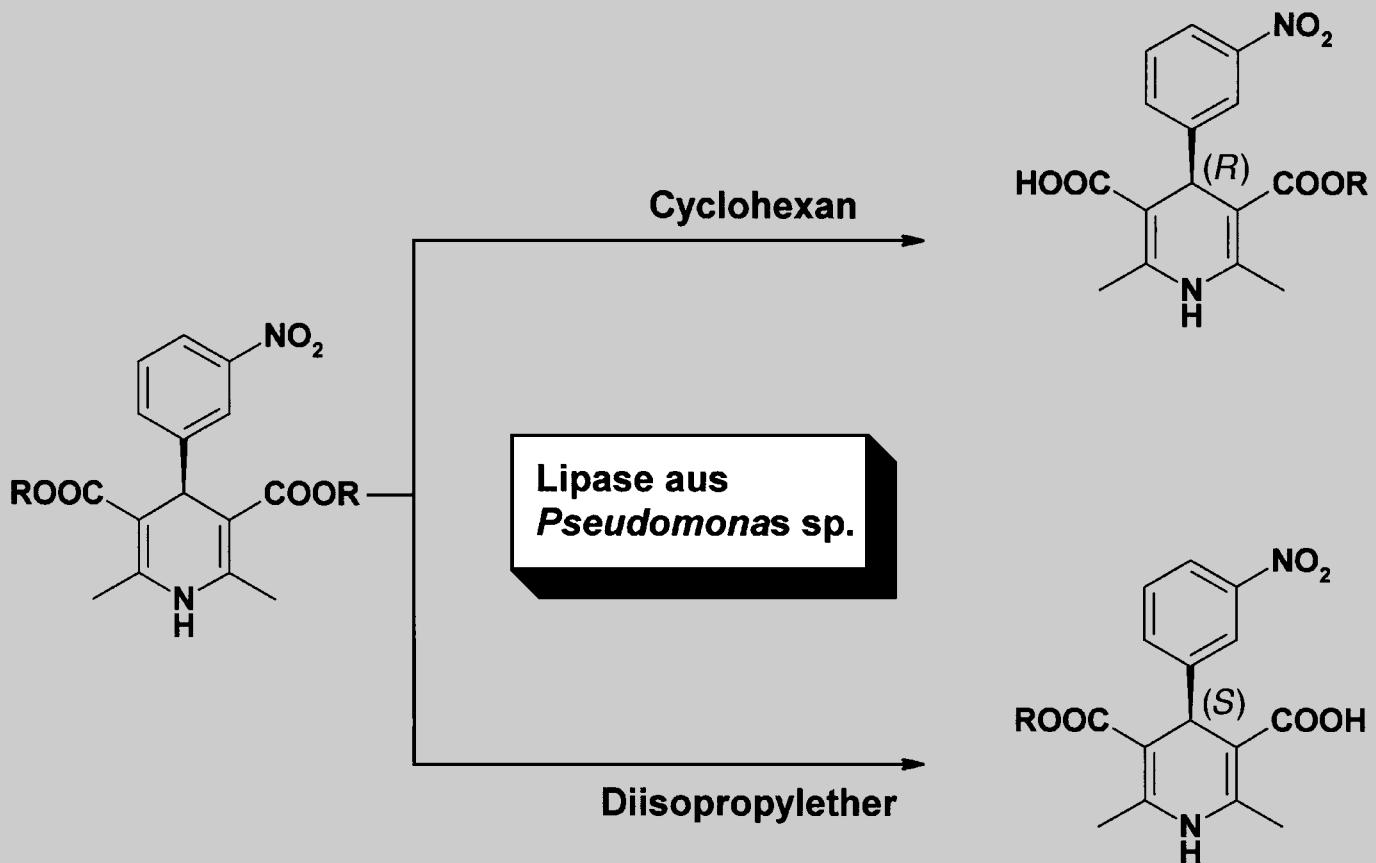


„Medien-Engineering“ von Enzymreaktionen:



Die Enzymselektivität in organischen Lösungsmitteln kann sich von der in Wasser unterscheiden, und sie kann sich ändern oder sogar umkehren, wenn das Lösungsmittel gewechselt wird.

Enzyme in organischen Lösungsmitteln: Eigenschaften und Einsatz in der Synthese

Giacomo Carrea* und Sergio Riva*

Biotransformationen sind, was die Herstellung von Feinchemikalien und optisch aktiven Verbindungen betrifft, bereits eine effektive und manchmal zu bevorzugende Alternative zur chemischen Synthese. Um die Vielseitigkeit solcher biologischer Zugangswege weiter auszubauen, entstand in den letzten Jahren die „nichtwässrige Enzymologie“, die inzwischen ein wichtiger Bereich der Forschung und biotechnologischen Entwicklung ist. Sie eignet sich besonders für die Modifizierung der Vorstufen von Pharmazeutika und Feinchemikalien, die in den meisten Fällen nur schlecht oder gar nicht in Wasser löslich sind. Zunächst wurde die Idee, enzymatische Prozesse in organischen Lösungsmitteln durchzuführen, mit Skepsis betrachtet, doch heute wird die Biokatalyse in derartigen Medien in zahlreichen akademischen

und industriellen Laboratorien untersucht und genutzt. Einer der Gründe, die eine Enzymkatalyse in nichtwässriger Umgebung so reizvoll machen, sind die wichtigen neuen Eigenschaften, die Enzyme in organischen Lösungsmitteln haben. Beispielsweise sind sie oftmals stabiler, und sie können Reaktionen katalysieren, die in Wasser schwierig oder unmöglich sind. Darüber hinaus kann die Enzymselektivität sich ebenfalls von der in Wasser unterscheiden sowie sich ändern oder sogar umkehren, wenn man von einem Lösungsmittel zu einem anderen übergeht. Dieses Phänomen, das man als „Medium-Engineering“ bezeichnen könnte, kann als Alternative zum Protein-Engineering genutzt werden. Der erste Teil dieser Übersicht behandelt die thermodynamischen, kinetischen, spek-

troskopischen und physikalischen Wege, die eingeschlagen wurden, um die Faktoren zu untersuchen, die Aktivität, Stabilität, Struktur und Selektivität von Enzymen in organischen Lösungsmitteln beeinflussen. Zusammengekommen haben diese Untersuchungen das Verständnis der Enzymkatalyse in organischen Lösungsmitteln auf ein Niveau gebracht, das nahezu dem entspricht, das für die Biokatalyse in wässrigen Medien erreicht ist. Im zweiten Teil werden Enzymkatalysen in organischen Medien vorgestellt, die von der Herstellung weniger Milligramm einer spezifisch markierten Verbindung bis zur Modifizierung von Fetten im Tonnenmaßstab reichen und von der Synthese komplexer Schlüsselzwischenstufen für die pharmazeutische Industrie bis zu der von Polymeren.

1. Einführung

Im Laufe der letzten zwanzig Jahren wurde die Verwendung von Biokatalysatoren für die organische Synthese eine immer attraktivere Alternative zu konventionellen chemischen Methoden.^[1] Da Enzyme recht häufig sehr chemo-, regio- und enantioselektiv reagieren, sind sie für den pharmazeutischen und den agrochemischen Bereich besonders attraktiv, da hier das Interesse an enantiomerenreinen und spezifisch funktionalisierten Verbindungen kontinuierlich wächst. Darüber hinaus werden enzymkatalysierte Reaktionen in der Regel unter milden Bedingungen durchgeführt,

etwa bei Raumtemperatur und bei neutralem oder nahezu neutralem pH, was die Gefahr von Produktisomerisierung, -racemisierung und -epimerisierung minimiert. Des Weiteren können Enzyme sehr effiziente Katalysatoren sein, die Reaktionsgeschwindigkeiten bis auf das 10^{12} fache erhöhen. Schließlich sind biokatalytische Prozesse auch noch weniger gefährlich, umweltgefährdend und energieverbrauchend als solche, die auf konventionellen chemischen Methoden basieren, insbesondere als jene, die Schwermetallkatalysatoren nutzen.

Alle diese Gründe machten die Biokatalyse zu einem populären Forschungsthema an Hochschulen und in der Industrie, und eine riesige Zahl von Enzymen mit einem behaupteten Potential für eine praktische Nutzung wurde beschrieben. Zum Beispiel beschreibt die Datenbank Bio-Catalysis, für die 8000 Veröffentlichungen und Patente ausgewertet wurden, 18500 Biotransformationen, die mit

[*] Dr. G. Carrea, Dr. S. Riva
Istituto di Biocatalisi e Riconoscimento Molecolare, CNR
Via Mario Bianco 9, 20131 Milano (Italien)
Fax: (+390)02-285-000-36
E-mail: g.carrea@ico.mi.cnr.it, rivas@ico.mi.cnr.it

Enzymen, Mikroorganismen oder katalytischen Antikörpern durchgeführt wurden.^[2] Ganz klar wird die Mehrzahl der beschriebenen Umwandlungen das Schicksal haben, reine Laborkuriositäten zu bleiben, aber ein wesentlicher Teil findet bereits industrielle Anwendung oder wird dies noch tun.

Allerdings gibt es auch einige Probleme, wie die manchmal ungenügende Stabilität der Enzyme und/oder ihre mühsame Isolierung und schlechte Produktivität. Doch die Verbesserungen bei den Reinigungsoperationen und der Einsatz von immobilisierten oder maßgeschneiderten Enzymen machen zunehmend das Auftreten dieser einschränkenden Faktoren unwahrscheinlicher. Wegen der begrenzten Wasserlöslichkeit vieler organischer Substrate ist ein weiterer Nachteil, dass die Reagenskonzentrationen bei biokatalytischen Prozessen im Allgemeinen niedriger sind als in chemischen Prozessen; dies führt natürlich zu größeren Reaktionsvolumina und kompliziert die Produktisolierung.

2. Organische Lösungsmittelsysteme

Unter den verschiedenen Methoden, die zur Erhöhung der Löslichkeit von hydrophoben Substraten in biokatalysierten Reaktionen angewendet wurden, ist die naheliegendste und am häufigsten angewendete der Einsatz organischer Lösungsmittel. Dies umfasst den Gebrauch von Mischungen von Wasser mit wasserlöslichen organischen Lösungsmitteln,^[3] zweiphasigen Systemen aus Wasser und einem nichtmischbaren organischen Lösungsmittel (siehe die bahnbrechende Arbeit von Sym^[4] und einige neuere Übersichten^[5]), invers

micellaren Systemen^[5f, 6] und schließlich rein organischen Lösungsmittelsystemen.^[5f, 7]

Einige Eigenheiten der verschiedenen Systeme, die helfen könnten, ihre Besonderheiten zu verstehen, sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt. In zweiphasigen Systemen (a) befinden sich Enzyme und hydrophile Verbindungen in der wässrigen Phase, in der die Reaktion stattfindet, während

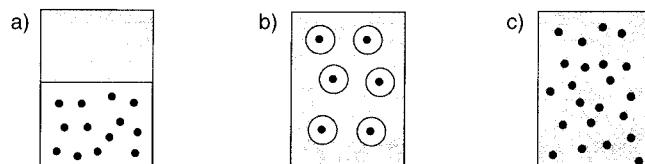


Abbildung 1. Schematische Darstellung einiger organischer Lösungsmittelsysteme. a) Zweiphasensystem, b) invers micellares System, c) organisches Solvens; schraffiert: organische Phase, weiß: wässrige Phase, schwarze Punkte: Biokatalysator.

hydrophobe Verbindungen sich hauptsächlich in der organischen Phase aufhalten. In invers micellaren Systemen (b) sind die Enzymmoleküle in diskreten, hydratisierten inversen Micellen solubilisiert, die von Tensiden in einer kontinuierlichen Phase eines hydrophoben organischen Lösungsmittels gebildet werden. Unter geeigneten Bedingungen ist eine solche Phase homogen, thermodynamisch stabil und optisch transparent. In organischen Lösungsmittelsystemen (c) liegen feste Enzympräparationen (z. B. lyophilisiert oder an einem inerten Träger adsorbiert) in Gegenwart von so viel wässrigem Puffer suspendiert vor, wie nötig ist, um die Enzymaktivität zu erhalten.

Giacomo Carrea, 1943 in Tortona (Italien) geboren, schloss sein Chemiestudium an der Universität von Pavia 1968 ab. 1969 kam er zum Centro Nazionale delle Ricerche (CNR), dessen Istituto di Biocatalisi e Riconoscimento Molecolare er derzeit als Direktor leitet. Seine Forschungsgebiete sind die Enzymkatalyse in organischen Lösungsmitteln, die Synthese von Feinchemikalien unter Katalyse durch Hydrolasen, Dehydrogenasen, Peroxidasen und Monoxygenasen, die Untersuchung der Konformationen von Proteinen und Polypeptiden und die analytischen Anwendungen von biolumineszenten Enzymen. Er ist Mitherausgeber der Zeitschriften Trends in Biotechnology und Biocatalysis and Biotransformation und Autor von rund 170 Publikationen.



G. Carrea



S. Riva

Sergio Riva, 1958 in Mailand (Italien) geboren, arbeitet seit 1984 am IBRM (Institut für Biokatalyse und molekulare Erkennung). Er erwarb 1983 seine Laurea in Chemie an der Universität von Mailand und 1989 sein Diploma di Specialità in Organischer Synthese am Politecnico von Mailand. 1987 verbrachte er ein Jahr am Massachusetts Institute of Technology (Cambridge, USA) in der Gruppe von Prof. A. Klibanov. 1993 wurde er mit der Ciamician-Medaille der Fachgruppe Organische Chemie der Italienischen Chemischen Gesellschaft ausgezeichnet. Seine Forschungsaktivität wird durch mehr als 100 Publikationen über die Isolierung und Charakterisierung von Enzymen verschiedener Klassen (Hydrolasen, Dehydrogenasen, Oxynitrilasen, Glycosyltransferasen) und über die Verwendung dieser Biokatalysatoren für die milde und selektive Modifizierung von Naturstoffen (Steroiden, Alkaloiden, Terpenen, Zuckern und natürlichen Glycosiden) dokumentiert.

tivität sicherzustellen (als Faustregel < 5 Vol.-%). Selbst wenn die zugegebene Menge an Wasser dessen Löslichkeit im Lösungsmittel überschreitet, tritt keine diskrete wässrige Phase auf, da ein Teil des Wassers vom Biokatalysator adsorbiert wird. Die beiden sichtbaren Phasen in einem organischen Lösungsmittelsystem sind flüssig (das Hauptlösungsmittel und die darin gelösten Reagentien) und fest (hydratisierte Enzympartikel).

Obwohl jedes der genannten Systeme Vor- und Nachteile hat,^[8] sind es die organischen Lösungsmittelsysteme, die am intensivsten untersucht und am breitesten eingesetzt wurden, und in dieser Übersicht werden wir uns ausschließlich auf diese Systeme konzentrieren. Einige Gründe für das Interesse an dieser Art von enzymkatalysierten Reaktionen und ihren Erfolg seien im Folgenden genannt:

- 1) Sie ermöglichen katalytische Reaktionen, die in Wasser zurückgedrängt würden (z.B. die Umkehr von Hydrolysen zugunsten der Synthese).
- 2) Durch Wasser induzierte Nebenreaktionen wie die Hydrolyse von Säureanhydriden und (Halogenethyl)estern werden umgangen.
- 3) Hydrophobe Substrate werden solubilisiert.
- 4) Bestimmte Produkte lassen sich leichter isolieren.
- 5) Der unlösliche Biokatalysator kann leicht zurückgewonnen werden.
- 6) Die Thermostabilität des Biokatalysators ist, zumindest bei niedrigen Wassergehalten, höher.

Darüber hinaus kann die Enzymselektivität durch das Lösungsmittel stark beeinflusst und sogar umgekehrt werden; dieses Medium-Engineering bietet also eine Alternative zum Protein-Engineering. Organische Lösungsmittelsysteme sind außerdem für grundlegende Untersuchungen über die Wirkungen von Wasser auf die Enzymdynamik und -katalyse nützlich.

In den folgenden Abschnitten werden die Eigenschaften von Enzymen in organischen Lösungsmitteln und ihr Einsatz in der Synthese beleuchtet.

3. Enzymeigenschaften in organischen Lösungsmitteln

Thermodynamische, kinetische, spektroskopische und physikalische Studien trugen allesamt zu einem besseren Verständnis der Faktoren bei, die für die Aktivität, Stabilität, Struktur und Selektivität von Enzymen in organischen Lösungsmitteln wichtig sind; dieses Verständnis ist mittlerweile fast so weit entwickelt wie das für die Biokatalyse im wässrigen Medium.

3.1. Enzymaktivität

Die Enzymaktivität in organischen Lösungsmitteln hängt erheblich von Parametern wie der Wasseraktivität, der Substrat- und Produkt-Solvatisierung, dem pH-Wert, der Enzymform und der Natur des Lösungsmittels ab.

3.1.1. Wasseraktivität

Ziemlich früh stellte sich heraus, dass die Enzymaktivität in hydrophoben Solventien höher ist als in hydrophilen, und Laane et al. fanden,^[9] dass eine direkte Korrelation zwischen der Aktivität und der Hydrophobie des Lösungsmittels, ausgedrückt als $\log P$ -Wert (wobei P der Verteilungskoeffizient des Lösungsmittels zwischen *n*-Octanol und Wasser ist), besteht. Die Autoren schrieben dieses Ergebnis der unterschiedlichen Fähigkeit organischer Lösungsmittel zu, die für die Aktivität essentielle Wasserschicht um die Biokatalysatoren zu verdrängen.^[9]

Kurz darauf zeigten Zaks und Klibanov^[10] mit den drei nicht verwandten Enzymen Alkohol-Oxidase aus Hefe, Polyphenol-Oxidase aus Pilzen und Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber, dass die Enzymaktivität in den verschiedenen Lösungsmitteln mehr oder weniger konstant war, solange die Menge des an das Enzym gebundenen Wassers gleich blieb. Aus Abbildung 2a wird deutlich, dass zum Erreichen einer hohen Aktivität der Wassergehalt des Lösungsmittels umso höher sein muss, je hydrophiler das Lösungsmittel ist. Dies liegt daran, dass nicht der Wassergehalt des Lösungsmittels (W_s) für die Aktivität zählt, sondern der Wassergehalt des Enzyms (W_e , Abbildung 2b). Abhängig von der Hydrophobie

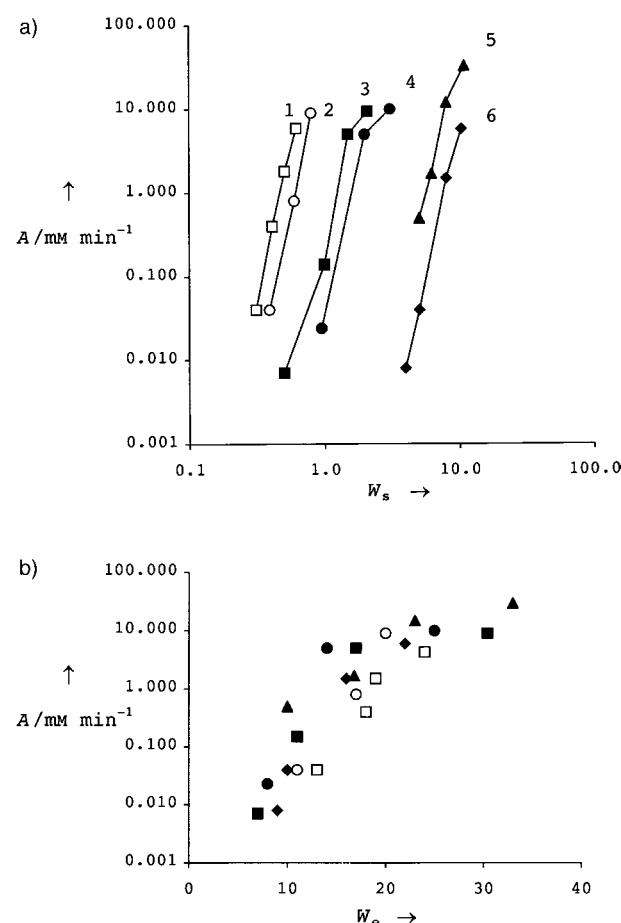


Abbildung 2. Abhängigkeit der Aktivität A der Alkohol-Oxidase aus Hefe in verschiedenen organischen Lösungsmitteln a) von der Wasserkonzentration im Lösungsmittel (W_s in Vol.-%), b) vom Wassergehalt des Enzyms (W_e in Vol.-%). Untersuchte Lösungsmittel: 1 = Diethylether (□), 2 = Butylacetat (○), 3 = Ethylacetat (■), 4 = *n*-Octanol (●), 5 = *tert*-Amylalkohol (▲), 6 = 2-Butanol (◆).

des Lösungsmittels resultieren nun aber bei gleichem Wassergehalt vollkommen verschiedene Mengen Wasser am Enzym. Diese Daten legen nahe, dass der Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf ein Enzym in erster Linie auf Wechselwirkungen mit der enzymgebundenen essentiellen Wasserschicht und nicht auf Wechselwirkungen mit dem Enzym selbst zurückzuführen ist. Die maximale Aktivität wurde für die drei untersuchten Enzyme bei etwa 1000 Wassermolekülen pro Enzymmolekül festgestellt, das ist über den Daumen eine Monoschicht Wasser auf der Oberfläche – in Einklang mit Untersuchungen zum Wiederherstellen der Aktivität von trockenem Lysozym^[11] und Chymotrypsin^[12] an Luft. Es sollte nicht unerwähnt bleiben, dass bei optimalen Wassergehalten die Aktivität der drei Enzyme in organischen Lösungsmitteln bei 20 bis 40 % der Aktivität in wässriger Lösung lag.^[10] Ein unterschiedliches Ausmaß des Abziehens von Wasser vom Enzym als Funktion der Lösungsmittelpolarität wurde durch direkte Messung der Desorption von tritiertem Wasser festgestellt und quantifiziert; das Abziehen des Wassers geschah unmittelbar, nachdem das Enzym im organischen Lösungsmittel suspendiert worden war.^[13]

Für eine genauere Korrelation der Enzymaktivität mit der im Reaktionsmedium vorhandenen Wassermenge nutzten Halling^[14] und Goderis et al.^[15] die thermodynamische Wasseraktivität. Die Wasseraktivität a_w ist mit dem Molenbruch von Wasser (χ_w) über den Wasseraktivitätskoeffizienten γ_w gemäß $a_w = \gamma_w \chi_w$ korreliert. Da der Wasseraktivitätskoeffizient γ_w in erster Näherung mit der Lösungsmittelhydrophobie größer wird, ist offensichtlich, dass ein bestimmter Wert von a_w in einem hydrophoben Lösungsmittel bei einer niedrigeren Wasserkonzentration erreicht wird als in einem hydrophilen Medium. Daher ist, um das gleiche Maß an Hydratisierung, d. h. die gleiche Wasseraktivität a_w , am Enzym zu erreichen, in einem hydrophoben Lösungsmittel weniger Wasser erforderlich als in einem hydrophilen. Um das Konzept der Wasseraktivität klarer zu machen, schugen Bell et al.^[7i] vor, dass a_w wie eine Temperatur, der Wassergehalt wie eine Wärmemenge zu betrachten sei: Zwei Systeme könnten die gleiche Wasseraktivität a_w (Temperatur) haben, sich dabei aber im Wassergehalt (in der Wärmemenge) unterscheiden. Es sei hier erwähnt, dass unter Gleichgewichtsbedingungen a_w für alle Komponenten des Reaktionssystems, d. h. für den Katalysator, die Matrix (im Falle immobilisierter Enzyme^[16]), die Reagentien und die Lösungsmittel, gleich sein wird.

Die direkte Korrelation zwischen der Enzym- und der Wasseraktivität wurde im Fall der Lipase aus *Mucor miehei* eindeutig nachgewiesen.^[17] Das Aktivitätsoptimum dieser Lipase lag unabhängig vom Lösungsmittel (Hexan bis Pentanon) immer etwa bei $a_w = 0.55$ (Abbildung 3a). Die absoluten Reaktionsgeschwindigkeiten waren zwar etwas unterschiedlich, aber die Form des Reaktivitätsprofils war im Wesentlichen unverändert. Dagegen überstrich das Optimum einen weiten Bereich, wenn die Enzymaktivität gegen die Wasserkonzentration aufgetragen wurde (Abbildung 3b). In einer Untersuchung, die mit fünf Lipasen unterschiedlicher Herkunft durchgeführt wurde, fand man außerdem, dass die Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von a_w von Enzym zu Enzym sehr verschieden war, möglicherweise als Folge von unterschiedlichen Molekülstrukturen.^[18] Eine neuere Studie

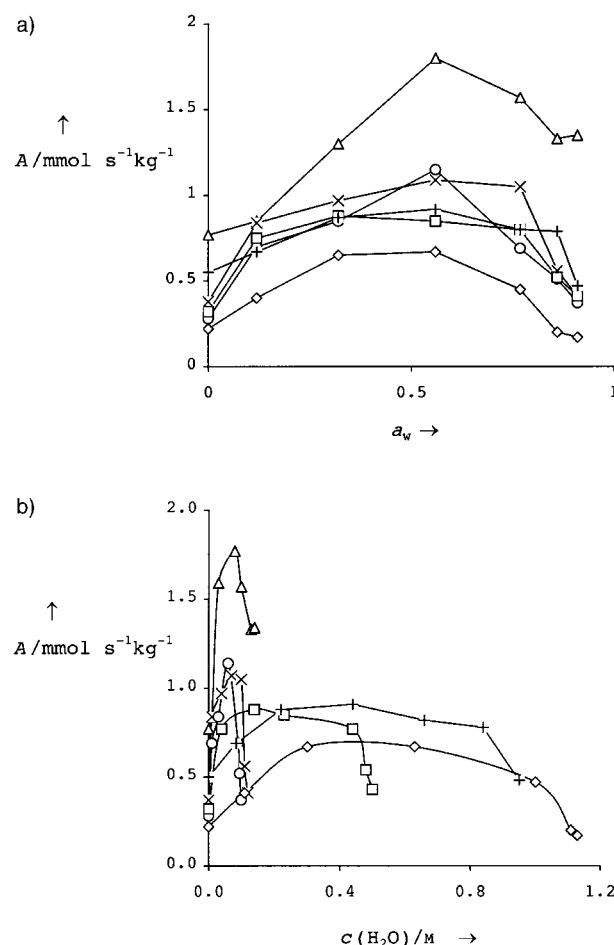


Abbildung 3. Aktivität A der Lipase aus *Mucor miehei* a) als Funktion der Wasseraktivität a_w , b) als Funktion der Wasserkonzentration c . Untersuchte Lösungsmittel: Hexan (Δ), Toluol (\times), Trichlorethylen (\circ), Diisopropylether (\square), 3-Pentanon (\diamond), Dodecansäure:Dodecanol 1:1 (+).

hat gezeigt, dass der a_w -Wert – anders als bei den bisher genannten, eher unpolaren Solventien – bei polaren Lösungsmitteln wie Dioxan, Acetonitril, Tetrahydrofuran und Aceton keine genauen Vorhersagen zur kritischen Hydratisierung für die optimale Enzymaktivität ermöglicht; dies spiegelt wahrscheinlich direkte Einflüsse des Lösungsmittels auf das Enzym wider.^[19]

Die Zunahme von a_w oder dem Wassergehalt kann ein Ansteigen der K_m -Werte induzieren.^[20] Dies trifft insbesondere für die K_m -Werte von Nucleophilen in Hydrolasekatalysierten Veresterungen und Umesterungen zu, bei denen Wasser mit dem Substrat um das Acyl-Enzym-Intermediat konkurriert und daher als Inhibitor wirkt.^[20b-d] Dieses Phänomen ist in Tabelle 1 an der Wirkung der Wasserkonzentration

Tabelle 1. Wirkung der Wasserkonzentration auf die Kinetikparameter der durch PEG-Subtilisin katalysierten Umesterung von Vinylbutyrat mit 1-Hexanol in Dioxan.

