

Biokatalysatoren für die organische Synthese – die neue Generation**

Bettina M. Nestl, Stephan C. Hammer, Bernd A. Nebel und Bernhard Hauer*

Stichwörter:

Biokatalyse · Bioorganische Chemie ·

Enzymkatalyse ·

Synthesemethoden



Die Verwendung von Enzymen als Katalysatoren zur Synthese neuartiger Verbindungen ist in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus gerückt. Entsprechend hohe Erwartungen werden an die Entdeckung und Identifizierung neuer Biokatalysatoren für die organische Synthese gestellt. Dies spiegelt sich auch in der Komplexität der adressierten Reaktionen wider. Der Anwendungsbereich von Biokatalysatoren umfasst die Synthese wichtiger Zwischenprodukte für die pharmazeutische und chemische Industrie sowie die Entwicklung neuer enzymatischer Techniken und Prozesse. Enzyme sind ein wichtiger Teil des Spektrums an Katalysatoren, die der Synthesechemie zur Verfügung stehen. Die Vorteile und Anwendungsmöglichkeiten der neuesten und höchst vielversprechenden Generation von Biokatalysatoren – Reduktasen, Transaminasen, Ammoniak-Lyasen, Epoxidhydrolasen und Dehalogenasen – werden hier vorgestellt und anhand der Synthese von Schlüsselmolekülen beispielhaft diskutiert.

1. Einleitung und Überblick

Katalyse, insbesondere jene mit Säuren, Basen und Metallen, war und ist wichtig für den Erfolg der organischen Synthese. Eine neuartige Gruppe von Katalysatoren sind die Biokatalysatoren. Enzyme ermöglichen chemo-, regio- und stereoselektive Reaktionen und erleichtern somit die Synthese von komplexen organischen Molekülen. Die hohen Synthesekapazitäten, die einige Enzyme von Natur aus aufweisen, werden bereits für die industrielle Produktion von Grund- und Feinchemikalien sowie Arzneimitteln eingesetzt. Die Herausforderung liegt jedoch vornehmlich darin, das gesamte Potenzial von Enzymen als alternative Katalysatoren zu ihren chemischen Gegenstücken zu entdecken und langfristig nutzbar zu machen. Somit können neue und bekannte Syntheserouten in der organischen Chemie erschlossen oder optimiert werden. Das wachsende Interesse an Enzymen und Mikroorganismen sowie ihre Berücksichtigung als Katalysatoren bei der Umsetzung von Synthesestrategien führen dazu, dass sich das Forschungsfeld signifikant weiterentwickelt. Dem Ziel der Kommerzialisierung ist man inzwischen einen erheblichen Schritt näher gekommen. Mittlerweile hat die Biokatalyse einen Punkt erreicht, an dem ernsthaft über die Verwendung von Enzymen für gleichermaßen einfache wie komplexe chemische Reaktionsschritte nachgedacht wird. Hauptgründe für die Anwendung von Enzymen für spezifische und präparative Aufgaben sind die hohe Selektivität und Spezifität dieser Katalysatoren. Der chirale Aufbau der aktiven Tasche ermöglicht oft die gewünschte enantiomerenreine Herstellung der Reaktionsintermediate und Produkte. Biokatalysatoren können nicht nur für die Einführung von chiralen Zentren in einem Molekül genutzt werden, sondern auch für milde Syntheserouten, bei denen Chemo- und Regioselektivitäten eine Schlüsselrolle spielen.^[1] Diese charakteristischen Vorteile enzymatisch katalysierter Reaktionen wurden zahlreich beschrieben.

