidation of *Pseudomonas Saccharophila*. In: *Journal of Biological Chemistry* 196 (2), S. 853–862. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)52415-2.
- Faber, Kurt (2011): Biocatalytic Applications. In: Kurt Faber (Hg.): *Biotransformations in organic chemistry. A textbook.* 6., rev. and corr. ed. Berlin, Heidelberg: Springer, S. 31–313.
- Fawcett, Colvin P.; Ciotti, Margaret M.; Kaplan, Nathan O. (1961): Inhibition of dehydrogenase reactions by a substance formed from reduced diphosphopyridine nucleotide. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 54 (1), S. 210–212. DOI: 10.1016/0006-3002(61)90962-3.
- Feaster, Jeremy T.; Shi, Chuan; Cave, Etosha R.; Hatsukade, Toru; Abram, David N.; Kuhl, Kendra P. et al. (2017): Understanding Selectivity for the Electrochemical Reduction of Carbon Dioxide to Formic Acid and Carbon Monoxide on Metal Electrodes. In: *ACS Catalysis* 7 (7), S. 4822–4827. DOI: 10.1021/acscatal.7b00687.
- Findrik, Z.; Vasić-Rački, Đ. (2009): Overview on Reactions with Multi-enzyme Systems. In: *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 23 (4), S. 545–553. Online verfügbar unter <https://hrcak.srce.hr/45419>.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (Hg.) (2022): p, alpha-Dimethylbenzyl alcohol - FAO. Online verfügbar unter <https://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-flav/details/en/c/826>, zuletzt aktualisiert am 02.01.2022, zuletzt geprüft am 02.01.2022.

Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB (2021): Campherbasierte Polymere - Fraunhofer IGB. Unter Mitarbeit von Michael Hofer, Harald Strittmatter und Volker Sieber. Online verfügbar unter <https://www.igb.fraunhofer.de/de/pressemedien/presseinformationen/2018/campher-basierte-polymere.html>, zuletzt aktualisiert am 08.09.2021, zuletzt geprüft am 26.12.21.

Fukuzumi, Shunichi; Kotani, Hiroaki; Lee, Yong-Min; Nam, Wonwoo (2008): Sequential electron-transfer and proton-transfer pathways in hydride-transfer reactions from dihydronicotinamide adenine dinucleotide analogues to non-heme oxoiron(IV) complexes and p-chloranil. Detection of radical cations of NADH analogues in acid-promoted hydride-transfer reactions. In: *J. Am. Chem. Soc.* 130 (45), S. 15134–15142. DOI: 10.1021/ja804969k.

Gallati, H. (1976): Stabilisierung des reduzierten β -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid in einem organischen Lösungsmittel. In: *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 14 (1-12). DOI: 10.1515/cclm.1976.14.1-12.9.

Ganesan, Vinothkumar; Sivanesan, Dharmalingam; Yoon, Sungho (2017): Correlation between the Structure and Catalytic Activity of Cp*Rh(Substituted Bipyridine) Complexes for NADH Regeneration. In: *Inorganic chemistry* 56 (3), S. 1366–1374. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.6b02474.

Gestrelus, S.; Månsson, M. O.; Mosbach, K. (1975): Preparation of an alcohol-dehydrogenase--NAD(H)--sepharose complex showing no requirement of soluble coenzyme for its activity. In: *European Journal of Biochemistry* 57 (2), S. 529–535. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1975.tb02328.x.

Gmelch, Tobias J.; Sperl, Josef M.; Sieber, Volker (2019): Optimization of a reduced enzymatic reaction cascade for the production of L-alanine. In: *Scientific Reports* 9 (1), S. 11754. DOI: 10.1038/s41598-019-48151-y.

Goldberg, Robert N.; Tewari, Yadu B.; Bell, Donna; Fazio, Kari; Anderson, Ellen (1993): Thermodynamics of Enzyme-Catalyzed Reactions: Part 1. Oxidoreductases. In: *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 22 (2), S. 515–582. DOI: 10.1063/1.555939.

Górecki, Marcin (2015): A configurational and conformational study of (-)-Oseltamivir using a multi-chiroptical approach. In: *Organic & biomolecular chemistry* 13 (10), S. 2999–3010. DOI: 10.1039/c4ob02369b.

Gröger, Harald; Hummel, Werner; Buchholz, Stefan; Drauz, Karlheinz; van Nguyen, Tien; Rollmann, Claudia et al. (2003): Practical asymmetric enzymatic reduction through discovery of a dehydrogenase-compatible biphasic reaction media. In: *Org. Lett.* 5 (2), S. 173–176. DOI: 10.1021/ol0272139.

Gröger, Harald; Hummel, Werner; Rollmann, Claudia; Chamouveau, Françoise; Hüsken, Hendrik; Werner, Helge et al. (2004): Preparative asymmetric reduction of ketones in a biphasic medium with an (S)-alcohol dehydrogenase under in situ-cofactor-recycling with a formate dehydrogenase. In: *Tetrahedron* 60 (3), S. 633–640. DOI: 10.1016/j.tet.2003.11.066.

Günther, Helmut; Paxinos, Antonios S.; Schulz, Michael; van Dijk, Cees; Simon, Helmut (1990): Direct Electron Transfer between Carbon Electrodes, Immobilized Mediator and an Immobilized Viologen-accepting Pyridine Nucleotide Oxidoreductase. In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29 (9), S. 1053–1055. DOI: 10.1002/anie.199010531.

