

Asymmetrische Synthesen

Biokatalytische asymmetrische Epoxidierung kombiniert mit NADH-Regenerierung in organisch-wässrigen Emulsionen**Karin Hofstetter, Jochen Lutz, Irene Lang,
Bernard Witholt und Andreas Schmid*

Chirale oxofunktionalisierte Kohlenwasserstoffe sind wichtige Synthesebausteine in der pharmazeutischen und agrochemischen Industrie. Dementsprechend intensiv werden neue und effiziente Katalysatoren für ihre Herstellung entwickelt. In den letzten Jahren wurden zahlreiche chemische Synthesewege für asymmetrische Epoxidierungen beschrieben.^[1,2] Unter anderem haben sich chirale Salen-Mn^{III}-Komplexe und Metalloporphyrine als Katalysatoren bei der Herstellung optisch aktiver Epoxide bewährt. Diese finden eine breite Anwendung für selektive Oxidationen, doch haben sie, bedingt durch Autoxidation, häufig niedrige Wechselzahlen.^[3]

Enzymkatalyse ist eine attraktive Alternative zur homogenen und heterogenen Katalyse chemischer Reaktionen. Sie zeichnet sich aus durch hohe Regio- und Enantioselektivität, hohe Wechselzahlen ($k_{\text{cat}} = 1\text{--}20\text{ s}^{-1}$), breite Substratspektren^[4] und umweltfreundliche Reaktionsbedingungen.^[5] Unterschiedliche biokatalytische Methoden zur Herstellung chiraler Epoxide sind bekannt,^[6] wobei die direkte asymmetrische Synthese aus den entsprechenden Olefinen durch Oxidoreduktasen die eleganteste Lösung ist. Aus dieser Klasse von Enzymen sind Oxygenasen von besonderem Interesse,^[7,8] da sie molekularen Sauerstoff in situ aktivieren können. Reaktive Sauerstoff-Donoren wie Persäuren, Ozon oder Iodosylbenzol werden somit obsolet.

Zurzeit werden Oxygenasen hauptsächlich in Ganzzellverfahren eingesetzt. Diese stabilisieren die meist komplexen Enzymsysteme mit bis zu vier individuellen Proteinen und regenerieren gleichzeitig Coenzyme (basierend auf dem Zellmetabolismus). Ein möglicher Nachteil von Ganzzellverfahren ist etwa die Überoxidation von Produkten durch den zelleigenen Metabolismus. Ebenso muss die Zelle trotz metabolischem und zellulärem Stress teilungsfähig bleiben,

um über eine längere Reaktionszeit als Biokatalysator aktiv zu bleiben. Die Trennung von Produkten aus komplexen Reaktionsgemischen von Zellen, Zelltrümmern, Edukt, Produkt und Katalysator ist nicht immer trivial. Mit der Weiterentwicklung biokatalytischer Prozesse sehen wir im Einsatz isolierter Oxygenasen eine mögliche Alternative zu Ganzzellverfahren. Die zellfreie Anwendung von Oxygenasen ist jedoch noch mit mehreren Schwierigkeiten verbunden.^[9] Das Problem der ausreichenden Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten wurde größtenteils durch die Entwicklung unterschiedlicher Regenerierungssysteme gelöst.^[10] Die größte Herausforderung ist aber nach wie vor die Herstellungen spezifischer, unter Prozessbedingungen stabiler Enzyme.