Wasser [M]	1-Hexanol		Vinylbutyrat	
	$K_{m,app}$ ^[a]	$v_{max,app}$ ^[b]	$K_{m,app}$ ^[a]	$v_{max,app}$ ^[b]
0	0.72	156	0.17	76
1.1	1.99	142	0.16	67
2.2	3.19	128	0.16	55

[a] Einheit: molar. [b] In μmol pro h und mg Protein.

tion auf den $K_{m,app}$ -Wert von Subtilisin für das Nucleophil 1-Hexanol illustriert. Wie erwartet ist der $K_{m,app}$ -Wert für das Acylierungsmittel Vinylbutyrat unverändert. In ähnlicher Weise beeinflusst a_w das Gleichgewicht von Hydrolase-katalysierten Um- und Veresterungen, da Wasser im Fall der Veresterung die Rückreaktion (Hydrolyse des Produkts) und im Fall der Umesterung die Hydrolyse des Acylierungsmittels (aktivierte Ester oder Enolester und Säureanhydride) sowie wiederum die Hydrolyse des Produkts begünstigt.^[14c, 21]

Wegen der zentralen Rolle, die Wasser spielt, ist es klar, dass eine Kontrolle von a_w in enzymatischen Reaktionen, die in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden, von äußerster Wichtigkeit ist, weswegen zu diesem Zwecke mehrere Methoden entwickelt wurden.^[15, 22] Goderis et al.^[15] haben die Tatsache genutzt, dass einige Salze einen festgelegten Hydratisierungszustand haben, der einen wohldefinierten Wert a_w ergibt,^[23] indem sie mit gesättigten Salzlösungen über die Gasphase die Reaktionen in organischen Lösungsmitteln äquilibrierten. Diese Methode kann nicht nur genutzt werden, um a_w anfänglich einzustellen, sondern auch noch während einer Reaktion, in der Wasser erzeugt oder verbraucht wird.^[22a,b] Nachteilig ist, dass der Wassertransfer durch die Ausgestaltung der Äquilibrierungskammern beeinflusst wird. Bei einer anderen Methode zur a_w -Kontrolle werden Salzhydrate genutzt, die in organischen Medien als a_w -Puffer wirken können; allerdings verfügen sie nur über eine begrenzte Kapazität und erfordern zusätzliche Trennoperationen, wenn sie (und/oder die Enzyme) wiederverwendet werden sollen.^[22c,d] Vielversprechender – besonders auch für Anwendungen in präparativem Maßstab – scheint eine kürzlich beschriebene Methode, in der eine a_w -Kontrolle ausgeübt wird, indem eine Salzlösung in Siliconschläuchen umläuft, die in das organische Lösungsmittel eintauchen.^[22e] Die Siliconmembran ist für Wasserdampf durchlässig und für Ionen nicht; daher tritt nur Wasser durch sie durch.

3.1.2. Kinetik

Kinetik-Untersuchungen, die hauptsächlich mit Hydrolasen durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass Enzyme in organischen Lösungsmitteln konventionellen Mechanismen folgen.^[24] So gehorchen diverse Umesterungsreaktionen, die durch Schweinepankreas-Lipase (PPL) in Hexan katalysiert wurden, der Michaelis-Menten-Kinetik^[24a]; solche, die durch Lipasen aus *Mucor miehei*^[24b] und *Candida antarctica*^[24c] katalysiert wurden, folgten einem doppelten Pingpong-Mechanismus mit kompetitiver Inhibierung durch Substrate und Produkte. Dass die Mechanismen der Subtilisin-katalysierten Esterhydrolyse in Wasser und der Umesterung in organischen Lösungsmitteln gleich sind, wurde von Chatterjee und Russell demonstriert,^[24d,e] die außerdem die individuellen Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten der Reaktion in den organischen Lösungsmitteln bestimmten.

Die Kinetikparameter für das gleiche Enzym und Substrat können sich sowohl von organischem Lösungsmittel zu organischem Lösungsmittel als auch von den Werten in wässrigem Medium deutlich unterscheiden; dasselbe gilt für die Substratspezifität. So ist beispielsweise *N*-Acetyl-L-serinethylester (*N*-Ac-L-Ser-OEt) in Dichlormethan das bevor-

zugte Substrat von Subtilisin, während in *tert*-Butylamin das bevorzugte Substrat *N*-Acetyl-L-phenylalanin-ethylester (*N*-Ac-L-Phe-OEt) ist^[25] (Tabelle 2).

Tabelle 2. Substratspezifität S ($= (k_{cat}/K_m)_{Ser}/(k_{cat}/K_m)_{Phe}$) bei der Umesterung von *N*-Ac-L-Ser-OEt (Ser) und *N*-Ac-L-Phe-OEt (Phe) mit 1-Propanol, katalysiert mit Subtilisin Carlsberg in verschiedenen wasserfreien Lösungsmitteln.

Lösungsmittel	S	Lösungsmittel	S
Dichlormethan	8.2	<i>tert</i> -Butylmethylether	2.5
Chloroform	5.5	Octan	2.5
Toluol	4.8	Isopropylacetat	2.2
Benzol	4.4	Acetonitril	1.7
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	4.3	Dioxan	1.2
<i>tert</i> -Butylacetat	3.7	Aceton	1.1
<i>N</i> -Methylacetamid	3.4	Pyridin	0.53
Diethylether	3.2	<i>tert</i> -Amylalkohol	0.27
Tetrachlorkohlenstoff	3.2	<i>tert</i> -Butylalkohol	0.19
Ethylacetat	2.6	<i>tert</i> -Butylamin	0.12

Allerdings können all diese Effekte zumindest teilweise mit einer je nach Lösungsmittel unterschiedlichen Solvatisierung der Substrate erklärt werden.^[26] Es sind mehrere Methoden zur Korrektur der Effekte verfügbar, die auf Substrat- (und Produkt-)Solvatisierung zurückzuführen sind. Die von Janssen et al.^[26f] fußt auf der Verwendung der Freien Transferenergie (transfer free energy method), wobei die (Bindungs- oder) Aktivierungsenergie aus experimentellen Daten für v_{max}/K_m (oder für K_m) berechnet wird.^[26a,b] Diese experimentelle (Bindungs- oder) Aktivierungsenergie und die Freie Transferenergie des Substrats werden verwendet, um die korrigierte Aktivierungsenergie (bzw. Bindungsenergie) zu berechnen. Eine andere Methode der Korrektur besteht darin, die kinetischen Konstanten über thermodynamische Aktivitäten statt über Konzentrationen auszudrücken.^[26c,d] Eine dritte Methode ist die Korrektur der Michaelis-Konstanten durch die Verwendung von Verteilungskoeffizienten. In diesem Fall wird der experimentelle Wert von K_m , der auf den Substratkonzentrationen in der organischen Phase basiert, zu einem K_m -Wert korrigiert, der auf den Konzentrationen in der wässrigen Phase beruht.^[26e] Diese drei Methoden der Korrektur sind im Wesentlichen äquivalent und ergeben, einmal angewendet, vergleichbare Kinetikparameter in den verschiedenen Medien^[7h] und erklären die Unterschiede in der Substratspezifität.^[24]

3.1.3. pH-Wert und pH-Kontrolle

Der Protonierungszustand der verschiedenen Gruppen eines Enzyms ist ohne Zweifel von Bedeutung für die Enzymaktivität – sowohl in organischem wie in wässrigem Medium. Während aber der Protonierungszustand in Wasser einfach über den pH-Wert eingestellt werden kann, ist dies in organischen Lösungsmitteln nicht so; hier wird vielmehr das Konzept des pH-Werts selbst in Frage gestellt.^[14c] Ein Weg, den anfänglichen Protonierungszustand des Enzyms und damit seine Aktivität zu beeinflussen, wurde von Zaks und Klibanov entwickelt,^[24a] die zeigten, dass die Enzymaktivität in organischen Lösungsmitteln deutlich vom pH-Wert der

Lösung abhängt, aus der das Enzym isoliert wurde (durch Lyophilisierung oder Fällung). Diese Methode, die mittlerweile auf dem Gebiet der Biokatalyse intensiv angewendet wird, ist perfekt geeignet, wenn im Verlauf der Reaktion keine Änderungen der Säuren- oder Basenkonzentrationen eintreten. Wenn dies nicht der Fall ist, z.B. bei der Synthese, Hydrolyse oder Aminolyse von Estern, kann sich die Enzymprotonierung und -aktivität während der Reaktion ändern.

Um diese Schwierigkeit zu überwinden, wurde die Verwendung von Puffersystemen aus hoch hydrophoben Säuren und ihren Natriumsalzen sowie aus hoch hydrophoben Basen und ihren Hydrochloriden vorgeschlagen.^[27] Tatsächlich können diese Systeme effizient organische Medien puffern, wie in Abbildung 4 an der Abhängigkeit der Subtilisin-Aktivität von der Zusammensetzung einiger Säure-Base-Paare demonstriert wird. Hauptnachteil dieser Puffersysteme ist, dass sie nur in Lösungsmitteln mit relativ hoher Polarität (z.B. 3-Pentanon, Dioxan, Dimethylformamid oder Tetrahydrofuran) annehmbar löslich sind.

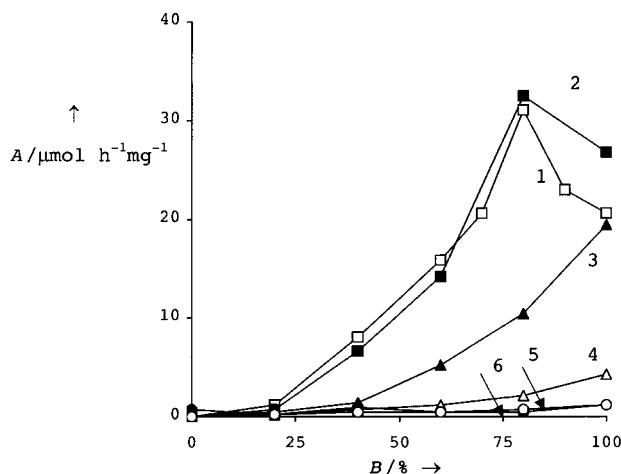


Abbildung 4. Abhängigkeit der Aktivität A von Subtilisin in 3-Pentanon vom Molenbruch B für eine Reihe von Paaren aus Säuren und ihren konjuguierten Basen (als Natriumsalze), die der Enzymsuspension zugegeben wurden: 1 = Phenylboronsäure (□), 2 = *para*-Nitrophenol (■), 3 = Triphenylessigsäure (▲), 4 = Essigsäure (△), 5 = *para*-Toluolsulfonsäure (○), 6 = Diphenylphosphinsäure (●).

3.1.4. Verwendungform des Enzyms

Proteine sind in den meisten organischen Lösungsmitteln so gut wie unlöslich,^[28] und wenn sie sich doch lösen, wie in Dimethylsulfoxid und Dimethylformamid, dann verlieren sie ihre ursprüngliche Konformation.^[29] Daher liegen Enzyme ohne eine spezielle Vorbehandlung in organischen Medien gewöhnlich in Form zweiphasiger Fest-flüssig-Suspensionen vor. Dies vereinfacht die Trennung von Katalysator und Produkt sowie die Wiederverwendung des Enzyms.

Der einfachste Weg, einen Biokatalysator für den Einsatz in organischen Lösungsmitteln vorzubereiten und gleichzeitig Schlüsselparameter wie pH-Wert und assozierte Ionen einzustellen, ist die Lyophilisierung oder die Fällung des Enzyms aus wässrigen Lösungen (beispielsweise durch die Zugabe von Aceton). Bei solchen Enzympräparationen ist allerdings oft die Diffusion eingeschränkt, oder es werden Enzym-Substrat-

Wechselwirkungen durch Protein-Protein-Stapelung verhindert. Die Verwendung kleiner Enzympartikel, die durch vorhergehende Behandlung mit Ultraschall erhalten wurden, und heftiges Schütteln oder Rühren während der Reaktion sind erforderlich, um diese Nachteile auszugleichen. In einigen Fällen wurde Ultraschall auch während der Reaktion eingesetzt, was zu deutlich höheren Reaktionsgeschwindigkeiten führte.^[30] Die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeiten wurde auf eine Vergrößerung der verfügbaren Katalysatoroberfläche (bessere Dispersion) und auf lokale hohe Drücke zurückgeführt.^[30b] Dass Aggregation die Enzymeffizienz einschränken kann, wurde auch durch den Befund nahegelegt, dass die Aktivitäten von Chymotrypsin und Subtilisin in Ethanol invers mit der Konzentration dieser Enzyme korreliert sind.^[31] Russell und Mitarbeiter berechneten die Rolle des internen und externen Massentransfers und fanden, dass die Diffusionseinschränkungen in organischen Lösungsmitteln suspendierter Enzympartikel zunehmen, wenn Enzymaktivität und Partikelgröße anwachsen.^[32]

Die Enzymlyophilisierung in Gegenwart von Liganden, Lyoprotektiva (diverse Zucker, Polyethylenglycol), Salzen und micellaren Amphiphilen erbrachte oftmals Enzympräparationen, die bedeutend aktiver waren als solche, die ohne Additive erhalten wurden.^[20d, 33] Zum Verständnis derartiger Ergebnisse wurden mehrere Erklärungen bemüht, wie das „Fixieren“ des Enzyms in einer aktiveren Konformation (bei Liganden und micellaren Amphiphilen),^[33a,f] das Verhindern einer teilweisen, durch die Lyophilisierung induzierten Denaturierung, die in organischen Lösungsmitteln irreversibel wird (Lyoprotektiva),^[33c] der Schutz gegen Desaktivierung durch direkten Kontakt mit dem Lösungsmittel (Salze),^[33d] die Retention der Wasserhülle um das Enzym (Sorbit)^[33e] oder eine verstärkte Dispersion des Katalysators im Medium (diverse Additive).^[20d]

Die Adsorption an festen Matrices, die zumindest bei optimalen Protein/Träger-Verhältnissen die Enzymverteilung verbessert, verringert Diffusionsbeschränkungen und begünstigt den Zugang des Substrats zu einzelnen Enzymmolekülen. Matrices von unterschiedlicher Partikelgröße, Porosität und Zusammensetzung (Celite, Glas mit einheitlicher Porosität, Polyamid, Polypropylen, Aluminiumoxidhydrat, Kieselgel, Zirconiumoxidhydrat) wurden eingesetzt und ihr Für und Wider ausgewertet.^[34] Eine gemeinsame Eigenheit ist, dass für jedes Enzym und jede Matrix ein optimales Enzym/Träger-Verhältnis für das Auftreten von Aktivität existiert. Abbildung 5 illustriert das Verhalten der Lipase aus *Pseudomonas* sp., adsorbiert auf Celite.^[34b] Wenn die Reaktionsgeschwindigkeit pro Gewichtseinheit Gesamtmaterial betrachtet wird, so wird die maximale Aktivität bei einer Enzymbeladung von 150 mg pro g Celite erlangt und blieb bei weiterer Beladung konstant (Abbildung 5a). Auch die Reaktionsgeschwindigkeit pro Gewichtseinheit Lipase hat ihr Maximum bei einer Enzymbeladung von 150 mg pro g Celite, danach fällt sie ab (Abbildung 5b). Diese Daten legen nahe, dass das Enzym bei niedriger Beladung Konformationsänderungen und Inaktivierung erfährt, die durch starke Wechselwirkungen mit der Matrix hervorgerufen werden,^[35] während bei hoher Beladung Diffusionsbeschränkungen oder verhinderter Zugang des Substrats zur aktiven Gruppe des

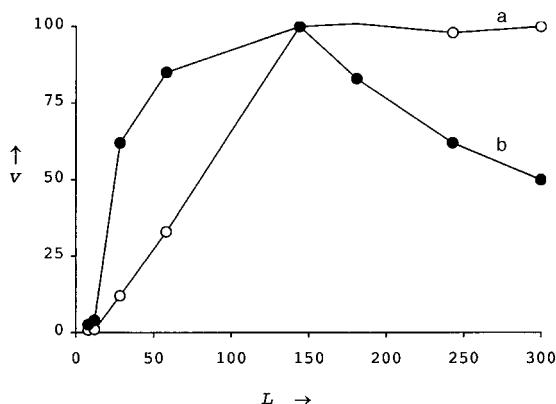


Abbildung 5. Umesterungsgeschwindigkeit v mit auf Celite adsorbierter Lipase aus *Pseudomonas cepacia* als Funktion der Enzymbeladung L (in mg Enzym pro g Celite). Die relative Geschwindigkeit ist einmal auf mg Gesamtmaterial (Lipase plus Celite, a) und einmal auf mg Lipase allein (b) bezogen. Es wurde die Umesterung von Vinylacetat mit (\pm)-Sulcatol untersucht.

Enzyms dessen Effektivität vermindern. Die Inaktivierung bei niedriger Enzymbeladung kann vermieden werden, indem man die Immobilisierung in Gegenwart von Fremdprotein (Albumin, Gelatine, Kasein) oder Polyethylenglycol durchführt.^[34c]

Immobilisierte Lipasen mit hervorragender Aktivität und Stabilität wurden durch Einschluss der Enzyme in hydrophoben Sol-Gel-Materialien erhalten.^[36] Mit dieser Methode sollte es möglich sein, maßgeschneiderte Gele für jede Lipase zu erzeugen, indem man Parameter wie die Art der Silanmonomere und die Wasser/Silan-Stöchiometrie variiert. Als sehr robuste, dabei allerdings ziemlich teure Katalysatoren für Reaktionen in organischen Lösungsmitteln haben sich mit Glutaraldehyd vernetzte Enzymkristalle (cross linked enzyme crystals, CLEC) herausgestellt.^[37] Zahlreiche CLEC-Katalysatoren (z.B. Thermolysin, Subtilisin, Penicillin-Acylase und Lipasen aus *Candida rugosa* und *Pseudomonas cepacia*) sind bereits im Multi-kg-Maßstab produziert worden.^[37]

Um Einschränkungen der Substratdiffusion zu minimieren und die Verteilung des Enzyms zu maximieren, wurde auf zahlreichen Wegen versucht, Biokatalysatoren in organischen Lösungsmitteln zu solubilisieren. Die am weitesten verbreitete Methode fußt auf der kovalenten Verknüpfung des amphiphilen Polymers Polyethylenglycol (PEG) mit Enzymmolekülen. Für eine Vielzahl solcher PEG-Enzym-Komplexe konnte gezeigt werden, dass sie in organischen Lösungsmitteln transparente Lösungen ergeben.^[20d, 38] Transparente Enzymlösungen können auch mit nichtkovalenten PEG-Enzym-Komplexen erhalten werden, die einfach hergestellt werden, indem man das Enzym in Gegenwart von PEG im Überschuss lyophilisiert.^[39] In beiden Fällen war die Aktivität in organischen Lösungsmitteln oftmals ausgezeichnet.^[38, 39]

Enzymkomplexe mit anionischen oder nichtionischen Tensiden, die sich in organischen Lösungsmitteln lösen, wurden von mehreren Gruppen beschrieben.^[40] So zeigten Chymotrypsin und Subtilisin, komplexiert mit Aerosol OT (Bis(2-ethylhexyl)natriumsulfosuccinat in Wasser (10 Gew.-% Tensid aufs Wasservolumen bezogen)) und gelöst in Isooctan in Abwesenheit inverser Micellen, k_{kat} -Werte, die nahezu ein

bzw. zwei Drittel so hoch wie in gepufferter wässriger Lösung waren.^[40a] Entsprechend fand man, dass die lipidumhüllte Lipase aus *Pseudomonas fragi* (Lipase B) bei der Veresterung von 1-Phenylethanol in Isooctan doppelt so aktiv war wie das PEG-geprägte Enzym und einhundertmal aktiver als das Enzympulver (Abbildung 6).^[40d]

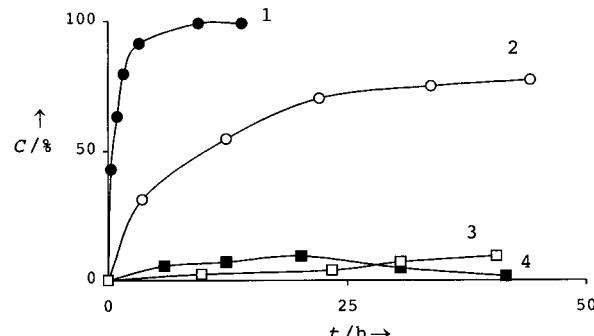


Abbildung 6. Estersynthese aus (R)-1-Phenylethanol und Laurylsäure in wasserfreiem Isooctan bei 40°C, katalysiert durch lipidumhüllte Lipase B (1, ●), PEG-geprägte Lipase B (2, ○), Lipase B in einer Wasser-in-Öl-Emulsion (3, □) sowie direkt dispergiertes Lipase-B-Pulver (4, ■). Auf der Ordinate ist der Umsatz von (R)-1-Phenylethanol aufgetragen.

Die Aktivitäten unterschiedlich vorbehandelter Lipasen aus *Pseudomonas cepacia* in Tetrachlorkohlenstoff wurden verglichen (Tabelle 3).^[39b] Dabei ergab sich, dass die aktivste Form die in einer Sol-Gel-Matrix eingeschlossene und die am wenigsten aktiven Formen die kristallisierte und die vernetzte Lipase waren. Hier sollte erwähnt werden, dass die von der Sol-Gel-Lipase gezeigte Aktivität in Tetrachlorkohlenstoff – mit *n*-Octanol und Vinylacetat als Substraten – sogar noch größer war als die von der gleichen Menge Lipase bei der Hydrolyse von Tributyrin in Wasser gezeigte.^[39b]

Tabelle 3. Relative Aktivität unterschiedlich vorbehandelter Lipase aus *Pseudomonas cepacia* in Tetrachlorkohlenstoff.

Enzymform ^[a]	Aktivität ^[b]
Sol-Gel-AK-PC	100
CLEC-PC	2
PEG + PC	30
rohes PC	9
PEG-PC	37

[a] Die Abkürzungen stehen für Lipase, eingeschlossen in einer Sol-Gel-Matrix (Sol-Gel-AK-PC), lyophilisiert in Gegenwart von PEG (PEG + PC), kovalent an PEG gebunden (PEG-PC), kristallisiert und vernetzt (CLEC-PC) sowie als rohes Pulver eingesetzt (rohes PC). [b] Jeweils auf die gleiche Menge Lipase bezogen.

3.1.5. Bioreaktoren

Durch Enzyme katalysierte Transformationen in organischen Lösungsmitteln werden im Labormaßstab gewöhnlich in nicht kontinuierlich zu betreibenden Batch-Reaktoren unter Verwendung von Enzympulvern oder adsorbierten Enzymen und unter ständigem Schütteln oder Rühren durchgeführt. Die Wasseraktivität und der pH-Wert werden zu Beginn durch Äquilibrierung mit gesättigten Salzlösungen bzw. durch Lyophilisierung oder Fällung des Katalysators aus

einem geeigneten Lösungsmittel eingestellt. Allerdings werden a_w und pH-Wert während der Reaktion üblicherweise nicht ständig überwacht.

