

# Hydroxy-Funktionalisierung nichtaktivierter C-H- und C=C-Bindungen: Neue Perspektiven für die Synthese von Alkoholen durch biokatalytische Verfahren\*\*

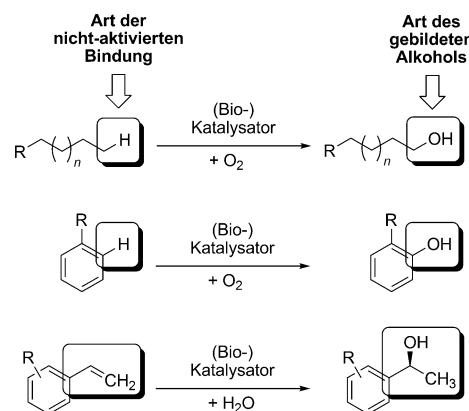
Harald Gröger\*

Alkohole · Biokatalyse · Enzymkatalyse ·  
Hydratisierungen · Hydroxylierungen

Professor Werner Hummel  
zum 65. Geburtstag gewidmet

Innernhalb der organischen Chemie hat sich die Biokatalyse zu einem wertvollen Hilfsmittel für akademische und industrielle Synthesen entwickelt, das die klassisch-chemischen und chemokatalytischen Verfahren in vorteilhafter Weise ergänzt.<sup>[1]</sup> Besonders im Bereich der Feinchemikalien- und Wirkstoff-Produktion werden Enzym-katalytische Verfahren bereits mit großem Erfolg eingesetzt.<sup>[2,3]</sup> Ein aktueller Fokus der Biokatalyse-Forschung liegt auf der Realisierung chemischer Transformationen, für die bislang keine effizienten und nachhaltigen Lösungen bestehen. Der Bedarf an solchen neuen Methoden wurde von Vertretern der pharmazeutischen Industrie ausführlich dargelegt.<sup>[4]</sup> Eine Herausforderung ist die selektive Hydroxy-Funktionalisierung von nicht-aktivierten C-H- und C=C-Bindungen. Als Beispiele solcher „dream reactions“ können die  $\omega$ -Hydroxylierung von (substituierten) Alkanen und regioselektive Hydroxylierung von Arenen jeweils mit Luftsauerstoff als Oxidationsmittel wie auch die asymmetrische Addition von Wasser an nicht-aktivierte Alkene betrachtet werden (Schema 1). Enzyme scheinen dafür zwar grundsätzlich prädestiniert, allerdings sind gerade Hydroxylierungen von oftmals niedrigen Enzymaktivitäten und -stabilitäten geprägt, die zu Biotransformationen mit geringer Effizienz führen. In den zurückliegenden Monaten wurden nun für die oben genannten Reaktionen beeindruckende Lösungswege auf Basis der Enzymkatalyse aufgezeigt. Nachfolgend sind diese am Beispiel von drei Pionierleistungen,<sup>[5–8]</sup> die alle als Durchbrüche auch im Hinblick auf das Erzielen präparativ praktikabler Katalyseprozesse angesehen werden können, dargestellt.

Eine aktuelle Herausforderung für die Enzymkatalyse ist ihre breitere Anwendung bei der Produktion von Spezial- und Bulkchemikalien im >1000-Jahrestonnen-Maßstab, da ihre Anwendung in diesem Bereich noch sehr überschaubar ist.<sup>[2]</sup> Eines der wenigen Beispiele ist die Acrylamid-Produktion