Hier wird erstmals die Herstellung und die präparative Anwendung einer bakteriellen Monooxygenase als Reagens für die asymmetrische zellfreie Epoxidierung beschrieben. Als Katalysator wurde die wasserlösliche FAD/NADH-abhängige Styrolmonooxygenase (StyAB) aus *Pseudomonas sp.* VLB120 eingesetzt. StyAB katalysiert die enantioselektive Epoxidierung von substituierten Styrolen und styrolähnlichen Edukten wie 1,2-Dihydronaphthalin und Inden.^[11] Das Zweikomponenten-Enzym besteht aus der Oxygenase StyA und der Reduktase StyB.^[12]

In einer Fermentation von *Escherichia coli* JM101 (pSPZ10) im 30-L-Maßstab wurden 1.2 kg Zellen (Nassgewicht) gezüchtet.^[13] Aus 280 g dieser Zellen wurden in einem Reinigungsschritt insgesamt 15 g technisches StyA produziert (Tabelle 1). Diese Menge entspricht mehr als 22000 inter-

Tabelle 1: Parameter für die Anreicherung von StyA mittels Säulenchromatographie.

| Reinigungsschritt | Proteinmenge [g] | StyA-Menge [g] ^[a] | spez. Aktivität [U mg ⁻¹] ^[b] | Gesamtaktivität [kU] | Ausbeute [%] |
|--|------------------|-------------------------------|--|----------------------|--------------|
| Rohextrakt | 59.7 | 16.1 | 0.57 | 24.3 | 100 |
| StyA enthaltende Fraktionen ^[c] | 25.3 | 15.2 | 0.89 ^[d] | 22.5 | 93 |

[a] Berechnet aus dem StyA-Gehalt in den Proteinfractionen. [b] 1 U entspricht der Menge an Produkt in μmol , die in einer Minute gebildet wird. [c] Durch schrittweise Elution mit KCl-Lösung wurden zwei StyA-haltige Fraktionen erhalten. Die Reinheit von StyA in den beiden Fraktionen war 45 und 70 %. [d] Durchschnittliche Aktivität der beiden StyA-Fractionen nach Anionenaustausch-Chromatographie (DEAE-Streamline).

nationalen Einheiten (U). Der technisch reine, lyophilisierte Biokatalysator zeigte über drei Monate keinen messbaren Aktivitätsverlust^[14] und wurde für die Produktion unterschiedlicher Epoxide eingesetzt. Frühere Versuche (nicht beschrieben) wiesen auf eine Desaktivierung von StyA in Gegenwart hoher Edukt- oder Produktkonzentrationen hin. Dieser Effekt hängt möglicherweise mit einer Anlagerung der Epoxide an nucleophile Aminosäurereste zusammen. Die Reaktionen wurden daher in einem Zweiphasensystem durchgeführt, um möglichen Enzymdesaktivierungen vorzubeugen. Dabei diente die organische Phase als Edukt- und Produktspeicher (Abbildung 1).

[*] Dipl.-Natw. K. Hofstetter, Dipl.-Biotech. J. Lutz, Dipl.-Ing. I. Lang, Prof. Dr. B. Witholt, Dr. A. Schmid
Institut für Biotechnologie, HPT
Wolfgang-Pauli-Strasse 16
Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
8093 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 16-331-051
E-mail: andreas.schmid@biotech.biol.ethz.ch

[**] Wir danken Dr. Katja Otto für die Herstellung von StyB, Dipl.-Ing. Ulrich Bauer für die ausgezeichnete technische Mithilfe sowie Dr. Frank Hollmann und Dr. Bruno Bühler für die kritische Korrektur des Manuskriptes. Das Projekt wurde von der EU unterstützt (QLRT-1999-00439).