Hardt, Steffen; Stapf, Stefanie; Filmon, Dawit T.; Birrell, James A.; Rüdiger, Olaf; Fourmond, Vincent et al. (2021): Reversible H₂ Oxidation and Evolution by Hydrogenase Embedded in a Redox Polymer Film. In: *Nat Catal* 4 (3), S. 251–258. DOI: 10.1038/s41929-021-00586-1.

Hartley, Carol J.; Williams, Charlotte C.; Scoble, Judith A.; Churches, Quentin I.; North, Andrea; French, Nigel G. et al. (2019): Engineered enzymes that retain and regenerate their cofactors enable continuous-flow biocatalysis. In: *Nat Catal* 2 (11), S. 1006–1015. DOI: 10.1038/s41929-019-0353-0.

Hildebrand, Falk; Kohlmann, Christina; Franz, Andreas; Lütz, Stephan (2008): Synthesis, Characterization and Application of New Rhodium Complexes for Indirect Electrochemical Cofactor Regeneration. In: *Advanced Synthesis & Catalysis* 350 (6), S. 909–918. DOI: 10.1002/adsc.200700505.

Hofer, Michael; Diener, Julia; Begander, Benjamin; Kourist, Robert; Sieber, Volker (2021): Engineering of a borneol dehydrogenase from *P. putida* for the enzymatic resolution of camphor. In: *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 105 (8), S. 3159–3167. DOI: 10.1007/s00253-021-11239-5.

Hollmann, Frank; Arends, Isabel W. C. E.; Buehler, Katja (2010): Biocatalytic Redox Reactions for Organic Synthesis: Nonconventional Regeneration Methods. In: *ChemCatChem* 2 (7), S. 762–782. DOI: 10.1002/cctc.201000069.

Hollmann, Frank; Arends, Isabel W. C. E.; Holtmann, Dirk (2011): Enzymatic reductions for the chemist. In: *Green Chem.* 13 (9), S. 2285. DOI: 10.1039/c1gc15424a.

Hori, Yoshio; Wakebe, Hidetoshi; Tsukamoto, Toshio; Koga, Osamu (1994): Electrocatalytic process of CO selectivity in electrochemical reduction of CO₂ at metal electrodes in aqueous media. In: *Electrochimica Acta* 39 (11-12), S. 1833–1839. DOI: 10.1016/0013-4686(94)85172-7.

Hou, Ching T. (2005): Handbook of Industrial Biocatalysis: CRC Press.

Hu, Jiankun; Sun, Baoku; Zhang, Haichun; Lu, Ading; Zhang, Huiqiu; Zhang, Hailong (2020): Terpolymer resin containing bioinspired borneol and controlled release of camphor: Synthesis and antifouling coating application. In: *Scientific Reports* 10 (1), S. 10375. DOI: 10.1038/s41598-020-67073-8.

Hummel, Werner; Abokitse, Kofi; Drauz, Karlheinz; Rollmann, Claudia; Gröger, Harald (2003): Towards a Large-Scale Asymmetric Reduction Process with Isolated Enzymes: Expression of an (S)-Alcohol Dehydrogenase in *E. coli* and Studies on the Synthetic Potential of this Biocatalyst. In: *Advanced Synthesis & Catalysis* 345 (3), A34-A34. DOI: 10.1002/adsc.200390064.

Hummel, Werner; Gröger, Harald (2014): Strategies for regeneration of nicotinamide co-enzymes emphasizing self-sufficient closed-loop recycling systems. In: *Journal of Biotechnology* 191, S. 22–31. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.07.449.

Immanuel, Susan; Sivasubramanian, R.; Gul, Rukhsana; Dar, Mushtaq Ahmad (2020): Recent Progress and Perspectives on Electrochemical Regeneration of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH). In: *Chemistry, an Asian journal* 15 (24), S. 4256–4270. DOI: 10.1002/asia.202001035.

Jaegfeldt, Hans (1981): 420 - A study of the products formed in the electrochemical reduction of nicotinamide-adenine-dinucleotide. In: *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 8 (3), S. 355–370. DOI: 10.1016/0302-4598(81)80018-9.

Jiang, Zhongyi; Lü, Chenqiu; Wu, Hong (2005): Photoregeneration of NADH Using Carbon-Containing TiO₂. In: *Ind. Eng. Chem. Res.* 44 (12), S. 4165–4170. DOI: 10.1021/ie049155w.

Jones, J. Bryan; Sneddon, David W.; Higgins, William; Lewis, Arthur J. (1972): Preparative-scale reductions of cyclic ketones and aldehyde substrates of horse liver alcohol dehydrogenase with in situ sodium dithionite recycling of catalytic amounts of NAD. In: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (15), S. 856. DOI: 10.1039/c39720000856.

Kim, Jae Hong; Lee, Minah; Lee, Joon Seok; Park, Chan Beum (2012): Self-assembled light-harvesting peptide nanotubes for mimicking natural photosynthesis. In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51 (2), S. 517–520. DOI: 10.1002/anie.201103244.

Kim, Sohyoung; Yun, Sei-Eok; Kang, Chan (1999): 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. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 465 (2), S. 153–159. DOI: 10.1016/S0022-0728(99)00074-1.

Kirk, Ole; Borchert, Torben Vedel; Fuglsang, Claus Crone (2002): Industrial enzyme applications. In: *Current Opinion in Biotechnology* 13 (4), S. 345–351. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00328-2.