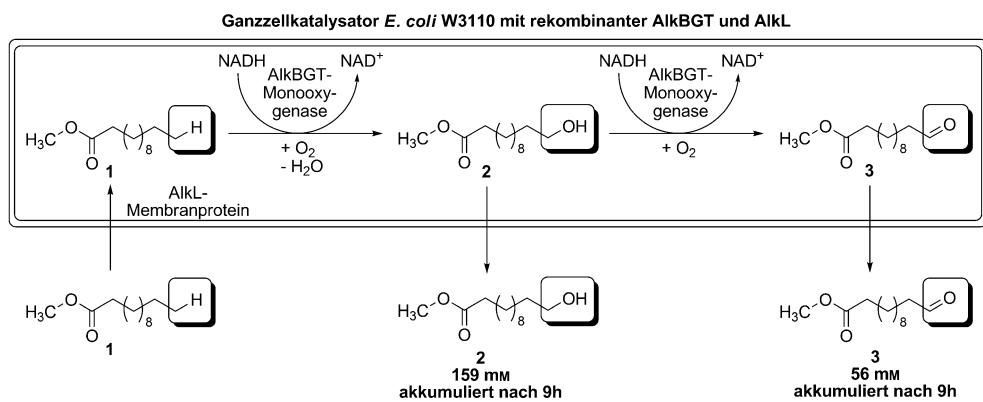


**Schema 1.** Ausgewählte Syntheseherausforderungen bei der Hydroxy-Funktionalisierung.

mit einer Nitrilhydratase.<sup>[9]</sup> Interessante Zielmoleküle sind aktuell  $\omega$ -Aminolaurinsäure und ihre Ester als Ersatz für Laurinlactam,<sup>[10]</sup> das für die Produktion von Polyamid-12 im Maßstab von mehreren 10 000 Jahrestonnen benötigt wird. Die Arbeitsgruppe um Schmid und Bühler konnte nun in einem Projekt mit Evonik Industries AG ein neuartiges und auf nachwachsenden Rohstoffen basierendes Verfahren für die Herstellung von  $\omega$ -Aminolaurinsäuremethylester unter Einsatz einer Monooxygenase entwickeln.<sup>[5,6]</sup> Die damit katalysierte selektive Hydroxylierung einer Alkylkette als Reaktionstyp, der bis heute als präparativ schwierig und allgemein wenig effizient gilt, gelingt hier mit außerordentlich hoher Prozesseffizienz (Schema 2): Bei Einsatz eines *E. coli*-Ganzzellkatalysators, in dem eine Monooxygenase und ein AlkL-Membranprotein (das für den Transport des hydrophoben Esters durch die äußere Membran in die Zelle verantwortlich ist) rekombinant vorliegt, wird der Dodecansäureester **1** zunächst endständig hydroxyliert und danach partiell in den Aldehyd **3** überführt, wobei eine Produktkonzentration von 159 mM an Alkohol **2** in der organischen Phase begleitet von zusätzlich ca. 50 mM des daraus durch Weiteroxidation entstandenen Aldehyds **3** erzielt wird.<sup>[5]</sup> Eine Schlüsselrolle kommt neben der Monooxygenase auch dem AlkL-Protein zu: Dessen Gegenwart führt zu einer 62-fachen Erhöhung der Ganzzellaktivität auf 87 U g<sup>-1</sup> BTM (BTM = Biotrockenmasse).

[\*] Prof. Dr. H. Gröger  
Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld  
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)  
E-Mail: harald.groeger@uni-bielefeld.de

[\*\*] Ich danke dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die großzügige Unterstützung im Rahmen des Projekts „BISON – Biotechnologische Synthese von Carboxyaminen und Carboxyalkoholen“ (Förderkennzeichen: 0316044A).



**Schema 2.** Selektive  $\omega$ -Hydroxylierung des Dodecansäureesters **1** unter Einsatz eines Ganzzellkatalysators.

Eine anschließende Umsetzung des Aldehyds **3** mit einer Transaminase und L-Alanin als Amindonor ergibt den gewünschten  $\omega$ -Aminododecansäureester, wofür auch von Schmid, Bühler et al. ein Ganzzellverfahren entwickelt wurde.<sup>[6]</sup> Die präparative Nützlichkeit und das industrielle Potenzial des Verfahrensansatzes,  $\omega$ -Aminolaurinsäure auf biotechnologischem Wege ausgehend von Palmkernöl für Polyamid 12 herzustellen, wird durch eine aktuelle Pressemitteilung von Evonik Industries AG unterstrichen,<sup>[11]</sup> nach der Anfang 2013 eine hierzu angedachte Pilotanlage in Slovenska Lupka (Slowakei) in Betrieb genommen wurde.

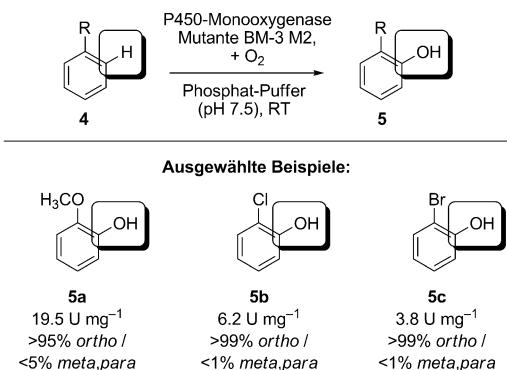
Analog zu der von aliphatischen Molekülen ist auch die Hydroxy-Funktionalisierung von Arenen anspruchsvoll. Selektive Hydroxylierungen substituierter Arene gelten bis heute als schwierig und oftmals nur unter harschen Reaktionsbedingungen und Nebenproduktbildung sowie mit geringer Selektivität durchführbar. Die Enzymkatalyse bietet auch hier eine interessante Perspektive zur Lösung dieses Problems. So gelang kürzlich der Arbeitsgruppe um Schwaneberg durch Protein-Engineering die hochregiospezifische *ortho*-Hydroxylierung von substituierten Arenen **4** (Schema 3).<sup>[7]</sup>