Das Überführen von Bioreaktionen in organischen Lösungsmitteln in den großtechnischen Maßstab und ihr Optmieren werden seit vielen Jahren untersucht, wie durch die Entwicklung der Festbett- und Membranreaktoren (mit mikroporösen Membranen) in den achtziger Jahren für die kontinuierlichen, Lipase-katalysierten wechselseitigen Veresterungen^[41a,b] oder die Synthese von Glyceriden^[41c] demonstriert wird. In neuerer Zeit wurden Festbettreaktoren mit immobilisierten Lipasen und Proteasen auch für die Produktion von Feinchemikalien und optisch aktiven Verbindungen wie 2-(4-Chlorphenoxy)propionsäure,^[42a] von metallorganischen Zwischenstufen^[42b] und verschiedenen Synthesebausteinen eingesetzt. Die pulverförmige Lipase aus *Pseudomonas cepacia* wurde auch in einem Mikrofiltrations-Membranreaktor zur kontinuierlichen Auftrennung des schleimlösenden Mittels (\pm)-*trans*-Sobrerol eingesetzt.^[42c]

Ein Doppelkernreaktor mit gepacktem Bett, der eine Steuerung von a_w über Salzpaare erlaubt, wurde für die durch *Candida rugosa* katalysierte Veresterung von Decansäure mit Dodecanol entwickelt.^[43a] Die Salzhydrate befanden sich nur im inneren Kern, und das Enzym – in einem makroporösen Polypropylenträger immobilisiert – befand sich im äußeren Kern des Reaktors, der kontinuierlich mit der Substratmischung beladen wurde. Eine vollständige Umsetzung, wenn auch unterschiedlich schnell, wurde mit a_w -Pufferung bei 0.48 und 0.80 durch Verwendung der Salzhydrate von $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ bzw. Na_2HPO_4 erreicht. Eine kontinuierliche a_w -Steuerung, in diesem Fall über gesättigte Salzlösungen, wurde für einen Hohlfaserreaktor mit gepacktem Bett beschrieben,^[43b] der für enzymatische Veresterungen in Hexan eingesetzt wurde. In einem weiteren Ansatz wurde die im Kilogramm-Maßstab durchgeführte und durch die Lipase aus *Candida antarctica* katalysierte Synthese von (Z)-3-Hexen-1-ylacetat durch das Entfernen des gebildeten Wassers über eine azeotrope Destillation erleichtert.^[43c]

3.2. Enzymstabilität und -struktur

Eine Vielzahl an Studien ergab, dass so verschiedene Enzyme wie Schweinepankreas-Lipase (PPL),^[44a] Chymotrypsin,^[44b,f] Terpen-Cyclase,^[44c] ATPase und Cytochrom-Oxidase^[44d,e] sowie Ribonuclease und Lysozym^[44f] in organischen Lösungsmitteln thermostabiler sind als in Wasser. So blieb etwa PPL über viele Stunden aktiv (Halbwertszeit über 12 Stunden), wenn sie bei 100 °C in einem nahezu wasserfreien Gemisch aus Heptanol und Tributyrin inkubiert wurde (Abbildung 7).^[44a] In Gegenwart von 0.8 Gew.-% Wasser war die Stabilität bereits geringer, und in einem wässrigen Puffer oder in Wasser erfolgte die Inaktivierung beinahe sofort. Die hohe thermische Stabilität von Enzymen in organischen Lösungsmitteln, besonders in hydrophoben Solventien und bei niedrigem Wassergehalt, wurde einer starreren Konformation zugeschrieben sowie dem Fehlen fast all jener Reaktionen in Wasser, bei denen kovalente Bindungen gebildet werden und die eine irreversible Thermoaktivierung zur Folge haben.^[44f]

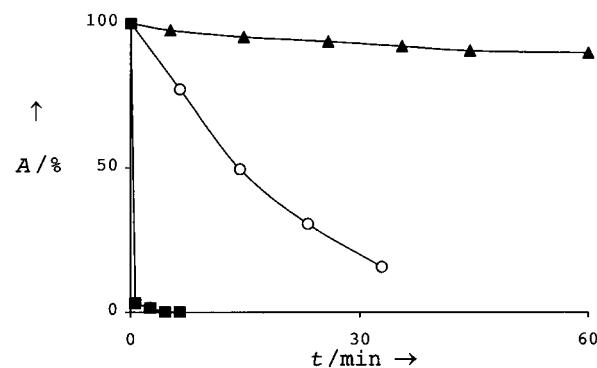


Abbildung 7. Abfall der Aktivität A von getrockneter Schweinepankreas-Lipase bei 100 °C in Wasser oder 0.1M Phosphatpuffer (■) sowie in einer 2M Lösung von Heptanol in Tributyrin mit 0.8 (○) oder 0.015 Gew.-% Wasser (▲).

Es sei hier auch erwähnt, dass – wie eine FTIR-spektroskopische Untersuchung an Lysozym und Subtilisin ergeben hat – die Struktur in reinen organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril, Tetrahydrofuran und 1-Propanol viel eher der des nativen Enzyms entspricht als die in Wasser-Lösungsmittel-Gemischen.^[45] Dieses Verhalten wurde als kinetisch kontrolliert erkannt, also zurückzuführen auf eine inhärente Einschränkung der konformativen Proteinbeweglichkeit in wasserfreien Medien im Gegensatz zu wässrig-organischen Lösungsmittelgemischen.^[45a] Verbesserungen der Enzymstabilität (und -aktivität) in wässrig-organischen Medien wurden durch „rationelles“ Design^[45b] und gerichtete Evolution^[45c] erzielt.

Ein direktes Bild der Enzymkonformation in organischen Lösungsmitteln lieferten Röntgenstrukturanalysen vernetzter Kristalle von Subtilisin in Acetonitril^[46a] und von γ -Chymotrypsin in Hexan.^[46b] Die Subtilisinstruktur in Acetonitril war im Wesentlichen identisch mit der dreidimensionalen Struktur des Enzyms in Wasser; die Unterschiede waren geringer als bei zwei unabhängig voneinander bestimmten Strukturen in wässriger Lösung.^[46a] Kristallines γ -Chymotrypsin behielt seine native Konformation in Hexan und konnte Hydrolyse- wie auch Synthesereaktionen im organischen Lösungsmittel katalysieren. Allerdings war seine Beweglichkeit eingeschränkt und die Konformation der Seitenketten signifikant verändert.^[46b] Eine Studie des Wasserstoffisotopenaustauschs mit Hilfe hochauflöster NMR-Spektroskopie wiederum ergab, dass die Struktur des Trypsininhibitors aus dem Rinderpankreas durch Lösungsmittel wie Acetonitril, Tetrahydrofuran, Essigester und Butanol nur wenig beeinflusst wird.^[47] Außerdem enthüllte eine Hammett-Analyse – eine Methode, die Informationen über Zwischenstufen von Reaktionen liefert –, dass der Übergangszustand einer Subtilisin-katalysierten Reaktion in Wasser und in organischen Lösungsmitteln der gleiche ist.^[48]

Neben Enzympulvern und -kristallen wurden auch andere Enzymformen auf ihre Stabilität und Struktur in organischen Lösungsmitteln untersucht. Kovalent an PEG gebundenes Subtilisin war weniger stabil und anfälliger für Autolyse in Acetonitril und Dioxan – worin es löslich war – als das entsprechende Enzympulver. Seine Konformation in Wasser und Dioxan war nach den Ergebnissen der Messung des

Circulardichroismus und der intrinsischen Proteinfluoreszenz identisch.^[20d, 49] Subtilisin, das durch Ionenpaarbildung mit einem in niedriger Konzentration vorliegenden anionischen Tensid solubilisiert war, war in Octan drei Größenordnungen stabiler als in Wasser, während es in Tetrahydrofuran innerhalb von 10 min 99 % seiner Aktivität verlor.^[50]

Die Beziehung zwischen Hydratisierung, katalytischer Aktivität und Proteindynamik wurde von mehreren Gruppen untersucht.^[51] Eine Deuterium-Festkörper-NMR-Studie an α -lytischer Protease, suspendiert in organischen Lösungsmitteln, ergab, dass die Hydratisierung die Enzymflexibilität erhöhte.^[51a] Allerdings konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der konformativen Flexibilität und der Dielektrizität des Solvens oder der katalytischen Aktivität festgestellt werden. Spätere Arbeiten – EPR-Untersuchungen^[51b] und zeitaufgelöste Messung der Fluoreszensanisotropie^[51c] – wiesen klar auf eine direkte Korrelation zwischen Proteinhydratisierung und konformativer Flexibilität sowie Aktivität hin. Eine 1998 erschienene Arbeit wies durch Festkörper-¹H-NMR-Spektroskopie nach, dass die Enzymflexibilität und -aktivität zum größten Teil eine Funktion der thermodynamischen Wasseraktivität sind und nicht der Lösungsmitteldielektrizität.^[51d]

3.3. Enzymselektivität

Die Fähigkeit von Enzymen, für ein breites Spektrum von organischen Reaktionen als selektive Katalysatoren zu wirken, ist seit vielen Jahren bekannt und genutzt.^[1] Trotzdem ist in vielen Fällen die (Enantio-, Regio- und Prochiralitäts-)Selektivität der Enzyme unbefriedigend, weswegen eine Reihe von Techniken entwickelt wurde, um diese Beschränkungen zu überwinden. Zu Verbesserungen der Selektivität führten unter anderem Modifizierungen der Enzyme (z.B. durch In-vitro-Evolution^[52a]), Substrate und Reaktionsbedingungen (Temperatur, Lösungsmittel und sogar Druck).^[52b] In dieser Übersicht sollen nur die Einflüsse der Lösungsmittel, die den hier untersuchten Systemen eigen sind, betrachtet werden.

3.3.1. Medium-Engineering

Der Ausdruck Medium-Engineering, der sich auf die Möglichkeit bezieht, Enzymeigenschaften durch Änderung des Lösungsmittels, in dem die Reaktion durchgeführt wird, zu beeinflussen, wurde von Klibanov und Mitarbeitern geprägt, die damit eine Alternative zum oder auch eine Vervollständigung des Protein-Engineering bezeichneten.^[53a] In einer großen Zahl an Veröffentlichungen wurde beschrieben, dass die Enantio-, Prochiralitäts- und Regioselektivität von Enzymen – manchmal bemerkenswert weitgehend – durch die Art des organischen Lösungsmittels, das als Reaktionsmedium eingesetzt wird, beeinflusst werden kann (Übersichten in Lit. [53]). Im Folgenden sollen einige Beispiele von Lösungsmittelleffekten betrachtet und die möglichen Deutungen diskutiert werden.

Es sei hier erwähnt, dass die Enantioselektivität eines Enzyms allgemein als Enantiomerenverhältnis E ausgedrückt

wird, das als Verhältnis der Spezifitätskonstanten k_{cat}/K_m der beiden Enantiomere definiert ist. Gleichungen, die das Enantiomerenverhältnis zum Wert des Enantiomerenüberschusses des Reagens oder des Produkts in Beziehung setzen, wurden für kinetische Enantiomerentrennungen entwickelt.^[7c] Natürlich gilt, je größer das Enantiomerenverhältnis ist, desto größer ist auch der Enantiomerenüberschuss des Produkts und des verbliebenen Substrats.

Tabelle 4 ist zu entnehmen, wie sich bei der Enantiomerenentrennung von (\pm) -1-Phenylethanol die Enantioselektivität von Subtilisin als Funktion der Art des Lösungsmittels ändert. Das Enantiomerenverhältnis E fällt von 61 in Dioxan auf 3 in

Tabelle 4. Enantioselektivität E von Subtilisin bei der Umesterung von (\pm) -1-Phenylethanol in verschiedenen organischen Lösungsmitteln und deren Dielektrizitätskonstanten ϵ_r .

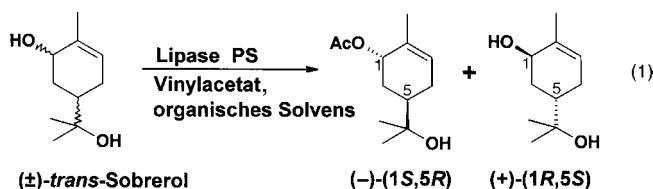
Lösungsmittel	ϵ_r	E
Dioxan	2.2	61
Dimethylformamid	36.7	9
Benzol	2.3	54
Nitromethan	35.9	5
Triethylamin	2.4	48
Acetonitril	35.9	3
Tetrahydrofuran	7.6	40
<i>N</i> -Methylacetamid	191.3	3
Pyridin	12.9	31

N-Methylacetamid und zeigt eine inverse Korrelation mit der Dielektrizitätskonstanten des Lösungsmittels.^[54a] Der Einfluss des Lösungsmittels auf die Prochiralitätsselektivität der Lipase aus *Pseudomonas* sp. sei mit der Monohydrolyse von 2-(1-Naphthoylamino)trimethylendibutyrat illustriert (Tabelle 5). In diesem Fall scheint die Enzymselektivität ungefähr invers mit der als $\lg P$ ausgedrückten Hydrophobie des Lösungsmittels korreliert zu sein.^[54b] Das Ergebnis der Trennung des schleimlösenden Mittels (\pm) -*trans*-Sobrerol durch die Lipase aus *Pseudomonas cepacia* [Gl. (1)] in

Tabelle 5. Einfluss der Hydrophobie $\lg P$ des Lösungsmittels auf die Prochiralitätsselektivität S der Lipase aus *Pseudomonas* sp. bei der Monohydrolyse von 2-(1-Naphthoylamino)trimethylendibutyrat.

Lösungsmittel	$\lg P$	$S^{[a]}$
Nitrobenzol	1.8	>30
Acetonitril	-0.33	>30
Aceton	-0.23	18
Cyclohexanon	0.96	18
Butanon	0.29	16
2-Pantan	0.80	16
Chloroform	2.0	9.9
Tetrahydrofuran	0.49	9.1
2-Hexanon	1.3	8.8
Dioxan	-1.1	5.4
<i>tert</i> -Butylacetat	1.7	5.3
<i>tert</i> -Butylalkohol	0.80	4.9
<i>tert</i> -Amylalkohol	1.4	4.8
Triethylamin	1.6	4.7
Toluol	2.5	3.5
Benzol	2.0	3.2
Tetrachlorkohlenstoff	3.0	2.6

[a] Definiert als das Verhältnis der Geschwindigkeiten, mit denen die Enantiomere gebildet werden, das identisch mit dem Verhältnis der Konzentrationen der Enantiomere in der Lösung ist.

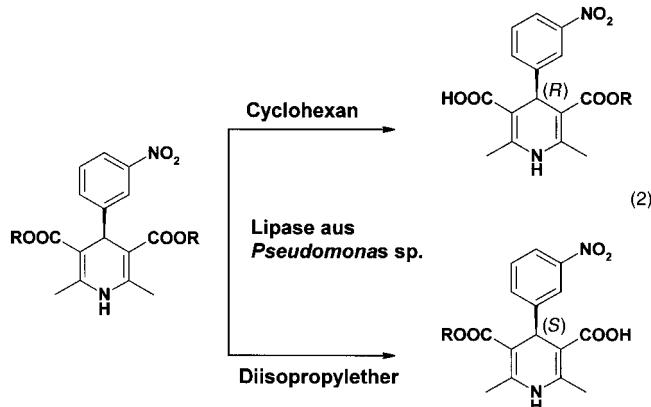


verschiedenen Lösungsmitteln ist in Tabelle 6 gezeigt; hier wurde keine Korrelation zwischen der Enantioselektivität des Enzyms und physikochemischen Parametern der Lösungsmittel gefunden, die sich auf Hydrophobie oder Polarität beziehen.^[54c]

Tabelle 6. Racematspaltung von (±)-trans-Sobrerol [Gl. (1)]: Optimierung der Enantioselektivität E durch Variation des Lösungsmittels.

Lösungsmittel	$\lg P$	ϵ_r	E
tert-Amylalkohol	1.4	5.8	518
3-Pentanon	0.80	17	212
Dioxan	-1.1	2.2	178
Aceton	-0.23	20.6	142
Vinylacetat	0.31	-	89
Tetrahydrofuran	0.49	7.6	69

Ein besonders bestechendes Beispiel für den Lösungsmitteleinfluss auf die Selektivität und stereochemische Präferenz eines Enzyms ist das von Hirose et al. berichtete.^[54d] In der durch Lipase aus *Pseudomonas* sp. katalysierten Desymmetrisierung von prochiralen Dihydropyridindicarboxylaten [Gl. (2)] wurden in wassergesättigtem Diisopropylether die



(S)-Monoester mit Enantiomerenüberschüssen bis zu 99 % erhalten, während in wassergesättigtem Cyclohexan bevorzugt die (R)-Isomere (88–91 % ee) gebildet wurden (Tabelle 7). Im Hinblick auf die Regioselektivität ist die von *Pseudomonas-cepacia*-Lipase katalysierte Butanolyse von 1,4-Dibutyryloxy-2-octylbenzol in zahlreichen organischen Lösungsmitteln ein interessantes Beispiel.^[55a] In Cyclohexan

Tabelle 7. Asymmetrische Hydrolyse von Dihydropyridindicarboxylaten [Gl. (2)]: Einfluss des Lösungsmittels auf die stereochemische Präferenz.

R	Lösungsmittel	Konfiguration	ee [%] des Halbesters
<i>t</i> BuC(O)OCH ₂	Cyclohexan	R	88.8
<i>t</i> BuC(O)OCH ₂	Diisopropylether	S	> 99
EtC(O)OCH ₂	Cyclohexan	R	91.4
EtC(O)OCH ₂	Diisopropylether	S	68.1

etwa desacetylierte die Lipase bevorzugt die 4-O-Butanoatfunktion, wogegen in Acetonitril die 1-Butanoatgruppe Vorrang hatte. Auch bei der Unterscheidung zwischen den Hydroxygruppen von Phenyl-6-*O*-trityl- β -D-glycopyranosiden erwies sich dieses Enzym als abhängig vom Lösungsmittel.^[55b]

3.3.2. Erklärungsversuche

Die bislang publizierten Daten (siehe oben sowie die Übersichten in Lit. [53]) haben gezeigt, dass für eine Modifizierung oder Verbesserung der Enzymselektivität das Medium-Engineering eine gute und bequeme Alternative zum Protein-Engineering und zur zeitaufwendigen Suche nach neuen Katalysatoren ist. Mehrere Theorien zur Deutung dieses Phänomens wurden formuliert. Beispielsweise könnte das Lösungsmittel – abhängig von seiner Polarität – die Enzymkonformation modifizieren und auf diese Weise die Selektivität durch eine Veränderung des molekularen Erkennungsprozesses zwischen Substrat und Enzym beeinflussen.^[54a] Nach einer anderen Theorie hängt die Selektivität von der Energetik der Substratsolvatisierung ab,^[54b] wogegen ein drittes Modell auf der Vorstellung beruht, dass Lösungsmittelmoleküle im aktiven Zentrum binden und, abhängig von ihrer Struktur, mit der Assozierung oder der Umwandlung eines Enantiomers stärker interferieren als mit der des anderen.^[54d, 56]

Allerdings sind sowohl die Hypothesen auf der Grundlage physikochemischer Eigenschaften als auch die auf der Lösungsmittelstruktur beruhenden hinsichtlich ihres Vorhersagewertes unbefriedigend. Sie scheinen entweder nur für das jeweils betrachtete Enzym und Substrat gültig zu sein,^[53a] oder es ist – wenn Lösungsmittel-Enzym-Komplexe angenommen werden – überhaupt keine Verallgemeinerung möglich, weil sehr viele Komplexe denkbar sind und sich jeder in Abhängigkeit von der Art des Substrats unterschiedlich verhalten könnte.^[53b]

Es wurde auch ein theoretisches Modell basierend auf der Thermodynamik der Substratsolvatisierung entwickelt.^[57a,b] Dieses Modell, das die Bestimmung des desolvatisierten Anteils des Substrat-Übergangszustands durch Molecular Modeling und die Berechnung der Aktivitätskoeffizienten durch UNIFAC impliziert, ergab jedoch widersprüchliche Ergebnisse. So war es bei der Vorhersage des Lösungsmitteleinflusses auf die Prochiralitäts- und Enantioselektivität von γ -Chymotrypsin gegenüber 2-substituierten 1,3-Propandiolen^[57a] und racemischem 3-Hydroxy-2-phenylpropionat^[57b] erfolgreich, während es im Fall von Subtilisin bei racemischem *sec*-Phenethylalkohol und *trans*-Sobrerol versagte.^[57c]

Gegenwärtig scheint keine Gemeinsamkeit zwischen den verschiedenen Hypothesen zu existieren, obgleich es wahrscheinlich ist, dass das Lösungsmittel die enzymatische Selektivität über mehr als einen Mechanismus beeinflusst.

4. Anwendungen in der Synthese

Die Anfänge einer detaillierten Untersuchung des Verhaltens von Enzymen in organischen Lösungsmitteln findet man

vor etwa fünfzehn Jahren. Seither sind die enthusiastischen Aussagen der Pioniere der Biokatalyse in nichtnatürlichen Medien experimentell in einer Reihe von Forschungsgruppen überprüft worden. Insbesondere hat es sich als zutreffend erwiesen, dass mit vielen Enzymen in organischen Lösungsmitteln gearbeitet werden kann, wobei allerdings je nach Enzymklasse unterschiedliche Hydratisierungsniveaus benötigt werden, damit die Enzyme ihre katalytische Aktivität oder wenigstens einen Teil davon behalten. Hinzu kommt, dass, obwohl einige Enzyme zu wirklich erstaunlichen Ergebnissen führen können, sich aus praktischer Sicht nur wenige Klassen dieser Biokatalysatoren (wie Lipasen, Proteasen, Oxynitrilasen und ein paar weitere Enzyme) als präparativ nützlich herausgestellt haben. Diese Enzyme sollen in den folgenden Abschnitten vorgestellt werden.

Andere Enzyme, darunter Dehydrogenasen und Glycosidasen, haben trotz ihrer präparativen Bedeutung bislang nur beschränkte oder gar keine praktische Anwendung gefunden. Dies liegt hauptsächlich daran, dass sie entweder auf polare Substrate oder Coenzyme wirken, die in organischen Lösungsmitteln schwerlöslich sind, oder von diesen Lösungsmitteln deaktiviert oder inhibiert werden. Eine weitere Beschränkung erwächst aus der Tatsache, dass viele Biokatalysatoren nach wie vor zu teuer oder gar nicht erst kommerziell erhältlich sind.

4.1. Hydrolasen

Durch Hydrolasen katalysierte Reaktionen überwiegen bei weitem bei den publizierten Biotransformationen in organischen Lösungsmitteln. In der Natur existieren zahlreiche Gruppen von Hydrolasen, aber nur zwei davon sind in nichtnatürlichen Medien breit genutzt worden: Lipasen – vor wenigen Jahren als „fettspaltende“ Esterasen umdefiniert^[58] – und Proteasen. Diese Enzyme wurden in Labors auf der ganzen Welt eingesetzt und werden mittlerweile als gewöhnliche chemische Reagentien betrachtet. Die Ursachen dieses Erfolgs liegen in der Verfügbarkeit dieser Proteine von verschiedenen kommerziellen Anbietern zu vernünftigen Preisen, in ihrer einfachen Handhabung (sie benötigen keine empfindlichen und/oder teuren Cofaktoren) sowie in ihrer Stabilität und Wirkungsbreite begründet. Aus chemischer Sicht können Lipasen und Proteasen in organischen Lösungsmitteln als milde und selektive Reagentien betrachtet werden, die in der Lage sind, Carboxylate zu aktivieren und in eine große Zahl von Nucleophilen zu überführen. Eine Reihe von Übersichten in Zeitschriften und Büchern wurde bereits speziellen präparativen Anwendungen dieser Enzyme gewidmet. Die neuesten davon finden sich in den Überschriften der folgenden Abschnitte.

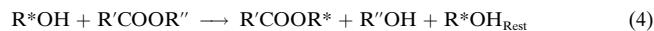
4.1.1. Enantioselektivität von Hydrolasen

Der wachsende Bedarf pharmazeutischer und agrochemischer Unternehmen an enantiomerenreinen Verbindungen war sicherlich eine Triebkraft für den Einsatz der Hydrolasen in der Synthese, wobei die am häufigsten wiederkehrende Anwendung die kinetische Racemattrennung ist.

Wie in Abschnitt 3.3.1 erläutert, kann die Enantioselektivität eines Enzyms anhand des „Enantiomerenverhältnis *E*“ beurteilt werden. Außer als das Verhältnis der Spezifitätskonstanten für die zwei konkurrierenden Enantiomere kann *E*, wie einige befruchtende Publikationen zeigten, sowohl für irreversible^[59] als auch für reversible Reaktionen^[60] einfacher aus dem Umwandlungsgrad (*c*) und dem Enantiomerenüberschuss der Produkte (*ee_P*) und der verbliebenen Substrate (*ee_S*) berechnet werden.

4.1.1.1. Kinetische Racematspaltung von Alkoholen^[1c–e, 7c, 61]

Die kinetische Racematspaltung von Alkoholen kann durch enzymkatalysierte Veresterung [Gl. (3)] oder, üblicher, durch Umesterung [Gl. (4)] erreicht werden.



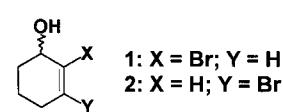
Da die achirale Alkoholkomponente *R''OH* des Acyltransferagens *R'COOR''* vom Enzym verwendet werden kann, um die Umkehrreaktion zu katalysieren, wobei die optische Reinheit der Produkte erniedrigt wird, müssen die Acyltransferagentien so ausgewählt werden, dass sie irreversible Umwandlungen ermöglichen.^[62] Dieses Ziel wird erreicht, wenn die Abgangsgruppe *R''OH* ein schwaches Nucleophil ist, und entsprechend wurden zunächst halogenierte Alkohole wie Trichlor- und Trifluorethanol verwendet.^[63] Später wurden dann Oxime^[64] und Anhydride^[65] vorgeschlagen, aber die Reagentien der Wahl für die kinetische Racematspaltung von Alkoholen in organischen Lösungsmitteln sind mittlerweile Enolester wie Vinyl- und Isopropenylacetat.^[66]

Die reichhaltigen Literaturangaben unterstützen den Anfänger, der sich erstmals einer enzymkatalysierten kinetischen Racematspaltung nähert. Trotzdem erfordert das Fehlen von Vorhersagemodellen allgemeiner Gültigkeit immer noch ein Durchprobieren der kommerziell erhältlichen Hydrolasen. Wie Tabelle 8 beispielhaft belegt, war die Lipase aus *Mucor*

Tabelle 8. Enantioselektivität *E* verschiedener Lipasen bei der Acetylierung von **1** und **2** in Vinylacetat.

Lipase aus	<i>E</i> -Werte für 1	<i>E</i> -Werte für 2
<i>Pseudomonas cepacia</i>	6	44
Schweinepankreas	34	24
<i>Chromobacterium viscosum</i>	6	26
<i>Mucor miehei</i>	78	15
<i>Humicola lanuginosa</i>	40	18
<i>Penicillium camemberti</i>	7	2
<i>Candida rugosa</i>	16	6

miehei der beste Katalysator für die kinetische Racematspaltung des cyclischen Allylalkohols **1**.^[67] Das Enzymverhalten kann selbst bei strukturell verwandten Substraten unterschiedlich sein, und entsprechend erwies sich die Lipase aus *Pseudomonas cepacia* unter den in Tabelle 8 aufgeführten als der beste Katalysator für die kinetische Racematspaltung des Allylalkohols **2**. Die optisch angereicherten Alkohole **1** und **2**



wie auch verwandte cyclische Allylalkohole wurden dann als chirale Synthesebausteine für die Herstellung von Alkaloiden über eine 1,3-Claisen-Umlagerung unter Erhaltung der Chiralität eingesetzt.^[67] Hunderte von Publikationen befassen sich in ähnlicher Weise mit der chemoenzymatischen Synthese von komplexen Verbindungen aus chiralen Synthesebausteinen, die durch kinetische Racematspaltung erhalten wurden.

Sobald einmal das beste verfügbare Enzym identifiziert ist, besteht gewöhnlich die Gelegenheit, die Enantioselektivität mit den in Abschnitt 3.3 beschriebenen Techniken zu verbessern. Gewöhnlich ist der empfindlichste und am leichtesten zu manipulierende Parameter das organische Lösungsmittel. Dies belegen die *E*-Werte für die Racematspaltung von *trans*-Sobrerol unter Verwendung der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* in Tabelle 6: Sie stiegen von 69 in THF auf mehr als 500 in *tert*-Amylalkohol.^[54c] In diesem Lösungsmittel gelang die „ideale“ kinetische Racematspaltung, da die enzymatische Reaktion bei 50 % Umwandlung spontan aufhörte, als das (–)-(1*S,5R*)-Enantiomer vollständig acyliert war.

