

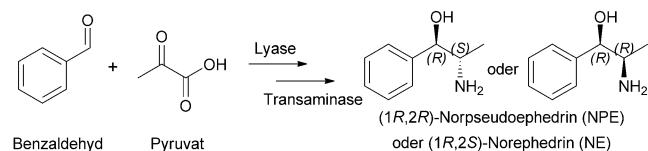
Zwei Schritte in einem Reaktionsgefäß: Enzymkaskaden zur selektiven Synthese von Nor(pseudo)ephedrin aus kostengünstigen Ausgangsmaterialien**

Torsten Sehl, Helen C. Hailes, John M. Ward, Rainer Wardenga, Eric von Lieres, Heike Offermann, Robert Westphal, Martina Pohl und Dörte Rother*

Die Entwicklung sauberer und umweltschonender Reaktionen wird eine anspruchsvolle Aufgabe für Chemiker in den nächsten zehn Jahren sein.^[1] Klassische chemische Synthesen enantiomerenreiner Verbindungen erfordern oft mehrstufige Reaktionen, das Einführen und Entfernen von Schutzgruppen sowie gegebenenfalls die Isolierung instabiler Zwischenprodukte, was sowohl die Ausbeuten als auch die Nachhaltigkeit eines Prozesses reduzieren kann.^[2]

Verbindungen mit vielseitigen Einsatzmöglichkeiten, aber anspruchsvollen Synthesestrategien, sind Phenylpropanolamine, die zur Amphetamin-Familie der Ephedra-Alkaloide gehören. Die Stereoisomere Norpseudoephedrin (NPE) und Norephedrin (NE) werden als Bausteine zur Herstellung von Liganden und chiralen Auxiliaren bei organischen Synthesen^[3] oder direkt als pharmazeutisch aktive Moleküle^[4] angewendet. Bekannte Methoden zur Herstellung dieser Stoffe haben allerdings Nachteile wie beispielsweise den Einsatz relativ teurer Reagenzien, mehrstufige Synthesewege oder nur moderate Enantiomeren- und Diastereomerenreinheiten.^[5] Vor Kurzem wurde eine neue, hoch selektive Methode zur Synthese aller Phenylpropanolamin-Isomere mit *ee*- und *de*-Werten > 99 % publiziert.^[6] Ausgehend von 2-Phenyl-2-trimethylsilyloxyacetonitril sind die Norephedrin-Isomere in vier Stufen (40% Ausbeute) und die Norpseudoephedrin-Isomere in sieben Stufen (35% Ausbeute) zugänglich.

Insbesondere für die stereoselektive Synthese von Feinchemikalien und Pharmazeutika sind synthetische Enzymkaskaden eine wertvolle Alternative. Aufgrund der meist hohen Chemo- und Stereoselektivitäten und der daraus resultierenden Vermeidung von Isolierungsschritten und Nebenprodukten^[7] kann so besonders die Ökoeffizienz einer Reaktion gesteigert werden.^[8] Wir präsentieren eine enzymatische Eintopf-Zweistufen-Reaktion zur Synthese von optisch reinem (1*R*,2*S*)-NE und (1*R*,2*R*)-NPE ausgehend von den kostengünstigen Ausgangsstoffen Benzaldehyd und Pyruvat (Schema 1). Verschiedene Möglichkeiten zur Durchführung von Enzymkaskaden wurden bereits beschrieben (Details in Kapitel 1 der Hintergrundinformationen).^[1b, 2a, 8a–c, 9]



Schema 1. Eintopf-Zweistufen-Reaktion zur Synthese von Norpseudoephedrin und Norephedrin.

Unsere Eintopf-Zweistufen-Reaktion kombiniert Vorteile bekannter Synthesestrategien wie hohe Stereoselektivität, günstige Ausgangsmaterialien, hohe Schrittökonomie (nur zwei Stufen) und eine Gleichgewichtsverschiebung ohne Zusatz weiterer Enzyme oder Cosubstrate.

