

(12)

Patentschrift

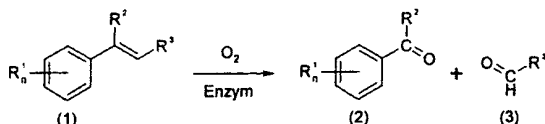
- (21) Anmeldenummer: A 1062/2007 (51) Int. Cl.⁸: **C12P 7/24** (2006.01)
 (22) Anmeldetag: 2007-07-10
 (43) Veröffentlicht am: 2009-03-15

(56) Entgegenhaltungen:
 BIOORGANIC & MEDICAL CHEMISTRY
 LETTERS, 12(8), 1139-1142
 EUROPEAN JOURNAL OF
 BIOCHEMISTRY, 265 (3), 1008-1014;
 1999
 US 5888787A

(73) Patentinhaber:
 UNIVERSITÄT GRAZ
 A-8010 GRAZ (AT)
 (72) Erfinder:
 KROUTIL WOLFGANG
 GRAZ (AT)
 LARA MIGUEL
 GRAZ (AT)

(54) ENZYMKATALYSIERTES VERFAHREN ZUR OXIDATIVEN SPALTUNG VON ETHYLENISCHEN DOPPELBINDUNGEN

- (57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur oxidativen Spaltung von Vinylaromaten der Formel (1) mit dem Kennzeichen, dass Verbindungen der Formel (1) in Gegenwart von molekularem Sauerstoff mit zumindest einem aus Peroxidasen und Laccasen ausgewählten Enzym als Katalysator gemäß nachstehendem Reaktionsschema zu Aldehyden bzw. Ketonen der Formeln (2) und (3) oxidiert wird bzw. werden:



worin n eine ganze Zahl von 0 bis 5 ist; die R¹, die gleich oder unterschiedlich sein können, ausgewählt sind aus gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffgruppen mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen, die gegebenenfalls durch ein oder mehrere Heteroatome, ausgewählt aus Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel, unterbrochen sind und gegebenenfalls mit einem oder mehreren Substituenten, ausgewählt aus C₁₋₆-Alkylgruppen, C₁₋₆-Alkylengruppen, C₁₋₆-Alkoxygruppen, Amino-, C₁₋₆-Alkylamino- und C₁₋₆-Dialkylaminogruppen, Halogenen, Hydroxy, Oxo und

Cyano weiter substituiert sind, Amino-, C₁₋₆-Alkylamino- und C₁₋₆-Dialkylaminogruppen, Halogenen, Hydroxy und Cyano, wobei zwei beliebige der Substituenten R¹ zu einem aliphatischen oder aromatischen Ring verbunden sein können; R² und R³ jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff oder eine der Optionen für R¹ sind, wobei R² und/oder R³ jeweils mit einem R¹ zu einem aliphatischen Ring verbunden sein können, in welchem Fall R² bzw. R³ jeweils für eine chemische Bindung zwischen dem Kohlenstoffatom der Vinylgruppe, an das sie gebunden sind, und dem Substituenten R¹ stehen können.

Die Erfindung betrifft Verfahren zur oxidativen Spaltung von mit aromatischen Ringen konjugierten ethylenischen Doppelbindungen unter Verwendung von Enzymkatalysatoren.

Milde und selektive Oxidationsmethoden sowie neue ökologische und ökonomische chemische Verfahren sind aufgrund der wirtschaftlichen Gegebenheiten und des höheren Umweltbewusstseins gefragt wie nie zuvor. Die oxidative Spaltung von Alkenen zu den entsprechenden Aldehyden bzw. Ketonen ist eine häufig verwendete Synthesemethode in der organischen Chemie, (i) um Sauerstoff-Funktionalitäten in Moleküle einzuführen, (ii) um komplexe Moleküle in kleinere Bausteine zu teilen und (iii) um Schutzgruppen zu entfernen. Unter den derzeit verfügbaren Methoden für die chemische oxidative Spaltung von Alkenen wird die reduktive Ozonolyse als die "sauberste" angesehen. Jedoch birgt diese Methode in der Praxis einige Nachteile, wie z.B. die Notwendigkeit der Verwendung spezieller Ausrüstung (Ozonisator), Tieftemperaturtechnik (normalerweise -78 °C) und der zusätzliche Bedarf stöchiometrischer Mengen an Reduktionsmitteln (z.B. Dimethylsulfid, Zink, Wasserstoff, Phosphinen usw.) für die reduktive Aufarbeitung. Zusätzlich sind spezielle Sicherheitsvorkehrungen zu treffen, um schweren Unfällen, etwa durch Explosionen, vorzubeugen.

Für andere Methoden unter Verwendung von Metalloxiden als Oxidationsmittel werden (zumindest) stöchiometrische Mengen an Salz oder Peroxiden benötigt. Diese Varianten zeigen jedoch mäßige bis niedrige Chemo-, Regio- und Stereoselektivität. In vielen Fällen ist die Überoxidation der intermediär erhaltenen Aldehyde zu den entsprechenden Säuren eine nur schwer zu unterbindende Nebenreaktion. So wird etwa die Verwendung von OsO_4 und NaIO_4 ^[1], von OsO_4 und Oxon[®] ($2 \text{ KHSO}_5 + \text{KHSO}_4 + \text{K}_2\text{SO}_4$) ^[2], von RuCl_3 in Kombination mit NaIO_4 oder Oxon[®] ^[3], und von Ruthenium-Nanopartikeln mit NaIO_4 ^[4] beschrieben.

Somit wäre ein Oxidationsverfahren für Alkene wünschenswert, mit dem die obigen Nachteile vermieden werden und in dem vor allem ein nichttoxisches, leicht verfügbares Oxidationsmittel, wie z.B. Sauerstoff, zum Einsatz kommen kann.

Die einzige bekannte chemisch-katalytische Methode, die als Oxidationsmittel molekularen Sauerstoff nutzt, erfordert jedoch wiederum eine Co(II) -Verbindung als Katalysator, ist nur mäßig selektiv und darüber hinaus auf Isoeugenol-Derivate limitiert ^[5].

Eine mögliche Alternative schien in der Biokatalyse zu liegen. Allerdings werden enzymatische Alkenspaltungen lediglich unter Verwendung eines Gemischs aus Lipoxygenasen und Hydroperoxid-Lyasen für wenige, sehr spezifische Substrate beschrieben ^[6].

Weiters werden selbige als unerwünschte Nebenreaktionen, d.h. mit Oxidationsprodukten in analytischen Mengen, für Peroxidase-katalysierte Prozesse beschrieben ^{[7]-[13]}. Bei allen diesen Reaktionen wird freilich kein molekularer Sauerstoff als Oxidationsmittel eingesetzt.

