

Entwicklung einer Amindehydrogenase zur Synthese von chiralen Aminen**

Michael J. Abrahamson, Eduardo Vázquez-Figueroa, Nicholas B. Woodall, Jeffrey C. Moore und Andreas S. Bommarius*

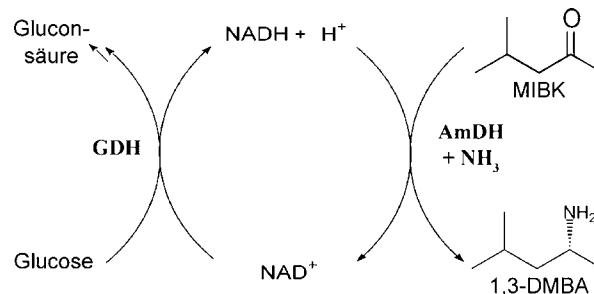
Biokatalysatoren werden immer wichtiger für die großtechnischen Synthese von enantiomerenreinen Verbindungen (EPCs; enantiomerically pure compounds), die hauptsächlich in pharmazeutischen Wirkstoffen (APIs; active pharmaceutical ingredients) Verwendung finden. Enantiomerenreine Substanzen können erhöhte Wirksamkeit erzielen, niedrigere Dosierung erlauben und sogar zur Verlängerung von Patentlaufzeiten führen.^[1] Im Jahr 2000 waren 35 % der APIs chirale Verbindungen, diese Zahl sollte auf 70 % bis 2010 ansteigen.^[2] Dies reflektiert jedoch nicht die Tatsache, dass für viele bedeutende Reaktionen bis jetzt keine entsprechenden enzymatischen Produktionswege bestehen. Eine kürzlich durchgeföhrte Analyse des Pharmaceutical Roundtable des Green Chemistry Institute der American Chemical Society stellte fest, dass die asymmetrische Synthese von Aminen aus prochiralen Ketonen und Ammoniak eine der herausforderndsten Reaktionen in der Pharmaindustrie ist.^[3]

Unser neuartiges Enzym erreicht genau dieses Ziel, chirale Amine mit hoher Selektivität herzustellen. Bis dato beschriebene Amindehydrogenasen waren nicht in der Lage, Ketone zu Aminen zu reduzieren und waren auch nicht stereospezifisch.^[4]

Obgleich chirale Amine sowohl chemisch als auch enzymatisch synthetisiert werden können, stellt ihre großtechnische Produktion weiterhin hohe Anforderungen und stützt sich weitgehend auf traditionelle Methoden der chemischen Synthese.^[1,5,6] Gängige Methoden schließen die Trennung durch fraktionierende Kristallisation^[7] und Hydrogenolyse von C=N-Bindungen, insbesondere von Enaminen, ein.^[8] Andererseits zeigen chemoenzymatische Routen, insbeson-

dere mit Transaminasen,^[9] Perspektiven auf für die dynamische kinetische Racematspaltung von racemischen Aminen^[10] und für die direkte asymmetrische Synthese von Aminen mit ω -Transaminasen (ω -TA), wie kürzlich bei der Synthese von Sitagliptin gezeigt.^[11,12] Dieser neue Prozess verzichtet auf die Verwendung und dann notwendige Abtrennung des weniger selektiven Rhodiumkatalysators, benötigt aber eine aufwändige Aminquelle. Das unerwünschte Keton-Beiprodukt muss ebenfalls abgetrennt werden, um das Gleichgewicht hin zu mehr als 50 % Umsatz zu verschieben.

Eine asymmetrische Synthese mit Amindehydrogenasen (AmDH) stellt die ideale Produktionsroute zu chiralen Aminen dar. Gekoppelt mit einem Cofaktor-Regenerierungssystem, etwa Glucose/Glucosedehydrogenase (GDH) oder Formiat/Formiatdehydrogenase (FDH), erlauben Amindehydrogenasen den direkten Zugang zu chiralen Aminen, der nur ein preiswertes Reduktionsmittel, etwa Glucose oder Formiat, und freies Ammoniak benötigt (Schema 1).^[5b,13]



Schema 1. Reaktionsschema der asymmetrischen Synthese mit einer Amindehydrogenase, gekoppelt mit einem Regenerierungssystem für den Glucosedehydrogenase-Cofaktor.

