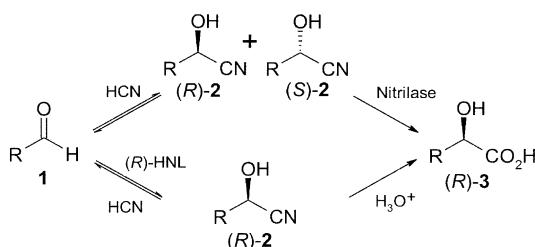


Stufenweise molekulare Optimierung einer (R)-Hydroxynitrillyase für die asymmetrische Synthese im Produktionsmaßstab**

Anton Glieder,* Roland Weis, Wolfgang Skranc,
Peter Poechlauer, Ingrid Dreveny, Sandra Majer,
Marcel Wubbolts, Helmut Schwab und Karl Gruber

Optisch aktive α -Hydroxycarbonsäuren wie Mandelsäure und ihre Derivate sind wichtige Bausteine für die Produktion von Pharmazeutika.^[1] Hydroxynitrillyasen (HNLs) eröffnen den Zugang zu attraktiven Synthesemethoden: Diese Enzyme katalysieren die Synthese von Cyanhydrinen durch asymmetrische Addition von HCN an Aldehyde mit hohen Ausbeuten und Selektivitäten (Schema 1).^[2,3] Unter sauren Bedingungen und bei erhöhter Temperatur werden die Cyanhydrine ohne zu racemisieren chemisch zu den entsprechenden α -Hydroxycarbonsäuren hydrolysiert.^[1] Der alternative Weg mit enantioselektiven Nitrilasen^[4,5] würde über Substrat-Racemisierung *in situ* bei hohem pH theoretisch



Schema 1. Enantioselektive Synthese von (R)- α -Hydroxycarbonsäuren (R)-3 aus Aldehyden 1 über den Nitrilase- und den Hydroxynitrilyase(HNL)-Weg. Andere Möglichkeiten wie die hydrolytische Trennung von Cyanhydrinen ohne zusätzliche Katalysatoren sind auf eine maximale Ausbeute von 50% beschränkt.

[*] Dr. A. Glieder, Mag. S. Majer, Prof. Dr. H. Schwab

Institut für Biotechnologie
Technische Universität Graz
Petersgasse 12, 8010 Graz (Österreich)
Fax: (+43) 316-873-8434
E-mail: glieder@glieder.com

Mag. R. Weis, Prof. Dr. K. Gruber
Research Centre Applied Biocatalysis
Steyergasse 17, 8010 Graz (Österreich)

Dr. I. Dreveny, Prof. Dr. K. Gruber
Institut für Chemie
Karl-Franzens-Universität Graz
Heinrichstraße 28, 8010 Graz (Österreich)
Dr. W. Skranc, Dr. P. Poechlauer, Dr. M. Wubbolts
R & D Center Linz
DSM Fine Chemicals Austria Nfg. GmbH & Co KG
St.-Peter-Straße 25, 4021 Linz (Österreich)

[**] Wir danken dem SFB Biokatalyse (F0101), TIG, SFG, dem Land Steiermark und der Stadt Graz für die finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

auch Ausbeuten von 100% liefern. Allerdings zeigen viele Nitrilasen niedrige Umsatzgeschwindigkeiten, geringe Stereoselektivitäten und schnelle Inaktivierung bei hohen Substratkonzentrationen.