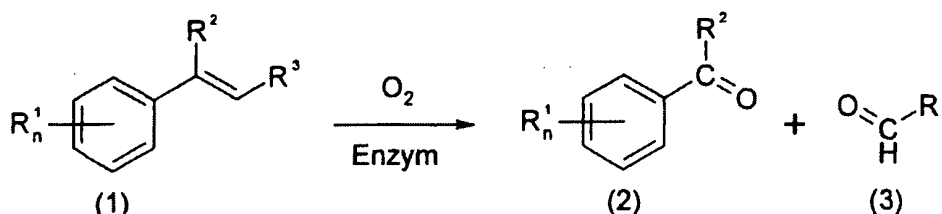
Enzymatische Alkenspaltung mit Sauerstoff unter Enzymkatalyse wurde zwar ebenfalls bereits versucht, allerdings lediglich mit bestimmten Mono- und Dioxygenasen als Enzyme und mit Ausbeuten in analytischen Mengen ^{[14]-[17]}. Dazu kommt, dass Oxygenasen sehr hohe Substratspezifität aufweisen ^{[18]-[29]}, so dass nur eine äußerst eingeschränkte Auswahl an Substraten infrage kommt.

Die Erfinder des vorliegenden Anmeldungsgegenstandes und ihre Mitarbeiter hatten vor diesem Hintergrund bereits in früheren Forschungen herausgefunden, dass bestimmte Arylalkene unter Nutzung von molekularem Sauerstoff als Oxidationsmittel zu den entsprechenden Aldehyden bzw. Ketonen oxidiert werden können, indem Zellen oder Zellextrakte eines bestimmten Pilzes, nämlich von *Trametes hirsuta* (striegelige Tramete), zugesetzt werden, welche die Oxidation katalysieren ^{[30],[31]}. Es handelte sich dabei somit um eine biokatalysierte Reaktion, wahrscheinlich mittels enzymatischer Katalyse, es konnte jedoch nicht geklärt werden, welche(s) Enzym(e) dafür verantwortlich waren.

In Weiterführung dieser Forschungen wurde von den Erfindern nunmehr überraschenderweise herausgefunden, dass bestimmte Peroxidasen und Laccasen, und zwar keineswegs nur solche fungalen Ursprungs, unter spezifischen Bedingungen in der Lage sind, die oxidative Spaltung spezieller ethylenischer Doppelbindungen durch Sauerstoff zu Aldehyden und Ketonen zu katalysieren. Dieses Ergebnis war deshalb überraschend, weil Sauerstoff normalerweise kein (oder, im Fall von Laccasen, zumindest kein bevorzugtes) Substrat für derartige Enzyme darstellt und andererseits die erhaltenen Oxidationsprodukte jene sind, die üblicherweise bei Ozonolyse-Reaktionen entstehen. Beispielsweise können Peroxidasen eigentlich - wie der Name angibt - nur Peroxid-Bindungen verarbeiten, und Halogenperoxidasen ergeben darüber hinaus nur halogenierte, z.B. chlorierte oder bromierte Oxidationsprodukte.

OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

Die vorliegende Erfindung liegt in der Bereitstellung eines Verfahrens zur oxidativen Spaltung von gegebenenfalls substituierten Vinylaromaten der nachstehenden Formel (1), welches dadurch gekennzeichnet ist, dass eine oder mehrere Verbindungen der Formel (1) in Gegenwart von molekularem Sauerstoff mit zumindest einem aus Peroxidasen und Laccasen ausgewählten Enzym als Katalysator gemäß nachstehendem allgemeinem Reaktionsschema zu Aldehyden bzw. Ketonen der Formeln (2) und (3) oxidiert wird bzw. werden:



worin n eine ganze Zahl von 0 bis 5 ist, so dass der aromatische Ring in ortho-, meta- und/oder para-Stellung zur Vinylgruppe mit 0 bis 5 Substituenten R^1 substituiert sein kann, die gleich oder unterschiedlich sein können und ausgewählt sind aus:

a) gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffgruppen mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen, die gegebenenfalls durch ein oder mehrere Heteroatome, ausgewählt aus Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel, unterbrochen sind und gegebenenfalls mit einem oder mehreren Substituenten, ausgewählt aus C_{1-6} -Alkylgruppen, C_{1-6} -Alkylengruppen, C_{1-6} -Alkoxygruppen, Amino-, C_{1-6} -Alkylamino- und C_{1-6} -Dialkylaminogruppen, Halogenen, Hydroxy, Oxo und Cyano weiter substituiert sind,

b) Amino-, C_{1-6} -Alkylamino- und C_{1-6} -Dialkylaminogruppen,

c) Halogenen, Hydroxy und Cyano,

wobei zwei beliebige der Substituenten R^1 zu einem alicyclischen oder aromatischen Ring verbunden sein können, und

worin die Substituenten R^2 und R^3 jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff oder eine der unter a), b) und c) beschriebenen Optionen sind,

wobei R^2 und/oder R^3 jeweils mit einem Substituenten R^1 zu einem alicyclischen Ring verbunden sein können, wobei in diesem Fall R^2 bzw. R^3 jeweils für eine chemische Bindung zwischen dem Kohlenstoffatom der Vinylgruppe, an das sie gebunden sind, und dem Substituenten R^1 stehen können.

Auf diese Weise wird ein Oxidationsverfahren für die oben genannten Verbindungen bereitgestellt, mit dem das zuvor definierte Ziel erreicht werden kann. Das heißt, Arylalkene können unter Verwendung von Sauerstoff, eines allgegenwärtigen, harmlosen Oxidationsmittels, und von speziellen natürlichen Enzymen, die auf biologischem oder biotechnologischem Wege leicht und kostengünstig erhältlich sind, zu den gewünschten Aldehyden und Ketonen oxidiert werden. Es sind somit weder teure bzw. toxische (Schwermetalle) Katalysatoren noch komplizierte und ebenfalls kostspielige Ausrüstung (Ozonisator, Tieftemperaturkühlsysteme) erforder-

lich, und es fallen keine aufwändig zu entsorgenden Abfallprodukte an.

In bevorzugten Ausführungsformen wird das zumindest eine Enzym aus fungalen Peroxidasen und Laccasen, Halogenperoxidasen, Lignin-Peroxidasen, Meerrettich-Peroxidase und Rindermilch-Peroxidase, noch bevorzugter aus fungalen Peroxidasen von *Coprinus cinereus* (struppiger Tintling), aus Laccasen von *Coriolus versicolor* (Schmetterlingstramete), *Agaricus bisporus* (Zuchtchampignon) und *Candida rugosa* (einer Hefeart), Laccase von *Rhus vernicifera* (japanischer Lackbaum), Chlorperoxidase von *Caldariomyces fumago* (einem Fadenpilz) und Bromperoxidasen, z.B. von *Streptomyces aureofaciens* (einem Bakterium) oder *Corallina officinalis* (Korallenmoos), insbesondere aus Meerrettich-Peroxidase, aus Peroxidasen von *Coprinus cinereus* sowie aus Laccasen von *Coriolus versicolor* und *Agaricus bisporus*, ausgewählt. Allgemein können als bevorzugte Peroxidasen jene aus der EC-Klasse 1.11.1.x angegeben werden. Mit den obigen Enzymen sind - unter jeweils optimierten Bedingungen, wie nachstehend erläutert wird - sehr gute Ergebnisse erzielbar.

Das Verfahren wird bevorzugt in einem geeigneten Puffer durchgeführt, um die Reaktionsbedingungen, insbesondere den pH, während der Oxidation stabil halten zu können. Vorzugsweise erfolgt die Reaktion in Bis-Tris-Puffer, Acetatpuffer, Formiatpuffer oder Phosphatpuffer. Der pH-Wert des Reaktionsgemischs wird vorzugsweise auf 2 bis 7, noch bevorzugter auf 2 bis 4, eingestellt, da in diesen Bereichen die jeweiligen Enzyme ihr Aktivitätsmaximum aufweisen.