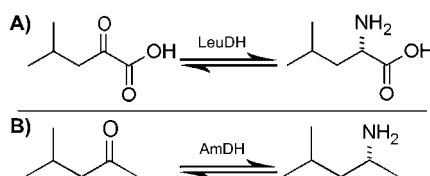
Ausgehend von einem bereits existierenden Sequenzgerüst einer Aminosäuredehydrogenase haben wir dessen Substratspezifität durch Anwendung mehrerer Zyklen von Proteindesign (protein engineering) erfolgreich dahingehend geändert, dass eine Amindehydrogenase entstanden ist. Anstelle der ursprünglichen α -Ketosäure akzeptiert die Amindehydrogenase nun das analoge Keton, Methylisobutylketon (MIBK), was dem Entfernen der Carboxyl-Einheit entspricht (Schema 2). Die Wildtyp-Leucinedehydrogenase zeigte keinerlei messbare Aktivität bei der reduktiven Aminierung von MIBK.

Leucinedehydrogenase aus *Bacillus stereothermophilus* diente als anfängliches Proteinstrukturtemplat. Die einzige zurzeit existierende Kristallstruktur einer Leucinedehydro-

[*] M. J. Abrahamson, Dr. E. Vázquez-Figueroa, N. B. Woodall, Prof. Dr. A. S. Bommarius
School of Chemical and Biomolecular Engineering, Georgia Institute of Technology, Petit Institute of Bioengineering and Bioscience 311 First Drive N.W., Atlanta, GA 30332 (USA)
E-Mail: andreas.bommarius@chbe.gatech.edu
Homepage: <http://www.chbe.gatech.edu/bommarius>
Dr. J. C. Moore
Department of Process Research, Merck Research Laboratories, Merck & Co., Inc., Rahway, NJ 07065 (USA)

[**] Die Autoren danken Merck & Co. für Unterstützung in der Anfangsphase des Projekts und der NSF (MRI Program 0320786) für die Unterstützung des Genetix Colony pickers. M.J.A. dankt dem US Department of Education (GAANN Fellowship) und der NSF (I/UCRC Grant 0969003 für das Center for Pharmaceutical Development) für finanzielle Unterstützung. E.V.F. dankt der NSF (Graduate Fellowship) und der Goizueta-Stiftung für Stipendien.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201107813> zu finden.



Schema 2. A) Reaktion der Wildtyp-Leucidehydrogenase. B) Neue Reaktion der Aminidehydrogenase.

nase (LeuDH) ist diejenige des Apoenzyms aus *Bacillus sphaericus* (PDB: 1LEH).^[14] Die Identifizierung der molekularen Wechselwirkungen innerhalb der Substratbindungs tasche basierten stattdessen auf der Kristallstruktur des analogen Holoenzymes Phenylalanidehydrogenase (PheDH) aus *Rhodococcus sp.* M4 (PDB: 1C1D und 1BW9).^[15] LeuDH und PheDH weisen eine nahezu identische Sekundärstruktur mit einem RMSD-Wert (mittlere quadratische Abweichung) des Rückgrats von nur 0.234 Å auf, was eine gute Abschätzung der Substratwechselwirkungen mit der Bindungstasche erlaubt. Die das Substrat L-Phenylalanin umgebenden Aminosäurereste der Substratbindungs tasche wurden mithilfe dieser Strukturen in Verknüpfung mit dem bekannten Reaktionsmechanismus identifiziert (Abbildung 1). Wie bereits durch Sekimoto et al. gefunden, sind die Reste Lys80 und Asp115 für den katalytischen Mechanismus des Enzyms essentiell.^[16] Diese Reste wurden daher von der Mutation ausgeschlossen. Hingegen interagiert die Seitenkette von Lys68 der LeuDH (Abbildung 1, PheDH: K67) aufgrund vorteilhafter Ladungswechselwirkung direkt mit der Carboxylgruppe des Aminosäuresubstrats und wurde daher als erster Ansatzpunkt für die Mutationsanalyse gewählt. Die Bibliothek 1 umfasst die Mutationen dieser Position zu den restlichen 19 Aminosäuren. Die Gene der resultierenden Varianten wurden in den Vektor pET28a kloniert, der Vektor in kompetente BL21(DE3)-Zellen transformiert, das His-Tag-Protein exprimiert und durch immobilisierte Metallionen- adsorptionschromatographie (IMAC) gereinigt. Jede gerei-