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

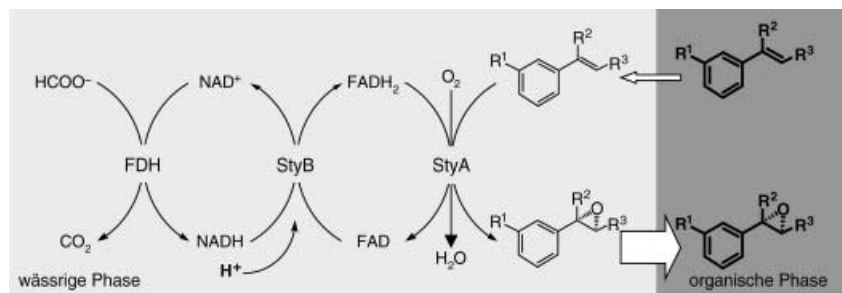


Abbildung 1. Reaktionsschema der biokatalytischen Epoxidierung in einem Zweiphasensystem. Die organische Phase dient als Eduktreservoir und Produktextraktionsphase. Die wässrige Phase enthält Formiat und FDH für die Regenerierung von NADH. StyB überträgt die Reduktionsäquivalente von NADH auf FAD. FADH $_2$ und Sauerstoff sind Cosubstrate für die Epoxidierungsreaktion von Olefinen durch StyA. $\text{R}^1 = \text{H, Cl}$; $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{H, CH}_3$.

Die Verwendung von Dodecan als organische Phase ermöglichte niedrige Substratkonzentrationen in der wässrigen, enzymhaltigen Phase. Somit wurde die Aktivität von StyA nicht maßgeblich beeinflusst.^[15] Die Bildung einer Emulsion verhinderte eine Verlangsamung der Reaktion durch unzureichenden Massentransfer an der Phasengrenzfläche. Die Entstehung eines weißen Aggregats an der Phasengrenze ließ auf Proteindenaturierung während der Reaktion schließen. Dies konnte durch Zugabe von Rinderserumalbumin (BSA) fast vollständig verhindert werden. Das so stabilisierte Enzym zeigte katalytische Aktivität über mehrere Stunden. Die Reduktionsäquivalente für die Aktivierung von molekularem Sauerstoff wurden durch StyB zur Verfügung gestellt,^[16] und die fortlaufende Regenerierung von NADH wurde durch das Formiat/Formiat-Dehydrogenase (FDH)-System mit dem Enzym aus *Pseudomonas sp.* 101 gewährleistet. Diese kommerziell erhältliche FDH-Mutante hat eine erhöhte Lösungsmittelstabilität und eine höhere Substrataffinität als andere Formiatdehydrogenasen.^[17] Maximale Reaktionsgeschwindigkeiten wurden bei vier- bis fünf-fachem Überschuss an FDH-Aktivität, relativ zur Epoxidierungsaktivität, erhalten.^[18] Abbildung 2 zeigt den Verlauf der

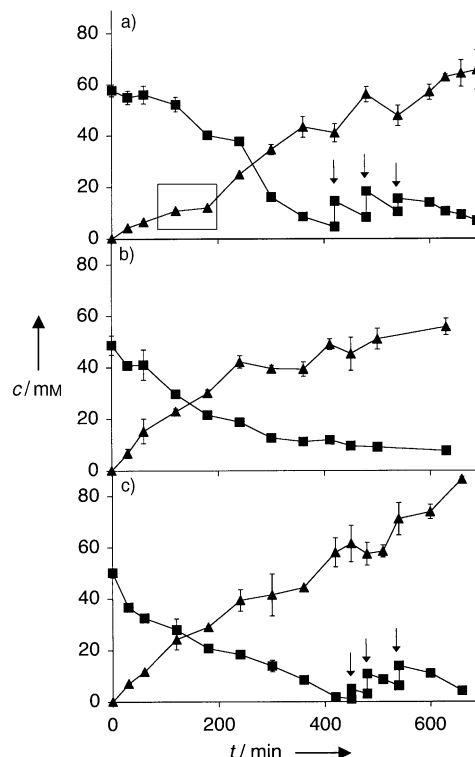


Abbildung 2. Biokatalytische Epoxidierung von unterschiedlichen Styrolderivaten durch StyAB in einem Zweiphasensystem. Verlauf von Eduktabnahme (■) und Produktzunahme (▲) der Epoxidierung von 3-Chlorstyrol (a), α -Methylstyrol (b) und *trans*- β -Methylstyrol (c). Edukt wurde jeweils an den mit einem Pfeil markierten Zeitpunkten während der Biotransformationen a (1.9 mmol) und c (2.5 mmol) zugegeben. Am Anfang der Reaktion a (eingekreist) wurde die Belüftungsrate herabgesetzt. Nach erneuter Steigerung der Belüftung erhöhte sich die Epoxidbildungsgeschwindigkeit.