Da es nahezu unmöglich ist, alle Beispiele von kinetischen Racematspaltungen bei primären und sekundären Alkoholen aufzuzählen, sollen nur einige spezielle Anwendungen in einem der folgenden Abschnitte diskutiert werden (Abschnitt 4.1.4). Die steigende Zahl untersuchter Substrate führte inzwischen zu Überlegungen über Modelle für die aktiven Zentren verschiedener Lipasen, um die bislang gesammelten Daten zu deuten und die Selektivität für neue Substrate vorherzusagen.

Was die sekundären Alkohole betrifft, ist eine Erweiterung der Prelog-Regel für die Lipasen aus *Pseudomonas cepacia* (mittlerweile als Lipase aus *Burkholderia cepacia*, BCL, reklassifiziert) und aus *Candida rugosa* (CRL) vorgeschlagen worden (Abbildung 8a).^[68] Diese empirische Regel macht eine Voraussage darüber, welches Enantiomer schneller reagiert und nutzt dafür die relativen Größen der Substituenten am Stereozentrum; sie wurde auch für andere kommerziell erhältliche Lipasen (aus *Mucor miehei*,^[69] *Arthrobacter*^[70] und *Aspergillus niger*^[71]) und Proteasen^[72] vorgeschlagen. Die „Kazlauskas-Regel“ für BCL ist auf primäre Alkohole erweitert worden (Abbildung 8b),^[73] obwohl sie bei Alkoholen mit einem Sauerstoffsubstituenten am Stereozentrum nicht immer verlässlich ist. 1997 wurde für dieselbe Lipase ein höher entwickeltes, dreidimensionales Modell des aktiven Zentrums vorgeschlagen,^[74] während eindeutige Schlüsse bezüglich der chiralen Präferenz von CRL aus den Röntgen-

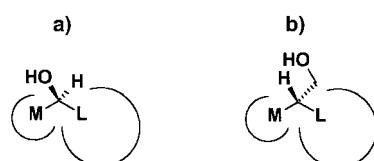
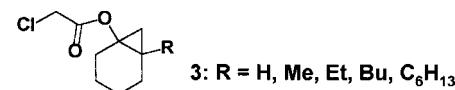


Abbildung 8. Empirische Regeln, die die Enantioselektivität von BCL und CRL bei sekundären Alkoholen (a) und die Enantioselektivität von BCL bei primären Alkoholen (b, kein Sauerstoffatom mit dem Stereozentrum verknüpft) zusammenfassen.

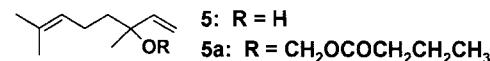
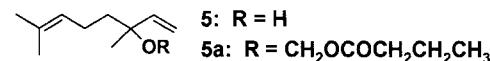
ten am Stereozentrum; sie wurde auch für andere kommerziell erhältliche Lipasen (aus *Mucor miehei*,^[69] *Arthrobacter*^[70] und *Aspergillus niger*^[71]) und Proteasen^[72] vorgeschlagen. Die „Kazlauskas-Regel“ für BCL ist auf primäre Alkohole erweitert worden (Abbildung 8b),^[73] obwohl sie bei Alkoholen mit einem Sauerstoffsubstituenten am Stereozentrum nicht immer verlässlich ist. 1997 wurde für dieselbe Lipase ein höher entwickeltes, dreidimensionales Modell des aktiven Zentrums vorgeschlagen,^[74] während eindeutige Schlüsse bezüglich der chiralen Präferenz von CRL aus den Röntgen-

strukturdaten von kovalenten Komplexen dieses Enzyms mit Übergangszustandsanologa für die Hydrolyse von Menthylestern gezogen werden konnten.^[75] Da alle bislang überprüften Lipasen und Esterasen die Hydrolyse des gleichen Enantiomers von Menthol (1*R*) katalysieren, ist es wahrscheinlich, dass Merkmale, die allen diesen Enzymen gemeinsam sind, für die beobachtete Enantioselektivität verantwortlich sind. Eine Kombination von empirischen Regeln, die auf Daten zu den Substraten und Daten, die mit hochauflösender Röntgenstrukturanalyse der Enzyme erhalten wurden, beruhen, wird vermutlich in der Lage sein, präparative Anwendungen dieses Verfahrens effektiv zu unterstützen.

Schließlich bleibt noch zu erwähnen, dass aus sterischen Gründen Hydrolasen normalerweise keine Umwandlungen von tertiären Alkoholen – weder in organischen Lösungsmitteln noch in wässrigen Lösungen – katalysieren. Eine Ausnahme bilden die Chloressigsäureester **3**, deren Propanolyse in Isopropylether durch die Lipase aus *Mucor miehei* katalysiert mit *E*-Werten im Bereich von 13 bis 38 gelang,



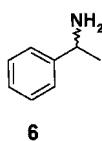
wobei der optisch aktive Alkohol mit der absoluten (1*S,6S*)-Konfiguration erhalten wurde.^[76] Die (wenigen) anderen Berichte beziehen sich auf die Hydrolyse von Estern in wässrigen Lösungen, die unterschiedliche Mengen an organischen Cosolventien enthielten, und sind daher nicht Gegenstand dieser Übersicht. Allerdings verdient der von Turner et al. vorgeschlagene Ansatz für die Racematspaltung des Alkohols **4** Erwähnung, der auf die Einführung einer räumlichen Trennung zwischen dem chiralen quartären Kohlenstoffatom und der Esterfunktion, die während der Reaktion gespalten werden muss, hinausläuft. In ihrem Beispiel verringerte die Bildung des Oxalatesters **4a** die sterische Hinderung



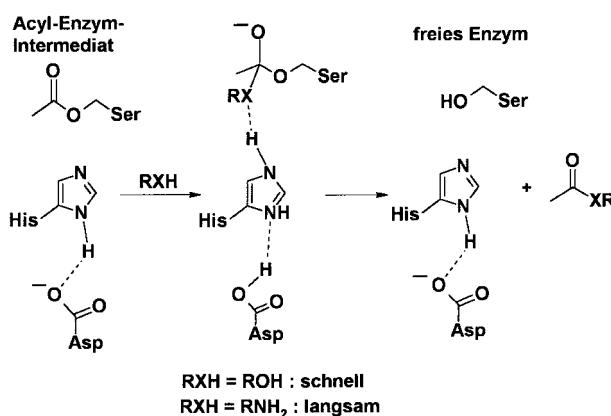
im Molekül und machte es so zu einem für mehrere Lipasen geeigneten Substrat.^[77a] In einem ähnlichen Ansatz wurde die stereoselektive Alkoholyse des Butanoyloxymethylidervats **5a** von Linalool **5** durch die Einwirkung der Lipase aus *Candida rugosa* erreicht.^[77b]

4.1.1.2. Kinetische Racematspaltung von Aminen und Thiolen^[1c-e, 61]

Verglichen mit den Hydrolase-katalysierten Racematspaltungen von acylierten Alkoholen sind entsprechende Ansätze



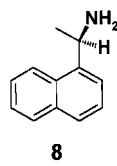
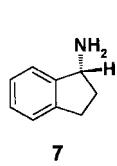
6  bei racemischen Aminen und Thiolen eher selten. In der ersten Publikation zu diesem Thema^[78] wurde die kinetische Racematspaltung von Aminen (z.B. α -Methylbenzylamin **6**), katalysiert durch die Protease Subtilisin, durch Modulierung des organischen Mediums beschrieben. Später wurde die Spezifität von drei Lipasen genutzt – aus *Candida antarctica* (CALB),^[79] *Pseudomonas cepacia*^[80] und *Pseudomonas aeruginosa*.^[81] Dabei entwickelte sich CALB zu der am meisten eingesetzten. Vergleicht man die experimentellen Literaturangaben, so ist offensichtlich, dass die Lipase-katalysierte Aminolyse von Estern größere Mengen an Enzym und längere Reaktionszeiten benötigt als die entsprechende Alkoholyse, zugleich aber im Allgemeinen die Produkte mit höheren *ee*-Werten liefert. Eine plausible Erklärung für dieses Phänomen sei anhand von Schema 1 abgeleitet.^[82] Die Geschwindigkeit der Protonenübertragung



Schema 1. Spaltung eines Acyl-Enzym-Intermediats durch Einwirkung von Alkoholen oder Aminen.

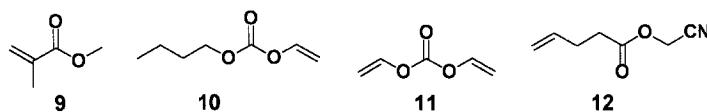
vom Acylacceptor (RNH_2 bzw. ROH) auf die His-Gruppe der katalytischen Triade während des nucleophilen Angriffs auf den Acyl-Enzym-Komplex ist wahrscheinlich für ein neutrales Amin geringer, das ja eine signifikant höhere Säuredissociationskonstante hat als der entsprechende Alkohol. Die höhere Enantioselektivität wiederum kann erklärt werden, wenn man die geringe Reaktivität der gebildeten Amide als Substrate für die Lipase bedenkt (diese Enzyme hydrolysieren in Wasser keine Peptidbindungen). Trotz des Umstands, dass energischere experimentelle Bedingungen notwendig sind, ist die Lipase-katalysierte Racematspaltung von Aminen gegenwärtig die erfolgreichste Anwendung der Enzymkatalyse in organischen Lösungsmitteln (siehe Abschnitt 4.1.4).

Es wurde darauf hingewiesen,^[72] dass Proteasen und Lipasen entgegengesetzte Enantioselektivitäten aufweisen. Entsprechend wurde die Protease Subtilisin für die Produktion der pharmazeutisch wichtigen Zwischenstufe (*R*)-1-

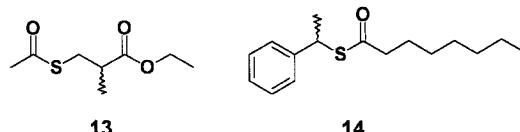


Aminoindan **7** und des für Racematspaltungen verwendeten (*R*)-1-(1-Naphthyl)ethylamins **8** verwendet.^[83] Mit Hilfe eines Durchflussreaktors, der das Enzym für die kinetische

Racematspaltung dieser Verbindungen an porösen Glasperlen adsorbiert enthielt, wurden bis zu 330 g racemisches **7** und 1.6 kg racemisches **8** aufgetrennt, wobei 132 g **7** (40% Ausbeute bezogen auf das Racemat, 98% *ee*) bzw. 560 g **8** (nach Kristallisation des entsprechenden Hydrochlorids, 35% Ausbeute, >99% *ee*; 95% *ee* vor der Kristallisation) erhalten wurden. Schließlich verdiensten noch einige Publikationen Erwähnung, in denen die enzymatische Racematspaltung von Aminen mit Acrylestern (z. B. **9**),^[84a] Vinylcarbonaten (z. B. **10**),^[84b] Homocarbonaten (z. B. **11**)^[84c] und Cyanmethylpent-4-enat (**12**)^[84d] als Acyldonoren beschrieben werden. Diese Beispiele zeigen bereits die vielseitige Kombinierbarkeit der Hydrolasen mit Acyldonoren, eine Eigenschaft, auf die in Abschnitt 4.1.2 näher eingegangen wird.



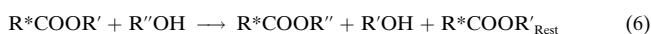
Nur wenig Beachtung fand bislang die enzymatische Racematspaltung von Thiolen. Die Lipasen aus Schweinepankreas und *Pseudomonas cepacia* katalysierten die regio- und chemoselektive Alkoholyse des Thioesters **13** zum entsprechenden Thiol mit der (*R*)-Konfiguration.^[85] Genauso



wurde der Thiooctansäureester **14** als Acyldonor in einer von CALB katalysierten Reaktion eingesetzt, wobei das entsprechende (*R*)-Thiol mit >95 % *ee* erhalten wurde.^[86] Die direkte enzymatische Acylierung der racemischen Thiole gelang nicht, aus Gründen, die offenbar mit dem Mechanismus der Enzymkatalyse zusammenhängen. Tatsächlich ist ja, was die Spaltung des tetraedrischen Intermediats (siehe Schema 1) betrifft, in diesem Fall das Thiol die beste Abgangsgruppe, da es weniger basisch ist als die Serin-Hydroxygruppe im aktiven Zentrum des Enzyms.

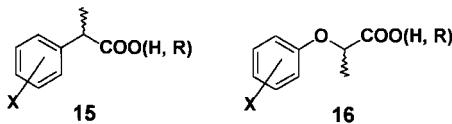
4.1.1.3. Kinetische Racematspaltung von Carbonsäuren^[1c-e, 61]

Prinzipiell können Carbonsäuren in organischen Medien auf zwei Wegen in Enantiomere getrennt werden: durch eine Hydrolase-katalysierte Veresterung der Säure mit einem Alkohol [Gl. (5)] oder durch Umesterung eines Esters mit einem Alkohol [Gl. (6)]. Auch Aminolysreaktionen mit einem geeigneten Amin wurden vorgeschlagen [Gl. (7)].



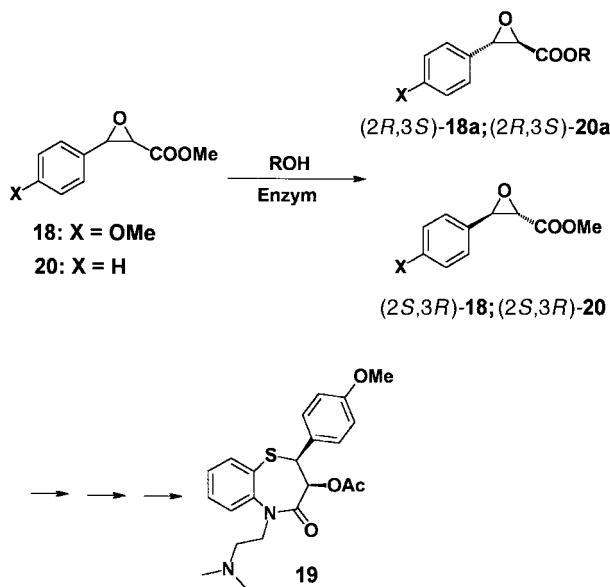
Der Großteil der Arbeiten widmete sich dabei der Trennung von α -Arylpropionaten **15** und α -Aryloxypropionaten **16**, wobei die ersten nichtsteroidale Entzündungshemmer

sind (z.B. Naproxen und Ibuprofen) und die zweiten eine wichtige Herbizidklasse bilden. Die (*S*)-Enantiomere von **15** zeigen therapeutische Effekte, und die (*R*)-Enantiomere von **16** (die nebenbei den Verbindungen (*S*)-**15** strukturell ähneln) sind als Herbizide aktiv.



Einer der allerersten Berichte befasste sich mit der durch die Lipase aus *Candida rugosa* katalysierten enantioselektiven Veresterung von α -halogensubstituierten Carbonsäuren

17, R = Alkyl, Aryl, X = Cl, Br, *p*-ClC₆H₄O, in Hexan.^[87] Diese Reaktion wurde bis zur Pilotproduktion vergrößert.^[88] Klibanov et al.^[89] haben verschiedene Strategien verglichen, um eine kinetische Racematspaltung von 2-(4-Chlorphenoxy)propionsäure **16a**, X = *p*-Cl, zu erreichen. Als bester Ansatz stellte sich die Umesterungsreaktion heraus ([Gl. (6), R' = Me, R'' = Bu]. Ein weiteres Beispiel für diese Methodik ist die kinetische Racematspaltung beim *trans*-Glycidsäuremethylester **18**, dessen (*2R,3S*)-Enantiomer **18a** eine Vorstufe des Calciumkanal-Inhibitors Diltiazam **19** ist (Schema 2). Sie gelang mit in Hexan/BuOH 9/1 suspendiertem *α*-Chymotrypsin^[90] oder durch Einwirkung der Lipase aus

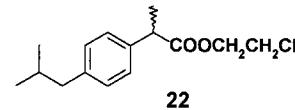
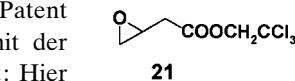


Schema 2. Enzymatische kinetische Racematspaltung von *trans*-Phenylglycidate estern.

Candida rugosa, suspendiert in *tert*-Amylalkohol mit etwas *n*-Octanol (37% Ausbeute, 88% ee für das verbliebene **18a**).^[91] Analog wurde der racemische Glycidsäuremethylester **20** durch Einwirkung der Lipase aus *Mucor miehei* in Hexan in Gegenwart von *i*BuOH aufgetrennt (*E* = 33, 42% Ausbeute, 95% ee für (−)-**20**, 43% Ausbeute, 95% ee für das (+)-Enantiomer).^[92] Beide Enantiomere wurden dann weiterverarbeitet, um die C-13-Seitenkette von Taxol zu erhalten.

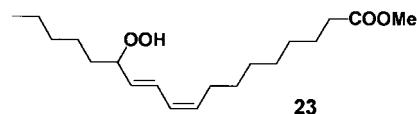
Ein Nachteil aller Umesterungen ist die Ähnlichkeit der Substrate und Produkte, was zu Reaktionsgemischen führt, die Verbindungen mit gleichartigen physikalischen Eigenschaften enthalten. Als Folge können beim Überführen derartiger Reaktionen in den technischen Maßstab ernste Probleme auftreten, wenn eine chromatographische Reinigung vermieden werden soll. Eine elegante Lösung dieses Problems war die Verwendung von Polyethylenglycol als Nucleophil in der Alkoholyse des Epoxybutanoats **21** – einer (*R*)-Carnitin-Vorstufe.^[93] Ein weiterer Lösungsansatz wird in einem Patent beschrieben, das sich wieder mit der Racematspaltung von **18** befasst: Hier wurde 4-Hydroxybuttersäure als Nucleophil verwendet, dazu die Lipase aus einer *Alcaligenes*-Spezies.^[94] Der entsprechende Ester **18a** (R = CH₂CH₂CH₂COOH) konnte vom nicht umgesetzten **18** getrennt werden, indem das Reaktionsgemisch mit einer mild alkalischen Lösung gewaschen wurde.

Die durch die Lipase B aus *Candida antarctica* katalysierte Aminolyse des 2-Chlorethylesters von Ibuprofen (**22**) ist ein gutes Beispiel für den in Gleichung (7) beschriebenen Prozess.^[95] Die Verwendung von NH₃ als Nucleophil erhöhte die Enantioselektivität der Reaktion gegenüber der enzymatischen Alkoholyse bedeutend (*E* = 28 bzw. 3, Lösungsmittel *tert*-Butylalkohol). Die Lipasen aus *Candida antarctica* (SP435) und aus *Humicola*-Spezies (SP398) scheinen für diese Reaktion besonders effektiv zu sein, da sie hohe NH₃-Konzentrationen (bis zu 2.5 M) tolerieren. Hinzu kommt, dass viele Amide in organischen Lösungsmitteln nur wenig löslich sind und daher während der Reaktion ausfallen, was ihre Isolierung erleichtert.



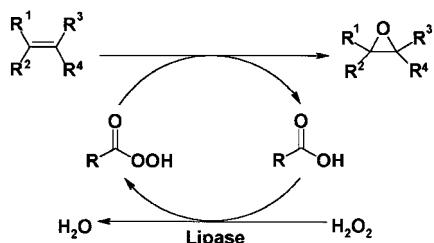
4.1.1.4. Kinetische Racematspaltung von Hydroperoxiden und Lipase-vermittelte Bildung von Peroxycarbonsäuren

Hydroperoxide können von in organischen Lösungsmitteln suspendierten Hydrolasen als Nucleophile akzeptiert werden. Die kinetische Racematspaltung von Hydroperoxiden (z.B. **23**) mit der Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* wurde



beschrieben,^[96] wobei auch die spontane Zersetzung acylierter Hydroperoxide in Carbonsäure und Keton genutzt wurde. Beispielsweise wurde in Cyclohexan als Lösungsmittel (*S*)-1-Phenethylhydroperoxid bei einem Umsatz von 60% enantiomerenrein hergestellt.

In einem interessanten Ansatz wurden immobilisierte Lipasen verwendet, um Peroxycarbonsäuren in einem geeigneten organischen Lösungsmittel direkt aus der jeweiligen Carbonsäure und Wasserstoffperoxid zu erzeugen. Diese unter sehr milden Reaktionsbedingungen gebildeten Peroxycarbonsäuren können unmittelbar für die nichtstereoselektive Epoxidierung von Alkenen verwendet werden (Schema 3).^[97]

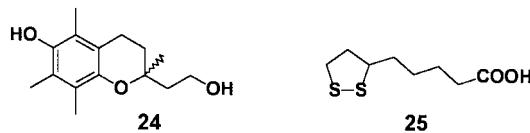


Schema 3. Chemoenzymatische Epoxidierung von Alkenen durch enzymatisch erzeugte Peroxycarbonsäuren.

4.1.1.5. Kinetische Racematspaltung von Verbindungen mit einem „entfernten“ Stereozentrum

In allen bislang beschriebenen Beispielen wirkte die Enzymselektivität an einem Stereozentrum, das dem Ort der Katalyse unmittelbar benachbart war. Allerdings kann ein Enzym jedes Stereozentrum eines Substrats erkennen, egal wie weit es von der katalytisch wichtigen Position entfernt ist, da ja die gesamte Bindungstasche des Enzyms chiral ist. Diese Eigenschaft ist in präparativer Hinsicht sehr ansprechend, da das Einstellen der Konfigurationen solcher von den eingesetzten chiralen Auxiliarien oder Katalysatoren entfernter Stereozentren bei nichtenzymatischen Methoden ein noch immer ungelöstes Problem darstellt. Trotzdem ist die Wirkung entfernter chiraler Zentren auf die Stereoselektivität von Hydrolasen nicht besonders intensiv untersucht worden, und daher wurden auch nicht viele Beispiele veröffentlicht.^[1]

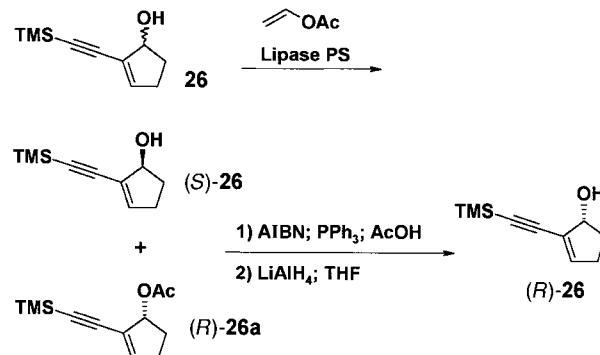
Ein Beispiel für derartige Umsetzungen in organischen Lösungsmitteln ist die kinetische Racematspaltung der Verbindung **24** – einer Vorstufe des α -Tocopherol-Analogons MDL-73404. Die enzymatische Acylierung von **24** unter Katalyse mit einer Lipase aus einer *Pseudomonas*-Spezies (Lipase B, Sapporo) ermöglichte die Isolierung des reinen (*S*)-Enantiomers von **24** in 36 % Ausbeute.^[98] Ein weiteres Beispiel ist die enzymatische stereoselektive Veresterung



racemischer α -Lipoinsäure **25** – einer Verbindung, in der die Carbonsäurefunktion und das Stereozentrum vier C-Atome auseinander liegen – mit Hilfe der Lipase aus *Candida rugose*.^[99] Es wurden mehrere Alkohole ausprobiert und dabei die besten Ergebnisse mit *n*-Hexanol erzielt.

4.1.1.6. Dynamische kinetische Racematspaltung^[100]

Der Hauptnachteil der bisher beschriebenen kinetischen Racematspaltungen ist, dass die maximal erzielbare Ausbeute an einem Stereoisomer auf 50 % begrenzt bleibt. Ein möglicher Ansatz, diese Einschränkung zu überwinden, ist die chemische Weiterbehandlung des Reaktionsgemisches, das bei der enzymatischen Acylierung erhalten wurde. So erwies sich die Inversion des verbliebenen Alkohols mittels des Mitsunobu-Protokolls als recht erfolgreich, wie in Schema 4



Schema 4. Chemoenzymatische kinetische Racematspaltung von **26**. AIBN = Azobisisobutyronitril.

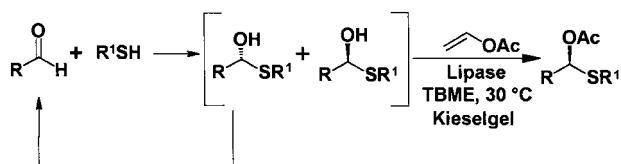
beispielhaft gezeigt wird. Reduktion des Acetats (+)-(*R*)-**26a** mit LiAlH₄ ergab den Alkohol (+)-(*R*)-**26** in einer optischen Reinheit von 87.5 % ee, die durch ein einziges Umlkristallisieren auf über 99 % ee gesteigert werden konnte (73 % Gesamtausbeute bezogen auf den racemischen Alkohol **26**).^[101]

Ein komplementärer Ansatz ist die „dynamische kinetische Racematspaltung“ (DKR).^[100] Dieser Prozess ist eine Art asymmetrische Umwandlung zweiter Ordnung^[102] und umfasst alle Prozeduren, die eine In-situ-Racemisierung des Substrats vor der enantioselektiven Reaktion erlauben, so dass im Prinzip das Ausgangsmaterial quantitativ in ein einziges Stereoisomer des Produkts umgewandelt werden kann. Damit eine DKR effektiv sein kann, muss sich das Gleichgewicht zwischen den Isomeren der Reaktanten rasch einstellen, wodurch die Entfernung eines Isomers zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird (Schema 5). Da das Enzym während der ganzen Reaktion immer ein racemisches Substrat vor sich hat, wird die optische Reinheit des Produkts unabhängig vom Umsatz und hängt nur vom Enantiomerenverhältnis *E* ab [Gl. (8)].

$$ee = \frac{E - 1}{E + 1} \quad (8)$$

Die Kinetik der DKR wurde 1993 beschrieben,^[103] und einige zum Thema dieser Übersicht gehörende Beispiele wurden veröffentlicht. Die In-situ-Racemisierung vollzieht sich ebenfalls durch Bindungsbruch und -bildung, und diese wurden entweder durch Nutzen der Acidität eines an ein bestimmtes Stereozentrum gebundenen Protons oder durch Bilden eines Stereozentrums aus achiralen Vorläufern erreicht. Letzteres war bei der DKR von Cyanhydrinen^[104] (siehe Abschnitt 4.1.2) und Halbthioacetalen der Fall.^[105]

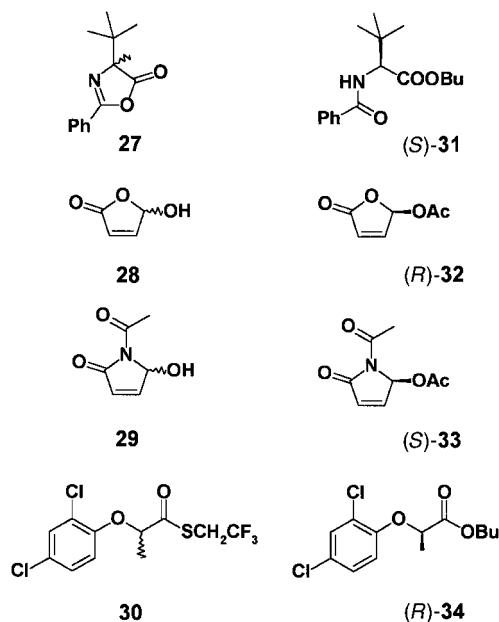
Wie in Schema 6 gezeigt, wurden Thiole und Aldehyde vermischt, um racemische Halbthioacetale zu bilden, von denen im Wesentlichen jeweils nur ein Enantiomer durch die Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* unter den gegebenen Reaktionsbedingungen acyliert wurde. Die Racemisierung der unumgesetzten Halbthioacetale wurde durch einen Kie-



Schema 6. Enzymvermittelte DKR eines epimerisierenden Halbthioacetals.