Im ersten Schritt wird Pyruvat decarboxyliert und anschließend mit Benzaldehyd zum Zwischenprodukt (*R*)-Phenylacetylcarbinol ((*R*)-PAC) ligiert. Die Reaktion wird durch die Thiamindiphosphat(ThDP)-abhängige Acetohydroxysäuresynthase I (AHAS-I) aus *E. coli* katalysiert. Dieses Enzym katalysiert die Decarboxylierung von Pyruvat und die anschließende Carboligation ohne das im aktiven Zentrum gebundene Hydroxyethyl-ThDP freizusetzen (Schema 2).^[10] (*R*)-PAC wird mit hoher Enantiomerenreinheit (*ee* > 98 %) gebildet und kann ohne weitere Isolierung im zweiten Reaktionsschritt mit (*S*)- oder (*R*)-selektiven ω -Transaminasen ((*S*)- bzw. (*R*)-TA) zum gewünschten (1*R*,2*S*)-NE bzw. (1*R*,2*R*)-NPE reduktiv aminiert werden. In unseren bisherigen Arbeiten wurden 18 (*S*)-selektive Wildtyp-Enzyme in Bezug auf die Umsetzung verschiedener 2-Hydroxyketone getestet.^[11] Die vielversprechendsten Ergebnisse zur reduktiven Aminierung von (*R*)-PAC lieferte das Enzym

[*] M. Sc. T. Sehl, Dr. E. von Lieres, H. Offermann, Dipl.-Biotechnol. R. Westphal, Prof. Dr. M. Pohl, Dr. D. Rother Institut für Bio- und Geowissenschaften, IBG-1: Biotechnologie Forschungszentrum Jülich GmbH Leo-Brandt-Straße 1, 52425 Jülich (Deutschland) E-Mail: do.rother@fz-juelich.de

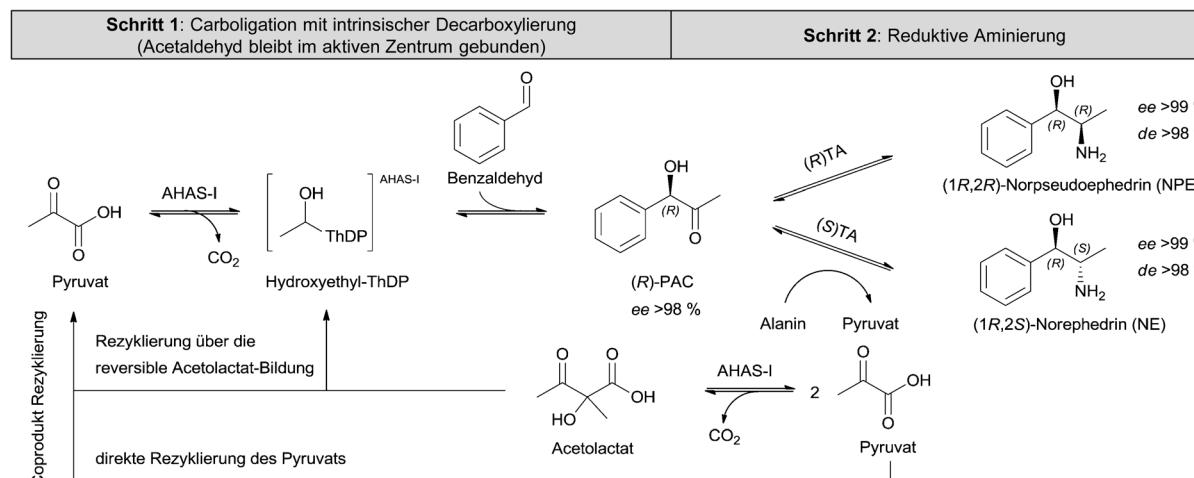
Prof. H. C. Hailes Department of Chemistry, University College London 20 Gordon Street, London WC1H 0AJ (Großbritannien)

Prof. J. M. Ward The Advanced Centre for Biochemical Engineering, Department of Biochemical Engineering, University College London Torrington Place, London, WC1E 7JE (Großbritannien)

Dr. R. Wardenga Enzymicals AG Walther-Rathenau-Straße 49a, 17489 Greifswald (Deutschland)

[**] Die Arbeiten wurden vom CLIB Graduierten-Cluster der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und von der DFG im Rahmen der Forschergruppe FOR 1296 unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201300718> zu finden.