Die Zweisubstitution von Anisol (**4a**) erfolgt hierbei unter Einsatz einer P450-Monoxygenasemutante mit hoher Wechselzahl von  $38.6 \text{ s}^{-1}$ .<sup>[7]</sup> Dies entspricht mit umgerechnet  $19.5 \text{ U mg}^{-1}$  zugleich der bislang höchsten für aromatische

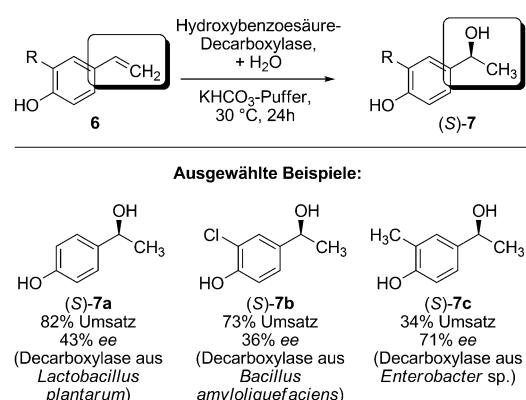
Hydroxylierungen mit P450-Monoxygenasen beobachteten Enzymaktivität. Das Produkt *ortho*-Methoxyphenol (**5a**) wird zudem mit hervorragender *ortho/para*-Regioselektivität von  $>95:5$  gebildet, und die *meta*-substituierte Form tritt nicht auf. Hohe Aktivitäten und *ortho/para*-Selektivitäten werden auch beim Einsatz von anderen, beispielsweise halogenierten Arenen erzielt. Die erhaltenen substituierten Phenole sind wertvolle Zwischenprodukte für die Synthese von Natur- und Arzneistoffen. Eine verbleibende Aufgabe bei diesem Verfahren, das mit molekularem Sauerstoff in Wasser bei Raumtemperatur abläuft, besteht in der Erhöhung der Produktkonzentration von bislang  $\leq 0.67 \text{ g L}^{-1}$ .

Erwähnt sei im Zusammenhang mit der selektiven enzymatischen Hydroxylierung von Arenen an dieser Stelle zudem die aktuelle Arbeit von Shoji, Watanabe et al.: Hierbei wurde mit dem P450-BM3-Wildtypenzym eine hohe *ortho*-Selektivität erzielt, wenn zusätzlich perfluorierte Carbonsäuren als „Ködermoleküle“ eingesetzt wurden.<sup>[12]</sup>

Die katalytische enantioselektive Hydratisierung von nicht-aktivierten Alkenen, beispielsweise Styrol, ist ein vielversprechender Synthesezugang zur Gewinnung enantiomerenreiner Alkohole. Im Unterschied zu vielen anderen asymmetrischen Reaktionen ist bis heute allerdings kein geeigneter chiraler Chemokatalysator für diesen Reaktionstyp bekannt.<sup>[13]</sup> Kürzlich gelang die enantioselektive Umwandlung von Styrol zu Phenylethan-1-ol in einer chemoenzymatischen Eintopsynthese, allerdings verläuft diese „formale Wasseranlagerung“ auf zweistufigem Wege unter Wacker-Oxidation und anschließender enzymatischer Ketonreduktion.<sup>[14]</sup> Direkte biokatalytische Hydratisierungen von C=C-Bindungen sind zwar ebenfalls bekannt und werden bereits im industriellen Maßstab bei der Produktion von Fumarsäure genutzt,<sup>[15]</sup> allerdings sind die Substrate hierbei aktivierte Alkene, beispielsweise Enoate. Eine direkte asymmetrische katalytische Wasseranlagerung an Styrol und andere nicht-aktivierte Alkene blieb entsprechend eine Herausforderung, für die nun ebenfalls durch Einsatz von Enzymkatalyse von der Arbeitsgruppe um Faber ein Lösungsansatz entwickelt wurde (Schema 4).<sup>[8]</sup> Hierfür erwiesen sich Hydroxybenzoesäure-Decarboxylasen als geeignet und ermöglichen beim Einsatz von *p*-Hydroxystyrol (**6a**) sowie substituierten Derivaten die asymmetrische Wasseranlagerung mit Umsätzen



