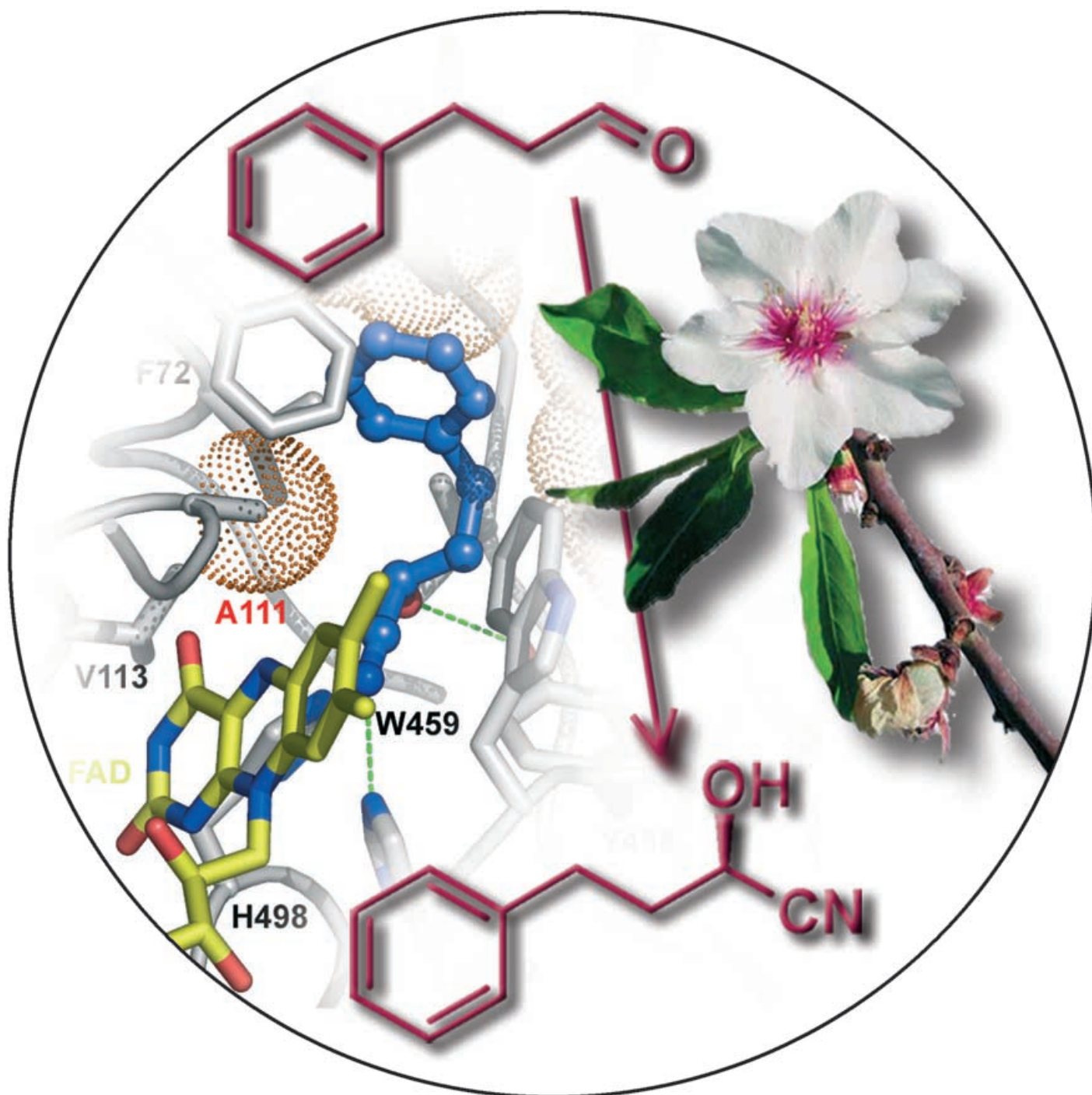


# Zuschriften



Das aktive Zentrum von Mandel-Hydroxynitrilase wurde umgestaltet, um Enzymvarianten für die hoch enantioselektive Synthese von (*R*)-2-Hydroxy-4-phenylbutyronitril in industriellem Maßstab zu erzeugen. K. Gruber, A. Glieder et al. beschreiben die Entwicklung dieser Biokatalysatoren in der Zuschrift auf den folgenden Seiten.