Knaus, Tanja; Paul, Caroline E.; Levy, Colin W.; Vries, Simon de; Mutti, Francesco G.; Hollmann, Frank; Scrutton, Nigel S. (2016): Better than Nature: Nicotinamide Biomimetics That Outperform Natural Coenzymes. In: *J. Am. Chem. Soc.* 138 (3), S. 1033–1039. DOI: 10.1021/jacs.5b12252.

Kragl, Udo; Kruse, Wolfgang; Hummel, Werner; Wandrey, Christian (1996): Enzyme engineering aspects of biocatalysis: Cofactor regeneration as example. In: *Biotechnol. Bioeng.* 52 (2), S. 309–319. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19961020)52:2<309::AID-BIT11>3.0.CO;2-E.

Kruse, Wolfgang; Hummel, Werner; Kragl, Udo (1996): Alcohol-dehydrogenase-catalyzed production of chiral hydrophobic alcohols. A new approach leading to a nearly waste-free process. In: *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 115 (4), S. 239–243. DOI: 10.1002/recl.19961150409.

L-Alanine - Alfa Aesar. 56-41-7 - L-Alanine, 99% - H-Ala-OH - L-2-Aminopropionic acid - A15804 - Alfa Aesar (2022). Online verfügbar unter <https://www.alfa.com/de/catalog/A15804/>, zuletzt aktualisiert am 02.01.2022, zuletzt geprüft am 02.01.2022.

Lang, Patrick T.; Harned, Andrew M.; Wissinger, Jane E. (2011): Oxidation of Borneol to Camphor Using Oxone and Catalytic Sodium Chloride: A Green Experiment for the Undergraduate Organic Chemistry Laboratory. In: *J. Chem. Educ.* 88 (5), S. 652–656. DOI: 10.1021/ed100853f.

Lee, Yoo Seok; Gerulskis, Rokas; Minter, Shelley D. (2021): Advances in electrochemical cofactor regeneration: enzymatic and non-enzymatic approaches. In: *Current Opinion in Biotechnology* 73, S. 14–21. DOI: 10.1016/j.copbio.2021.06.013.

Li, Zhong; Yan, Jinxin; Sun, Jinkai; Xu, Ping; Ma, Cuiqing; Gao, Chao (2018): Production of value-added chemicals from glycerol using in vitro enzymatic cascades. In: *Commun Chem* 1 (1). DOI: 10.1038/s42004-018-0070-7.

Lorillière, Marion; Guérard-Hélaine, Christine; Gefflaut, Thierry; Fessner, Wolf-Dieter; Clapés, Pere; Charmantray, Franck; Hecquet, Laurence (2020): Convergent in situ Generation of Both Transketolase Substrates via Transaminase and Aldolase Reactions for Sequential One-Pot, Three-Step Cascade Synthesis of Ketoses. In: *ChemCatChem* 12 (3), S. 812–817. DOI: 10.1002/cctc.201901756.

Lu, Xu; Leung, Dennis Y. C.; Wang, Huizhi; Leung, Michael K. H.; Xuan, Jin (2014): Electrochemical Reduction of Carbon Dioxide to Formic Acid. In: *ChemElectroChem* 1 (5), S. 836–849. DOI: 10.1002/celec.201300206.

Lubitz, Wolfgang; Ogata, Hideaki; Rüdiger, Olaf; Reijerse, Edward (2014): Hydrogenases. In: *Chemical Reviews* 114 (8), S. 4081–4148. DOI: 10.1021/cr4005814.

Maenaka, Yuta; Suenobu, Tomoyoshi; Fukuzumi, Shunichi (2012): Efficient catalytic interconversion between NADH and NAD⁺ accompanied by generation and consumption of hydrogen with a water-soluble iridium complex at ambient pressure and temperature. In: *J. Am. Chem. Soc.* 134 (1), S. 367–374. DOI: 10.1021/ja207785f.

May, Sheldon W.; Padgett, Stephen R. (1983): Oxidoreductase Enzymes in Biotechnology: Current Status and Future Potential. In: *Nat Biotechnol* 1 (8), S. 677–686. DOI: 10.1038/nbt1083-677.

McDonald, Andrew G.; Boyce, Sinéad; Tipton, Keith F. (2009): ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list. In: *Nucleic acids research* 37 (Database issue), D593–7. DOI: 10.1093/nar/gkn582.

McDonald, Andrew G.; Tipton, Keith F. (2021): Enzyme nomenclature and classification: the state of the art. In: *The FEBS journal*. DOI: 10.1111/febs.16274.

Megazyme (Hg.) (2021): Formate Dehydrogenase (Lot 180710b). Online verfügbar unter https://www.megazyme.com/documents/Data_Sheet/E-FDHCB_DATA.pdf, zuletzt geprüft am 02.01.2022.

Moiroux, J.; Deycard, S.; Malinski, T. (1985): Electrochemical reduction of NAD⁺ and pyridinium cations adsorbed at the mercury/water interface. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 194 (1), S. 99–108. DOI: 10.1016/0022-0728(85)87008-X.

Money, T. (1985): Camphor: a chiral starting material in natural product synthesis. In: *Nat. Prod. Rep.* 2 (3), S. 253–289. DOI: 10.1039/np9850200253.

Morrison, Clifford S.; Armiger, William B.; Dodds, David R.; Dordick, Jonathan S.; Koffas, Mattheos A. G. (2018): Improved strategies for electrochemical 1,4-NAD(P)H₂ regeneration: A new era of bioreactors for industrial biocatalysis. In: *Biotechnology Advances* 36 (1), S. 120–131. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.10.003.