Schema 2. Eintopf-Zweistufen-Reaktion zur Synthese von Nor(pseudo)ephedrin als Rezyklierungskaskade durch Kombination der Acetohydroxsäuresynthase I (AHAS-I) und einer (S)- oder (R)-selektiven ω -Transaminase ((S)TA, (R)TA).

Cv-(S)TA aus dem Organismus *Chromobacterium violaceum*. Für den Zugang zu (1R,2R)-NPE wurden sieben weitere (R)-selektive Transaminasen der Firma Enzymicals AG (Kapitel 2 der Hintergrundinformationen) untersucht.

Für die enzymatische reduktive Aminierung wird ein Amindonor als Cosubstrat benötigt. Durch eine geschickte Kombination von Cosubstraten (hier: Alanin) und Enzymen kann das Nebenprodukt des zweiten Reaktionsschritts (hier: Pyruvat) als Substrat der ersten Reaktion fungieren. Diese neuartige Kaskadenreaktion wird als „Rezyklierungskaskade“ bezeichnet (Schema 2 und Kapitel 1 der Hintergrundinformationen). Die thermodynamische Gleichgewichtskonstante für die reduktive Aminierung von PAC mit Alanin als Amindonor wurde hier mit 2.31×10^{-3} bestimmt (Kapitel 4 der Hintergrundinformationen). Folglich liegt der maximale theoretische Umsatz ohne Gleichgewichtsverschiebung bei weniger als 5%, wenn äquimolare Konzentrationen von Alanin und PAC eingesetzt werden (Kapitel 4.4 der Hintergrundinformationen). In unserer Enzymkaskade kann Pyruvat ohne den Zusatz weiterer Enzyme über zwei verschiedene von der AHAS-I katalysierte Carboligationswege aus dem Gleichgewicht der Transaminasereaktion entfernt werden (Schema 2): 1) Carboligation mit Benzaldehyd zu (R)-PAC oder 2) Selbstligation zweier Pyruvat-Moleküle zu Acetolactat. Die reversible Reaktion zu Acetolactat ist zwar kinetisch bevorzugt, das thermodynamische Reaktionsgleichgewicht liegt aber auf Seiten der PAC-Bildung.^[10] Somit ist auch intermediär gebildetes Acetolactat durch die reversible Spaltung zu Pyruvat und Hydroxyethyl-ThDP als Substrat für die Carboligation von (R)-PAC zugänglich.

Eine Herausforderung bei dieser Eintopf-Zweistufen-Kaskade ist die Tatsache, dass Benzaldehyd nicht nur als Substrat der Lysreaktion fungieren, sondern auch in einer Nebenreaktion von Transaminasen reduktiv zu Benzylamin aminiert werden kann. Als Folge der höheren chemischen Reaktivität von Aldehyden gegenüber Ketonen und der sterischen Einschränkungen im aktiven Zentrum der TA war es nicht möglich, unter den 25 zur Verfügung stehenden TAs ein Enzym zu finden, bei dem die reduktive Aminierung von PAC

im Vergleich zur Reaktion von Benzaldehyd kinetisch begünstigt ist. Die vielversprechendste (S)-selektive Transaminase Cv-(S)TA hat eine etwa 17-fach höhere Anfangsreaktionsgeschwindigkeit für Benzaldehyd als für PAC (Abbildung 1A). Daher wurde in der simultanen Zweistufen-Kas-