präparativen Epoxidierungen von 3-Chlorstyrol (**1**), α -Methylstyrol (**2**) und *trans*- β -Methylstyrol (**3**). Zusätzliche Reaktionsparameter sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Reaktionsparameter für die Umsetzung unterschiedlicher Styrolerivate zu den entsprechenden Epoxiden in einem Zweiphasensystem mit isolierter Styrolmonooxygenase StyAB.

| Edukt | Produkt | Eduktkonz. [mM] | Umsatz [%] | P_0 [U g^{-1}] ^[a] | P_D [U g^{-1}] ^[b] | TN_{StyA} ^[c] | TN_{NAD^+} ^[d] | ee | Ausbeute nach Produktreinigung [%] |
|-------|---------|-------------------------|------------|--|--|--|---|--------|------------------------------------|
| | | 50 (+25) ^[e] | 90.5 | 108 | 48 | 2171 | 66 | > 99.9 | 73 |
| | | 50 | 87.9 | 112 | 44 | 1844 | 56 | 98.1 | 75 |
| | | 50 (+19) ^[e] | 95.3 | 118 | 66 | 2867 | 87 | 99.7 | 87 |

[a] Anfangsproduktivität P_0 : Aktivität in den ersten 30 Minuten der Reaktion. [b] Durchschnittliche Produktivität P_D : Durchschnittliche Aktivität, die über die gesamte Reaktionsdauer gemessen wurde. [c] TN_{StyA} : Wechselzahl für StyA = (Mol gebildetes Produkt) (Mol eingesetztes StyA) $^{-1}$ [d] TN_{NAD^+} : Wechselzahl für NAD $^+$ = (Mol gebildetes Produkt) (Mol eingesetztes NAD $^+$) $^{-1}$ [e] In Klammern ist die Substratmenge angegeben, die während der Reaktion zugegeben wurde.

Hohe Belüftungsraten führten vermehrt zu Proteindenaturierung an der Gas-flüssig-Grenzschicht. Gleichzeitig musste jedoch eine Sauerstofflimitierung verhindert werden, da Sauerstoff ein Cosubstrat der Epoxidierungsreaktion ist. Der eingerahmte Bereich in Abbildung 2a zeigt den Einfluss der Belüftungsrate auf die Aktivität von StyA. Eine reduzierte Belüftungsrate zu Beginn der Reaktion führte zu einer verminderten Umsatzgeschwindigkeit. Nach Erhöhung der Luftzufuhr nahm die Epoxidbildungsgeschwindigkeit zu. Die höchste Umsatzgeschwindigkeit wurde bei einer 10-proz. Sättigung der Lösung mit Sauerstoff gemessen, und es wurde kein signifikanter Proteinverlust durch Denaturierung festgestellt. Unter diesen Bedingungen war es möglich, fast ein Gramm der unterschiedlichen Epoxide zu synthetisieren. Der Enantiomerenüberschuss lag bei allen hergestellten Epoxiden über 98%, und die Reaktionen verliefen mit einem Umsatz von über 87%. Außer Spuren von Diolen (durch spontane nichtenzymatische Hydrolyse),^[19] Phenethylalkoholen und Phenylacetaldehyden wurden keine weiteren Nebenprodukte nachgewiesen.

