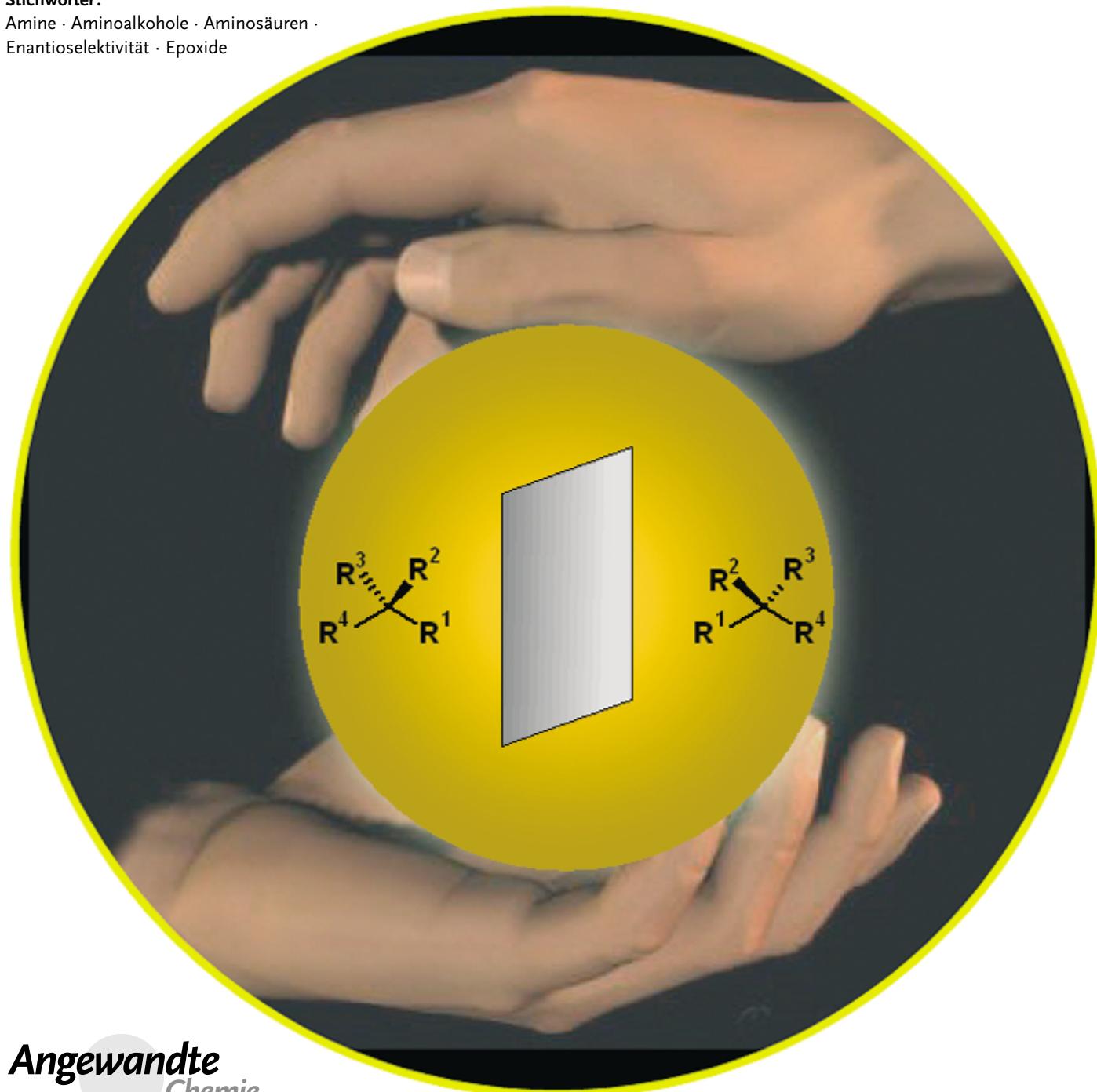


# Industrielle Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Zwischenprodukten

Michael Breuer, Klaus Ditrich, Tilo Habicher, Bernhard Hauer,\* Maria Keßeler, Rainer Stürmer und Thomas Zelinski

**Stichwörter:**

Amine · Aminoalkohole · Aminosäuren ·  
Enantioselektivität · Epoxide



**E**nantiomerenreine Aminosäuren, Aminoalkohole, Amine, Alkohole und Epoxide spielen heutzutage als Zwischenprodukte in pharmazeutischer Industrie und Agrochemie eine immer größere Rolle. Dabei sind sowohl ein hoher Reinheitsgrad als auch große Mengen der Verbindungen gefragt. Die chemische Industrie hat sich bei der Synthese dieser Zwischenstufen bislang auf bewährte chemische Verfahren gestützt, greift jedoch zunehmend auf enzymatische und fermentative Prozesse aus der Biotechnologie zurück. Für die industrielle Umsetzung vieler Transformationen stehen alternative Verfahren zur Verfügung. Die Vorteile der einzelnen Methoden werden in diesem Aufsatz anhand der Synthesen wichtiger Beispielverbindungen diskutiert.

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	807
<b>2. Herstellung von Aminosäuren</b>	807
<b>3. Herstellung von Carbonsäuren</b>	815
<b>4. Herstellung von Aminen</b>	821
<b>5. Herstellung von Alkoholen</b>	829
<b>6. Herstellung von Epoxiden</b>	833
<b>7. Zusammenfassung und Ausblick</b>	838

### 1. Einleitung

Die Life-Science-Industrie ist ein wichtiger Markt für die chemische Industrie. Der Gesamtumsatz im Handel mit Pharma- und Agroindustrie wird für 2000 auf mehr als 20 Mrd. € geschätzt, der größte Teil entfällt auf die Pharmaindustrie. Optisch aktive Zwischenprodukte, die als Hilfsreagentien (Advanced Intermediates) verwendet werden, haben schätzungsweise einen Anteil von 15 % daran.

Der Umsatz mit speziellen Zwischenprodukten wächst um etwa 7–8 % pro Jahr. Durch den steigenden Bedarf in der Pharmaindustrie haben die optisch aktiven Zwischenprodukte mit 10 % pro Jahr einen überproportionalen Anteil daran. Etwa 80 % der Wirkstoffe in der Produktpipeline der Pharmafirmen sind chiral, und dieser Anteil wird weiter steigen (da die Entwicklung der Wirkstoffe immer weiter verbessert wird). Die Einführung enantiomerenreiner Wirkstoffe wird auch durch die Regularien der US Food and Drug Administration (FDA) immer mehr forciert. Bei der Zulassung neuer Wirkstoffe wird von den Behörden zunehmend die gezielte Synthese eines Stereoisomers verlangt. Seit 1992 schreiben sowohl die FDA wie auch das European Committee for Proprietary Medicinal Products vor, dass die physiologische Wirkung jedes Enantiomers eines Pharmawirkstoffs einzeln charakterisiert werden muss. Das „Fast-Track-Single-Isomer-Program“ der FDA gesteht seit 1997 den Wirkstoffherstellern verkürzte Zulassungszeiten bei einem so genannten „Chiral Switch“ zu, d. h. bei der Umstellung auf enantiomerenreine Wirkstoffe. Neben geringeren Dosierungen und besserer Wirksamkeit ist auch eine Verlängerung der Patentlaufzeiten eine Triebfeder für Pharmafirmen, von einem racemischen Wirkstoff auf die enantiomerenreine Form umzustellen.

Auch im Agrobereich werden zunehmend enantiomerenreine Wirkstoffe eingesetzt. Die Gründe hierfür sind ähnlich wie im Pharmabereich. Die gezielte Synthese des wirksamen Enantiomers kann die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens verbessern, führt zu verminderten Aufwandsmengen und damit auch zu einer geringeren Umweltbelastung.

Optisch aktive Amine, Alkohole und Säuren sind wichtige Produktklassen für die Synthese vieler Pharma- und Agroarzneistoffe. Die Verfügbarkeit von technischen Mengen hochreiner Enantiomere und Diastereomere war aber bislang für zahlreiche Produkte eingeschränkt. Die Entwicklung neuer Technologien und deren Umsetzung im großtechnischen Maßstab hat in den letzten Jahren neue Perspektiven eröffnet und zu wirtschaftlicheren Verfahren für Wirkstoffe geführt.

### 2. Herstellung von Aminosäuren

#### 2.1. Einführung

Der Gesamtmarkt für die proteinogenen Aminosäuren betrug 1999 ca. 1.5 Millionen Tonnen; der Umsatz dieser Sparte wurde auf rund 3.5 Milliarden € geschätzt. Die große wirtschaftliche Bedeutung der Aminosäuren leitet sich von ihren breiten industriellen Einsatzmöglichkeiten ab. Rund 40 % des Markts machen Anwendungen für die menschliche Ernährung und Gesundheit aus, das Segment Tierernährung umfasst ca. 55 %. Als Zusatzstoffe für die Nahrungsmittelproduktion werden L-Glutaminsäure, L-Phenylalanin, L-Asparaginsäure und Glycin hergestellt. L-Lysin, Methionin, L-Threonin und L-Tryptophan sind wichtige Additive im modernen Tierfutter, da diese Aminosäuren in den natürlichen Quellen nicht ausreichend vorhanden sind.

Bezogen auf das Marktvolumen ist L-Glutaminsäure die wichtigste Aminosäure. Mehr als 650000 Tonnen werden jährlich produziert. Glutaminsäure wird als Mono-Natrium-Salz vor allem als Geschmacksverstärker in Nahrungsmitteln eingesetzt. Das zweitgrößte Marktvolumen hat Methionin

[\*] Dr. M. Breuer, Dr. K. Ditrich, Dr. T. Habicher, Dr. B. Hauer, Dr. M. Keßeler, Dr. R. Stürmer, Dr. T. Zelinski  
BASF Aktiengesellschaft  
Forschung Feinchemikalien & Biokatalyse  
67056 Ludwigshafen (Deutschland)  
Fax: (+49) 621-60-20914  
E-mail: bernhard.hauer@basf-ag.de

mit rund 450000 Jahrestonnen ( $\text{ta}^{-1}$ ), L-Phenylalanin und L-Asparaginsäure sind mit jeweils rund 12000  $\text{ta}^{-1}$  ebenfalls bedeutend. Sie werden für die Synthese des Süßstoffs Aspartam ( $\alpha$ -L-Aspartyl-L-Phenylalaninmethylester) benötigt. Neben den natürlichen Aminosäuren sind auch nicht-natürliche Aminosäuren als Bausteine für Wirkstoffe von industrieller Bedeutung. Wichtige Beispiele sind die D-Aminosäuren für die Herstellung semisynthetischer  $\beta$ -Lactam-Antibiotika.

Bei der Produktion von Aminosäuren werden drei grundsätzlich verschiedene Wege beschritten: In extractiven Verfahren werden Aminosäuren als Bestandteile von natürlichem proteinhaltigem Material isoliert. Alternative chemische oder biologische Verfahren erlauben die gezielte Synthese von Aminosäuren.

## 2.2. Herstellung von Aminosäuren durch extractive Verfahren

Der älteste Zugang zu Aminosäuren ist die Extraktion aus proteinreichem biologischem Material. Hierbei werden so verschiedene Naturprodukte wie Haare, Fleischextrakte und Pflanzenhydrolysate verwendet. Meist handelt es sich bei den Ausgangsstoffen um industrielle Nebenprodukte oder Abfallstoffe, die so verwertet werden können. Ein Vorteil der extractiven Verfahren ist der direkte Zugang zu einer Reihe unterschiedlicher Aminosäuren. Für Aminosäuren, die nur in kleinen Mengen nachgefragt werden, erweist sich die extractive Gewinnung als besonders nützlich. Charakteristisch für die extractiven Prozesse ist die Bildung von Salzen als Nebenprodukten, die zu einer beträchtlichen Umweltbelastung führen kann. Einige neuere Methoden versuchen, diesen Nachteil durch biokatalytische Verfahren zu umgehen. Insbesondere der Einsatz extremophiler Biokatalysatoren hat bereits zu vielversprechenden Ergebnissen geführt.<sup>[1,2]</sup> Extractive Verfahren werden heute vor allem noch zur

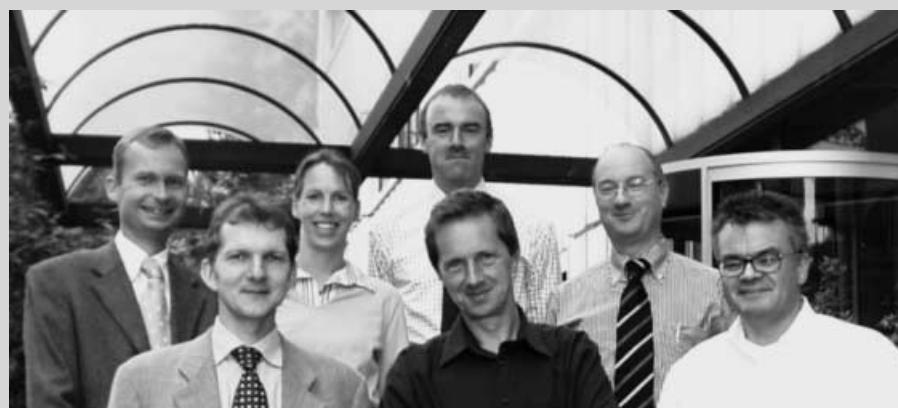
Herstellung von L-Cystein eingesetzt. Durch starke Säuren wird Keratin aus Haaren und Tierborsten hydrolysiert. Das dimere Oxidationsprodukt Cystin kann aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit durch Filtration des Hydrolysats isoliert werden. Elektrochemische Reduktion der Disulfidbrücke im Cystin ergibt Cystein.

Ein neueres Verfahren zur industriellen Herstellung von Cystein wurde beim Consortium für elektrochemische Industrie GmbH der Wacker-Chemie entwickelt.<sup>[3]</sup> Bei diesem fermentativen Verfahren wurde die Stoffwechselregulation von *Escherichia coli* gentechnisch so verändert, dass der Produktionsstamm weit mehr Cystein herstellt als er selbst benötigt. Der Cystein-Überschuss gelangt ins Fermentationsmedium, wo er durch Luftsauerstoff zu schwer löslichem Cystin oxidiert wird. Die Aufarbeitung verläuft analog zu herkömmlichen Verfahren. Das biokatalytisch hergestellte Produkt hat eine höhere Qualität als Cystein, das aus biologischen Reststoffen gewonnen wird. Cystein wird von der Wacker-Chemie in einer Allianz mit der Firma Kyowa Hakko in den USA vermarktet.

## 2.3. Chemische Verfahren zur Aminosäureherstellung

Obwohl asymmetrische Aminosäuresynthesen hinlänglich bekannt sind,<sup>[4,5]</sup> konnte bis heute noch kein wirtschaftliches Verfahren etabliert werden. Bei der industriellen Herstellung von racemischen Aminosäuren wird meist auf die Bucherer-Bergs-Variante der Strecker-Synthese zurückgegriffen.<sup>[6]</sup> Aus Ammoniak, Blausäure und einem Aldehyd erhält man das entsprechende  $\alpha$ -Aminonitril, das entweder direkt zur Aminosäure hydrolysiert wird oder mit  $\text{CO}_2$  in ein Hydantoin umgewandelt und anschließend basisch zur racemischen Aminosäure verseift wird.

Eine andere Syntheseroute zu racemischen Aminosäuren ist die übergangsmetallkatalysierte Amidocarbonylierung. In



Von links nach rechts: T. Habicher, M. Kefeler, M. Breuer, B. Hauer (hintere Reihe), T. Zelinski, K. Ditrich R. Stürmer (vordere Reihe).

Dr. Tilo Habicher, geboren 1969, studierte Chemie an der Universität Leipzig und der Ecole Européenne des Hautes Etudes des Industries Chimiques de Strasbourg. Er promovierte 1998 bei F. Diederich an der ETH Zürich auf dem Gebiet der supramolekularen Chemie. Anschließend war er als Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes (BASF-Forschungsstipendium) an der UC Berkeley und am Scripps Research Institute in La Jolla bei P. Schultz. Dort befasste er sich mit der In-vitro-Evolution von katalytischen Antikörpern an Phagenoberflächen. Seit 2000 arbeitet er bei der BASF AG im Bereich Biokatalyse.

Dr. Maria Kefeler, Jahrgang 1969, erhielt 1993 das Diplom in Biologie an der Universität Marburg und ging anschließend als Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes und des Fonds der Chemischen Industrie für einen Forschungsaufenthalt an die University of the Witwatersrand in Johannesburg. Nach ihrer Promotion an der Universität Göttingen (1996) stieg sie 1997 bei der BASF AG in Ludwigshafen ein, wo sie Laborleiterin in der Gruppe Biotransformationen der Abteilung Forschung Feinchemie ist.

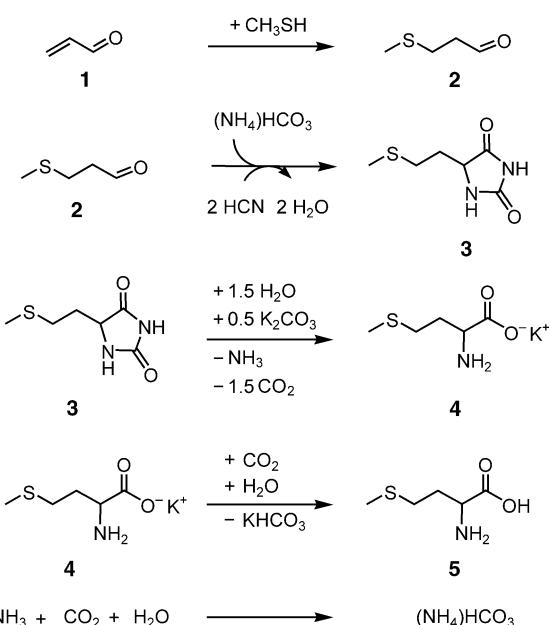
einer Dreikomponentenreaktion werden *N*-Acyl- $\alpha$ -amino-säuren aus CO, einem Aldehyd und einem Amid aufgebaut.<sup>[7]</sup>

Auch wenn es kein wirtschaftliches chemisches Verfahren zur Herstellung enantiomerenreiner Aminosäuren gibt, ist die Synthese racemischer Aminosäuren dennoch von großer Bedeutung, weil Racemate durch eine Vielzahl biokatalytischer Verfahren leicht in enantiomerenreine Verbindungen überführt werden können. Chemische Verfahren, die nicht enantiomerenreine Aminosäuren liefern, werden nur für zwei Produkte eingesetzt: Glycin ist achiral, und das nichtnatürliche Enantiomer *D*-Methionin wird von Erwachsenen und Tieren durch eine Transaminierungsreaktion in das biologisch aktive *L*-Enantiomer überführt.

### 2.3.1. Methionin-Synthese

Besonders elegant ist die chemische *D,L*-Methionin-Synthese, die bei Degussa entwickelt wurde.<sup>[8]</sup> Bei dieser Variante der klassischen Aminosäuresynthese wird im Unterschied zu anderen Verfahren die Bildung großer Salzmengen umgangen. (Schema 1)

Aus Acrolein (**1**) und Methanthsol wird 3-Methylsulfanyl-propionaldehyd (**2**) hergestellt, der mit Blausäure und Ammoniumbicarbonat zu 5-(2-Methylthioethyl)hydantoin (**3**) reagiert. **3** wird mit einem Überschuss an Kaliumcarbonat in alkalischer Lösung bei 170 °C hydrolysiert. Es entstehen neben *D,L*-Kaliummethioninat (**4**) auch CO<sub>2</sub> und Ammoniak, aus denen Ammoniumbicarbonat für die zweite Stufe zurückgewonnen wird. Durch Einpressen von CO<sub>2</sub> wird die Kaliummethioninat-Lösung angesäuert und *D,L*-Methionin (*D,L*-**5**) und Kaliumhydrogencarbonat werden freigesetzt. Letzteres wird durch Erhitzen und Konzentrieren in CO<sub>2</sub> und Kaliumcarbonat zersetzt, das wieder in der Hydantoinhydrolyse eingesetzt wird.



**Schema 1.** Methioninsynthese nach dem Degussa-Verfahren.

### 2.4. Biokatalytische Herstellung von Aminosäuren

In biokatalytischen Verfahren werden Enzyme als Katalysatoren eingesetzt. Daher verlaufen diese Reaktionen meist unter moderaten Temperaturen und Drücken. Biokatalysen finden häufig, wenn auch nicht immer, im wässrigen Milieu statt. Die Verfahren können in Biotransformationen und fermentativen Verfahren unterschieden werden.

#### 2.4.1. Fermentationen

Bei fermentativen Verfahren wird der Syntheseapparat lebender Mikroorganismen benutzt, um aus einfachen, preis-

**Dr. Michael Breuer**, geboren 1965, studierte Biologie an der Universität Bonn. 1992–1993 forschte er als Stipendiat des Boehringer-Ingelheim-Fonds bei H. G. Floss an der University of Washington. Er promovierte an der Universität Bonn bei E. Leistner über die Ansamakrolidbioynthese in Actinomyceten (1995) und ist seit 1996 Laborleiter in der Abteilung Forschung Feinchemie und Biokatalyse der BASF AG.

**Dr. Bernhard Hauer**, geboren 1955, studierte Biologie an der Universität Hohenheim, wo er 1982 bei F. Lingens über den mikrobiellen Alkaloidabbau promovierte. Beim anschließenden Postdoc-Aufenthalt an der University of Chicago untersuchte er unter Anleitung von J. A. Shapiro das Transposon Tn7. 1983 trat er in die BASF AG ein, wo er heute er als wissenschaftlicher Direktor das Arbeitsgebiet Biokatalyse leitet. Darüber hinaus habilitierte er 1996 an der Universität Heidelberg und ist dort außerplanmäßiger Professor für Molekularbiologie.

**Dr. Thomas Zelinski**, geboren 1965, promovierte 1995 in Chemie bei Prof. M.-R. Kula an der Universität Düsseldorf über enzymatische Reduktionen. 1996–1997 forschte er als Postdoc bei Prof. H. Waldmann an der Universität Karlsruhe, wo er ein Thema aus der Phosphopeptidsynthese bearbeitete. Seit 1997 arbeitet er in der Forschungsabteilung Feinchemie/Biokatalyse der BASF AG.

**Dr. Klaus Ditrich**, Jahrgang 1956, studierte Chemie an der Universität Marburg und promovierte 1986 über Naturstoffsynthesen bei Prof. R. W. Hoffmann. Seit 1987 ist er bei der BASF AG, wo er zunächst im Bereich Wirkstoffsuchforschung (Pflanzenschutz) und seit 1992 in der Abteilung Feinchemie und Biokatalyse arbeitete. Seine Tätigkeitsfelder umfassen die asymmetrische Katalyse, enzymatische Synthesen und die Entwicklung von Produktionsverfahren für optisch aktive Zwischenprodukte.

**Dr. Rainer Stürmer**, Jahrgang 1963, studierte Chemie an der Universität Marburg. 1992 promovierte er bei Prof. R. W. Hoffmann mit einer Naturstoffsynthese. Ein Postdoc-Aufenthalt führte ihn 1992–1993 mit einem Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes zu Prof. D. A. Evans an die Harvard University, wo er Arbeiten zur Lanthanoidenkatalyse durchführte. Seit 1993 ist er Laborleiter in die Abteilung Feinchemie der BASF AG. Dort befasst er sich vorrangig mit asymmetrischer Katalyse, enzymatischen Synthesen und optisch aktiven Zwischenprodukten.

werten Rohstoffen Wertprodukte zu erzeugen. Prinzipiell sind alle proteinogenen Aminosäuren durch fermentative Verfahren zugänglich. Bei der Herstellung der umsatzstarken enantiomerenreinen Produkte Glutaminsäure, Lysin und Threonin haben sich wirtschaftliche fermentative Prozesse durchgesetzt. Der Weltmarkt für diese Aminosäuren betrug 1999 650000 (Glutaminsäure), 40000 (Lysin) bzw. 6000  $\text{t a}^{-1}$  (Threonin).

1957 wurde das Bakterium *Corynebacterium glutamicum* isoliert. Organismen dieser Gattung<sup>[9]</sup> wurden durch eine Vielzahl von Verbesserungen zu Hochleistungsstämmen entwickelt, die mit beachtlichen Raum-Zeit-Ausbeuten Glutaminsäure oder Lysin synthetisieren. Mit modernen Produktionsstämmen werden Aminosäurekonzentrationen von mehr als 160  $\text{g L}^{-1}$  erreicht.<sup>[10]</sup> Ursprünglich wurde diese im Vergleich zu anderen Mikroorganismen enorme Syntheseleistung damit erklärt, dass die Zellmembran der Bakterien für Aminosäuren durchlässig ist und intrazellulär gebildete Verbindungen passiv ins Medium diffundieren können.<sup>[11]</sup> Neuere Arbeiten zeigen jedoch, dass auch ein aktiver Transport über die Zellmembran für die Sekretion der Aminosäuren verantwortlich ist.<sup>[12]</sup>

Für die Verbesserung von Produktionsstämmen ist ein detailliertes Verständnis der Aminosäurebiosynthese notwendig. So konnten Ergebnisse aus den Arbeiten mit *Corynebacterium glutamicum* genutzt werden: Die ersten Stufen der Biosynthese von Glutaminsäure, Lysin und Threonin werden in *Corynebacterium* von den gleichen Enzymen katalysiert. Daher lassen sich Erkenntnisse über Regulationsmechanismen auf Produktionsstämmen für die unterschiedlichen Aminosäuren übertragen. So kann man beispielsweise durch Überproduktion des Enzyms Dihydro-picolinat-Synthase den Stoffwechsel in *Corynebacterium* zugunsten der Lysin-Produktion dirigieren. Die Deletion des entsprechenden Gens führt hingegen zur Biosynthese von L-Threonin.<sup>[13]</sup>

Die wirtschaftliche fermentative Herstellung von L-Threonin konnte erst in den 80er Jahren etabliert werden, als leistungsfähige *E. coli*-Mutanten entwickelt wurden. Mit gentechnisch veränderten *E. coli* oder *Serratia marcescens* können L-Threonin-Endkonzentrationen von 100  $\text{g L}^{-1}$  erzielt werden.<sup>[14,15]</sup> Für die industrielle L-Threonin-Produktion scheinen *E. coli*-Stämme mit einer erhöhten Kopienzahl des Threonin-Operons am besten geeignet zu sein.<sup>[16]</sup>

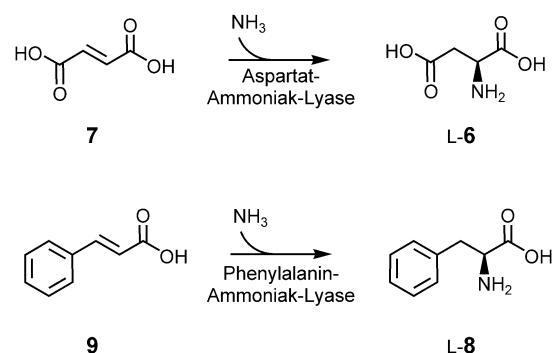
## 2.4.2. Biotransformationen

Während bei der fermentativen Herstellung von Aminosäuren lebende Mikroorganismen als Biokatalysatoren verwendet werden, sind isolierte Enzyme oder metabolisch nicht aktive Zellen die Katalysatoren bei Biotransformationen.

Je nach Spezifität des Biokatalysators können auch Verbindungen umgesetzt werden, die im natürlichen Stoffwechsel nicht vorkommen. Somit sind Biotransformationen die Verfahren der Wahl für die Herstellung enantiomerenreiner D-Aminosäuren sowie anderer nichtnatürlicher Aminosäuren. Auch natürliche Aminosäuren mit einem Marktvolumen  $< 10000 \text{ t a}^{-1}$  werden durch Biotransformationen hergestellt.<sup>[16,17]</sup>

## 2.4.3. Lyasen als Biokatalysatoren für Aminosäuresynthesen

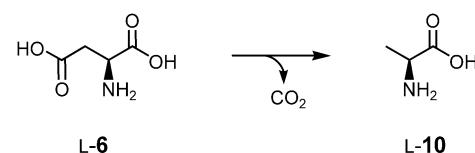
Eine etablierte Anwendung von Lyasen ist die Herstellung von L-Asparaginsäure (L-6) aus Fumarsäure (7) und Ammoniak mit dem Enzym L-Aspartat-Ammoniak-Lyase (Schema 2). Seit 1958 werden verschiedene Varianten dieser



Schema 2.

Biotransformation durchgeführt. Analog verläuft die Synthese von L-Phenylalanin (L-8) aus (E)-Zimtsäure (9), als Katalysator wird das Enzym Phenylalanin-Ammoniak-Lyase verwendet.<sup>[18]</sup> Industriell wurde dieses Verfahren allerdings von einer wirtschaftlicheren, fermentativen Herstellung mit Phenylalanin-Überproduzenten abgelöst.<sup>[16]</sup>

L-Alanin (L-10) kann ebenfalls durch Lyase-Katalyse hergestellt werden. Die L-Aspartat-β-Decarboxylase vermittelt jedoch nicht wie bei der Herstellung von L-Phenylalanin oder L-Asparaginsäure eine C-N-Verknüpfung, sondern sie katalysiert die Decarboxylierung von L-Asparaginsäure (L-6) zu L-10 (Schema 3). Industriell werden immobilisierte Zellen als Katalysator eingesetzt, die die L-Aspartat-β-Decarboxylase enthalten.<sup>[19]</sup>



Schema 3.

Mithin ist eine direkte enzymkatalysierte Synthese von L-10 aus Fumarsäure (7) und Ammoniak denkbar. Da die optimalen pH-Werte für L-Aspartat-Ammoniak-Lyase und L-Aspartat-β-Decarboxylase sich zu stark unterscheiden, muss das Verfahren in zwei Stufen durchgeführt werden.<sup>[20]</sup> Die Synthese von L-10 aus 7 und Ammoniak ist das erste zweistufige Verfahren, das auf Biokatalysatoren basiert. Bei der Decarboxylierung von L-6 werden stöchiometrische Mengen CO<sub>2</sub> frei, sodass Gasblasenbildung zu Inhomogenitäten im Immobilisatbett führt. Diese Nachteile werden bei Reaktionen in einem speziellen Druckreaktor umgangen, der eine Biotransformation bei 10 bar erlaubt.<sup>[21]</sup> Der erhöhte Druck verhindert, dass CO<sub>2</sub> als Gas austritt, hat aber keinen Einfluss auf die Enzymaktivität.

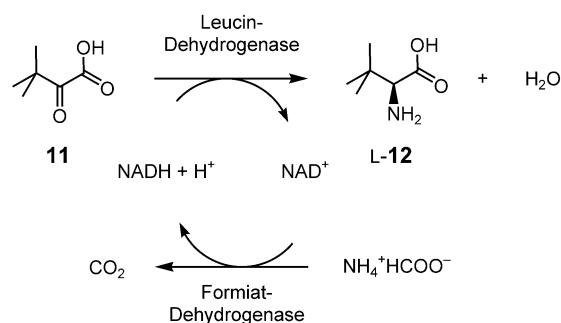
#### 2.4.4. Aminosäure-Dehydrogenasen

Enantioselektive Biotransformationen sind im industriellen Maßstab auch mit Aminosäure-Dehydrogenasen (desaminierenden Aminosäure-Oxidoreduktasen) möglich. Einige dieser Enzyme zeichnen sich durch sehr geringe Substratspezifitäten aus, sodass auch nichtnatürliche Verbindungen umgesetzt werden können. Aminosäure-Dehydrogenasen benötigen neben Ammoniak und der entsprechenden 2-Oxocarbonsäure ein Cosubstrat, das die Hydridionen zur Reduktion des Schiff-Base-Intermediats liefert.<sup>[22]</sup> Dafür eignet sich beispielsweise Nicotinamidadenin dinucleotid (NADH). Die oxidierten Cosubstrate (z. B. NAD<sup>+</sup>) müssen ihres hohen Preises wegen in einer weiteren Redoxreaktion regeneriert werden.