In der chemischen und pharmazeutischen Industrie wird bei der Synthese von einigen chiralen Verbindungsklassen die Biokatalyse mehr und mehr zur Methode der Wahl. Diesbe-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung und Überblick	3133
2. Selektive Reduktion aktivierter C=C-Bindungen	3135
3. Enzyme zur Herstellung chiraler Amine und Aminosäuren	3140
4. Biokatalyse als Alternative zur Generierung chiraler Epoxide und Epoxidringöffnungsprodukte	3149
5. Zusammenfassung und Ausblick	3154

züglich sind besonders Aminosäuren, Aminoalkohole, Amine, Alkohole und Epoxide zu nennen, die wichtige Bausteine für viele biologisch aktive Verbindungen sind.^[2] In den folgenden Abschnitten werden bekannte, bereits etablierte Biokatalysatoren benannt und erläutert. Die am häufigsten in der industriellen organischen Synthese eingesetzten Enzyme gehören zu den Klassen der Hydrolasen und Keto-reduktasen. In den letzten Jahren waren Hydrolyserreaktionen wegen der Verfügbarkeit sowie der einfachen Handhabung von Esterasen, Lipasen und im geringeren Maße Acylasen ein dominierender Bereich der Biokatalyse. Darüber hinaus machen die Abwesenheit von Kofaktoren sowie die breite Substratspezifität und Stabilität in Lösungsmitteln diese Enzymklasse wertvoll für die Synthese.^[3] Ein neu etabliertes Anwendungsgebiet für Lipasen ist die Polymerisation. Dies ermöglicht einen Zugang zu einer großen Zahl an Polymeren, die über Polykondensation und Ringöffnungspolymerisation ausgehend von cyclischen Monomeren hergestellt werden.^[4] Chemische Veresterungen werden üblicherweise mithilfe von Metall- oder Säurekatalyse bei höheren Temperaturen oder Drücken durchgeführt. Dies ist allerdings bei der Verwendung von Acrylverbindungen nicht zielführend, da diese unter solchen Bedingungen spontan polymerisieren können. Anders als chemische Katalysatoren können Lipasen effiziente Veresterungen von Acrylaten unter milden Reaktionsbedingungen^[5,6] katalysieren, was ihren Einsatz im industriellen Maßstab interessant macht.^[7] In den letzten Jahren haben sich ebenfalls Ketoreduktasen^[8] etabliert, welche die asymmetrische Reduktion von Ketonen zu chiralen Alkoho-

[*] Dr. B. M. Nestl, Dipl.-Chem. S. C. Hammer, Dr. B. A. Nebel,
Prof. Dr. B. Hauer
Technische Biochemie, Universität Stuttgart
Stuttgart (Deutschland)
E-Mail: Bernhard.Hauer@itb.uni-stuttgart.de

[**] Das Titelbild „Guiding“ stammt von der jungen österreichischen Künstlerin Claudia Nebel. Das Werk illustriert ihre Interpretation des Begriffs „Biokatalyse“. Das Bild zeigt die Interaktion eines Substrats im aktiven Zentrum eines Enzyms.

len ermöglichen, eine der am weitesten verbreiteten Redoxreaktionen in der organischen Chemie.^[9] Die „Merck-Process-Group“ wies kürzlich darauf hin, dass Fortschritte in der Ketoreduktase-Applikation ein großes Potenzial für eine nachhaltige chemische Prozesskultur bieten.^[10] Außer den Ketoreduktasen finden auch Baeyer-Villiger-Monoxygenasen zunehmende Verwendung, auch wenn sich in beiden Fällen die Methodik wegen der Kofaktorregenerierung komplexer gestaltet als bei der Gruppe der Hydrolasen. Baeyer-Villiger-Monoxygenasen werden für die Oxidation aliphatischer und cyclischer Ketone zur Herstellung enantiomerenreiner Zwischenprodukte eingesetzt.^[11] Zusätzlich zu den Oxidoreduktasen im Allgemeinen gehören neue C-C-, C-N- und C-O-bindungsbildende Biokatalysatoren mit einem breiten Substratspektrum zu der Gruppe von Enzymen, in deren Fall das wissenschaftliche wie auch das industrielle Interesse stetig zunimmt.^[12,13] Unter diesen wurden vor allem Aldolasen, Hydroxynitrilasen und Thiamindiphosphat-abhängige Lyasen, wie die Benzaldehydrylase oder die Pyruvatdecarboxylase, als leistungsfähige Biokatalysatoren identifiziert und für verschiedenste Anwendungen genutzt. So ermöglichen diese Enzyme zusätzlich zur Herstellung unterschiedlicher Zucker und cyclischer Kohlenstoffver-

bindungen auch die Synthese von Acyloinen und Cyanhydrinen.^[13]