Nitopi, Stephanie; Bertheussen, Erlend; Scott, Soren B.; Liu, Xinyan; Engstfeld, Albert K.; Horch, Sebastian et al. (2019): Progress and Perspectives of Electrochemical CO₂ Reduction on Copper in Aqueous Electrolyte. In: *Chemical Reviews* 119 (12), S. 7610–7672. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00705.

Noffke, Anna Louisa; Habtemariam, Abraha; Pizarro, Ana M.; Sadler, Peter J. (2012): Designing organometallic compounds for catalysis and therapy. In: *Chemical communications (Cambridge, England)* 48 (43), S. 5219–5246. DOI: 10.1039/c2cc30678f.

OECD (2001): The application of biotechnology to industrial sustainability. Paris: OECD (Sustainable development).

Opgenorth, Paul H.; Korman, Tyler P.; Bowie, James U. (2014): A synthetic biochemistry molecular purge valve module that maintains redox balance. In: *Nat Commun* 5 (1), S. 4113. DOI: 10.1038/ncomms5113.

Ozbakir, Harun F.; Banta, Scott (2018): Kinetic and transport effects on enzymatic biocatalysis resulting from the PEGylation of cofactors. In: *AIChE J.* 64 (1), S. 12–17. DOI: 10.1002/aic.15893.

Pàmies, Oscar; Bäckvall, Jan-E (2003): Combination of enzymes and metal catalysts. A powerful approach in asymmetric catalysis. In: *Chemical Reviews* 103 (8), S. 3247–3262. DOI: 10.1021/cr020029g.

Pandey, P. C.; Upadhyay, S.; Upadhyay, B. C.; Pathak, H. C. (1998): Ethanol biosensors and electrochemical oxidation of NADH. In: *Analytical biochemistry* 260 (2), S. 195–203. DOI: 10.1006/abio.1998.2679.

Park, Chan Beum; Lee, Sahng Ha; Subramanian, Esakkiappan; Kale, Bharat B.; Lee, Sang Mi; Baeg, Jin-Ook (2008): Solar energy in production of L-glutamate through visible light active photocatalyst--redox enzyme coupled bioreactor. In: *Chemical communications (Cambridge, England)* (42), S. 5423–5425. DOI: 10.1039/b808256a.

Paul, Pandeeti Emmanuel Vijay; Sangeetha, Veeraiah; Deepika, Routhu Gyana (2018): Emerging Trends in the Industrial Production of Chemical Products by Microorganisms. In: Buddolla Viswanath (Hg.): *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. San Diego: Elsevier Science & Technology, S. 107–125.

Pearson, Brian (Hg.) (1991): *Speciality chemicals. Innovations in industrial synthesis and applications*; [compendium of articles based on papers presented at conferences on speciality chemicals organized throughout Europe and the USA. Spring Innovations Ltd. London: Elsevier Applied Science.

Philips, Matthew F.; Gruter, Gert-Jan M.; Koper, Marc T. M.; Schouten, Klaas Jan P. (2020): Optimizing the Electrochemical Reduction of CO₂ to Formate: A State-of-the-Art Analysis. In: *ACS Sustainable Chem. Eng.* 8 (41), S. 15430–15444. DOI: 10.1021/acssuschemeng.0c05215.

Quinto, Tommaso; Köhler, Valentin; Ward, Thomas R. (2014): Recent Trends in Biomimetic NADH Regeneration. In: *Top Catal* 57 (5), S. 321–331. DOI: 10.1007/s11244-013-0187-y.

Rafter, Gale W.; Colowick, Sidney P. (1969): [127] Enzymatic preparation of DPNH and TPNH. In: Britton Chance, Sidney Paul Colowick und Nathan Oram Kaplan (Hg.): *Preparation and assay of substrates*, Bd. 3. 5. printing. New York, NY: Academic Press (*Methods in enzymology* / edited by Sidney P. Colowick and Nathan O. Kaplan, Vol. 3), S. 887–890.

Rahman, Gul; Mian, Shabeer Ahmad; Shah, Anwar ul Haq Ali; Joo, Oh-Shim (2016): Electrocatalytic behavior of glassy carbon electrode modified with ruthenium nanoparticles and ruthenium film. In: *J Appl Electrochem* 46 (4), S. 459–468. DOI: 10.1007/s10800-016-0937-1.

Raja, M.M.M.; Raja, A.; Imran, M. M.; Santha, A.M.I.; Devasena, K. (2010): Enzymes Application in Diagnostic Prospects. In: *Biotechnology* 10 (1), S. 51–59. DOI: 10.3923/biotech.2011.51.59.

Raku, Takao; Tokiwa, Yutaka (2004): Chemoenzymatic synthesis of optically active, biodegradable polymers based on phenyl- and naphthyl-ethanols esterified with divinyl-adipate. In: *Biotechnology Letters* 26 (8), S. 665–670. DOI: 10.1023/B:BILE.0000023027.84347.e2.

Ravindran, Rajeev; Jaiswal, Amit K. (2019): Current Advances in Immobilization Techniques of Enzymes. In: Inamuddin, Mohammad Faraz Ahmer, Mohd Imran Ahamed und Abdullah Mohamed Asiri (Hg.): *Enzymatic fuel cells. Materials and applications*, Bd. 44. Millersville, PA: Materials Research Forum LLC (Materials Research Foundations Ser, volume 44), S. 51–72.

Ritter, John J. (1933): A New Camphor Synthesis. In: *J. Am. Chem. Soc.* 55 (8), S. 3322–3326. DOI: 10.1021/ja01335a046.