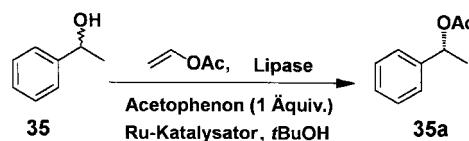
selgel-katalysierten Dissoziations-Rekombinations-Prozess erreicht. Am besten verlief die Umsetzung bei den Substituenten $R = \text{AcOCH}_2$, $R^1 = n\text{-Octyl}$: Das acetylierte (*S*)-Halbthioacetal wurde in 85% Ausbeute und mit >95% *ee* erhalten.

Die Verbindungen **27–30** sind einige der ein labiles Stereozentrum enthaltenden Moleküle, die erfolgreich einer DKR unterworfen wurden. Die Alkoholyse des Dihydrooxazolons **27**, katalysiert durch Lipozym, konnte bis zu Ansatzgrößen von 200 g L^{-1} durchgeführt werden, und das Produkt



(*S*)-**31** wurde nach 24 h bei einem Umsatz von 96% mit 97% *ee* erhalten.^[106] Durch Wahl der richtigen Lipase konnte das Acetat (*R*)-**32** bei einem Umsatz von 90% enantiomerenrein (>99% *ee*) erhalten werden,^[107] ebenso das Acetat (*S*)-**33** (>99% *ee* bei einem Umsatz von 99% nach 18 h).^[107a] Die Alkoholyse des Thioesters **30** unter Katalyse mit Lipase PS ergab den Butylester (*R*)-**34** bei einem Umsatz von 99% mit 75% *ee*.^[108]

Erst vor wenigen Jahren gelangen DKRs durch geeignete Kombination von Enzymen mit Übergangsmetallen.^[107b, 109] Um solche Reaktionen nutzen zu können, muss natürlich eine weitere Bedingung erfüllt sein, nämlich, dass der metallorganische Katalysator das Enzym hinsichtlich Selektivität und Reaktivität nicht beeinflusst. Als Erstes wurde der sekundäre Modellalkohol **35** in Gegenwart der Lipase aus einer *Pseudomonas*-Spezies und eines geeigneten Rutheniumkatalysators bei einem Umsatz von 60% nach 72 h mit 98% *ee* zum (*R*)-Acetat **35a** acetyliert (Schema 7).^[110] Me-



Schema 7. DKR mit einer Kombination von Übergangsmetall und Enzym.

chanistisch verläuft die Racemisierung des nichtumgesetzten Alkohols über seine temporäre Oxidation, die durch das Übergangsmetall in Gegenwart eines Ketons (Acetophenon) katalysiert wird. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen (ein anderer Rutheniumkatalysator und die Verwendung von *p*-Chlorphenylacetat als Acyldonor) ermöglichte die Isolierung von **35a** in 92% Ausbeute und mit >99.5% *ee*.^[111]

Die Lipase-katalysierte DKR von Aminen in Gegenwart von Palladiumkatalysatoren wurde ebenfalls publiziert.^[112] Beispielsweise wurde N-acyliertes Phenylmethylamin mit 99% *ee* bei 75–77% Umsatz erhalten.

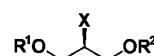
4.1.1.7. Enzymatische Desymmetrisierung von prochiralen und *meso*-Substraten^[113]

Die enzymatische DKR ist ohne Zweifel ein sehr attraktiver Prozess, aber Racemisierung und Racematspaltung erfordern in der Regel miteinander nicht vereinbare Reaktionsbedingungen. Nur durch Auffinden der benötigten feinen Balance zwischen diesen beiden Reaktionen kann eine solche DRK erreicht werden, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben ist.

Ein vielseitiger Ansatz, enantiomerenreine Produkte in quantitativer Ausbeute zu erhalten, ist die Nutzung einer weiteren Eigenschaft der Hydrolasen – ihrer Fähigkeit, enantiotope Gruppen von prochiralen oder *meso*-Verbündungen zu unterscheiden. Hinzu kommt als weiterer Vorteil dieses Vorgehens, dass, unabhängig vom stereochemischen Ergebnis der enzymatischen Desymmetrisierung, einfach beide Enantiomerenreihen zugänglich sind. Zu derartigen Desymmetrisierungen sind bereits detaillierte Übersichten erschienen,^[113] weshalb im Folgenden nur einige Beispiele präsentiert werden.

Bei den prochiralen Substraten wurde zunächst die synthetische Vielseitigkeit von 2-Methyl-1,3-propandiol **36** und seinen Äquivalenten ($X = \text{Alkyl, Benzyl, Aryl, Alkenyl}$) erkannt, und eine ausschließlich ihrer Herstellung, enzymatischen Desymmetrisierung und Anwendung in der Synthese gewidmete Übersicht ist verfügbar.^[114] So wurde die durch Schweinepankreas-Lipase katalysierte Desymmetrisierung des Diols **37** im 40-g-Maßstab durchgeführt.^[115] Das Monobutanoat **38**, das mit 97.6% *ee* in rund 74% Ausbeute erhalten wurde, war eine Schlüsselzischenstufe in der Synthese der beiden Enantiomere des Monocarbamats **39**, Metaboliten des antiepileptischen Wirkstoffs Felbamat **40**.

An C-2 monosubstituierte Malonate sind mit **36** verwandte Verbindungen. Eine versuchte enzymatische De-



36: $X = \text{Me}; R^1 = R^2 = \text{H}$

37: $X = \text{Ph}; R^1 = R^2 = \text{H}$

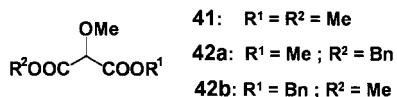
38: $X = \text{Ph}; R^1 = \text{H}; R^2 = \text{COPr}$

39a: $X = \text{Ph}; R^1 = \text{H}; R^2 = \text{CONH}_2$

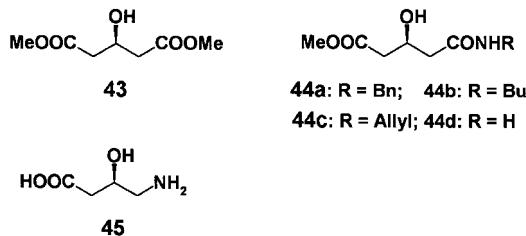
39b: $X = \text{Ph}; R^1 = \text{CONH}_2; R^2 = \text{H}$

40: $X = \text{Ph}; R^1 = R^2 = \text{CONH}_2$

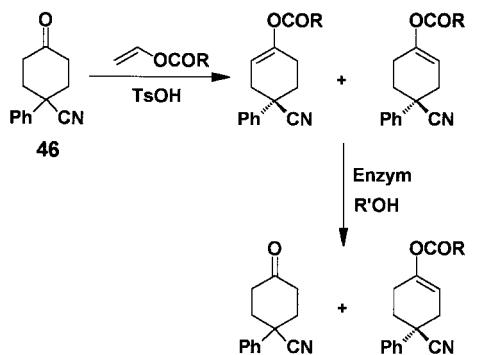
symmetrisierung von **41** unter wässrigen Bedingungen scheiterte, da das Methin-H im aktivierten Halbesterprodukt rasch und unter Racemisierung austauscht. Dagegen ermöglichte die Verwendung von Enzymen in organischen Lösungsmitteln die Herstellung beider – optisch labiler – Enantiomere **42a** und **42b** und ihre Umwandlung in konformationsstabile Verbindungen.^[116]



Die Aminolyse oder Ammonolyse des zu **36** homologen Dimethyl-3-hydroxyglutarats **43**, katalysiert durch die Lipase aus *Candida antarctica* in Dioxan, verlief ebenso hoch enantioselektiv, und die entsprechenden enantiomerenreinen Amide (*R*)-**44** wurden nahezu quantitativ isoliert.^[117] Zur Demonstration des präparativen Nutzens der optisch aktiven Verbindungen (*R*)-**44** wurde eine davon ((*R*)-**44d**) weiter zur biologisch aktiven (*R*)-4-Amino-3-hydroxybuttersäure ((*R*)-GABOB **45**) umgesetzt.



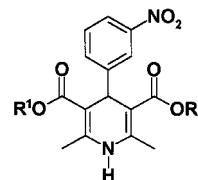
Bei den cyclischen Verbindungen wurde über die Desymmetrisierung des prochiralen Ketons **46** durch enzymatische enantioselektive Hydrolyse seiner Enolester in mit Wasser gesättigtem organischem Lösungsmittel berichtet (Schema 8).^[118]



Schema 8. Desymmetrisierung des prochiralen Ketons **46**.

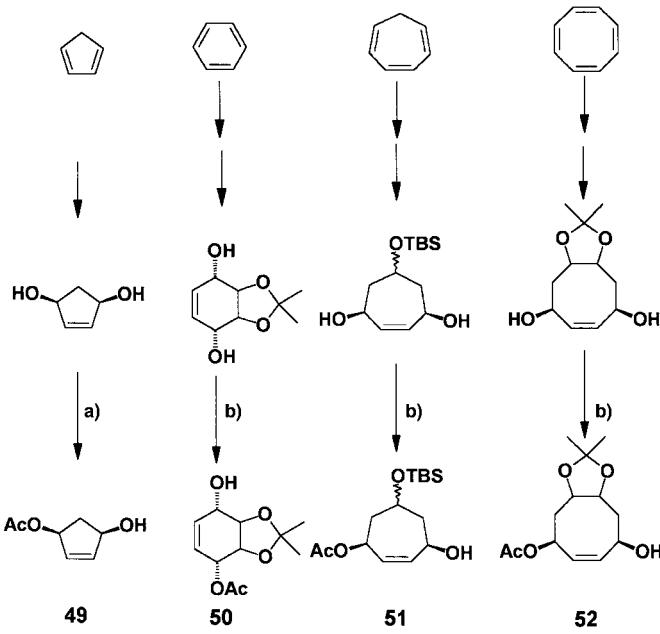
Bei der Desymmetrisierung prochiraler Verbindungen darf die brillante Umsetzung der prochiralen 1,4-Dihydropyridine **47** nicht unerwähnt bleiben.^[119] Wie bereits früher diskutiert wurde,^[54d] können die beiden Enantiomere (*S*)-**48** und (*R*)-**48** entweder mit der gleichen Lipase (Lipase AH) durch Modulierung des Reaktionsmediums (*iPr*₂O für (*S*)-**48** und Cyclohexan für (*R*)-**48**) oder im gleichen Lösungsmittel durch

Verwendung zweier verschiedener Lipasen (Lipase AH für (*S*)-**48** und Lipase PS für (*R*)-**48**) erhalten werden. Interessanterweise verhielt sich eine mutierte Lipase PS, bei der lediglich drei Aminosäuren durch ortsspezifische Mutagenese ausgetauscht waren, gleichartig wie die Wildtyp-Lipase AH.^[119]

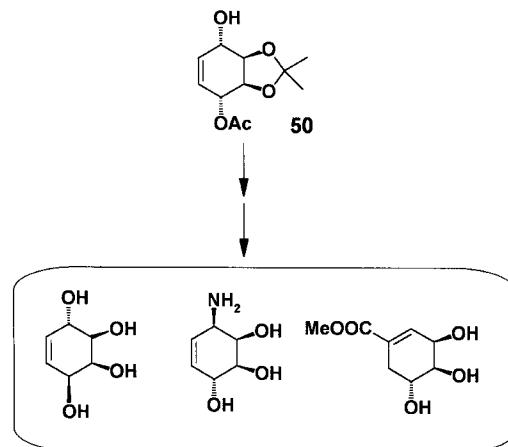


47: R¹ = R² = CH₂OCO*t*Bu
(R)-48: R¹ = H; R² = CH₂OCO*t*Bu
(S)-48: R¹ = CH₂OCO*t*Bu; R² = H

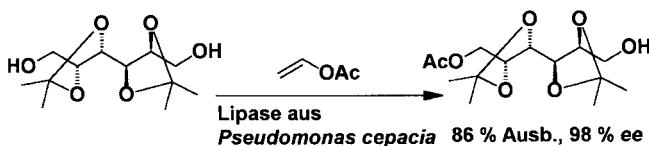
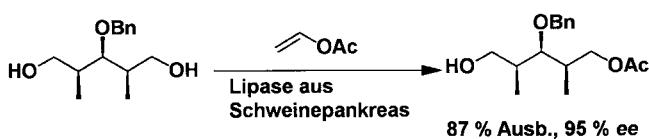
Schema 9 zeigt beispielhaft die Desymmetrisierung einiger cyclischer *meso*-Diole (Produkte **49**–**52**),^[113a,b] und Schema 10 stellt einige der aus dem Synthesebaustein **50** erhaltenen Verbindungen vor. Auch über die enzymatische Desymmetrisierung von acyclischen *meso*-Polyolen wurde viel geschrieben.^[113b] Zwei willkürlich ausgewählte Beispiele^[120, 121] sind in Schema 11 wiedergegeben.



Schema 9. Desymmetrisierung von cyclischen *meso*-Diolen mit Isopropenylacetat als Acyllieferant. Eingesetzte Enzyme: a) Novozym 435, b) Lipase aus *Pseudomonas cepacia*.



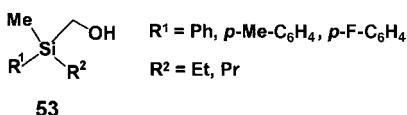
Schema 10. Durch konventionelle chemische Weiterumsetzung des enzymatisch erzeugten Monoacetats **50** erhaltene Verbindungen.



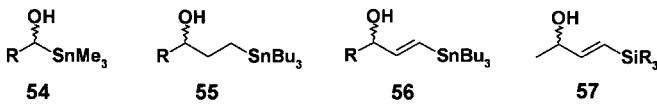
Schema 11. Lipase-katalysierte Desymmetrisierung von acyclischen *meso*-Polyolen.

4.1.1.8. Kinetische Racematspaltung von Organometallverbindungen

Organometallverbindungen werden in der modernen Organischen Chemie breit eingesetzt, und die Selektivität von Hydrolasen kann auch bei diesen nichtnatürlichen Substraten genutzt werden. In einigen wenigen Fällen war das Nicht-Kohlenstoffatom das Stereozentrum, z.B. bei den Silylmetanolderivaten **53**, die über eine durch die Protease Papain

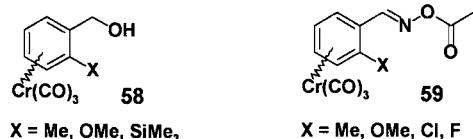


katalysierte Acylierung mit 5-Phenylpentansäure in wasser-gesättigtem 2,2,4-Trimethylpentan in ihre Enantiomere getrennt wurden.^[122] Häufiger – wie bei den Organozinn- und Organosiliciumverbindungen **54–57** (R in **57** variabel) – war das Metallatom lediglich eine weitere funktionelle Gruppe,



die bei den weiteren Umsetzungen einen größeren Spielraum eröffnete. Die Lipase-katalysierten Racematspaltungen dieser Verbindungen^[123–126] sind weitere Beispiele für die in Abschnitt 4.1.1.1 beschriebenen Verfahren.

Die Kompatibilität von Metallatomen mit Enzymaktivität und -selektivität wird bei der Verwendung planar-chiraler Organometallverbindungen (die beispielweise zur (Aren)-Cr(CO)₃-Serie gehören) als Substrat noch deutlicher. So ergab die Veresterung der Chromkomplexe **58** mit Vinyl-estern in Gegenwart der Lipase einer *Pseudomonas*-Spezies den entsprechenden (S)-Ester und den verbleibenden (R)-Alkohol, wobei die optische Reinheit der Produkte vom Acyldonor abhing.^[127] In ähnlicher Weise ermöglichte die durch Lipase PS katalysierte Desacylierung der Oximacetate **59** mit *n*BuOH die Spaltung des racemischen Gemischs.^[128] Der *E*-Wert war zwar nicht besonders hoch, aber durch Modulieren des Reaktionsmediums gelang eine Umkehrung der enzymatischen Enantioselektivität.

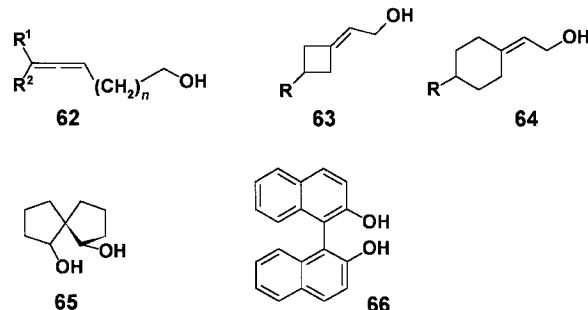


Die effiziente enzymatische Erzeugung von optisch aktiven Ferrocenylalkoholen ging von racemischen *meso*-Vorstufen wie **60** und **61** aus und wurde von mehreren Autoren beschrieben.^{[66b], [129]}

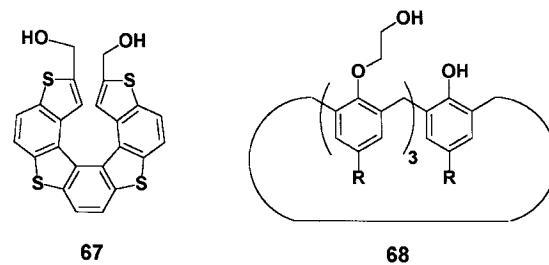


4.1.1.9. Kinetische Spaltung von Racematen ohne chirales Kohlenstoffzentrum

Die letzten Beispiele des vorangegangenen Abschnitts belegen, dass Hydrolasen nicht nur Moleküle mit einem oder mehreren Stereozentren selektiv erkennen können, sondern auch in der Lage sind, die kinetische Racematspaltung anderer chiraler Verbindungen zu katalysieren. Entsprechend wurde auch über die Racematspaltung eines axial-chiralen primären Allenalkohols des Typs **62** sowie der Alkene **63** und **64** berichtet, wenngleich mit mäßigen Selektivitäten.^[130, 131] Die Racematspaltungen beim Spirodiol **65** und beim axial-chiralen [1,1'-Binaphthyl]-2-2'-diol **66** gelangen effizienter.^[132, 133]



Sehr interessante Ergebnisse wurden auch über die Trennung racemischer Bis(hydroxymethyl)[7]thiaheterohelicene **67**^[134] und die Desymmetrisierung von Calix[4]arenderivaten **68**^[135] berichtet.



4.1.2. Regioselektivität von Hydrolasen

Laut Definition der IUPAC ist “a regioselective reaction one in which one direction of bond making or breaking occurs preferentially over all the other possible directions”.^[136] Bereits 1985 wurde über die regioselektive Acylierung von

einfachen aliphatischen Glycolen durch Einwirkung von Schweinepankreas-Lipase berichtet.^[137] Seitdem ist die Fähigkeit von Hydrolasen, derartige Umwandlungen in organischen Lösungsmitteln zu bewirken, extensiv zur Modifizierung anderer Diole und polyfunktioneller Verbindungen – wie Kohlenhydrate, Steroide und Alkaloide – genutzt worden.

Als Erstes sei auf die Kohlenhydrate eingegangen. Hier möchten wir zunächst die bahnbrechenden Studien von Klibanov et al. über die Verwendung von Lipasen zur regioselektiven Veresterung von primären^[138] und sekundären Hydroxygruppen^[139] von Monosacchariden sowie über die Verwendung der Protease Subtilisin für die Modifikation der primären Hydroxygruppen sowohl von Di- und Oligosacchariden als auch von natürlichen Glycosiden würdigen.^[140] Die in diesen Veröffentlichungen beschriebenen Substrate (von denen einige in Abbildung 9 wiedergegeben sind) verdeutlichen beispielhaft die Vielseitigkeit der Methodik, und sie

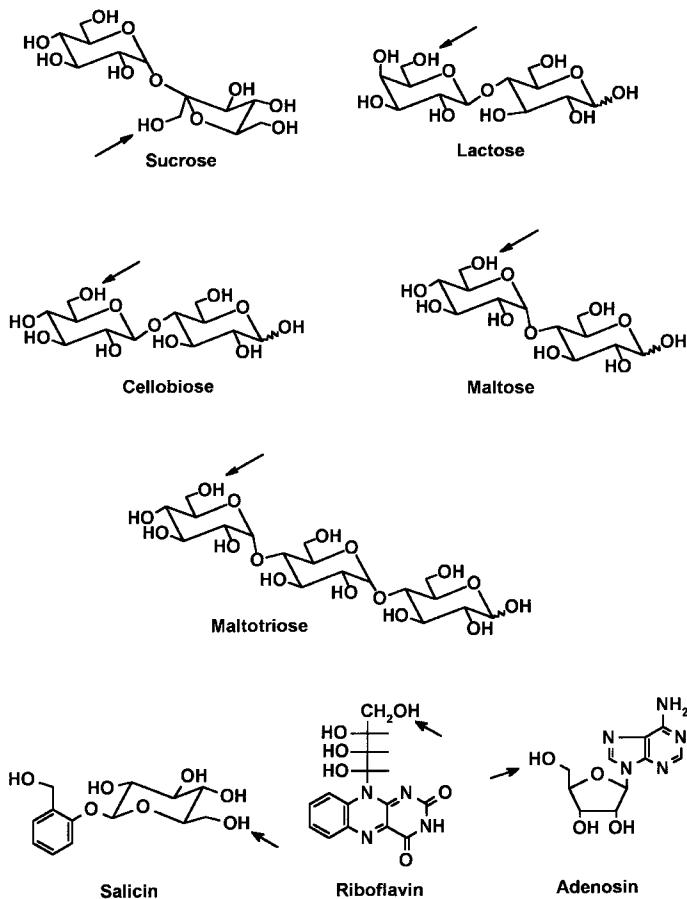
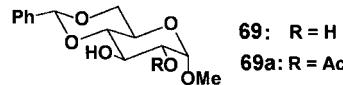


Abbildung 9. Zucker und natürliche Glycoside, die in DMF durch Subtilisin katalysiert an den gekennzeichneten Stellen acyliert wurden.

können als „natürliche Ahnen“ der vielen Anwendungen betrachtet werden, die seitdem beschrieben wurden. Da dieses Thema bereits durch neuere Übersichten und Bücher^[141] abgedeckt ist, sollen hier nur wenige Beispiele vorgestellt und kommentiert werden; dabei wurden insbesondere Lipasen und Proteasen eingesetzt.

a) Die Katalyse einer Schutzgruppeneinführung in chemoenzymatischen Synthesen von Zuckerderivaten: Beispielsweise wurde die Subtilisin-katalysierte Veresterung von

Lactosiden in einem chemoenzymatischen Zugang zu 6'-Desoxy-6'-fluor- und 6-Desoxy-6-fluorlactosiden genutzt.^[142] Des Weiteren wurde die Acylierung von Zuckerbenzylidenderivaten – nützlichen Zwischenstufen bei der Synthese von Oligosacchariden – beschrieben. So ergab die Veresterung von 4,6-O-Benzyliden- α -D-glucopyranosid **69** mit Vinylacetat unter Einwirkung der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* quantitativ das 2-O-Aacetat **69a**. Mit ähnlichen Zuckerderivaten arbeiteten auch zwei weitere Forschergruppen.^[143, 144]



- b) Die Synthese spezifischer Ester natürlicher Glycoside: Unter anderem wurde der chemoenzymatische Weg zu Malonylestern der Flavonoidglycoside Isoquercitrin, Rutin und Naringin^[145] sowie von Ginsenosid Rg₁ beschrieben.^[146]
- c) Die Verbesserung der Kenntnisse über die Selektivität von Hydrolasen: Die rationale Steuerung der enzymkatalysierten Regioselektivität wurde an der Acylierung von Sucrose mit Vinylestern in organischen Medien als Modell untersucht.^[147]
- d) Die Produktion von Zuckeracrylaten – geeigneten Monomeren für die Herstellung neuer polymerer Hydrogele^[148]
- e) Die Produktion von Biotensiden^[149]

Die erste über die selektive Acylierung von polyhydroxylierten Steroiden publizierte Arbeit beschrieb die komplementäre Regioselektivität von zwei Hydrolasen, der Lipase aus dem *Chromobacterium viscosum* (CvL) und Subtilisin, bezüglich der Substitution des tetracyclischen Gerüsts.^[150] In Abbildung 10 ist dies für das dihydroxylierte Modellsteroid **70** illustriert (dieses Phänomen ist recht verbreitet und wurde

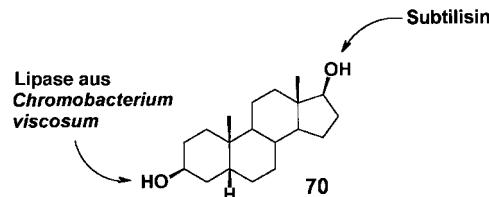
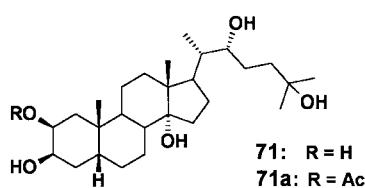


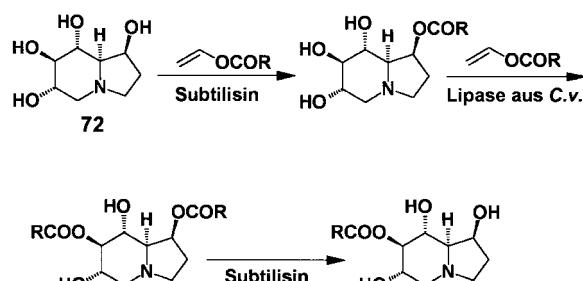
Abbildung 10. Angriffsstellen bei der durch CvL und Subtilisin katalysierten Acylierung von 5 α -Androstan-3 β ,17 β -diol **70**.

auch bei anderen Polyhydroxyverbindungen beschrieben^[139, 151]). Die Reaktivitäten zahlreicher Hydroxysteroide in Gegenwart dieser zwei Enzyme wurden untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die CvL-Lipase sehr empfindlich auf die unmittelbare Umgebung der C-3-OH-Gruppe anspricht: Nur Steroide mit einer *trans*-A/B-Ringverknüpfung und der C-3-OH-Gruppe in äquatorialer (β -) Position wurden akzeptiert. Dagegen war die CvL-Lipase sehr unempfindlich gegen Variationen in der Seitenkette. Umgekehrt konnten Veränderungen am A- oder B-Ring die Acylierung der Steroide durch Subtilisin nicht sonderlich beeinflussen, was die Präferenz dieser Protease für C-17- oder Seitenketten-Hydroxy-

gruppen bestätigte. Die Wirksamkeit zweier weiterer Lipasen – aus *Candida rugosa*^[152] und aus *Candida antarctica*^[153] – wurde anschließend für verschiedene Steroide untersucht, wobei sich ergab, dass diese Enzyme weniger strikte stereochemische Ansprüche haben. Das letzte Enzym wurde auch zur regioselektiven Veresterung der C-2-OH-Gruppe zahlreicher Ecdysteroids eingesetzt (z. B. **71** zu **71a**).^[154]

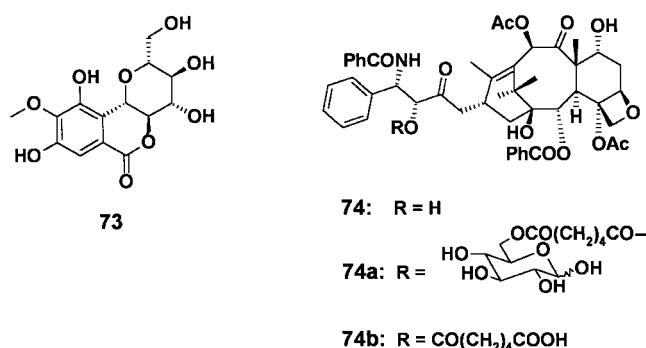


Eine interessante Anwendung enzymatischer Regioselektivität wurde von Margolin et al. berichtet.^[155] Sie stellten durch die aufeinanderfolgende Verwendung verschiedener Hydrolasen viele O-Acylderivate des Alkaloids Castanospermin **72** her (Schema 12), die sich als bis zu zwanzigmal so wirksam wie Castanospermin selbst bei der Inhibition der HIV-Replikation herausstellten.