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen wird das erfindungsgemäße Verfahren unter O₂-Überdruck durchgeführt, um so die Ausbeuten zu erhöhen. Es wird dabei jedoch nicht einfach das Reaktionsgleichgewicht verschoben, was daran zu erkennen ist, dass manche Enzyme nach Erreichen eines Aktivitätsmaximums bei höheren Drücken wiederum geringere Ausbeuten ergeben. Vorzugsweise wird die Oxidation unter einem O₂-Überdruck von 1 bis 6 bar, vorzugsweise 2 bis 3 bar, durchgeführt. Noch höhere Werte ergeben keine oder kaum zusätzliche Verbesserungen, oftmals sogar niedrigere Umsätze, und würden den apparativen Aufwand deutlich erhöhen. In den obigen Druckbereichen ist beispielsweise eine herkömmliche Parr-Apparatur problemlos einsetzbar.

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen wird das Verfahren unter Lichteinwirkung, d.h. unter Bestrahlung durchgeführt, da so die Ausbeuten, speziell bei Verwendung von Laccasen als Enzyme, um ein Vielfaches gesteigert werden können.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung somit die Verwendung von fungalen Peroxidasen und Laccasen, fungalen Halogenperoxidasen, bakteriellen Halogenperoxidasen, Lignin-Peroxidasen, Meerrettich-Peroxidase oder Rindermilch-Peroxidase zur Katalyse der oxidativen Spaltung von mit dem aromatischen Ring konjugierten ethylenischen Doppelbindungen gegebenenfalls substituierter Vinylaromaten mit molekularem Sauerstoff, wobei dieselben Enzyme bevorzugt werden, wie zuvor für das Verfahren des ersten Aspekts der Erfindung beschrieben wurde.

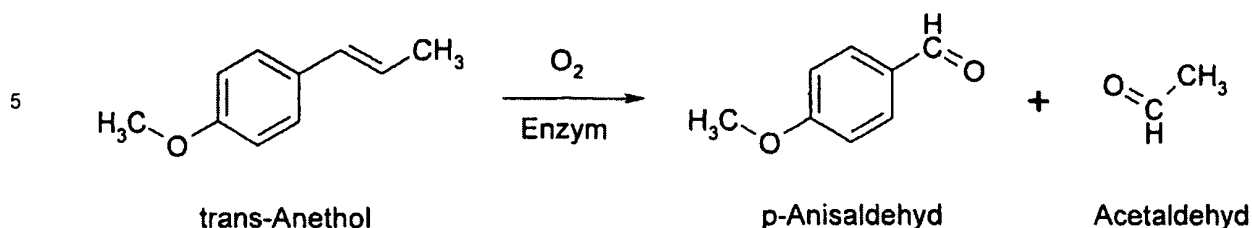
Die Erfindung wird nun anhand von spezifischen Beispielen beschrieben, die lediglich zur Illustration dienen und nicht als Einschränkung aufzufassen sind.

BEISPIELE

Nachdem in Vorversuchen die Reaktivität unterschiedlicher Enzyme als Katalysatoren der Oxidation von Arylalkenen mit molekularem Sauerstoff festgestellt worden war, wurde zunächst das pH-Optimum der einzelnen Enzyme für derartige Reaktionen in einer Modellreaktion mit trans-Anethol als Vinylaromat der Formel (1) ermittelt. Zur Einstellung von pH-Werten von 2 bis 7 wurden bekannte Puffersysteme eingesetzt.

Beispiele 1 bis 16

Oxidation von trans-Anethol bei unterschiedlichem pH



10

Die jeweiligen Enzyme (je 3 mg der durchwegs festen Präparate) wurden in die Wells von "Riplate LV" 5 ml Deep Well Plate (HJ-Bioanalytik GmbH) gefüllt. Danach wurden 900 µl des jeweiligen Puffers und 6 µl (0,04 mmol) trans-Anethol zugesetzt. Die Platten wurden anschließend in aufrechter Position in einen O₂-Druckreaktor gestellt. Der Reaktor wurde mit reinem molekularem Sauerstoff gespült, und der Druck wurde auf 2 bar Sauerstoff eingestellt. Nach 24 h bei 170 U/min und 25 °C wurden die Reaktionsgemische in 2-ml-Eprouvetten übergeführt, und die Wells wurden mit EtOAc (600 µl) nachgewaschen. Diese 600 µl wurden zu den jeweiligen Eprouvetten zugesetzt, um damit auch eine erste Extraktion der wässrigen Reaktionsgemische durchzuführen. Nach einer zweiten Extraktion mit reinem EtOAc (600 µl) wurden die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und mittels GC bezüglich des Umsatzes zu p-Anisaldehyd (4-Methoxybenzaldehyd) analysiert.

15

20

Die Puffer zur Einstellung des pH-Werts waren folgende:

25

pH 2 - Trimethylammoniumformiat/Ameisensäure, 20 mM

pH 3 - Trimethylammoniumformiat/Ameisensäure, 20 mM

pH 4 - Natriumacetat/Essigsäure, 50 mM

pH 5 - Natriumacetat/Essigsäure, 50 mM

pH 6 - Bis-Tris-Puffer, 50 mM

30

pH 7 - Bis-Tris-Puffer, 50 mM

Die in den jeweiligen Beispielen eingesetzten Enzyme und die bei unterschiedlichen pH-Werten erzielten Umsätze von trans-Anethol zu p-Anisaldehyd sind in der nachstehenden Tabelle 1 angegeben.

35

Tabelle 1

40

45

50

55

Bei- spiel	Enzym	Umsatz zu p-Anisaldehyd (%)					
		pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
1	Peroxidase von <i>Coprinus cinereus</i> , Charge 1	62	68	73	6	3	6
2	Peroxidase von <i>Coprinus cinereus</i> , Charge 2	7	7	73	5	4	7
3	Meerrettich-Peroxidase, Charge 1	63	88	65	8	8	14
4	Meerrettich-Peroxidase, Charge 2	76	57	64	10	13	6
5	Meerrettich-Peroxidase, Charge 3	88	55	53	3	4	5
6	Meerrettich-Peroxidase, Charge 4	95	93	73	7	8	5
7	Meerrettich-Peroxidase, Charge 5	83	64	79	6	7	11
8	Meerrettich-Peroxidase, Charge 6	86	82	30	16	11	11
9	Lignin-Peroxidase	10	4	67	25	9	4
10	Rindermilch-Peroxidase	n.b.	3	4	4	2	n.b.
11	Chlorperoxidase von <i>Caldariomyces fumago</i>	n.b.	3	4	3	2	n.b.
12	Bromperoxidase von <i>Corallina officinalis</i>	3	4	5	3	3	3

Bei- spiel	Enzym	Umsatz zu p-Anisaldehyd (%)					
		pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
13	Laccase von <i>Rhus vernicifera</i>	n.b.	n.b.	2	3	2	n.b.
14	Laccase von <i>Coriolus versicolor</i>	n.b.	n.b.	2	4	3	n.b.
15	Laccase von <i>Candida Rugosa</i>	n.b.	n.b.	3	3	2	n.b.
16	Laccase von <i>Agaricus bisporus</i>	8	6	4	10	10	6

n.b.: nicht bestimmt

Aus dieser Tabelle geht bereits eindeutig die überraschende katalytische Wirkung der getesteten Peroxidasen, Halogenperoxidasen und Laccasen in der obigen Oxidationsreaktion hervor. Peroxidasen sind im Vergleich zu Halogenperoxidasen und Laccasen zwar klar reaktiver, jedoch reichen auch die Umsätze mancher anderer Enzyme, insbesondere von *Agaricus bisporus*-Laccase, durchaus für eine präparative Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens aus, ohne eine der später beschriebenen Optimierungen vornehmen zu müssen.