nigte Variante wurde spektrophotometrisch bei 340 nm analysiert, indem NADH/NAD⁺-Cofaktorumsatz mit Aminierungs- bzw. Desaminierungsaktivität korreliert wurde. Diese Analyse der Bibliothek erzielte eine vorteilhafte Mutation, Lys68Met, die zwar eine niedrige, aber noch nie vorher gefundene Aktivität in der reduktiven Aminierung aufwies (0.2 mU mg⁻¹). Eine höhere Aktivität von 3.4 mU mg⁻¹ wurde in oxidativer Desaminierungsrichtung bei racemischem 1,3-Dimethylbutylamin (1,3-DMBA) beobachtet.

Die verbleibenden Reste der Bindungstasche wurden in Gruppen unterteilt, die auf den Prinzipien des CASTing basierten, und so Bibliotheken 2, 3, 4 und 6 erzeugt (Tabelle 1).^[17] Die Reste innerhalb einer Gruppe wurden gleichzeitig mutiert, um synergistische Effekte bei benachbarten Resten auszunutzen. Die Breite der Mutationen an jeder

Tabelle 1: Gruppierung der Aminosäurereste im aktiven Zentrum der LeuDH.

Bibliothek	PheDH	LeuDH mit degenerierten Codons	Größe der Bibliothek ^[a]
1	K67	K68 ^[b]	20
2	M64	M65 NNK	3066
	K67	K68 NNK	
3	G117	A113 GBG	3450
	P118	E114 NNT	
	D119	D115 RAB	
	V120	V116 RTK	
4	A39	L40 DBW	2910
	G40	G41 GBC	
	G41	G42 DBW	
5	S190	A187 NNK	94
6	A293	V291 DBS	969
	L296	V294 DBS	
7	G117	A113 NNK	94
8	I293	I292 NNK	94
9	E300	E297 NNK	94
10	N263	N261 NNK	94
11	K67	K68 DDK	969
	N263	N261 DDK	

[a] Benötigte Bibliotheksgröße, um 95 % Konfidenz zur Abdeckung des gesamten Mutantenspektrums zu erreichen. [b] Individuelle Mutanten unter Verwendung von gereinigtem Protein.

Position wurde durch entsprechende degenerierte Codons eingeschränkt, um Mutation zu Aminosäureresten zu vermeiden, die die Substratbindung beeinträchtigen könnten (wie etwa offensichtliche sterische Hinderung oder unvorteilhafte Ladungswechselwirkungen). Die von vornherein angesetzte Vermeidung einer Untergruppe von unvorteilhaften Aminosäuren verringert die Größe der Bibliothek, sodass die Screeningeffizienz verbessert und damit gleichzeitig eine erhöhte Chance auf Änderung der Substratspezifität erhalten wird.

Bibliotheken mit nur einer Aminosäure (5, 7, 8 und 9 in Tabelle 1) wurden komplett zu allen verfügbaren 20 Aminosäuren (Codon: NNK) durchmutiert, da diese Bibliotheken relativ klein waren und nur relativ geringe Aufwandserleichterung durch restriktivere Codonwahl erzielt werden würde. Diese Aminosäurereste waren bereits bei der PheDH

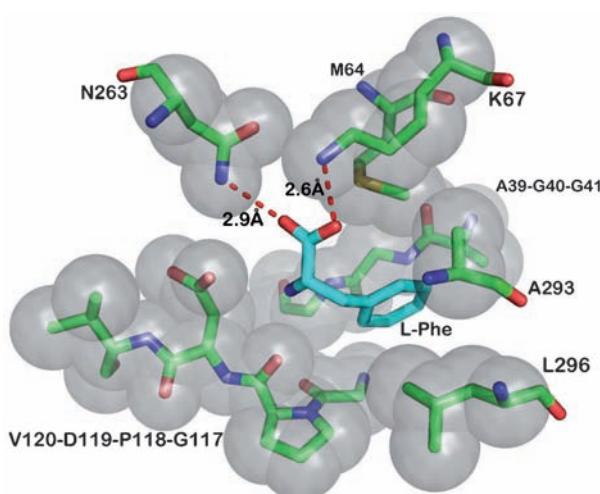


Abbildung 1. Aktives Zentrum der PheDH mit dem gebundenen Substrat L-Phenylalanin sowie umliegende Aminosäurereste, die für Mutationen vorgesehen sind (PDB: 1C1D).^[15]

aus *Bacillus sphaericus* als für die Substratspezifität wichtig eingestuft worden.^[18]