Schema 12. Synthese mehrerer Acylderivate des Alkaloids Castanospermin **72** durch den Einsatz mehrerer Hydrolasen nacheinander.

Im Prinzip kann man diese Veröffentlichung auch als Vorstufe der „kombinatorischen Biokatalyse“ betrachten, eines neueren Ansatzes zur Wirkstoffsuche.^[156] So wurde die gleiche enzymatische Strategie angewendet, um eine kombinatorische Bibliothek aus 167 unterscheidbaren, selektiv acylierten Derivaten des polyhydroxylierten Flavonoids Bergenin **73** mit einem Syntheseroboter in 96er-Mikrotiterplatten herzustellen. Zusätzlich wurden durch Einsatz von Enzymen, die verschiedenen Klassen angehörten, bis zu 600



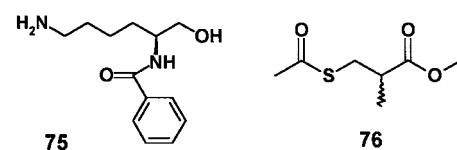
Bergeninderivate automatisch erzeugt.^[157] Andere Leitstrukturen, die in ähnlicher Weise derivatisiert wurden, sind das Antibiotikum Erythromycin und das Tumortherapeutikum Paclitaxel **74**. Die letztgenannte Verbindung ist sehr schlecht wasserlöslich – ein Problem, das durch selektive enzymatische Modifizierung seiner Seitenketten-C-2'-OH-Gruppe und weitere enzymatische Modifizierungen gelöst werden konnte. So ist etwa das glucosyierte Derivat **74a** 60 Mal löslicher als **74** und das Säurederivat **74b** sogar mehr als drei Größenordnungen besser löslich.^[158]

Natürlich ist dieser Ansatz nicht auf komplexe Moleküle beschränkt, sondern kann genutzt werden, um jede Art organischer Verbindungen mit einer funktionellen Gruppe zu derivatisieren, z. B. Polybenzylester, die zur Herstellung von Amid-Bibliotheken verwendet wurden.^[159]

Der kombinatorische biokatalytische Ansatz zeigt schön die Vielseitigkeit der Hydrolasen bezüglich der Acylierungsmittel, die keineswegs auf einfache aliphatische Säurederivate wie Acetate und Butanoate beschränkt sind. Allerdings ist es nicht wahr, dass jedes Substrat mit jeder Art Säurerest acyliert werden kann. Wie in einigen Berichten herausgestellt wurde,^[141, 145] ist es vielmehr wahrscheinlich, dass eine gegenseitige sterische Hinderung zwischen großen Acylgruppen und großen Nucleophilen auftritt, wobei die letzten nicht an die katalytisch aktive Stelle gelangen und damit von einem Angriff auf das Acyl-Enzym-Intermediat abgehalten werden.

4.1.3. Chemoselektivität von Hydrolasen

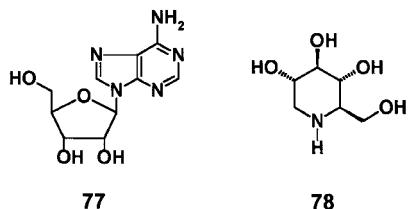
Chemoselektivität ist „the preferential reaction of a chemical reagent with one of two or more different functional groups“.^[136] Diese Eigenschaft wurde für die selektive Monoacylierung von Aminoalkoholen und Sulfanylalkoholen genutzt. 1989 beschrieben Klibanov und Mitarbeiter die unerwartete Selektivität der Lipase aus *Aspergillus niger* bei der Acylierung von 6-Amino-1-hexanol, die derjenigen der chemischen Reaktion entgegengesetzt war.^[160] Die ausgeprägte Bevorzugung der Hydroxygruppen-Veresterung ermöglichte es den Autoren, zahlreiche O-acylierte Aminoalkohole in guten Ausbeuten herzustellen, ohne Schutzgruppen zu verwenden. Bei einer detaillierten Untersuchung ergab sich, dass das Verhältnis von O- zu N-Acylierung beträchtlich vom Lösungsmittel abhing.^[161] Beispielsweise änderte sich dieses Verhältnis bei der mit der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* katalysierten Acylierung von *N*-*α*-Benzoyl-L-lynisol **75** mit Trifluorethylbutyrat von 1.1:1 in *tert*-Butylalkohol auf 21:1 in 1,2-Dichlorehthan. Andere Autoren stellten fest, dass



Schweinepankreas-Lipase in der Lage war, die selektive O-Acylierung von 2-Sulfanylethanol mit Ethylcarboxylaten zu katalysieren.^[162] Dagegen katalysierten sowohl diese Lipase wie auch die Lipase aus *Pseudomonas cepacia* in

Hexan ausschließlich die Thioumesterung des Thioesters **76** mit Propanol.^[85]

Sowohl die in Abbildung 9 angedeutete Acylierung der Zuckereinheit des Nucleotids Adenosin **77**^[140] als auch die Acylierung der Hydroxygruppen des Alkaloids Castanospermin **72** (siehe Schema 12)^[155] sind Beispiele für chemoselektive Umsetzungen. Durch die Protease Subtilisin bevorzugt O-acyliert wurde auch das ebenfalls bioaktive Alkaloid 1-Desoxynojirimycin **78**, und zwar selektiv an den C-6- und/oder den C-2-OH-Gruppen, obwohl eine potentiell reaktivere Aminogruppe vorlag.^[163]



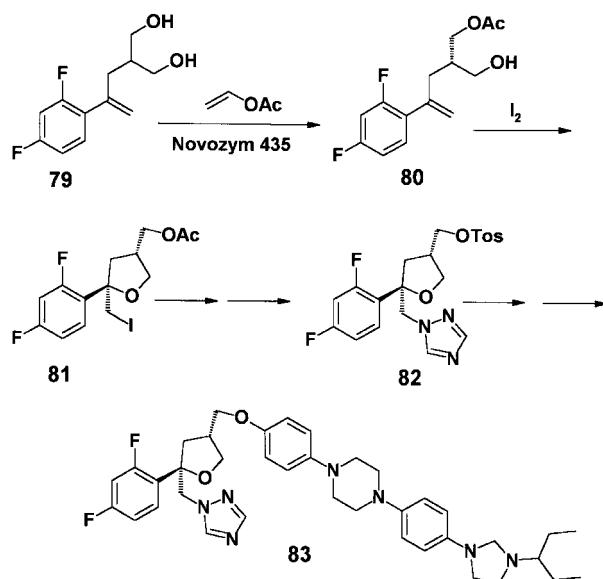
Überraschenderweise ist die NH₂/OH-Chemoselektivität dieses Enzyms in der Peptidsynthese umgekehrt. So konnten Aminosäurederivate mit Seitenketten-OH-Gruppen (z.B. Serin, Threonin oder Tyrosin) ohne Schützen der OH-Gruppen eingesetzt werden, wie die Synthese von Dipeptidfragmenten des „Octapeptids T“ belegt.^[160]

4.1.4. Technische Anwendungen^[164]

Mehrere Firmen produzieren gegenwärtig nützliche Zwischenstufen mit Hilfe enzymkatalysierter Reaktionen in organischen Lösungsmitteln. Sie halten ihre Prozesse allerdings weitgehend geheim, so dass es oftmals schwierig ist, über diese oder auch nur die verwendeten Substrate und Enzyme etwas zu erfahren. Im Folgenden werden einige Beispiele vorgestellt, die aus der wissenschaftlichen und der Patentliteratur extrapoliert werden konnten.

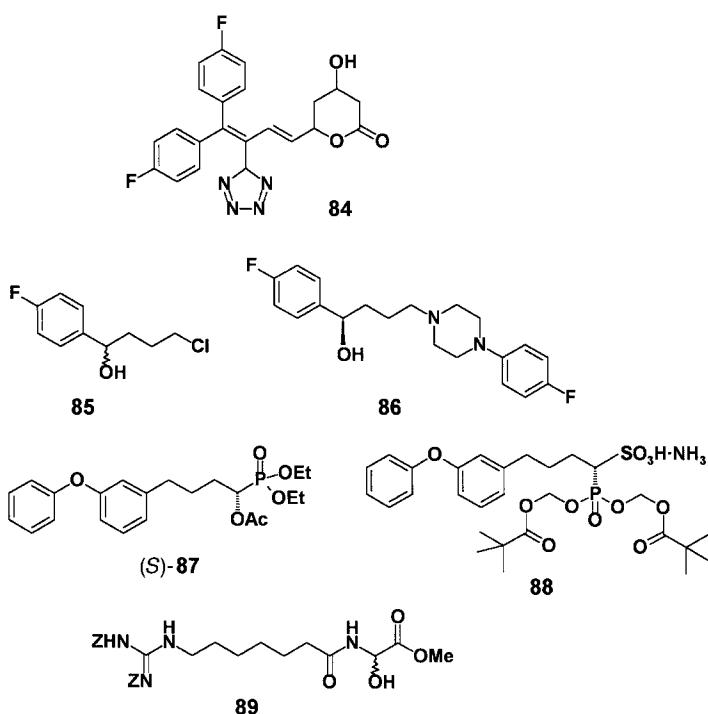
Die Verbindung SCH 51048 **83** von Schering-Plough ist ein antimykotisches Azolderivat, das sich gegenwärtig in Phase II der klinischen Prüfungen befindet. Die Syntheseroute zum eigentlichen Wirkstoff durchläuft eine Schlüsselzwischenstufe, das (2*R*,4*S*)-Phenylsulfonat **82** (Schema 13). Die Konfiguration an C-2 und C-4 des Tetrahydrofuranrings von **82** wird über eine Iod-induzierte Cyclisierung des chiralen Monoesters **80** zu **81** erreicht, an die sich der Ersatz der Iodfunktion durch Natriumtriazolid anschließt. Die Verbindung **80** selbst wird durch enzymatische Acetylierung des Diols **79** in Acetonitril mit der Lipase B aus *Candida antarctica* (Novozym 435) und Vinylacetat erhalten. Acetonitril wurde als Lösungsmittel gewählt, weil der anschließende Cyclisierungsschritt ebenfalls bei 0 °C in Acetonitril ausgeführt wird. Dazu werden die Enzymperlen abfiltriert und im verbleibenden Reaktionsrohgemisch die Cyclisierung durchgeführt. Dieser enzymatische Prozess läuft kontinuierlich im Pilotmaßstab, um das Material für die klinischen Prüfungen zu liefern.^[165]

Von Bristol-Myers Squibb wurde die Racematspaltung von **84** durch eine mit der Lipase PS-30 katalysierte Acetylierung



Schema 13. Synthese von SCH 51048 **83**.

in 640-L-Ansätzen durchgeführt. Dazu wurden in Toluol 4 g L⁻¹ racemisches **84**, 2 Vol.-% Isopropenylacetat, 0.05 Vol.-% destilliertes Wasser und 1 Gew.-% rohes Lipase-PS-30-Pulver (auf das Volumen der Lösung bezogen) umgesetzt. Der Reaktor wurde bei 37 °C 20 h mit 150 U min⁻¹ geschüttelt und lieferte das nichtumgesetzte (*R*)-(+)-**84** mit einem ee-Wert von 99.5% in 48% chemischer Ausbeute.^[166] Auch andere pharmazeutische Zwischenprodukte wurden von dieser Forschungsgruppe im Multigramm-Maßstab hergestellt. Beispielsweise wurde 4-Chlor-1-fluorphenylbutanol **85**, eine mögliche Zwischenstufe für die Synthese des potentiell antipsychotischen Wirkstoffs BMS 181100 **86**, mit Isopropenylacetat und der Lipase PS-30 in Heptan in die Enantiomere getrennt. Der (*S*)-Alkohol wurde in 42%

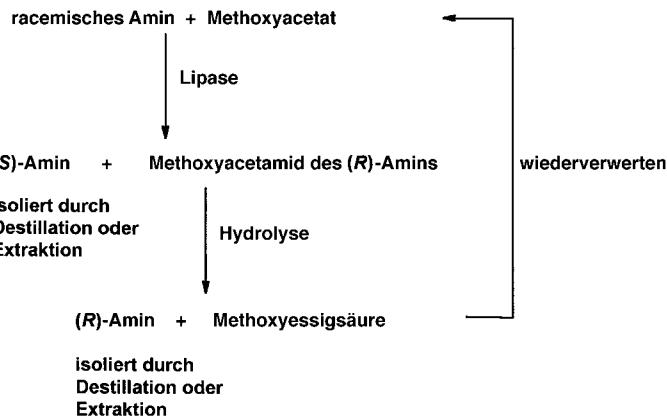


Ausbeute mit >99% *ee* erhalten und das (*R*)-Acetat mit 92.6% *ee* beim Abbrechen der Reaktion nach einem Umsatz von 46% isoliert.^[167] Die chirale Zwischenstufe (*S*)-**87** wurde für die Totalsynthese eines Inhibitors der Squalen-Synthase, BMS-188494 **88**, der als Anticholesterin-Medikament eingesetzt werden kann, hergestellt. Die kinetische Racematspaltung der Vorgänger-Verbindung [1-Hydroxy-4-(3-phenyloxyphenyl)butyl]phosphonsäure-diethylester wurde in Toluol ausgeführt; verwendet wurde die Lipase aus *Geotrichum candidum* mit Isopropenylacetat als Acylierungsmittel; die Reaktionsausbeute war 38% und der *ee*-Wert 95%.^[168] Die stereoselektive Acetylierung von racemischem **89** (Z=Benzyloxycarbonyl), einer Vorstufe des Tumortherapeutikums-Antibiotikums und Immunsuppressivums (-)-15-Desoxy-spergualin, wurde zur Abwechslung in Ethylmethylketon durchgeführt, und zwar mit einer Lipase aus *Pseudomonas* sp. (Lipase AK) und mit Vinylacetat. Für das (*S*)-Acetat war die Reaktionsausbeute 48% und der *ee*-Wert 98%, der nicht umgesetzte Alkohol wurde in 41% Ausbeute mit 98.5% *ee* erhalten.^[169]

Die Forschungsgruppe von Chiroscience Ltd. entwickelte eine effiziente Lipase-katalysierte Veresterung von racemischem/*meso*-Hexan-2,5-diol **90** verbunden mit einer Sequenz aus Mesylierung und Verdrängung, bei der sowohl Hexan-(2*R*,5*R*)-diol **91** als auch Hexan-(2*S*,5*S*)-diol **92** in 99% *ee* und 99% *de* erhalten werden, ohne dass ein chromatographischer Schritt notwendig ist (Schema 14).^[170] Diese Verbindungen sind wichtige Zwischenstufen in der Synthese von 2,5-disubstituierten Pyrrolidinen und von Phosphanliganden, die für asymmetrische Hydrierungen interessant sind. Dieser volumeneffiziente Prozess wurde im Multikilogramm-Maßstab durchgeführt und kann auf andere Diole ausgedehnt werden.

Der Prozess, der wahrscheinlich wirklich großtechnisch durchgeführt wird, ist die enzymatische Racematspaltung von Aminen, wie sie von einer Forschungsgruppe der BASF

entwickelt wurde.^[171] Hierbei wird ein racemisches Amin oder ein racemischer Aminoalkohol enantioselektiv in Gegenwart einer Hydrolase und eines Esters acyliert, dessen Säurekomponente ein Fluor-, Stickstoff-, Sauerstoff- oder Schwefelatom in der Nähe der Carbonylgruppe enthält (Schema 15). Das Acylierungsmittel kann beispielsweise Ethylmethoxyacetat sein, und im Anschluss an die Abtrennung des nichtumgesetzten (*S*)-Amins durch Extraktion oder Destillation wird das Methoxyacetamid des (*R*)-Amins chemisch hydrolysiert und das entstandene Amin entweder isoliert oder nach Racemisierung wiederverwendet.



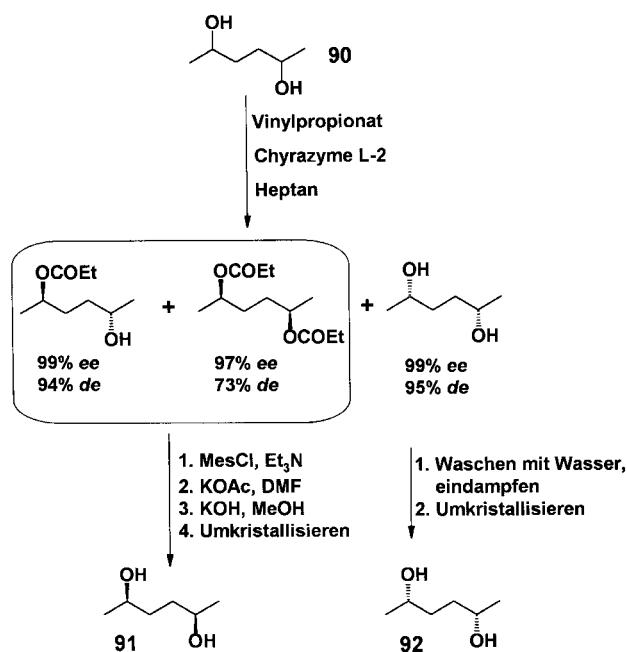
Schema 15. BASF-Prozess zur kinetischen Racematspaltung von Aminen.

4.1.5. Sonstige Anwendungen von Hydrolasen

Die enzymkatalysierte Umesterung mit 1,3-regiospezifischen Lipasen kann verwendet werden, um wertvolle Speisefette für Süßwaren zu produzieren. Zurzeit produzieren Unichema in Europa und Fuji Oil in Japan mehrere hundert Tonnen von Kakaobutter-äquivalenten Fetten (Kakaobutter ist das Fett, das Schokolade die erforderlichen Kristallisations- und Schmelzcharakteristika verleiht) durch Umesterung des billigen Sonnenblumenöls, das besonders reich an Ölsäure ist, mit Stearinsäure.^[11] Diese Prozesse werden in einem lösungsmittelfreien Reaktor mit gepacktem Bett durch die Lipasen aus *Rhizomucor miehei* (Unichema)^[172] bzw. *Rhizopus* (Fuji Oil)^[173] katalysiert.

Die Verwendung von Lipasen hat sich als besonders vorteilhaft für die Synthese partieller Glyceride herausgestellt, die labile Substituenten wie 8'-Apo- β -carotinsäure enthalten, die einem chemischen Prozess nicht standhalten würden.^[174]

Fettsäureester von Kohlenhydraten sind wegen ihrer oberflächenaktiven Eigenschaften potentiell als Tenside, für Esswaren und Futtermittel, in Kosmetika und Pharmazeutika interessant. Ein vielversprechender enzymatischer Zugang zu dieser Verbindungsklasse wurde bei Novo Nordisk entwickelt. Die Monoester von Alkylglycopyranosiden wurden in großem Maßstab in mehr als 90% Ausbeute durch die direkte enzymkatalysierte Veresterung von Glucopyranosiden mit langkettenigen Fettsäuren in einem lösungsmittelfreien Prozess hergestellt.^[149] In einer Pilot-Produktion wurde diese Methode im 20-kg-Maßstab mit einem Gemisch aus α - und β -Ethyl-D-glucopyranosid getestet, das durch direkte Glucosylierung



Schema 14. Herstellung enantiomerenreiner *C*₂-symmetrischer Diole.

von Glucose in Ethanol in Gegenwart eines Ionenaustauscherharzes und von 5 Gew.-% der immobilisierten Lipase aus *Candida antarctica* als Katalysator hergestellt worden war. Die 6-O-Monoester wurden in 85–90 % Ausbeute innerhalb von 24 h erhalten, und das Enzym konnte mehrere Male ohne spürbaren Aktivitätsverlust verwendet werden. In anderen Veröffentlichungen wurden Abhilfen gegen die geringe Löslichkeit der Zucker in den geschmolzenen Fettsäuren beschrieben: die Verwendung von Butylglycosiden^[175] oder Zuckeracetaten^[176] sowie die Zugabe geringer Mengen als Adjuvantien dienender organischer Lösungsmittel, die etwas Flüssigphase aufrecht erhielten.^[177]

Lipasen und Proteasen wurden außerdem für die Herstellung von Zuckeracrylaten, die sich für die Herstellung polymerer Hydrogele eignen, in großem Maßstab eingesetzt.^[178] Eine chemoenzymatische Zweistufenstrategie wurde für die Synthese von Polyzuckeracrylaten entwickelt.^[148] Im ersten Schritt wurde ein Enzym verwendet, um die regioselektive Acryloylierung des Zuckers zu katalysieren; danach wurde der derivatisierte Zucker chemisch polymerisiert (meist radikalisch), was langkettige, lineare Polyzuckeracrylate ergab. Dem ersten Bericht von Klibanov und Mitarbeitern^[179] folgten weitere Arbeiten, in denen mit Hilfe Hydrolase-katalysierter Prozesse diverse Oligomere und Polymere durch Polykondensationsen vom A-B-Typ^[180] und vom AA-BB-Typ^[181] sowie durch ringöffnende Polymerisationen^[182] hergestellt wurden.

Eine weitere interessante Anwendung von Hydrolasen in organischen Medien ist die Synthese von Peptiden.^[183] In einer der ersten Veröffentlichungen zu diesem Thema steht, dass die Enantioselektivität von Serin-Protease in organischen Lösungsmitteln drastisch nachlässt.^[184] Dieser Befund eröffnete die Möglichkeit, D-L- und D-D-Peptidbindungen durch Verwendung einer Protease zu erhalten,^[185] eine Transformation, die in Wasser wegen der strikten Selektivität des Enzyms für L-Aminosäuren nicht möglich ist. Hinzu kommt, dass dieses System eine einzigartige Regio- und Chemoselektivität aufweist. Wurde beispielsweise Lysin als Amindonor ohne Schützen seiner Seitenkette verwendet, erfolgte die Subtilisin-katalysierte Bildung der Peptidbindung in *tert*-Amylalkohol selektiv an der ε -Aminogruppe.^[186] Hydrolasen wie etwa Lipasen, die in Wasser nicht proteolytisch wirken, sind in der Lage, den Acyltransfer auf ein Aminnucleophil zu katalysieren. Dementsprechend wurden mehrere Lipasen verwendet, um die Knüpfung von Peptidbindungen zu katalysieren.^[187]

Schließlich verdient noch die Verwendung von Lipasen auf dem Gebiet der Geruchs- und Geschmacksstoffe Erwähnung.^[188] In diesen Fällen ist die enzymatische Umwandlung selbst in der Regel recht trivial, z.B. die Veresterung von Citronellol mit Essigsäure in Gegenwart von Molekularsieb zur Entfernung des Reaktionswassers,^[189] aber die Produkte können wegen der Bezeichnung „natürlich“ wertvoll sein. In vielen Ländern ist gesetzlich vorgeschrieben, dass ein Produkt – wie etwa ein Lebensmittelzusatz – nur dann als natürlich bezeichnet werden darf, wenn seine Herstellung keinen „chemischen“ Schritt enthält. Enzymatische Umwandlungen werden dabei als „natürlich“ angesehen.

4.2. Der Einsatz weiterer Enzyme in organischen Lösungsmitteln

In allen bislang diskutierten Beispielen wurde die Verwendung von Hydrolasen behandelt. Dabei gibt es auch andere Enzymklassen, die in nichtwässrigen Medien nutzbringend angewendet worden sind, wie in den folgenden Abschnitten gezeigt werden wird.