Ein etabliertes System für die Regenerierung von NADH aus NAD<sup>+</sup> besteht aus der Formiat-Dehydrogenase von *Candida boidinii*, die im Gegenzug Formiat zu CO<sub>2</sub> oxidiert.<sup>[23]</sup> Eine Kombination aus L-Leucin-Dehydrogenase, Formiat-Dehydrogenase und Cosubstrat wird bei der Degussa eingesetzt, um L-tert-Leucin (L-12) im Tonnenmaßstab aus Ammoniumformiat und Trimethylbrenztraubensäure (11) herzustellen (Schema 4).<sup>[24]</sup>

#### 2.4.5. Aminotransferasen

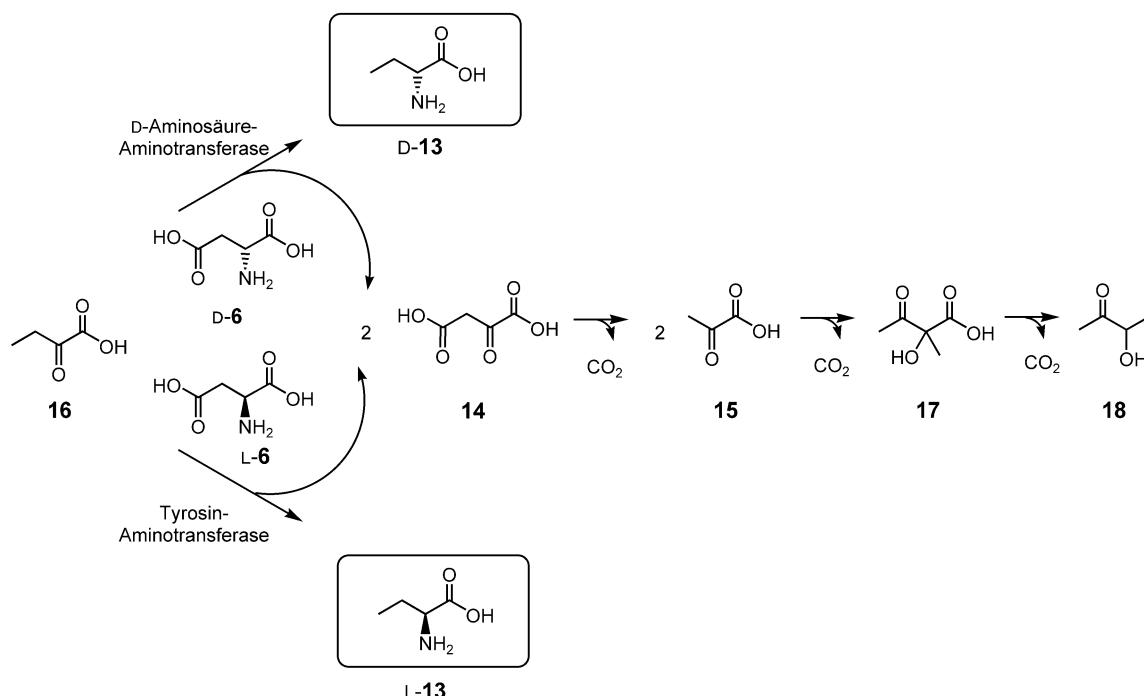
Mit Aminotransferasen kann die Problematik der Cosubstratregenerierung umgangen werden. Diese Enzyme übertragen Aminogruppen von Aminosäuren auf 2-Oxocarbonsäuren. Ein illustratives Beispiel für eine technische Umsetzung ist der Synthese von L-2-Aminobuttersäure (L-13) von Great Lakes Chemicals.<sup>[25]</sup> Bei dieser Biotransformation wird



**Schema 4.** Herstellung von L-tert-Leucin (L-12) durch reduktive Aminierung mit Leucin-Dehydrogenase.

genetisch veränderte *E. coli* als Katalysator eingesetzt (Schema 5). Als Aminogruppendonor fungiert L-Asparaginsäure (L-6), das durch die Aspartat-Aminotransferase zu 2-Oxalylsäure (14) umgewandelt wird. 14 zerfällt in Pyruvat 15 und CO<sub>2</sub>. Die Aminogruppe von L-6 wird auf 2-Oxobuttersäure (16) übertragen. Weil 16 nicht leicht zugänglich ist, wurde in die Zellen das Gen der L-Threonin-Desaminase eingebracht. So kann 16 in situ aus preisgünstigem L-Threonin gewonnen werden.

Durch eine unerwünschte Nebenreaktion der Aminotransferasen kann aus 15 Alanin (10) entstehen. Um dies zu vermeiden, werden durch das Enzym Acetolactat-Synthase zwei Moleküle 15 zu Acetolactat 17 kondensiert. Das Acetolactat-Synthase-Gen eines *Bacillus*-Stamms wurde in *E. coli* transferiert. 17 decarboxyliert zu 2-Hydroxybutan-3-on (Acetoin, 18), das destillativ aus der Reaktionsmischung entfernt wird. So wird das Gleichgewicht zugunsten der

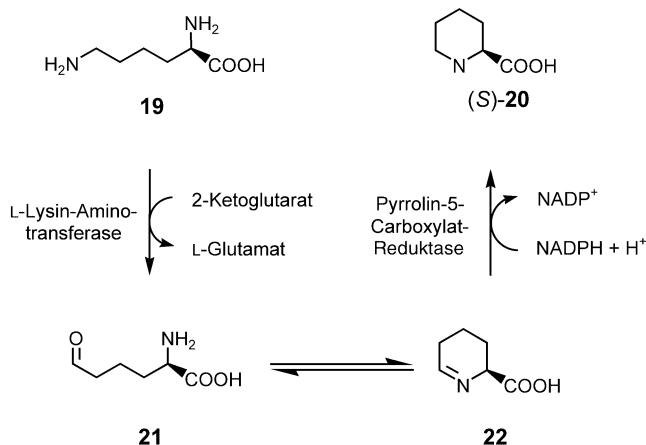


**Schema 5.** Die Herstellung von D- und L-Aminobutyrat (D,L-13) aus 2-Oxobuttersäure (16) und Asparaginsäure wird durch enantioselektive Aminotransferasen katalysiert.

gewünschten Produkte verschoben, und die Bildung des Nebenprodukts **L-10** wird effizient zurückgedrängt. Das Verhältnis des Hauptprodukts **L-13** zu **L-10** wird von 2.4:1 auf 22.5:1 gesteigert und Endkonzentrationen von 27 g L<sup>-1</sup> **L-13** können erhalten werden.<sup>[25]</sup>

Je nach Wahl der Aminotransferase können beide Enantiomere erhalten werden. Die **L**-Tyrosin-Aminotransferase aus *E.coli* ist so wenig selektiv, dass sie zur Herstellung von **L-13** verwendet werden kann. Stämme, die stattdessen über eine **D**-Aminosäure-Aminotransferase aus *Bacillus sphaericus* verfügen, bilden entsprechend **D-13**.

Eine Kombination aus Dehydrogenase und Aminotransferase nutzt die Firma Mercian (Japan) in einem eleganten Ganzzell-Verfahren, das ausgehend von natürlichem **L**-Lysin (**19**) (*S*)-Piperidin-2-carbonsäure ((*S*)-**20**) liefert (Schema 6).



Schema 6.

Das Verfahren beruht auf einer Biotransformation mit rekombinanten *E.coli*-Bakterien: **19** gelangt mithilfe des überexprimierten **L**-Lysin-Permease-Transportsystems in die Zellen und wird dort durch die Lysin-Aminotransferase aus *Flavobacterium lutescens* zur Oxoamino säure **21** desaminiert.

**21** steht im Gleichgewicht mit 2,3,4,5-Tetrahydropyridin-2-carbonsäure **22** und wird durch die *E.coli*-eigene Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase mit NADPH zu (*S*)-**20** reduziert.<sup>[26]</sup> Mehr als 90% des Lysins werden umgesetzt, die Reinsubstanz kann aus dem Filtrat in 70% Ausbeute isoliert werden. Um die hohen Endkonzentrationen von 50 g L<sup>-1</sup> zu erreichen, benötigt man allerdings lange Fermentationszeiten (150 h). (*S*)-**20** dient als Baustein bei der Synthese einiger Pharmazeutika, z.B. des Lokalanästhetikum Bupivacain (Astra Zeneca). Einen alternativen Zugang zu enantiomerenreiner Piperidin-2-carbonsäure bietet die Acylase-katalysierte Racematspaltung (Abschnitt 2.4.8.3).

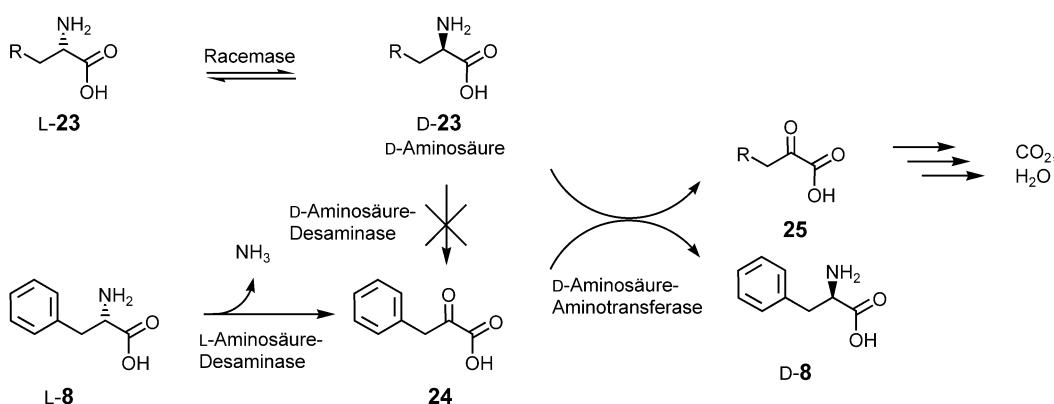
## 2.4.6. *D*-Aminosäuren durch fermentative Verfahren

Monsanto hat ein fermentatives Verfahren zur Herstellung von **D**-Aminosäuren durch gentechnisch veränderte Mikroorganismen patentieren lassen.<sup>[27]</sup> Mit diesen Biokatalysatoren kann beispielsweise **D**-Phenylalanin (**D-8**) hergestellt werden (Schema 7).

Der Stoffwechsel der Mikroorganismen wurde so verändert, dass keine funktionalen **D**-Aminosäure-Desaminasen produziert werden. Die Stämme enthalten jedoch zusätzliche Gene für **L**-Aminosäure-Desaminasen, **D**-Aminosäure-Aminotransferasen und eine spezifische Racemase. Das Nährmedium der Zellen wird mit einer **L**-Aminosäure (**L-23**) als Aminogruppendonor supplementiert. Dafür werden **L**-Alanin, **L**-Glutamin oder **L**-Asparaginsäure verwendet.

Das Kohlenstoffgerüst für **D-8** stammt aus endogen produziertem oder dem Nährmedium zudosiertem **L-8**, das von der **L**-Aminosäure-Desaminase in Phenylpyruvat **24** umgewandelt wird. Der Aminogruppendonor **L-23** wird von den Mikroorganismen racemisiert. Dabei wird **D-23** als Substrat für die **D**-Aminosäure-Aminotransferasen gebildet. Die Aminogruppe von **D-23** wird auf **24** übertragen. So entstehen **D-8** und die 2-Oxocarbonsäure **25**, die im mikrobiellen Stoffwechsel abgebaut wird. Dadurch wird das Gleichgewicht der **D**-Aminosäure-Aminotransferase-Reaktion zugunsten der Bildung von **D-8** verschoben.

Da sowohl die **L**-Aminosäure-Desaminasen als auch die **D**-Aminosäure-Aminotransferasen unspezifisch sind, ist



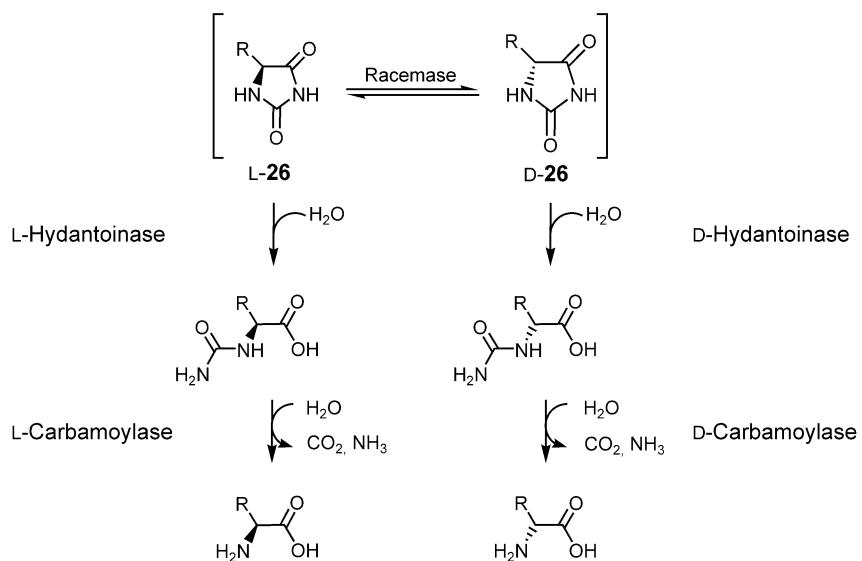
Schema 7. Herstellung von **D**-Phenylalanin (**D-8**) durch Fermentation mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen (nach Lit. [27]). Alanin, Glutamin oder Asparaginsäure werden als Aminogruppendonor (**L-23**) zugesetzt, **L-8** stammt aus endogener Überproduktion. **25** wird im Stoffwechsel zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O abgebaut.

diese Methode auf die Herstellung einer großen Palette von **D**-Aminosäuren aus den entsprechenden **L**-Aminosäuren anwendbar.<sup>[27]</sup>

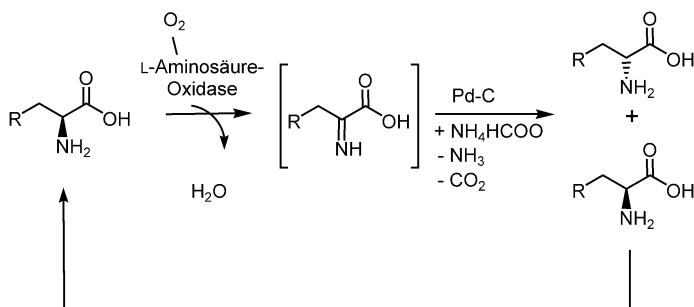
#### 2.4.7. Chemoenzymatische Synthese von **D**-Aminosäuren

##### D-Aminosäuren

Schließlich gibt es für diese Aminosäuresynthese auch eine elegante chemoenzymatische Lösung.<sup>[28]</sup> Hierbei wird die **L**-Aminosäure durch eine **L**-Aminosäure-Oxidase oxidiert (Schema 8). Das intermediär entstehende Imin wird durch Pd-C in gepufferter Ammoniumformiat-Lösung reduziert. Nur das **L**-Enantiomer des racemischen Gemisch wird durch die Oxidase verwertet, während das **D**-Enantiomer akkumuliert. Je nach Spezifität der Oxidasen lassen sich die Enantiomere der Aminosäuren gezielt herstellen. Beispiele mit Ausbeuten von 90% und 99% *ee* sind beschrieben worden.



Schema 9. Herstellung optisch aktiver Aminosäuren mit enantioselektiven Hydantoinasen und Carbamoylasen.



Schema 8. Chemoenzymatische Synthese von **D**-Aminosäuren.

#### 2.4.8. Herstellung enantiomerenreiner Aminosäuren durch Racematspaltung

##### 2.4.8.1. Synthese von **L**- und **D**-Aminosäuren mit dem Hydantoinase-Carbamoylase-System

Die racemischen Hydantoine **26** sind durch chemische Synthese sehr gut zugänglich. Eine Reihe spezifischer natürlicher Hydrolasen für die enantioselektive Hydrolyse zu den entsprechenden Carbamoylderivaten sind bereits isoliert worden. Für diese Verbindungen existieren ebenfalls spezifische Hydrolasen, sodass die enantioselektive Herstellung von Aminosäuren aus den racemischen Hydantoinen problemlos möglich ist.<sup>[29]</sup>

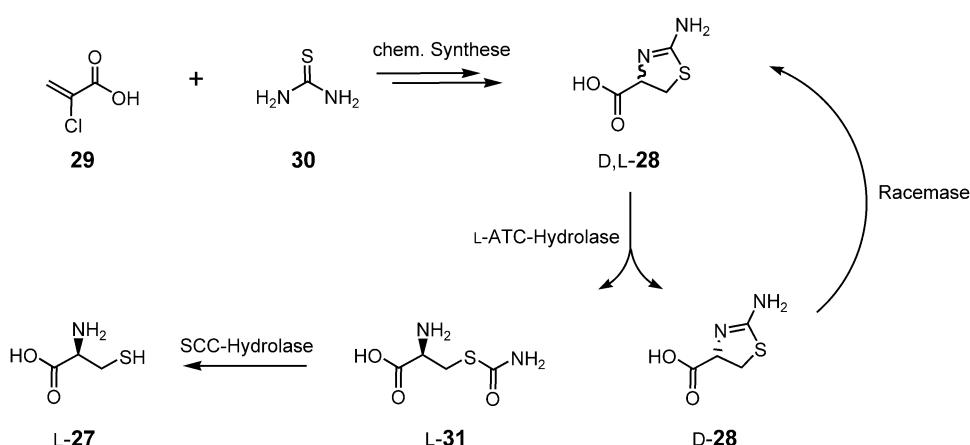
Besondere Bedeutung kommt diesem Verfahren bei der Synthese von **D**-Aminosäuren zu. **D**-Phenylglycin und **D**-Hydroxyphenylglycin, die in die Seitenketten halbsynthetischer  $\beta$ -Lactam-Antibiotika eingebaut werden, sind auf diese Weise erhältlich.<sup>[30]</sup> Da die Hydantoine bei  $\text{pH} > 8$  spontan racemisieren, ist ein vollständiger Umsatz des Racemats zu einem Enantiomer möglich. Die Racemisierungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Seitenkette R ab. Wenn die Racemisierung des Hydantoins der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, kann die Reaktion durch Zugabe einer Racemase deutlich beschleunigt werden (Schema 9).

Während **D**-Aminosäuren bereits biokatalytisch aus **D,L**-Hydantoinen hergestellt werden, ist die Synthese von **L**-Aminosäuren mit diesem System technisch noch nicht so weit fortgeschritten. Dies liegt vor allem an der geringen Stereoselektivität bekannter **L**-Hydantoinasen, die allerdings ständig verbessert werden. So konnte gezeigt werden, dass die Enantioselektivität einer **D**-Hydantoinase mithilfe von evolutiver Enzymentwicklung („Directed Evolution“) aus *Arthrobacter* sp. DSM 9771 bei gleichzeitiger Aktivitätssteigerung umgekehrt werden konnte.<sup>[31]</sup> **L-tert**-Leucin lässt sich ebenfalls mit dem Hydantoinase-Carbamoylase-System herstellen.

Degussa produziert diese Verbindung zurzeit in einem Pilotverfahren im 100-kg-Maßstab durch eine neuartige Biotransformation. Dabei wird ein rekombinanter Mikroorganismus verwendet, der die modifizierte **D**-Hydantoinase, eine Carbamoylase und die entsprechende Racemase enthält.<sup>[32]</sup>

##### 2.4.8.2. Herstellung von **L**-Cystein durch Racematspaltung

Als Alternative zur Extraktion von Cystein (**27**) aus Menschenhaar, Federn oder Schweineborsten wurde bereits in den 70er Jahren ein biokatalytisches Verfahren entwickelt. Die Umsetzung geht aus von **D,L**-2-Amino- $\Delta^2$ -thiazolin-4-carbonsäure (**D,L-28**), die aus  $\alpha$ -Chloracrylsäure (**29**) und Thioharnstoff (**30**) zugänglich ist (Schema 10). Das Bakterium *Pseudomonas thiazolinophilum* setzt **D,L-28** zu Cystein um. Dabei wird **L-28** mit zwei spezifischen Hydrolasen über *S*-Carbamoyl-**L**-Cystein (**L-31**) zu **L**-Cystein (**L-27**) gespalten. Eine Racemase wandelt **D-28** in das **L**-Enantiomer um, sodass das Racemat komplett umgesetzt werden kann. Der Prozess liefert Ausbeuten von 95% und Cysteinkonzentrationen von  $30 \text{ g L}^{-1}$ .<sup>[33]</sup> Dieses Verfahren wurde 1982 bei Ajinomoto implementiert.



**Schema 10.** Enantioselektive Synthese von L-Cystein (L-27) (SCC = S-Carbamoyl-L-Cystein).

#### 2.4.8.3. Racematspaltung mit Acylasen und Amidasen

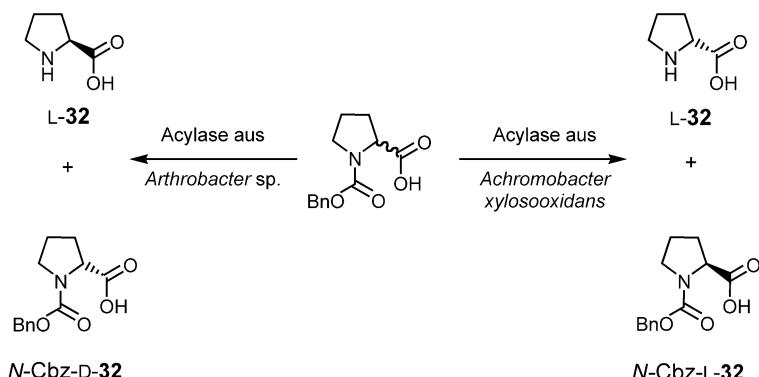
Nicht nur Hydantoinasen werden zu Racematspaltungen eingesetzt, sondern auch Acylasen und Amidasen. L-Acylasen katalysieren die Racematspaltung von D,L-Acylaminoäuren zu L-Aminosäuren und N-Acetyl-D-aminoäuren. Nach der Trennung der Produkte wird die N-Acetyl-D-aminoäure in einem zweiten Reaktionsschritt wieder racemisiert und erneut der Enzymreaktion zugeführt. Eine der ersten industriellen Anwendungen einer Aminosäure-Acylase wurde 1969 von Tanabe Seiyaku (Japan) eingeführt.<sup>[34]</sup>

Bei der Degussa wird L-Methionin (5) für Nahrungsmittel mithilfe einer Acylase durch Racematspaltung hergestellt (Schema 11). Der Prozess wird in einem kontinuierlich arbeitenden Rührreaktor durchgeführt. Dabei wird die Acylase durch Ultrafiltration über ein Hohlfasermodul zurückgehalten.

Nach dem gleichen Prinzip, jedoch mit einem anderen Biokatalysator, arbeitet ein Amidaseprozess, der von DSM entwickelt wurde. D,L-Aminosäureamide werden mit Amidasen enantioselektiv

hydrolysiert. Nach Trennung von L-Aminosäure und D-Aminosäureamid kann das Amid racemisiert oder durch chemische Hydrolyse in die entsprechende D-Aminosäure umgewandelt werden.<sup>[35]</sup>

Nichtnatürliche cyclische Aminosäuren wie Piperidin- und Prolinderivate sind ebenfalls durch enantioselektive Hydrolasen zugänglich. Oft sind beide Enantiomere industriell interessant. Beispiele sind Piperidin-2-carbonsäure (20),



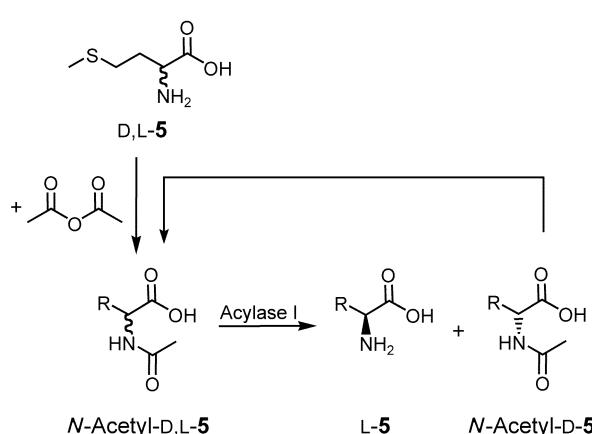
**Schema 12.** Prolin-Acylase-Verfahren von Lonza zur Herstellung von enantiomerenreinem N-Cbz-Prolin (N-Cbz-32).

deren Enantiomere in verschiedene Wirkstoffe eingebaut werden, oder N-Cbz-geschütztes Prolin (N-Cbz-32). Forscher bei Lonza entwickelten biokatalytische Verfahren, die den Zugang zu dieser Verbindungsklasse durch Reaktionen mit Hydrolasen ermöglichen.<sup>[36]</sup> Schema 12 zeigt als Beispiel die Synthese geschützter Prolinderivate.

#### 2.5. Verbesserungen der biokatalytischen Aminosäuresynthese

##### 2.5.1. Verbesserungen bei fermentativen Verfahren

Die klassische Verbesserung von Produktionsstämmen beruht auf ungerichteten Mutationen: Das Genom der Produktionsorganismen wird willkürlich verändert. Die leistungsfähigeren Mutanten werden anschließend durch Selektion identifiziert. Die veränderten Stämme zeichnen sich zum Beispiel durch erhöhte Membranpermeabilität,<sup>[37]</sup> Regula-



**Schema 11.** Acylase-katalysierte Racematspaltung von D,L-N-Acetyl-5 (Degussa).

tionsdefekte oder Biosyntheseenzyme mit veränderten kinetischen Charakteristika aus.<sup>[38]</sup>

In den 80er Jahren erkannte man, dass für weitere Produktivitätssteigerungen ein fundierteres Verständnis des mikrobiellen Aminosäurestoffwechsels notwendig ist. Durch die detaillierte Analyse der Metaboliten können die Stoffflüsse, die bei einer Fermentation auftreten, quantifiziert werden, sodass die Nährstoffzufuhr optimiert und folglich die Ausbeuten gesteigert werden können. Die Analyse des Stoffwechsels ermöglicht es auch, den Metabolismus eines Produktionsstamms zu modellieren („Metabolic Modelling“). Zudem kann die Stoffwechselanalyse als Grundlage für gezielte gentechnische Eingriffe dienen.<sup>[39]</sup>

Ist das Genom der Aminosäure-Produktionsstämme bekannt, so können die Mikroorganismen gezielt verbessert werden. Das Genom von *Corynebacterium glutamicum* ist mittlerweile von mindestens drei wichtigen Aminosäureherstellern sequenziert worden.<sup>[8, 40, 41]</sup> Daher ist es lediglich eine Frage der Zeit, wann die Ergebnisse von Genomsequenzierung und Metabolic Modelling die Aminosäureproduktion deutlich verbessern werden.

### 2.5.2. Verbesserungen bei Biotransformationen

Nicht nur die fermentativen Verfahren, sondern auch die Biotransformationen werden ständig weiterentwickelt. Wie bei chemischen Verfahren ist außer der Selektivität auch die Produktivität entscheidend für die Qualität und Zyklenzahl eines Katalysators.

Bei der Etablierung und Weiterentwicklung eines biokatalytischen Verfahrens werden verschiedene Strategien verfolgt. Im Idealfall ist ein geeigneter Biokatalysator bereits vorhanden, und man muss lediglich ein technisches Verfahren ausarbeiten; weitaus häufiger muss ein neuer Katalysator entwickelt werden. Mithilfe breit angelegter Screening-Programme versucht man, neuartige Enzyme zu identifizieren. Oft ist das Ziel dabei nicht mehr wie beim klassischen Screening, ganze Mikroorganismen aus der Biodiversität zu isolieren, sondern direkt auf die genetische Information zuzugreifen. DNA wird aus Proben isoliert und in geeignete Expressionssysteme übertragen. Anschließend werden die Systeme auf die gewünschte Aktivität geprüft.<sup>[42]</sup> So will man einen unmittelbaren Zugang zum Genpool nichtkultivierbarer Mikroorganismen schaffen, deren Vielfalt weit größer ist als diejenige von kultivierbaren Mikroorganismen.<sup>[43]</sup>

Selbstverständlich können auch bestimmte Charakteristika bekannter Enzymsysteme durch die evolutive Enzymoptimierung gezielt verbessert werden.<sup>[44]</sup> Hierbei wird die natürliche Evolution *in vitro* nachgeahmt. Mutationen werden ungezielt in die Biokatalysatorgene eingeführt, sodass man eine Vielzahl von Varianten erhält. Im anschließenden Screening wird nach Mutationen mit verbesserten Katalysatoreigenschaften gesucht. Die Arbeiten von May et al. zur D-Hydantoinase aus *Arthrobacter* sind ein gutes Beispiel für das Potenzial dieser Methode.<sup>[31]</sup> Neben der ungezielten Veränderung spielt auch die Rekombination genetischen Materials eine entscheidende Rolle in der Evolution. Auch diese Mechanismen lassen sich kopieren und *in vitro* durchführen.<sup>[45]</sup>

Die Entwicklung von Biokatalysatoren für industrielle Anwendungen wird von kleineren Firmen dominiert, die größeren Partner ihre Dienstleistungen anbieten. Durch evolutive Enzymoptimierung können selbstverständlich auch fermentative Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren verbessert werden. Die optimierten Biokatalysatoren können auch in Produktionsstämme übertragen werden, um Engpässe in der Aminosäurebiosynthese zu umgehen.

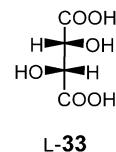
## 3. Herstellung von Carbonsäuren

Für die Herstellung optisch aktiver Carbonsäuren gibt es wie bei den Aminosäuren prinzipiell drei Wege. Natürliche Carbonsäuren können aus geeigneten Rohmaterialien gewonnen werden. Die meisten Carbonsäuren werden jedoch in chemischen und biokatalytischen Verfahren hergestellt. Für natürliche Carbonsäuren bieten sich mikrobielle Fermentationsverfahren an, insbesondere wenn die Produktion 1000 t a<sup>-1</sup> übersteigt. Als Kohlenstoffquelle werden Glucose oder billige Industrieprodukte wie Melasse eingesetzt. Sie werden durch Mikroorganismen in Biomasse (Wachstum), Stoffwechselprodukte wie CO<sub>2</sub> und die gewünschte Carbonsäure umgewandelt.

In diesem Abschnitt werden Beispiele für die verschiedenen Technologien vorgestellt. Die stürmische Entwicklung von enzymkatalysierten Synthesen wurde bereits in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefasst, auf die jeweils verwiesen wird.

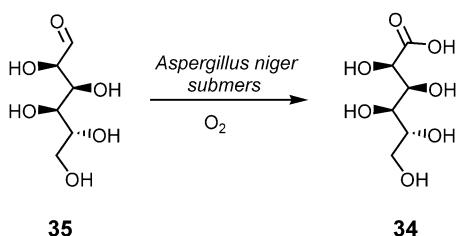
### 3.1. Gewinnung aus natürlichen Rohstoffen

Natürliche chirale Rohstoffe (der „Chiral Pool“) bieten oft eine Alternative zur enantioselektiven Synthese von enantiomerenreinen Verbindungen.<sup>[46]</sup> L-(+)-Weinsäure (**33**) ist ein Beispiel für eine enantiomerenreine Carbonsäure, die aus natürlichen Quellen isoliert wird. Dieses Isomer lagert sich bei der Gärung von Traubensaft als Weinstein (Kaliumhydrogentartrat) ab. Durch Umsetzung mit Calciumchlorid oder Calciumhydroxid und Schwefelsäure wird **33** freigesetzt, als Nebenprodukte fallen Gips und Hefreste an. Ein alternativer Prozess wurde kürzlich von Lurgi Life Science etabliert: Dabei wird der Weinstein mit Kalilauge in das wasserlösliche Dikaliumsalz umgewandelt. Nach Filtration und Ionenaustauschchromatographie werden kristalline Weinsäure und Futterhefe gewonnen. Bei der Regeneration des Ionenaustauschers entstehen Kaliumsulfat und Ammoniumsulfat als Nebenprodukte. Verbindung **33** und Derivate wie (–)-Dibenzoyl-L-Weinsäure finden sowohl in zahlreichen Verfahren in der Textil- und Lebensmittelindustrie Anwendung, als auch bei der Racematspaltung und zur asymmetrischen Synthese, beispielsweise von 2-Aminotetralinen<sup>[47]</sup> und (R)-3-Hydroxybuttersäuremethylester.<sup>[48]</sup>



Natürliche Zuckerbausteine werden seit Jahrzehnten für die Herstellung von enantiomerenreinen Zuckersäuren genutzt.<sup>[49]</sup> In industriellen Synthesen werden die Saccharide

selektiv oxidiert. Für die Herstellung von D-Gluconsäure (**34**, Schema 13) aus D-Glucose (**35**) stehen seit Mitte des letzten Jahrhunderts Oxidationen mit Hypochlorit<sup>[50]</sup> und elektro-



**Schema 13.** Selektive enzymatische Oxidation von D-Glucose (**35**) zu D-Gluconsäure (**34**).

chemische Oxidationen<sup>[49]</sup> zur Verfügung. Diese Reaktionen wurden durch biotechnologische Verfahren abgelöst, bei denen das Monosaccharid in einem aeroben Submersverfahren mit Mikroorganismen (hauptsächlich *Aspergillus niger* und *Gluconobacter* sp.) selektiv oxidiert wird.