(R)-*ortho*-Chlormandelsäure (**3b**) ist eine Schlüsselverbindung für die Produktion eines häufig verabreichten Thrombozytenfunktionshemmers, der bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom das Risiko von Myokard-Infarkten und Schlaganfällen mindert. Allerdings bereiten *ortho*-substituierte Substrate in allen bekannten Synthesewegen technische Schwierigkeiten; sie liefern schlechte Ausbeuten, niedrige Umsatzgeschwindigkeiten und/oder nur geringe Enantiomerenüberschüsse.^[4,6-9] Darüber hinaus ist die Umsetzung von aromatischen Aldehyden mit der bisher einzigen beschriebenen rekombinanten (R)-Hydroxynitrilyase aus *Linum usitatissimum* (*LuHNL*) unvollständig.^[10] (R)-HNL aus *Prunus amygdalus* (*PaHNL*) zeigt eine breite Substratspezifität, war aber nur in sehr kleinen Mengen aus natürlichen Quellen erhältlich; die rekombinante Produktion von aktiver FAD(Flavin-Adenin-Dinucleotid)-haltiger HNL war bislang nicht erfolgreich.^[11] Hier berichten wir über die erste rekombinante *PaHNL*, die ihre Aktivität auch unter Prozessbedingungen beibehält. Dadurch wird die Anwendung dieses Enzyms in Emulsionssystemen bei niedrigem pH-Wert möglich. Wir zeigen auch den Erfolg eines weithin anwendbaren Optimierungskonzepts, mit dem die Produktivität dieses Enzyms während des Fermentationsprozesses gesteigert werden konnte, was zu hohen Umsatzgeschwindigkeiten mit dem schwierigen Substrat **1b** führte. Unser Ziel war die Entwicklung eines kommerziell nützlichen Biokatalysators für die Produktion von (R)-**3b** über den HNL-Weg, um die Produktion von enantiomerenreinem (R)-**2b** in hoher Ausbeute und mit hoher Enantioselektivität durch geringe Mengen eines robusten Enzyms zu gewährleisten.

Für *PaHNL* ist eine beachtliche Menge an Daten über präparative Anwendungen sowie biochemische und strukturelle Untersuchungen vorhanden.^[2,3,12-17] Um unbeschränkten Zugang zu *PaHNL* zu erlangen, klonten wir das *Pa_hnl5*-Gen aus *Prunus amygdalus*, das große Ähnlichkeit zu den spezifisch in Blütengeweben exprimierten *hnl*-Genen aus *Prunus dulcis* (*mdl1*, 99 % Identität) und *Prunus serotina* (*mdl5*, 94 % Identität) hat. Durch Überexpression des *Pa_hnl5*-Gens mit seiner natürlichen pflanzlichen Sekretionssequenz in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* erhielten wir 250 mg aktives, sekretiertes Enzym pro Liter Kulturrührstand. Die spezifische Aktivität des stark glycosylierten Enzyms für die Spaltung von **2a** ist mit $295 \pm 30 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ doppelt so hoch wie diejenige von aus Mandelkernen isolierter *PaHNL* (Sigma M-6782, Lot41H4016; $160 \pm 30 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Die Aktivität des rekombinanten Isoenzymes *PaHNL5* änderte sich zwischen pH 2.5 bis 6.5 kaum. *PaHNL5* war überraschend stabil unter sauren Bedingungen (Abbildung 1), unter denen die chemische Konkurrenzreaktion unterdrückt wird^[18,19] und auch das enantiomerenreine Cyanhydrin-Produkt stabil ist. Diese Tatsache ist außerordentlich wichtig für HNL-Reaktionen in technischen Emulsionssystemen; sie ermöglicht die Produktion von reinen Enantiomeren sogar mit langsam reagierenden Substraten sowie eine effektive Rückgewinnung des Enzyms. Eine vergleichbare Stabilität