Bibliothek 10 beinhaltet die Mutation des Aminosäurerests N261 innerhalb der Substratbindungstasche (Abbildung 1, PheDH: N263). Dieser Rest war zuerst nicht für Mutationen vorgesehen, obwohl er beim Wildtyp direkt mit dem Carboxylrest des Substrats wechselwirkt, aber auch gleichzeitig die Bindung des Cofaktors mitträgt. Da jedoch nur die Aminogruppe des Aminosäurerückgrats mit dem Cofaktor interagiert, wurde für diese spezielle Aminosäure an dieser Position eine Ausnahme gemacht. Als letzter Schritt wurden die Reste K68 und N261 zusammen als Bibliothek 11 mutiert, da sie beide sowohl sehr nah an der Substratbindungstasche positioniert sind als auch vergleichbare Wechselwirkungen mit der Carboxylgruppe des Substrats innerhalb des Wildtyps aufweisen.

Einzelne Kolonien der Bibliotheken 2 bis 11 wurden gepickt und ihre AmDH in 96er Titerplatten exprimiert. Ein absorbanzbasierter Hochdurchsatz-Assay (HTA) wurde als die einfachste und akkurateste Methode der Mutantenanalyse etabliert. Die anfänglich sehr geringe Aminierungsaktivität ist jedoch innerhalb eines HTA nicht detektierbar, da das Zelllysat allein bereits eine zu hohe Grundabsorption aufweist. Daher wurde die Enzymaktivität in Richtung der sehr viel aktiveren Desaminierung durchgeführt, was sich in besserem Signal-Rausch-Verhältnis und einer verminderten Zahl von falsch-positiven Signalen niederschlug.

Absorptionen wurden bei zwei Wellenlängen gemessen, 340 und 600 nm, um sowohl Substratumsatz als auch Biomasseeinsatz zu bestimmen. Die ansteigende Absorption bei 340 nm ist stöchiometrisch korreliert mit der Reduktion des Cofaktors NAD⁺ und kann daher direkt als Substratumsatz gemessen werden. Die Absorption bei 600 nm wurde als Referenz in Bezug auf Biomasseeinsatz benutzt und konnte somit zur Normalisierung der 340-nm-Absorption eingesetzt werden, in Relation zur Kontrollplatte ohne Substrat.^[19] Diese Methode eliminierte erfolgreich falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Zelllysatbestandteilen oder Aggregation und verringerte den experimentellen Fehler.

Die so resultierenden Treffer wurden aufgereinigt und spektrometrisch auf ihre Aminierungs- und Desaminierungsaktivität untersucht. Die jeweils beste Variante wurde dann als Basis für weitere Mutationszyklen verwendet.

Anfängliche Zyklen von Mutationen (Bibliotheken 1–9) erbrachten entweder die Wildtypsequenz oder Einzelmutationen, die sowohl Verbesserungen in der Aminierungs- als auch Desaminierungsrichtung aufwiesen und daher einfach selektierbar im Hinblick auf die beste Mutante waren. Darauf aufbauend, wurden in der Bibliothek 10 verschiedene Mutationen für die aktivsten Aminierungs- und Desaminierungsvarianten identifiziert. Diese Mutationen wiesen jeweils Austausche an Position Asn261 zu Cys und Val auf. Durch Einsatz der Bibliothek 11 wurde die Aminierungsaktivität anhand von synergistischen Mutationen an Position 68 und 261 weiter verbessert, wodurch die bereits erzielten Mutationen in Bibliothek 1 und 10 ersetzt werden konnten. Die letztendlich erzielte Aminidehydrogenase enthält vier Mutationen, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind.

Die aktivsten Varianten zeigten sowohl Aminierungs- als auch Desaminierungsaktivität gegenüber einer Reihe von Ketonen und Aminen (Tabelle 3). Die letztendlich erzielte beste Aminidehydrogenase (K68S/E114V/N261L/V291C) zeigte verbesserte Aminierungsaktivität im Vergleich zur besten Mutante aus Bibliothek 10 bei allen gemessenen Ketonen außer Methylacetoacetat.