Als nächstes wurde der Einfluss des Sauerstoffdrucks auf die Wirksamkeit der Enzyme als Biokatalysatoren getestet.

Beispiele 17 bis 31

Oxidation von trans-Anethol bei unterschiedlichem Sauerstoffdruck

Die Reaktion und GC-Messung erfolgte im Wesentlichen wie in den Beispielen 1 bis 16, nur dass der Druck für jedes getestete Enzym zwischen 2 und 6 bar variiert wurde. Aufgrund des zu hohen apparativen Aufwands wurden keine höheren Drücke untersucht. Die Ergebnisse der Tests sind in nachstehender Tabelle 2 angeführt.

Tabelle 2

Bei- spiel	Enzym	Umsatz zu p-Anisaldehyd (%)				
		1 bar	2 bar	3 bar	4 bar	6 bar
17	Peroxidase von <i>Coprinus cinereus</i> , Charge 1	69	63	75	68	76
18	Peroxidase von <i>Coprinus cinereus</i> , Charge 2	33	61	48	34	45
19	Peroxidase von <i>Coprinus cinereus</i> , Charge 3 *)	12	8	47	53	15
20	Meerrettich-Peroxidase, Charge 1	65	70	76	68	57
21	Meerrettich-Peroxidase, Charge 2	63	63	76	70	75
22	Meerrettich-Peroxidase, Charge 3	4	23	22	4	17
23	Meerrettich-Peroxidase, Charge 4	65	83	73	47	75
24	Meerrettich-Peroxidase, Charge 5	5	47	14	3	4
25	Meerrettich-Peroxidase, Charge 6	61	68	77	68	69
26	Lignin-Peroxidase	6	67	23	4	4
27	Laccase von <i>Rhus vernicifera</i>	3	3	9	3	3
28	Laccase von <i>Agaricus bisporus</i>	3	3	12	3	4
29	Laccase von <i>Coriolus versicolor</i>	4	8	5	3	8
30	Laccase von <i>Candida Rugosa</i>	7	3	7	6	9
31	Laccase DeniLite II Base	3	3	5	3	3

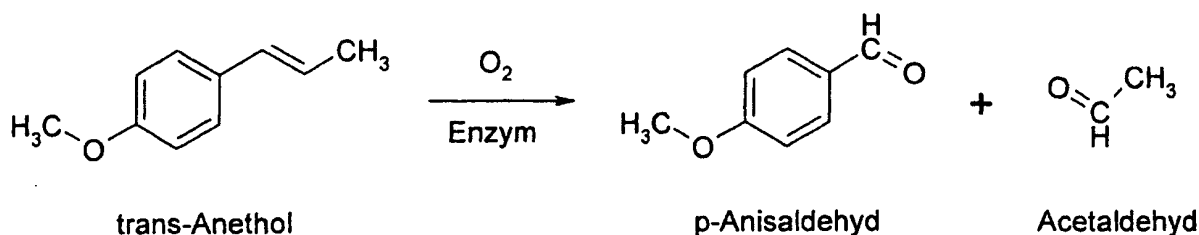
*) Flüssiges Präparat, von dem 20 µl (anstelle von 3 mg) eingesetzt wurden.

Auffällig ist, dass keine generelle Präferenz für höhere oder niedrigere Drücke feststellbar ist. Die Erwartung, höhere Sauerstoffdrücke würden das Reaktionsgleichgewicht zur Produktseite verschieben, hat sich somit nicht erfüllt. Vielmehr scheint jedes Enzym nicht nur einen optimalen pH-, sondern auch einen optimalen Druckbereich aufzuweisen.

In weiteren Versuchen wurden die verschiedenen Enzyme mit unterschiedlichen Substraten, d.h. Arylalkenen der Formel (1), unter ansonsten im Wesentlichen gleichen Bedingungen getestet, um Substratspezifitäten ableiten zu können. Die Ausnahme war lediglich die Durchführung der Reaktionen beim zuvor festgestellten pH-Optimum des jeweiligen Enzyms

Beispiele 32 bis 36

Enzymvergleich anhand der Oxidation von trans-Anethol



Die Reaktionen, Aufarbeitungen und GC-Messungen erfolgten wie für die Beispiele 1 bis 16 beschrieben (2 bar Sauerstoff) und mit dem jeweils dem pH-Optimum entsprechenden Puffer. Die eingesetzten Enzyme, Puffer, pH-Werte und die Umsätze von trans-Anethol zu p-Anisaldehyd sind in der nachstehenden Tabelle 3 angegeben.

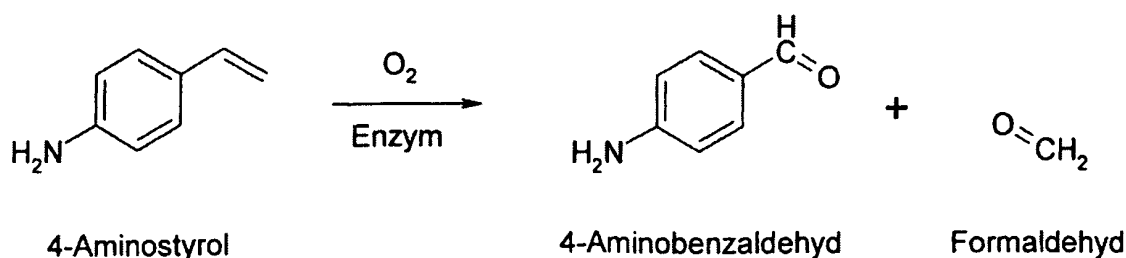
Tabelle 3

Bei- spiel	Enzym	Puffer	PH	Umsatz zu Anisaldehyd (%)
32	Peroxidase von <i>Coprinus cinereus</i> , Charge 1	Me ₃ N/HCOOH	2	61
33	Meerrettich-Peroxidase, Charge 1	Me ₃ N/HCOOH	2	83
34	Lignin-Peroxidase	AcONa/AcOH	4	67
35	Laccase von <i>Agaricus bisporus</i>	AcONa/AcOH	5	10
36	Laccase von <i>Coriolus versicolor</i>	AcONa/AcOH	5	8

Es zeigte sich erneut klar, dass trans-Anethol mittels Enzymkatalyse in mitunter sehr guter Ausbeute zu p-Anisaldehyd oxidiert werden kann und dass Peroxidasen Laccasen klar überlegen sind, obwohl auch Letztere durchaus für präparative Zwecke eingesetzt werden können.