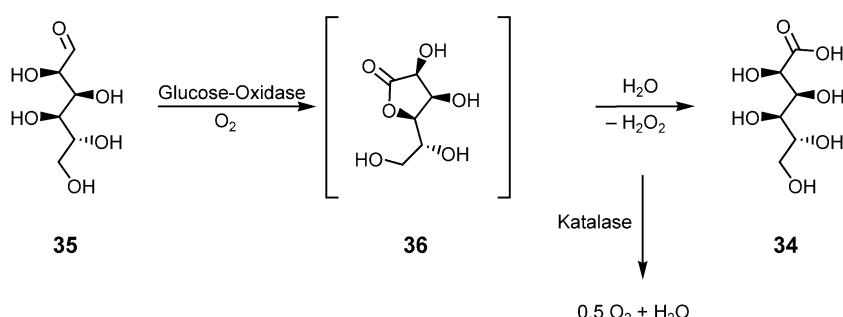
Eine neue Methode für Anwendungen in der Nahrungsmittelindustrie wurde von DSM/Gist Brocades ausgearbeitet. Glucose-Oxidase wandelt **35** in das Lacton **36** um, das zu **34** und  $H_2O_2$  hydrolysiert (Schema 14). Katalase zerstört das  $H_2O_2$ , sodass einerseits erneut Sauerstoff für die Oxidation frei wird und andererseits eine Enzymdesaktivierung durch Nebenreaktionen verhindert wird. Der Prozess zeichnet sich durch die hohe Reinheit des Produkts **34** und eine nahezu quantitative Ausbeute aus.<sup>[51]</sup>

D-Glycerinsäure kann entweder durch stufenweise chemische Oxidation von D-Glucose mit Anthrachinon-2-sulfonat/ $H_2O_2$  und Hypochlorit oder durch enzymatische Decarboxylierung von L-Tartrat hergestellt werden.<sup>[52,53]</sup>

## 3.2. Klassische chemische Synthesen

### 3.2.1. Kristallisation mit enantiomerenreinen Aminen

Die Enantiomere racemischer Carbonsäuren werden durch fraktionierende Kristallisation der diastereomeren

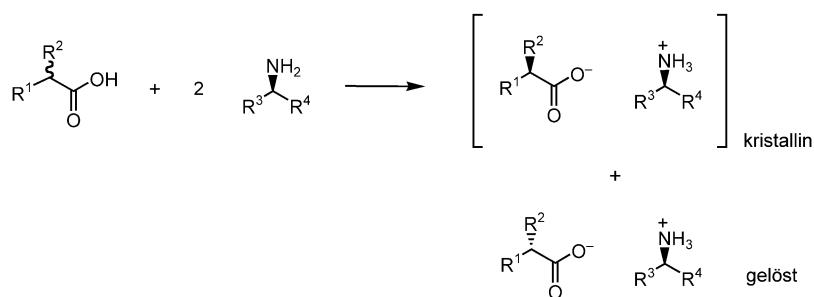


**Schema 14.** Alternative Synthese von hochreiner D-Gluconsäure (**34**) durch Oxidation von D-Glucose (**35**) (DSM/Gist Brocades).

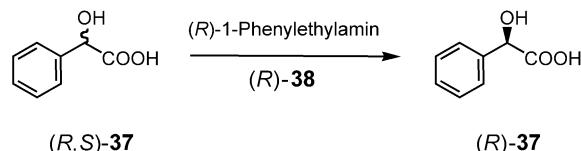
Salze trennt, die sie mit enantiomerenreinen Aminen bilden (Schema 15, siehe auch Abschnitt 4.1.1).

(*R*)-Mandelsäure ((*R*)-**37**) wird von Yamakawa Chemical Industry Ltd. (Japan) durch klassische Racematspaltung aus (*R,S*)-**37** mit enantiomerenreinem (*R*)-1-Phenylethylamin ((*R*)-**38**) produziert (Schema 16). Das enantiomerenreine (*R*)-**38** kann mehrmals eingesetzt werden.<sup>[96]</sup>

Die (*S*)-Thiazolidinoncarbonsäure (*S*)-**39**, eine Zwischenstufe bei der Synthese des neuen Calciumantagonisten CP-060-S ((*S*)-**40**), erhält man durch Racematspaltung mit (*S*)-*N*-Benzyl-1-phenylethylamin ((*S*)-**41**) (Schema 17). Obwohl die salzbildende Carboxyfunktion nicht weniger als vier Bindungen vom Chiralitätszentrum entfernt ist, wird (*S*)-**39** mit 99.8 % ee isoliert.<sup>[54]</sup>



**Schema 15.** Racematspaltung optisch aktiver Carbonsäuren durch Salzbildung mit enantiomerenreinen Aminen und fraktionierende Kristallisation.



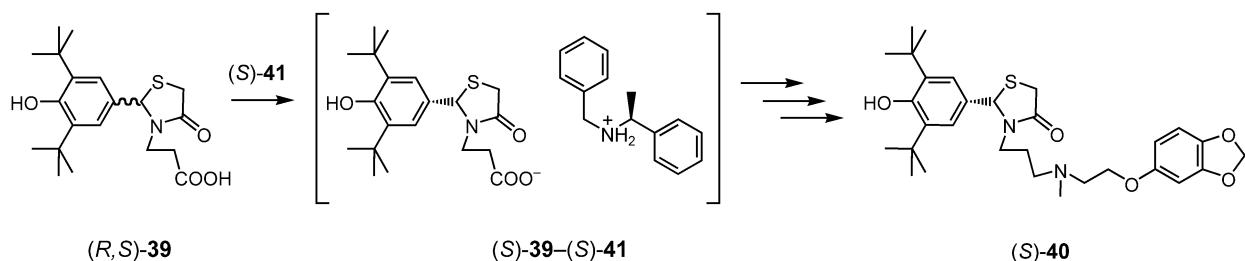
**Schema 16.**

Die enantiomerenreine Aminosäure (*S*)-**20** ist ebenfalls durch fraktionierende Kristallisation diastereomerer Salze mit 2-Phenoxypropionsäure (**42**) erhältlich (Schema 18). Aus Wasser/Alkohol kristallisiert das schlechter lösliche Salz (*S*)-**20**-(*S*)-**42** mit hoher Diastereomerenreinheit.<sup>[55]</sup>

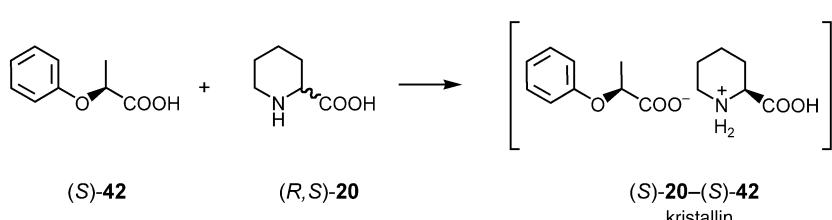
Die „Dutch Resolution“, bei der Carbonsäureracemate mithilfe von Amingemischen getrennt werden, wird in Abschnitt 4.1.1 beschrieben.

### 3.2.2. Asymmetrische C-C-Verknüpfungen

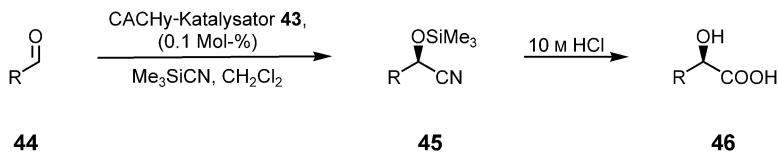
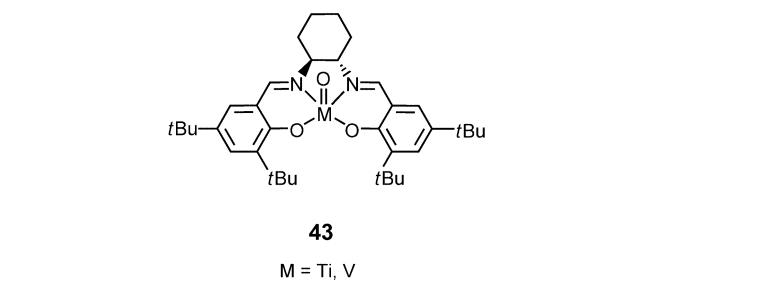
Für die Herstellung von substituierten  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren stehen seit Neuestem (Salen)-titan- und (Salen)-vanadium-Komplexe **43** (CACHy-Katalysatoren)<sup>[56]</sup> zur Verfügung, die die asymmetrische Addition von Trimethylsilylcyanid an aromatische und aliphatische Aldehyde<sup>[57]</sup> und Ketone<sup>[58]</sup> vermitteln (Schema 19, Tabelle 1). Diese Methode wurde auch auf das billigere Kaliumcyanid als Nucleophil erweitert.<sup>[59]</sup> Durch saure Verseifung der Cyanhydrintrimethylsilylether **45** sind



**Schema 17.** Racematspaltung mit (S)-N-Benzyl-1-phenylethylamin ((S)-41) ergibt enantiomerenreines (S)-39 für die Synthese des Calciumantagonisten CP-060-S ((S)-40).



**Schema 18.**



**Schema 19.** Die CACHy-Katalysatoren 43 bewirken die enantioselektive Addition von Trimethylsilylcyanid an aromatische und aliphatische Aldehyde (44), die nach Hydrolyse enantiomerenreine  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren (46) ergibt.

**Tabelle 1:** Addition von Trimethylsilylcyanid an Aldehyde mit CACHy-Katalysatoren 43 (Schema 19).<sup>[a]</sup>

R	43 (M = Ti)	43 (M = V)
Ph	82	94
p-OMe-Ph	84	90
o-Me-Ph	76	90
m-Me-Ph	90	95
p-Me-Ph	87	94
p-NO <sub>2</sub> -Ph	50	73
Et	52	77
tBu	66	68

[a] ee-Werte in %. Vergleiche Lit. [57]: 0.1 Mol-% Katalysator; Reaktionsdauer: M = Ti < 5 min, M = V 18 h; quantitativer Umsatz.

die  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren 46 zugänglich. Da diese Reaktion mit den unten beschriebenen enzymatischen Verfahren konkurriert, dürfte sie jedoch nur bei einigen speziellen Synthesen zur Anwendung kommen.

### 3.3. Biotechnologische Synthesen

#### 3.3.1. Asymmetrische Synthesen

##### 3.3.1.1. Oxidationen

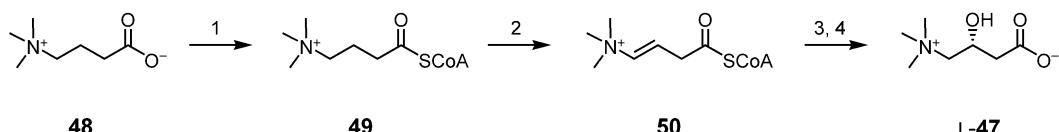
Einige bakterielle Mono- oder Dioxygenasen können in Hydroxylierungsprozessen eines oder beide Sauerstoffatome von O<sub>2</sub> mit nicht aktivierte Kohlenstoffzentren von Substraten verknüpfen. Diese Hydroxylierungen verlaufen zumeist regio-, aber nicht stereoselektiv.<sup>[60,61]</sup>

Bei vielen mikrobiellen Hydroxylierungen werden Hydroxycarbonsäuren durch stufenweise  $\alpha,\beta$ -Dehydrierung und Hydrolyse aufgebaut: Hierzu zählt die Herstellung von L-Carnitin (47) aus  $\gamma$ -Butyrobetain (48) nach dem Lonza-Verfahren (> 100 t a<sup>-1</sup>). Die biochemische Transformation verläuft über Butyrobetainyl-CoA (49) und Crotonobetainyl-CoA (50) (Schema 20).<sup>[62]</sup>

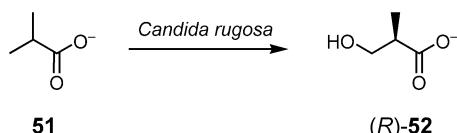
Analog führt das Kaneka-Verfahren durch  $\beta$ -Hydroxylierung von 2-Methylpropionsäure (51) mit *Candida rugosa* zu (R)-52, einem Synthesebaustein für ACE-Inhibitoren wie Captopril (Schema 21).<sup>[63]</sup>

##### 3.3.1.2. Reduktionen

Grundsätzlich bietet die enantioselektive biokatalytische Reduktion von Ketosäuren einen Zugang zu enantiomerenreinen Hydroxycarbonsäuren. Nachteilig wirkt sich derzeit jedoch die Abhängigkeit von teuren Cofaktoren wie NADH aus, die auf verschiedene Arten regeneriert werden müssen (siehe Abschnitt 2.4.4). Weitere Beispiele werden im Abschnitt 5 diskutiert.



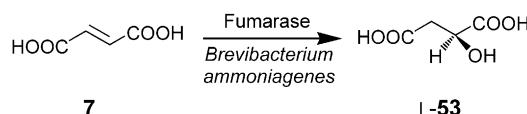
**Schema 20.** Synthese von L-Carnitin (L-47) nach dem Lonza-Verfahren. 1. Thioester-Synthase. 2. Dehydrogenase. 3. Hydrolase. 4. Thioesterase.



**Schem 21.**  $\beta$ -Hydroxylierung von 2-Methylpropionsäure (51).

### 3.3.1.3. Hydrolysen

Die enzymkatalysierte enantioselektive Addition von Wasser an die Doppelbindung von prochiraler Fumarsäure (**7**) wird bei der Herstellung von L-Äpfelsäure (**L-53**) mit immobilisierten Brevibakterien oder Pilzen genutzt (Tanabe-Prozess, Schema 22).<sup>[64,65]</sup> **L-53** wird vor allem als Stabilisator in Fruchtsäften eingesetzt.



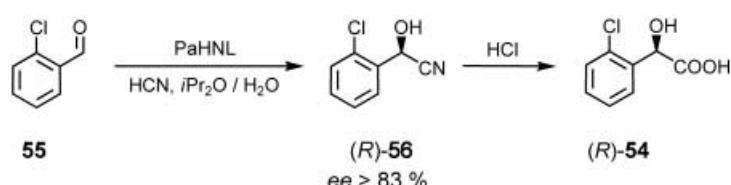
**Schema 22.** Herstellung von L-Äpfelsäure (L-53) durch enantioselektive Addition von Wasser an **7** (Tanabe-Prozess).

### 3.3.1.4. C-C-Verknüpfungen (Hydroxynitril-Lyase-Verfahren)

Hydroxynitril-Lyasen (HNL) katalysieren die stereoselektive Addition von Blausäure an Aldehyde und Ketone oder – je nach Reaktionsbedingungen – die Spaltung der Cyanhydrine.<sup>[66]</sup> Durch Hydrolyse der chiralen Cyanhydrine mit Salzsäure werden die  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren freigesetzt. Bei dieser sehr günstigen Synthese ist eine quantitative Umsetzung des Aldehyds zum Produkt möglich. Einige chirale aromatische  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren werden seit kurzem nach einem HNL-Verfahren industriell hergestellt.

Chirale Mandelsäurederivate werden sowohl als Bausteine in diversen Wirkstoffsynthesen als auch zur Racematspaltung eingesetzt (Abschnitt 4.1.1). Chemische und biokatalytische Syntheserouten für diese Verbindungen wurden bereits mehrfach beschrieben,<sup>[67]</sup> daher beschränken wir uns auf neuere Beispiele. HNL-Syntheseverfahren für (*R*)-*o*-Chlormandelsäure (**54**), einen Baustein des Antidepressivums und Plättchenaggregationshemmers Clopidogrel,<sup>[68]</sup> wurden bei DSM Chemie Linz, Nippon Shokubai und Clariant entwickelt (Schema 23).<sup>[69]</sup> In mikro-wässrigen oder zweiphasischen<sup>[70]</sup> Systemen addiert Blausäure enantioselektiv an *o*-Chlorbenzaldehyd (**55**). Als Katalysator dient die Mandelonitril-Lyase (PaHNL), die beispielsweise in Form

von Mandelmehlextrakt oder Avicel-Immobilisat eingesetzt wird. Je nach Lösungsmittel kann das Enzym monatelang verwendet werden. Das *(R)*-*o*-Chlormandelonitril (**(R)-56**) racemisiert nicht, wenn es mit konz. HCl zur entsprechenden Säure hydrolysiert wird. Das Verfahren bietet gegenüber den Racematspaltungen durch Kristallisation diastereomerer Ammoniumsalze, enzymatische Acylierung/Desacylierung oder Umesterung den Vorteil, dass theoretisch eine Ausbeute von 100% erreicht werden kann.



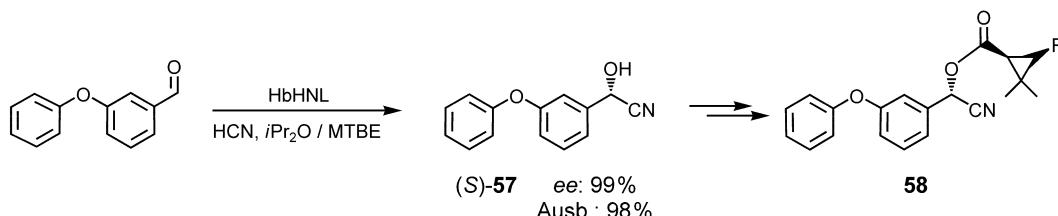
**Schema 23.** HNL-katalysierte Synthese von (R)-o-Chlormandelsäure (54).

Durch die rekombinante Enzymherstellung in *E. coli* wurden in den letzten Jahren Prozesse zur Herstellung von (S)-Cyanhydrinen und (S)-Hydroxycarbonsäuren wirtschaftlich attraktiv, die durch die HNLs aus *Hevea brasiliensis* und *Manihot esculenta* katalysiert werden.<sup>[71]</sup> Ein aktuelles Beispiel ist die Produktion von (S)-*m*-Phenoxybenzaldehyd-Cyanhydrin ((S)-**57**) bei DSM Chemie Linz und Nippon Shokubai in einem zweiphasigen Verfahren.<sup>[72]</sup> Das Cyanhydrin dient als Alkoholsynthon bei der Herstellung von Pyrethroiden wie **58** (Schema 24).

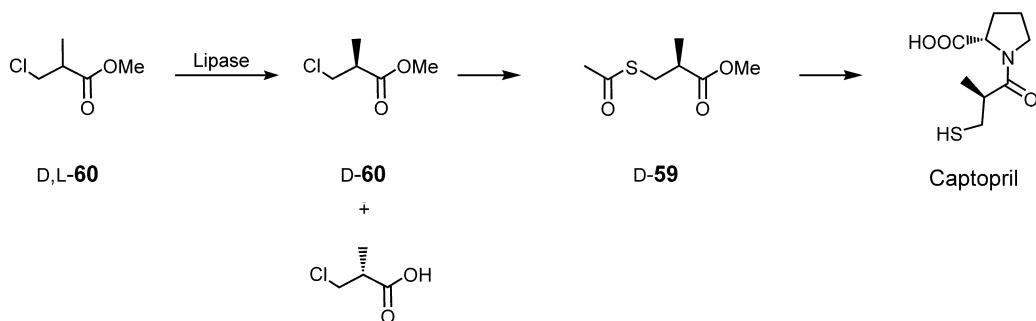
### 3.3.1.5. Esterhydrolysen und Transacylierungen

Forscher bei DSM haben ein enzymatisches Verfahren zur Herstellung der Captopril-Zwischenstufe **D-59** ausgearbeitet. Mit einer Lipase werden die Enantiomere von 3-Chlor-2-methylpropionsäureester (**D,L-60**) getrennt:<sup>[73]</sup> Alle untersuchten Lipasen hydrolyseren **L-60**, das nicht umgesetzte **D-60** wird in **D-59** umgewandelt (Schema 25). Mit Lipase aus *Candida cylindracea* werden bei 64 % Umsatz Produkte mit bis zu 98 % ee erhalten.

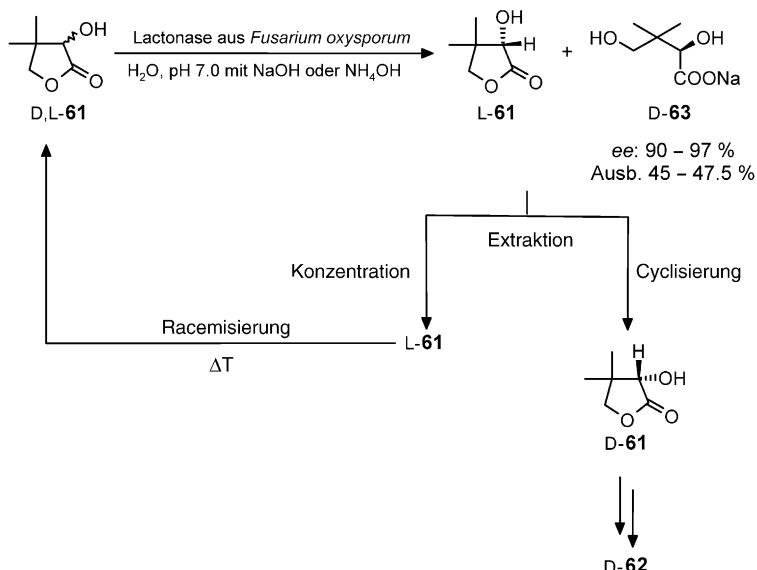
Als Spezialfall einer Esterhydrolyse kann die Racematspaltung von D,L-Pantolacton (D,L-**61**) durch enantioselektive Pantolacton-Hydrolasen betracht werden. D-**61** ist ein Synthon für D-Pantothenäure (D-**62**, Vitamin B5), die als Futterzusatz in der Schweine- und Geflügelzucht benötigt wird (Schema 26). In den 90er Jahren haben Forscher bei Fuji Chemical Industries (heute Daiichi Fine Chemical Co.) in Kooperation mit Yamada et al.<sup>[74]</sup> ein Verfahren entwickelt, bei dem D,L-**61** durch eine pilzliche Aldonolactonase in Natrium-D-pantoat (D-**63**) und L-**61** gespalten wird<sup>[75]</sup> (Kapazi-



**Schema 24.** (S)-*m*-Phenoxybenzaldehyd-Cyanhydrin ((S)-57) ist eine Zwischenstufe bei der Synthese von Pyrethroiden wie 58.



**Schema 25.** Synthese des ACE-Antagonisten Captopril.



**Schema 26.** Herstellung von D,L-Pantothenäure (D-62) aus D,L-Pantolacton (D,L-61). Bei der enantioselektiven Esterhydrolyse entsteht Natrium-D-pantoat (D-63), das zum Produkt umgesetzt wird. L-61 wird zu D,L-61 racemisiert und erneut eingesetzt.

tät  $3500 \text{ t a}^{-1}$ ). Das Enzym wirkt hoch selektiv und ist in Form von immobilisierten Pilzmycel sehr stabil; nach 180 Ansätzen bzw. Tagen liegt die Aktivität immer noch bei > 90 %.

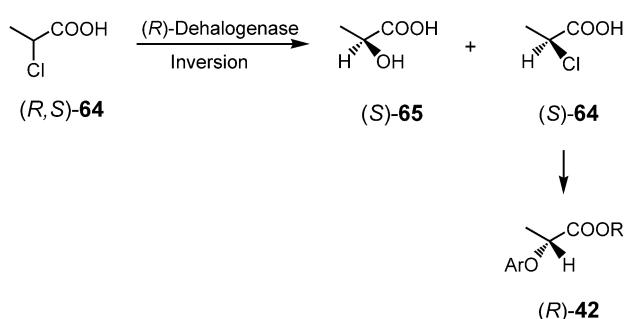
### 3.3.1.6. Dehalogenase-Verfahren

Die enantioselektive Dehalogenierung von (R)-2-Chlorpropionsäure ((R)-64) unter Inversion des Stereozentrums

liefert (S)-64 und (S)-Milchsäure ((S)-65, Schema 27). Diese Umsetzung wird industriell bei der Synthese von (R)- $\alpha$ -Phenoxypropionsäure ((R)-42) genutzt.<sup>[76]</sup>

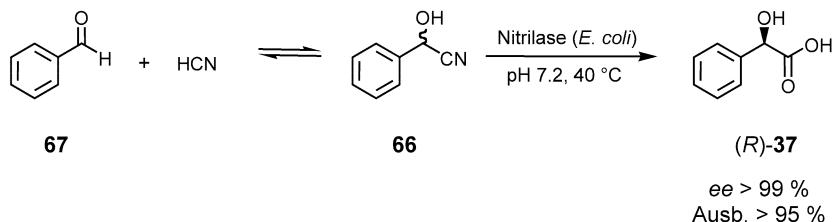
### 3.3.1.7. Enzymatische Hydrolysen von Nitrilen

Die Hydrolyse von Nitrilen durch Nitrilasen oder Nitril-Hydratase/Amidase-Systeme bietet analog zu den Hydroxynitril-Lyase-Verfahren einen günstigen Zugang zu  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren durch Kombination von klassischer Blausäurechemie mit Biokatalyse.<sup>[77]</sup> In den vergangenen Jahren wurden einige Nitrilase-Prozesse etabliert, z.B. bei Lonza (Abschnitt 3.3.1); auch BASF und Mitsubishi Rayon stellen (R)-Mandelsäure ((R)-37) und ihre Derivate im Multitonnen-Maßstab durch Nitrilase-Verfahren her.<sup>[78]</sup> Als Produkt der



**Schema 27.** Industrielle Synthese von (R)- $\alpha$ -Phenoxypropionsäure ((R)-42) ausgehend von (R)- $\alpha$ -Chlorpropionsäure ((R)-64).

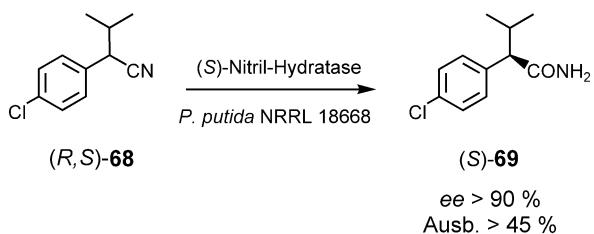
biokatalytischen Reaktion erhält man das Ammoniumsalz, die Säure (*R*)-**37** wird durch Kristallisation isoliert. Da die Cyanhydrine **66** in situ racemisieren, gelingt mit diesem Prozess eine dynamische kinetische Racematspaltung (Schema 28). Erfolgt die Umwandlung der enantiomeren Cyanhydrine schneller als die enzymatische Hydrolyse, so kann **67** komplett in (*R*)-**37** umgewandelt werden. Die Nitrilase-Verfahren bieten den Vorteil, dass sie ohne organische Lösungsmittel auskommen. Darüber hinaus kann auf



**Schema 28.** Industrielle Synthese von (*R*)-Mandelsäure ((*R*)-**37**) durch enantioselektive Hydrolyse des Cyanhydrins **66** (Nitrilase-Verfahren).

eine Nitrilsynthese verzichtet werden, da sich das Cyanhydrin **66** unter den Reaktionsbedingungen aus **67** und HCN bildet.<sup>[79]</sup>

Prinzipiell bieten auch Nitril-Hydratase/Amidase-Systeme, bei denen die Nitrilhydrolyse über das Amid verläuft, Zugang zu chiralen Carbonsäuren.<sup>[80]</sup> Allerdings sind nur wenige enantioselektive Nitril-Hydratases bekannt,<sup>[81,82]</sup> beispielsweise die Nitril-Hydratase für die Racematspaltung von (*R,S*)-2-(*p*-Chlorphenyl)-3-methylbutyronitril (**68**) zu (*S*)-**69** (Schema 29).<sup>[83]</sup> Großtechnisch ge-



**Schema 29.**

nutzt werden die unselektive Nitril-Hydratase aus *Rhodococcus rhodochrous* *J1* bei der Acrylamid-Herstellung (Nitro-Prozess, > 20000 t a<sup>-1</sup>)<sup>[84]</sup> und Nicotinamid-Synthese (Lonza, 3000 t a<sup>-1</sup>) sowie regioselektive Nitril-Hydratase/Amidase-Systeme zur Verseifung von Dinitrilen.<sup>[85]</sup> In den meisten Fällen werden die racemischen Amide getrennt, sodass die maximalen Ausbeuten bei 50 % liegen. Ein Beispiel hierfür ist die Herstellung von (*S*)-Piperazinsäure ((*S*)-**70**) mit einer *Klebsiella*-Amidase bei Lonza (Schema 30), die von racemischem (*R,S*)-Piperazin-2-carboxamid ((*R,S*)-**71**) ausgeht. (*S*)-**70** ist ein Intermediat bei der Synthese des Anti-HIV-Wirkstoffs Crixivan.<sup>[86]</sup>



**Schema 30.** Selektive Umsetzung von racemischem (*R,S*)-Piperazin-2-carboxamid ((*R,S*)-**71**) zu (*S*)-Piperazinsäure ((*S*)-**70**).

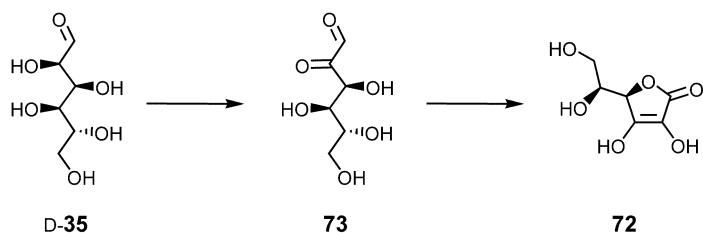
### 3.3.2. Fermentationen

Durch die Fortschritte bei Stammentwicklung und Metabolic Engineering sind mikrobielle Synthesen auch für viele in großem Maßstab erzeugte Produkte wirtschaftlich attraktiv. Hierzu zählen die Aminosäuren ebenso wie Milchsäure (*Lactobacilli*-Fermentation), Ascorbinsäure (**72**, Vitamin C) und Pantothensäure (**62**, Vitamin B5). Stellvertretend für den Pharmamarkt sind hier die Penicilline zu nennen.

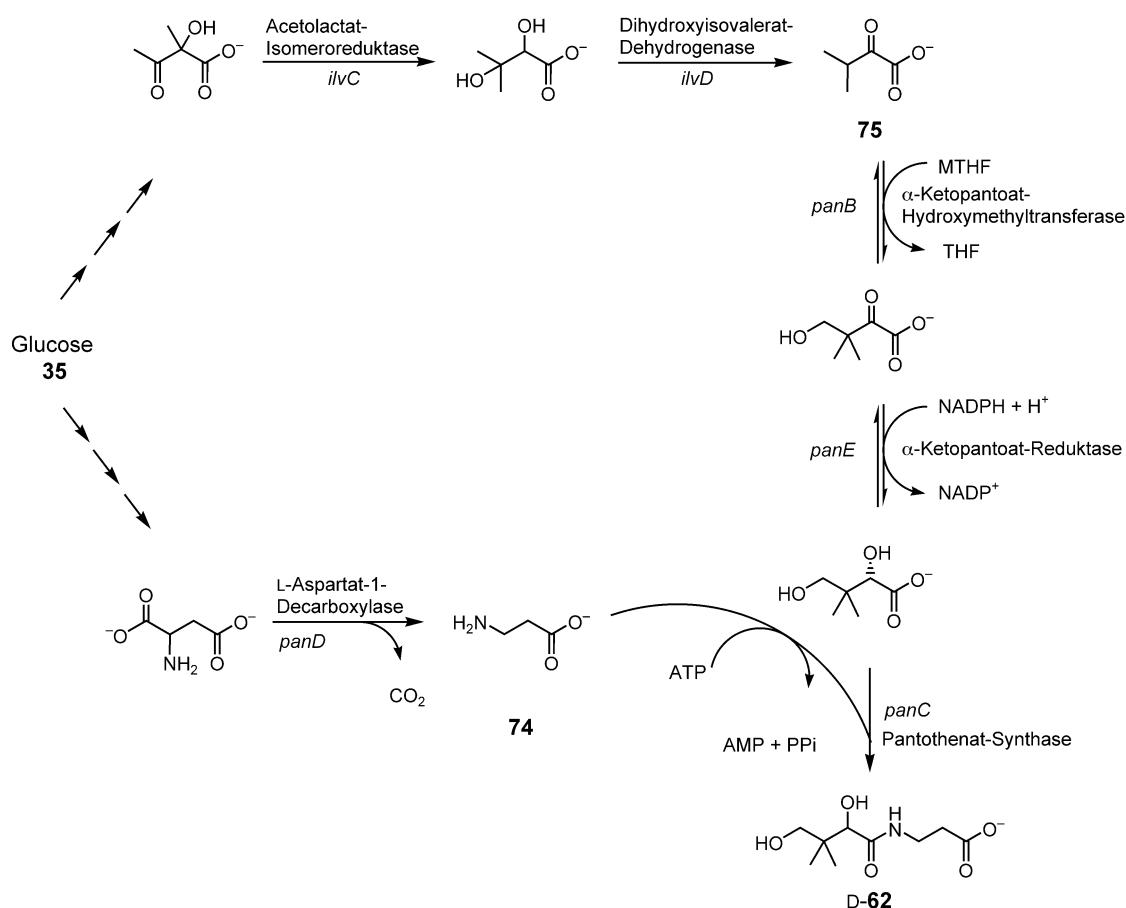
Die weltweite Produktion von Vitamin C (80000 t a<sup>-1</sup>) stützt sich noch immer auf das Reichstein-Verfahren.<sup>[87]</sup> Biotechnologische Verbesserungen beruhen in erster Linie auf der fermentativen Herstellung von 2-Keto-L-Gulonsäure (**73**), einer offenkettigen Vorstufe von **72**, aus D-Glucose (D-**35**) (Schema 31). Die Verfahren wurden kürzlich von Hancock und Viola verglichen.<sup>[88]</sup>

Zur Herstellung von D-Pantothensäure (D-**62**) in *E. coli* wurde bei Takeda Chemical Ind. in den 90er Jahren ein fermentatives Verfahren entwickelt. Bei Zufütterung von  $\beta$ -Alanin (**74**) wurden hohe Endkonzentrationen erzielt (> 60 g L<sup>-1</sup> D-**62** nach 72 h Fermentationszeit).<sup>[89]</sup>

In Kooperation mit Pühler et al. und Sahm et al. entwickeln Forscher bei Degussa zurzeit auf der Basis dieses Prozesses fermentative Pantothensäure-Synthesen in *E. coli*<sup>[90]</sup> bzw. *Corynebacterium glutamicum*.<sup>[91]</sup> Die Gene, die für die Pantothensäurebiosynthese relevant sind, wurden überexprimiert. Außerdem wurde die Produktion der Vorstufe  $\alpha$ -Ketoisovalerat **75** durch *ilvBNCD*-Überexpression und *ilvA*-Deletion gesteigert. Zur Aufarbeitung der ins Medium ausgeschiedenen Pantothensäure D-**62** werden (wahlweise) die Zellen abgetrennt. Das Mischsalz der Pantothensäure wird durch Zusatz von Calciumhydroxid, Eindampfen und Sprühtrocknung in das entsprechende Calcium-D-pantothenat überführt (Schema 32).<sup>[92]</sup>



**Schema 31.** Herstellung von Vitamin C (**72**) aus D-Glucose (D-**35**).



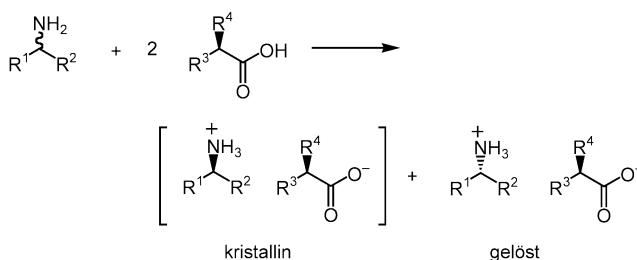
**Schema 32.** Biosynthese von D-Pantothenensäure (D-62) (MTHF = 5-Methyltetrahydrofolat, THF = Tetrahydrofolat).