**Schema 3.** Selektive *ortho*-Hydroxylierung von Arenen unter Einsatz von P450-Monoxygenasen.



**Schema 4.** Asymmetrische Wasseranlagerung an substituierte Styrole unter Einsatz von Decarboxylasen.

von bis zu 82 % und Enantioselektivitäten von bis zu 71 % *ee*. Beispielsweise wurde *p*-Hydroxystyrol mit 82 % Umsatz und 43 % *ee* in das Produkt (S)-7a umgewandelt. Die aufgrund dieser Enzymklasse zu erwartende Carboxylierung fand dagegen selbst in Gegenwart einer hohen Konzentration an Carbonatpuffer von 3 M nur in untergeordnetem Maße statt (< 5 %). Bemerkenswert ist mit sechs von sieben untersuchten Decarboxylasen der hohe Anteil an Enzymen, die sich für diese Hydratisierung nichtaktivierter C=C-Bindungen eignen. Zukünftige Forschungsaufgaben im Hinblick auf eine breite Nutzung dieser Methode sind die Erhöhung der Substratbreite (da bislang auf *p*-Hydroxy-substituierte Styrole begrenzt) sowie die Verbesserung der Enantioselektivität.

Zusammenfassend wurde kürzlich eine Reihe von biokatalytischen Pionierleistungen im Hinblick auf präparativ praktikable Katalyseprozesse für verschiedene Hydroxy-Funktionalisierungen von (substituierten) Alkanen und Alkenen realisiert. Hierbei gelingen jeweils mit Luftsauerstoff die  $\omega$ -Hydroxylierung von Fettsäureestern und die regioselektive *ortho*-Hydroxylierung von Arenen. Auch für die asymmetrische Addition von Wasser an nicht-aktivierte Alkene wurde ein biokatalytisches Verfahren entwickelt. Diese Arbeiten bieten eine vielversprechende Perspektive für die

zukünftige, verstärkte Anwendung dieser Reaktionstypen unter Einsatz der Enzymkatalyse in der organischen Synthese.

Eingegangen am 1. Oktober 2013  
Online veröffentlicht am 3. März 2014

- [1] *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Bd. 1–3, 3. Aufl. (Hrsg.: K. Drauz, H. Gröger, O. May), Wiley-VCH, Weinheim, **2012**.
- [2] A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [3] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, 485, 185–194.
- [4] D. J. C. 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.
- [5] M. K. Julsing, M. Schrewe, S. Cornelissen, I. Hermann, A. Schmid, B. Bühler, *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, 78, 5724–5733.
- [6] M. Schrewe, N. Ladkau, B. Bühler, A. Schmid, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, 355, 1693–1697.
- [7] A. Dennig, N. Lülsdorf, H. Liu, U. Schwaneberg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 125, 8617–8620; *Angew. Chem. Int. Ed. Ed.* **2013**, 52, 8459–8462.
- [8] C. Wuensch, J. Gross, G. Steinkellner, K. Gruber, S. M. Glueck, K. Faber, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 2349–2353; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 2293–2297.
- [9] Y. Asano, P. Kaul in *Comprehensive Chirality*, Bd. 7 (Hrsg.: E. M. Carreira, H. Yamamoto), Elsevier, Amsterdam, **2012**, S. 122–142.
- [10] T. Schiffer, G. Oenbrink in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 6. Aufl., Electronic Release, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [11] Evonik Industries AG, Pressemitteilung „Alternativer Rohstoff für Polyamid 12: Evonik betreibt Pilotanlage für biobasierte  $\omega$ -Amino-Laurinsäure“, 30. Juli **2013**.
- [12] O. Shoji, T. Kunimatsu, N. Kawakami, Y. Watanabe, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 6738–6742; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 6606–6610.
- [13] L. Hintermann, *Top. Organomet. Chem.* **2010**, 31, 123–155.
- [14] I. Schnapperelle, W. Hummel, H. Gröger, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 1073–1076.
- [15] J.-F. Jin, U. Hanefeld, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2502–2510.