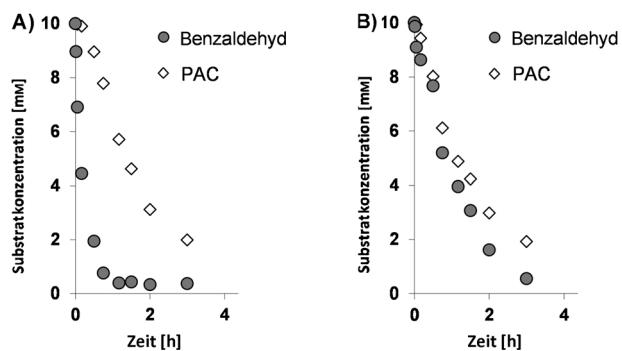


Abbildung 1. Umsatzkurven der reduktiven Aminierung von Benzaldehyd (10 mM) und PAC mit A) der ω -TA Cv-(S)TA (1 mg mL^{-1}) und B) At-(R)TA (1 mg mL^{-1}). Die Reaktion wurde in HEPES-Puffer (100 mM, pH 7.5 mit 200 μM Pyridoxal-5'-phosphat (PLP), 50 μM Flavinadenindinucleotid (FAD), 100 μM ThDP, 5 mM MgCl_2) und mit (S)- oder (R)- α -Methylbenzylamin (10 mM) als Amindonor durchgeführt.

kadenreaktion mit AHAS-I und Cv-(S)TA 98% des Benzaldehyds zu Benzylamin umgesetzt (Abbildung 2A). Im Falle der (R)-selektiven TAs konnten hingegen Enzyme identifiziert werden, mit denen auch im simultanen Modus Umsätze von bis zu 85% (1R,2R)-NPE erzielt wurden (Abbildung 2A). Hier liegen im Falle der At-(R)TA aus dem Organismus *Aspergillus terreus* die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten für PAC und Benzaldehyd etwa in der gleichen Größenordnung (Abbildung 1B). Im Vergleich zur Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der von AHAS-I katalysierten (R)-PAC-Bildung sind diese aber ca. 10-fach erniedrigt. Diese Unterschiede genügen, um die Benzylamin-Nebenproduktbildung auf etwa 10% zu reduzieren (Abbildung 2A).