Gegenwärtig gibt es eine Vielzahl von etablierten biokatalytischen Strategien, um Chiralität in ein Molekül einzuführen. Diese Katalysatoren können auch in Kaskadenreaktionen sequenziell oder kooperativ genutzt werden.^[14] Darüber hinaus wurden Beispiele beschrieben, bei denen Biokatalysatoren zusammen mit konventionellen chemischen Katalysatoren in heterogenen Kaskadenreaktionen in einem Reaktionsgefäß eingesetzt werden. Das Potenzial, verschiedene Katalysatoren in einem Ansatz parallel zu verwenden, ist bei Enzymen wegen ihres chemisch inerten Verhaltens besonders ausgeprägt. Allerdings ist dieses Potenzial wegen der begrenzten Reaktionsvielfalt der etablierten Enzyme kaum nutzbar.

Viele Enzyme (hauptsächlich Hydrolasen, Lyasen und Oxidoreduktasen) werden bereits für die Synthese von unterschiedlichsten organischen Verbindungen verwendet. Wegen der eingeschränkten chemischen Reaktionsvielfalt dieser etablierten Enzyme ist ein großes Interesse an neuen Biokatalysatoren für weitere Reaktionen vorhanden. Um neuartige Enzyme zu identifizieren und zu entwickeln, sind heutzutage ausgereifte Techniken verfügbar: 1) das Screening



Bernhard Hauer (2. von links) studierte Biologie an der Universität Hohenheim und promovierte 1982 bei Franz Lingens. Nach einem Postdoktorat an der University of Chicago bei James Shapiro wurde er 1983 Laborleiter bei der BASF SE. Dort war er zuletzt für den Forschungsbereich Biokatalyse als Wissenschaftlicher Direktor verantwortlich. 1996 habilitierte er sich an der Universität Heidelberg. Nach Jahren in der Industrie folgte er 2009 dem Ruf an die Universität Stuttgart als Leiter des Instituts für Technische Biochemie. Er entwickelt neuartige Enzyme zur Erweiterung biokatalytischer Reaktionen und Prozesse.

Bettina M. Nestl (2. von rechts) studierte Chemie an der Universität Graz und promovierte 2007 bei Kurt Faber. Im Anschluss wechselte sie für ein Postdoktorat an das Manchester Institute of Biotechnology der University of Manchester zu Nicholas J. Turner. Seit 2010 ist sie als Gruppenleiterin am Institut für Technische Biochemie tätig. Dort befasst sie sich mit dem Akquirieren neuer nationaler und internationaler Projekte und widmet ihr wissenschaftliches Engagement hauptsächlich der Entwicklung und Optimierung von Proteinen mit neuartigen katalytischen Eigenschaften und deren Anwendung in Kaskadenprozessen.

Stephan C. Hammer (rechts) studierte nach einer abgeschlossenen Ausbildung zum Techniker bei der BASF SE Chemie an den Universitäten Marburg und Cambridge. Nach seiner Diplomarbeit wechselte er an das Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart. Unter der Leitung von Bernhard Hauer entwickelt er in seiner Doktorarbeit Biokatalysatoren für die chirale Brønsted-Säurekatalyse.

Bernd A. Nebel (links) studierte Umweltwissenschaften mit einer Spezialisierung in organischer Chemie und Chemieingenieurwesen an der Universität Graz. Er promovierte dort bei Martin Mittelbach im Bereich nachwachsende Rohstoffe. Nach einem Postdoktorat am Forschungszentrum CoEBio3 der University of Manchester bei Nicholas J. Turner wechselte er 2010 an das Institut für Technische Biochemie. Dort koordiniert er die Gruppe für Angewandte Biokatalyse und erforscht unkonventionelle Reaktionsmedien zur Modifizierung erneuerbarer Rohstoffe sowie deren nachhaltiger industrieller Anwendung.