4.2.1. Hydroxynitril-Lyasen

Hydroxynitril-Lyasen (HNLs, auch Oxynitrilasen genannt) sind Proteine, die die Spaltung von Cyanhydrinen in Aldehyde und Blausäure katalysieren, und tragen damit in der Natur zum katabolischen Abbau von Cyanhydrinen bei. Unter geeigneten Bedingungen können diese Enzyme die stereoselektive Addition von HCN an Carbonylverbindungen katalysieren, wobei entweder (R)- oder (S)-Cyanhydrine entstehen.^[190] Elf HNLs aus sechs Pflanzenfamilien wurden bis heute isoliert,^[191] aber lediglich vier davon haben interessante Anwendungen in der Synthese gefunden.^[192] Dabei handelt es sich um die (R)-HNL aus Mandeln (*Prunus amygdalus*) sowie die (S)-HNLs aus *Sorghum bicolor*, *Hevea brasiliensis* und *Manihot esculenta* (Abbildung 11). Die beiden letztgenannten Enzyme wurden kürzlich kloniert und überexprimiert,^[193] während die (R)-HNL aus Mandeln leicht in ausreichenden Mengen aus ihrer natürlichen Quelle gewonnen werden kann und – wegen ihrer Stabilität und natürlichen Häufigkeit – das erste untersuchte Enzym dieser Klasse war.

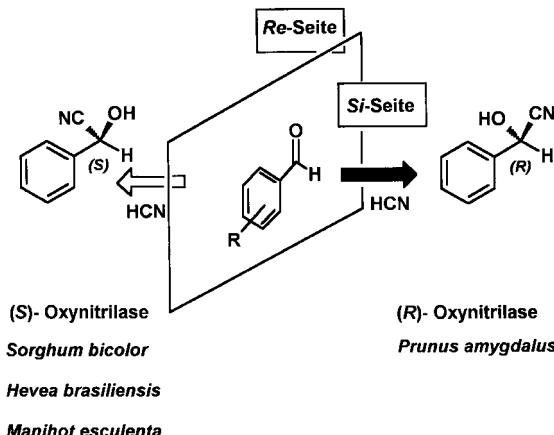
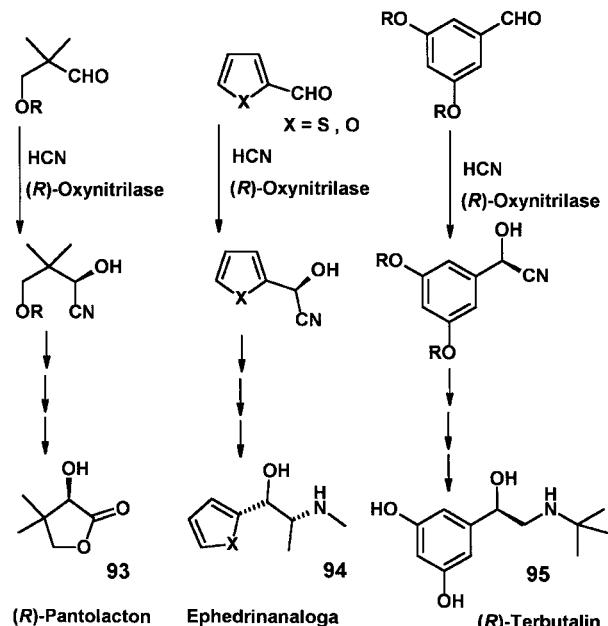


Abbildung 11. Oxynitrilase-katalysierte enantioselektive Synthese von Cyanhydrinen.

Die Unterdrückung der spontanen chemischen Addition von HCN an Carbonylverbindungen ist eine Voraussetzung, um chirale Cyanhydrine in guter Enantiomerenreinheit zu erhalten. Das Ausmaß dieser nichtenzymatischen Reaktion hängt stark von den Reaktionsbedingungen ab; so wurde gefunden, dass ein wässriges Reaktionsmedium nur dann geeignet ist, wenn der pH-Wert unter 4.0 liegt und niedrige Temperaturen eingehalten werden. Einen entscheidenden Durchbruch brachte die Entdeckung, dass die unerwünschte chemische Addition in organischen, nicht mit Wasser misch-

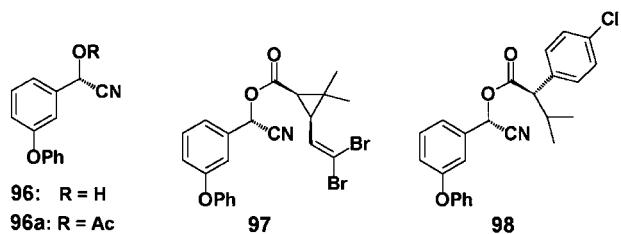
baren Lösungsmitteln wie Essigester oder Diisopropylether mehr oder weniger unterdrückt ist.^[194] Seitdem sind zahlreiche Veröffentlichungen über dieses Thema von verschiedenen Gruppen erschienen, aber die meisten liegen außerhalb der Thematik dieser Übersicht, da die Reaktionen in „reinen“ Zweiphasensystemen durchgeführt wurden. In einigen Fällen beschränkte sich die Wasserphase allerdings auf die Menge Wasser, die vom Enzymträger adsorbiert worden war. Mit dieser Methodik wurden Cyanhydrine, die als Vorstufen von (*R*)-Pantolacton **93**,^[195] den Thienyl- und Furylanaloga von Ephedrin (**94**),^[196] sowie dem andrenergischen Bronchodilator (*R*)-Terbutalin **95**^[197] – um nur einige zu nennen – Verwendung fanden, im Multigramm-Maßstab hergestellt (Schema 16).



Schema 16. Chemoenzymatische Synthese der Verbindungen **93–95**.

4.2.2. Eine Fallstudie: die chemoenzymatische Synthese von (*S*)- α -Cyan-3-phenoxybenzylalkohol **96**

Pyretrin I, eine aus *Chrysanthemum cinerariifolium* gewonnene Verbindung, wirkt stark insektizid. Die hohe Knock-down-Wirkung auf Insekten, das hohe Aktivitätsniveau und die bemerkenswert geringe Gefahr für Säugetiere verbunden mit einer relativ niedrigen Stabilität führten zu einem intensiven Interesse an der Synthese von chemischen Analoga dieser Substanz. Viele der gegenwärtig kommerziell genutzten Pyretrin-I-Analoga – darunter Deltametrin **97** (Hoechst) und Esfenvalerat **98** (Sumitomo Chemicals) – sind Ester des (*S*)- α -Cyan-3-phenoxybenzylalkohols **96**.



Bei den meisten der bisher beschriebenen enzymatischen Routen zu **96** werden Enzyme in organischen Lösungsmitteln genutzt. Die durch die (*S*)-Oxynitrilase aus *Sorghum bicolor* katalysierte Reaktion lieferte **96** in 93 % Ausbeute mit 96 % ee.^[198] Das Haupthindernis für diese Reaktion ist die Schwierigkeit, das benötigte Enzym zu isolieren. Die seit 1996 gegebene Verfügbarkeit von zwei anderen (*S*)-HNLs (aus *Hevea brasiliensis* und *Manihot esculenta*) – kloniert und überexprimiert – könnte diese biokatalytische Umwandlung bald konkurrenzfähig machen.^[199]

Ein alternativer Ansatz ist die kinetische Racematspaltung des chemisch hergestellten, racemischen **96** durch eine Lipase-katalysierte Umesterung. Die enantioselektive Acetylierung von racemischem **96** wurde durch Einwirkung einer Lipoprotein-Lipase aus einer *Pseudomonas*-Spezies, suspendiert in *tert*-Butylmethylether, der Vinylacetat enthielt, erreicht. Das (*S*)-Acetat **96a** wurde mit 90 % ee bei 41 % Umsatz erhalten.^[200] Das gleiche Enzym wurde verwendet, um (*S*)-**96a** zurück zu **96** zu hydrolysern (96 % ee bei 82 % Umsatz), das anschließend mit dem passenden Acylchlorid zum Insektizid **98** gekuppelt wurde.

Eine erhebliche Verbesserung brachte die Verbindung der Lipase-katalysierten kinetischen Racematspaltung mit der In-situ-Bildung und Racemisierung von Cyanhydrinen (ein weiteres Beispiel für eine dynamische kinetische Racematspaltung). Racemisches **96**, aus *meta*-Phenoxybenzaldehyd und Acetoncyanhydrin in Diisopropylether unter Katalyse durch ein basisches Ionenaustauscherharz erhalten, wurde durch die Lipase aus *Pseudomonas cepacia* mit Isopropenylacetat als Acetylierungsmittel umgesetzt.^[104] Die Racemisierung des optisch aktiven Rest-Cyanhydrins mittels Amberlite-IRA-904 (in der OH⁻-Form) stellte sich als erheblich rascher als die enzymatische Acetylierung heraus, was die effektiv verlaufende asymmetrische Transformation zweiter Ordnung bestätigte. Auf diesem Weg wurde das Acetat (*S*)-**96a** in 84 % Ausbeute und mit einem ee-Wert von 89 % erhalten. Die Ethanolyse von (*S*)-**96a**, katalysiert durch die gleiche Lipase in Diisopropylether, und die Kupplung des erhaltenen Cyanhydrins mit dem entsprechenden Acylchlorid lieferte das Pyretroid **97** in 90 % Ausbeute mit 94 % de.

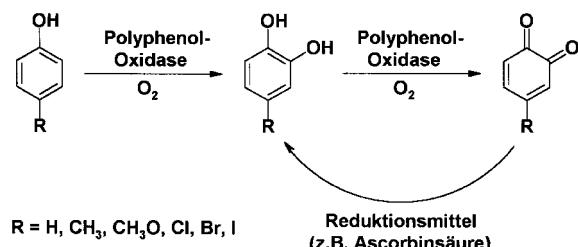
Schließlich wurde vor kurzem noch ein weiteres Vorgehen vorgeschlagen, bei dem das racemische Cyanhydrinacetat **96a** Lipase-katalysiert alkoholisiert wird. Das erhaltene **96** wurde vom nichtumgesetzten (*R,S*)-**96a** mittels Chromatographie und Extraktion mit Hexan abgetrennt und der verbleibende (enantiomerenangereicherte) Ester mit Triethylamin in Diisopropylether oder Toluol racemisiert.^[201] Alternativ wurde das Rohgemisch der enzymatischen Reaktion direkt mit dem entsprechenden Chlorid behandelt und das Pyretroid-Produkt vom nichtumgesetzten (*R,S*)-**96a** durch Kugelrohrdestillation getrennt. Das verbliebene nichtumgesetzte (enantiomerenangereicherte) **96a** wurde mit Triethylamin racemisiert und in den Prozess zurückgeführt.^[202]

4.3. Vermischtes

Weitere Enzymklassen wurden in organischen Lösungsmitteln verwendet, aber trotz des hohen Synthesepotentials

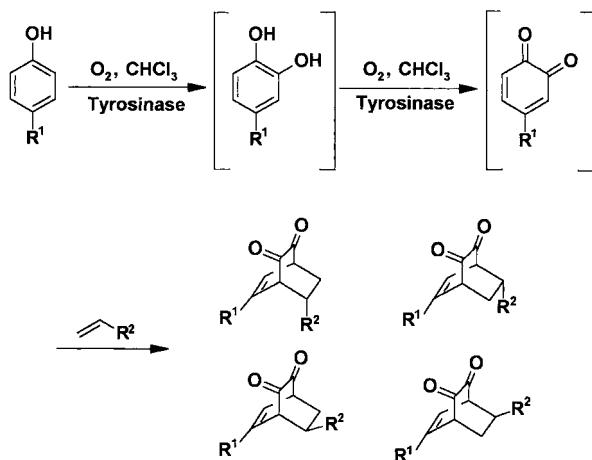
einiger dieser Umwandlungen beschränken sich bislang die Berichte auf wenige Beispiele.

Kazandjian und Klibanov zeigten, dass es möglich ist, eine an porösem Glas adsorbierte Polyphenol-Oxidase (auch Tyrosinase genannt) aus Pilzen zu verwenden, um in Chloroform die Oxidation einer Reihe von Phenolen zu den *ortho*-Chinonen zu katalysieren.^[203] Die Autoren berichten, dass in Chloroform eine quantitative Umwandlung erreicht wurde, während in Wasser die enzymatische Oxidation wegen rascher Enzymdesaktivierung und spontaner Polymerisation der Chinone nur vernachlässigbare Ausbeuten liefert. Die erhaltenen Chinone wurden sodann nichtenzymatisch zu Brenzcatechinen reduziert, was insgesamt einer regioselektiven Hydroxylierung von Phenolen gleichkommt (Schema 17). Vor wenigen Jahren nutzten Waldmann und Mitarbeiter diese



Schema 17. Chemoenzymatische Synthese von Brenzcatechinen.

Biotransformation, indem sie sie mit nichtenzymatischen Umwandlungen zu einer Dominoreaktionssequenz verknüpften.^[204] Wie in Schema 18 gezeigt, reagierten die durch Einwirkung der Pilz-Tyrosinase erhaltenen *ortho*-Chinone in einem Diels-Alder-Folgeschritt mit Dienophilen weiter. Diese dreistufige Reaktionskaskade ermöglichte die rasche und effiziente Herstellung von funktionalisierten Bicyclo[2.2.2]octendionen.



Schema 18. Enzymgestartete Dominoreaktion bestehend aus Hydroxylierung, Oxidation und Carbo-Diels-Alder-Reaktion.

Das Enzym Meerrettich-Peroxidase katalysiert effizient die Radikalpolymerisation von Phenolen in Gegenwart von H₂O₂. Die schlechte Löslichkeit der wachsenden Polymerketten in Wasser führte zum Zusatz von organischen Lösungsmitteln zum Reaktionsmedium, und es wurden beispielsweise Polymere aus *para*-Phenylphenol in wässrigem Dioxan her-

gestellt, wobei das Molekulargewicht der Makromoleküle mit abnehmendem Wassergehalt anstieg.^[205] Diese Methodik könnte eine Alternative für die Herstellung von Phenolharzen bieten, die den Einsatz des toxischen Formaldehyds vermeidet; die Technik befindet sich derzeit in der Entwicklung, wie Patentanmeldungen zeigen.

Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase (HLADH) wurde ebenfalls in organischen Lösungsmitteln (in Diisopropyl-ether) eingesetzt. Sowohl das Enzym wie sein Nicotinamid-Cofaktor wurden auf der Oberfläche von Glasperlen abgeschieden und diese in mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmitteln, die das Substrat enthielten, suspendiert.^[206] Wegen der Unlöslichkeit des NAD(H)-Moleküls im organischen Medium konnte der Cofaktor *in situ* durch den „Ein-Enzym-zwei-Substrate“-Ansatz regeneriert werden: Der Cofaktor NADH wurde durch die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd regeneriert und das oxidierte NAD durch die Reduktion von Isobutyraldehyd erzeugt.

Von einer teilweise gereinigte Präparation der (+)- α -Pinen-Cyclase aus Salbei (*Salvia officinalis*) konnte gezeigt werden, dass sie Geranylpyrophosphat in Hexan in die Monoterpen-Olefine α -Pinen, Camphen, Limonen und Myrcen überführt. Die Cyclase erwies sich hinsichtlich Temperatur und Zeit als durch den als Lösungsmittel verwendeten Kohlenwasserstoff stabilisiert. Im Übrigen zeigte sie Eigenschaften, die denen in wässriger Phase glichen.^[44c]

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Enzymkatalyse in organischen Lösungsmitteln – zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts noch als ungewöhnliches Phänomen beschrieben – hat sich im Verlauf des letzten Jahrzehnts in ein wichtiges Instrument für die organische Synthese verwandelt. Wie die vorgestellten Beispiele belegen, sind Hydrolasen – und hier speziell die Lipasen – bereits vielfach genutzte Werkzeuge für Transformationen bis zum Produktionsmaßstab. Oxynitrilasen, eine Enzymklasse, die eine der wichtigsten Reaktionen der organischen Synthese – die Knüpfung von C-C-Bindungen – katalysiert, sind ebenfalls auf dem besten Weg, ein industrieller Erfolg zu werden. Die Anwendungen dieser Biokatalysatoren reichen von der Herstellung weniger Milligramm einer spezifisch markierten Verbindung bis zur Modifizierung von Fetten im Vieltonnenbereich und von der Präparation komplexer Schlüsselstufen für die pharmazeutische Industrie bis zur Synthese von Polymeren. Andere Enzyme dagegen, speziell die Oxidoreduktasen, haben viel weniger Anwendung gefunden. Weitere Forschung ist erforderlich, Hindernisse wie eine eingeschränkte Substrat- und/oder Coenzym-Löslichkeit sowie Enzyminstabilitäten oder -inhibitierungen in organischen Lösungsmitteln zu überwinden.

Die Enzymkatalyse in organischen Lösungsmitteln hat sich nicht nur in einer großen Zahl präpartiver Anwendungen als außerst nützlich erwiesen, sondern sie hat auch die Grundlagenforschung stimuliert, die Fragen zur Wirksamkeit von Enzymen in nichtnatürlichen Umgebungen sowie zum katalytischen Mechanismus in solche Medien aufgreift. In den letzten Jahren wurde vor allem nach einem Verständnis dafür

gesucht, dass die katalytische Aktivität von Enzymen in wasserfreien organischen Lösungsmitteln in den meisten Fällen gegenüber der in Wasser drastisch vermindert ist. Dabei wurden mehrere Ursachen dieses Phänomens erhellert, und die Forschung konzentriert sich jetzt auf die Entwicklung von Strategien, die die vollständige katalytische Aktivität wiederherstellen könnten.

Schließlich wurde darauf hingewiesen, dass eine Optimierung der katalytischen Aktivität erreicht werden kann, wenn die Enzymstruktur gentechnisch – entweder durch ortsspezifische oder durch zufällige Mutagenese – verändert wird. Protein- und Medium-Engineering tragen entscheidend zur Weiterentwicklung dieser Methodik und zur Erweiterung ihres synthetischen Potentials bei.

Wir danken für die Förderung unserer eigenen Arbeiten durch das Biotechnologie-Programm der Europäischen Kommission und durch das CNR Target Project on Biotechnology.

Ein eingegangen am 25. März 1999 [A335]
Übersetzt von Dr. Stefan Herrmann, Langenfeld

- [1] a) G. M. Whitesides, C. H. Wong, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 617–638; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 17–638; b) J. B. Jones, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3351–3403; c) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin, **1992**; d) E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, A. Manzocchi, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1071–1140; e) C. H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon, Trowbridge, **1994**; f) F. Theil, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2203–2227; g) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), VCH, Weinheim, **1995**; h) *Chirality in Industry* (Hrsg.: A. N. Collins, G. N. Sheldrake, J. Crosby), Wiley, Chichester, **1997**; i) R. D. Schmidt, R. Verger, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1694–1720; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608–1633; j) R. J. Kaslauskas, U. T. Bornscheuer in *Biotechnology Series, Vol. 8a* (Hrsg.: H. J. Rehm, G. Reed, V. Puhlet, P. J. W. Stadler, D. R. Kelly), WILEY-VCH, Weinheim, **1998**, S. 37–191; k) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis—Regio- and Stereoselective Biotransformations*, WILEY-VCH, Weinheim, **1999**.
- [2] J. B. Jones, H. Holland, *Biocatalysis, Synopsis Scientific System*, Leeds, **1997**.
- [3] L. G. Butler, *Enzyme Microb. Technol.* **1979**, *1*, 253–259.
- [4] E. A. Sym, *Biochem. J.* **1936**, *30*, 609–617.
- [5] a) M. D. Lilly, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1982**, *32*, 162–169; b) G. Carrea, *Trends Biotechnol.* **1984**, *2*, 102–106; c) A. N. Semenov, Y. L. Khmelnitsky, I. V. Berezin, K. Martinek, *Biocatalysis* **1987**, *1*, 2–7; d) L. E. S. Brink, J. Tramper, K. C. A. M. Luyben, K. Van't Riet, *Enzyme Microb. Technol.* **1988**, *10*, 736–743; e) R. A. Ramelmeier, H. V. Blanch, *Biocatalysis* **1989**, *2*, 97–120; f) *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (Hrsg.: J. Tramper, M. H. Vermue, H. H. Beeftink, U. von Stockar), Elsevier, Amsterdam, **1992**; g) M. G. Wubbolts, O. Favre-Bulle, B. Withold, *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *52*, 301–308; h) M. Garguri, M. D. Legoy, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1337*, 227–232.
- [6] a) F. M. Menger, K. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *101*, 6731–6734; b) K. Martinek, A. V. Levashov, Y. L. Khmelnitsky, U. L. Klyachko, I. V. Berezin, *Science* **1982**, *218*, 889–891; c) P. D. I. Fletcher, G. D. Rees, B. H. Robinson, R. B. Freedman, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *832*, 204–214; d) P. L. Luisi, L. J. Magid, *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1986**, *20*, 409–474; e) M. Waks, *Protein Struct. Funct. Genet.* **1986**, *1*, 4–15; f) R. M. D. Verhaert, R. Hilhorst, M. Vermue, T. J. Schaafsma, C. Veeger, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *187*, 59–72.
- [7] a) A. M. Klibanov, *CHEMTECH* **1986**, *16*, 354–359; b) J. S. Dordick, *Enzyme Microb. Technol.* **1989**, *11*, 194–211; c) C. S. Chen, C. J.

Sih, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 711–723; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 695–707; d) A. M. Klibanov, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 141–144; e) M. N. Gupta, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *203*, 25–32; f) E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 367–382; g) L. Kvittingen, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 8253–8274; h) J. A. Jongejan, *Chim. Oggi* **1994**, July/August, 15–24; i) G. Bell, P. J. Halling, B. D. Moore, J. Partridge, D. G. Rees, *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 468–473; j) *Enzymatic Reactions in Organic Media* (Hrsg.: A. M. P. Koskinen, A. M. Klibanov), Blackie Academic & Professional, London, **1996**; k) S. V. Kamat, E. J. Beckman, A. J. Russell, *Crit. Rev. Biotechnol.* **1995**, *15*, 41–71; l) A. M. Klibanov, *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 97–101.

- [8] a) F. Borzeix, F. Monot, J. P. Vandecasteele, *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14*, 791–797; b) F. Yang, A. J. Russell, *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *47*, 60–70; c) R. J. Tweddel, S. Kermasha, D. Combes, A. Marty, *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *22*, 439–445; d) E. Catoni, E. Cernia, C. Palocci, *J. Mol. Catal. A* **1996**, *105*, 79–86.
- [9] C. Laane, S. Boeren, K. Vos, C. Veeger, *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 81–87.
- [10] A. Zaks, A. M. Klibanov, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 8017–8021.
- [11] J. A. Rupley, E. Gratton, G. Careri, *Trends Biochem. Sci.* **1983**, *8*, 18–22.
- [12] S. Bone, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *916*, 128–134.
- [13] L. A. S. Gorman, J. S. Dordick, *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *39*, 392–397.
- [14] a) P. J. Halling, *Enzyme Microb. Technol.* **1984**, *6*, 513–514; b) P. J. Halling, *Trends Biotechnol.* **1989**, *7*, 50–52; c) P. J. Halling, *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, *16*, 178–206.
- [15] H. L. Goderis, G. Ampe, M. P. Feyten, B. L. Fouwè, W. M. Guffens, S. M. Van Cauwenbergh, P. P. Tobback, *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 258–266.
- [16] a) M. Reslow, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *172*, 573–578; b) R. H. Valivety, P. J. Halling, A. D. Peilow, A. R. Macrae, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *222*, 461–464.
- [17] R. H. Valivety, P. J. Halling, A. R. Macrae, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1118*, 218–222.
- [18] R. H. Valivety, P. J. Halling, A. D. Peilow, A. R. Macrae, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1122*, 143–146.
- [19] G. Bell, A. E. M. Janssen, P. J. Halling, *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *20*, 471–477.
- [20] a) S. H. M. van Herp, E. O. Kamenskaya, Y. L. Khmelnitsky, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *202*, 379–384; b) R. H. Valivety, P. J. Halling, A. R. Macrae, *Biotechnol. Lett.* **1993**, *15*, 1133–1138; c) R. Bovara, G. Carrea, G. Ottolina, S. Riva, *Biotechnol. Lett.* **1993**, *15*, 937–942; d) R. Bovara, G. Carrea, A. M. Gioacchini, S. Riva, F. Secundo, *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *54*, 50–57.
- [21] K. Faber, S. Riva, *Synthesis* **1992**, 895–910.
- [22] a) G. Ljunger, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, *16*, 751–755; b) Y. Dusal, R. Lortie, *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *45*, 129–134; c) P. J. Halling, *Biotechnol. Tech.* **1992**, *6*, 271–276; d) Z. Yang, D. Robb, *Biotechnol. Tech.* **1993**, *7*, 37–42; e) E. Wehtje, K. Jasmedh, P. Adlercreutz, S. Chand, B. Mattiasson, *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *21*, 502–510.
- [23] L. Greenspan, *J. Res. Natl. Bur. Stand. Sect. A* **1977**, *81*, 89–96.
- [24] A. Zaks, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 3192–3196; b) M. Rizzi, P. Stylos, A. Riek, M. Reuss, *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14*, 709–714; c) M. Martinelle, K. Hult, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1251*, 191–197; d) S. Chatterjee, A. J. Russell, *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *40*, 1069–1077; e) S. Chatterjee, A. J. Russell, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 1022–1029.
- [25] C. R. Wescott, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1629–1631.
- [26] a) K. Ryu, J. S. Dordick, *Biochemistry* **1992**, *31*, 2588–2598; b) C. R. Wescott, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10362–10363; c) A. J. J. Straathof, J. L. L. Rakels, J. J. Heejnen in *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (Hrsg.: J. Tramper, M. H. Vermue, H. H. Beeftink, U. von Stockar), Elsevier, Amsterdam, **1992**, S. 137–144; d) J. B. A. Van Tol, J. B. Odenthal, J. A. Jongejan, J. A. Duine in *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (Hrsg.: J. Tramper, M. H. Vermue, H. H. Beeftink, U. von Stockar), Elsevier, Amsterdam, **1992**, S. 229–235; e) A. Reimann, D. A. Robb, P. J. Halling, *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 1081–1086; f) A. E. M.