## Erhöhung der Enantioselektivität von Mandel-*R*-HNL durch rationales Design des aktiven Zentrums\*\*

Roland Weis, Richard Gaisberger, Wolfgang Skranc,  
Karl Gruber\* und Anton Glieder\*

Die enzymkatalysierte Addition von HCN an Aldehyde oder Ketone durch Hydroxynitrilysasen (HNLs) ermöglicht eine quantitative und stereoselektive Bildung von C-C-Bindungen. Die daraus resultierenden enantiomerenreinen Cyanhydrine sind Schlüsselbausteine in einer Vielzahl chemischer Synthesen.<sup>[1]</sup> In der Natur existieren sowohl *R*- als auch *S*-selektive HNLs, und mehrere Gene wurden bereits kloniert und exprimiert.<sup>[1]</sup> Beispielsweise wird das rekombinante Isoenzym 5 der Mandel-HNL (*PaHNL5*) von *Pichia pastoris* in den Kulturüberstand sekretiert. So kann es ohne vorherige Enzymaufreinigung oder Immobilisierung direkt für biokatalytische Umsetzungen in wässrigen oder zweiphasigen Systemen verwendet werden. Stabilität in saurer Lösung (zur Unterdrückung der unselektiven nichtenzymatischen Hintergrundreaktion) sowie eine hohe Enantioselektivität sind weitere Anforderungen für die industrielle Anwendung dieses Enzyms. Obwohl die ausgeprägte Stabilität der rekombinanten *PaHNL5* bei niedrigen pH-Werten sogar mit langsam reagierenden Substraten bereits stereoselektive enzymatische Synthesen in wässrigen und zweiphasigen Systemen ermöglicht hat,<sup>[1,2]</sup> reicht die Enantioselektivität in einigen Fällen noch nicht für eine biokatalytische Anwendung in großem Maßstab aus.

Innerhalb der Substratpalette<sup>[3]</sup> von *PaHNL5* sind jene Substanzen von besonderem Interesse, bei denen die Aldehydfunktion durch eine oder mehrere Methylengruppen von einer aromatischen Gruppe getrennt ist. Wie beim natürlichen Substrat Mandelonitril (Benzaldehydcyanhydrin) dürfte der aromatische Ring eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Bindung dieser Substrate spielen.<sup>[4]</sup> Andererseits redu-

zieren die Distanz zur funktionellen Gruppe wie auch die flexible Konformation des Alkylbindestücks den Einfluss des aromatischen Rings auf die Stereoselektivität der Reaktion. Unter diesen aromatischen Substraten mit räumlich entfernter reaktiver Gruppe sind 3-Phenylpropionaldehyd (**1a**) und 3-Phenylpropenal (**2a**, *trans*-Zimtaldehyd), oder die entsprechenden Cyanhydrine (*R*)-2-Hydroxy-4-phenylbutyronitril (**1b**) bzw. (*R*)-2-Hydroxy-4-phenyl-3-butenitril (**2b**), aus kommerzieller Sicht die wichtigsten Repräsentanten. Diese Cyanhydrine können durch saure Hydrolyse in enantiomerenreine  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren umgewandelt werden, die ihrerseits wichtige Zwischenprodukte für die Synthese einer Klasse von „Angiotensin-Converting-Enzyme“-Inhibitoren (ACEi) mit dem Überbegriff „Prile“<sup>[5]</sup> darstellen. **2a** wurde häufig als besonders schlecht umsetzbares Substrat beschrieben. Alternativ führt die palladiumkatalysierte Hydrierung des resultierenden Cyanhydrins **2b** ebenso zu (*R*)-2-Hydroxy-4-phenylbuttersäure.<sup>[6]</sup> **2b** reagiert darüber hinaus als vielseitiges Zwischenprodukt unter asymmetrischer Epoxidierung, Dihydroxylierung oder Addition von Halogenen.<sup>[7]</sup> Da nur das *R*-Enantiomer von **2b** eine Zwischenstufe für pharmakologisch aktive „Prile“ darstellt, erfordert die kommerzielle Produktion einen hohen Enantiomerenüberschuss (*ee* > 95 %); außerdem sind eine hohe Ausbeute (> 95 %), ein umweltverträglicher Prozess und ökonomische Reaktionszeiten bei einem niedrigen Enzym/Substrat-Verhältnis wünschenswert. Eine Trennung der beiden Enantiomere gelang zwar durch Kristallisation von Diastereomeren, allerdings nur mit 68 % Ausbeute.<sup>[8]</sup> Alternative Synthesewege (z. B. über die enantioselektive Reduktion von Keto- oder Diketoestern) sind komplizierter oder benötigen teure Ausgangsverbindungen.<sup>[5,9]</sup>