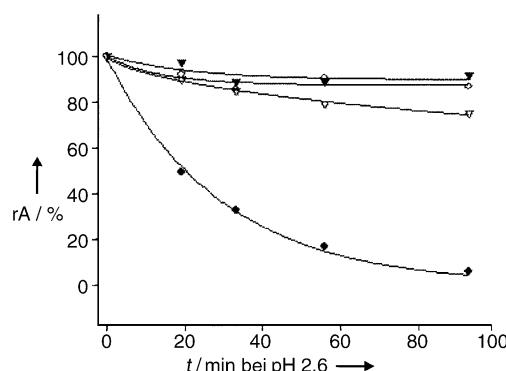


Abbildung 1. PaHNL5 (H21, ○), die in *Pichia pastoris* mit der Signalsequenz des α -Mating-Faktors aus *S. cerevisiae* exprimiert wurde, und ihre A111G-Variante (▼) sind bei niedrigen pH-Werten bemerkenswert stabil. Das deglycosyierte Enzym (H21_deglyco, ▽) weist leicht verrinerte Stabilität auf. Zum Vergleich ist kommerzielle PaHNL aus Mandelsamen (Sigma, ●) gezeigt. Die relativen Aktivitäten (rA) wurden nach verschiedenen Reaktionszeiten bei pH 2.6 durch photometrische Analyse der Spaltung von **2a** bei pH 5.0 bestimmt.

bei tiefen pH-Werten ist für keine andere HNL bekannt. Zwar ist die molekulare Grundlage für diese Eigenschaft nach wie vor ungeklärt, die Überglycosylierung durch *Pichia* kann jedoch nicht der einzige Grund sein: Deglycosylierung der rekombinanten PaHNL5 mit Endoglycosidase H in einem nicht denaturierenden Puffer bei 37 °C, welche nur einen N-Acetylglucosamin-Substituenten an jedem modifizierten Asparagin belässt, führte bei pH 2.6 im Unterschied zu einer PaHNL-Präparation aus Mandelsamen (Sigma) nicht zu einer starken Inaktivierung. Die Stabilität des deglycosylierten Enzyms war nach der Behandlung bei 37 °C leicht reduziert. Die Desaktivierungs-Halbwertszeiten des rekombinanten Proteins PaHNL5_L1Q (H21), des Enzyms mit der zusätzlichen Mutation (A111G), des deglycosylierten Enzyms (H21_deglyco) und des nativen Enzyms aus Mandelkernen (Sigma) unter diesen Bedingungen wurden aus den Inaktivierungskurven zu ca. 530, 530, 250 bzw. 20 min bestimmt (Abbildung 1).

Im nächsten Schritt gelang uns durch Änderung der ersten Aminosäure des reifen Proteins (Leucin zu Glutamin; L1Q) und durch Austausch des natürlichen Pflanzensekretions-Signalpeptids gegen die α -Mating-Faktor-Signalsequenz von *Saccharomyces cerevisiae* eine 4- bis 4.5fache Steigerung der Enzymproduktivität. Die Sekretion von nahezu reinem Enzym in den Kulturüberstand und die Produktion von 1 g Enzym pro Liter Überstand sichern verlässlich die fast unbeschränkte Verfügbarkeit dieses neuen Biokatalysators.

Für die Synthese der industriell interessanten Zwischenstufe (*R*)-**2b** wurde bei Katalyse durch das pH-stabile rekombinante PaHNL-Isoenzym 5 eine hohe Enantioselektivität beobachtet. Dennoch waren die Umsatzgeschwindigkeiten mehr als 10- bis 15-mal geringer als bei der Reaktion mit dem natürlichen, unsubstituierten Substrat **1a** (Tabelle 1). Bislang wurde noch keine erfolgreiche Methode für die stereoselektive Umsetzung von *ortho*-substituierten Mandelonitril- oder Benzaldehydderivaten beschrieben: Auch für die Reaktion mit nativer PaHNL aus natürlichen Quellen,^[9]

Tabelle 1: Enantioselektive Synthese und Spaltung von chlorsubstituierten Mandelonitrilderivaten.^[a]