#### 4. Herstellung von Aminen

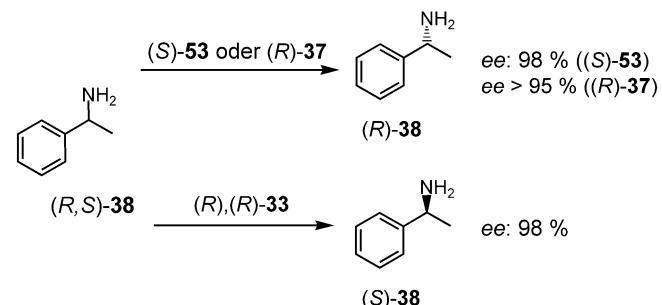
##### 4.1. Klassische chemische Verfahren

###### 4.1.1. Kristallisation mit optisch aktiven Carbonsäuren

Der Kristallisation diastereomerer Salze aus optisch aktiven Säuren und chiralen Aminen kommt auch heute noch große Bedeutung bei der Gewinnung enantiomerenreiner Amine zu (Schema 33).<sup>[93]</sup> So können (R)- oder (S)-1-Phenylethylamin ((R)- oder (S)-38) großtechnisch durch Kristallisation mit (S)-Äpfelsäure ((S)-53)<sup>[94]</sup> oder (R)-Mandelsäure ((R)-37)<sup>[96]</sup> bzw. mit (R,R)-Weinsäure ((R,R)-33)<sup>[95]</sup> gewonnen werden (Schema 34). Die Racematspaltung mit



**Schema 33.** Klassische Racematspaltung durch fraktionierende Kristallisation der Salze aus racemischen Aminen und enantiomerenreinen Carbonsäuren.

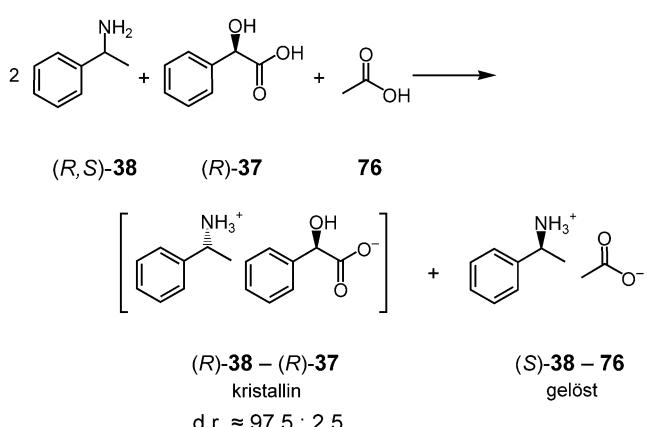


**Schema 34.** Racematspaltung von (R,S)-1-Phenylethylamin ((R,S)-38) durch fraktionierende Kristallisation.

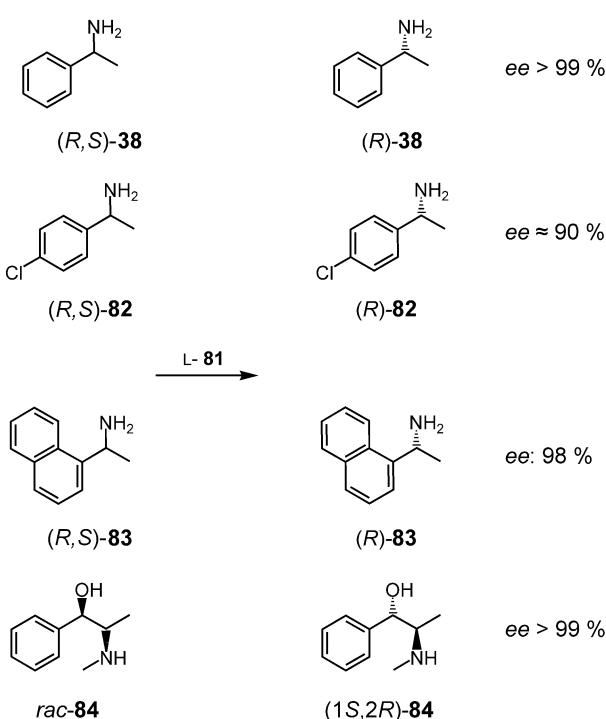
(R)-37 ist von besonderem kommerziellem Interesse. Bei der Prozessoptimierung wurde gefunden, dass ein Äquivalent (R)-37 durch Essigsäure (76) ersetzt werden kann (Schema 35).<sup>[96a]</sup> So erhält man (R)-38–(R)-37 mit d.r. ≈ 97.5:2.5.

Mandelsäure (37) hat sich als geeignetes Racematspaltungsreagens für eine Vielzahl von Aminen erwiesen. So können auch substituierte Arylalkylamine wie 1-(*m*-Methoxyphenyl)ethylamin (77)<sup>[97]</sup> oder 1-(*o,p*-Dichlorphenyl)-ethylamin (78)<sup>[98]</sup> mit 37 in die Enantiomeren gespalten werden (Schema 36).

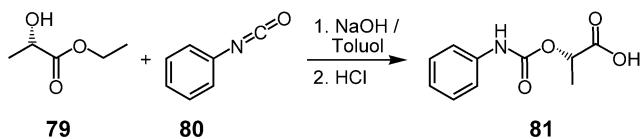
Ein weiteres breit anwendbares Reagens für die Enantiomerenentrennung chiraler Amine, L-Phenylcarbamoylmilch-



Schema 35.

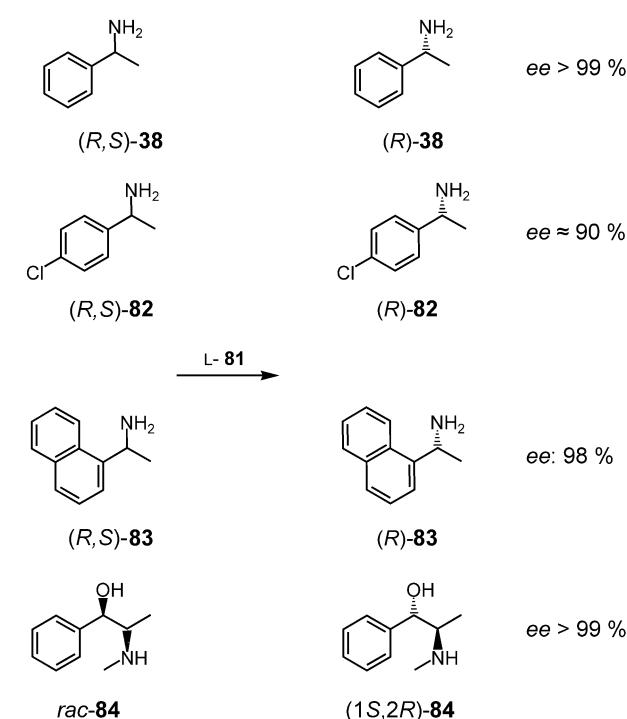

 Schema 36. Racematspaltungen mit (*R*)- und (*S*)-Mandelsäure ((*R*)-bzw. (*S*)-38).

säure (**L-81**), ist aus den kommerziellen Ausgangsmaterialien L-Milchsäureethylester (**L-79**) und Phenylisocyanat (**80**) leicht und preiswert zugänglich (Schema 37).<sup>[99]</sup> Beispielsweise


 Schema 37. Synthese von L-Phenylcarbamoylmilchsäure (**L-81**), einem Reagens zur Enantiomerentrennung chiraler Amine.

erhält man (*R*)-Phenylethylamin ((*R*)-38) mit **L-81** in > 99 % ee aus (*R,S*)-38.<sup>[99b]</sup> Darüber hinaus eignet sich **L-81** zur Racematspaltung von 1-(*p*-Chlorphenyl)ethylamin (**82**), dem Schlüsselbaustein der Synthese eines chiralen Funigizids,<sup>[100]</sup> sowie von 1-(1-Naphthyl)ethylamin (**83**)<sup>[99b]</sup> und Ephedrin (*rac*-**84**, Schema 38).<sup>[99b]</sup>

Durch Umsetzung von L-Milchsäure (**L-79**) mit substituierten Arylisocyanaten sind auch Derivate von **L-81** zugänglich (Schema 37).<sup>[101]</sup> Zu berücksichtigen ist allerdings, dass nur **L-79** kostengünstig verfügbar ist; daher kann in der Regel nur ein Enantiomer der Amine gewonnen werden.


 Schema 38. Beispiele für Racematspaltungen mit L-Phenylcarbamoylmilchsäure (**L-81**).

#### 4.1.1.1. „Dutch Resolution“

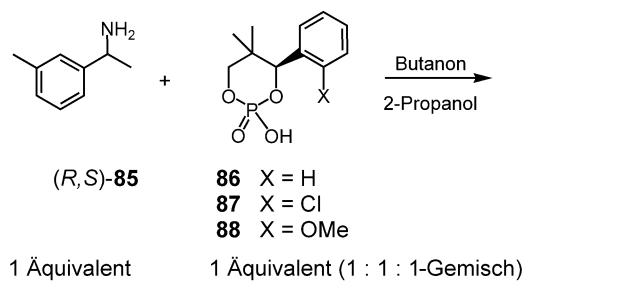
Eine bemerkenswerte Variante der klassischen Racematspaltung ist die „Dutch Resolution“ von DSM und Syncrom BV.<sup>[102]</sup> In einem kombinatorischen Ansatz wurde eine Mischung von mehreren optisch aktiven Säuren eingesetzt, um die Suche nach dem geeigneten Spaltreagens für ein Amin abzukürzen. Dabei fiel ein Salz aus, das nicht *ein*, sondern *mehrere* Säureanionen enthält.

Ein typisches Beispiel ist die Enantiomerentrennung von racemischem 1-(*m*-Methylphenyl)ethylamin ((*R,S*)-85), das mit einem Äquivalent einer äquimolaren Mischung der chiralen Phosphorsäureester **86**, **87** und **88** umgesetzt wird. Dabei erhält man ein Salz, in dem nahezu enantiomerenreines (*S*)-85 vorliegt (Schema 39); als Gegenionen fungieren die Phosphate von **86**, **87** und **88** (5:5:1). Auch nach mehrmaligem Umkristallisieren ändert sich das Verhältnis der Gegenionen nicht.

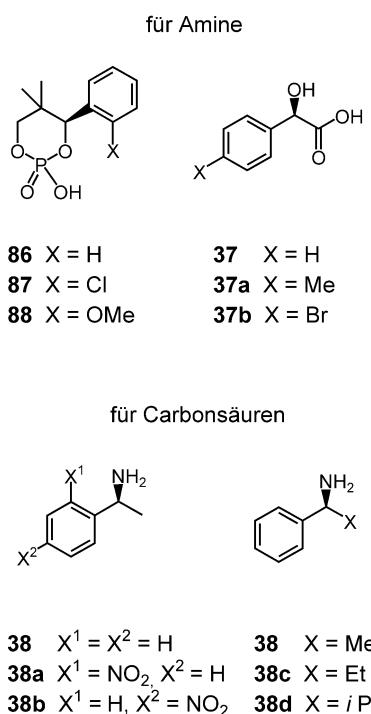
Die Methode ist breit anwendbar; so wurden inzwischen mehrere Gemische für die Racematspaltung von Aminen und Carbonsäuren etabliert (Schema 40). Da in der Mutterlauge komplexe Gemische der Spaltreagentien vorliegen, ist die Wiederverwendung dieser Hilfsstoffe problematisch.

#### 4.1.2. Reduktion von C-N-Doppelbindungen

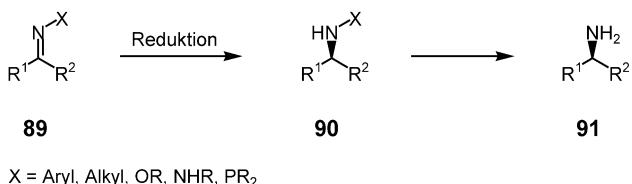
Die Herstellung von optisch aktiven Aminen durch Reduktion eines prochiralen Vorläufers **89** mit C-N-Doppelbindung (Schema 41) wurde bereits in mehreren Übersichtsartikeln eingehend beschrieben.<sup>[103]</sup>



**Schema 39.** „Dutch Resolution“: Fällung von Salzen enantiomerenreiner Amine, die ein Gemisch chiraler Säureanionen enthalten.

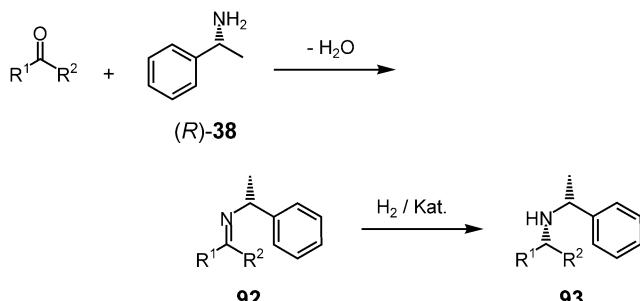


**Schema 40.** „Dutch Resolution“: häufig verwendete Reagentien.



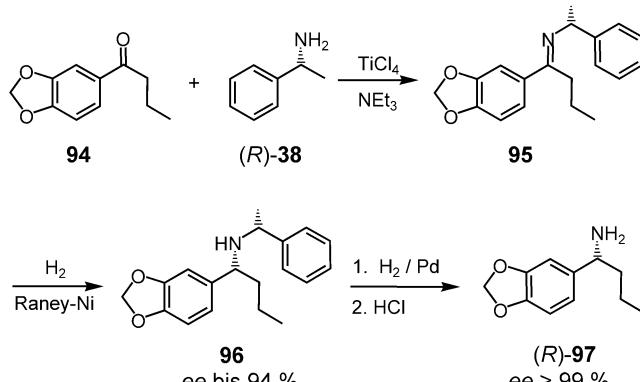
**Schema 41.** Prochirale Vorläufer 89 mit C-N-Doppelbindung bei der enantioselektiven Synthese von Aminen.

Aus industrieller Sicht liegen die Probleme in der Synthese der Vorstufe 89 und in der Abspaltung der Hilfsgruppe X aus 90 zum freien Amin 91 (die N-N-Bindung in optisch aktiven Hydrazinen wird beispielsweise mit SmI<sub>2</sub> gespalten).<sup>[104]</sup> Auch in großem Maßstab durchführbar ist die diastereoselektive Hydrierung von Schiff-Basen 92 aus Ketonen und (*R*)-38<sup>[105a,b]</sup> zu den sekundären Aminen 93 (Schema 42).



**Schema 42.**

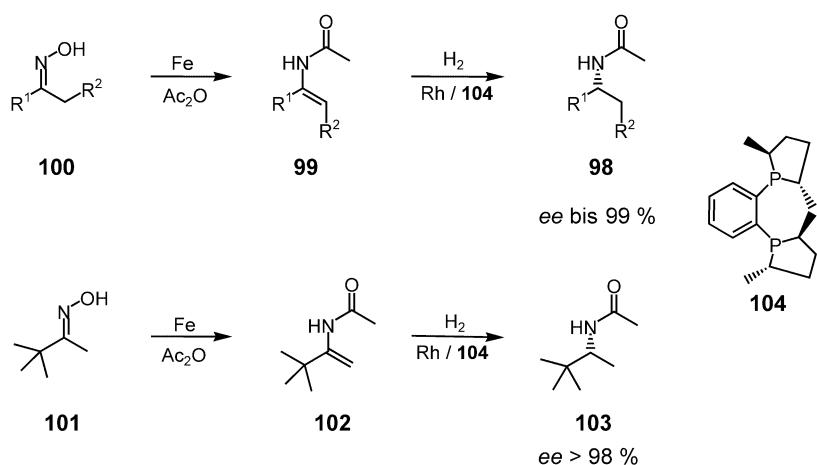
Optisch aktive Schiff-Basen 95 von elektronenreichen Arylketonen ergeben nach Hydrierung sekundäre Amine 96. Beide Benzylpositionen in 96 sind unterschiedlich, sodass die selektive Spaltung einer benzylischen C-N-Bindung (*R*)-97 liefert (Schema 43).<sup>[105c,d]</sup> Die Diastereoselektivität der



**Schema 43.**

Hydrierung von 95 hängt entscheidend von den Reaktionsbedingungen ab: Bei erhöhten Temperaturen sind die Selektivitäten besser als bei RT! Durch einmalige Fällung des Hydrochlorids erhält man (*R*)-97 mit über 99 % ee.<sup>[105c]</sup>

Ebenfalls für technische Anwendungen interessant ist die dreistufige Synthese optisch aktiver Amide 98 von Burk et al.<sup>[106]</sup> durch enantioselektive katalytische Hydrierung von 99 mit Rh<sup>I</sup>/DuPhos (104). Die Enamide 99 sind wiederum durch Reduktion der Oxime 100 mit Eisen zugänglich (Schema 44). Ausgehend von Pinakolon-Oxim (101) erhält



**Schema 44.** Die enantioselektive katalytische Hydrierung mit  $\text{Rh}^1$  / DuPhos (104) liefert optisch aktive Amide.

Einem sehr ähnlichen Weg folgt Avecia Ltd. bei der Synthese von optisch aktivem (*R*)-1-(1-Naphthyl)ethylamin ((*R*)-83): Ausgehend von Keton 111 wird mit Diphenylphosphoramatid 112 ein phosphoryliertes Imin 113 erzeugt. Die asymmetrische Transferhydrierung (Catalytic Asymmetric Transfer Hydrogenation, CATHy; siehe auch Abschnitt 3.2.2) von 113 mit dem Rhodium-Komplex 114 führt zum optisch aktiven phosphorylierten Amin 115, aus dem durch Hydrolyse (*R*)-83 freigesetzt wird (Schema 46). Mit 0.1 Mol-% 114 und Substratkonzentrationen von ca.  $0.5 \text{ mol L}^{-1}$  werden bei zufriedenstellendem Umsatz ee-Werte  $>99\%$  erzielt.<sup>[108b]</sup>

## 4.2. Biotechnologische Verfahren

### 4.2.1. Transaminierungen

Ende der 80er Jahre wurde bei Celgene ein neues biotechnologisches Verfahren zur Herstellung optisch aktiver Amine ausgearbeitet.<sup>[111]</sup> Dabei werden Transaminasen eingesetzt, die Carbonylverbindungen wie Ketone oder  $\alpha$ -Ketosäuren (117 oder 118) in die Amine 119 bzw. 116 umwandeln können. Die enantioselektive Übertragung ist abhängig vom Cofaktor Pyridoxalphosphat (120, Schema 47). Um die Rückreaktion zu unterdrücken und das Gleichgewicht in die gewünschte Richtung zu verschieben, werden üblicherweise unterschiedliche Stoffmengen der Reaktanten eingesetzt. Die Konzentration lipophiler Substrate in der wässrigen Phase kann auch durch Arbeiten in einem Zweiphasensystem mit einer organischen Phase niedrig gehalten werden.

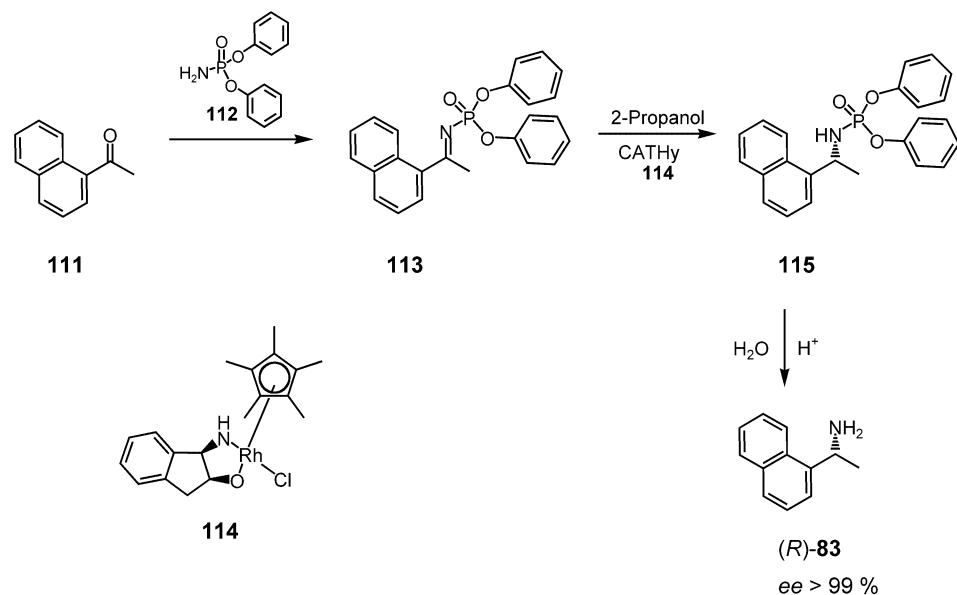
Da Forscher bei Celgene sowohl *S*- als auch *R*-selektive Transaminasen entwickelt haben, sind mit dieser Technologie beide Enantiomere der Amine 119 zugänglich. Außerdem kann man die Reaktion im Sinne einer Synthese oder einer kinetischen Racematspaltung führen (Schema 48). Bei der Synthese geht man von einem prochiralen Keton 121 aus, das vom Aminogruppendonor Isopropylamin (122) eine Aminogruppe übernimmt. (*S*)-123 und Aceton (124) entstehen in über 90% Ausbeute. Mit der gleichen Transaminase können auch die Enantiomere (*R*)- und (*S*)-123 getrennt werden. Dabei wird (*S*)-123 in das Acetophenonederivat 121 umgewandelt. Als Aminogruppenacceptor verwendet man Aldehyde wie Propionaldehyd (125), aus dem Propylamin (126) wird. Mit Ketocarbonsäuren als Aminogruppenacceptoren werden Aminocarbonsäuren erhalten.

Die Technologie von Celgene wurde bereits im 2.5-m<sup>3</sup>-Maßstab durchgeführt. Die Transaminasen akzeptieren viele verschiedene aliphatische oder aromatische Ketone und Amine als Substrate.<sup>[111d]</sup> Ein Nachteil besteht allerdings darin, dass die Reaktion grundsätzlich nur in wässriger Lösung oder in Mischungen aus Wasser und organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden kann. Daher werden mit hydrophoben Substraten in der Regel nur geringe Produktkonzentrationen erzielt. Die Produktmischungen von

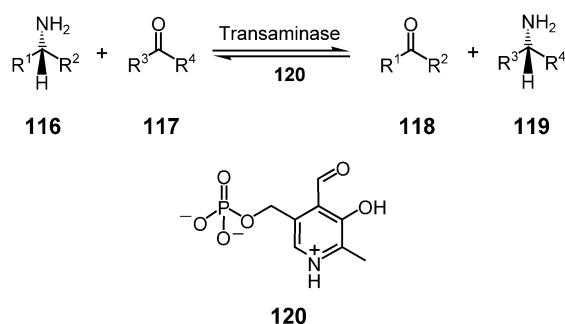
**Schema 45.** Die asymmetrische Hydrierung der Diphenylphosphanylketimine 107 mit einem  $\text{Rh}^1$  / JosiPhos (108)-Katalysator ist der Schlüsselschritt bei der Herstellung der chiralen Amine (*R*)-110.

man über das Enamin 102 das nahezu enantiomerenreine Amid 103. Dabei genügen 0.1 Mol-% des Katalysators!

Die leichte Spaltbarkeit von P-N-Bindungen nutzen Forscher bei Solvias<sup>[107]</sup> und Avecia Ltd.<sup>[108]</sup> in ihren Synthesen von optisch aktiven Aminen. Das Verfahren von Solvias geht von Ketoximen 105 aus, die durch Umsetzung mit Chlordiphenylphosphan (106) leicht in die Diphenylphosphanylketimine 107 überführt werden können (Schema 45).<sup>[109]</sup> Die asymmetrische Hydrierung mit einem  $\text{Rh}^1$  / JosiPhos (108)-Katalysator<sup>[110]</sup> resultiert in der Bildung von optisch aktiven Phosphonsäureamiden 109, aus denen die chiralen Amine (*R*)-110 leicht durch saure Hydrolyse freigesetzt werden können. Unter optimalen Bedingungen genügen 0.2 Mol-%  $\text{Rh}^1$  / 108 als Katalysator, um bei komplettem Umsatz von 107 das Produkt 109 mit >99% ee zu erhalten. Werden *p*-substituierte Acetophenone eingesetzt, so liegen die Enantiomerenüberschüsse deutlich niedriger (30–97% ee).



**Schema 46.** Synthese von enantiomerenreinem (*R*)-1-(1-Naphthyl)ethylamin ((*R*)-83) (Avecia Ltd.).



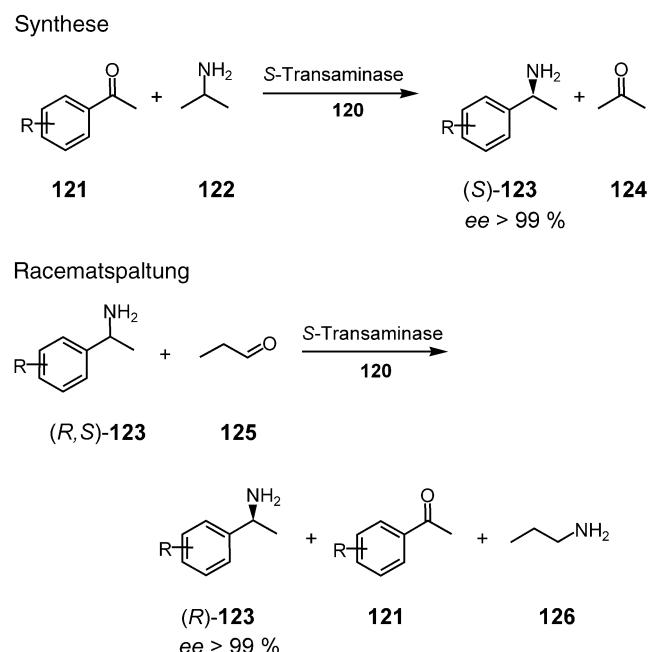
**Schema 47.** Die enantioselektive Transaminierung mit Pyridoxalphosphat (120) als Cofaktor.

Racematspaltungen (Schema 48) können überdies nur durch aufwändige Methoden getrennt werden.

#### 4.2.2. Kinetische Racematspaltungen

Anfang der 90er Jahre wurden bei Shell erste Arbeiten zur enantioselektiven Hydrolyse racemischer Amide durchgeführt.<sup>[112]</sup> So wurde durch enzymvermittelte selektive Hydrolyse von racemischem *N*-1-Phenylethylacetamid ((*R,S*)-127) sowohl optisch reines (*S*)-1-Phenylethylamin ((*S*)-38) als auch – nach langer Reaktionszeit – enantiomerenreines (*R*)-127 hergestellt (Abbildung 49). Die Verwendung von ganzen Zellen erwies sich ebenso als nachteilig wie die langen Reaktionszeiten, die aufgrund der geringen Selektivität für die Gewinnung der enantiomerenreinen *R*-Amide erforderlich sind.

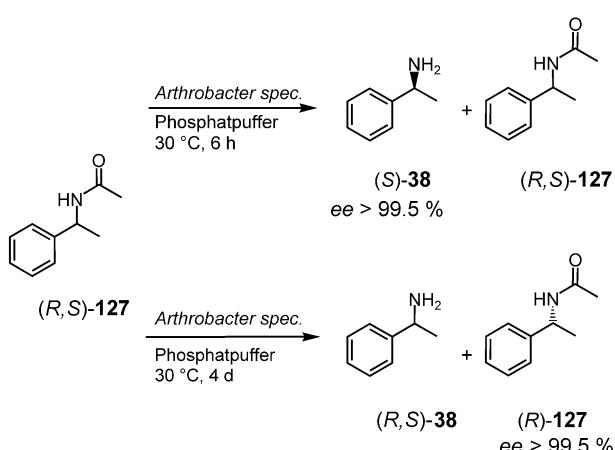
Mitte der 90er Jahre wurden bei Bayer Methoden zur selektiven Hydrolyse von racemischen Acetamiden (*R,S*)-128 von 1-(*p*-Chlorphenyl)ethylamin (82) ausgearbeitet:<sup>[113]</sup> Lipase B aus *Candida antarctica* eignet sich als Katalysator für die selektive Hydrolyse von (*R*)-128 zum Amin (*R*)-82 (Schema 50). Da offenbar nur mit hohen Katalysatorkon-



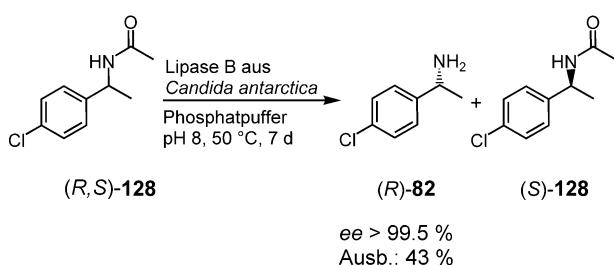
**Schema 48.** Beispiele für *S*-Transaminase-katalysierte asymmetrische Aminogruppenübertragungen (Celgene).

zentrationen befriedigende Raum-Zeit-Ausbeuten erzielt werden können, wird dieser Prozess noch nicht technisch angewendet.