Die erreichten volumetrischen Produktivitäten ($\approx 1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) des Katalysators liegen schon jetzt im Bereich der für Ganzzell-Oxidationen beschriebenen Produktivitäten.^[11,20,21] Es wurde eine fast vollständige Umsetzung bei hohen Eduktkonzentrationen erreicht, was bislang mit anderen isolierten Oxygenasen in Zweiphasensystemen nicht möglich war.^[22] Unter Prozessbedingungen wurden für StyA Wechselzahlen von 1800–2800 und durchschnittliche Reaktionsgeschwindigkeiten von $3\text{--}4.3 \text{ min}^{-1}$ erreicht. Diese Werte sind vielversprechend, verglichen mit Wechselzahlen von weniger als 1000 und Reaktionsgeschwindigkeiten unter 1 min^{-1} für chemische Katalysatoren, die ähnliche Reaktionen katalysieren.^[23] Auch ist die Reinigung der erhaltenen Produkte einfach. Interessant ist auch die stereoselektive Epoxidierung sterisch gehinderter C-C-Doppelbindungen durch StyA. Dadurch wird das bis jetzt in chemisch katalysierten Reaktionen eingesetzte Substratspektrum erweitert.^[1,24] Die Umsatzgeschwindigkeit von StyA im Reaktionsansatz war achtmal geringer als in Kurzzeitexperimenten im Zweiphasensystem. Deshalb werden sich weitere Untersuchungen des Reaktionssystems auf die Erhöhung der Wechselzahlen von StyA konzentrieren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der modulare Charakter der präsentierten biokatalytischen Reaktion den Austausch einer oder mehrerer Komponenten für weitere Epoxidierungen erlaubt, wie auch für spezifische Hydroxylierungen, Baeyer-Villiger- oder Heteroatomoxidationen. Diese Studie eröffnet neue Perspektiven der zellfreien, enzymatischen Oxygenierungsreaktionen für die asymmetrische Herstellung von enantiomerenreinen oxofunktionalisierten Kohlenwasserstoffen.

Experimentelles

Chemikalien: Edukte wurden von Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland, erworben. Die Herstellung der Epoxidstandards wurde in Lit. [11] beschrieben. Flavinadenindinucleotid (FAD), Natriumformiat, β -Nicotinamidenindinucleotid (NAD^+), Pufferkomponenten und Lösungsmittel stammen von Fluka AG, Schweiz.

Zellkultur: Die Züchtung von *E. coli* (pSPZ10)^[8] (mit den Genen der Styrolmonooxygenase, *styAB*) erfolgte nach dem Protokoll von Panke et al.,^[21] jedoch wurde statt eines Zweiphasen- ein Einphasensystem verwendet. Die Induktion der *styAB*-Expression erfolgte durch Zusatz von 0.05% (v/v) Dicyclopropylketon (Fluka AG, Schweiz).

Anreicherung von StyA im Großmaßstab: 280 g Zellen (Nassgewicht) wurden mit einer Kugelmühle aufgeschlossen. Der erhaltene Rohextrakt wurde direkt auf 500 mL DEAE-Streamline in einer Streamline⁵⁰-Säule im expandierten Zustand geladen. Nachdem der Durchfluss klar wurde, wurde das Bett gepackt. Die Protein-elution erfolgte mit einem diskontinuierlichen Salzgradienten von 0 über 0.16 auf 0.24 M KCl über 6 L 20 mM Tris pH 6.8. StyA wurde in jeder Fraktion nach Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese quantifiziert, außerdem wurde die Epoxidierungsaktivität bestimmt.^[25] Fraktionen mit StyA wurden mit 1% (w/v) Saccharose und 2% (w/v) Mannit versetzt und lyophilisiert (Lyovac GT 3, Leybold-Heraeus GmbH, Deutschland).

Zweiphasenreaktion: Die präparative Synthese der Epoxide erfolgte in 350 mL-Sixforce-Reaktoren (Infors HT, Schweiz), bei pH 7.5, 30°C und 400 rpm Rührgeschwindigkeit. Die wässrige Phase enthielt 2 g L^{-1} StyA, 0.03 g L^{-1} StyB, 0.1 mM FAD, 50 mM Formiat, 8 U mL^{-1} FDH (Jülich Fine Chemicals, Deutschland), 250 U mL^{-1} Katalase (Fluka AG, Schweiz), 2 g L^{-1} BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) und 1 mM NAD^+ in insgesamt 100 mL 50 mM Tris-Puffer (pH 7.5). Die organische Phase bestand aus 100 mL Dodecan mit 50 mM Edukt. Stündlich wurde 1 mmol Formiat zugegeben. Die beiden Phasen wurden nach der Umsetzung durch Zentrifugieren (1000 g, 30 min, 4°C) getrennt, und der Enantiomerenüberschuss (*ee*) wurde ermittelt.^[26]