Wir haben ein biokatalytisches Verfahren für die Synthese dieser chiralen Bausteine in großem Maßstab untersucht, bei dem geringe Mengen rekombinanter *PaHNL5* (17  $\mu$ g Enzym pro mmol Substrat **1a**) verwendet werden (Schema 1). Dieser Syntheseweg geht von kostengünstigen Substraten aus, minimiert die Anzahl der Arbeitsschritte und bietet zusätzlich die Möglichkeit einer fraktionierenden Kristallisation nach der Hydrolyse der Cyanhydrine zur Gewinnung von reinem Produkt. **1a** wurde mit rekombinanter *PaHNL5* innerhalb von vier Stunden annähernd vollständig (93 %) zu **1b** mit 89.4 % *ee* umgesetzt (Tabelle 1, Eintrag 1). Um den zusätzlichen Reinigungsschritt einer Kristallisation zur Enantiomeren-trennung zu vermeiden, benötigten wir allerdings ein noch selektiveres Mutein.

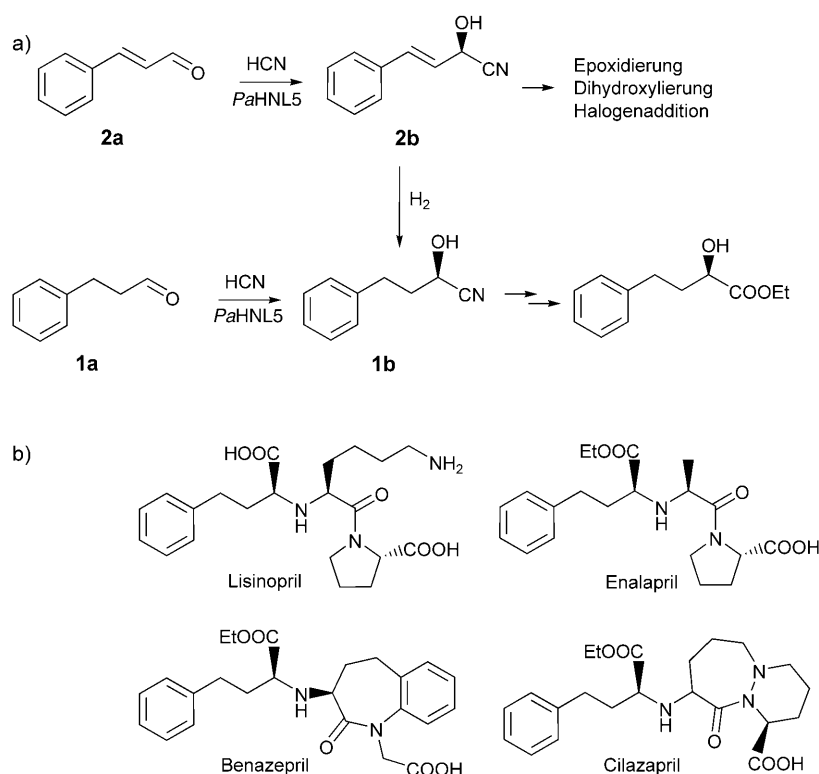
Durch gerichtete Evolution konnte die Enantioselektivität von vielen (hauptsächlich bakteriellen) Enzymen effizient beeinflusst werden.<sup>[10]</sup> Obwohl die Expression von *PaHNL*-Isoenzymen in *E. coli* möglich ist, konnte *PaHNL5* bis jetzt nur in *Pichia pastoris* in hoch aktiver Form produziert werden.<sup>[1,11]</sup> *P. pastoris* ist aber kein verlässliches Wirtssystem für die gerichtete Evolution. Darüber hinaus verhindert ein Codon-Dilemma<sup>[12]</sup> den Zugang zu allen theoretisch möglichen Aminosäure-Austauschen durch Punktmutationen – vor allem wenn nur wenige tausend Mutanten untersucht werden können. Aufbauend auf unserem kürzlich beschriebenen Design eines Muteins mit höherer katalytischer Aktivität für sterisch anspruchsvolle Mandelonitril-Derivate,<sup>[1a]</sup> verbes-