Beispiele 37 bis 40

Enzymvergleich anhand der Oxidation von 4-Aminostyrol



Analog zu den Beispielen 32 bis 36 wurde anstelle von trans-Anethol 4-Aminostyrol mit verschiedenen Enzymen und in unterschiedlichen Puffern zu 4-Aminobenzaldehyd oxidiert. Zusätzlich wurde bei der Aufarbeitung der pH der wässrigen Phase auf 10 eingestellt, um eine Salzbildung der Aminogruppen zu verhindern. Die Ergebnisse der Versuche sowie der GC-Messungen sind in Tabelle 4 angeführt.

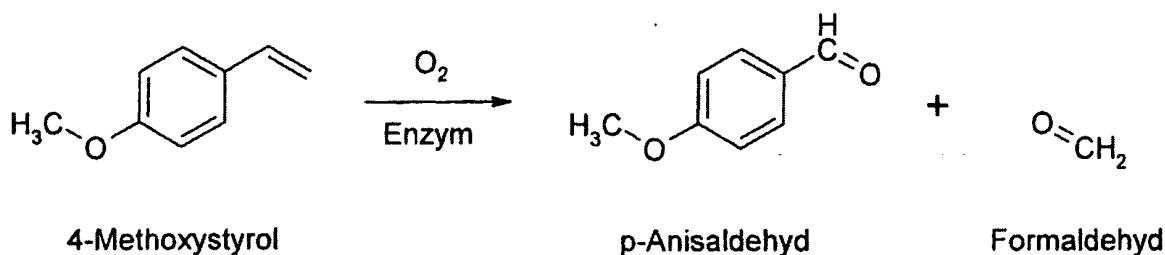
Tabelle 4

Bei- spiel	Enzym	Puffer	PH	Umsatz zu Amino- benzaldehyd (%)
37	Meerrettich-Peroxidase, Charge 1	Me ₃ N/HCOOH	2	3
38	Lignin-Peroxidase	AcONa/AcOH	4	2
39	Laccase von <i>Agaricus bisporus</i>	AcONa/AcOH	5	3
40	Laccase von <i>Coriolus versicolor</i>	AcONa/AcOH	5	19

Es zeigt sich, dass unter den Versuchsbedingungen von den vier getesteten Enzymen nur Laccase von *Coriolus versicolor* die Oxidation von 4-Aminostyrol mit gutem Umsatz katalysieren konnte. Dieser Umstand, sowie die Tatsache, dass dieses Enzym hier mehr als das Doppelte seiner Leistungsfähigkeit im Falle von trans-Anethol entwickelte, belegen eindeutig eine Substratspezifität der Enzyme.

Beispiel 41

Oxidation von 4-Methoxystyrol



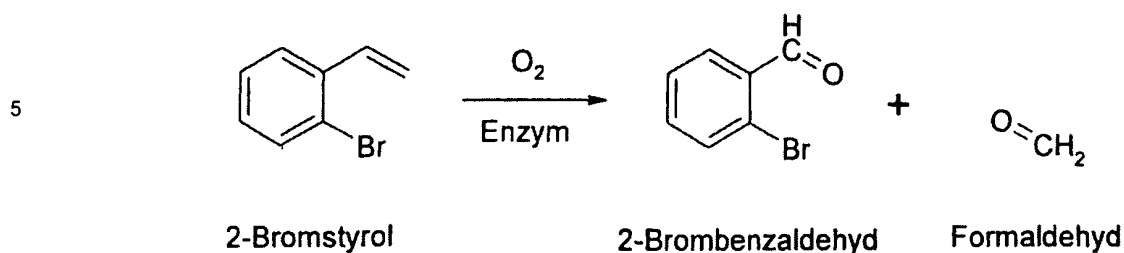
Analog zu Beispiel 32 wurde anstelle von trans-Anethol 4-Methoxystyrol mit der Peroxidase von *Coprinus cinereus*, Charge 1 zu p-Anisaldehyd oxidiert. Die Ergebnisse der beiden Versuche sind in Tabelle 5 angeführt.

Tabelle 5

Bei- spiel	Enzym	Puffer	pH	Umsatz zu Anisaldehyd (%)
32	Peroxidase von <i>Coprinus cinereus</i> , Charge 1	Me ₃ N/HCOOH	2	61
41	Peroxidase von <i>Coprinus cinereus</i> , Charge 1	Me ₃ N/HCOOH	2	3

Dieses Beispiel belegt erneut die Substratspezifität der Enzyme. Die getestete Peroxidase kann offensichtlich die Oxidation der beidseitig substituierten Doppelbindung von trans-Anethol sehr gut katalysieren, die einseitig unsubstituierte von Methoxystyrol jedoch kaum. Die Substituenten an der Vinylgruppe üben somit einen wesentlichen Einfluss auf die Katalysereaktion aus.

Beispiele 42 und 43

Oxidation von 2-Bromstyrol

15

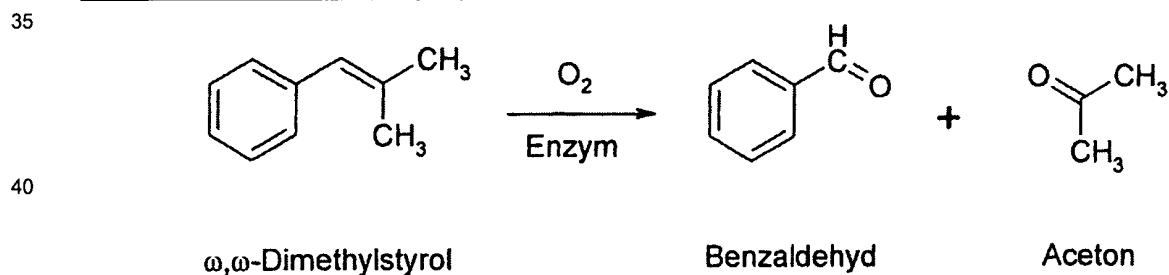
Analog zu den Beispielen 32 und 33 wurde anstelle von trans-Anethol 2-Bromstyrol mit der Peroxidase von *Coprinus cinereus*, Charge 1 und der Meerrettich-Peroxidase, Charge 1, oxidiert, in diesem Fall zu 2-Brombenzaldehyd. Die Ergebnisse der vier Versuche sind in Tabelle 6 angeführt.

Tabelle 6

Bei- spiel	Enzym	Puffer	pH	Umsatz zu Produkt (%)
				p-Anisaldehyd
32	Peroxidase von <i>Coprinus cinereus</i> , Charge 1	Me ₃ N/HCOOH	2	61
33	Meerrettich-Peroxidase, Charge 1	Me ₃ N/HCOOH	2	83
				2-Brombenzaldehyd
42	Peroxidase von <i>Coprinus cinereus</i> , Charge 1	Me ₃ N/HCOOH	2	4
43	Meerrettich-Peroxidase, Charge 1	Me ₃ N/HCOOH	2	3

30

Dieses Ergebnis belegt erneut, dass auch die Substituenten am Aromaten einen wesentlichen Einfluss auf die Katalysereaktion ausüben.