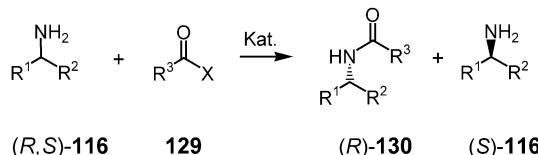
Alternativ kann man die kinetische Racematspaltung von Aminen auch in einem Syntheseschritt realisieren. Hierbei wird das racemische Amin (*R,S*)-116 in Gegenwart eines Katalysators mit einem Acylierungsmittel 129 umgesetzt. (*R*)-116 wird so zu (*R*)-130 acyliert, während (*S*)-116 unverändert als freies Amin vorliegt (Schema 51). Vor zwei Jahren beschrieben Fu et al.<sup>[114]</sup> die ersten kinetischen Racematspaltungen von Aminen mit Oxazolen vom Typ 132 in Gegenwart



**Schema 49.** Enantioselektive Hydrolyse von racemischem *N*-(1-Phenylethyl)acetamid (*(R,S)*-127).



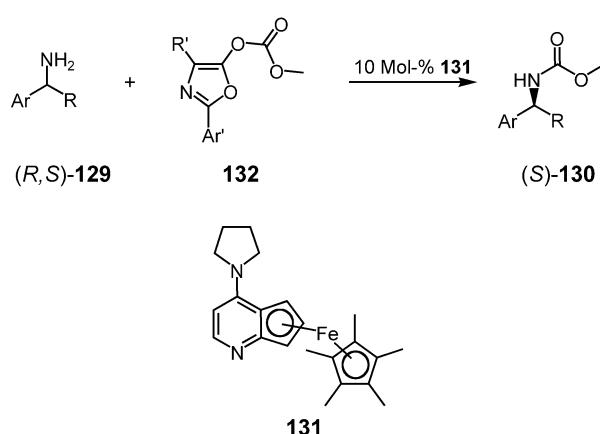
**Schema 50.** Selektive Hydrolyse von *(R,S)*-128 (Bayer).



**Schema 51.**

planar-chiraler DMAP-Derivate wie **131** als Acylierungskatalysatoren (Schema 52). Bei der Amidbildung wurde eine Enantiomerenanreicherung um den Faktor 10–30 erzielt.

Bisher konnten aber die Ergebnisse, die mit vielen Biokatalysatoren erzielt wurden, nicht übertrffen werden (Tabelle 2). So gelingt die selektive Acylierung von *(R)*-1-Phenylethylamin (*R*)-38 nach einem von BASF patentierten Verfahren: In einer Stufe erhält man nahezu enantiomerenreines (*S*)-38 und das entsprechende Amid (*(R)*-130, Schema 53).<sup>[116]</sup> Nach Abtrennung von (*S*)-38 durch Destillation oder Extraktion wird (*R*)-38 durch basische Hydrolyse von *(R)*-130 freigesetzt. In bestimmten Lösungsmittelgemischen gelingt die Hydrolyse in nahezu quantitativer Ausbeute ohne Racemisierung.<sup>[116d,125]</sup> Erstaunlich ist die Substratbandbreite des Verfahrens: Die Enantiomerenentrennung gelingt mit vielen strukturell sehr unterschiedlichen Aminen (Schema 54). Die Substratbreite des Verfahrens, die Möglichkeiten zur Rückführung der unerwünschten Enantiomere durch Racemisierung<sup>[126]</sup> und die Rückgewinnung des Acylierungsmittels<sup>[127]</sup> sind die Hauptvorteile dieses Prozesses.

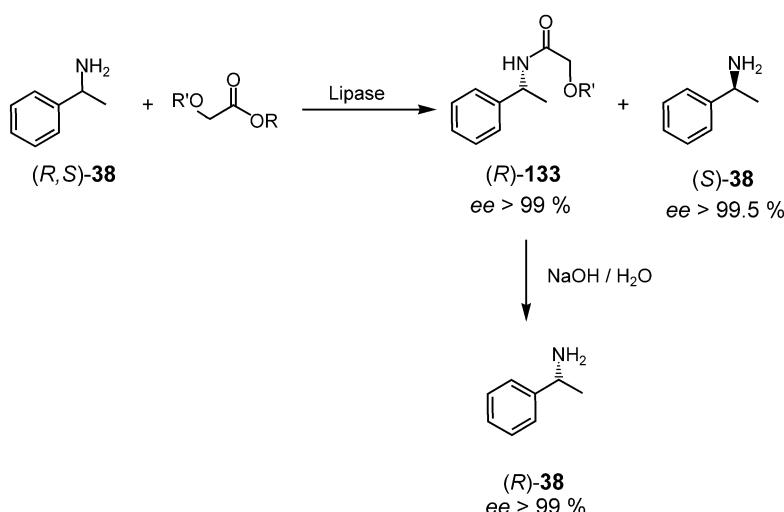


**Schema 52.** Enantioselektive Amidbildung mit dem Ferrocenderivat **131** als Katalysator (Selektivität: 10–30).

Anfang 2002 ging bei der BASF eine maßgeschneiderte cGMP-konforme (cGMP: current Good Manufacturing Practices) Neuanlage in Betrieb, die über 1000 t a<sup>-1</sup> optisch aktive Amine produzieren kann. In einer weiteren Anlage werden nach diesem Verfahren ca. 2500 t a<sup>-1</sup> (*S*)-1-Methoxy-2-propylamin (*(S)*-164) hergestellt (Abschnitt 4.3.2).

**Tabelle 2:** Biokatalysatoren und Acylierungsmittel, die bei kinetischen Racematspaltungen von Aminen eingesetzt wurden.

Biokatalysator	Acylierungsmittel	Lit.	
<i>Subtilisin carlsberg</i>		[115]	
<i>Burkholderia plantarii</i>		[116a]	
<i>Candida antarctica</i> Lipase B		[117]	
		[118]	
		R = C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> R = C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> [119a] [119b]	[119a] [119b]
		[120]	
		X = OCH <sub>3</sub> X = Cl X = CN X = COOR [116c, 121a] [121a] [121a] [121b]	[116c, 121a] [121a] [121a] [121b]
		[122]	
		[123]	
Penicillin-Acylase		[124]	



**Schema 53.** Die Lipase-katalysierte enantioselektive Amidbildung von **(R,S)-38** liefert **(S)-38** und **(R)-133** (Selektivität > 1000). Hydrolyse von **(R)-133** ergibt **(R)-38** (BASF).

noindan-2-ol ((1*S*,2*R*)-**137**) unternommen. Keine chemische<sup>[131]</sup> oder biokatalytische<sup>[132]</sup> asymmetrische Synthese kann sich allerdings in ihrer Wirtschaftlichkeit mit dem klassischen Verfahren messen, in dem *rac*-**137** durch eine elegante Synthesesequenz aus dem Indenoxid **138** gewonnen wird. Im zweiten Schritt erfolgt eine Racematspaltung von *rac*-**137** mit *(R,R)*-**33** (Schema 57). Wichtig ist hierbei die Kristallisation des Tartrats als Hydrat.<sup>[133]</sup> Durch Fällung des Tartrats in Methanol und anschließende Umkristallisation aus Wasser erhält man enantiomerenreines (1*S*,2*R*)-**137**.

#### 4.3.1.2. Reduktion von Aminosäuren

Forscher bei Degussa haben ausgehend vom Chiral Pool einen wichtigen Zugang zu Aminoalkoholen **139** mit primärer

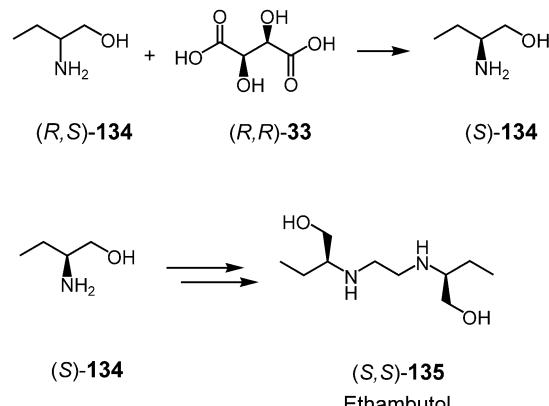
#### 4.3. Herstellung von optisch aktiven Aminoalkoholen

##### 4.3.1. Klassische chemische Verfahren

###### 4.3.1.1. Kristallisation mit optisch aktiven Carbonsäuren

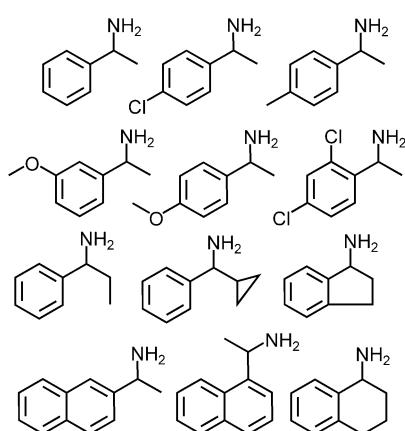
(*S*)-2-Aminobutanol ((*S*)-**134**) ist eine der wichtigsten Aminoalkohol-Zwischenstufen, z.B. für die Synthese des Tuberkulostatikums Ethambutol ((*S,S*)-**135**, Schema 55). Enantiomerenreines (*S*)-**134** für diesen Prozess wird durch Kristallisation mit L-Weinsäure (*L*-**33**) aus dem Racemat gewonnen.<sup>[129]</sup> Ethambutol muss in enantiomerenreiner Form appliziert werden – denn (*R,R*)-**135** führt zur Erblindung!<sup>[128]</sup>

Mit der Entwicklung von Protease-Inhibitoren zur Behandlung von AIDS-Patienten<sup>[130]</sup> setzte Anfang der 90er Jahre eine stürmische Nachfrage nach optisch aktiven Zwischenprodukten ein. So wurden im Zuge der Entwicklung des Wirkstoffs Indinavir (**136**, Schema 56) bei Merck & Co erhebliche Anstrengungen zur Synthese von (1*S*,2*R*)-1-Amino-

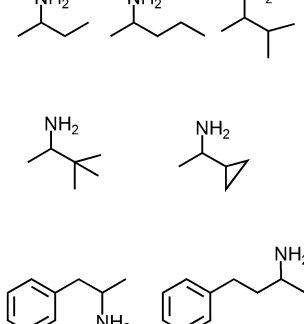


**Schema 55.** Die Synthese des Tuberkulostatikums Ethambutol ((*S,S*)-**135**) verläuft über (*S*)-2-Aminobutanol ((*S*)-**134**).

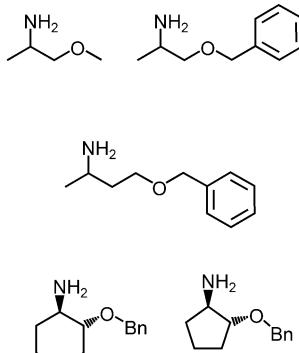
##### Arylalkylamine:



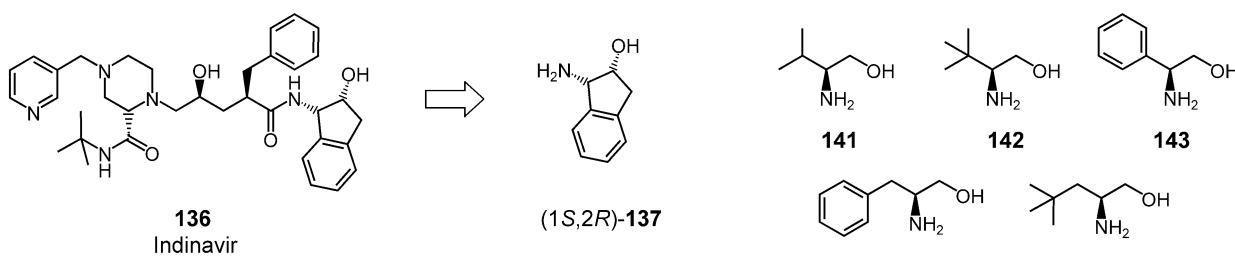
##### Alkylamine:



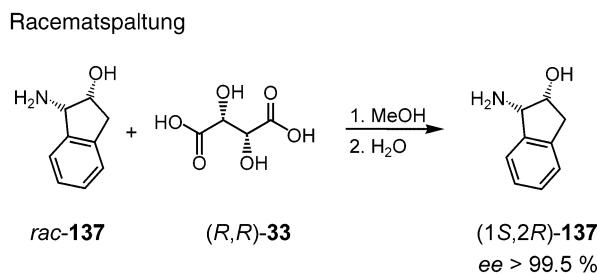
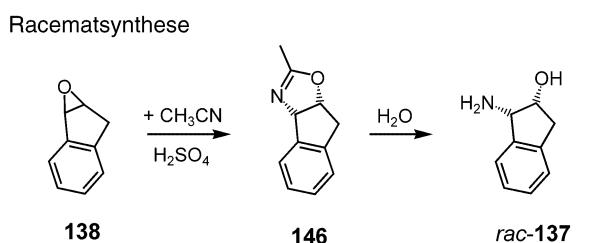
##### Aminoalkohole:



**Schema 54.** Die Enantiomerentrennung vieler Amine gelingt durch den BASF-Prozess (Schema 53). Einige Verbindungen werden im Multitonnen-Maßstab umgesetzt.

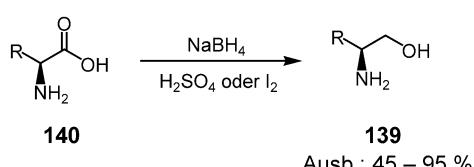


*Schema 56.*



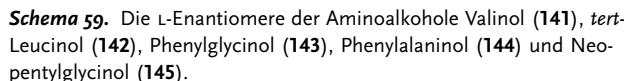
**Schema 57.** Synthese von enantiomerenreinem (1S,2R)-1-Aminoindan-2-ol ((1S,2R)-137), einer Zwischenstufe für die Herstellung des Anti-HIV-Wirkstoffs Indinavir (136, Schema 56) (Merck & Co.).

Hydroxyfunktion erschlossen. Dabei werden die Aminosäuren **L-140** mit  $\text{NaBH}_4$  reduziert. Ein Aktivator ( $\text{I}_2^{[134a]}$  oder  $\text{H}_2\text{SO}_4^{[134b]}$ ) erzeugt dabei aus  $\text{NaBH}_4$  in situ  $\text{B}_2\text{H}_6$  (Schema 58).



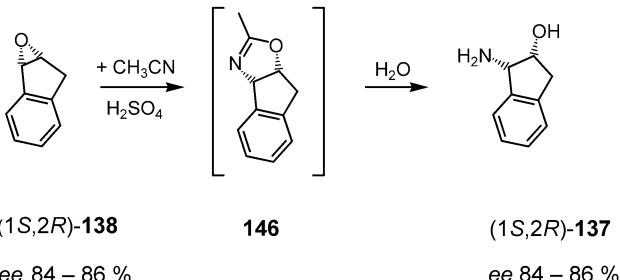
**Schema 58.** Die Reduktion der natürlichen Aminosäuren **L-140** mit  $\text{NaBH}_4$  liefert enantiomerenreine Aminoalkohole **139**.

Bei der Reduktion bleibt die Konfiguration des asymmetrischen Kohlenstoffzentrums erhalten. Die Produkte werden in guten Ausbeuten isoliert. Die L-Enantiomere von Valinol (**141**), *tert*-Leucinol (**142**), Phenylglycinol (**143**), Phenylalaninol (**144**) und Neopentylglycinol (**145**) werden auf diesem Weg im Tonnenmaßstab hergestellt (Schema 59).<sup>[135]</sup>



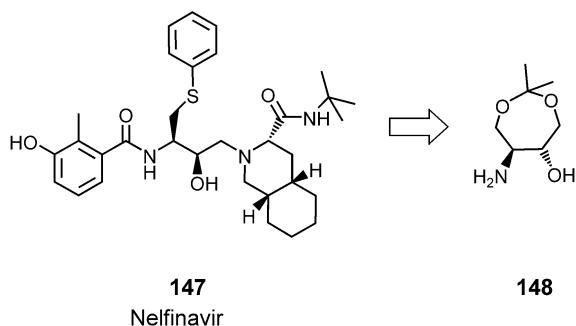
#### 4.3.1.3. Öffnung von Epoxiden

Ein sehr eleganter Zugang zu optisch aktivem 1-Amidonindan-2-ol ((*1S,2R*)-**137**) beruht auf der enantioselektiven Epoxidierung von Inden nach Jacobsen et al. (Schema 80, Abschnitt 6.1.3).<sup>[131a]</sup> So erhält man Indenoxid ((*1S,2R*)-**138**) mit 84–86% *ee*. Die Umsetzung mit Acetonitril ergibt das Oxazolin **146**, dessen Hydrolyse ((*1S,2R*)-**137**) liefert. Durch diese Reaktionssequenz wird der Enantiomerenüberschuss von ((*1S,2R*)-**138**) in das Produkt ((*1S,2R*)-**137**) übertragen (Schema 60). Dieses Produkt kann durch Kristallisation mit Weinsäure gereinigt und bei der Synthese von Indinavir (**136**, Schema 57) eingesetzt werden.<sup>[131a,b]</sup>



**Schema 60.** Durch Jacobsen-Epoxidierung von Inden erhältliches Indenoxid ( $(1S,2R)$ -138) liefert nach Umsetzung mit Acetonitril und anschließende Hydrolyse ( $(1S,2R)$ -137).

Für die Synthese des HIV-Protease-Inhibitors Nelfinavir (**147**) (Agouron, Roche) benötigt man den chiralen Aminoalkohol **148** (Schema 61). Dieses Zwischenprodukt wird ausgehend vom *meso*-Epoxid **149** im technischen Maßstab hergestellt. Bei der Umsetzung mit (*R*)-1-Phenylethylamin ((*R*)-**38**) fallen die diastereomeren Aminoalkohole **150** und **151** ohne chiralen Katalysator in gleichen Mengen an (Schema 62). Das gewünschte Diastereomer **150** kann durch Kristallisation isoliert werden. Nach dem Entfernen der chirale Hilfsgruppe durch Debenzylierung erhält man **148** in 37–40 % Gesamtausbeute (bezogen auf **149**).<sup>[136]</sup> Ein bedeutender Fortschritt war die Zugabe katalytischer Mengen Ti(O*i*Pr)<sub>4</sub> und (*S*)-1,1'-



#### 4.3.2.2. Kinetische Racematspaltungen

Die BASF hat die enzymkatalysierte kinetische Racematspaltung als effektiven Zugang zu optisch aktiven Aminoalkoholen etabliert. Dabei wird die Hydroxyfunktion durch Veretherung geschützt, um unspezifische Nebenreaktionen zu unterdrücken. So liefert die Racematspaltung von *trans*-2-Aminocyclopentanol (**rac-160**) das Amin (*S,S*)-**160** und das Amid (*R,R*)-**161** mit jeweils nur ca. 25 % *ee*. Die Umsetzung des entsprechenden Benzylethers (**rac-162**) verläuft hingegen hoch enantioselektiv: Amin ((*S,S*))-**162** und Amid ((*R,R*))-**163**) werden mit > 99.5 % *ee* bzw. 93 % *ee* erhalten (Schema 64).<sup>[138c,d]</sup> Bei diesem Verfahren können auch die Methylether eingesetzt werden: Beispielsweise wird racemisches (1-Methoxy)-2-propylamin ((*R,S*))-**164**) in die Enantiomere gespalten (Schema 65). Dabei entstehen (*R*)-**165** und (*S*)-1-Methoxy-2-propylamin („S-MOIPA“) (*S*)-**164**, das für die Herstellung des optisch aktiven Mais-Herbizids **166** („Outlook“, BASF) benötigt wird. Zurzeit produziert die BASF bis zu 2500 t a<sup>-1</sup> (*S*)-**164** durch enzymkatalysierte kinetische Racematspaltung.

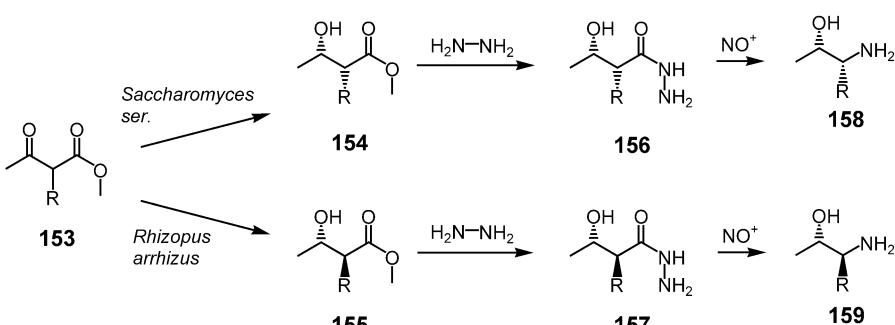
## 5. Herstellung von Alkoholen

## 5.1. Klassische chemische Verfahren

### 5.1.1. Asymmetrische Hydrierungen von Ketonen

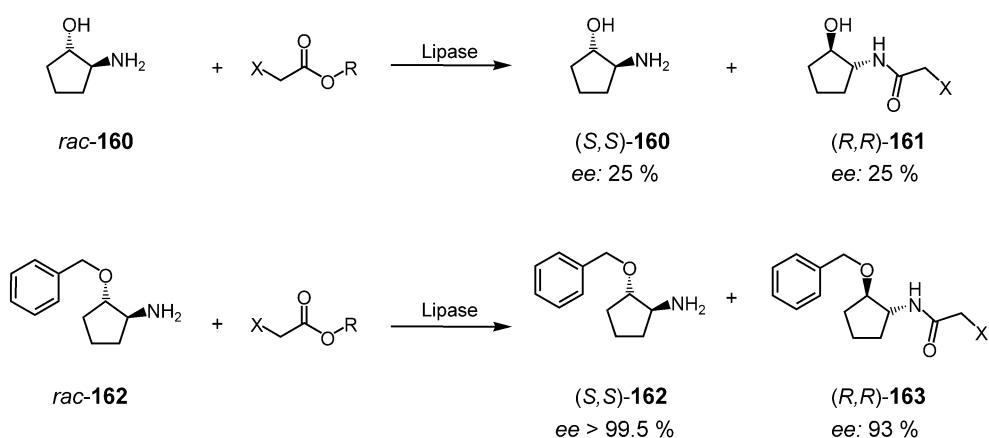
Die asymmetrische Hydrierung von Ketoestern **167** und Ketonen **168** wurde maßgeblich von den Arbeiten von Noyori et al. geprägt.<sup>[139]</sup> Als Katalysatoren dienen

Rutheniumkomplexe von binap<sup>[140]</sup> und Derivaten wie Tol-binap<sup>[141]</sup> oder SegPhos.<sup>[142]</sup> Die technische Entwicklung bis in den Tonnenmaßstab wurde von Takasago Inc. in Japan vorangetrieben. (*R*)-Propandiol **169** ist so mit 94 % ee erhältlich (Schema 66). Auch Vorstufen für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sind auf diesem Weg zugänglich,<sup>[143]</sup> teilweise über dynamische kinetische Racematspaltung. Forscher bei Roche

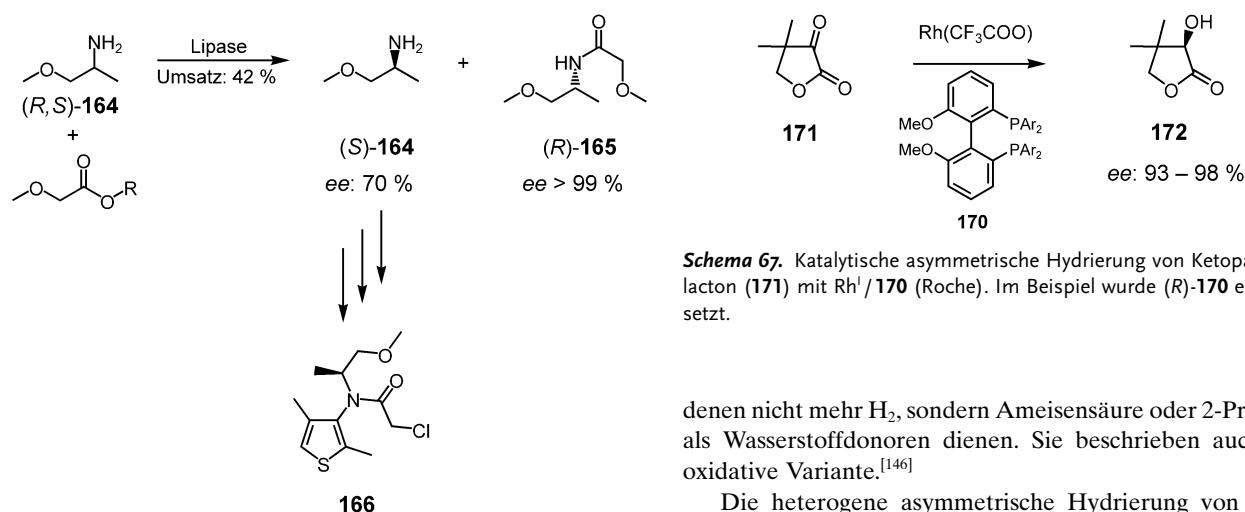


**Schema 63.** Enzymkatalysierte stereoselektive Reduktion der 1,3-Dicarbonylverbindung 153 (Biocatalysis, Inc.)

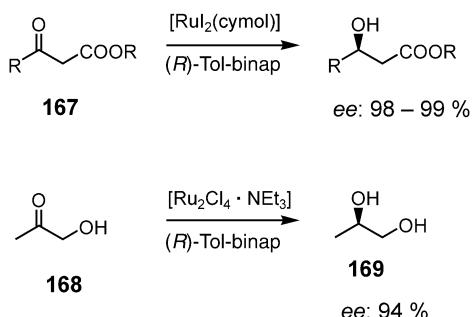
Angew Chem 2004, 116, 806–813



**Schema 64.** Enzymkatalysierte kinetische Racematspaltung von *trans*-2-Aminocyclopentanol (**rac-160**) (BASF).



**Schema 65.** Racematspaltung von (1-Methoxy-2-propyl)amin ((*R,S*)-**164**) liefert (*R*)-**165** und „S-MOIPA“ ((*S*)-**164**), eine Zwischenstufe in der Synthese des chiralen Mais-Herbizids **166** („Outlook“, BASF).



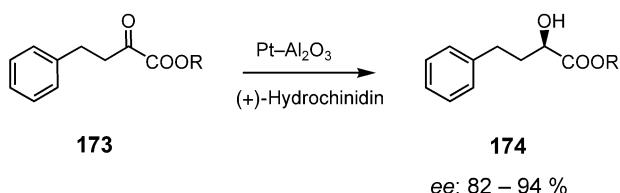
**Schema 66.**  $\text{Ru}^{II}$ /binap-katalysierte asymmetrische Hydrierung von Carbonylverbindungen.

entwickelten die Biphep-Liganden **170**,<sup>[144]</sup> die Umsetzung von Ketopantolacton (**171**) zu (*R*)-Pantolacton (**172**) wurde bereits in einer Pilotanlage durchgeführt (Schema 67).

In neueren Arbeiten berichteten Noyori et al. über leistungsfähige Transferhydrierungs-Katalysatoren,<sup>[145]</sup> bei

denen nicht mehr  $\text{H}_2$ , sondern Ameisensäure oder 2-Propanol als Wasserstoffdonoren dienen. Sie beschrieben auch eine oxidative Variante.<sup>[146]</sup>

Die heterogene asymmetrische Hydrierung von Blaser et al.,<sup>[147]</sup> die eine Vorstufe für ACE-Hemmer liefert, wurde bei Ciba-Geigy im Tonnenmaßstab durchgeführt. Die Hydrierung von **173** zu 4-Phenylhydroxybutyrat (**174**) gelingt mit einem Platin-Katalysator, der mit einem Cinchona-Alkaloid dotiert ist (Schema 68).

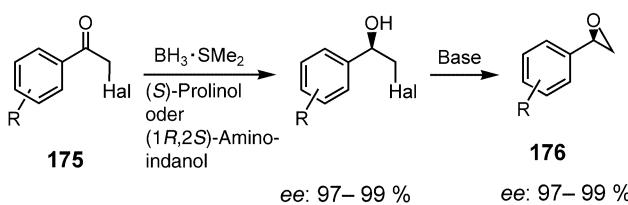


**Schema 68.**

### 5.1.2. CBS-Boranreduktionen

Nach grundlegenden Arbeiten von Itsuno et al.<sup>[148]</sup> entwickelten Corey et al.<sup>[149]</sup> einen leistungsfähigen Katalysator auf der Grundlage von chiral modifiziertem Boran. Als stöchiometrisches Reduktionsmittel werden Addukte von  $\text{BH}_3$  mit THF oder Dimethylsulfid eingesetzt. Die Methode hat eine große Anwendungsbreite und liefert nicht nur mit Arylalkylketonen bei sehr kurzen Reaktionszeiten Produkte

mit hohen Enantiomerenüberschüssen. Die halogenierten Acetophenonderivate **175** können in zwei Stufen hoch enantioselektiv in substituierte Styroloxide **176** umgewandelt werden (Schema 69).

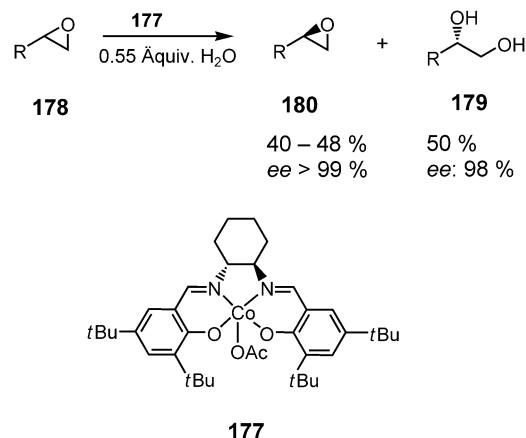


**Schema 69.** CBS-Boranreduktionen von halogenierten Acetophenon-derivaten 175.

Beide Enantiomere des Diphenylprolinol-Auxiliars sind verfügbar; sie können extraktiv zurückgewonnen und mehrmals verwendet werden. Die aufwändige Handhabung von größeren Boranaddukt-Mengen ist ein Nachteil des Verfahrens, der allerdings durch In-situ-Erzeugung von Boran aus Natriumborhydrid und Trimethylchlorsilan<sup>[150]</sup> oder Lewis-Säuren umgangen werden kann. Chemiker von Merck, USA, und Sipsy haben industrielle Anwendungen dieses Prozesses beschrieben.<sup>[151, 152]</sup> Kommerzielle Boranaddukte sind häufig mit Natriumborhydrid stabilisiert; dies kann die Enantioselektivität der Reaktion stark beeinflussen.<sup>[153]</sup> Ein Aufsatz von Deloux und Srebnik gibt einen umfassenden Überblick über borankatalysierte Reaktionen.<sup>[154]</sup>

### 5.1.3. Kinetische Racematspaltung durch Epoxidhydrolyse

Jacobsen et al. entwickelten den (Salen)cobalt-Komplex [(R,R)-(salen)CoOAc] (**177**) als Katalysator für die enantioselektive Hydrolyse racemischer Epoxide **178**.<sup>[155]</sup> Bei der Öffnung der Epoxidringe entstehen die S-Diole **179** mit hervorragenden Selektivitäten, und auch die nicht hydrolysierten R-Epoxide **180** werden hoch enantiomerenrein isoliert (Schema 70, siehe auch Abschnitt 6.1.4).



**Schema 70.** Enantioselektive Hydrolyse der racemischen Epoxide **178** mit dem (Salen)cobalt-Komplex  $(R,R)\text{-}[(\text{salen})\text{CoOAc}]$  (**177**) als Katalysator.

Die Epoxidringer können nicht nur durch Wasser, sondern auch durch Phenolderivate<sup>[156]</sup> als Nucleophile mit hohen Selektivitäten geöffnet werden. Die resultierenden 1-Phenoxy-2-alkanole sind Zwischenstufen für die Synthese von  $\beta$ -Blockern.<sup>[157]</sup>

#### 5.1.4. Verschiedene Methoden

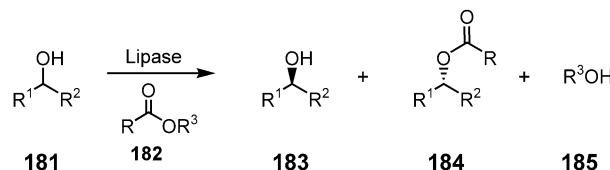
#### 5.1.4.1. Kinetische Racematspaltung von Alkoholen mit organischen Katalysatoren

Diese Verfahren wurden bereits in Übersichtsartikeln von Dalko et al.<sup>[158]</sup> und Jacobsen et al.<sup>[196]</sup> diskutiert, die eine hervorragende Übersicht über verschiedene neuere Entwicklungen wie chirale Ferrocenderivate als Katalysatoren für nucleophile Acylierungen, kinetische Racematspaltungen, Racematspaltungen durch peptidische Enzymmimetika und kinetische Acylierungen geben. Eine industrielle Anwendung dieser Reaktionen ist derzeit noch nicht bekannt.