Nr.	R	Substrat	Produkt	Mutation	spezifische Aktivität ^[b] [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]
1	Ph	1a	(<i>R</i>)- 2a		1450 ± 400
2	Ph	1a	(<i>R</i>)- 2a	A111G	1150 ± 400
3	Ph	1a	(<i>R</i>)- 2a	V317G	295 ± 50
4	<i>o</i> -Cl-Ph	1b	(<i>R</i>)- 2b		67 ± 25
5	<i>o</i> -Cl-Ph	1b	(<i>R</i>)- 2b	A111G	409 ± 60
6	<i>o</i> -Cl-Ph	1b	(<i>R</i>)- 2b	V317G	< 5
7	<i>m</i> -Cl-Ph	1c	(<i>R</i>)- 2c		155 ± 30
8	<i>m</i> -Cl-Ph	1c	(<i>R</i>)- 2c	A111G	390 ± 100
9	<i>m</i> -Cl-Ph	1c	(<i>R</i>)- 2c	V317G	290 ± 50
10	<i>p</i> -Cl-Ph	1d	(<i>R</i>)- 2d		298 ± 50
11	<i>p</i> -Cl-Ph	1d	(<i>R</i>)- 2d	A111G	566 ± 40
12	<i>p</i> -Cl-Ph	1d	(<i>R</i>)- 2d	V317G	26 ± 13
13	Ph	2a	(<i>S</i>)- 2a + 1a		325 ± 30
14	Ph	2a	(<i>S</i>)- 2a + 1a	A111G	8 ± 2
15	Ph	2a	(<i>S</i>)- 2a + 1a	V317G	6 ± 1.5

[a] Alle Mutationen wurden im Produktionsklon PaHNL5_L1Q hergestellt. Die Spaltungsaktivität für **2a** wurde photometrisch während der ersten 3 min einer linearen Zunahme der Produktkonzentration bestimmt ($\lambda = 280 \text{ nm}$; $T = 25^\circ\text{C}$; 12 mM Substrat, 0.1 M Phosphat-Citrat-Puffer, pH 5.0). Alle Cyanhydrinsynthesen wurden mit 15 mM Substrat und 0.5 mg gereinigtem Enzym in einer Emulsion von 3.8 mL 50 mM Citratpuffer, 2.1 mL *tert*-Butylmethylether und 1.2 mL HCN bei 10 °C und pH 3.4 durchgeführt. [b] Die spezifische Aktivität basiert auf mit dem Lowry-Test bestimmten Proteinkonzentrationen mit PaHNL von Sigma als Standard sowie auf Produktbildungsgeschwindigkeiten innerhalb der ersten 15 min (**1b**) bzw. 5–10 min (**1a-d**). In diesen Zeiträumen wurden 5–20% Produkt gebildet.

für die Umsetzung von **2b** mit Nitrilasen^[4] und für den nicht biokatalytischen Weg mit Titan- oder Vanadium-Katalysatoren^[6,7,20] wurden ähnliche Beobachtungen gemacht wie für das PaHNL-Isoenzym 5. Um die Stellen im aktiven Zentrum zu verkleinern, die zu sterischen Wechselwirkungen führen könnten, wurden Alanin 111 (A111) und Valin 317 (V317) durch ortsspezifische Mutagenese gegen Glycin ausgetauscht. Simulationen des Substrat-Dockings von (*R*)-**2b**, (*R*)-**2c** und (*R*)-**2d** in das aktive Zentrum eines Homologiemodells von PaHNL5 (basierend auf der bekannten Struktur des homologen Isoenzyms PaHNL1^[15] aus Mandelsamen) ermöglichten die Identifizierung von Aminosäuren, die nahe bei den Chlorsubstituenten des Substrats stehen (Abbildung 2). Bei (*R*)-**2b** kommt es zu Kontakten zwischen den Seitenketten von A111 und V317 und dem *ortho*-Chlorsubstituenten des aromatischen Ringes. Die sterischen Konflikte mit diesen beiden Gruppen, vor allem zwischen A111 und (*R*)-**2b**, sind sehr wahrscheinlich für die verringerte Enzymaktivität ausschlaggebend. Ein *meta*-Chlorsubstituent verursacht keine auffälligen sterischen Wechselwirkungen (Abbildung 2).