[\*] R. Weis, R. Gaisberger, Prof. Dr. K. Gruber, Prof. Dr. A. Glieder  
Kompetenzzentrum Angewandte Biokatalyse GmbH  
Petersgasse 14, 8010 Graz (Österreich)  
Fax: (+43) 316-873-4072  
E-mail: karl.gruber@a-b.at  
glieder@glieder.com

Dr. W. Skranc  
DSM Fine Chemicals Austria Nfg. GmbH & Co KG  
R & D Center Linz  
St.-Peter-Straße 25, 4021 Linz (Österreich)

[\*\*] Wir danken DSM, der FFG, dem Land Steiermark, der SFG und der Stadt Graz für finanzielle Unterstützung, H. Mandl vom Kompetenzzentrum Angewandte Biokatalyse, I. Wirth und O. Maurer von DSM für ausgezeichnete technische Unterstützung, K. Faber, C. Kratky und W. Kroutil für wertvolle Kommentare zum Manuskript sowie P. Nagl für die Illustration.

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



**Schema 1.** a) Enantioselektive Synthese von (R)-2-Hydroxy-4-phenylbutyronitril (**1b**) und (R)-2-Hydroxy-4-phenylbutanenitril (**2b**) aus 3-Phenylpropionaldehyd (**1a**) bzw. 3-Phenylpropenal (**2a**). So wird (R)-2-Hydroxy-4-phenylbuttersäure produziert, die ein Intermediat der Synthese der „Prile“ ist. b) Einige Beispiele für „Prile“.

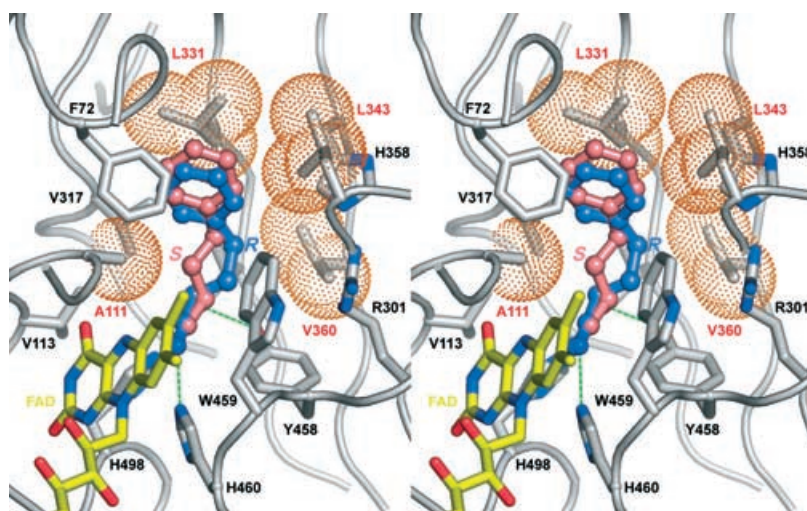
**Tabelle 1:** Vergleich der Eigenschaften der Muteine und des Ausgangsenzyms PaHNL5 bei der enantioselektiven Hydrocyanierung von **1a**.<sup>[a]</sup>