## 5.2. Biotechnologische Verfahren

### 5.2.1. Enzymkatalysierte Racematspaltung

Enzymatische Acylierungen zur Racematspaltung von Alkoholen sind schon Anfang der 80er Jahre entwickelt worden (Schema 71).<sup>[159]</sup> Racemische Alkohole **181** werden

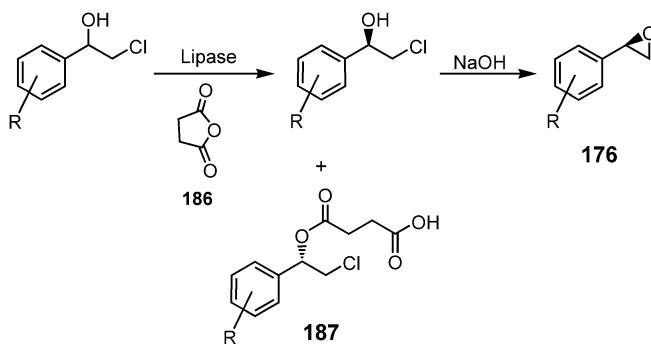


**Schema 71.** Racematspaltung von chiralen Alkoholen durch enzymatische Acylierung.

mit einem Acylierungsmittel **182** unter Enzymkatalyse umgesetzt: Ein Enantiomer (**183**) bleibt unverändert, während das zweite Enantiomer zu **184** verestert wird. Als Biokatalysatoren werden hauptsächlich bakterielle und pilzliche Lipasen eingesetzt. Auch Esterasen spielen eine Rolle. Die erstaunliche Stabilität von Enzymen in organischen Lösungsmitteln nutzte eine Reihe von Arbeitsgruppen, da diese Medien gegenüber wässrigen Lösungen einige Vorteile bieten, z.B. höhere Substratkonzentrationen und eine einfachere Aufarbeitung. Auch die Abtrennung des Enzyms sowie die Entwicklung eines industriell interessanten kontinuierlichen Verfahrens lassen sich so leichter realisieren.

In der Regel werden enzymatische Racematspaltungen irreversibel geführt, z. B. mit einem Vinylester als Acylierungsmittel.<sup>[160]</sup> Bei der Transacylierung entsteht Vinylalkohol, der rasch und irreversibel zum Acetaldehyd tautomerisiert; so wird das Gleichgewicht zugunsten der Produkte verschoben. Manche Lipasen sind empfindlich gegen Acetaldehyd, der mit primären Aminogruppen Schiff-Basen bildet. Bei einer mildereren Variante mit Propenylestern wird nach der Veresterung Aceton abspalten.<sup>[161]</sup> Auch Bernsteinsäureanhydrid (**186**) oder Diketen eignen sich als Acylierungsmittel.

Das unveränderte Enantiomer und das acylierte Enantiomer **187** werden destillativ getrennt oder, bei Veresterungen mit **186**, durch Säure-Base-Extraktion isoliert (Schema 72). Die BASF hat ein entsprechendes Verfahren im Technikumsmaßstab für die Synthese der Styroloxide **176** entwickelt.



**Schema 72.** Die enzymatische Acylierung von halogenierten Acetophenon-Abkömmlingen kann zur enantioselektiven Synthese von Styroloxiden **176** genutzt werden (vgl. Schema 69).

Im Allgemeinen können hohe Selektivitäten erzielt werden, jedoch haben auch Enzyme bei sterisch nur wenig differenzierten Substraten wie 2-Butanol ihre Schwächen. Abgesehen von einer hohen Selektivität ist auch eine möglichst hohe Aktivität wichtig, um bei industriellen Anwendungen gute Raum-Zeit-Ausbeuten zu erzielen. Diese und andere Eigenschaften wie Solvenstoleranz, Substratbreite und Temperaturspektrum können mittlerweile durch Enzym-Engineering<sup>[162]</sup> erstaunlich gezielt verbessert werden. Durch moderne gentechnische Methoden gelingt es, mehrere tausend Mutanten pro Tag zu erzeugen. Um diese Vielzahl von Enzymvarianten in kürzester Zeit durchzumustern, müssen nun ausgefeilte Screeningsysteme entwickelt werden.<sup>[163]</sup>

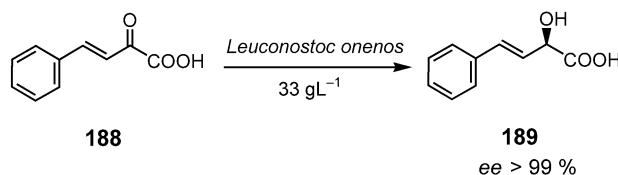
Im Regelfall wird nur ein Enantiomer eines spezifischen Wirkstoffzwischenprodukts benötigt – unter ökonomischen und ökologischen Aspekten sollte also das unerwünschte Enantiomer zurückgeführt werden, beispielsweise durch Oxidation/Reduktion oder katalytische Dehydrierung/Hydrierung. Neuere Arbeiten von Park et al.,<sup>[164]</sup> Bäckvall et al.,<sup>[165]</sup> Williams et al.<sup>[166]</sup> und anderen beschäftigen sich mit der dynamischen kinetischen Racematspaltung, bei der das nichtacylierte Enantiomer durch Übergangsmetallkatalysierte Meerwein-Ponndorf-Verley-Reduktion oder Oppenauer-Oxidation *in situ* racemisiert wird. Erstaunlich ist die Resistenz mancher Lipasen gegenüber diesen harschen Bedingungen: Auch bis zu 10 Mol-% KOTBu oder KOH und Temperaturen bis 70°C werden toleriert. Diese Verfahren werden bislang noch nicht industriell angewendet.

## 5.2.2. Fermentative Verfahren

Mikrobielle Umsetzungen mit Hefen gehören zu den ältesten chemischen Verfahren überhaupt. Bereits 1874 erkannte Dumas die reduzierende Wirkung einer *Saccharo-*

*myces*-Spezies.<sup>[167]</sup> Csuk und Gläntzer geben eine umfassende Übersicht,<sup>[168]</sup> industriell interessante Biotransformationen wurden von Liese, Seelbach und Wandrey beschrieben.<sup>[169]</sup>

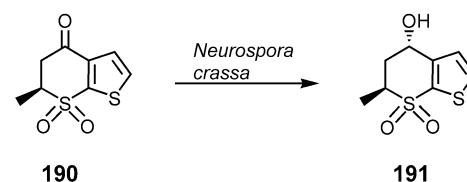
Bei fermentativen Verfahren zur Herstellung optisch aktiver Alkohole werden hauptsächlich bakterielle Dehydrogenasen in lebenden Zellen eingesetzt. Ein Beispiel dafür ist ein Verfahren von Daicel: Die Reduktion der  $\alpha$ -Ketocarbonsäure **188** liefert die Hydroxycarbonsäure **189**, ein Zwischenprodukt für die Synthese von ACE-Hemmern (Schema 73).



**Schema 73.** Reduktion der  $\alpha$ -Ketocarbonsäure **188** durch eine Dehydrogenase (Daicel).

Ein interessanter Vergleich von chemischen und biokatalytischen Methoden zur Herstellung von (*R*)-4-Phenyl-2-hydroxybuttersäure, einem Schlüsselintermediat für ACE-Inhibitoren, findet sich bei Blaser et al.<sup>[170]</sup> Hage et al.<sup>[171]</sup> geben einen ausführlicheren Vergleich von chemischen und biokatalytischen Reduktionen. Hier zeigt sich, dass es keinen Königsweg gibt, sondern dass je nach Substrat die eine oder andere Methode besser geeignet ist. In der Praxis spielen wirtschaftliche und rechtliche Aspekte eine maßgebliche Rolle.

Die Reduktion von Ketosulfon **190** zum entsprechenden Alkohol **191** ist der Schlüsselschritt bei der Synthese von Trusopt, einem Glaucom-Therapeutikum (Schema 74). Diese Reaktion wird im Tonnenmaßstab durchgeführt;<sup>[172]</sup> man erhält **191** mit >98% ee.

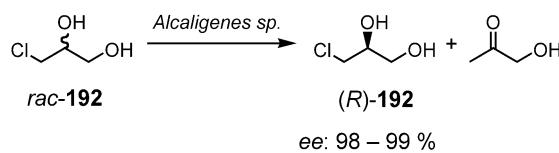


**Schema 74.**

Eine fermentative Methode ist nur dann ökonomisch, wenn hohe Substratkonzentrationen (>30 g L<sup>-1</sup>) erreicht werden können und eine leichte Trennung des Produkts von der Biomasse möglich ist. Die Vorteile liegen in der üblicherweise hohen Selektivität und dem einfachen Upscaling (industriell sind Fermentationen problemlos im 100-Kubikmeter-Maßstab durchführbar). Zudem stehen organische Nährstoffe wie Melasse oder Rübensirup für das Wachstum der Organismen in großen Mengen kostengünstig zur Verfügung.

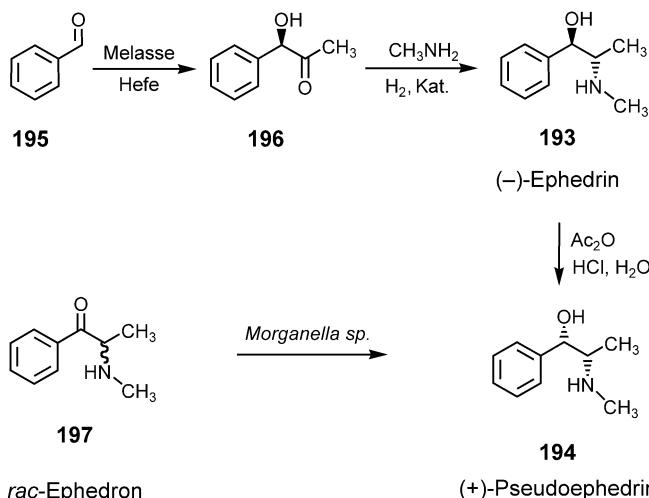
Auch einige Reduktionen mit isolierten Dehydrogenasen wurden beschrieben.<sup>[173]</sup> Üblicherweise erfordern diese Reak-

tionen jedoch kostspielige Cofaktoren wie NAD oder FAD. Daher sind nur solche Verfahren wirtschaftlich, bei denen der Cofaktor *in situ* regeneriert wird.<sup>[174]</sup> Auch dehalogenierende Stämme wie *Alcaligenes* oder *Pseudomonas*-Stämme werden zur Synthese von Zwischenstufen eingesetzt.<sup>[175]</sup> Diese Technologie nutzte Daiso (Japan) für die Synthese eines Portfolios enantiomerenreiner C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Bausteine **192** (Schema 75, siehe auch Abschnitt 6.2.1). Durch moderne gentechnische Methoden können viele Eigenschaften der Stämme gezielt verbessert werden.



Schema 75. Selektive Dehalogenierung von **rac-192** (Daiso).

Die Herstellung der Sympathomimetika Ephedrin (**193**) und Pseudoephedrin (**194**) kombinierte als eines der ersten Verfahren biotechnologische und chemische Syntheseschritte (Schema 76). Bereits um 1920 wurde entdeckt, dass gärende



Schema 76. Herstellung der Sympathomimetika Ephedrin (**193**) und Pseudoephedrin (**194**) und eine alternative biokatalytische Synthese von **194** durch dynamische kinetische Racematspaltung von Ephedron (**197**) (Fuji).

Hefe die stereoselektive Acyloin-Kondensation von Benzaldehyd (**195**) und endogenem Acetaldehyd zu (1*R*)-1-Hydroxy-1-phenylpropanon (**196**) katalysiert.<sup>[176]</sup> Bei Knoll wurde ein Zugang zu **193** und **194** durch reduktive Methylaminierung von **196** etabliert;<sup>[177]</sup> nach diesem Verfahren wird noch heute der Großteil synthetischer Ephedrinderivate gewonnen (Weltmarkt 1997: > 50 Millionen €).

Eine neuere Arbeit von Forschern bei Fuji Chemical Industries zeigt eine alternative biokatalytische Syntheseroute (Schema 76).<sup>[178]</sup> Chemisch hergestelltes *rac*-2-Methylamino-1-phenylpropanon (**197**, Ephedron) wird von verschie-

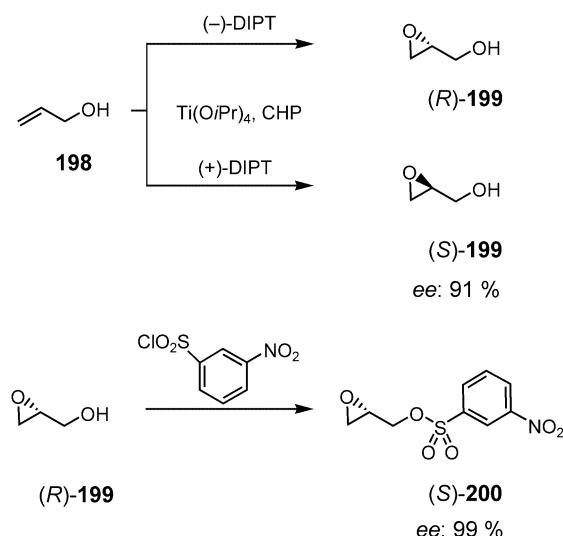
denen Mikroorganismen enantioselektiv zu **194** reduziert. Das nicht reagierende Enantiomer racemisiert bei dieser dynamischen kinetischen Racematspaltung *in situ*.

## 6. Herstellung von Epoxiden

### 6.1. Chemische Verfahren

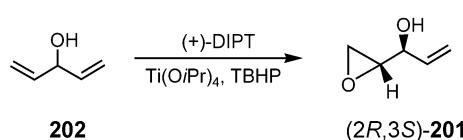
#### 6.1.1. Asymmetrische Sharpless-Epoxidierung

Eine Methode zur direkten Epoxidierung von primären Allylalkoholen ist die Sharpless-Epoxidierung, bei der stöchiometrische Mengen Ti(O*i*Pr)<sub>4</sub> und ein enantiomerenreines Dialkytartrat in Gegenwart eines Sauerstoffatomdonors wie Cumolhydroperoxid (CHP) oder *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP), eingesetzt werden.<sup>[179]</sup> Dieser Methode gelang 1986 der Durchbruch für den industriellen Einsatz, als sich zeigte, dass bei Zugabe von Molekularsieb zur Reaktionsmischung nur 5–10 Mol-% des Titanatrat-Komplexes als Katalysator benötigt werden.<sup>[180]</sup> Die Oxidation von Allylalkohol (**198**) zu (*R*)- und (*S*)-Glycidol (**199**) war die erste Sharpless-Epoxidierung, die im technischen Maßstab durchgeführt wurde (Arco Chemicals, Schema 77).<sup>[181]</sup> Mit CHP als Sauerstoff-



Schema 77. Industrielle Anwendung der Sharpless-Epoxidierung (CHP = Cumolhydroperoxid, DIPT = Diisopropyltartrat).

atomdonor wurden dabei Enantiomerenüberschüsse von 91% ee erzielt.<sup>[182]</sup> Durch die In-situ-Derivatisierung des wasserlöslichen und labilen Glycidols, z.B. als *m*-Nitrobenzolsulfonat (**200**), wird die Isolierung des Produkts erheblich erleichtert. Nach einer Kristallisation erhält man **200** mit > 99% ee.<sup>[183]</sup> PPG-Sipsy hat die Anwendung der asymmetrischen Sharpless-Epoxidierung von Arco Chemical für die Produktion von **199** lizenziert.<sup>[184]</sup> Enantiomerenreines **199** und **200** werden als Zwischenstufen bei den Synthesen von Cidofovir und Indinavir (**136**) eingesetzt.<sup>[185]</sup> (2*S*,3*R*)-1,2-Epoxy-4-penten-3-ol (**201**), eine Zwischenstufe einer Synthese des Immunosuppressors FK-506 (Tacrolimus), kann durch Sharpless-Epoxidierung von Divinylmethanol (**202**) hergestellt werden (Schema 78).<sup>[186]</sup>

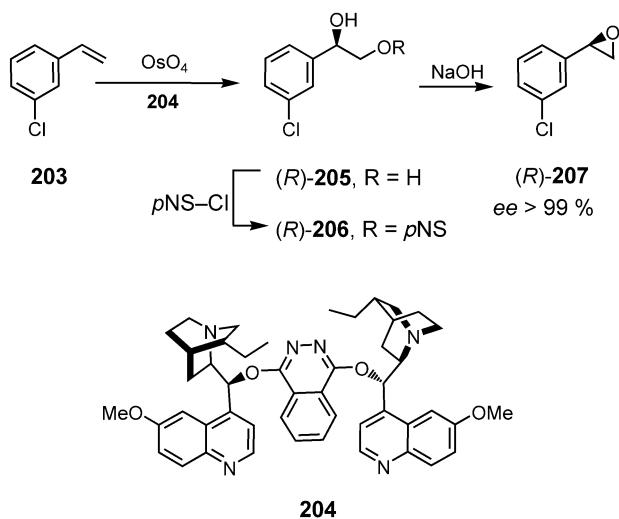


Schema 78.

### 6.1.2. Asymmetrische Sharpless-Dihydroxylierung

Ein weiterer Zugang zu chiralen Epoxiden führt über optisch aktive Diole, die sich zu den entsprechenden Oxiranen umsetzen lassen. Sharpless et al. entwickelten 1987 ein katalytisches Verfahren zur Herstellung von chiralen vicinalen Diolen, bei dem katalytische Mengen eines chiralen tertiären Aminliganden (z.B. Dihydrochinin) und  $\text{OsO}_4$  zur Oxidation des Olefins eingesetzt werden. Ein stöchiometrisches Oxidationsmittel, üblicherweise ein Amin-N-Oxid oder  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , sorgt für die Rückoxidation des Osmiumkomplexes.<sup>[187]</sup>

Bei der Herstellung von *(R)*-*m*-Chlorstyroloxid im 100- bis 4000-Liter-Maßstab (Rhodia ChiRex) wird zunächst *m*-Chlorstyrol (**203**) in Gegenwart des Phthalazindichinolin-Liganden  $(DHQD)_2PHAL$  (**204**) mit  $Os_4$  zum Diol **205** hydroxyliert, das über das primäre Nitrobenzolsulfonat **206** in *(R)*-*m*-Chlorstyroloxid (**207**, > 99 % ee) überführt wird (Schema 79).<sup>[188]</sup> *cis*-Diole können auch mit Trimethoxyethan und Essigsäurebromid unter Retention der Konfiguration zu optisch aktiven Epoxiden umgesetzt werden.<sup>[189]</sup>



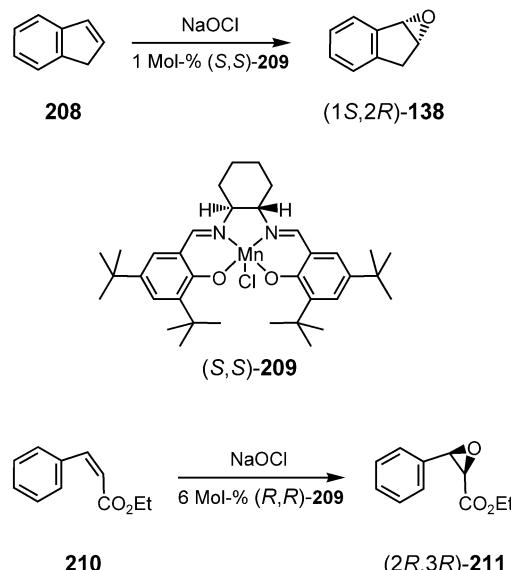
**Schema 79.** (R)-m-Chlorstyroloid (207) wird industriell durch Sharpless-Dihydroxylierung von 203 und anschließenden Ringschluss erhalten (Rhodia ChiRex). *p*NS = *p*-Nitrophenylsulfonyl.

Zur Vermeidung von Abfallströmen, die beim stöchiometrischen Einsatz von  $K_3[Fe(CN)_6]$  auftreten, wurde bei Separcor und ChiRex eine elektrokatalytische Variante der asymmetrischen Sharpless-Dihydroxylierung entwickelt.<sup>[190]</sup> Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass die  $OsO_4$ -katalysierte Dihydroxylierung bei pH 10.4–12 auch mit  $O_2$  als stöchiomet-

rischem Oxidationsmittel durchführbar ist.<sup>[191]</sup> Damit eröffnen sich auch neue Perspektiven für die industrielle Synthese chiraler Diole und Epoxide.

### 6.1.3. Asymmetrische Jacobsen-Epoxidierung

Die asymmetrische Jacobsen-Epoxidierung basiert auf einem (Salen)mangan(III)-Komplex als Präkatalysator; als stöchiometrisches Oxidationsmittel wird Hypochlorit eingesetzt.<sup>[192]</sup> Umsetzungen von *cis*-Olefinen mit 1 Mol-% Katalysator liefern Epoxide mit > 98 % *ee*; Jacobsen-Epoxidierungen von *trans*- oder tetrasubstituierten sowie terminalen Olefinen ergeben geringere Ausbeuten und *ee*-Werte. Die exklusiven Rechte an dieser Technologie liegen bei der Firma ChiRex, die Jacobsen-Epoxidierungen im Multitonnen-Maßstab durchführt. Als Beispiel ist die Epoxidierung von Inden (**208**) zu (1*S*,2*R*)-Indenoxid (**138**) mit katalytischen Mengen von (*S,S*)-(Salen)mangan(III)-Komplex **209** angeführt (Schema 80). **138** ist eine Zwischenstufe zu HIV-Protease-Inhibitoren wie Indinavir (**136**) von Merck (Abschnitt 4.3.1.1).<sup>[186, 193]</sup>



**Schema 8o.** Jacobsen-Epoxidierungen: Als Katalysatoren dienen der  $(S,S)$ -(Salen)mangan(II)-Komplex  $(S,S)\text{-209}$  bzw. sein  $(R,R)$ -Enantiomer (nicht abgebildet).

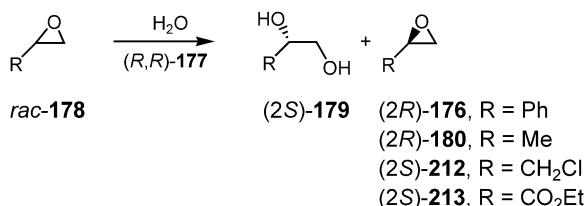
Ein weiteres Beispiel ist die Epoxidierung von Zimtsäure-ethylester (**210**) in 56% Ausbeute zu *cis*-Ethyl-3-phenylglycidat (**211**, 95–97% ee), einer Zwischenstufe bei der Synthese von Paclitaxel und Docetaxel (Schema 80).<sup>[194]</sup>

Der Ligand für den chiralen Katalysator **209** wird aus 1,2-Diaminocyclohexan und 2,4-Di-*tert*-butylphenol im 100-kg-Maßstab hergestellt.<sup>[195]</sup>

#### 6.1.4. Hydrolytische kinetische Racematspaltung nach Jacobsen

Jacobsen et al. entwickelten 1996 ein Verfahren zur Racematspaltung von Epoxiden durch enantioselektive nucleophile Hydrolyse eines Enantiomers (siehe

Abschnitt 5.1.3, Schema 70). Mit dem (Salen)cobalt(III)-Katalysator **177** werden Enantioselektivitäten > 99 % und Ausbeuten von 40–48 % erzielt (Schema 81); das entspricht einer Selektivität von  $E = 500$ . Die Reaktion eignet sich besonders gut für terminale Epoxide<sup>[196]</sup> und wurde u. a. bei Rhodia ChiRex<sup>[197]</sup> für die Racematspaltung von Styroloxid (**176**), Propylenoxid (**180**), Epichlorhydrin (**212**) und 2,3-Epoxyacrylsäureethylester (**213**) in den Tonnenmaßstab entwickelt.<sup>[198]</sup>



Schema 81. Selektive Hydrolyse eines Enantiomers von Epoxid **178** mit dem (Salen)cobalt(III)-Katalysator **177** (Schema 70).

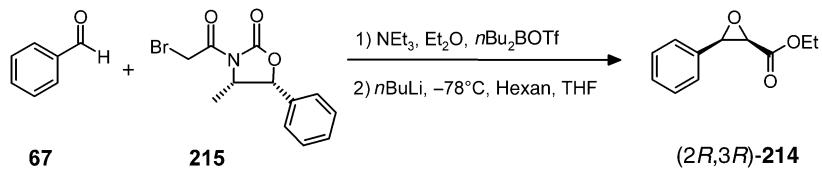
Die Epoxidöffnung verläuft nach einer Kinetik zweiter Ordnung bezüglich des Katalysators. Daher nimmt man an, dass ein Metallzentrum das Epoxid als Lewis-Säure aktiviert, während ein weiteres Metallzentrum das Gegenion des Nucleophils bildet. Erwartungsgemäß zeigen oligomere (Salen)cobalt(III)-Komplexe noch höhere Reaktivitäten und Selektivitäten als einkernige Komplexe wie **177**.<sup>[199]</sup>

Forscher bei Synetix entwickeln einen Jacobsen-Katalysator, in dem der Salenkomplex an einem Zeolithträger immobilisiert ist. Dadurch sollen die Abtrennung und Wiederverwendung des Katalysator erleichtert und die Kontamination des Produkts verringert werden.<sup>[200]</sup> Die Firma Daiso, die Epichlorhydrin (**212**), Glycidol (**199**) und chirale Vorstufen durch mikrobielle Racematspaltung herstellt, gab kürzlich den Wechsel zur Jacobsen-Technologie bei der Epichlorhydrinherstellung bekannt. Die Lizenz wurde von der Firma ChiRex erworben, die auch den Katalysator liefert. Die Produktionskapazität soll 2004 auf 50 t a<sup>-1</sup> erweitert werden.<sup>[201]</sup>

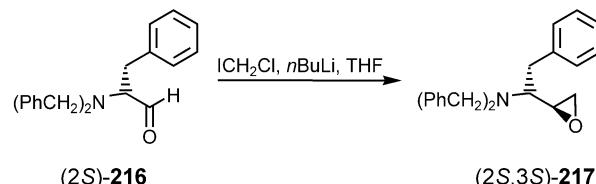
#### 6.1.5. Andere Methoden

Ein weiterer Zugang zu chiralen Epoxiden führt über optisch aktive  $\alpha$ -Halogenalkohole, die durch eine enantioselektive Darzens-Reaktion hergestellt werden.<sup>[202]</sup> Bei der Synthese des  $\alpha,\beta$ -Epoxycarbonsäureesters **214**, einer Zwischenstufe der Docetaxel-Synthese, wurde das Enolat des *N*-( $\alpha$ -Bromacetyl)oxazolidinons **215** in einer Aldolkondensation an Benzaldehyd (**67**) addiert (Schema 82).<sup>[203]</sup> Dabei entsteht ein Bromhydrin, das zum Epoxid **214** cyclisiert.

Ein weiteres Beispiel ist die Addition von *in situ* generiertem Chlormethylolithium an den chiralen  $\alpha$ -Aminoaldehyd **216** (Schema 83). Das (2S,3S)-Epoxid **217** wird nach Säulenchromatographie in einer Ausbeute von 65 % mit 70 % d. e. isoliert.



Schema 82.



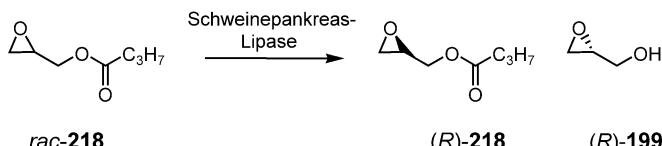
Schema 83.

#### 6.2. Biotechnologische Verfahren

##### 6.2.1. Racematspaltung

###### 6.2.1.1. Lipasen

Durch Schweinepankreas-Lipase-katalysierte Hydrolyse von racemischem Glycidylbutyrat (**218**) gelang Whitesides und Ladner die Herstellung von (*R*)-**218** mit 89 % der theoretisch erreichbaren Ausbeute und 92 % ee (Schema 84).<sup>[204]</sup> Dieses Verfahren wurde von Andeno-DSM weiterentwickelt und zur Produktion von (*R*)-**218** und (*R*)-Glycidol ((*R*)-**199**) im Multitonnen-Maßstab eingesetzt.<sup>[205]</sup>

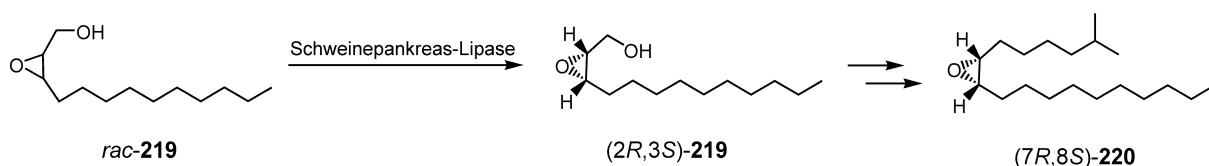


Schema 84. Herstellung von (*R*)-**218** durch Schweinepankreas-Lipase-katalysierte Hydrolyse (Andeno-DSM).

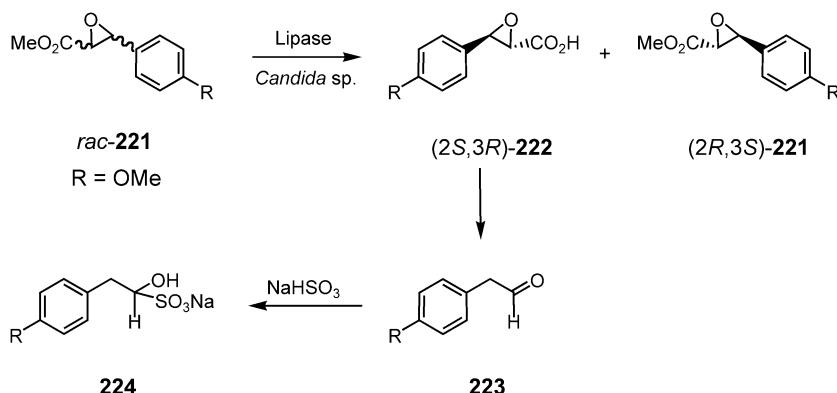
Bei der kinetischen Racematspaltung von **219** mit Schweinepankreas-Lipase F und Essigsäureanhydrid wird das (2S,3R)-Enantiomer vorrangig acyliert. Unverändertes (2R,3S)-**219** konnte in 27 % Ausbeute und 99 % ee isoliert werden (Schema 85).<sup>[206]</sup> Dieses Zwischenprodukt kann bei der Synthese des Motten-Pheromons Disparlur ((7R,8S)-**220**) eingesetzt werden.

Die BASF nutzt zur Herstellung von Styroloxiden die Racematspaltung der entsprechenden Styrolchlorhydrine mit einer Lipase (siehe Abschnitt 5.2.1; Schema 72).

Aus dem racemischen Epoxycarbonsäureester **221** kann (2R,3S)-**221** erhalten werden, indem man das nicht gewünschte Enantiomer mit einer Lipase aus *Candida* sp. verseift (Schema 86). Die Carbonsäure **222** zersetzt sich dabei zu CO<sub>2</sub> und dem Aldehyd **223**, der die Lipase stark inhibiert. Daher wird **223** in das Bisulfitaddukt **224** überführt und abgetrennt.<sup>[207]</sup> Die Firma Tanabe hat 1993 einen Hohlfaser-



**Schema 85.** Das Epoxid (2R,3S)-219 ist ein Zwischenprodukt der Synthese von Disparlur ((7R,8S)-220).

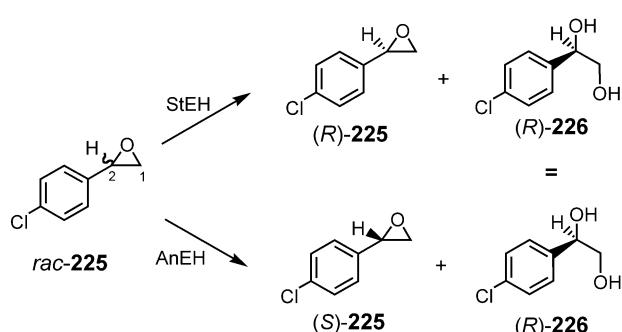


**Schema 86.** Die enantioselektive Verseifung des Epoxycarbonsäureesters 221 ergibt (2R,3S)-221.

reaktor zur Herstellung von (2R,3S)-221 mit einer immobilisierten Lipase aus *Serratina marescens* in Betrieb genommen.<sup>[208]</sup> (2R,3S)-221 wird als Zwischenprodukt bei der Synthese des Calcium-Antagonisten Diltiazem eingesetzt.<sup>[209]</sup>

### 6.2.1.2. Epoxid-Hydrolasen

Archelas et al. gelang die Herstellung beider Enantiomere von *p*-Chlorstyroloxid (225) aus dem Racemat durch Epoxid-Hydrolasen aus *Aspergillus niger* (AnEH) und *Solanum tuberosum* (StEH) (Schema 87). AnEH katalysiert die Epoxidöffnung von (R)-225 durch Angriff eines Wassermoleküls an der C-1-Position zum Diol (R)-226 unter Retention der Konfiguration; das S-Epoxid bleibt unverändert. Mit StEH wird dagegen (S)-225 durch Angriff an der C-2-Position und Inversion der Konfiguration zu (R)-226 hydrolysiert,

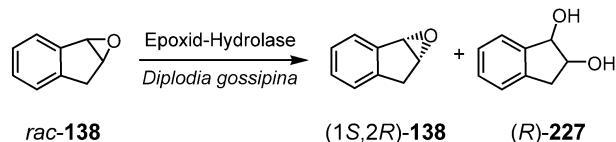


**Schema 87.** Enantiomerenreines (R)- und (S)-*p*-Chlorstyroloxid ((R)- bzw. (S)-225) sind gezielt durch enzymkatalysierte Epoxidöffnung zugänglich. Mit beiden Enzymen erhält man (R)-226 als Nebenprodukt.