Rover Júnior, L.; Fernandes, J. C.; Oliveira Neto, G. de; Kubota, L. T.; Katekawa, E.; Serrano, S. H. (1998): Study of NADH stability using ultraviolet-visible spectrophotometric analysis and factorial design. In: *Analytical biochemistry* 260 (1), S. 50–55. DOI: 10.1006/abio.1998.2656.

Rüdiger, Olaf; Abad, Jose M.; Hatchikian, E. Claude; Fernandez, Victor M.; Lacey, Antonio L. de (2005): Oriented immobilization of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase onto carbon electrodes by covalent bonds for nonmediated oxidation of H₂. In: *J. Am. Chem. Soc.* 127 (46), S. 16008–16009. DOI: 10.1021/ja0554312.

Ryu, Jungki; Lee, Sahng Ha; Nam, Dong Heon; Park, Chan Beum (2011): Rational design and engineering of quantum-dot-sensitized TiO₂ nanotube arrays for artificial photosynthesis. In: *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* 23 (16), S. 1883–1888. DOI: 10.1002/adma.201004576.

Sallach, H. J. (1956): Formation of Serine from Hydroxypyruvat und L-Alanine. In: *Journal of Biological Chemistry* 223 (2), S. 1101–1108. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)65108-7.

Santacoloma, Paloma A.; Sin, Gürkan; Gernaey, Krist V.; Woodley, John M. (2011): Multienzyme-Catalyzed Processes: Next-Generation Biocatalysis. In: *Org. Process Res. Dev.* 15 (1), S. 203–212. DOI: 10.1021/op1002159.

Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. (2001): Industrial biocatalysis today and tomorrow. In: *Nature* 409 (6817), S. 258–268. DOI: 10.1038/35051736.

Schmid, Andreas; Hollmann, Frank; Park, Jin Byung; Bühler, Bruno (2002): The use of enzymes in the chemical industry in Europe. In: *Current Opinion in Biotechnology* 13 (4), S. 359–366. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00336-1.

Schritt Wieser, Joerg H.; Velikogne, Stefan; Hall, Mélanie; Kroutil, Wolfgang (2018): Artificial Biocatalytic Linear Cascades for Preparation of Organic Molecules. In: *Chemical Reviews* 118 (1), S. 270–348. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00033.

Selescu, Tudor; Ciobanu, Alexandru C.; Dobre, Cristian; Reid, Gordon; Babes, Alexandru (2013): Camphor activates and sensitizes transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) to cooling and icilin. In: *Chemical Senses* 38 (7), S. 563–575. DOI: 10.1093/chemse/bjt027.

Shaked, Ze'ev; Barber, James J.; Whitesides, George M. (1981): Combined electrochemical/enzymic method for in situ regeneration of NADH based on cathodic reduction of cyclic disulfides. In: *J. Org. Chem.* 46 (20), S. 4100–4101. DOI: 10.1021/jo00333a044.

Shaked, Ze'ev; Whitesides, George M. (1980): Enzyme-catalyzed organic synthesis: NADH regeneration by using formate dehydrogenase. In: *J. Am. Chem. Soc.* 102 (23), S. 7104–7105. DOI: 10.1021/ja00543a038.

Sheldon, R. A. (2007): *Green Chemistry and Catalysis*. Unter Mitarbeit von Isabella Arends, Ulf Hanefeld und Fred Rantwijk. 1st ed. Weinheim: John Wiley & Sons Incorporated.

Sheldon, Roger A. (2008): E factors, green chemistry and catalysis: an odyssey. In: *Chemical communications (Cambridge, England)* (29), S. 3352–3365. DOI: 10.1039/b803584a.

Shi, Qing; Yang, Dong; Jiang, Zhongyi; Li, Jian (2006): Visible-light photocatalytic regeneration of NADH using P-doped TiO₂ nanoparticles. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 43 (1-4), S. 44–48. DOI: 10.1016/j.molcatb.2006.06.005.

Shin, Hyun-Dong; Guo, Xuan; Chen, Rachel R. (2006): Chapter 13 - Biocatalysis for Chiral Synthesis. In: Shang-Tian Yang (Hg.): *Bioprocessing for value-added products from renewable resources. New technologies and applications*. Amsterdam: Elsevier, S. 351–371. Online verfügbar unter <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444521149500141>.