Produktreinigung: Reaktionsprodukte wurden über Kieselgel (Fluka AG, Schweiz) aus der organischen Phase gereinigt. Die Edukte und die organische Phase wurden mit 1% Triethylamin in Hexan eluiert. Die Produkte (0.78 g **1a**, 0.51 g **2a** und 0.88 g **3a**) wurden mit dem gleichen Elutionsmittel, dem 10% Diethylether zugegeben wurde, von der Säule gewaschen.

Eingegangen am 17. November 2003 [Z53338]

Stichwörter: Asymmetrische Synthesen · Coenzyme · Enzymkatalyse · Epoxidierungen · Zweiphasenkatalyse

- [1] T. Katsuki, *Coord. Chem. Rev.* **1995**, *140*, 189–214.
- [2] a) T. Katsuki, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5974–5976; b) E. N. Jacobsen in *Catalytic Asymmetric Synthesis*, VCH, New York, **1993**, S. 159–201; c) J. T. Groves, R. S. Myers, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5786–5791; d) C. Bolm, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 414–415; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 403–404.
- [3] a) J. R. L. Smith, G. Reginato, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2543–2549; b) J.-L. Zhang, Y.-L. Liu, C.-M. Che, *Chem. Commun.* **2002**, 23, 2906–2907; c) E. Brulé, Y. R. de Miguel, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 8555–8558; d) B. Clapham, T. S. Reger, K. D. Janda, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4637–4662.
- [4] S. M. Resnick, K. Lee, D. T. Gibson, *J. Ind. Microbiol.* **1996**, *17*, 438–457.
- [5] R. B. Silverman, *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*, 1. Aufl., Academic Press, San Diego.
- [6] Einen Überblick geben die folgenden Artikel: a) E. J. de Vries, D. B. Janssen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 414–420; b) A. Archelas, R. Furstoss, *Top. Curr. Chem.* **1999**, *200*, 160–191; c) J. A. M. de Bont, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1331–1340.
- [7] a) E. J. Allain, L. P. Hager, L. Deng, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4415–4416; b) S. Colonna, N. Gaggero, L. Casella, G. Carrea, P. Pasta, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*,