Beispiel 44Oxidation von ω,ω-Dimethylstyrol (2-Methyl-1-phenyl-1-propen)

45

Analog zu Beispiel 33 wurde anstelle von trans-Anethol ω,ω-Dimethylstyrol mit Meerrettich-Peroxidase, Charge 1 oxidiert, in diesem Fall zu Benzaldehyd. Die Ergebnisse der beiden Versuche sowie jener von Beispiel 43 sind zu Vergleichszwecken in Tabelle 7 angeführt.

Tabelle 7

50

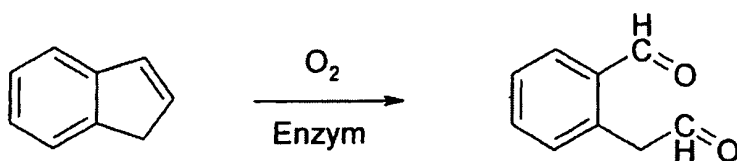
Bei- spiel	Enzym	Puffer	pH	Umsatz zu Produkt (%)
				p-Anisaldehyd
33	Meerrettich-Peroxidase, Charge 1	Me ₃ N/HCOOH	2	83
55				2-Brombenzaldehyd

Bei- spiel	Enzym	Puffer	pH	Umsatz zu Produkt (%)
43	Meerrettich-Peroxidase, Charge 1	Me ₃ N/HCOOH	2	3
				Benzaldehyd
44	Meerrettich-Peroxidase, Charge 1	Me ₃ N/HCOOH	2	5

Wiederum wird die Substratspezifität belegt. Die Gegenwart zweier Methylgruppen am ω-Kohlenstoff von Styrol anstatt nur einer und das Fehlen von Substitution am Aromaten wirken sich spürbar auf die Katalyse aus.

Beispiele 45 bis 47

Oxidation von Inden



Inden

2-(Formylmethyl)benzaldehyd

Analog zu den Beispielen 32, 33 und 36 wurde anstelle von trans-Anethol Inden mit der Peroxidase von *Coprinus cinereus*, Charge 1, Meerrettich-Peroxidase, Charge 1, und der Laccase von *Coriolus versicolor* oxidiert, in diesem Fall zu 2-(Formylmethyl)-benzaldehyd. Die Ergebnisse der sechs Versuche sind in Tabelle 8 angeführt.

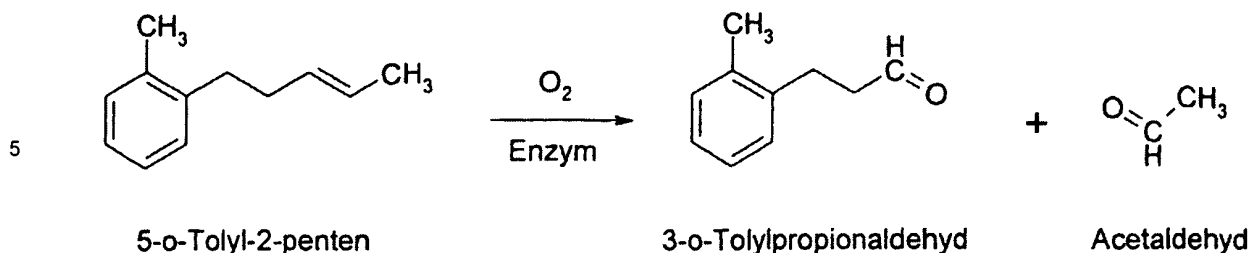
Tabelle 8

Bei- spiel	Enzym	Puffer	pH	Umsatz zu Produkt (%)
				p-Anisaldehyd
32	Peroxidase von <i>Coprinus cinereus</i> , Charge 1	Me ₃ N/HCOOH	2	61
33	Meerrettich-Peroxidase, Charge 1	Me ₃ N/HCOOH	2	83
36	Laccase von <i>Coriolus versicolor</i>	AcONa/AcOH	5	8
				2-(Formylmethyl)- benzaldehyd
45	Peroxidase von <i>Coprinus cinereus</i> , Charge 1	Me ₃ N/HCOOH	2	4
46	Meerrettich-Peroxidase, Charge 1	Me ₃ N/HCOOH	2	12
47	Laccase von <i>Coriolus versicolor</i>	AcONa/AcOH	5	8

Während die beiden Peroxidasen deutlich geringere katalytische Aktivität mit Inden als Substrat zeigen, gibt es bei der (weniger aktiven) die Laccase kaum Unterschiede zu trans-Anethol zu beobachten. Jedenfalls wird jedoch belegt, dass auch in zyklischen Strukturen enthaltene ethylenische Doppelbindungen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren oxidierbar sind.

Vergleichsbeispiele 1 und 2

Oxidation der nichtkonjugierten Doppelbindung von 5-o-Tolyl-2-penten



10 Analog zu den Beispielen 32 und 33 wurde anstelle von trans-Anethol 5-o-Tolyl-2-penten mit der Peroxidase von *Coprinus cinereus*, Charge 1 und Meerrettich-Peroxidase, Charge 1 oxidiert, in diesem Fall zu 3-o-Tolylpropionaldehyd. Die Ergebnisse der beiden Versuche sind in Tabelle 9 angeführt.

15 Tabelle 9

Vergl.-bsp.	Enzym	Puffer	pH	Umsatz zu 3-o-Tolylpropionaldehyd (%)
1	Peroxidase von <i>Coprinus cinereus</i> , Charge 1	Me ₃ N/HCOOH	2	<1
2	Meerrettich-Peroxidase, Charge 1	Me ₃ N/HCOOH	2	<1

25 Diese Ergebnisse zeigen, dass Arylalkene mit nichtkonjugierten Doppelbindungen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht oxidierbar sind. Die Oxidationsprodukte sind lediglich in analytischen Mengen ($\leq 1\%$) zu detektieren.

Beispiele 48 bis 51

Oxidation von trans-Anethol unter unterschiedlichen Lichtverhältnissen

30 Die Reaktionen und GC-Messungen erfolgten für jedes getestete Enzym in doppelter Ausführung im Wesentlichen wie in den Beispielen 32 bis 36 in den dort angegebenen Puffern für das jeweilige Enzym. Allerdings wurde nun in einer ersten Versuchsreihe eine Lampe (PAR 38 EC Spot, Osram Concentra, 120 W, 230 V, 448) in einem Abstand von 50 cm oberhalb des Reaktors angeordnet, um die Reaktionsgemische während der Oxidation zu beleuchten, während in einer zweiten Versuchsreihe der Reaktor zur Verdunkelung mit einer Aluminiumfolie abgedeckt wurde, die perforiert war, um Sauerstoffaustausch mit der Umgebung zu ermöglichen. Die Ergebnisse der vier besten aller getesteten Enzyme sind in nachstehender Tabelle 10 angeführt.

40 Tabelle 10

Bei-spiel	Enzym	Umsatz zu Anisaldehyd (%)	
		beleuchtet	dunkel
48	Peroxidase von <i>Coprinus cinereus</i> , Charge 1	85	43
49	Meerrettich-Peroxidase, Charge 1	86	55
50	Laccase von <i>Agaricus bisporus</i>	32	4
51	Laccase von <i>Coriolus versicolor</i>	64	7

55 Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Steigerung der katalytischen Aktivität aller vier Enzyme unter Lichteinstrahlung. Dieser Effekt ist bei den beiden Laccasen besonders stark ausgeprägt, da deren Wirksamkeit auf das Acht- bis Neunfache erhöht wurde. So können auch mit den tendenziell weniger aktiven Laccasen sehr gute Umsätze für präparative Zwecke erzielt werden.