Nr.	Enzym	Umsatz [%]	ee [%]
1	PaHNL5	93	89.4
2	A111VL331A	30	≈0
3	A111G	40	15.2
4	A111VL343A	40	27.6
5	A111V	16	60.2
6	L331F	80	63.1
7	A111GV360M	75	64.7
8	L343A	83	68.8
9	L343F	95	74.4
10	V360M	93	86.7
11	A111GV360I	92	87.6
12	L331A	94	88
13	V360I	98	95.3

[a] 30 mmol **1a** und 0.5 mg Enzym (17  $\mu\text{g mmol}^{-1}$  Substrat), 4 h, 10°C, pH 3.4.

serten wir hier durch einen strukturgestützten Ansatz die Enantioselektivität dieser Lyase. Unseres Wissens ist dies das erste Beispiel für ein erfolgreiches rationales Design von Lyasen zur Steigerung der Enantioselektivität; allerdings haben auch rationale Ansätze mit HNL-Varianten aus *Manihot esculenta* für besseren Substrattransport die Enantioselektivität für mehrere Substrate erhöht.<sup>[13]</sup>

In berechneten Strukturmodellen der Komplexe von PaHNL5 mit (R)-**1b** und (S)-**1b** ist die Phenylgruppe bei beiden Substraten in nahezu identischer Position gebunden, und auch die mechanistisch wichtigen polaren Wechselwirkungen der Hydroxy- und Cyangruppen mit His498 und His460 sind konserviert (Abbildung 1).<sup>[4]</sup> Deutliche Unterschiede ergaben sich nur für die Wechselwirkungen des Enzyms mit dem Alkylbindestück von **1b**, das im Komplex des S-Enantiomers in Richtung von Ala111 und beim R-Enantiomer in Richtung von Val360 orientiert ist (Abbildung 1, siehe auch das Video in den Hintergrundinformationen). Diese Pseudo-Spiegelsymmetrie war der Ausgangspunkt für die gezielte Modifizierung des aktiven Zentrums von PaHNL5, bei der das zugängliche Volumen für das jeweilige Enantiomer eingeschränkt oder vergrößert wurde. Ähnliches wurde schon für einige erfolgreich evolvierte Enzyme beobachtet.<sup>[14]</sup> Ausgewählte Aminosäuren im aktiven Zentrum wurden unter Beibehaltung des hydrophoben Charakters der Bindestelle gegen Reste unterschiedlicher Größe ausgetauscht. Da Ala111 und Val360 stark mit der Alkylkette des Substrats wechselwirken, sind sie besonders interessante Stellen für Mutationen. Gleiches gilt für Leu331 und Leu343, die hauptsächlich mit der Phenylgruppe wechselwirken und einen Teil des Eingangstunnels zum aktiven Zentrum bilden. Insgesamt wurden 24 Mutanten in silico modelliert; davon wurden 12 – und zwar jene mit den größten vorausgesagten Änderungen der Enantioselektivität – präpariert und experimentell analysiert. In einer ersten Hydrocyanierung von **1a** mit kleinen Mengen an Mutein zeigte V360I die höchste Selektivität, wohingegen A111G wie erwartet wenig stereoselektiv war (Tabelle 1). Für exaktere Analysen wurden jeweils 2 g



**Abbildung 1.** Stereobild der Überlagerung der modellierten Komplexe von PaHNL5 mit (R)-**1b** (blau) und (S)-**1b** (rosa). Aminosäure-Seitenketten sind hellgrau, der FAD-Cofaktor gelb, N- und O-Atome sind blau bzw. rot wiedergegeben. Die für die Mutagenese selektierten Aminosäuren sind rot gekennzeichnet, ihre entsprechenden Van-der-Waals-Volumina sind durch kleine Kugeln abgegrenzt. Das Bild wurde mit dem Programm PyMol erzeugt (<http://www.pymol.org>).