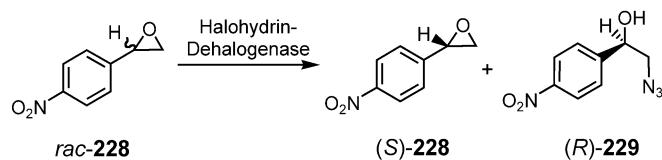
wobei (R)-225 isoliert werden konnte. Damit schufen Archelas et al. nicht nur einen Zugang zu enantiomerenreinem (R)- und (S)-*p*-Chlorstyroloxid, sondern auch eine enantioselektive Synthese für (R)-226 mit beiden Enzymen: Ausgehend von racemischem *p*-Chlorstyroloxid erhält man die Zwischenstufe einer Synthese des Glutamat-Antagonisten Eliprodil in 93 % Ausbeute und 94 % ee.<sup>[210]</sup>

Bei Merck wurde eine Epoxid-Hydrolase aus *Diplodia gossypina* zur Racematspaltung von Indenoxid (138) eingesetzt (Schema 88). Man erhält (1S,2R)-138, eine Vorstufe zu HIV-Protease-Inhibitoren, in 14 % Ausbeute und 100 % ee. Außerdem entsteht Indandiol 227.<sup>[211]</sup>

Janssen et al. gelang die Isolierung von (S)-*p*-Nitrostyroloxid ((S)-228) (>99 % ee) durch selektive Azidolyse von (R)-228 mit einer Halohydrin-Dehalogenase aus *Agrobacterium radiobacter* (Schema 89). 2-Azido-1-(*p*-nitrophenyl)-ethanol (229) wurde mit 96 % ee erhalten.<sup>[212]</sup>



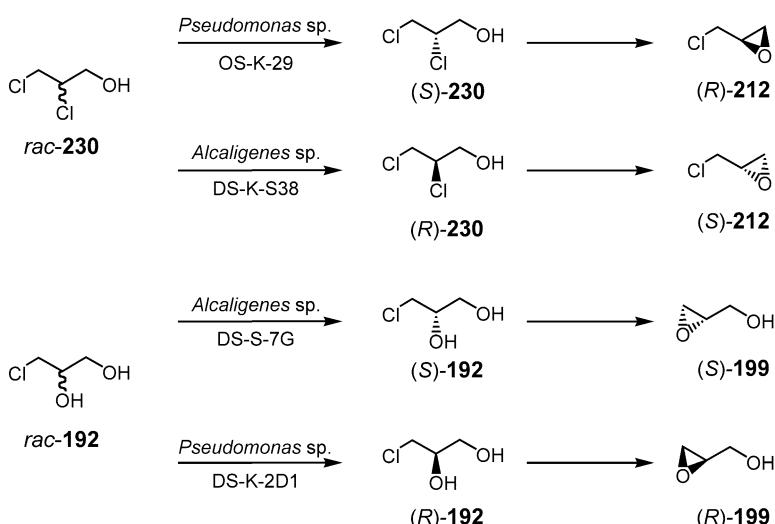
**Schema 88.**



**Schema 89.** Die selektive Azidolyse von rac-228 ergibt (S)-228 und (R)-229.

### 6.2.2. Mikrobielle Methoden zur Racematspaltung

Forscher bei Daiso entwickelten 1994 einen Prozess zur Herstellung von (S)-2,3-Dichlor-1-propanol ((S)-230) durch selektive Assimilierung von (R)-230 mit *Pseudomonas* sp. (OS-K-29).<sup>[213]</sup> Das Enantiomer (R)-230 konnte durch Abbau von (S)-230 mit *Alcaligenes* sp. (DS-K-S38) erhalten werden.<sup>[214]</sup> (R)- und (S)-230 werden in optisch aktives Epichlorhydrin ((S)- bzw. (R)-212, Schema 90) umgewandelt.



**Schema 90.** Biotechnologische Herstellung von enantiomerenreinem Epichlorhydrin ((S)- bzw (R)-212) und Glycidol ((R)- bzw (S)-199) durch Fermentation (Daiso).

Unter ähnlichen Fermentationsbedingungen konnte auch 3-Chlorpropan-1,2-diol (**192**) stereoselektiv produziert werden.<sup>[215]</sup> Unter basischen Bedingungen werden (R)- und (S)-**192** zu Glycidol ((R)- bzw (S)-**199**) umgesetzt.

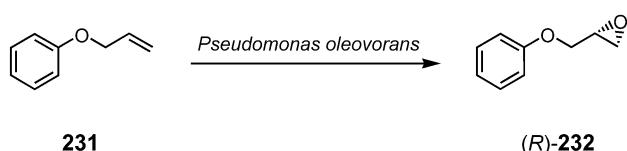
#### 6.2.3. Monooxygenasen

Obwohl Monooxygenasen vieler Mikroorganismen die stereoselektive Epoxidierung von Olefinen katalysieren, ist ihr Einsatz aus zwei Gründen problematisch: Erstens sind die Epoxide häufig nur Intermediate eines Abbaupfades und werden nicht akkumuliert; zweitens wirken die Epoxide als Alkylierungsmittel toxisch auf die Mikroorganismen, was zu Produktinhibition führt.

*Nocardia corallina* (Nippon Mining) kann zur Epoxidierung eines breiten Spektrums terminaler und subterminaler Olefine sowie von Styrolen eingesetzt werden (Tabelle 3). Je nach Substratklasse werden drei verschiedene Verfahren angewendet.<sup>[216]</sup> Bei der Epoxidierung von kurzkettigen, gasförmigen Olefinen ( $C_3$ – $C_5$ ) wird das stark toxische Epoxid durch Einleiten eines starken Gasstroms aus Luft und Substrat kontinuierlich ausgetrieben. Propylenoxid mit

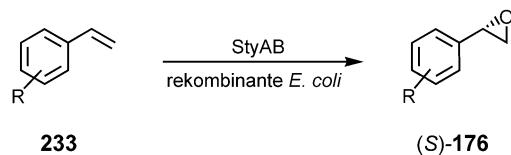
83 % ee kann so aus Propen in einer Raum-Zeit-Ausbeute von  $23 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  hergestellt werden. Epoxide langkettiger Olefine ( $> C_{13}$ ) sind weniger toxisch und können mit auf Glucose wachsenden Zellen ohne Produktextraktion hergestellt werden. Bei der Epoxidierung von Alkenen mittlerer Kettenlänge ( $C_6$ – $C_{12}$ ) und von Styrolen hat sich der Einsatz von ruhenden Zellen in Gegenwart einer nicht toxischen organischen Phase (z. B. Hexadecan) bewährt.<sup>[217]</sup> Das organische Lösungsmittel verringert die Konzentration des inhibierenden Epoxids in der wässrigen Phase durch kontinuierliche Produktextraktion.

Bei Shell wird durch Oxidation von 3-Aryloxypropen (**231**) wurde (R)-Phenylglycidylether ((R)-**232**) mit suspendierten *Pseudomonas-oleovorans*-Zellen hergestellt. Dieser Prozess liefert die Zwischenstufe für die Synthese von  $\beta$ -Adrenozeptor-Blockern mit  $> 99.9\%$  ee (Schema 91).<sup>[218]</sup>



**Schema 91.**

Styrol-Monooxygenasen aus styrolabbauenden *Pseudomonaden* wurden in *E. coli*-Zellen exprimiert und zur selektiven Oxidation von Styrolderivaten **233** zu den S-Styroloxiden (S)-**176** eingesetzt (Schema 92).<sup>[219]</sup> In Gegenwart einer organischen Phase (Diocetylphthalat) konnten Ausbeuten von  $11 \text{ g L}^{-1}$  erzielt werden.<sup>[220]</sup>



**Schema 92.** Styrol-Monooxygenasen oxidieren **233** selektiv zu den (S)-Styroloxiden (S)-**176**.

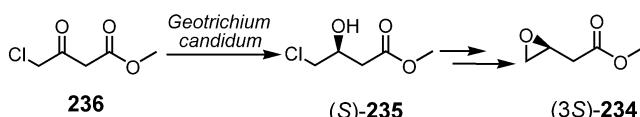
**Tabelle 3:** Epoxidierungen mit *Nocardia* sp.

	Substrat	Konfiguration des Epoxids	ee [%]
$C_3$ – $C_5$	1,2-Propen	R	83
	3-Chlorpropen	S	81
$C_6$ – $C_{12}$	1,2-Hepten	R	94
	1,2-Octen	R	91
	1,2-Decen	R	86
	1,2-Dodecen	R	87
	<i>o</i> -Chlorstyrol	R	86
	<i>m</i> -Chlorstyrol	R	82
	<i>p</i> -Chlorstyrol	R	72
$> C_{13}$	1,2-Tridecen	R	92
	1,2-Pentadecen	R	81
	1,2-Heptadecen	R	81

#### 6.2.4. Dehydrogenasen

Einen weiteren Zugang zu chiralen Epoxiden bieten enantiomerenreine  $\alpha$ -Halogenalkohole, die aus den entsprechenden Chlorketonen durch enantioselektive Reduktion hergestellt werden. Bei einem Projekt von Kaneka zur Herstellung von (R)- und (S)-Styroloxiden im Pilotmaßstab werden Dehydrogenasen in Form ganzer Zellen eingesetzt.

Bristol Myers Squibb stellte (3S)-3,4-Epoxyethylbutyrat (**234**) aus dem optisch aktiven Chlorhydrin **235** her, das durch enantioselektive Dehydrogenase-Reduktion der Ketoverbindung **236** (99 % ee) mit ganzen *Geotrichum-candidum*-Zellen im Multikilogramm-Maßstab zugänglich ist (Schema 93).<sup>[221]</sup>



*Schema 93.*

## **7. Zusammenfassung und Ausblick**

Beim Vergleich von chemischen Prozessen und Biotransformationen kann nicht pauschal über Wirtschaftlichkeit oder Umweltfreundlichkeit geurteilt werden. Vor- und Nachteile einzelner Methoden müssen für jeden Prozess individuell abgeschätzt werden. Beim Vergleich der Sharpless-Epoxidierung mit einer mikrobiellen Epoxidierung durch Lebenszyklusanalyse (Life Cycle Analysis, LCA) war beispielsweise kein Verfahren umweltfreundlicher als das andere.<sup>[222]</sup> Spezifische Probleme der chemischen Routen sind Lösungsmittel-emission oder toxische Verbindungen, während mit mikrobiellen Verfahren geringe Ausbeuten bezogen auf die eingesetzte Biomasse bzw. geringe Produktkonzentrationen Probleme bereiten.

Die chiralen Technologien entwickeln sich immer noch sehr rasch. Für die erfolgreiche Umsetzung eines Verfahrens in den industriellen Maßstab sind eine Reihe von Punkten wichtig. Gesucht werden vor allem breit einsetzbare Technologien. Viele chirale Intermediate werden häufig in kleineren Mengen hergestellt (10–100 t), und oft gibt es konkurrierende Hersteller. Daher wünscht man sich Methoden mit einem breiten Substratspektrum, die keine Spezialapparaturen erfordern und einen kostengünstigen Zugang zu einer ganzen Palette von Produkten ermöglichen.

Für biotechnologische Prozesse ist die Substratkonzentration oft der entscheidende Faktor, bei katalytischen chemischen Methoden das Verhältnis Substrat/Katalysator. Vor allem roboterunterstützte Optimierungsverfahren helfen uns heute diese Ziele in kurzer Zeit zu erreichen.

Die Zukunft wird den katalytischen Technologien gehören. Auxiliargestützte Methoden verlieren an Boden, da zu große Materialmengen am Kreislauf beteiligt sind. Für die schnelle Bereitstellung enantiomerenreiner Bausteine hat die klassische Racematspaltung immer noch ihre Nische. Die dynamische kinetische Spaltung befindet sich zwar noch in einer frühen Entwicklungsphase, ihr Potenzial ist jedoch bereits offensichtlich.

Aber auch in Zukunft wird es Raum für mehrere Technologien geben. Welche Technologie letztlich in einem Produktionsprozess umgesetzt wird, hängt oft auch von den Rahmenbedingungen wie Verfügbarkeit von Vorprodukten und Apparaten in den einzelnen Unternehmen ab.

*Wir danken Frau Dr. Gisela Hieber für ihre Unterstützung bei der Beschaffung von Marktinformationen. Unser besonderer Dank gilt Frau Tanja Jenak, die durch ihre engagierte Mitarbeit diesen Aufsatz erst in Form brachte.*

Eingegangen am 28. März 2003 [A599]

- [1] A. Friedrich, G. Antranikian, *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62, 2875.

[2] S. Riessen, G. Antranikian, *Extremophiles* **2001**, 5, 399.

[3] T. Maier, C. Winterhalter (Consortium für Electrochemische Industrie GmbH), WO 01/27307, **2001** [*Chem. Abstr.* **2000**, 133, 361976].

[4] G. C. Barrett in *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*, Chapman and Hall, New York, **1985**, S. 251, 261.

[5] L. Yet, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 900; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 875.

[6] a) A. Strecker, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1850**, 75, 27; b) H. T. Bucherer, H. T. Fischbeck, *J. Prakt. Chem.* **1934**, 140, 69; c) H. T. Bucherer, W. Steiner, *J. Prakt. Chem.* **1934**, 140, 291; d) H. Bergs, Deutsches Reichspatent Nr. 566094, **1929**.

[7] M. Beller, M. Eckert, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1026; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1010.

[8] H. Wagner, H. Tanner, E. Liebetanz, S. P. Mannsfeld, A. Pfeiffer (Degussa AG), DE 1906405, **1969** [*Chem. Abstr.* **1971**, 74, 64392].

[9] W. Liebl, M. Ehrmann, W. Ludwig, K. H. Schleifer, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1991**, 41, 255.

[10] H. Sahm, L. Eggeling in *Encyclopedia of Microbiology* (Hrsg.: J. Lederberg), Academic Press, San Diego, CA, **2000**, S. 152.

[11] M. Kikuchi, Y. Nakao in *Biotechnology of Amino Acid Production* (Hrsg.: K. Aida, I. Chibata, K. Nakayama, K. Takinami, H. Yamada), Elsevier, Amsterdam, **1986**, S. 101.

[12] R. Krämer, *BioEngineering* **1993**, 9, 51.

[13] S. Isamu, Y. Toride, A. Yokota, S. Sugimoto, K. Kawamura (Ajinomoto Co., Inc.), FR 2626286, **1990** [*Chem. Abstr.* **1989**, 113, 38946].

[14] M. Masuda, S. Takamatu, N. Nishimura, S. Komatsubara, T. Tosa, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1992**, 37, 255.

[15] K. Okamoto, K. Kino, M. Ikeda, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, 61, 1877.

[16] W. Leuchtenberger in *Biotechnology* (Hrsg.: H.-J. Rehm, G. Reed), VCH, Weinheim, **1996**, S. 465.

[17] H. Kumagai, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2000**, 69, 71.

[18] S. Yamada, K. Nabe, N. Izuo, *Appl. Environ. Microbiol.* **1981**, 42, 773.

[19] I. Chibata, T. Tosa, S. Takamatsu, *Microbiol. Sci.* **1984**, 1, 58.

[20] A. Liese, K. Seelbach, A. Buchholz, J. Haberland in *Industrial Biotransformations* (Hrsg.: A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 334.

[21] M. Furui, K. Yamashita, *J. Ferment. Technol.* **1983**, 61, 587.

[22] E. L. Smith, B. M. Austen, K. M. Blumenthal, J. F. NYC in *The Enzymes*, Vol. XI (Hrsg.: P. D. Boyer), Academic Press, **1975**, S. 293.

[23] R. Wichmann, C. Wandrey, A. F. Buckmann, M. R. Kula, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, 67, 791.

[24] A. S. Bommarius, M. Schwarm, M. Stengl, K. Kotterhahn, K. Huthmacher, K. Drauz, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 2851.

[25] I. G. Fotheringham in *Biotechnology* (Hrsg.: D. Kelly), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 313.

[26] a) H. Agematsu, *ChiraSource Nov.* **2001**, Philadelphia; b) T. Fujii, T. Narita, H. Agematsu, N. Agata, K. Isshiki, *J. Biochem.* **2000**, 128, 975; c) T. Fujii, T. Narita, H. Agematsu, N. Agata, K. Isshiki, *J. Biochem.* **2000**, 128, 391.

[27] I. G. Fotheringham, P. P. Taylor, J. L. Ton (Monsanto Co.), US 5728555, **1998** [*Chem. Abstr.* **1999**, 128, 216437].

[28] W. Liu, S. Laneman, D. J. Ager, P. P. Taylor (Great Lakes Chemical Corp.), WO 01/62948A2, **2001** [*Chem. Abstr.* **2001**, 135, 209968].

[29] C. Syldatk, M. Pietzsch in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis* (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), VCH, Weinheim,

- [30] M. A. Wegman, M. H. A. Janssen, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 559.
- [31] O. May, P. T. Nguyen, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 317.
- [32] O. May, persönliche Mitteilung.
- [33] K. Sano, K. Mitsugi, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 2315.
- [34] A. S. Bommarius, M. Schwarm, K. Drauz, *Chimia* **2001**, *55*, 50.
- [35] H. E. Schoemaker, W. H. J. Boesten, O. B. Broxterman, E. C. Roos, B. Kaptein, W. J. J. Van Den Tweel, J. Kamphuis, E. M. Meijer, F. P. J. T. Rutjes, *Chimia* **1997**, *51*, 308.
- [36] M. Petersen, M. Sauter, *Chimia* **1999**, *53*, 608.
- [37] H. Momose, T. Tagaki, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 1911.
- [38] E. R. Börmann, B. J. Eikmanns, H. Sahm, *Mol. Microbiol.* **1992**, *6*, 317.
- [39] H. Holms, *FEMS Microbiol. Rev.* **1996**, *19*, 85.
- [40] M. Pompejus, B. Kröger, H. Schröder, O. Zelder, G. Haberhauer (BASF AG), WO 01/00844, **2001** [*Chem. Abstr.* **2001**, *134*, 67211].
- [41] S. Nakagawa, H. Mizoguchi, S. Ando, M. Hayashi, K. Ochiai, H. Yokoi, N. Tateishi, A. Senoh, M. Ikeda, A. Ozaki (Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd.), EP 1108790, **2001** [*Chem. Abstr.* **2001**, *135*, 283981].
- [42] D. E. Robertson, E. J. Mathur, R. V. Swanson, B. L. Marrs, J. M. Short, *SiM news* **1996**, *46*, 3.
- [43] R. I. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer, *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 143.
- [44] a) I. P. Petrounia, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 325; b) K. A. Powell, S. W. Ramer, S. B. del Cardayre, W. P. C. Stemmer, M. B. Tobin, P. F. Longchamp, G. W. Huisman, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4068; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3948; c) F. H. Arnold, *Nature* **2001**, *409*, 253.
- [45] J. E. Ness, S. B. del Cardayre, J. Minshull, W. P. Stemmer, *Adv. Protein Chem.* **2000**, *55*, 261.
- [46] a) C. Thomas, U. Ohnmacht, K. Zahn, K. Mohr, P. Gmeiner, *Pharmazie* **1999**, *54*, 248; b) F. Rahm, R. Stranne, U. Bremberg, K. Nordstrom, M. Cernerud, E. Macedo, C. Moberg, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 1983; c) A. Goti, S. Cicchi, F. M. Cordero, V. Fedi, A. Brandi, *Mol. Online* **1999**, *4*, 1; d) W. G. Liu in *Handbook of Chiral Chemicals* (Hrsg.: D. J. Ager), Marcel Dekker, New York, **1999**, S. 83; e) D. J. Ager, D. R. Allen, M. B. East, I. G. Fotheringham, S. A. Laneman, W. G. Liu, D. P. Pantaleone, D. R. Schaad, P. P. Taylor in *Handbook of Chiral Chemicals* (Hrsg.: D. J. Ager), Marcel Dekker, New York, **1999**, S. 301.
- [47] G. Amari, M. Del Canale, R. Razzetti, P. A. Monici Preti, I. Rondelli (Chiesi Farmaceutici S.p.A.), WO 01/085668, **2001** [*Chem. Abstr.* **2001**, *135*, 357780].
- [48] H. Brunner, M. Muschiol, T. Wischert, J. Wiehl, *Tetrahedron: Asymmetry* **1990**, *1*, 159.
- [49] H. G. J. De Wilt, *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* **1972**, *11*, 370.
- [50] R. L. Whistler, R. Schweiger, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 5190.
- [51] A. J. Vroemen, M. Beverini (Gist Brocades B.V.), WO 96/35800, **1996** [*Chem. Abstr.* **1997**, *126*, 130654].
- [52] C. H. H. Emons, B. F. M. Kuster, J. A. J. M. Vekemans, R. A. Sheldon, *Proc. Chiral 92 Symp.*, Spring Innovations, Stockport, UK, **1992**, S. 39.
- [53] S. Furuyoshi, N. Kawabata, H. Tanaka, K. Soda, *Agric. Biol. Chem.* **1989**, *53*, 2101.
- [54] T. Kato, T. Ozaki, K. Tsuzuki, N. Ohi, *Org. Process Res. Dev.* **2001**, *5*, 122.
- [55] H. Hasegawa, T. Wataya, Y. Miura, N. Kou (Daito Kagaku KK), JP 2000-178253, **2000** [*Chem. Abstr.* **2000**, *133*, 43448].
- [56] Y. N. Belokon, B. Green, N. S. Ikonnikov, V. S. Larichev, B. V. Lokshin, M. A. Moscalenko, M. North, C. Orizu, A. S. Peregrudov, G. I. Timofeeva, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2655.
- [57] a) Y. N. Belokon, S. Caveda-Cepas, B. Green, N. S. Ikonnikov, V. N. Krustalev, 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; b) Y. N. Belokon, B. Green, N. S. Ikonnikov, M. North, T. Parsons, V. I. Tararov, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 771; c) Y. N. Belokon, M. North, T. Parsons, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1617.
- [58] Y. N. Belokon, B. Green, N. S. Ikonnikov, M. North, V. I. Tararov, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8147.
- [59] J. Blacker, *ChiraSource Nov.* **2001**, Philadelphia.
- [60] A. Kiener (Lonza AG), EP 442430, **1991** [*Chem. Abstr.* **1992**, *116*, 57572].
- [61] A. Kiener, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 748; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 774.
- [62] T. Zimmermann, J. Werlen (Lonza AG), WO 95/10613, **1995** [*Chem. Abstr.* **1995**, *123*, 135109].
- [63] T. Ohashi, *Proc. Chiral 90 Symp.*, Spring Innovations, Stockport, UK, **1990**, S. 65.
- [64] I. Takata, K. Yamamoto, T. Tosa, I. Chibata, *Enzyme Microb. Technol.* **1980**, *2*, 30.
- [65] F. Schindler (Hüls AG), EP 175007, **1983** [*Chem. Abstr.* **1985**, *102*, 4464].
- [66] a) F. Effenberger, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1609; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1555; b) F. Effenberger, *Enantiomer* **1996**, *1*, 359; c) F. Effenberger, *Chimia* **1999**, *53*, 3; d) F. Effenberger in *Stereoselective Biocatalysis* (Hrsg.: R. N. Patel), Marcel Dekker, New York, **2000**, S. 321; e) F. Effenberger, S. Forster, H. Wajant, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 532; f) D. V. Johnson, H. Griengl, *Chim. Oggi* **1997**, *9/10*, 9; g) H. Griengl, A. Hickel, D. V. Johnson, C. Kratky, M. Schmidt, H. Schwab, *Chem. Commun.* **1997**, 1933; h) M. Schmidt, H. Griengl in *Biocatalysis—From Discovery to Application* (Hrsg.: W. D. Fessner) Springer, **1998**, S. 193; i) D. V. Johnson, A. A. Zabelinskaja-Mackova, H. Griengl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 103; j) H. Griengl, H. Schwab, M. Fechter, *Oph. Gen.* **2000**, *18*, 252.
- [67] H. Gröger, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 547.
- [68] A. Bousquet, A. Musolino (Sanofi-Synthelabo), EP 1021449, **1998** [*Chem. Abstr.* **1999**, *130*, 296510].
- [69] a) P. Pöchlauer, H. Mayrhofer (DSM Fine Chemicals Austria), EP 1148042, **2001** [*Chem. Abstr.* **2001**, *135*, 303603]; b) N. Okuda, H. Semba, Y. Dobashi (Nippon Shokubai), EP 1160235, **2001** [*Chem. Abstr.* **2002**, *136*, 5721]; c) H. Semba, Y. Dobashi (Nippon Shokubai), EP 1160329, **2001** [*Chem. Abstr.* **2002**, *136*, 4802]; d) H. Bühler, Dissertation, Universität Stuttgart, **2000**; e) Clartext 3/2001 (Clariant), C. Hanisch, *Von handigen Molekülen und ihren Spiegelbildern*, Clartext 3-2001 (Clariant), zu finden unter [http://www.clariant.de/e2wportal/de/internet.nsf/directframe/CTX\\_Startpage](http://www.clariant.de/e2wportal/de/internet.nsf/directframe/CTX_Startpage), **2001**.
- [70] Siehe auch: H. Griengl, N. Klempier, P. Pöchlauer, M. Schmidt, N. Y. Shi, A. A. Zabelinskaja-Mackova, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 14477.
- [71] a) Chemie Linz GmbH, DE 19529116, **1997** [*Chem. Abstr.* **1997**, *126*, 208953]; b) H. Semba (Nippon Shokubai), EP 1016712, **2000** [*Chem. Abstr.* **2000**, *133*, 85120]; c) F. Effenberger, H. Wajant, P. Lauble, S. Förster, H. Bühler, H. Schwab, C. Kratky, U. Wagner, E. Steiner (DSM Fine Chemicals Austria), EP 969095, **2000** [*Chem. Abstr.* **2000**, *132*, 191223].
- [72] a) M. Hasslacher, M. Schall, H. Schwab, E. Hayn, S. Kohlwein, H. Griengl (DSM Chemie Linz), WO 97/03204, **1997** [*Chem. Abstr.* **2000**, *126*, 196118]; b) H. Semba (Nippon Shokubai), EP 1026256, **2000** [*Chem. Abstr.* **2000**, *133*, 134248]; c) P. Pöchlauer, M. Schmidt, I. Wirth, R. Neuhofer, A. A. Zabelinskaja-Mackova, H. Griengl, C. van den Broek, R. W. E. G. Reintjens, H. J. Wories (DSM Fine Chemicals Austria), EP 927766, **1999** [*Chem. Abstr.* **2000**, *131*, 72766].
- [73] a) V. H. M. Elferink, J. G. T. Kierkels, M. Kloosterman, J. H. Roskam (Stamicarbon B.V.), EP 369553, **2000** [*Chem. Abstr.* **2000**, *114*, 41029]; b) J. Kamphuis, H. E. Schoemaker, W. H. J.