Für beide Mutanten, A111G und V317G, wurde ein drastischer Rückgang der Aktivität bei der Spaltung von **2a** auf eine Restaktivität von 2–5% beobachtet (Tabelle 1). Dieser nahezu vollständige Aktivitätsverlust überrascht nicht, da das Risiko der Zerstörung der enzymatischen Aktivität sehr groß ist, wenn hoch konservierte Aminosäuren in der hydrophoben Tasche des Enzyms verändert werden. Ein völlig anderes Bild ergab sich jedoch für die HCN-Addition, die wichtigere Synthesereaktion. Während die

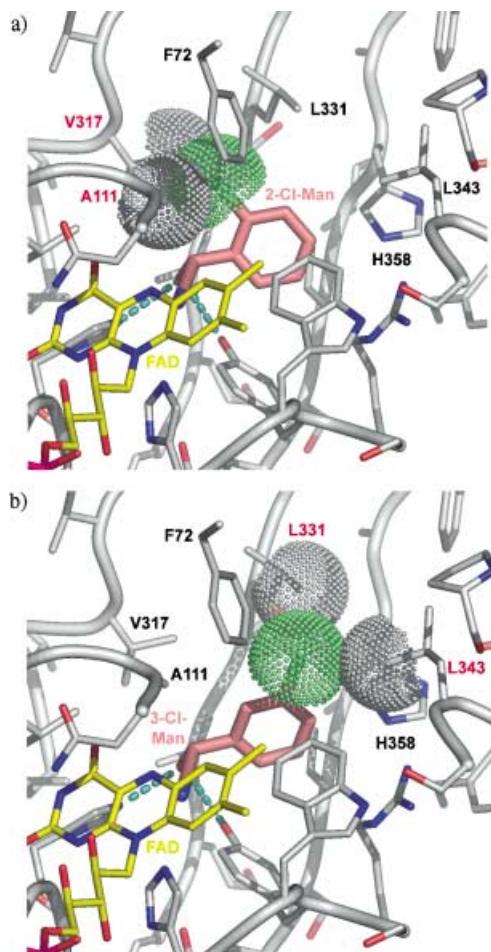


Abbildung 2. Das aktive Zentrum von PaHNL5 mit (R)-2b (2-Cl-Man) und (R)-2c (3-Cl-Man). a) Sterische Wechselwirkungen zwischen dem *ortho*-Chlorsubstituenten (grüner Bereich) von Substrat 2-Cl-Man und A111 und V317 (graue Bereiche). b) Nahe Kontakte von L343 und L331 (graue Bereiche) mit dem *meta*-Chlorsubstituenten von 3-Cl-Man.

Mutante V317G auch für die Synthese von (R)-2a, (R)-2b und (R)-2d niedrige Geschwindigkeiten zeigte, behielt die A111G-Variante ihre starke Hydrocyanierungsaktivität. Die Umsatzgeschwindigkeiten der A111G-Variante mit dem natürlichen Substrat **1a** waren nur etwa 20–30 % geringer als bei PaHNL5_L1Q. Darüber hinaus war die Aktivität bei der Synthese von (R)-2b durch den Einzelaustausch stark erhöht (spezifische Aktivität von A111G: $409 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$; Umsatzgeschwindigkeit: 390 s^{-1} ; sechsmal schneller als mit dem Wildtyp-Enzym). Zusätzlich wurde mit beiden Mutanten ein schnellerer Umsatz von **1c** mit hervorragender Enantioselektivität erreicht ($> 99\% ee$). Die Synthese von (R)-2d wurde durch die Mutation A111G leicht verbessert. In einer Reaktion mit hoher Aldehydkonzentration (3 M bezogen auf die wässrige Phase) wurden aus 150 mmol **1b** mit 5 mg des Enzyms bei pH 3.4 21.1 g (R)-2b erhalten, 2.9 % **1b** wurden nicht umgesetzt. Das entspricht 95.9 % der theoretischen Ausbeute für (R)-2b. Nebenprodukte wurden nach 7 h Reaktionsdauer und Produktextraktion mit *tert*-Butylmethylether nicht beobachtet. Das (R)-