- Singh, Rajendra; Kumar, Manoj; Mittal, Anshumali; Mehta, Praveen Kumar (2016): Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. In: *3 Biotech* 6 (2), S. 174. DOI: 10.1007/s13205-016-0485-8.
- Slusarczyk, H.; Felber, S.; Kula, M. R.; Pohl, M. (2000): Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. In: *European Journal of Biochemistry* 267 (5), S. 1280–1289. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01123.x.
- Sperl, Josef M.; Carsten, Jörg M.; Guterl, Jan-Karl; Lommès, Petra; Sieber, Volker (2016): Reaction Design for the Compartmented Combination of Heterogeneous and Enzyme Catalysis. In: *ACS Catalysis* 6 (10), S. 6329–6334. DOI: 10.1021/acscatal.6b01276.
- Sperl, Josef M.; Sieber, Volker (2018): Multienzyme Cascade Reactions—Status and Recent Advances. In: *ACS Catalysis* 8 (3), S. 2385–2396. DOI: 10.1021/acscatal.7b03440.
- Steckhan, Eberhard (1994): Electroenzymatic synthesis. In: Eberhard Steckhan und J. Bersier (Hg.): *Electrochemistry*, Bd. 170. Berlin: Springer (Topics in Current Chemistry, 170), S. 83–111.
- Steckhan, Eberhard; Herrmann, Sabine; Ruppert, Romain; Thömmes, Jörg; Wandrey, Christian (1990): Continuous Generation of NADH from NAD⁺ and Formate Using a Homogeneous Catalyst with Enhanced Molecular Weight in a Membrane Reactor. In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29 (4), S. 388–390. DOI: 10.1002/anie.199003881.
- Stengelin, Martin; Patel, Ramesh N. (2000): Phenylalanine Dehydrogenase Catalyzed Reductive Amination of 6-(1',3'-Dioxolan-2'-YL)-2-Keto-Hexanoic Acid to 6-(1',3'-Dioxolan-2'-YL)-2S-Aminohexanoic Acid with NADH Regeneration and Enzyme and Cofactor Retention. In: *Biocatalysis and Biotransformation* 18 (5), S. 373–400. DOI: 10.3109/102424200009015258.
- Stewart, Jon D. (2001): Dehydrogenases and transaminases in asymmetric synthesis. In: *Current Opinion in Chemical Biology* 5 (2), S. 120–129. DOI: 10.1016/S1367-5931(00)00180-0.
- Straathof, Adrie J.J.; Panke, Sven; Schmid, Andreas (2002): The production of fine chemicals by biotransformations. In: *Current Opinion in Biotechnology* 13 (6), S. 548–556. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00360-9.

- Ströhle, Frank W.; Kranen, Eva; Schrader, Jens; Maas, Ruth; Holtmann, Dirk (2016): A simplified process design for P450 driven hydroxylation based on surface displayed enzymes. In: *Biotechnol. Bioeng.* 113 (6), S. 1225–1233. DOI: 10.1002/bit.25885.
- Taylor, K. E.; Jones, J. B. (1976): Nicotinamide coenzyme regeneration by dihydropyridine and pyridinium compounds. In: *J. Am. Chem. Soc.* 98 (18), S. 5689–5694. DOI: 10.1021/ja00434a047.
- Thanos, Iordanes C.G.; Simon, Helmut (1987): Electro-enzymic viologen-mediated stereospecific reduction of 2-enoates with free and immobilized enoate reductase on cellulose filters or modified carbon electrodes. In: *Journal of Biotechnology* 6 (1), S. 13–29. DOI: 10.1016/0168-1656(87)90042-3.
- Ullah, Nehar; Ali, Irshad; Omanovic, Sasha (2015): Direct electrocatalytic reduction of coenzyme NAD⁺ to enzymatically-active 1,4-NADH employing an iridium/ruthenium-oxide electrode. In: *Materials Chemistry and Physics* 149-150, S. 413–417. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2014.10.038.
- Wandrey, Christian (2004): Biochemical reaction engineering for redox reactions. In: *Chemical record (New York, N.Y.)* 4 (4), S. 254–265. DOI: 10.1002/tcr.20016.
- Wang, Guang-Li; Xu, Jing-Juan; Chen, Hong-Yuan (2009): Dopamine sensitized nanoporous TiO₂ film on electrodes: photoelectrochemical sensing of NADH under visible irradiation. In: *Biosensors & bioelectronics* 24 (8), S. 2494–2498. DOI: 10.1016/j.bios.2008.12.031.
- Wang, Lei; Liu, Bin; Liu, Yuxue; Sun, Yue; Liu, Wujun; Yu, Dayu; Zhao, Zongbao K. (2019): Escherichia coli Strain Designed for Characterizing in Vivo Functions of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Analogues. In: *Org. Lett.* 21 (9), S. 3218–3222. DOI: 10.1021/acs.orglett.9b00935.
- Wang, Xiaodong; Saba, Tony; Yiu, Humphrey H.P.; Howe, Russell F.; Anderson, James A.; Shi, Jiafu (2017): Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways. In: *Chem* 2 (5), S. 621–654. DOI: 10.1016/j.chempr.2017.04.009.
- Weckbecker, Andrea; Gröger, Harald; Hummel, Werner (2010): Regeneration of nicotinamide coenzymes: principles and applications for the synthesis of chiral compounds. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 120, S. 195–242. DOI: 10.1007/10_2009_55.