- Boesten, T. Sonke, H. Moody, B. Kaptein, W. J. J. Van den Tweel, *Meded. Fac. Landbouwwet. Univ. Gent* **1992**, *57*, 1731; c) J. Kamphuis, W. J. J. Van den Tweel, Q. B. Broxtermann, B. Kaptein, T. Sonke, W. H. J. Boesten, H. E. Schoemaker, 205<sup>th</sup> ACS National Meeting, Denver, **1993**.
- [74] a) M. Kataoka, K. Shimizu, K. Sakamoto, H. Yamada, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *43*, 974; b) S. Shimizu, M. Kataoka, K. Shimizu, M. Hirakata, K. Sakamoto, H. Yamada, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *209*, 383; c) S. Shimizu, M. Kataoka, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1996**, *799*, 650.
- [75] a) K. Sakamoto, H. Yamada, S. Shimizu (Fuji Chemicals Industrial Co.), EP 436730, **1991** [*Chem. Abstr.* **1991**, *115*, 27689]; b) K. Sakamoto, H. Yamada, S. Shimizu (Fuji Yakuhiin Kogyo K.K.), EP 504421, **1992** [*Chem. Abstr.* **1992**, *117*, 110119].
- [76] S. C. Taylor in *Biocatalysis* (Hrsg.: D. A. Abramowicz), Van Nostrand Reinhold, New York, **1990**, S. 157, zit. Lit.; R. A. Sheldon, *Chirotechnology*, 1. Aufl., Marcel Dekker, New York, **1993**, S. 130.
- [77] a) A. W. Bunch in *Biotransformations* (Hrsg.: D. R. Kelly), BLDSC, Shelfmark, **1998**, S. 277; b) T. Sugai, T. Yamazaki, M. Yokoyama, H. Ohta, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*, 1419; c) D. Cowan, R. Cramp, R. Pereira, D. Graham, Q. Almatawah, *Extremophiles* **1998**, *2*, 207; d) M. Wieser, T. Nagasawa in *Stereoselective Biocatalysis* (Hrsg.: R. N. Patel), Marcel Dekker, New York, **2000**, S. 461.
- [78] a) M. Ress-Löschke, T. Friedrich, B. Hauer, R. Mattes, D. Engels (BASF AG), DE 19848129, **2000** [*Chem. Abstr.* **2000**, *132*, 292813]; b) Y. Yamaguchi, M. Ushigome, T. Kato (Nitto Chem. Ind.), EP 773297, **1997** [*Chem. Abstr.* **1997**, *127*, 4190]; c) T. Endo, K. Tamura (Nitto Chem. Ind.), EP 449648, **1991** [*Chem. Abstr.* **1992**, *116*, 5338].
- [79] T. Endo, K. Tamura (Nitto Chem. Ind.), EP 527553, **1993** [*Chem. Abstr.* **1993**, *118*, 167640].
- [80] M. Kobayashi, S. Shimizu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 95.
- [81] L. Martíková, A. Stolz, H.-J. Knackmuss, *Biotechnol. Lett.* **1996**, *18*, 402.
- [82] M. S. Payne, S. Wu, R. D. Fallon, G. Tudor, B. Stieglitz, I. M. Turner, M. J. Nelson, *Biochemistry* **1997**, *36*, 5447.
- [83] R. D. Fallon, B. Stieglitz, I. Turner, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *47*, 156.
- [84] H. Yamada, M. Kobayashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60*, 1391.
- [85] R. Di Cosimo, R. D. Fallon, J. E. Gavagan, F. E. Herkes (E. I. Du Pont), WO 97/44318, **1997** [*Chem. Abstr.* **1998**, *128*, 89231].
- [86] a) A. Kiener, J.-P. Roduit, J. Kohr, N. Shaw (Lonza AG), EP 686698, **1995** [*Chem. Abstr.* **1996**, *124*, 115569]; b) M. Wieser, T. Nagasawa in *Stereoselective Biocatalysis* (Hrsg.: R. N. Patel), Marcel Dekker, New York, **2000**, S. 461.
- [87] T. Reichstein, A. Grossner, *Helv. Chim. Acta* **1934**, *17*, 311.
- [88] R. D. Hancock, R. Viola, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *56*, 567.
- [89] a) T. Moriya, Y. Hikichi, Y. Moriya, T. Yamaguchi (Takeda Chemical Ind.), WO 97/10340, **1997** [*Chem. Abstr.* **1997**, *126*, 263217]; b) Y. Hikichi, T. Moriya, I. Nogami, H. Miki, T. Yamaguchi (Takeda Chemical Ind.), EP 590857, **1994** [*Chem. Abstr.* **1994**, *121*, 55989].
- [90] a) F. Elischewski, J. Kalinowski, A. Pühler, N. Dusch, J. Dohmen, M. Farwick, G. Thierbach (Degussa-Hüls AG), EP 1001027A2, **2000** [*Chem. Abstr.* **2000**, *132*, 278241]; b) N. Dusch, J. Kalinowski, A. Pühler (Degussa-Hüls AG), EP 1006192A2, **2000** [*Chem. Abstr.* **2000**, *133*, 29682]; c) M. Rieping, G. Thierbach, W. Pfefferle, N. Dusch, J. Kalinowski, A. Pühler (Degussa-Hüls AG), EP 1006193A2, **2000** [*Chem. Abstr.* **2000**, *133*, 29683]; d) N. Dusch, A. Pühler, J. Kalinowski, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 1530; e) F. Elischewski, A. Pühler, J. Kalinowski, *J. Biotechnol.* **1999**, *75*, 135.
- [91] a) L. Eggeling, G. Thierbach, H. Sahm (Degussa-Hüls AG), EP 1006189A2, **2000** [*Chem. Abstr.* **2000**, *133*, 29681]; b) H. Sahm, L. Eggeling, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 1973.
- [92] M. Binder, K.-E. Uffmann, I. Walger, U. Becker, W. Pfefferle, H. Friedrich (Degussa AG), DE 10016321, **2000** [*Chem. Abstr.* **2000**, *135*, 357110].
- [93] J. Jacques, A. Collett, S. Wilen, *Enantiomers, Racemates, and Resolutions*, Wiley-Interscience, New York, **1980**.
- [94] A. W. Ingersoll, *Org. Synth. Coll. Vol. II* **1950**, 506.
- [95] A. Ault, *Org. Synth. Coll. Vol. V* **1973**, 932.
- [96] a) W. Bryker, L. A. Avila (Hexcel Corp.), US 4983771, **1989** [*Chem. Abstr.* **1991**, *114*, 206739]; b) Yamakawa Yakuhiin Co., JP 56026848, **1979** [*Chem. Abstr.* **1981**, *95*, 115012].
- [97] H. Hirotoshi (Sumitomo Chem. Co.), JP 11106368, **1997** [*Chem. Abstr.* **1999**, *130*, 311605].
- [98] K. Hagiya, E. Harada, F. Goto (Sumitomo Chemical Co.), EP 0735018, **1994** [*Chem. Abstr.* **1996**, *125*, 167547].
- [99] a) M. Littmann, A. Günther, U. Kraatz (Bayer AG), DE 19619445, **1996** [*Chem. Abstr.* **1997**, *127*, 293000]; b) E. Brown, F. Viot, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 4451.
- [100] W. Merz, M. Littmann, U. Kraatz, C. Mannheims (Bayer AG), DE 19624820, **1996** [*Chem. Abstr.* **1998**, *128*, 88664]; M. Littmann, A. Günther, U. Kraatz (Bayer AG), DE 19650081, **1996** [*Chem. Abstr.* **1998**, *128*, 22711]; U. Kraatz, M. Littmann, *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer (Engl. Ed.)* **1998**, *51*, 203.
- [101] E. Brown, M. Moudachirou, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 10309.
- [102] a) T. Vries, H. Wynberg, E. van Echten, J. Koek, W. ten Hoeve, R. M. Kellogg, Q. B. Broxterman, A. Minnaard, B. Kaptein, S. van der Sluis, L. Hulshof, J. Kooistra, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2491; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2349; b) Q. B. Broxterman, E. van Echten, L. A. Hulshof, B. Kaptein, R. M. Kellogg, A. J. Minaard, T. R. Vries, H. Wynberg, *Chim. Oggi* **1998**, *16*, 34.
- [103] A. Johansson, *Contemp. Org. Synth.* **1995**, *2*, 393; H.-U. Blaser, F. Spindler, *Chim. Oggi* **1995**, *13*, 11.
- [104] M. J. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8518; M. J. Burk, J. E. Feaster, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6266; M. J. Burk, J. P. Martinez, J. E. Feaster, N. Cosford, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 4399.
- [105] a) C. Lensink, J. G. de Vries, *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 325; b) C. Lensink, J. G. de Vries, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 215; c) H.-Y. Li, L. Anzalone, R. E. Waltermire (DuPont Pharmaceutical Company), US 5932749, **1997** [*Chem. Abstr.* **1999**, *131*, 144591]; d) L. Storace, L. Anzalone, P. N. Confalone, W. P. Davis, J. M. Fortunak, M. Giangiordano, J. J. Haley, Jr., K. Kamholz, H.-Y. Li, P. Ma, W. A. Nugent, R. L. Parsons, Jr., P. J. Sheeran, C. E. Silverman, R. E. Waltermire, C. C. Wood, *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 54; e) H.-Y. Li, L. Anzalone, R. E. Waltermire (DuPont Pharmaceutical Company), WO 9734887, **1996** [*Chem. Abstr.* **1997**, *127*, 318949].
- [106] M. J. Burk, G. Casy, N. B. Johnson, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6084; N. B. Johnson, G. Casy, M. J. Burk (Chirotech Techn. Ltd.), WO 9918065, **1997** [*Chem. Abstr.* **1999**, *130*, 281579].
- [107] F. Spindler, H.-U. Blaser, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 68.
- [108] a) A. J. Blacker, L. Campbell (Avecia Ltd.), WO 00/18708, **2000** [*Chem. Abstr.* **2000**, *132*, 265099]; b) L. A. Campbell, Avecia Ltd., persönliche Mitteilung.
- [109] B. Krzyzanowska, W. J. Stec, *Synthesis* **1982**, 270; B. Krzyzanowska, W. J. Stec, *Synthesis* **1978**, 521.
- [110] A. Togni, C. Breutel, A. Schnyder, F. Spindler, H. Landert, A. Tijani, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4061.
- [111] a) D. I. Sterling, A. L. Zeitlin, G. W. Matcham (Celgene Corp.), US 4950606, **1989** [*Chem. Abstr.* **1991**, *114*, 41055]; b) G. W. Matcham, J. D. Rozzell, D. I. Sterling, A. L. Zeitlin, (Celgene Corp.), US 5169780, **1990** [*Chem. Abstr.* **1993**, *118*, 190144]; c) G. W. Matcham, D. I. Sterling, A. L. Zeitlin, (Celgene Corp.), US 5300437, **1992** [*Chem. Abstr.* **1994**, *121*,

- 132394]; d) G. W. Matcham, A. R. S. Bowen, *Chim. Oggi* **1996**, *14*, 20; e) D. I. Sterling in *Chirality in Industry* (Hrsg.: A. N. Collins, G. N. Sheldrake, J. Crosby), Wiley, Chichester, **1992**, S. 209.
- [112] G. T. Phillips, J. H. Shears (Shell Internationale Research Maatschappij B.V.), EP 399589, **1989** [*Chem. Abstr.* **1991**, *115*, 69951].
- [113] H. Smidt, A. Fischer, P. Fischer, R. D. Schmidt, U. Stelzer (Bayer AG), EP 812363, **1995** [*Chem. Abstr.* **1996**, *125*, 219744].
- [114] S. Arai, S. Bellemin-Laponnaz, G. C. Fu, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 240; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 234.
- [115] a) H. Kitaguchi, P. A. Fitzpatrick, J. E. Huber, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3094; b) A. L. Gutman, *Spec. Chem.* **1996**, *16*, 242; c) A. L. Gutman, E. Meyer, E. Kalerin, F. Polyak, J. Sterling, *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *40*, 760.
- [116] a) F. Balkenhol, K. Ditrich, B. Hauer, W. Ladner, *J. Prakt. Chem.* **1997**, *339*, 381; b) F. Balkenhol, B. Hauer, W. Ladner, U. Pressler (BASF AG), DE 4332738, **1993** [*Chem. Abstr.* **1995**, *122*, 289035]; c) K. Ditrich, F. Balkenhol, W. Ladner (BASF AG), DE 19534208, **1995** [*Chem. Abstr.* **1997**, *126*, 277259].
- [117] F. Rebollo, V. Gotor, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 4007.
- [118] a) M. T. Reetz, C. Dreisbach, *Chimia* **1994**, *48*, 570; b) M. T. Reetz, K. Schimossek, *Chimia* **1996**, *50*, 668; c) C. Dreisbach, U. Stelzer (Bayer AG), WO 97/28271, **1996** [*Chem. Abstr.* **1997**, *127*, 160678]; d) C. D. Reeve (Zeneca Ltd.), WO 9931264, **1998** [*Chem. Abstr.* **1999**, *131*, 43668]; e) L. E. Iglesias, V. M. Sanchez, F. Rebollo, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2675; f) F. Messina, M. Botta, F. Corelli, M. P. Schneider, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3767.
- [119] a) M. Soledad de Castro, J. V. Sinisterra Gago, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 2877; b) N. Öhrner, C. Orrenius, A. Mattson, T. Norin, K. Hult, *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, *19*, 328.
- [120] D. T. Chapman, D. H. G. Crout, M. Mahmoudian, D. I. C. Scopes, P. W. Smith, *Chem. Commun.* **1996**, 2415.
- [121] a) U. Stelzer (Bayer AG), DE 19621686, **1996** [*Chem. Abstr.* **1998**, *128*, 60789]; b) A. Maestro, C. Astorga, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 3153.
- [122] S. Takayama, S. T. Lee, S.-C. Hung, C.-H. Wong, *Chem. Commun.* **1999**, 127.
- [123] S. Conde, P. Lopez-Serrano, A. Martinez, *J. Mol. Catal. B* **1999**, *5*, 299.
- [124] L. M. van Langen, N. H. P. Oosthoek, D. T. Guranda, F. van Rantwijk, V. K. Svedas, R. A. Sheldon, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 4593.
- [125] K. Ditrich, W. Ladner, J.-P. Melder (BASF AG), DE 19913256, **1999** [*Chem. Abstr.* **2000**, *133*, 252151].
- [126] a) H. Riechers, J. Simon, A. Höhn, A. Kramer, F. Funke, W. Siegel, C. Nübling (BASF AG), WO 2000047546, **1999** [*Chem. Abstr.* **2000**, *133*, 163769]; b) H. Riechers, J. Simon, A. Höhn, A. Kramer, F. Funke, W. Siegel, C. Nübling (BASF AG), US 6049007, **1999** [*Chem. Abstr.* **2000**, *132*, 236800]; c) H. Riechers, J. Simon, A. Höhn, A. Kramer, F. Funke, W. Siegel, C. Nübling (BASF AG), DE 19852282, **1998** [*Chem. Abstr.* **2000**, *132*, 308056]; d) K. Ditrich (BASF AG), DE 19606124, **1996** [*Chem. Abstr.* **1997**, *127*, 234169].
- [127] K. Ditrich, U. Block (BASF AG), WO 2000046177, **1999** [*Chem. Abstr.* **2000**, *133*, 165414].
- [128] J. Crosby in *Chirality in Industry* (Hrsg.: A. N. Collins, G. N. Sheldrake, J. Crosby), Wiley, Chichester, **1992**, S. 1.
- [129] a) R. S. Samant, S. B. Chandalla, *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* **1985**, *24*, 426; b) R. A. Sheldon, *Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds*, Marcel Dekker, New York, **1993**, S. 173.
- [130] I. S. Sigal, J. R. Huff, P. L. Darke, J. P. Vacca, S. D. Young, S. J. Desolms, W. J. Thompson, T. A. Lyle, S. L. Graham, A. K. Ghosh (Merck & Co., Inc., USA), EP 337714, **1988** [*Chem. Abstr.* **1990**, *112*, 199132].
- [131] a) J. F. Larrow, E. Roberts, T. R. Verhoeven, K. M. Ryan, C. H. Sennayake, P. J. Reider, E. N. Jacobsen, *Org. Synth.* **1999**, *76*, 46; b) C. H. Sennayake, R. F. Edward, L. M. DiMichele, K. M. Ryan, J. Liu, L. E. Fredenburgh, B. S. Foster, A. W. Douglas, R. D. Larson, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3993; c) H. Kajiro, S. Mitamura, A. Mori, T. Hiyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, *72*, 1093;
- [132] a) M. Takahashi, K. Ogasawara, *Synthesis* **1996**, 954; b) M. M. Chartrain, C. H. Sennayake, J. P. N. Rosazza, J. Zhang (Merck & Co., Inc., USA), WO 9612818, **1994** [*Chem. Abstr.* **1996**, *125*, 56385]; c) A. K. Ghosh, J. F. Kincaid, M. G. Haske, *Synthesis* **1997**, 541; d) K. Kuniro (Chisso Corp., Japan), JP 08332095, **1995** [*Chem. Abstr.* **1997**, *126*, 156476]; e) B. C. Buckland, M. M. Chartrain, N. C. Connors, F. P. Gailliot, R. L. Greasham, C. Lee, R. C. Olewinski, P. J. Reider, F. E. Roberts, C. H. Senanayake, T. R. Verhoeven (Merck & Co., Inc., USA), WO 9700966, **1995** [*Chem. Abstr.* **1997**, *126*, 143388]; f) A. J. Blacker, D. R. Boyd, H. Dalton, N. Bowers (Zeneca Limited, UK), WO 9637628, **1995** [*Chem. Abstr.* **1997**, *126*, 88342]; g) A. T. Anilkumar, K. Goto, T. Takahashi, K. Ishizaki, H. Kaga, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 2501; h) A. S. Demir, H. Hamamci, F. Doganel, E. Ozgul, *J. Mol. Catal. B* **2000**, *9*, 157.
- [133] a) T. R. Verhoeven, F. E. Roberts, C. H. Sennayake, K. M. Ryan (Merck & Co., Inc., USA), US 5420353, **1994** [*Chem. Abstr.* **1995**, *123*, 314545]; b) P. R. Hof (DSM N.V., NL), EP 890571, **1997** [*Chem. Abstr.* **1999**, *130*, 110062].
- [134] a) A. I. Meyers, K. Drauz, M. Schwarm, M. McKennon (Degussa AG), DE 4232505, **1992** [*Chem. Abstr.* **1994**, *121*, 10000]; b) A. Bommarius, K. Drauz, G. Krix, R.-M. Kula (Degussa AG), EP 692538, **1994** [*Chem. Abstr.* **1996**, *124*, 173602].
- [135] M. Schwarm, *NaBH<sub>4</sub>-Reductions of Amino Acids & Derivatives Using Electrophilic Assistance*, Rohm&Haas 6<sup>th</sup> European Metallhydride Symposium, Schloss Reinach, Freiburg, **2001**.
- [136] a) T. Inaba, A. G. Birchler, Y. Yamada, S. Sagawa, K. Yokota, K. Ando, I. Uchida, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7582; b) T. Inaba, Y. Yamada, H. Abe, S. Sagawa, H. Cho, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1623.
- [137] T. Inaba, S. Sagawa, H. Abe (Japan Tobacco Inc.), EP 930312, **1998** [*Chem. Abstr.* **1999**, *131*, 116260].
- [138] a) J. D. Rozzell (Biocatalysis Inc.), US 5834261, **1997** [*Chem. Abstr.* **1999**, *130*, 3114]; b) J. D. Rozzell (Biocatalysis Inc.), US 5942644, **1997** [*Chem. Abstr.* **1999**, *131*, 169389]; c) F. Balkenhol, K. Ditrich, C. Nübling (BASF AG), WO 9623894, **1995** [*Chem. Abstr.* **1996**, *125*, 219729]; d) C. Nübling, K. Ditrich, C. Dully (BASF AG), DE 19837745, **1999** [*Chem. Abstr.* **1998**; *Chem. Abstr.* **2000**, *132*, 165214].
- [139] R. Noyori, M. Tokunaga, M. Kitamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, *68*, 36.
- [140] S. Akutagawa, *Appl. Catal. A* **1995**, *128*, 171.
- [141] H. Kumobayashi, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1996**, *115*, 201.
- [142] T. Saito, T. Yokozawa, T. Ishizaki, T. Moroi, N. Sayo, T. Miura, H. Kumobayashi, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 264.
- [143] N. Sayo, T. Salto, Y. Okeda, N. Nagashima, H. Kumobayashi (Takasago Corp.), EP 369691, **1988** [*Chem. Abstr.* **1988**, *113*, 190758].
- [144] R. Schmid, E. A. Broger, *Proceedings of the Chiral Europe '94 Symposium*, Spring Innovations, Stockport, England, **1994**, S. 79.
- [145] R. Noyori, T. Okhuma, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 41; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 40; R. Noyori, T. Okhuma, *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 1493; R. Noyori, S. Hashiguchi in *Applied Homogeneous Catalysis with Organometallic Compounds*, Vol. 1 (Hrsg.: B. Cornils, W. A. Herrmann), VCH, Weinheim, **1996**, S. 559.
- [146] a) S. Hashiguchi, A. Fujii, J. Takehara, T. Ikariya, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7562; b) S. Hashiguchi, K.-J. Haack,

- K. Matsumura, T. Ikariya, R. Noyori, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 300; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 288.
- [147] H. U. Blaser, M. Studer, *Chirality* **1999**, *11*, 459.
- [148] A. Hirao, S. Itsuno, S. Nakahama, N. Yamazaki, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, 315.
- [149] a) E. J. Corey, R. K. Bakshi, S. Shibata, C.-P. Chen, V. K. Singh, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7925; b) R. Hett, Q. K. Fang, Y. Gao, S. A. Wald, C. H. Senanayake, *Org. Process Res. Dev.* **1998**, *2*, 96.
- [150] B. Jiang, Y. Feng, J. Zheng, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 10281.
- [151] E. J. Mathre, T. K. Jones, L. C. Xavier, T. J. Blacklock, R. A. Reamer, J. J. Mohan, E. T. Turner-Jones, K. Hoogsteen, M. W. Baum, E. J. J. Grabowski, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 751; E. J. Mathre, T. K. Jones, L. C. Xavier, T. J. Blacklock, R. A. Reamer, J. J. Mohan, E. T. Turner-Jones, K. Hoogsteen, M. W. Baum, E. J. J. Grabowski, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 763.
- [152] a) J.-C. Caille, M. Bulliard, B. Laboue in *Chirality in Industry II*, Wiley, New York, **1997**, Kap. 20; b) M. Bulliard, *Chiral Chemicals*, Marcel Dekker, New York, **1999**, Kap. II.
- [153] K. Matos, J. A. Corella, E. R. Burkhardt, S. M. Nettles (Mine Safety Appliances Company, USA), US 6218585 [*Chem. Abstr.* **2001**, *134*, 295546].
- [154] L. Deloux, M. Srebnik, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 763.
- [155] M. Tokunaga, J. F. Larrow, F. Kakiuchi, E. N. Jacobsen, *Science* **1997**, *277*, 937.
- [156] J. M. Ready, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6086.
- [157] a) B. G. Main, H. Tucker in *Medicinal Chemistry*, 2. Aufl. (Hrsg.: C. R. Genellin, S. M. Roberts), Academic Press, London, **1993**, S. 187; b) L. H. C. Lund in *Medicinal Chemistry*, 2. Aufl. (Hrsg.: C. R. Genellin, S. M. Roberts), Academic Press, London, **1993**, S. 210; c) Y. Hong, Y. Gao, X. Nie, C. M. Zepp, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5551; d) C. Campo, E. F. Llama, J. L. Bermudez, J. V. Sinisterra, *Biocatal. Biotransform.* **2001**, *19*, 163.
- [158] P. I. Dalko, L. Moisan, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3840; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 3726.
- [159] a) B. Cambou, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **1984**, *26*, 1449; b) A. M. Klibanov, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 114; c) *Enzymatic Reactions in Organic Media* (Hrsg.: A. M. P. Koskinen, A. M. Klibanov), Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK, **1996**; d) G. M. Whitesides, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 617; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 617.
- [160] Y.-F. Wang, J. L Lalonde, M. Momongan, D. E. Bergbreiter, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7200.
- [161] a) R. N. Patel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *38*, 56; R. N. Patel, *Adv. Appl. Microbiol.* **1997**, *43*, 91; b) R. Keller, W. Holla, G. Fülling, M. Schneider (Hoechst AG), EP 321918, **1988** [*Chem. Abstr.* **1988**, *112*, 137568].
- [162] a) E. T. Farinas, T. Butler, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 545; b) E. T. Farinas, U. Schwaneberg, A. Glieder, F. H. Arnold, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 601; c) F. H. Arnold, *Nature* **2001**, *409*, 253.
- [163] a) M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 292; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 284; b) K. A. Powell, S. W. Ramer, S. B. del Cardayré, W. P. C. Stemmer, M. B. Tobin, P. F. Longchamp, G. W. Huisman, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4068; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3948.
- [164] a) J. H. Park, J. H. Koh, J. Park, *Organometallics* **2001**, *20*, 1892; b) H. M. Jung, S. T. Shin, Y. H. Kim, M.-J. Kim, J. Park, *Organometallics* **2001**, *20*, 3370.
- [165] a) O. Pamies, J. E. Bäckvall, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 726; b) F. F. Huerta, A. B. Minidis, J.-E. Bäckvall, *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 321.
- [166] a) P. M. Dinh, J. A. Howarth, A. R. Hudnott, J. M. J. Williams, W. Harris, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7623; b) J. V. Allen, J. M. J. Williams, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1859.
- [167] J. B. Dumas, *Ann. Chim. Phys.* **1874**, *5*, 3.
- [168] R. Csuk, B. I. Glänzer, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 49.
- [169] A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [170] E. Schmidt, H. U. Blaser, P. F. Fauquez, G. Sedelmeier, F. Spindler in *Microbial Reagents in Organic Synthesis* (Hrsg.: S. Servi), Kluwer, Niederlande, **1992**, S. 377.
- [171] A. Hage, D. G. I. Petra, J. A. Field, D. Schipper, J. B. P. A. Wijnberg, P. C. J. Kamer, J. N. H. Reek, P. W. N. M. van Leeuwen, R. Wever, H. E. Schoemaker, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 1025.
- [172] R. A. Holt, S. R. Rigby (Zeneca Ltd.), WO 9405802, **1994** [*Chem. Abstr.* **1994**, *120*, 268348].
- [173] U. Kragl, W. Kruse, W. Hummel, C. Wandrey, *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *52*, 309.
- [174] W. Kruse, U. Kragl, C. Wandrey (Forschungszentrum Jülich GmbH), DE 4436149, **1996** [*Chem. Abstr.* **1996**, *124*, 315156].
- [175] a) T. Suzuki, N. Kasai, R. Yamamoto, N. Minamiura, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, *42*, 270; b) T. Suzuki, H. Idogaki, N. Kasai, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 3109; c) für weitere Informationen siehe: <http://www.daiso.co.jp>.
- [176] a) C. Neuberg, J. Hirsch, *Biochem. Z.* **1921**, *115*, 282; b) C. Neuberg, H. Ohle, *Biochem. Z.* **1922**, *127*, 327; c) verwandte C-C-Verknüpfungen: A. S. Demir, Ö. Sesenoglu, E. Eren, B. Hosrik, M. Pohl, E. Janzen, D. Kolter, R. Feldmann, P. Dünkelmann, M. Müller, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 96.
- [177] G. Hildebrandt, W. Klavehn (Knoll A.-G. Chemische Fabriken in Ludwigshafen a. Rh.), DRP No.548 459, **1932**.
- [178] K. Sakamoto, S. Kita, K. Tsuzaki, T. Morikawa (Fuji Chemical Industries Ltd), WO 0173100, **2001** [*Chem. Abstr.* **2001**, *135*, 256203].
- [179] a) T. Katsuki, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5976; b) T. Katsuki, K. B. Sharpless (Stanford Junior University), US 4471130, **1984** [*Chem. Abstr.* **1985**, *102*, 24872].
- [180] a) R. M. Hanson, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1922; b) Y. Gao, R. M. Hanson, J. M. Klunder, S. Y. Ko, H. Masamune, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5765; c) R. M. Hanson, S. Y. Ko, K. B. Sharpless (Massachusetts Institute of Technology), US 4900847, **1986** [*Chem. Abstr.* **1987**, *106*, 66496].
- [181] a) J. M. Klunder, S. Y. Ko, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3710; b) W. Dougherty, F. Liotta, D. Mondimore, W. Shum, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4389.
- [182] N. Kasai, T. Suzuki, Y. Furukawa, *J. Mol. Catal. B* **1998**, *4*, 237.
- [183] a) Y. Gao, R. M. Hanson, J. M. Klunder, S. Y. Ko, S. Masamune, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5765; b) J. M. Klunder, T. Onami, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1295.
- [184] A. Richards, R. McCague, *Chem. Ind.* **1997**, *11*, 422.
- [185] A. Kleemann, J. Engel, *Pharmaceutical Substances*, 4. Aufl., Thieme, Stuttgart, **2001**, S. 466 und 1067.
- [186] A. Kleemann, J. Engel, *Pharmaceutical Substances*, 4. Aufl., Thieme, Stuttgart, **2001**, S. 1958.
- [187] a) E. N. Jacobsen, I. E. Marko, W. S. Mungall, G. Schröder, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1968; b) I. E. Marko, K. B. Sharpless (Massachusetts Institute of Technology), US 4871855, **1989** [*Chem. Abstr.* **1990**, *112*, 75971]; c) D. Gilheany, B. M. Kim, H.-L. Kwong, K. B. Sharpless, T. Shibata (Massachusetts Institute of Technology), US 5126494, **1991** [*Chem. Abstr.* **1992**, *116*, 127820].
- [188] <http://www.rhodiachirex.com/default.htm>; J. Hartung, K. B. Sharpless (Massachusetts Institute of Technology), US 5260461, **1993** [*Chem. Abstr.* **1993**, *119*, 139588].
- [189] a) W. Harmann, H.-G. Heine, D. Wendisch, *Tetrahedron Lett.* **1977**, 2263; b) H. Kolb, K. B. Sharpless, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 10515.
- [190] a) R. A. Johnson, K. B. Sharpless in *Catalytic Asymmetric Synthesis*, 2. Aufl. (Hrsg.: I. Ojima), Wiley-VCH, Weinheim,

- 2000, S. 395; b) Y. Gao, C. Zepp (Sepracor), WO9317150, **1993** [Chem. Abstr. **1994**, *120*, 119437]; c) R. Pettman, *IBC International Symposium on New Synthetic Methods*, Sanibel Harbour, Fort Myers, Florida, **1998**; (<http://www.albmolecular.com/features/tekreps/vol02/no20/>)
- [191] a) C. Döbler, G. Mehltretter, M. Beller, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3211; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3026; b) M. Beller, C. Döbler, G. Mehltretter, U. Sundermeier (Bayer AG), WO 0064844, **2000** [Chem. Abstr. **2000**, *133*, 309573].
- [192] a) W. Zhang, J. L. Loebach, S. R. Wilson, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2801; b) E. N. Jacobsen, W. Zhang (Research Corporation Technologies Inc.), WO 9114694, **1991** [Chem. Abstr. **1992**, *116*, 106067]; c) E. N. Jacobsen, W. Zhang, L. Deng (Research Corporation Technologies Inc.), WO 9303838, **1993** [Chem. Abstr. **1994**, *120*, 7876].
- [193] [www.rhodiachirex.com](http://www.rhodiachirex.com).
- [194] a) A. Kleemann, J. Engel, *Pharmaceutical Substances*, 4. Aufl., Thieme, Stuttgart, **2001**, S. 1545; b) L. Deng, E. N. Jacobsen, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4320.
- [195] J. F. Larrow, E. N. Jacobsen, Y. Gao, Y. Hong, X. Nie, C. M. Zepp, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1939.
- [196] J. M. Keith, J. F. Larrow, E. N. Jacobsen, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 5.
- [197] Informationen bei <http://www.chirex.com>.
- [198] <http://www.rhodiachirex.com/default.htm>; E. N. Jacobsen, M. Tokunaga, J. F. Larrow (President and Fellows of Harvard College), WO 00/09463, **2000** [Chem. Abstr. **2000**, *132*, 180173].
- [199] J. M. Ready, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2687.
- [200] S. C. Stinson, *Chem. Eng. News* **2001**, *79*, 65.
- [201] <http://www.daiso.co.jp/topics/e0072101.htm>
- [202] A. Abdel-Magid, L. N. Pridgen, D. S. Eggleston, I. Lantos, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 4595.
- [203] J.-D. Bourzat, A. Commercon (Rhone Poulenc Rorer), WO 9209589, **1991** [Chem. Abstr. **1992**, *117*, 251589].
- [204] W. E. Ladner, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7250.
- [205] R. A. Sheldon in *Speciality Chemicals*, Elsevier, London, **1991**.
- [206] E.-I. Fukusaki, S. Satoda, S. Senda, T. Omata, *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, *87*, 103.
- [207] a) A. Gentil, C. Giordano, C. Fuganti, L. Ghirotto, S. Servi, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6635; b) D. R. Dodds, J. L. Lopez (Sepracor, Inc., USA), US 5274300, **1990** [Chem. Abstr. **1990**, *113*, 76620]; c) J. G. Kierkels (DSM N.V., NL), EP 0602740, **1994** [Chem. Abstr. **1994**, *121*, 177874].
- [208] a) H. Matsumae, M. Furui, T. Shibatani, T. Tosa, *J. Ferment. Bioeng.* **1994**, *78*, 59; b) T. Tosa, T. Shibatani, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1995**, *750*, 364; c) A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 208; d) S. Matson (Sepracor, Inc., USA), WO 87/02381, **1986** [Chem. Abstr. **1988**, *108*, 127641].
- [209] a) G. Rossy, L. Zard, A. E. Wick, *Manuf. Chem.* **1993**, *4*, 20; b) A. Kleemann, J. Engel, *Pharmaceutical Substances*, 4. Aufl., Thieme, Stuttgart, **2001**, S. 657.
- [210] K. M. Manoj, A. Archelas, J. Baratti, R. Furstoss, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 695.
- [211] a) J. Zhang, J. Reddy, C. Roberge, C. Senanayake, R. Greasham, M. Chartrain, *J. Ferment. Bioeng.* **1995**, *80*, 244; b) M. Chartrain, C. H. Senanayake, J. P. Rosazza, J. Zhang (Merck & Co., Inc., USA), WO 9612818, **1996** [Chem. Abstr. **1996**, *125*, 56385].
- [212] J. H. Spelberg, J. E. T. van Hylckama Vlieg, L. Tang, D. B. Janssen, R. M. Kellogg, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 41.
- [213] a) N. Kasai, K. Tsujimura, K. Unoura, T. Suzuki, *J. Ind. Microbiol.* **1992**, *9*, 97; b) N. Kasai, T. Suzuki, H. Idogaki (Daiso Co., Ltd., Japan), JP 2000287673, **1999** [Chem. Abstr. **2000**, *133*, 293205].
- [214] N. Kasai, T. Suzuki, Y. Furukawa, *J. Mol. Catal. B* **1998**, *4*, 237 N. Kasai, T. Suzuki, Y. Furukawa (Daiso Co., Ltd., Japan), US 5177007, **1990** [Chem. Abstr. **1991**, *115*, 112848].
- [215] a) T. Suzuki, N. Kasai, R. Yamamoto, N. Minamiura, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1993**, *40*, 273; b) T. Suzuki, N. Kasai, R. Yamamoto, N. Minamiura, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, *42*, 270; c) T. Suzuki, N. Kasai (Daiso Co., Ltd., Japan), EP 0435551, **1990** [Chem. Abstr. **1991**, *115*, 278161]; d) N. Kasai, T. Suzuki (Daiso Co., Ltd., Japan), US 5246843 [Chem. Abstr. **1991**, *115*, 112850].
- [216] a) K. Furuhashi, *CEER Chem. Econ. Eng. Rev.* **1986**, *18*, 21; b) K. Furuhashi (Nippon Mining Co., Ltd., Japan), JP 60214892, **1984** [Chem. Abstr. **1986**, *104*, 87153]; c) K. Furuhashi (Nippon Mining Co., Ltd., Japan), JP 62296888, **1986** [Chem. Abstr. **1986**, *109*, 5300].
- [217] K. Furuhashi, M. Shintani, M. Takagi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1986**, *23*, 218.
- [218] a) K. Kieslich, *Acta Biotechnol.* **1991**, *11*, 559; b) A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 159; c) T. Gareth, M. A. Bertola, A. F. Marx, H. S. Koger (Gist Brocades N.V., NL; Shell Internationale Research Maatschappij B.V.), EP 0256586, **1987** [Chem. Abstr. **1989**, *110*, 7868].
- [219] a) P. D. Gennaro, A. Colmegna, E. Galli, G. Sello, F. Pelizzoni, G. Bestetti, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 2794; b) S. Panke, V. de Lorenzo, A. Kaiser, B. Witholt, M. G. Wubbolts, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 5619; c) S. Bernasconi, F. Orsini, G. Sello, A. Colmegna, E. Galli, G. Bestetti, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9157.
- [220] a) S. Panke, M. Wubbolts, A. Schmid, B. Witholt, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *69*, 91; b) A. Schmid, K. Hofstetter, H.-J. Feiten, F. Hollmann, B. Witholt, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 732; c) A. Schmid, B. Witholt, H.-J. Feiten, S. Panke (ETH Zürich), EP 1106699, **2000** [Chem. Abstr. **2001**, *135*, 4579].
- [221] R. N. Patel, C. G. McNamee, A. Banerjee, J. M. Howell, R. S. Robison, L. Szarka, *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14*, 731.
- [222] A. T. Boam, T. O. Carlsson, D. C. Stuckey, A. G. Livingston in *Proceedings of the Asia-Pacific Conference on Sustainable Energy and Environmental Technology*, World Scientific, Singapore, **1996**, S. 615.