- 1325–1330; c) F. P. Guengerich, *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *409*, 59–71; d) M. Sono, M. P. Roach, E. D. Coulter, J. H. Dawson, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2841–2887; e) M. G. Wubbolts, S. Panke, J. B. van Beilen, B. Witholt, *Chimia* **1996**, *50*, 436; f) B. J. Wallar, J. D. Lipscomb, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2625–2658; g) E. I. Solomon, T. C. Brunold, M. I. Davis, J. N. Kemsley, S.-K. Lee, N. Lehnert, F. Neese, A. J. Skulan, Y.-S. Yang, J. Zhou, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 235–349; h) P. D. Gennaro, A. Colmegna, E. Galli, G. Sello, F. Pelizzoni, G. Bestetti, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 2794–2797.
- [8] S. Panke, M. G. Wubbolts, A. Schmid, B. Witholt, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *69*, 91–100.
- [9] V. L. Vilker, V. Reipa, M. Mayhew, M. J. Holden, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, *76*, 1283–1289.
- [10] a) F. Hollmann, B. Witholt, A. Schmid, *J. Mol. Catal. B* **2002**, *19–20*, 167–176; b) C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4890–4899; c) H. K. Chenault, G. M. Whitesides, *Bioorg. Chem.* **1989**, *17*, 400–409; d) W. A. van der Donk, H. Zhao, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 421–426; e) Z. Shaked, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7104–7105.
- [11] A. Schmid, K. Hofstetter, H.-J. Feiten, F. Hollmann, B. Witholt, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 732–737.
- [12] K. Otto, K. Hofstetter, B. Witholt, A. Schmid in *Flavins and Flavoproteins* (Hrsg.: S. Chapman, R. Perham, N. Scrutton), Rudolf Weber, Berlin, **2002**, S. 1027–1033.
- [13] Effiziente heterologe Expression von Oxygenasegenen kann durch die Einführung des regulatorischen *alk*-Systems erhalten werden. Dieses System wird beschrieben in: a) I. E. Staijen, J. B. van Beilen, B. Witholt, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1957–1965; b) S. Panke, V. de Lorenzo, A. Kaiser, B. Witholt, M. G. Wubbolts, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 5619–5623.
- [14] Daten siehe Hintergrundinformationen.
- [15] Der Verteilungskoeffizient für Styrol und Styroloxid in Dodecan als organischem Lösungsmittel und Wasser liegt bei 500 bzw. 50. Deshalb wird während der Umsetzung nur eine geringe Produktinhibition der Epoxidierungsaktivität von StyA erwartet.
- [16] Reduktionsäquivalente können auch durch andere NAD(P)H-Flavin-Reduktasen oder chemische Mediatoren nachgeliefert werden. StyB wird einfach aus rekombinanten *E. coli* durch Inclusion-Body-Isolierung gereinigt. Diese Methode ist beschrieben in: Lit. [12].
- [17] V. I. Tishkov, A. G. Galkin, G. N. Marchenko, O. A. Egorova, D. V. Sheluho, L. B. Kulakova, L. A. Dementieva, A. M. Egorov, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *192*, 976–981.
- [18] StyA-FDH-Verhältnis siehe Hintergrundinformationen.
- [19] Stabilität der Epoxide siehe Hintergrundinformationen.
- [20] a) S. D. Doig, L. M. O'Sullivan, S. Patel, J. M. Ward, J. M. Woodley, *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 265–274; b) B. Bühler, I. Bollhalder, B. Hauer, B. Witholt, A. Schmid, *Bio-technol. Bioeng.* **2003**, *82*, 833–842.
- [21] S. Panke, M. Held, M. G. Wubbolts, B. Witholt, A. Schmid, *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *80*, 33–41.
- [22] a) A. Schmid, I. Vereyken, M. Held, B. Witholt, *J. Mol. Catal. B* **2001**, *11*, 455–462; b) J. Lutz, V. V. Mozhaev, Y. L. Khmelnsky, B. Witholt, A. Schmid, *J. Mol. Catal. B* **2002**, *19–20*, 177–187; c) U. Schwarz-Linek, A. Krödel, F.-A. Ludwig, A. Schulze, S. Rissom, U. Kragl, V. I. Tishkov, M. Vogel, *Synthesis* **2001**, *6*, 947–951.
- [23] a) P. Pietikäinen, *J. Mol. Catal. A* **2001**, *165*, 73–79; b) G. Pozzi, M. Cavazzini, F. Cinato, F. Montanari, S. Quici, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, *1999*, 1947–1995; c) S. H. R. Abdi, R. I. Kureshy, N. H. Khan, M. M. Bhadbhade, E. Suresh, *J. Mol. Catal. A* **1999**, *150*, 185–194.
- [24] a) N. Hosoya, A. Hatayama, R. Irie, H. Sasaki, T. Katsuki, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 4311–4322; b) R. Zhang, W.-Y. Yu, K.-Y. Wong, C.-M. Che, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8145–8153; c) K.-H. Ahn, S. W. Park, S. Choi, H.-J. Kim, C. J. Moon, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2485–2488.
- [25] Reaktionsbedingungen für standardisierte Aktivitätsmessungen von StyA siehe Hintergrundinformationen.
- [26] Standardbedingungen für die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses siehe Hintergrundinformationen.