nach neuen Stämmen und neuen Enzymaktivitäten, 2) gezielte Evolution für die Optimierung von Enzymen mit gewünschten Funktionen, 3) die Entwicklung von alternativen Reaktionsmedien und unkonventionellen Lösungsmittelsystemen sowie 4) die Bioinformatik.^[5,15] Zusätzlich zu den zuvor genannten Möglichkeiten bieten neuartige Screeningmethoden von Mikroorganismen, inklusive der Anreicherungsselektion und der Metagenomik, sowie das De-novo-Engineering von Designerproteinen neue Möglichkeiten, um Enzyme als Katalysatoren zu entwickeln. In diesem Sinne dürfen auch die Untersuchungen der katalytischen Flexibilität von vorhandenen Enzymen für eine Vielzahl nichtnatürlicher Reaktionen nicht unerwähnt bleiben.

In diesem Aufsatz zeigen wir ausgewählte biokatalytische Beispiele für die selektive Synthese interessanter Moleküle, die mit konventionellen chemischen Methoden nur schwer zu erreichen sind. Die jüngsten Fortschritte in der Biokatalyse mit dem Schwerpunkt auf Epoxiden, Aminen, Aminoalkoholen und reduzierten Alkenen werden hier zusammengefasst. Darüber hinaus werden die breite Anwendbarkeit bestimmter Katalysatoren und deren Nutzen für die organische Synthese in den Vordergrund gestellt. Die Zusammenfassung relevanter Informationen gibt Chemikern in der Industrie und an Hochschulen einen Einblick in die neuesten Forschungsfortschritte. Die Biokatalyse bietet mit ihren besonderen Selektivitäten neue Möglichkeiten für die Retrosynthese komplexer Moleküle.

2. Selektive Reduktion aktiver C=C-Bindungen

Asymmetrische Hydrierungen sind in der organischen Chemie von größter Bedeutung und sind oft ein Schlüsselschritt in einer Gesamtsynthese. Dies gilt besonders für die stereoselektive Reduktion von C=C-Bindungen, da in einem Schritt bis zu zwei Stereozentren erzeugt werden können (Abbildung 1).

Aktuell werden solche Reaktionen durch Übergangsmetall-Homogenkatalysatoren^[16] oder Organokatalysatoren^[17] katalysiert. Ein neues Instrument für die asymmetrische Reduktion von aktivierte C=C-Bindungen sind Katalysatoren der „Old Yellow Enzym“(OYE)-Familie.^[18] Die Mitglieder dieser Familie, auch Enreduktasen (EC 1.3.1.31) genannt, sind Flavinmononukleotid (FMN) enthaltende, NAD(P)H-abhängige Redoxkatalysatoren. Die Reaktion lässt sich in zwei Schritte unterteilen: Bei der reduktiven Teilreaktion wird der FMN-Kofaktor durch NAD(P)H reduziert, während im oxidativen Teilschritt die Reduktion der aktivierte Doppelbindung bei gleichzeitiger Oxidation des FMN-Kofaktors erfolgt (Abbildung 2).

Insgesamt ähnelt die Reaktion einer asymmetrischen Michael-Addition an eine α,β -ungesättigte C=O-Bindung, wobei das Hydrid und das Proton ausschließlich *trans*-stereospezifisch addiert werden. Erste biokatalytische Versuche wurden mit ganzen Zellen durchgeführt, um eine externe NAD(P)H-Kofaktor-Rückgewinnung und aufwendige Proteinaufreinigung zu umgehen. Hierbei wurde meistens die Bäckerhefe als Zellsystem verwendet. Während exzellente Stereoselektivitäten erreicht wurden, sind Chemoselективitä-

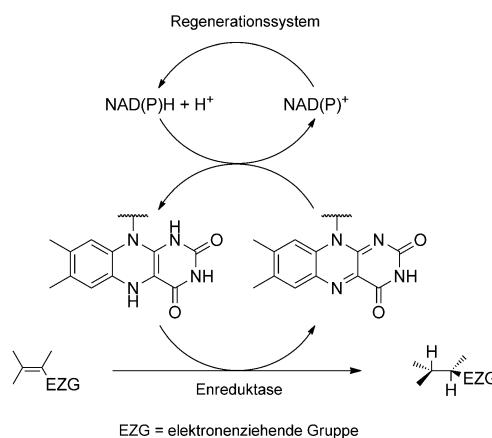


Abbildung 1. Asymmetrische Reduktion einer aktivierten Doppelbindung, katalysiert durch eine Enreduktase der OYE-Familie.