Enantiomer bildete sich mit 96.5 % *ee*. Somit wurde eine enorme Verbesserung für die Synthese von (R)-2b über den HNL-Weg erreicht. Bei der bisher besten Umsetzung^[9] wurde ca. 25-mal so viel Enzym (basierend auf Berechnungen mit der spezifischen Enzymaktivität der zumeist verwendeten nativen PaHNL aus Mandelkernen in der **2a**-Spaltungsreaktion ($160 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)) bei pH 3.3 eingesetzt, um 83 % *ee* zu erhalten. Trotz bedeutender Fortschritte brachten auch nichtenzymatische Katalysatoren in diesen asymmetrischen Syntheseschritten nur ca. 80 % *ee*, die Ausbeuten für *ortho*-substituierte Substrate waren gering^[7,20,21] und eine Kristallisation war notwendig, um hoch enantiomerenreines **3b** zu erhalten.

Ein ähnlich hoher Enantiomerenüberschuss wie mit der A111G-Variante (97 % *ee*) wurde für den enzymatischen Schritt des Nitrilase-Wegs beschrieben^[22] – dort allerdings mit geringeren Substratkonzentrationen. Außerdem war die spezifische Aktivität mit nur 3 $\mu\text{mol Produkt pro min pro mg Nitrilase I}$ mehr als 100fach geringer. Oft wird die Faltung und die Stabilität eines Proteins beeinträchtigt, wenn Mutationen an den Gruppen des aktiven Zentrums vorgenommen werden. Diese Tatsache verhindert häufig die Herstellung nützlicher Mutanten. Unsere A111G-Variante wurde auch nach Steigerung des Fermentationsmaßstabs noch gut exprimiert und zeigte hohe Stabilität bei niedrigen pH-Werten.

PaHNL wurde als erster Biokatalysator für asymmetrische Synthesen eingesetzt.^[23] Ihre mangelnde Stabilität bei niedrigen pH-Werten, bei denen die chemischen Konkurrenzreaktionen unterdrückt werden, die eingeschränkte Verfügbarkeit des Enzyms aus relativ teuren natürlichen Quellen sowie die niedrige Aktivität und geringe Enantioselektivität bei Reaktionen mit *ortho*-substituierten Arylaldehyden haben jedoch dazu geführt, dass PaHNL bis jetzt noch keine Anwendung in industriellen Prozessen gefunden hat. Wir nehmen an, dass unterschiedliche Anteile der individuellen Isoenzyme in Enzympräparationen aus unterschiedlichen Produktchargen und von diversen Herstellern der Grund für die nach Gotor und Mitarbeitern^[24] schwankenden Enantioselektivitäten und Umsatzgeschwindigkeiten sind. Durch das Klonen und die Optimierung der Genexpression für HNL-Isoenzym 5 aus *Prunus amygdalus* haben wir die Basis für eine unbegrenzte und billige Verfügbarkeit rekombinanter PaHNL mit neuen technologischen Eigenschaften geschaffen. Eine gezielte Optimierung des aktiven Zentrums ermöglichte die Adaptierung des Enzyms für die schwierige stereoselektive Umsetzung des nichtnatürlichen, industriell interessanten Substrates **1b** zu (R)-2b in hoher Enantiomerenreinheit. Durch ein umfassendes molekulares Optimierungskonzept ist fast 100 Jahre nach der Entdeckung des ersten stereoselektiven Biokatalysators eine industrielle Anwendung im großtechnischen Maßstab in greifbare Nähe gerückt.