Die Enantioselektivität wurde zuerst durch Messung der Desaminierungsaktivität gegenüber einzelnen Enantiomeren von Methylbenzylamin (MBA) abgeschätzt. MBA wurde

Tabelle 3: Substratprofile der erfolgreichsten Aminierungs- und Desaminierungsvarianten.

Substrat ^[a]	K68M/E114V/N261V/ V291C ^[b]	K68S/E114V/N261L/ V291C ^[b]		
(R)-MBA	476.5	± 1.4	586.3	± 4.1
(S)-MBA	5.0	± 0.0	1.6	± 0.0
(R/S)-MBA ^[c]	484.0	± 3.5	784.6	± 13.4
Cyclohexylamin	–		56.0	± 0.0
Cyclohexanon	18.8	± 0.0	123.4	± 3.5
Ethylpyruvat	19.8	± 7.0	13.2	± 5.8
Methylacetoacetat	4.5	± 0.7	4.5	± 0.6
Ethyl-3-oxohexanoat	6.4	± 4.9	14.0	± 1.2
Acetophenon	3.5	± 0.7	58.8	± 1.7

[a] Aktivität wurde mit 20 mM Substrat gemessen. [b] Spezifische Aktivität dargestellt in mU/mg Protein mit Standardabweichung. [c] Aktivität gemessen mit 40 mM racemischem MBA, 20 mM von jedem Enantiomer.

Tabelle 2: Kumulative Mutationen der Aminosäurereste und ihre daraus resultierenden Verbesserungen der spezifischen Aktivität und der K_M -Werte der Leucinedehydrogenase.^[a]

Bibliothek	Mutationen	Reduktive Aminierung		Oxidative Desaminierung	
		Spez. Aktivität ^[b]	K_M ^[c]	Spez. Aktivität ^[b]	K_M ^[c]
Wildtyp	–	n.m. ^[d]	n.m.	n.m.	n.m.
1	K68M	0.0002	n.m.	0.0034	n.m.
3	K68M, E114V	0.015	n.m.	0.65	48
6	K68M, E114V, V291C	0.016	± 0.004	70.2	± 35
10 ^[e]	K68M, E114V, N261V, V291C	0.089	± 0.007	10.3	± 3.6
	K68M, E114V, N261C, V291C	0.236	± 0.04	21.6	± 12
11	K68S, E114V, N261I, V291C	0.690	± 0.07	15.1	± 5.1

[a] Statistische Fehlerwerte repräsentieren 95 % Vertrauensintervall bei der nicht-linearen Anpassung. [b] Maximale spezifische Aktivität (Units/mg Protein). [c] MIBK oder 1,3-DMBA Substrat (mM). [d] n.m. = nicht messbar: < 0.1 mU mg⁻¹. [e] Verschiedene Varianten erzielen maximale Aminierungs- und Desaminierungsaktivität.

anstelle von 1,3-DMBA für selektive Experimente eingesetzt, da es sowohl einen messbaren Aktivitätsbereich aufwies als auch weil beide Enantiomere kommerziell erhältlich sind. Eine Präferenz von (*R*)-MBA im Vergleich zum (*S*)-Enantiomer war anhand der entsprechenden Desaminierungsaktivitäten von 0.586 U mg^{-1} und 0.002 U mg^{-1} ersichtlich. Diese vorläufigen Ergebnisse wurden durch die direkte Messung der Enantioselektivität der Aminierung von MIBK zu chiralem 1,3-DMBA bestätigt. Die enzymatische Umsetzung über 48 h unter Zuhilfenahme eines GDH-Cofaktor-Regenerierungssystems resultierte in $92.5 \pm 2.6\%$ Umsetzung des Ketonsubstrats. Das erhaltene Aminprodukt wurde mit Toluol aus der wässrigen Lösung extrahiert, anschließend mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) derivatisiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Die Derivatisierung von 1,3-DMBA ergab ausreichende Basistrennung der Peaks mit Retentionszeiten von 47.5 und 48.9 min für die (*S*)- bzw. (*R*)-Enantiomere. Die Enantiomerenpeaks wurden mittels Polarimetrie zugeordnet, da reine Enantiomerenstandards nicht zur Verfügung standen.^[19] Die Messung ergab einen *ee*-Wert von 99.8 % des erzeugten (*R*)-1,3-DMBA, was mit der (*S*)-Selektivität des Wildtypenzyms übereinstimmt (Änderung der Cahn-Ingold-Prelog-Präferenz nach Ersatz der Carboxylgruppe durch eine Methylgruppe).