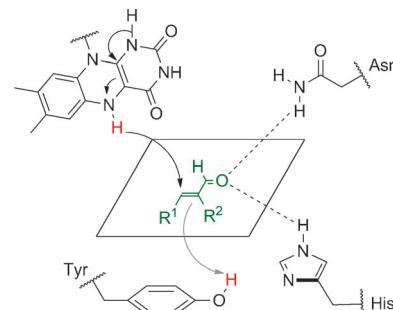


Abbildung 2. Oxidative Halbreaktion, die von OYE katalysiert wird. Die Reaktion erfolgt über den Transfer eines Hydrids vom reduzierten FMN auf das C β -Atom des Substrats sowie anschließende Protonierung des C α -Atoms. Die Reduktion von FMN mit NAD(P)H als Reduktionsmittel findet in der reduktiven Halbreaktion statt.

ten und Gesamtausbeuten mit ganzen Zellen oft gering. Dies ist im Wesentlichen auf Nebenreaktionen, wie die Reduktion von Carbonylverbindungen zu Alkoholen, zurückzuführen. Diese Nachteile können nun vermieden werden, indem rekombinante Enreduktasen zusammen mit passenden Redoxenzymen zur effizienten Wiedergewinnung des teuren NAD(P)H-Kofaktors verwendet werden.

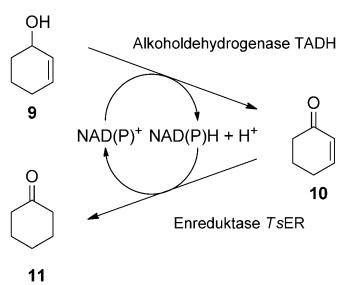
Die asymmetrische Reduktion von konjugierten C=C-Bindungen mit Enreduktasen fand großes Interesse bei Synthesechemikern. Das breite Spektrum von Enreduktase-katalysierten stereospezifischen Reduktionen bietet eine brauchbare Alternative zu herkömmlichen Übergangsmetall-katalysierten Reduktionen. Eine Schwierigkeit bei diesen Systemen ist die Abhängigkeit vom reduzierten Nicotinamidkofaktor NAD(P)H, der die entsprechenden Reduktionsäquivalente für eine Alkenreduktion zur Verfügung stellt. Wegen des teuren Kofaktors und der Notwendigkeit eines Kofaktorregenerationssystems sowie der teilweise nicht zufriedenstellenden Chemoselективitäten bei der Reduktion von ungesättigten Aldehyden und Ketonen wurde kürzlich eine Reihe synthetischer NADH-Mimetika studiert. Bei dieser Reduktion wurde Rohextrakt der thermophilen Enreduktase YqjM aus *Bacillus subtilis* verwendet. Durch den

Einsatz dieser artifiziellen Kofaktoren wurden hohe Umsätze sowie Enantio- und Chemoselektivitäten erzielt.^[19] Enzyme der OYE-Familie sind in vielen Mikroorganismen und Pflanzen zu finden. Mehr als 25 Familienmitglieder wurden bisher biochemisch charakterisiert und auf ihre katalytischen Fähigkeiten untersucht. Alles in allem weisen diese Enzyme einen bemerkenswert umfassenden Substratbereich auf und katalysieren die Reduktion von acyclischen und cyclischen α,β -ungesättigten Ketonen, Aldehyden, Nitroalkenen, Carbonsäuren und Estern wie auch Nitratestern, Nitroglycerinen, nitroaromatischen Sprengstoffen und cyclischen Triazinen.^[20] Einige Enreduktasen können außerdem die Disproportionierungsreaktion von Cyclohex-2-enon zu äquimolaren Mengen Cyclohexanon und Phenol katalysieren. Diese Disproportionierung wurde als Nebenreaktion beobachtet und demonstriert die katalytische Promiskuität der OYEs.^[21]