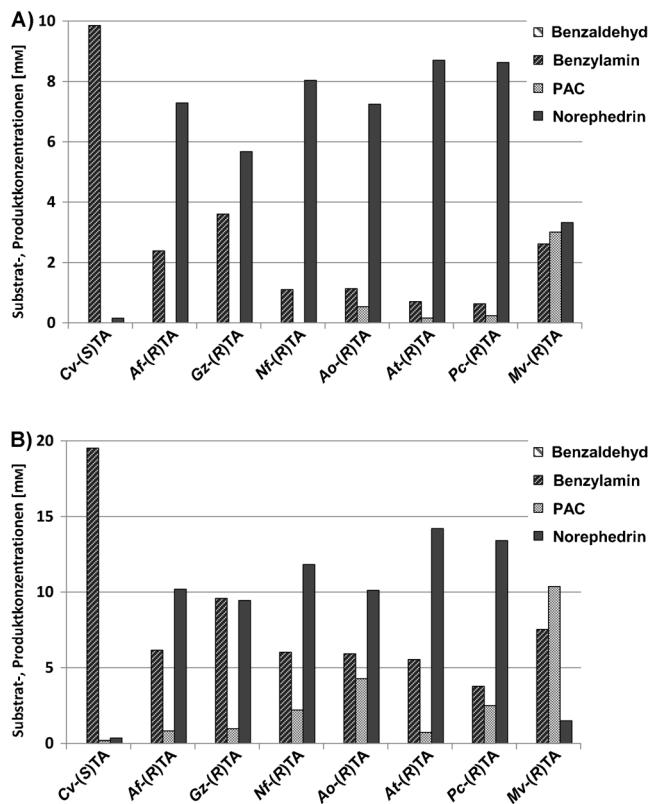


Abbildung 2. A) Simultane Eintopf-Zweistufen Kaskade und B) simultane Eintopf-Zweistufen Rezyklierungskaskade mit der Cv-(S)TA und sieben (R)-selektiven TAs. Für die Eintopf-Zweistufen-Reaktion wurden Benzaldehyd (10 mM), Pyruvat (10 mM) und D- oder L-Alanin (50 mM) in HEPES (100 mM, pH 7.5 mit 200 µM PLP, 50 µM FAD, 100 µM ThDP, 5 mM MgCl₂) gelöst und beide Enzyme (AHAS-I und ω-TA) simultan hinzugegeben. Die Rezyklierungskaskade (B) wurde analog mit 20 mM Benzaldehyd anstelle von 10 mM durchgeführt.

Im Einklang mit diesen experimentellen Daten ist das Verhältnis NE/Benzylamin niedrig, wenn die Eintopf-Zweistufen-Reaktion als simultane Kaskade mit einem Rezyklierungsschritt durchgeführt wird. Hierbei wurden beide Enzyme gleichzeitig zu einem Reaktionsgemisch aus Benzaldehyd (20 mM), Pyruvat (10 mM) und Alanin (50 mM) gegeben. Da anfänglich nur 10 mM Pyruvat vorhanden waren, konnten Produktkonzentrationen von mehr als 10 mM (NE bzw. NPE) nur bei erfolgreicher Rezyklierung des aus Alanin gebildeten Pyruvats erreicht werden. In Falle der At-(R)TA wurden so 14 mM (1R,2R)-NPE und bemerkenswerterweise nur 5.5 mM Benzylamin gebildet (Abbildung 2B). Bei der analogen Reaktion mit der TA Cv-(S)TA ist hingegen Benzylamin mit mehr als 98% das Hauptprodukt (Abbildung 2B).

Benzylamin kann zwar von NPE bzw. NE durch Säulenchromatographie getrennt werden (mobile Phase EtOAc/MeOH/NH₃=85:10:5), um die Prozesseffizienz zu erhöhen, ist jedoch die Reduzierung der Nebenproduktbildung durch geeignete Verfahrenstechnik vorzuziehen. Im Allgemeinen gibt es zwei Wege, eine Kaskadenreaktion auszuführen. Der eine ist der bereits beschriebene simultane Reaktionsmodus, der andere der sequenzielle Modus, bei dem die Katalysato-