(15 mmol) **1a** mit 1 mg der vier selektivsten Muteine umgesetzt (67  $\mu\text{g}$  Enzym pro mmol Substrat, Einträge 10–13). Die Varianten L331A, V360M und V360I (Tabelle 2, Einträge 3, 4 und 5) setzten dabei das Substrat innerhalb von vier Stunden mit signifikant erhöhter Enantioselektivität um. Am Ende der Umsetzung zeigte das von A111GV360I produzierte **1b** zwar auch eine etwas erhöhte Enantioselektivität (91.8 % *ee*), die Umsetzung war jedoch langsamer.

Die Umsatzgeschwindigkeiten von **1a** mit jedem einzelnen Mutein wurden bestimmt; dazu wurde die Enzymmenge jeweils so angepasst, dass die Geschwindigkeit während der ersten 20 Minuten in einem annähernd linearen Bereich lag. Die unter diesen Bedingungen erhaltenen spezifischen Aktivitäten (Tabelle 2) wurden für den Vergleich der Muteine bei der Cyanhydrinsynthese herangezogen, obwohl aus solchen Zahlenwerten aufgrund der nichtlinearen Kinetik von *PaHNL5*-katalysierten Reaktionen in zweiphasigen Systemen nicht direkt  $k_{\text{cat}}$ -Werte für höhere Enzymkonzentrationen abgeleitet werden können. Die Einführung von Isoleucin an der Position 360 verbesserte die Enantioselektivität auf mehr als 96 % *ee* und beschleunigte die Umwandlung von **1a** beinahe 6fach. Daher war die Umsetzung binnen weniger Stunden mit einem niedrigen Enzym/Substrat-Verhältnis abgeschlossen. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde vergleichsweise mindestens die 30fache Menge an Enzym verwendet.<sup>[6]</sup> Die Mutationen L331A und überraschenderweise auch A111GV360I zeigten ebenfalls eine leicht erhöhte Katalysegeschwindigkeit. Allerdings sank die Umsatzgeschwindigkeit von A111GV360I, im Unterschied zu den anderen Muteinen, mit Fortschreiten der Reaktion.

Alle Muteine mit erhöhter Enantioselektivität bei der Synthese von **1b** wurden auch in der Umsetzung von 15 mmol der starrereren Verbindung **2a** zu **2b** untersucht (Tabelle 3). Zwei der Muteine ergaben für **2a** höhere Selektivitäten, und wieder lieferte V360I mit ca. 98 % *ee* das beste Resultat.

Zusätzlich wandelten alle Mutationen außer V360M das Substrat **2a** schneller um als das Ausgangsenzym *PaHNL5*. Die Kombination aus höherer Steifigkeit von **2a** (verglichen mit **1a**) und größerem Platzbedarf des Methioninrests könnte die geringere Aktivität der V360M-Variante erklären. Der Umsatz mit nur 27  $\mu\text{g}$  *PaHNL5*-V360I pro mmol **2a** war nach drei Stunden annähernd vollständig, und das Produkt **2b** wurde überdies mit ausgezeichnetem Enantiomerenüberschuss erhalten (ca. 98 % *ee*). Gerrits und Mitarbeiter benötigten dagegen Reaktionszeiten von 168 Stunden für 97 % Ausbeute bei 98 % *ee*.<sup>[15]</sup> Kürzlich wurden durch den Einsatz von „vernetzten Enzymaggregaten“ (cross-linked enzyme aggregates, CLEAs) aus nativer Mandel-HNL hohe Enantioselektivitäten bei kurzen Reaktionszeiten erzielt.<sup>[16]</sup>