Darüber hinaus wurde kürzlich gezeigt, dass Enreduktasen eine redoxneutrale Isomerisierung von α,β -ungesättigtem γ -Butyrolacton **1** katalysieren.^[22] Des Weiteren wurden auch β -Halogenacrylesterderivate **4** unter reduktiver Dehalogenierung umgesetzt. Bei dieser Reaktion wird **4** durch eine enzymatische C=C-Bindungsreduktion, gefolgt von einer spontanen β -Eliminierung des instabilen Zwischenprodukts, in das entsprechende Produkt umgewandelt.^[23] Die Umsetzung von β,β -disubstituierten Nitroalkenen **6** verläuft ange- sichts der Reaktion über den Nef-Reaktionsweg^[24] oder der Bildung des 1,2-Oxazetzwischenprodukts etwas überraschend.^[25] Der jeweilige Reaktionsverlauf ist abhängig vom Substrat und vom gewählten Biokatalysator (Abbildung 3).

Kürzlich wurde über eine enzymatische Kaskade zur Isomerisierung von Allylalkoholen zu den entsprechenden gesättigten Carbonylverbindungen berichtet (Schema 1). In dieser Kaskade wurde eine durch eine NAD(P)⁺-abhängige Alkoholdehydrogenase (ADH) katalysierte Oxidation des Allylalkohols Cyclohexenol **9** mit einer durch eine NAD(P)H-abhängige Enreduktase katalysierten Reduktion des α,β -ungesättigten Ketons **10** gekoppelt.^[26] Als Modell-enzym wurden eine ADH aus *Thermus* sp. ATN1 (TADH) und eine Enreduktase aus *Thermus scotoductus* SA-01 (*TsER*) ausgewählt. Nach 24 h Reaktionszeit konnte eine Gesamtausbeute von 66 % unter optimierten Transformationsbedingungen erzielt werden.

In den vergangenen fünf Jahren wurde das katalytische Potenzial von OYEs ausgiebig studiert. Es konnten im präparativen Maßstab hoch stereoselektive C=C-Reduktionen industriell interessanter Moleküle realisiert werden, die mit



Schema 1. Enzymatische Kaskade für die Redoxisomerisierung von Allylalkoholen.

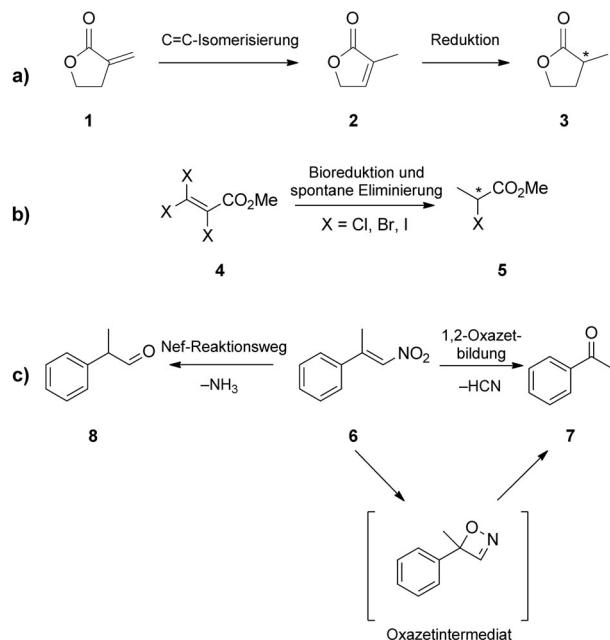
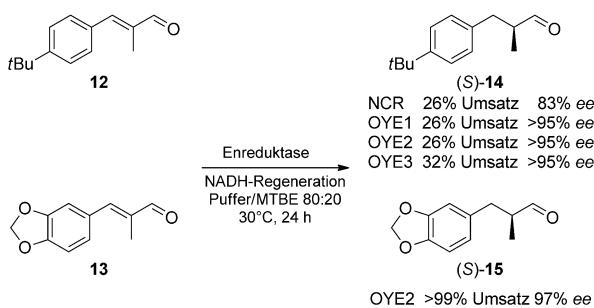