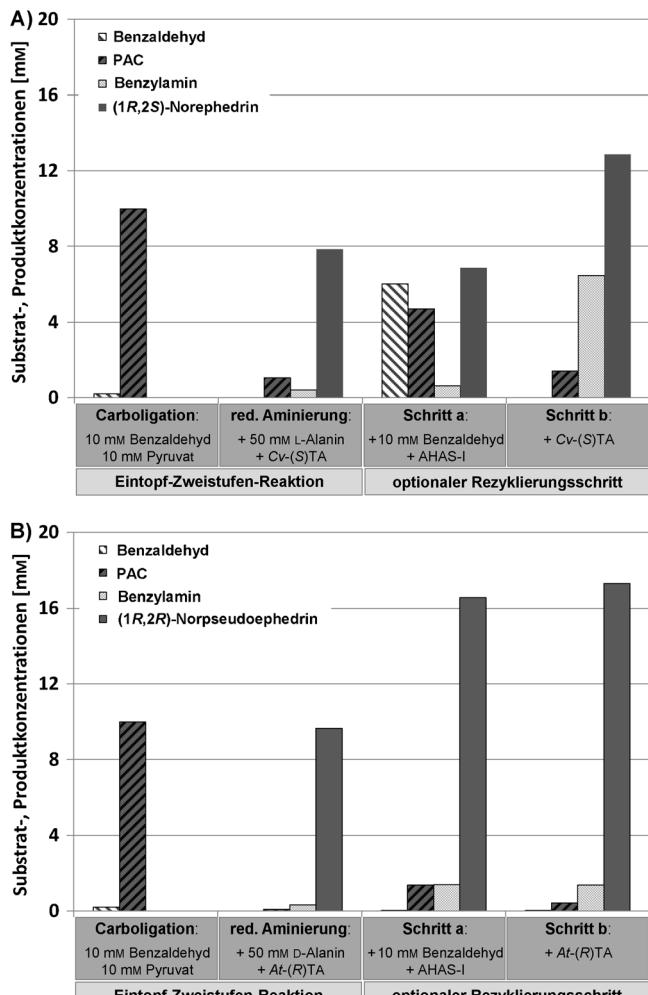


Abbildung 3. Synthese von A) (1R,2S)-NE und B) (1R,2R)-NPE als sequenzielle Eintopf-Zweistufen-Reaktion, durchführbar mit optionalem Rezyklierungsschritt (die zeitabhängigen Reaktionsverläufe sind in Kapitel 6 der Hintergrundinformationen zu finden). Reaktionsbedingungen: HEPES-Puffer (100 mM, pH 7.5 mit 200 µM PLP, 50 µM FAD, 100 µM ThDP, 5 mM MgCl₂), 25 °C, 100 rpm. Eintopf-Zweistufen-Reaktion: Carboligation (1 h): 10 mM Benzaldehyd, 10 mM Pyruvat, 0.5 mg mL⁻¹ AHAS-I; reduktive Aminierung (12 h): +50 mM Alanin, +1 mg mL⁻¹ TA. Rezyklierungsschritt: Schritt a: +10 mM Benzaldehyd, +0.5 mg mL⁻¹ AHAS-I (A: 1.5 h, B: 5 h); Schritt b: +1 mg mL⁻¹ TA (A: Cv-(S)TA, 12 h, B: At-(R)TA, 5 h).

ren nacheinander zugegeben werden.^[9] In der hier untersuchten sequenziellen Enzymkaskade ist der limitierende Schritt die reduktive Aminierung. Um diese Limitierung zu umgehen, wurden die Reaktionsparameter des reduktiven Aminierungsschritts bezüglich pH-Wert, Temperatur, Konzentrationen von Transaminasen und AHAS-I sowie Aminodonor/PAC-Verhältnis optimiert (Kapitel 5 der Hintergrundinformationen). Für die Enzymkombination Cv-(S)TA/AHAS-I konnte der Umsatz unter optimierten Kaskadenbedingungen (pH 7.5, 25 °C, 1 mg mL⁻¹ Cv-(S)TA, 0.5 mg mL⁻¹ AHAS-I, Alanin/PAC=5:1) auf über 80% gesteigert werden.

Diese optimierten Bedingungen wurden für die sequenzielle Eintopf-Zweistufen-Kaskade angewendet. Die Transa-

minase wurde dabei erst im Anschluss an die zu 100% vollzogene AHAS-I-Reaktion hinzugegeben (Abbildung 3 A). Dadurch konnte der Umsatz von (1R,2S)-NE bei der Kombination AHAS-I/Cv-(S)TA von ursprünglich 2% (Abbildung 2 A: simultane Kaskade) auf 78% (7.8 mm) gesteigert werden (Abbildung 3 A). Zusätzlich wurde die Bildung des Benzylamin-Nebenprodukts auf weniger als 0.5 mm reduziert (Abbildung 3 A). Bei anschließender Zugabe von weiteren 10 mm Benzaldehyd und frischer AHAS-I wurde in einem zweiten Carboligationsschritt erneut PAC gebildet. Da kein weiteres Pyruvat zugesetzt wurde, zeigt dieses Ergebnis, dass die Rezyklierung von Pyruvat (durch Deaminierung von Alanin) auch in der sequenziellen Rezyklierungskaskade erfolgreich durchgeführt wird. Allerdings konnten hier anstelle der theoretisch möglichen 10 mm PAC nur 4.7 mm (47% Umsatz) zusätzlich durch die Rezyklierung generiert werden. Vermutlich ist dies auf die Instabilität des Acetolactats zurückzuführen, welches chemisch zu Acetoin decarboxylieren kann und somit für die PAC-Bildung nicht mehr zugänglich ist. Darüber hinaus kann Acetoin (und gegebenenfalls auch Acetolactat) als Substrat der Cv-(S)TA fungieren.^[11] In diesem Schritt wurde keine deutliche Erhöhung der NE- oder Benzylamin-Konzentration beobachtet, was eine nahezu vollständige Inaktivierung von Cv-(S)TA impliziert (Abbildung 3 A). Nach Zugabe von frischer Cv-(S)TA stieg die Konzentration des Zielprodukts (1R,2S)-NE (*de* > 98%, *ee* > 99%) auf 12.9 mm. Dies entspricht etwa 65% der möglichen Produktkonzentration (bezogen auf insgesamt 20 mm eingesetztem Benzaldehyd; Abbildung 3 A).