- Janssen, A. M. Vaidya, P. J. Halling, *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, *18*, 340–346.
- [27] a) A. D. Blackwood, L. J. Curran, B. D. Moore, P. J. Halling, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1206*, 161–165; b) K. Xu, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9815–9819.
- [28] S. J. Singer, *Adv. Protein Chem.* **1962**, *17*, 1–68.
- [29] a) A. A. Klyosov, N. Van Viet, I. V. Berezin, *Eur. J. Biochem.* **1975**, *59*, 3–7; b) M. Jackson, H. M. Mantsch, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1078*, 2231–2235.
- [30] a) E. N. Vulfson, D. B. Sarney, B. A. Law, *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, *13*, 123–126; b) G. Lin, H.-C. Liu, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6067–6068.
- [31] Y. Yamamoto, H. Kise, *Biotechnol. Lett.* **1993**, *15*, 647–652.
- [32] S. Kamat, E. J. Beckman, A. J. Russell, *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14*, 265–271.
- [33] a) A. J. Russell, A. M. Klibanov, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 11624–11626; b) T. Yamane, T. Ichiryu, M. Nagata, A. Ueno, S. Shimizu, *Biotechnol. Bioeng.* **1990**, *36*, 1063–1069; c) K. Dabulis, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *41*, 566–571; d) Y. L. Khmel'niitsky, S. H. Welch, D. S. Clark, J. S. Dordick, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2647–2648; e) A. O. Triantafyllou, E. Wehtje, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *45*, 406–414; f) I. Mingarro, H. Gonzales-Navarro, L. Braco, *Biochemistry* **1996**, *35*, 9935–9944.
- [34] a) P. Adlercreutz, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *199*, 609–614; b) R. Bovara, G. Carrea, G. Ottolina, S. Riva, *Biotechnol. Lett.* **1993**, *15*, 169–174; c) E. Wehtje, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *41*, 171–178; d) D. K. Oladepo, P. J. Halling, V. F. Larsen, *Biocatal. Biotransform.* **1995**, *12*, 47–54; e) G. Pencreac'h, J. C. Baratti, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *47*, 630–635; f) R. J. Barros, E. Wehtje, P. Adlercreutz, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *59*, 364–373.
- [35] M. Wahlgren, T. Arnebrant, *Trends Biotechnol.* **1991**, *9*, 201–208.
- [36] M. T. Reetz, A. Zonta, J. Simpelkamp, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 373–375; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 301–303.
- [37] A. L. Margolin, *Trends Biotechnol.* **1996**, *14*, 223–230.
- [38] A. Matsushima, Y. Kodera, M. Hiroto, H. Nishimura, Y. Inada, *J. Mol. Catal. B* **1996**, *2*, 1–17, zit. Lit.
- [39] a) G. Ottolina, G. Carrea, S. Riva, L. Sartore, F. M. Veronese, *Biotechnol. Lett.* **1992**, *14*, 947–952; b) F. Secundo, S. Spadaro, G. Carrea, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *62*, 554–561.
- [40] a) V. M. Paradkar, J. S. Dordick, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5009–5010; b) M. Goto, N. Kamiya, F. Nakashio, *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *45*, 27–32; c) S. Basheer, K. I. Mogi, M. Nakajima, *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *45*, 187–195; d) Y. Okahata, T. Mori, *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 50–54.
- [41] a) A. R. Macrae, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1983**, *60*, 291–294; b) R. A. Wisdom, P. Dunnill, M. D. Lilly, *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *29*, 1081–1085; c) M. M. Hog, T. Yamane, S. Shimizu, S. Ishida, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, *61*, 776–781.
- [42] a) T. Fukui, T. Kawamoto, K. Sonomoto, A. Tanaka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1990**, *34*, 330–334; b) A. Wickli, E. Schmidt, J. R. Bourne in *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (Hrsg.: J. Tramper, M. H. Vermue, H. H. Beaufink, U. von Stockar), Elsevier, Amsterdam, **1992**, S. 577–584; c) M. Indlekofer, M. Funke, W. Claassen, M. Reuss, *Biotechnol. Prog.* **1995**, *11*, 436–442.
- [43] a) C. M. Rosell, A. M. Vaidya, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *44*, 283–286; b) C. M. Rosell, A. M. Vaidya, P. J. Halling, *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *49*, 284–289; c) S. Bourg-Garros, N. Razafindrambo, A. A. Pavia, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *59*, 495–500.
- [44] a) A. Zaks, A. M. Klibanov, *Science* **1984**, *224*, 1249–1251; b) M. Reslow, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1987**, *26*, 1–8; c) C. J. Wheeler, R. Croteau, *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *248*, 429–434; d) G. Ayala, M. Tuena de Gomez-Puyou, A. Gomez-Puyou, A. Darszon, *FEBS Lett.* **1986**, *203*, 41–43; e) G. Garza-Ramos, A. Darszon, M. Tuena de Gomez-Puyou, A. Gomez-Puyou, *Biochemistry* **1989**, *28*, 3177–3182; f) D. B. Volkin, A. Staubli, R. Langer, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *37*, 843–853.
- [45] a) K. Griebenow, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11695–11700; b) F. H. Arnold, *Trends Biotechnol.* **1990**, *8*, 244–249; c) L. You, F. H. Arnold, *Protein Eng.* **1994**, *9*, 77–83.
- [46] a) P. L. Fitzpatrick, A. C. U. Steinmetz, D. Ringe, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 8653–8657; b) N. H. Yennawar, H. P. Yennawar, G. K. Farber, *Biochemistry* **1994**, *33*, 7326–7336.
- [47] U. R. Desai, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3940–3945.
- [48] L. T. Kanerva, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6864–6865.
- [49] P. Pasta, S. Riva, G. Carrea, *FEBS Lett.* **1988**, *236*, 329–332.
- [50] P. P. Wangikar, P. Michels, D. S. Clark, J. S. Dordick, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 70–76.
- [51] a) P. A. Burke, R. G. Griffin, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *42*, 87–94; b) R. Affleck, Z. I. Xu, V. Suzawa, K. Focht, D. S. Clark, J. S. Dordick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 1100–1104; c) J. Broos, A. J. W. G. Visser, J. F. J. Engbersen, W. Verboom, A. van Hoek, D. N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12657–12663; d) J. Partridge, P. R. Dennison, B. D. Moore, P. J. Halling, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1386*, 79–89.
- [52] a) M. T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, K. E. Jaeger, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2961–2963; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2830–2832; b) K. Faber, G. Ottolina, S. Riva, *Biocatalysis* **1993**, *8*, 91–132.
- [53] a) C. R. Wescott, A. M. Klibanov, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1206*, 1–9; b) G. Carrea, G. Ottolina, S. Riva, *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 63–70.
- [54] a) P. A. Fitzpatrick, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3166–3171; b) F. Terradas, M. Teston-Henry, P. A. Fitzpatrick, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 390–396; c) R. Bovara, G. Carrea, L. Ferrara, S. Riva, *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2*, 931–938; d) Y. Hirose, K. Kariya, J. Sasaki, Y. Kurono, H. Ebike, K. Achiwa, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7157–7160.
- [55] a) E. Rubio, A. Fernandez-Mayorales, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 695–696; b) D. A. MacManus, E. N. Vulfson, *Enzyme Microbiol. Technol.* **1997**, *20*, 225–228.
- [56] a) K. Nakamura, J. Takebe, T. Kitayama, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4941–4944; b) F. Secundo, S. Riva, G. Carrea, *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 267–280.
- [57] a) T. Ke, C. R. Wescott, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3366–3374; b) C. R. Wescott, H. Noritomi, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10365–10370; c) G. Colombo, G. Ottolina, G. Carrea, A. Bernardi, C. Scolastico, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 1205–1214.
- [58] R. Verger, *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 32–38.
- [59] C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294–7298.
- [60] C. S. Chen, S. H. Wu, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2812–2817.
- [61] a) C. J. Sih, G. Girdaukas, C. S. Chen, C. J. Sih in Lit. [7j], S. 94–139; b) L. T. Kanerva in Lit. [7j], S. 170–223.
- [62] K. Faber, S. Riva, *Synthesis* **1992**, 895–910.
- [63] G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7072–7076.
- [64] A. Ghogare, G. S. Kumar, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 1533–1535.
- [65] D. Bianchi, P. Cesti, E. Battistel, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5531–5534.
- [66] a) M. Degueil-Castaing, B. De Jeso, S. Drouillard, B. Maillard, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 953–954; b) Y. F. Wang, J. J. Lalonde, M. Momongan, D. E. Bergbreiter, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7200–7205.
- [67] G. Carrea, B. Danieli, G. Palmisano, S. Riva, M. Santagostino, *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 775–784.
- [68] R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissflock, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656–2665.
- [69] S. M. Roberts, *Philos. Trans. R. Soc. London* **1989**, *324*, 557–587.
- [70] „Biocatalysis in Agricultural Biotechnology“: T. Umemura, H. Hirohara, *ACS Symp. Ser.* **1989**, *389*, 371–384.
- [71] L. E. Janes, R. J. Kazlauskas, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 3719–3733.
- [72] R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissflock, *J. Mol. Catal. B* **1997**, *3*, 65–72.
- [73] A. N. E. Weissflock, R. J. Kazlauskas, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6959–6969.
- [74] K. Lemke, M. Lemke, F. Theil, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6268–6273.

- [75] M. Cygler, P. Grochulski, R. J. Kazlauskas, J. D. Schrag, F. Bou-thillier, B. Rubin, A. N. Serreqi, A. K. Gupta, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180–3186.
- [76] J. P. Branier, L. Blanco, G. Rousseau, E. Guibe'-Jampel, I. Fresse, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1570–1574.
- [77] a) I. Brackenridge, R. McCague, S. M. Roberts, N. J. Turner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 1093–1094; b) M. C. R. Franssen, E. L. V. Goetheer, H. Jongejan, A. de Groot, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8345–8348.
- [78] H. Kitaguchi, P. A. Fitzpatrick, J. E. Huber, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3094–3095.
- [79] a) V. Gotor, E. Menendez, Z. Moulongui, A. Gaset, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 2453–2456; b) M. T. Reetz, C. Dreisbach, *Chimia* **1994**, *48*, 570; c) L. E. Iglesias, V. M. Sanchez, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2675–2677.
- [80] L. T. Kanerva, P. Csomas, O. Sundholm, G. Bernath, F. Fulop, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1705–1716.
- [81] K. E. Jaeger, K. Liebeton, A. Zonta, K. Schimossek, M. T. Reetz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *46*, 99–105.
- [82] M. Soledad de Castro, J. V. Sinisterra Cago, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 2877–2892.
- [83] a) A. L. Gutman, E. Meyer, E. Kalerin, F. Polyak, J. Sterling, *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *40*, 760–767; b) A. L. Gutman, E. Shkolnik, E. Meyer, F. Polyak, D. Brenner, A. Boltanski, *Ann. NY Acad. Sci.* **1996**, *799*, 620–632.
- [84] a) S. Puertas, R. Brieva, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 4007–4014; b) M. Pozo, V. Gotor, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 4321–4326; c) B. Orsat, P. B. Alper, W. Moree, C. P. Mak, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 712–713; d) S. Takayama, W. J. Moree, C. H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6287–6290.
- [85] D. Bianchi, P. Cesti, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5657–5659.
- [86] N. Ohrner, C. Orrenius, A. Mattson, T. Norin, K. Hult, *Enzyme Microbiol. Technol.* **1996**, *19*, 328–331.
- [87] G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7072–7076.
- [88] A. M. Klibanov, G. Kirchner, US-A 4601987, **1986**.
- [89] B. Cambou, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *26*, 1149–1154.
- [90] A. Gentile, C. Giordano, C. Fuganti, L. Ghirotto, S. Servi, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6637–6640.
- [91] L. T. Kanerva, O. Sundholm, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 1385–1389.
- [92] D. M. Gou, Y. C. Liu, C. S. Chen, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1287–1289.
- [93] J. S. Wallace, K. B. Rede, M. E. Williams, C. J. Morrow, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3544–3546.
- [94] G. Rossey, I. Chekroun, A. Ugolini, A. Wick, B. Gerin, A. Bourbon, J. B. Graux, FR-B 89-246890111, **1989** [*Chem. Abstr.* **1991**, *114*, 81901s].
- [95] M. C. de Zoete, A. C. Kock Van Dalen, F. Van Rantwijk, R. A. Sheldon, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1831–1832.
- [96] a) N. Baba, M. Mimura, J. Hiratake, K. Uchida, J. Oda, *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 2685–2687; b) N. Baba, K. Takeno, J. Iwasa, J. Oda, *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 3349–3350.
- [97] a) F. Bjorkling, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1301–1303; b) F. Bjorkling, H. Frykman, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 4587–4592.
- [98] E. Mizuguchi, T. Suzuki, K. Achiba, *Synlett* **1994**, 929–930.
- [99] N. W. Fadnavis, K. Koteswar, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 337–339.
- [100] a) H. Stecher, K. Faber, *Synthesis* **1997**, 1–16; b) E. J. Ebbers, G. J. A. Ariaans, J. P. M. Houbiers, A. Bruggink, B. Zwanenburg, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 9417–9476; c) R. S. Ward, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1475–1490.
- [101] S. Takano, M. Suzuki, K. Ogasawara, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1043–1046.
- [102] E. L. Eliel in *Stereochemistry of Organic Compounds* (Hrsg.: E. L. Eliel, S. H. Wilen, L. N. Mander), Wiley, New York, **1994**, S. 315.
- [103] M. Kitamura, M. Tokunaga, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 144–152.
- [104] M. Inagaki, J. Hiratake, T. Nishioka, J. Oda, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5643–5649.
- [105] S. Brand, M. F. Jones, C. M. Rayner, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8493–8496.
- [106] N. J. Turner, J. R. Winterman, R. McCague, J. S. Parratt, S. J. C. Taylor, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1113–1116.
- [107] a) H. van der Deen, A. D. Cuiper, R. P. Hof, A. van Oeveren, B. L. Feringa, R. M. Kellogg, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3801–3803; b) J. Willem, J. F. Thuring, A. J. H. Klunder, G. H. L. Nefkens, M. A. Wegman, B. Zwanenburg, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4759–4760.
- [108] P. J. Um, D. G. Drueckhammer, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5605–5610.
- [109] R. Stürmer, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1221–1222; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1173–1174.
- [110] P. M. Dinh, J. A. Howarth, A. R. Hudnott, J. M. J. Williams, W. Harris, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7623–7626.
- [111] A. L. E. Larsson, B. Anders Persson, J. E. Backvall, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1256–1258; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1211–1212.
- [112] M. T. Reetz, K. Schimossek, *Chimia* **1996**, *50*, 668–669.
- [113] a) C. R. Johnson, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 333–341; b) E. Schoffers, A. Golebiowski, C. R. Johnson, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 3769–3826; c) B. Danieli, G. Lesma, D. Passarella, S. Riva in *Advances in the Use of Synths in Organic Chemistry* (Hrsg.: A. Dondoni, A. Padwa), JAI, London, **1993**, S. 143–219.
- [114] L. Banfi, G. Guanti, *Synthesis* **1993**, 1029–1056.
- [115] B. Morgan, G. Bydlinsky, D. R. Dodds, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1765–1772.
- [116] a) A. L. Gutman, M. Shapira, A. Boltanski, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1063–1065; b) M. Shapira, A. L. Gutman, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 1689–1700.
- [117] S. Puertas, R. Rebolledo, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6024–6027.
- [118] A. J. Carnell, J. Barkley, A. Singh, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7781–7784.
- [119] J. Hirose, K. Kariya, Y. Nakanishi, K. Achiba, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1063–1066.
- [120] S. Nagumo, T. Arai, H. Akita, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5165–5168.
- [121] C. Bonini, R. Racioppi, L. Viggiani, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 353–354.
- [122] T. Fukui, T. Kawamoto, A. Tanaka, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 73–82.
- [123] a) J. M. Chong, E. K. Mar, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5683–5686; b) T. Itoh, T. Ohta, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6407–6408.
- [124] T. Itoh, T. Ohta, M. Sano, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6387–6390.
- [125] T. Itoh, T. Ohta, *Chem. Lett.* **1991**, 217–218.
- [126] M. A. Sparks, J. S. Panek, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4085–4088.
- [127] a) K. Nakamura, K. Ishihara, A. Ohno, M. Vemura, H. Nishimura, Y. Hayashi, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3603–3604; b) Y. Yamasaki, K. Hosono, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3895–3896.
- [128] C. Baldoli, S. Maiorana, G. Carrea, S. Riva, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 767–772.
- [129] a) G. Nicolosi, A. Patti, M. Piattelli, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 251–254; b) D. Lambusta, G. Nicolosi, A. Patti, M. Piattelli, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 919–924; c) T. Izumi, F. Tamura, K. Sasaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, *65*, 2784–2788; d) M. J. Kim, H. Cho, K. Chol, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 2270–2272; e) N. W. Boaz, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2061–2064.
- [130] G. Gill, E. Ferre, J. LePetit, C. Triantaphylides, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1647–1648.
- [131] J. C. Fiaud, R. Gil, J. Y. Legros, W. A. Konig, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6967–6970.
- [132] K. Naemura, A. Furutani, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 1879–1884.
- [133] M. Inagaki, J. Hiratake, T. Nishida, J. Oda, *Agric. Biol. Chem.* **1989**, *53*, 1879–1884.
- [134] a) K. Tanaka, Y. Shogase, H. Osuga, H. Suzuki, K. Nakamura, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1675–1678; b) K. Tanaka, H. Osuga, H. Suzuki, Y. Shogase, Y. Kitahara, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1998**, *935*–940.
- [135] J. K. Browne, M. A. McKervey, M. Pitarch, J. A. Russell, J. S. Millership, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1787–1790.
- [136] P. Muller, *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 1077–1184.
- [137] P. Cesti, A. Zaks, A. M. Klibanov, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1985**, *11*, 401–407.

- [138] M. Therisod, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5638–5640.
- [139] M. Therisod, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *109*, 3977–3981.
- [140] S. Riva, J. Chopineau, A. P. G. Kieboom, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 584–589.
- [141] S. Riva in Lit. [7j], S. 140–169.
- [142] S. Cai, S. Hakomori, T. Toyokuni, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3431–3437.
- [143] L. Panza, M. Luisetti, E. Crociati, S. Riva, *J. Carbohydr. Chem.* **1993**, *12*, 125–130.
- [144] M. J. Chin, G. Iacazio, D. G. Spackman, N. J. Turner, S. M. Roberts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, 661–662.
- [145] S. Riva, B. Danieli, M. Luisetti, *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 618–621.
- [146] B. Danieli, M. Luisetti, S. Riva, A. Bertinotti, E. Ragg, L. Scaglioni, E. Bombardelli, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3637–3642.
- [147] J. O. Rich, B. A. Bedell, J. S. Dordick, *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *45*, 426–434.
- [148] X. Chen, A. Johnson, J. S. Dordick, D. G. Rethwisch, *Macromol. Chem. Phys.* **1994**, *195*, 3567–3578.
- [149] K. Adelhorst, F. Bjorkling, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, *Synthesis* **1990**, 112–115.
- [150] S. Riva, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3291–3295.
- [151] F. Nicotra, S. Riva, F. Secundo, L. Zucchelli, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1703–1704.
- [152] S. Riva, R. Bovara, G. Ottolina, G. Carrea, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3161–3164.
- [153] A. Bertinotti, G. Carrea, G. Ottolina, S. Riva, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 13165–13172.
- [154] B. Danieli, G. Lesma, M. Luisetti, S. Riva, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 5855–5862.
- [155] A. L. Margolin, D. L. Delinck, M. R. Whalon, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2849–2854.
- [156] P. C. Michels, Y. L. Khmelnitsky, J. S. Dordick, D. S. Clark, *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 210–215.
- [157] V. M. Mozhaev, C. L. Budde, J. O. Rich, A. Y. Usyatinsky, P. C. Michels, Y. L. Khmelnitsky, J. S. Dordick, D. S. Clark, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3971–3982.
- [158] Y. L. Khmelnitsky, C. L. Budde, J. M. Arnold, A. Y. Usyatinsky, J. S. Dordick, D. S. Clark, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11554–11555.
- [159] M. Adamezyk, J. C. Gebler, J. Grote, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1027–1030.
- [160] N. Chinsky, A. L. Margolin, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 386–388.
- [161] S. Tawaki, A. M. Klibanov, *Biocatalysis* **1993**, *8*, 3–19.
- [162] A. Baldessari, L. E. Iglesias, E. G. Gros, *J. Chem. Res. Synop.* **1992**, 204–205.
- [163] D. L. Delink, A. L. Margolin, *Tetrahedron* **1990**, *31*, 3093–3096.
- [164] A. Zaks, D. R. Dodds, *Drug Discovery Today* **1997**, *2*, 513–531.
- [165] B. M. Morgan, D. R. Dodds, A. Zaks, D. R. Andrews, R. Klesse, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7736–7743.
- [166] R. N. Patel, C. M. McNamee, L. J. Szarka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *38*, 56–60.
- [167] R. L. Hanson, A. Banerjee, F. T. Comezoglu, K. D. Mirfakhray, R. N. Patel, L. J. Szarka, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 1925–1934.
- [168] R. N. Patel, A. Banerjee, L. J. Szarka, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 1055–1059.
- [169] R. N. Patel, A. Banerjee, L. J. Szarka, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 1767–1771.
- [170] K. E. Holt, U. Berens, R. McCague, S. J. C. Taylor, *Abstr. Pap. Biotrans '97 Conference* (La Grande Motte, 1997), S. 65.
- [171] a) F. Balkenhol, K. Ditrich, B. Hauer, W. Ladner, *J. Prakt. Chem.* **1997**, *339*, 381–384; b) F. Balkenhol, B. Hauer, W. Ladner, U. Pressler, C. Nubling, US-A 5728876, **1998**.
- [172] M. H. Coleman, A. R. MacRae (Unilever NV), DE-B 2705608, **1977** [Chem. Abstr. **1977**, *87*, 166366].
- [173] T. Matsuo, N. Sawamura, Y. Hashimoto, W. Hashida (Fuji Oil Co.), EP-B 0035883A2, **1982** [Chem. Abstr. **1982**, *96*, 4958y].
- [174] V. Partali, L. Kvittingen, H. R. Sliwka, T. Anthonsen, *Angew. Chem. 1996*, *108*, 342–344; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 329–330.
- [175] J. Fabre, D. Betbeder, F. Paul, P. Monsan, J. Perie, *Carbohydr. Res.* **1993**, *243*, 407–411.
- [176] G. Fregapane, D. B. Sarney, E. N. Vulson, *Enzyme Microbiol. Technol.* **1991**, *13*, 796–800.
- [177] L. Cao, A. Fischer, U. T. Bornscheuer, R. D. Schmid, *Biocatal. Biotransform.* **1997**, *14*, 269–283.
- [178] J. S. Dordick, R. J. Linhardt, D. G. Rethwisch, *CHEMTECH* **1994**, *24*(1), 33–39.
- [179] A. L. Margolin, J. Y. Crenne, A. M. Klibanov, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1607–1610.
- [180] D. Knani, A. L. Gutmann, D. H. J. Kohn, *Polym. Sci. Part A* **1993**, *31*, 1221–1232.
- [181] a) C. Berkane, G. Mezoul, T. Lalot, M. Bigodiot, E. Marechal, *Macromolecules* **1997**, *30*, 7729–7734; b) A. K. Chaudhary, E. J. Beckman, A. J. Russell, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3728–3733; c) D. R. Patil, J. S. Dordick, D. G. Rethwisch, *Macromolecules* **1991**, *24*, 3462–3463; d) J. S. Wallace, C. J. Morrow, *J. Polym. Sci. Part A* **1989**, *27*, 3271–3284; e) J. S. Wallace, C. J. Morrow, *J. Polym. Sci. Part A* **1989**, *27*, 2553–2567.
- [182] a) K. S. Bisht, F. Deng, R. A. Gross, D. L. Kaplan, G. J. Swift, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1363–1367; b) A. Cordova, T. Iversen, K. Hult, *Macromolecules* **1998**, *31*, 1040–1045; c) K. S. Bisht, Y. T. Svirkin, L. A. Henderson, R. A. Gross, D. L. Kaplan, G. Swift, *Macromolecules* **1997**, *30*, 7735–7742; d) S. Kobayashi, H. Kikuchi, H. Uyama, *Macromol. Rapid Commun.* **1997**, *18*, 575–579; e) K. S. Matsumura, K. Mabushi, K. Toshima, *Macromol. Rapid Commun.* **1997**, *18*, 477–482; f) A. R. Nobes, R. J. Kazlauskas, R. H. Marchessault, *Macromolecules* **1996**, *29*, 4829–4833.
- [183] H. Kitaguchi in Lit. [7j], S. 224–243.
- [184] T. Sakurai, A. L. Margolin, A. J. Russell, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7236–7237.
- [185] A. L. Margolin, D. F. Tai, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7885–7887.
- [186] H. Kitaguchi, D. F. Tai, A. M. Klibanov, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5487–5488.
- [187] a) A. L. Margolin, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3802–3804; b) L. Gardossi, D. Bianchi, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6328–6329.
- [188] R. A. Sheldon in Lit. [7j], S. 280–284.
- [189] F. M. Fonteyn, C. Blecker, G. Lognoy, M. Marlier, M. Severin, *Biotechnol. Lett.* **1994**, *16*, 693–696.
- [190] F. Effenberger, *Angew. Chem.* **1994**, *104*, 1609–1619; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1555–1564.
- [191] A. Hickel, M. Hasslacher, H. Griengl, *Physiol. Plant.* **1996**, *98*, 891–898.
- [192] H. Griengl, A. Hickel, D. V. Johnson, C. Kratky, M. Schmidt, H. Schwab, *Chem. Commun.* **1997**, 1933–1940.
- [193] a) M. Hasslacher, M. Schall, M. Hayn, H. Griengl, S. D. Kohlwein, H. Schwab, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 5884–5891; b) S. Forster, J. Roos, F. Effenberger, H. Wajant, A. Sprauer, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 493–494; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 437–439.
- [194] F. Effenberger, T. Ziegler, S. Forster, *Angew. Chem.* **1987**, *99*, 491–492; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 458–460.
- [195] F. Effenberger, J. Eichhorn, J. Roos, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 271–282.
- [196] F. Effenberger, J. Eichhorn, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 469–476.
- [197] F. Effenberger, J. Jäger, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3867–3873.
- [198] F. Effenberger, B. Hörsch, S. Förster, T. Ziegler, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1249–1252.
- [199] M. Schmidt, S. Hervé, N. Klempier, H. Griengl, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 7883–7840.
- [200] S. H. Hsu, S. S. Wu, Y. F. Wang, C. H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6403–6406.
- [201] A. Fishman, M. Zviely, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 107–118.
- [202] J. Roos, U. Stelzer, F. Effenberger, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 1043–1049.
- [203] R. Z. Kazandjian, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5448–5450.
- [204] G. H. Müller, A. Lang, D. R. Seithel, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 2513–2522.
- [205] J. S. Dordick, M. A. Marletta, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 31–36.
- [206] J. Grunwald, B. Wirz, M. Scollar, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6732–6734.