Somit wurde die Wirksamkeit der Enzyme im erfindungsgemäßen Verfahren eindeutig belegt. Der einschlägige Fachmann kann anhand der obigen Lehre durch Optimierungsreihen leicht die optimalen Bedingungen bezüglich pH, Druck und Lichteinstrahlung für einzelne, spezielle Enzyme ermitteln. Die Erfindung erweitert daher das Gebiet der Biokatalyse zur Herstellung organischer Verbindungen um einen bedeutenden Beitrag.

Materialien und Bezugsquellen

trans-Anethol: Sigma-Aldrich, Cat. 11,787-0, Lot.: S16146-283

4-Aminostyrol: Lancaster, 11845, 216-185-8, Batch FA008716

2-Bromstyrol: Sigma-Aldrich, 132683

2-Methyl-1-phenyl-1-propen: Sigma-Aldrich, 282510, 13028 BE

Inden: Merk-Schuchard, S17014 843, 8.20701.0005

Peroxidase von *Coprinus cinereus*, Charge 1: NovoNordisk A/S, Peroxidase SP 502, Batch PPX 3829

Peroxidase von *Coprinus cinereus*, Charge 2: Novozymes, 51004, OON00008, (produziert in *Asp. oryzae*)

Peroxidase von *Coprinus cinereus*, Charge 3: Biesterfeld Chemiehandel GmbH & Co. KG, "Baylase"

Meerrettich-Peroxidase, Charge 1: Sigma-Aldrich, P2088

Meerrettich-Peroxidase, Charge 2: Sigma-Aldrich, P8250, 031K74711

Meerrettich-Peroxidase, Charge 3: Sigma-Aldrich, P6140, 051K7490

Meerrettich-Peroxidase, Charge 4: Roche, POD10108090001, Lot.: 93350720

Meerrettich-Peroxidase, Charge 5: Sigma-Aldrich, P8125, 031K7465

Meerrettich-Peroxidase, Charge 6: Roche, POD10814407001, Lot.: 93396221

Lignin-Peroxidase: Fluka, Lot. & Fillingcode 1239384, 32506 171, 42603

Rindermilch-Peroxidase: Sigma-Aldrich, Lactoperoxidase from bovine milk, L-2005, Lot. 16H38311

Chlorperoxidase von *Caldaromyces fumago*: Biochemika, 25810

Bromperoxidase from *Corallina officinalis*: Sigma-Aldrich, B2170, 123K3783

Laccase von *Rhus vernicifera*: Sigma-Aldrich, L-2157, Lot.: 67H0281

Laccase von *Coriolus versicolor*: Fluka, 38429, Lot. & Filling code 414571/1, 43001

Laccase von *Candida rugosa*: Jülich Fine Chemicals Life Science Technology, Laccase CV, Ord.No. 14.10

Laccase von *Agaricus bisporus*: Fluka, 40452, Lot. & Filling code 443928/1 42703431

Laccase DeniLite II Base: Novozymes, OM30402613, Chemical Abstracts Service (CAS) Registry No.: 80498-15-3

Literaturzitate

[1] W. Yu, Y. Mei, Y. Kang, Z. Hua, Z. Jin, Org. Lett. 6, 3217-3219 (2004).

[2] B.R. Travis, R.S. Narayan, B. Borhan; J. Am. Chem. Soc. 124, 3824-3825 (2002).

[3] D. Yang, C. Zhang, J. Org. Chem. 66, 4814-4818 (2001).

[4] C.-M. Ho, W.-Y. Yu, C.-M. Che, Angew. Chem. 116, 3365-3369 (2004).

[5] R.S. Drago, B.B. Corden, C.W. Barnes, J. Am. Chem. Soc. 108, 2453-2454 (1986).

[6] G. Bourel, J.-M. Nicaud, B. Nthangeni, P. Santiago-Gomez, J.-M. Belin, F. Husson, Enzyme Microb. Technol. 35, 293-299 (2004).

[7] "Horseradish peroxidase in the presence of phenol as cosubstrate", P.R. Ortiz de Montellano, L.A. Grab, Biochemistry 26, 5310-5314 (1987).

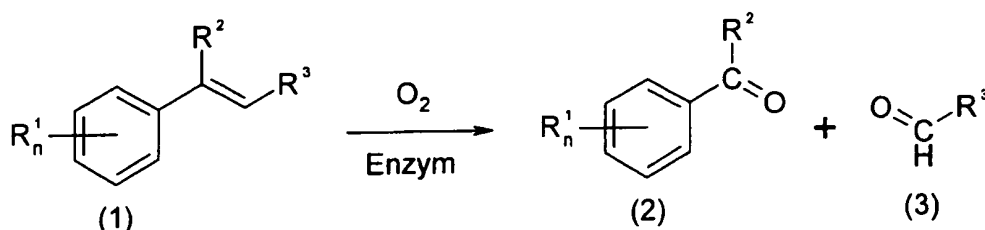
[8] "Engineered horseradish peroxidase", S.-I. Ozaki, P.R. Ortiz de Montellano, J. Am. Chem. Soc. 117, 7056-7064 (1995).

[9] "Myeloperoxidase and *Coprinus cinereus* peroxidase with electron-deficient styrene derivatives", A. Tuynman, J.L. Spelberg, I.M. Kooter, H.E. Schoemaker, R. Wever, J. Biol. Chem. 275, 3025-3030 (2000).