Im Falle der Kombination AHAS-I/At-(R)TA ist der sequenzielle Kaskadenmodus noch deutlich effizienter. (1R,2R)-NPE ist über die sequenzielle Eintopf-Zweistufen-Reaktionsführung mit einem Umsatz von > 96% in hoher optischer Reinheit (*de* > 98%, *ee* > 99%) zugänglich. Nach Zugabe von weiteren 10 mm Benzaldehyd und frischer AHAS-I war die At-(R)TA noch aktiv, sodass ohne Zusatz weiterer Transaminase in 5 h bereits 16.6 mm (1R,2R)-NPE (83% Umsatz) durch den zusätzlichen Rezyklierungsschritt generiert wurden. Eine weitere Zugabe der At-(R)TA erhöhte die Endproduktkonzentration nicht nennenswert.

Zusammenfassend haben wir eine neue Strategie zur Synthese von (1R,2S)-NE und (1R,2R)-NPE entwickelt. Beide Verbindungen sind über biokatalytische Eintopf-Zweistufen-Reaktionen in hohen optischen Reinheiten (*de* > 98%, *ee* > 99%) aus preiswerten Ausgangsstoffen ohne Isolierung des Zwischenprodukts zugänglich. Darüber hinaus können diese Kaskadenreaktionen im neuartigen „Rezyklierungsmodus“ durchgeführt werden, wobei ein Coprodukt der zweiten Reaktion ohne Zugabe weiterer Katalysatoren oder Cosubstrate entfernt und als Substrat des ersten Reaktionsschritts rezykliert werden kann.

Die Kombination aus Reaktions- und Prozessoptimierung führte im sequenziellen Kaskadenmodus mit den Enzymen AHAS-I und Cv-(S)TA zu einem auf 80% (8.0 mm) gesteigerten Umsatz des Zielprodukts (1R,2S)-NE. Zur Herstellung von (1R,2R)-NPE konnten wir (*R*)-selektive ω -TAs identifizieren, die die Zweistufen-Reaktion in einem Gefäß auch im simultanen Modus mit Umsätzen von bis zu 85% (8.5 mm) ausführen. Durch Einsatz des sequenziellen Modus

konnte die Nebenproduktbildung (Benzylamin) signifikant reduziert werden. Hierbei lag der Umsatz von (1*R*,2*R*)-NPE nach 13 h über beide Reaktionsschritte bei mehr als 96% (9.6 mm). Im optionalen Rezyklierungsschritt konnte allein durch erneute Zugabe von 10 mm Benzaldehyd die Gesamtkonzentration des Zielprodukts auf 16.6 mm (83% Umsatz) gesteigert werden.

Der Rezyklierungsmodus kann für jede Kaskadenreaktion angewendet werden, bei der die Nebenprodukte einer Reaktion als Substrate für einen anderen Reaktionsschritt wiederverwendet werden können. Dies optimiert nicht nur die Atombilanz der Reaktion, sondern reduziert auch die Menge gebildeter Nebenprodukte.