Durch strukturgestütztes rationales Design wurden rekombinante *PaHNL5*-Varianten für die stereoselektive Synthese von aromatischen Cyanhydrinen mit einem Phenylring in entfernter Position in großem Maßstab in einem wässrigen System entwickelt. Vier der 24 entworfenen und 12 präparierten, gut exprimierten ortsspezifischen Mutanten des *PaHNL5*-Gens zeigten signifikant erhöhte Stereoselektivität. Alle Muteine waren bei niedrigem pH-Wert in den wässrigen Systemen stabil. Besonders gute Ergebnisse lieferte die Variante *PaHNL5*-V360I, die den Enantiomerenüberschuss für die Umsetzung von **1a** auch bei sehr niedrigem Enzym/Substrat-Verhältnis auf über 96 % erhöhte. Dieses Mutein reduzierte die benötigte Menge an Biokatalysator für die Herstellung von enantiomerenreiner (*R*)-2-Hydroxy-4-phenylbuttersäure (und ihren Derivaten) um das 10- bis 30fache. Mit sehr geringen Mengen an *PaHNL5*-V360I konnte auch das Cyanhydrin **2b** innerhalb von nur drei Stunden mit ca. 98 % *ee* produziert werden. Die Reaktionszeit für diese schlecht reagierenden Substrate wurde von 168 auf drei Stunden herabgesetzt. Interessanterweise zeichneten sich unsere am Computer entworfenen, selektiveren Muteine

**Tabelle 2:** Umsatz und Enantioselektivität des Ausgangsenzyms *PaHNL5* und ausgewählter Muteine bei der Hydrocyanierung von **1a**.<sup>[a]</sup>

Nr.	Enzym	Reaktionszeit						TOF <sup>[d]</sup> [s <sup>-1</sup> ]
		1 h		2 h		4 h		
		Ums. <sup>[b]</sup> [%]	ee [%]	Ums. <sup>[b]</sup> [%]	ee [%]	Ums. <sup>[b]</sup> [%]	ee [%]	
1	<i>PaHNL5</i>	72	89.0	87	90.1	96	90.2	2497 ± 208
2	A111GV360I	70	90	83	90.6	94	91.8	3379 ± 208
3	L331A	78	90.7	90	93.3	95	92.9	2865 ± 312
4	V360M	78	93.6	93	94.0	97	94.6	6812 ± 837
5	V360I	86	96.0	96	96.6	98	96.7	14 397 ± 416

[a] 15 mmol **1a**, 1 mg Enzym (67  $\mu\text{g}$  mmol<sup>-1</sup> Substrat), 10 °C, pH 3.4. [b] Umsatz. [c] TOF: Umsatzzahl.

**Tabelle 3:** Umsatz und Enantioselektivität des Ausgangsenzyms *PaHNL5* und ausgewählter Muteine bei der Hydrocyanierung von **2a**.<sup>[a]</sup>

Nr.	Enzym	Reaktionszeit						TOF <sup>[c]</sup> [s <sup>-1</sup> ]
		1 h		2 h		3 h		
		Ums. <sup>[b]</sup>	ee	Ums. <sup>[b]</sup>	ee	Ums. <sup>[b]</sup>	ee	
1	PaHNL5	13	95.2	22	96.2	30	96.4	110 ± 19
2	V360M	9	90.3	14	92.7	18	92.6	n.b. <sup>[d]</sup>
3	L331A	19	94.5	29	95.4	39	95.7	n.b. <sup>[d]</sup>
4	A111GV360I	21	95.8	36	96.8	47	96.8	149 ± 16
5	V360I	70	98.0	90	97.9	97	97.6	458 ± 32

[a] 15 mmol **2a**, 0.4 mg Enzym (27  $\mu\text{g}$  mmol<sup>-1</sup> Substrat), 10 °C, pH 3.4. [b] Umsatz. [c] TOF: Umsatzzahl. [d] n.b.: nicht bestimmt; *ee* war nicht erhöht.

auch durch höhere Aktivitäten aus. Dies unterscheidet unsere Ergebnisse vom Design selektiverer Hydrolasen, bei denen nur die Reaktivität mit dem „falschen“ Enantiomer reduziert wurde.<sup>[17]</sup> PaHNL5-V360I ist zurzeit der effizienteste Katalysator in der Synthese enantiomerenreiner Bausteine für pharmakologisch aktive „Prile“, was eine industrielle Anwendung in großem Maßstab nahelegt.