- [10] "Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* with tert-butyl hydroperoxide", D.J. Bougioukou, I. Smonou, *Tetrahedron Lett.* 43, 339-342 (2002).
- [11] D.J. Bougioukou, I. Smonou, *Tetrahedron Lett.* 43, 4511-4514 (2002).
- [12] M. Takemoto, Y. Iwakiri, Y. Suzuki, K. Tanaka, *Tetrahedron Lett.* 45, 8061-8064 (2004).
- 5 [13] "Horseradish peroxidase with indoles", K.-Q. Ling, L.M. Sayre, *Bioorg. Med. Chem.* 13, 3543-3551 (2005).
- [14] "Employing β -carotene monooxygenase for epoxidation in a cascade with a hydrolase and further enzymes", M.G. Leuenberger, C. Engeloch-Jarret, W.-D. Woggon, *Angew. Chem.* 113, 2684-2687 (2001).
- 10 [15] M.G. Leuenberger, C. Engeloch-Jarret, W.-D. Woggon, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 2614-2617 (2001).
- [16] T.D.H. Bugg, *Tetrahedron* 59, 7075-7101 (2003).
- [17] M. Sono, M.P. Roach, E.D. Coulter, J.H. Dawson, *Chem. Rev.* 96, 2841-2888 (1996).
- [18] "Quercetin 2,3-dioxygenase from *Bacillus subtilis*", M.R. Schaab, B.M. Barney, W.A. Francisco, *Biochemistry* 45, 1009-1016 (2006).
- 15 [19] "Quercetin 2,3-dioxygenase from *Aspergillus niger*", H.-K. Hund, J. Breuer, F. Lingens, J. Hüttermann, R. Kappl, S. Fetzner, *Eur. J. Biochem.* 263, 871-878 (1999).
- [20] "Indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase from mammals", D.H. Munn, M. Zhou, J.T. Attwood, I. Bondarev, S.J. Conway, B. Marshall, C. Brown, A.L. Mellor, *Science* 281, 1191-1193 (1998).
- 20 [21] "A dioxygenase from *Acinetobacter johnsonii* is restricted to 1,3-diones", G.D. Straganz, H. Hofer, W. Steiner, B. Nidetzky, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 12202-12203 (2004).
- [22] G. Straganz, A. Glieder, L. Brecker, D.W. Ribbons, W. Steiner, *Biochem. J.* 369, 573-581 (2003).
- 25 [23] "Lignostilbene- α,β -dioxygenase isozymes cleave various substituted stilbene derivatives", S. Kamoda, T. Terada, Y. Saburi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 2575-2576 (1997).
- [24] S. Kamoda, M. Samejima, *Agric. Biol. Chem.* 55, 1411-1412 (1991).
- [25] S. Kamoda, Y. Saburi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57, 931-934 (1993).
- [26] S. Kamoda, T. Terada, Y. Saburi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 1394-1396 (2003).
- 30 [27] S. Kamoda, T. Terada, Y. Saburi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 635-637 (2005).
- [28] "Heme-dependent oxygenase cleaves double bonds of rubber (poly(cis-1,4-isoprene))", R. Braaz, P. Fischer, D. Jendrosseck, *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7388-7395 (2004).
- [29] " β -Diketone cleavage", G. Grogan, *Biochem. J.* 388, 721-730 (2005).
- [30] H. Mang, J. Gross, M. Lara, C. Goessler, G.M. Gübitz, H.E. Schoemaker, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 5201-5203 (2006).
- 35 [31] H. Mang, J. Gross, M. Lara, C. Goessler, G.M. Gübitz, H.E. Schoemaker, W. Kroutil, *Angew. Chem.* 118, 5325-5328 (2006).

Patentansprüche:

1. Verfahren zur oxidativen Spaltung von gegebenenfalls substituierten Vinylaromaten der nachstehenden Formel (1),
dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere Verbindungen der Formel (1) in Gegenwart von molekularem Sauerstoff mit zumindest einem aus Peroxidasen und Laccasen ausgewählten Enzym als Katalysator gemäß nachstehendem allgemeinem Reaktionsschema zu Aldehyden bzw. Ketonen der Formeln (2) und (3) oxidiert wird bzw. werden:



worin n eine ganze Zahl von 0 bis 5 ist, so dass der aromatische Ring in ortho-, meta- und/oder para-Stellung zur Vinylgruppe mit 0 bis 5 Substituenten R^1 substituiert sein kann, die gleich oder unterschiedlich sein können und ausgewählt sind aus:

a) gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffgruppen mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen, in denen gegebenenfalls ein oder mehrere Kohlenstoffatome durch ein Heteroatom, ausgewählt aus Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel, ersetzt sind und die gegebenenfalls mit einem oder mehreren Substituenten, ausgewählt aus C_{1-6} -Alkylgruppen, C_{1-6} -Alkylengruppen, C_{1-6} -Alkoxygruppen, Amino-, C_{1-6} -Alkylamino- und C_{1-6} -Dialkylaminogruppen, Halogenen, Hydroxy, Oxo und Cyano weiter substituiert sind,

b) Amino-, C_{1-6} -Alkylamino- und C_{1-6} -Dialkylaminogruppen, sowie

c) Halogenen, Hydroxy und Cyano,

wobei zwei beliebige der Substituenten R^1 zu einem alicyclischen oder aromatischen Ring verbunden sein können, und

worin die Substituenten R^2 und R^3 jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff oder eine der unter a), b) und c) beschriebenen Optionen sind,

wobei R^2 und/oder R^3 jeweils mit einem Substituenten R^1 zu einem alicyclischen Ring verbunden sein können, wobei in diesem Fall R^2 bzw. R^3 jeweils für eine chemische Bindung zwischen dem Kohlenstoffatom der Vinylgruppe, an das sie gebunden sind, und dem Substituenten R^1 stehen können.

2. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, dass das zumindest eine Enzym aus fungalen Peroxidasen und Laccasen, Halogenperoxidasen, Lignin-Peroxidasen, Meerrettich-Peroxidase und Rindermilch-Peroxidase ausgewählt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, *dadurch gekennzeichnet*, dass das zumindest eine Enzym aus fungalen Peroxidasen von *Coprinus cinereus*, aus Laccasen von *Coriolus versicolor*, *Agaricus bisporus* und *Candida rugosa*, Laccase von *Rhus vernicifera*, Chlorperoxidase von *Caldariomyces fumago* und Bromperoxidasen, z.B. von *Streptomyces aureofaciens* oder *Corallina officinalis*, ausgewählt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, *dadurch gekennzeichnet*, dass das zumindest eine Enzym aus Meerrettich-Peroxidase, aus Peroxidasen von *Coprinus cinereus* sowie aus Laccasen von *Coriolus versicolor* und *Agaricus bisporus* ausgewählt wird.

5. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Oxidation in einem Puffer durchgeführt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, *dadurch gekennzeichnet*, dass der Puffer aus Bis-Tris-Puffer, Acetatpuffer, Formiatpuffer und Phosphatpuffer ausgewählt wird.

7. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, *dadurch gekennzeichnet*, dass der pH der Reaktion auf 2 bis 7, vorzugsweise auf 2 bis 4, eingestellt wird.

8. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Oxidation unter O_2 -Überdruck durchgeführt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Oxidation unter einem O_2 -Überdruck von 1 bis 6 bar, vorzugsweise 2 bis 3 bar, durchgeführt wird.

10. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Oxidation unter Lichteinwirkung durchgeführt wird.

11. Verwendung von fungalen Peroxidasen und Laccasen, fungalen Halogenperoxidasen, bakteriellen Halogenperoxidasen, Lignin-Peroxidasen, Meerrettich-Peroxidase oder Rindermilch-Peroxidase zur Katalyse der oxidativen Spaltung von mit dem aromatischen Ring

konjugierten ethylenischen Doppelbindungen gegebenenfalls substituierter Vinylaromaten mit molekularem Sauerstoff.

- 5 12. Verwendung nach Anspruch 11, *dadurch gekennzeichnet*, dass zumindest ein aus fungalen Peroxidasen von *Coprinus cinereus*, Laccasen von *Coriolus versicolor*, *Agaricus bisporus* oder *Candida rugosa*, Laccasen von *Rhus vernicifera*, Chlorperoxidase von *Caldariomyces fumago* und Bromperoxidasen, z.B. von *Streptomyces aureofaciens* oder *Corallina officinalis*, ausgewähltes Enzym als Katalysator verwendet wird.
- 10 13. Verwendung nach Anspruch 11 oder 12, *dadurch gekennzeichnet*, dass zumindest eine von Meerrettich-Peroxidase, Peroxidasen von *Coprinus cinereus* oder Laccasen von *Coriolus versicolor* oder *Agaricus bisporus* als Katalysator verwendet wird.

15 **Keine Zeichnung**

20

25

30

35

40

45

50

55