Eingegangen am 13. Juni 2003 [Z52141]
Online veröffentlicht am 23. September 2003

Stichwörter: Asymmetrische Synthesen · C-C-Kupplungen · Enzymkatalyse · Proteindesign · Protein-Engineering

-
- [1] H. Groger, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 547–558.
 - [2] F. Effenberger, S. Forster, H. Wajant, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 532–539.
 - [3] D. V. Johnson, A. A. Zabelinskaja-Mackova, H. Griengl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 103–109.
 - [4] G. Desantis, Z. Zhu, W. A. Greenberg, K. Wong, J. Chaplin, S. R. Hanson, B. Farwell, L. W. Nicholson, C. L. Rand, D. P. Weiner, D. Robertson, M. J. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12922.
 - [5] M. Ress-Loeschke, B. Hauer, R. Mattes, D. Engels (BASF AG), DE10010149, **2000** [*Chem. Abstr.* **2001**, *135*, 223444].
 - [6] C. Bensoussan, M. C. Bontoux, P. M. Gelo, F. Foray (Rhodia Chimie), Fr 4014[2822460], **2001** [*Chem. Abstr.* **2002**, *137*, 368675].
 - [7] A. J. Blacker, I. N. Houson (Avecia Limited), WO GB667[0266410], **2002** [*Chem. Abstr.* **2002**, *137*, 201079].
 - [8] B. Kirschbaum, G. Wilbert, F. Effenberger (Clariant), US4600[20020052523], **2001** [*Chem. Abstr.* **2002**, *136*, 355075].
 - [9] B. Kirschbaum, R. Fell (Clariant), WO EP6681[0305010], **2002** [*Chem. Abstr.* **2003**, *138*, 106498].
 - [10] K. Trummler, J. Roos, U. Schwaneberg, F. Effenberger, S. Forster, K. Pfizenmaier, H. Wajant, *Plant Sci.* **1998**, *139*, 19–27.
 - [11] D. V. Johnson, A. A. Zabelinskaja-Mackova, H. Griengl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 103–109.
 - [12] K. R. Baerwald, L. Jaenicke, *FEBS Lett.* **1978**, *90*, 255–260.
 - [13] W. Becker, U. Benthin, E. Eschenhof, E. Pfeil, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 93; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 44–45.
 - [14] J. Butenuth, E. Pfeil, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1972**, *353*, 698–699.
 - [15] I. Dreveny, K. Gruber, A. Glieder, A. Thompson, C. Kratky, *Structure* **2001**, *9*, 803–815.
 - [16] I. Dreveny, C. Kratky, K. Gruber, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 292–300.
 - [17] M. Schmidt, H. Griengl, *Top. Curr. Chem.* **1999**, *200*, 193–226.
 - [18] M. Bauer, R. Geyer, M. Boy, H. Griengl, W. Steiner, *J. Mol. Catal. B* **1998**, *5*, 343–347.
 - [19] U. Kragl, U. Niedermeyer, M. R. Kula, C. Wandrey, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1990**, *613*, 167–175.
 - [20] Y. N. Belokon', M. North, T. Parsons, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1617–1619.
 - [21] Y. N. Belokon', S. Caveda-Cepas, B. Green, N. S. Ikonnikov, V. N. Khrustalev, V. S. Larichev, M. A. Moscalenko, M. North, C. Orizu, V. I. Tararov, M. Tasinazzo, G. I. Timofeeva, L. V. Yashkina, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3968–3973.
 - [22] G. Desantis, Z. Zhu, W. A. Greenberg, K. Wong, J. Chaplin, S. R. Hanson, B. Farwell, L. W. Nicholson, C. L. Rand, D. P. Weiner, D. E. Robertson, M. J. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9024–9025.
 - [23] L. Rosenthaler, *Biochem. Z.* **1909**, *14*, 238–253.
 - [24] G. de Gonzalo, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B* **2002**, *8*, 223–230.
-