Eingegangen am 4. Februar 2005

Online veröffentlicht am 6. Juli 2005

**Stichwörter:** ACE-Inhibitoren · Asymmetrische Synthesen · Biokatalyse · Hydroxynitrilase · Protein-Engineering

- [1] a) A. Glieder, R. Weis, W. Skranc, P. Poechlauer, I. Dreveny, S. Majer, M. Wubboldts, H. Schwab, K. Gruber, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4963–4966; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4815–4818; b) M. H. Fechter, H. Griengl, *Food Technol. Biotechnol.* **2004**, *42*, 287–294.
- [2] a) M. Bauer, R. Geyer, M. Boy, H. Griengl, W. Steiner, *J. Mol. Catal. B* **1998**, *5*, 343–347; b) U. Kragl, U. Niedermeyer, M. R. Kula, C. Wandrey, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1990**, *613*, 167–175.
- [3] a) F. Effenberger, B. Horsch, F. Weingart, T. Ziegler, S. Kuhner, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2605–2608; b) F. Effenberger, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1609–1619; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1555–1564.
- [4] a) I. Dreveny, K. Gruber, A. Glieder, A. Thompson, C. Kratky, *Structure* **2001**, *9*, 803–815; b) I. Dreveny, C. Kratky, K. Gruber, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 292–300.
- [5] R. K. Tikare, WO 0242244A, **2004** [*Chem. Abstr.* **2002**, *136*, 401540].
- [6] A. Matsuyama, I. Takase, Y. Ueda, Y. Kobayashi, US 5429935, **1995** [*Chem. Abstr.* **1995**, *123*, 141884].
- [7] a) A. Schummer, H. Yu, H. Simon, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 9019–9034; b) H. Yu, H. Simon, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 9035–9052.
- [8] M. Kottenhahn, K. Drauz (Degussa AG), US 5616727, **1997** [*Chem. Abstr.* **1997**, *126*, 305791].
- [9] a) H. U. Blaser, E. Schmidt, *Asymmetric Catalysis on Industrial Scale: Challenges, Approaches and Solutions*, VCH, Weinheim, **2004**, S. 91–103; b) M. Studer, S. Burkhardt, A. F. Indolese, H.-U. Blaser, *Chem. Commun.* **2000**, 1327–1328.
- [10] a) O. May, P. T. Nguyen, F. H. Arnold, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 317–320; b) K. E. Jaeger, T. Eggert, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 305–313; c) B. Lingen, J. Groetzinger, D. Kolter, M.-R. Kula, M. Pohl, *Protein Eng.* **2002**, *15*, 585–593.
- [11] a) H. Ayguen, S. Wojczewski, S. Rosmus (Biospring GmbH), DE 10251547, **2004** [*Chem. Abstr.* **2002**, *140*, 401356]; b) R. Weis, P. Poechlauer, R. Bona, R. Luiten, M. Wubboldts, H. Schwab, A. Glieder, *J. Mol. Catal. B* **2004**, *29*, 211–218.
- [12] B. Steipe, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1999**, *243*, 55–86.
- [13] H. Buhler, F. Effenberger, S. Forster, J. Roos, H. Wajant, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 211–216.
- [14] M. Chen-Goodspeed, M. A. Sogorb, F. Wu, F. M. Rauschel, *Biochemistry* **2001**, *40*, 1332–1339; M. T. Reetz, F. Daligault, B. Brunner, H. Hinrichs, A. Deege, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4170–4173; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4078–4081.
- [15] J. P. Gerrits, W. F. Willeman, A. J. J. Straathof, J. J. Heijnen, J. Brussee, A. van der Gen, *J. Mol. Catal. B* **2001**, *15*, 111–121.
- [16] L. M. van Langen, R. P. Selassa, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 327–329.
- [17] a) U. T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 543–547; b) M. T. Reetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5716–5722; c) D. Rotticci, J. C. Rotticci-Mulder, S. Denman, T. Norin, K. Hult, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 766–770.