Experimentelles

L-Alanin (Merck), D-Alanin (Sigma Aldrich) und Pyruvat (Sigma-Aldrich) hatten eine Reinheit > 99%. Benzaldehyd (Sigma-Aldrich) wurde vor der Verwendung frisch destilliert. Die Herstellung der Katalysatoren Cv-(S)TA und AHAS-I ist in den Hintergrundinformationen beschrieben. Die (*R*)-selektiven ω -Transaminasen sind von der Enzymicals AG (Deutschland) als lyophilisierte Rohzellextrakte erhältlich. Reaktionsdetails, Reaktionsanalytik, Kaskadenoptimierungen und die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante sind ebenfalls in den Hintergrundinformationen zu finden.

Eingegangen am 27. Januar 2013
Online veröffentlicht am 9. Mai 2013

Stichwörter: Asymmetrische Synthesen · Biokatalyse · Enzymkaskaden · Phenylpropanolamin · ω -Transaminasen

- [1] a) F. Cavani, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 1175–1183; b) E. Ricca, B. Brucher, J. H. Schrittwieser, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2239–2262.
- [2] a) S. Shanmuganathan, D. Natalia, L. Greiner, P. Dominguez de Maria, *Green Chem.* **2012**, *14*, 94–97; b) M. J. Climent, A. Corma, S. Iborra, M. Mifsud, A. Velty, *Green Chem.* **2010**, *12*, 99–107.
- [3] a) M. Sherman, *Spatial Statistics and Spatio-Temporal Data: Covariance Functions and Directional Properties*, Wiley, Hoboken **2010**; b) G. Blay, I. Fernández, B. Monje, J. R. Pedro, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 8039–8042; c) F. K. Cheung, A. M. Hayes, J. Hannadouche, A. S. Y. Yim, M. Wills, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3188–3197; d) D. A. Evans, M. D. Ennis, T. Le, N. Mandel, G. Mandel, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1154–1156; e) J. L. García Ruano, C. Alemparte, M. T. Aranda, M. M. Zarzuelo, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 75–78; f) R. Guo, A. J. Lough, R. H. Morris, D. Song, *Organometallics* **2004**, *23*, 5524–5529; g) S. R. Hitchcock, D. M. Casper, J. F. Vaughn, J. M. Finefield, G. M. Ferrence, J. M. Esken, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 714–718; h) C. Unaleroğlu, A. E. Aydin, A. S. Demir, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 742–749.
- [4] a) N. A. Flavahan, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *313*, 432–439; b) R. B. Rothman, N. Vu, J. S. Partilla, B. L. Roth, S. J. Hufeisen, B. A. Compton-Toth, J. Birkes, R. Young, R. A. Glennon, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *307*, 138–145; c) R. Krizevski, N. Dudai, E. Bar, E. Lewinsohn, *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *114*, 432–438.
- [5] J. A. Groeper, S. R. Hitchcock, G. M. Ferrence, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2884–2889.
- [6] H. K. Lee, S. Kang, E. B. Choi, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 5454–5460.

- [7] F. Lopez-Gallego, C. Schmidt-Dannert, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 174–183.
- [8] a) A. Bruggink, R. Schoevaart, T. Kieboom, *Org. Process Res. Dev.* **2003**, *7*, 622–640; b) S. F. Mayer, W. Kroutil, K. Faber, *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 332–339; c) J. H. Schrittweiser, J. Sattler, V. Resch, F. G. Mutti, W. Kroutil, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 249–256; d) R. A. Sheldon, *Green Chem.* **2007**, *9*, 1273–1283; e) R. A. Sheldon, *Chem. Commun.* **2008**, 3352–3365.
- [9] C. V. Voss, C. C. Gruber, W. Kroutil, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 753–757; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 741–745.
- [10] S. Engel, M. Vyazmensky, S. Geresh, Z. Barak, D. M. Chipman, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *83*, 833–840.
- [11] T. Sehl, R. C. Simon, H. C. Hailes, J. M. Ward, U. Schell, M. Pohl, D. Rother, *J. Biotechnol.* **2012**, *159*, 188–194.