Zusammenfassend haben wir eine Amindehydrogenase aus einer Aminosäuredehydrogenase evolviert. Elf Zyklen an Proteindesign haben die Enzymspezifität komplett verändert und führten zu einer Aminierungsaktivität von 0.69 U mg^{-1} mit einem k_{cat} von 0.46 s^{-1} , während die ursprüngliche Wildtypaktivität der Leucindehydrogenase auf einen nicht messbaren Wert reduziert wurde. Die Enantioselektivität des Wildtyps wurde beibehalten, was durch einen gemessenen *ee*-Wert von (*R*)-1,3-DMBA von 99.8 % bei 92.5 % Umsatz belegt wurde. Die Amindehydrogenase zeigte auch Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten. Dies ist das erste uns bekannte Beispiel einer cofaktorabhängigen Amindehydrogenase, die in der Lage ist, selektiv chirale Amine aus prochiralen Ketonen und Ammoniak zu synthetisieren.

Experimentelles

Leucindehydrogenase (E.C. 1.4.1.9) aus *Bacillus stereothermophilus* wurde durch Assistenzprofessor Bert C. Lampson von der East Tennessee State University zur Verfügung gestellt. Die genomische DNA wurde anhand der Methode B von Mehling et al. isoliert.^[20] Bibliotheken der Mutanten wurden durch überlappende Polymerasekettenreaktion (PCR) mit individuellen Oligoprimeren (MWG Operon) hergestellt (Molecular Cloning, 2000, Sambrook). Für das anfängliche Hochdurchsatz-Screening wurden alle mutierten Gene in pET17b (Invitrogen) kloniert, kompetente BL21(DE3)-Zellen transformiert und die Proteine exprimiert. Kolonien wurden selektiv gepickt mit Hilfe eines Genetix QPix2 colony picker. Titerplatten wurden mit den in den Hintergrundinformationen beschriebenen Methoden analysiert. Zur Aufreinigung der Varianten wurden die Proteine in den pET28a-Vektor (Invitrogen) inklusive eines C-terminalen His-tags kloniert und in BL21(DE3)-Zellen exprimiert. Alle Proteine wurden 24 h in MagicMedia (Invitrogen) bei 37°C exprimiert.

His-Proteine wurden mithilfe des Ni-NTA-Säulenmaterials aufgereinigt (Thermo Scientific). Die pelletierten Zellen (50 mL Flüssigkultur) wurden in 6 mL 50 mM Phosphatpuffer pH 8.0, der 20 mM Imidazol und 300 mM NaCl enthielt, resuspendiert, dann mit Ultra-

schall aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Das filtrierte Zelllysat wurde auf Eis mit dem Säulenmaterial inkubiert, um Bindung des Zielproteins daran zu ermöglichen, und dann durch Säulenchromatographie aufgereinigt. Dabei wurde das Material zuerst zweimal mit 5 mL 50 mM Imidazol in 300 mM NaCl in 50 mM Phosphatpuffer bei pH 8 gewaschen. Das gereinigte Protein wurde anschließend mithilfe der gleichen Puffermischung, aber mit 250 mM Imidazol, eluiert.

Desaminierungsreaktionen wurden in 250 mM Na_2CO_3 -Puffer bei pH 10, 1 mM NAD^+ und variierenden Konzentrationen an Aminen durchgeführt. Aminierungsreaktionen wurden in 0.5 M $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$ -Puffer pH 9.6, 200 μM NADH und variierenden Konzentrationen an Ketonen geprüft. Die Batchreaktion der Aminierung wurde in 1.6 mL Volumen vermessen (1.5 mL 0.5 M $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$ -Puffer pH 9.6, 213 μM NADH, 10.67 mM MIBK, 12.8 mM Glucose und 16 U GDH (85 U mg^{-1}) sowie 100 μL AmDH K68S/E114V/N261L/V291C mit einer Konzentration von 1.3 mg mL^{-1}). Die Reaktionen wurden 24 h inkubiert, dann wurden weitere 100 μL AmDH zugegeben, und es wurde erneut 24 h inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 250 μL 10 N NaOH, gefolgt durch Extraktion mit Toluol und TFAA-Derivatisierung, abgestoppt.