- Weimberg, R.; Doudoroff, Michael (1955): The Oxidation of L-Arabinose by *Pseudomonas Saccharihila*. In: *Journal of Biological Chemistry* 217 (2), S. 607–624. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)65926-5.
- Wichmann, R.; Vasic-Racki, D. (2005): Cofactor regeneration at the lab scale. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 92, S. 225–260. DOI: 10.1007/b98911.
- Wichmann, Rolf; Wandrey, Christian; Bckmann, Andreas F.; Kula, Maria-Regina (2000): Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. In: *Biotechnol. Bioeng.* 67 (6), S. 791–804. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000320)67:6<791::AID-BIT15>3.0.CO;2-I.
- Wienkamp, Rainer; Steckhan, Eberhard (1983): Selective Generation of NADH by Visible Light. In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (6), S. 497. DOI: 10.1002/anie.198304971.
- Wood, Paul M. (1981): The redox potential for dimethyl sulphoxide reduction to dimethyl sulphide. In: *FEBS Letters* 124 (1), S. 11–14. DOI: 10.1016/0014-5793(81)80042-7.
- Wu, Hong; Tian, Chunyong; Song, Xiaokai; Liu, Chuang; Yang, Dong; Jiang, Zhongyi (2013): Methods for the regeneration of nicotinamide coenzymes. In: *Green Chem.* 15 (7), S. 1773. DOI: 10.1039/c3gc37129h.
- Wu, J. T.; Wu, L. H.; Knight, J. A. (1986): Stability of NADPH: effect of various factors on the kinetics of degradation. In: *Clinical Chemistry* 32 (2), S. 314–319. DOI: 10.1093/clinchem/32.2.314.
- Xiang, Quanjun; Yu, Jiaguo; Jaroniec, Mietek (2012): Graphene-based semiconductor photocatalysts. In: *Chem. Soc. Rev.* 41 (2), S. 782–796. DOI: 10.1039/c1cs15172j.
- Xu, Haoxing; Blair, Nathaniel T.; Clapham, David E. (2005): Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. In: *Journal of Neuroscience* 25 (39), S. 8924–8937. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2574-05.2005.
- Yadav, Rajesh K.; Baeg, Jin-Ook; Oh, Gyu Hwan; Park, No-Joong; Kong, Ki-jeong; Kim, Jinheung et al. (2012): A photocatalyst-enzyme coupled artificial photosynthesis system for solar energy in production of formic acid from CO₂. In: *J. Am. Chem. Soc.* 134 (28), S. 11455–11461. DOI: 10.1021/ja3009902.
- Yang, Zhi; Guo, Peipei; Han, Rui; Wu, Shihua; Gao, Jin-Ming (2018): Gram-scale separation of borneol and camphor from *Cinnamomum camphora* (L.) Presl by continuous counter-current chromatography. In: *Sep Sci plus* 1 (2), S. 144–153. DOI: 10.1002/sscp.201700041.

Yoshimura, Tohru; Shimizu, Yusuke; Kurotani, Wataru; Yamaoka, Ryohei; Hayashiya, Keizo (1988): Application of Fibroin Membrane to Immobilizing Coenzymes. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 52 (12), S. 3201–3202. DOI: 10.1080/00021369.1988.10869211.

Yuryev, Ruslan; Strompen, Simon; Liese, Andreas (2011): Coupled chemo(enzymatic) reactions in continuous flow. In: *Beilstein journal of organic chemistry* 7, S. 1449–1467. DOI: 10.3762/bjoc.7.169.

Zhang, Bingqing; Xu, Shaochen; Da He; Chen, Rong; He, Yumin; Fa, Wenjun et al. (2020): Photoelectrochemical NADH regeneration is highly sensitive to the nature of electrode surface. In: *J. Chem. Phys.* 153 (6), S. 64703. DOI: 10.1063/5.0016459.

Zhang, Chenhao; Yang, Shize; Wu, Jingjie; Liu, Mingjie; Yazdi, Sadegh; Ren, Muqing et al. (2018): Electrochemical CO₂ Reduction with Atomic Iron-Dispersed on Nitrogen-Doped Graphene. In: *Adv. Energy Mater.* 8 (19), S. 1703487. DOI: 10.1002/aenm.201703487.

Zhang, Xiangjing; Zhao, Ying; Hu, Shuozen; Gliège, Marisa Elise; Liu, Yumin; Liu, Runjing et al. (2017): Electrochemical Reduction of Carbon Dioxide to Formic Acid in Ionic Liquid [Emim][N(CN)₂]/Water System. In: *Electrochimica Acta* 247, S. 281–287. DOI: 10.1016/j.electacta.2017.06.112.

7 Anhang

CbFDH_C23S/C262A

CATATGAAGATCGTTTTAGTCTTATATGATGCTGGTAAGCACGCTGCTGATGAAGAA
AAATTATATGGTTCTACTGAAAATAAATTAGGTATTGCTAATTGGTTAAAAGATCAAG
GTCATGAACTAATTACTACTTCTGATAAAGAAGGTGAAACAAGTGAATTGGATAAAC
ATATCCCAGATGCTGATATTATCATCACCCTCCTTTCCATCCTGCTTATATCACTAA
GGAAAGACTTGACAAGGCTAAGAACTTAAAATTAGTCGTTGTCGCTGGTGTGGTTC
TGATCACATTGATTTAGATTATATTAATCAAACAGGTAAGAAAATCTCAGTCTTGAA
GTTACAGGTTCTAATGTTGTCTCTGTTGCTGAACACGTTGTCATGACCATGCTTGTC
TTGGTTAGAAATTCGTTCCAGCACATGAACAAATTATTAACCACGATTGGGAGGTT
GCTGCTATCGCTAAGGATGCTTACGATATCGAAGGTAAAACCTATTGCTACCATTGGT
GCTGGTAGAATTGGTTACAGAGTCTTGAAAGATTACTCCCTTTTAAATCCAAAAGAA
TTATTATACTACGATTATCAAGCTTTACCAAAGAAGCTGAAGAAAAAGTTGGTGCTA
GAAGAGTTGAAAATATTGAAGAATTAGTTGCTCAAGCTGATATCGTTACAGTTAATG
CTCCATTACACGCAGGTACAAAAGGTTTAAATTAATAAGGAATTATTATCTAAATTTAA
AAAAGGTGCTTGGTTAGTCAATACCGCAAGAGGTGCTATTGCTGTTGCTGAAGATG
TTGCAGCAGCTTTAGAATCTGGTCAATTAAGAGGTTACGGTGGTGTGTTTGGTTCC
CACAACCAGCTCCAAGGATCACCCATGGAGAGATATGAGAAAATAAATATGGTGCT
GGTAATGCCATGACTCCTCACTACTCTGGTACTACTTTAGATGCTCAAACAAGATAC
GCTGAAGTACTAAAAATATCTTGAATCATTCTTTACTGGTAAATTTGATTACAGAC
CACAAGATATTATCTTATTAATGGTGAATACGTTACTAAAGCTTACGGTAAACACGA
TAAGAAACTCGAG