Eingegangen am 7. November 2011
Online veröffentlicht am 6. März 2012

Stichwörter: Amindehydrogenase · Asymmetrische Synthese · Biokatalyse · Chirale Amine · Gerichtete Evolution

- [1] M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 806–843; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788–824.
- [2] D. J. Pollard, J. M. Woodley, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 66–73.
- [3] D. J. Constable, P. J. Dunn, J. D. Hayler, G. R. Humphrey, J. L. Leazer, Jr., R. J. Linderman, K. Lorenz, J. Manley, B. A. Pearlman, A. Wells, A. Zaks, T. Y. Zhang, *Green Chem.* **2007**, *9*, 411–420.
- [4] N. Itoh, C. Yachi, T. Kudome, *J. Mol. Catal. B* **2000**, *10*, 281–290.
- [5] a) J. M. Woodley, *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 321–327; b) S. K. Ma, J. Gruber, C. Davis, L. Newman, D. Gray, A. Wang, J. Grate, G. W. Huisman, R. A. Sheldon, *Green Chem.* **2010**, *12*, 81–86.
- [6] a) T. C. Nugent, M. El-Shazly, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 753–819; b) M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42–51.
- [7] J. Jacques, A. Collett, S. H. Wilen, *Enantiomers, Racemates, and Resolutions*, Wiley-Interscience, New York, **1981**.
- [8] a) A. Johansson, *Contemp. Org. Synth.* **1995**, *2*, 393–407; b) H. U. Blaser, F. Spindler, *Chim. Oggi* **1995**, *13*, 11.
- [9] a) P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, J. S. Jensen, N. Al-Haque, W. Neto, J. M. Woodley, *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 1479–1493; b) J. D. Stewart, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 120–129; c) P. P. Taylor, D. P. Pantaleone, R. F. Senkpiel, I. G. Fotheringham, *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 412–418; d) D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 324–332; e) M. D. Truppo, J. D. Rozzell, N. J. Turner, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 234–237.
- [10] a) D. Koszelewski, D. Clay, D. Rozzell, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2289–2292; b) M. D. Truppo, N. J. Turner, J. D. Rozzell, *Chem. Commun.* **2009**, 2127–2129; c) H. Pellissier, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3769–3802.
- [11] a) D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, G. M. Guebitz, D. Rozzell, W. Kroutil, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9477–9480; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9337–9340; b) M. W. Truppo, J. D. Rozzell, J. C. Moore, N. J. Turner, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 395–398; c) J. S. Shin, B. G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*, 206–211.

- [12] a) C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, *329*, 305–309; b) F. G. Mutti, J. Sattler, K. Tauber, W. Kroutil, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 109–111.
- [13] a) E. Vázquez-Figueroa, J. Chaparro-Riggers, A. S. Bommarius, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2295–2301; b) V. O. Popov, V. S. Lamzin, *Biochem. J.* **1994**, *297*, 625–643; c) W. A. van der Donk, H. Zhao, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 421–426.
- [14] P. J. Baker, A. P. Turnbull, S. E. Sedelnikova, T. J. Stillman, D. W. Rice, *Structure* **1995**, *3*, 693–705.
- [15] a) J. L. Vanhooke, J. B. Thoden, N. M. W. Brunhuber, J. S. Blanchard, H. M. Holden, *Biochemistry* **1999**, *38*, 2326–2339; b) N. M. W. Brunhuber, J. B. Thoden, J. S. Blanchard, J. L. Vanhooke, *Biochemistry* **2000**, *39*, 9174–9187.
- [16] T. Sekimoto, T. Matsuyama, T. Fukui, K. Tanizawa, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 27039–27045.
- [17] M. T. Reetz, M. Bocola, J. D. Carballeira, D. Zha, A. Vogel, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4264–4268; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4192–4196.
- [18] a) S. Chen, P. C. Engel, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1407–1411; b) S. Chen, P. C. Engel, *J. Biotechnol.* **2009**, *142*, 127–134.
- [19] Siehe Hintergrundinformationen für Details.
- [20] A. Mehling, U. F. Wehmeier, W. Piepersberg, *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, *128*, 119–125.