ReADH wt

CATATGAAAGCCATTCAGTATACCCGTATTGGTGCAGAACCGGAACCTGACCGAAATT
CCGAAACCGGAACCTGGTCCGGGTGAAGTTCTGCTGGAAGTTACCGCAGCCGGTG
TTTGT CATAGTGATGATTTTATCATGAGCCTGCCGGAAGAACAGTATACCTATGGTC
TGCCGCTGACACTGGGTGCAGGTGCAAGGTGCAAGTTGCAGCAGTTGGTGAAGG
TGTTGAAGGTCTGGATATTGGCACCAATGTTGTTGTTTATGGTCCGTGGGGTTGTG
GTAATTGTTGGCATTGTAGCCAGGGTTTAGAAAACCTATTGTAGCCGTGCACAAGAAC
TGGGTATTAATCCGCCTGGTCTGGGTGCACCGGGTGCCTGGCAGAATTCATGATT
GTTGATAGTCCGCGTCATCTGGTCCGATTGGTGTGCTGGACCCGGTTAAAACCGT
TCCGCTGACCGATGCAGGTCTGACCCCGTATCATGCAATTAACGTAGCCTGCCGA
AACTGCGTGGTGGTAGCTATGCAGTTGTTATTGGTACAGGTGGTCTGGGCCATGTT
GCAATTCAGCTGCTGCGCCATCTGAGCGCAGCAACCGTTATTGCACTGGATGTTAG
CGCAGATAAACTGGAACCTGGCAACCAAAGTTGGTGCACATGAAGTTGTTCTGAGCG
ATAAAGATGCAGCCGAAAATGTTTCGTAATAATTACCGGTAGTCAGGGTGCAGCACTG
GTTCTGGATTTTGGTGGTTATCAGCCGACCATTGATACCGCAATGGCAGTTGCCGG
TGTTGGTAGTGATGTTACCATTGTTGGTATTGGTGTGATGGTCAGGCACATGCAAAAGT
TGGTTTTTTTCAGAGCCCGTATGAAGCAAGCGTTACCGTTCCGTATTGGGGTGCAC
GTAATGAACTGATCGAACTGATTGATCTGGCACATGCCGGTATTTTTGATATTAGCG
TTGAAACCTTTAGCCTGGATAATGGTGCCGAAGCATATCGTCGTCTGGCAGCAGGC
AC C CTGAGCGGTCGTGCCGTTGTTGTTCCGGGTCTGCTCGAG

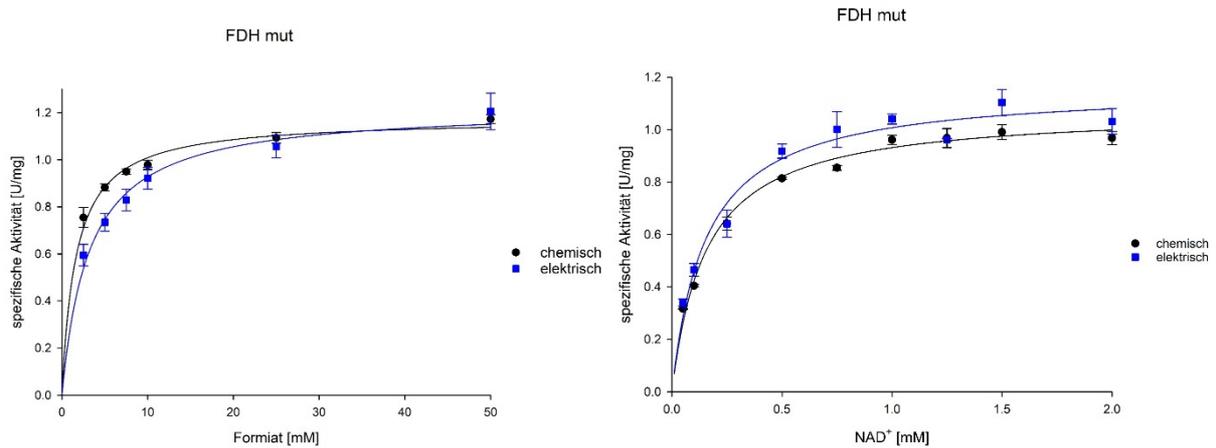


Abbildung 26, links: Aktivität der Formiatdehydrogenase C23S/C262A aus *Candida boidinii* (CbFDH_C23S/C262A) bei verschiedenen Formiat-Konzentrationen.

Das Formiat entstammt sowohl aus kommerzieller, chemischer Produktion als auch aus der elektrochemischen Reduktion von CO₂. Als Puffer wurde KP_i 500 mM pH 7,5 eingesetzt, zusammen mit 1 mM NAD⁺ als Cofaktor. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung nach drei voneinander unabhängigen Messungen an.

Abbildung 27, rechts: Aktivität der Formiatdehydrogenase C23S/C262A aus *Candida boidinii* (CbFDH_C23S/C262A) bei verschiedenen NAD⁺-Konzentrationen.

Das verwendete Formiat entstammt sowohl aus kommerzieller, chemischer Produktion als auch aus der elektrochemischen Reduktion von CO₂ und wurde jeweils mit einer Konzentration von 50 mM eingesetzt. Als Puffer diente KP_i 500 mM pH 7,5. Die Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung nach drei voneinander unabhängigen Messungen an.