Abbildung 3. Promiskutive Aktivitäten von Enreduktasen. a) Biokatalytische C=C-Isomerisierung und Bindungsreduktion von α,β -ungesättigtem γ -Butyrolacton **1**. b) Enzymatische Bioreduktion von β -Halogen- α,β -ungesättigten Carboxylestern **4** über eine schrittweise C=C-Bindungsreduktion und spontane β -Eliminierung des instabilen, gesättigten Zwischenprodukts. c) Reduktive Transformation von β,β -disubstituierten Nitroalkenen über einen Nef-Reaktionsweg zu **8** oder über die Reduktion der Nitrogruppe zum 1,2-Oxazetderivat, das zum Keton **7** weiterreagiert.

konventionellen Techniken nur schwer zu verwirklichen wären. Die nachfolgenden Beispiele verdeutlichen die breite Anwendbarkeit dieser Enzyme mit unterschiedlichen, hoch-funktionalisierten Michael-Systemen als Substrate. Des Weiteren haben erste Experimente gezeigt, dass OYEs auch zur Katalyse der Umkehrreaktion, der regioselektiven Synthese von α,β -ungesättigten Ketonen aus den entsprechenden ge-sättigten Verbindungen, herangezogen werden können.^[27]

Die asymmetrische katalytische Reduktion von C=C-Bindungen geht Hand in Hand mit der Bildung von bis zu zwei Stereozentren und gehört somit zu einer häufig eingesetzten Strategie zur Herstellung von chiralen Verbindungen. Für die chemoenzymatische, asymmetrische Synthese der Duftstoffe Lilial (**14**) und Helional (**15**) haben Stückler et al. die biokatalytische Reduktion der entsprechenden Zimtaldehydderivate mit unterschiedlichen Enreduktasen studiert (Schema 2).^[28] Diese Reduktionen erwiesen sich unter Standardbedingungen in wässrigem Puffer bei pH 7.5 als sehr langsam. Um eine effiziente Löslichkeit der lipophilen Zimtaldehydderivate im g L⁻¹-Konzentrationsbereich zu gewährleisten, wurden 20 % *tert*-Butylmethylether als Kosolvans zugefügt, was zu einer gesteigerten Reaktionsgeschwindigkeit führte. *R*-Enantiomere mit moderaten Enantiomerenüberschüssen (maximal 53 % ee α -Methyldihydro-zimtaldehyd) wurden mit den Enreduktasen YqjM aus *Bacillus subtilis* und OPR1 aus *Lycopersicon esculentum* erreicht. Die entsprechenden *S*-Enantiomere wurden mit exzellenten Stereoselektivitäten (bis zu 97 % ee) mithilfe von



Schema 2. Reduktase-katalysierte Synthese von chiralen α -Methyldihydroimtaldehydderivaten. MTBE = *tert*-Butylmethylether.

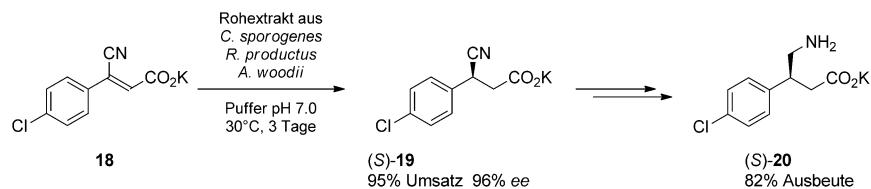
OYE1–OYE3 aus *Saccharomyces* sp. und NCR aus *Zymomonas mobilis* erhalten. Während die Bioreduktion von **12** zu Lilial nur einen moderaten Umsatz von bis zu 32 % zeigte, konnte quantitativer Umsatz von **13** zu Helional in Gegenwart von OYE2 beobachtet werden.

Auf dieser Grundlage konnte eine direkte Synthese von „Roche-Ester“-Verbindungen entwickelt werden. „Roche-Ester“ sind wichtige chirale Bausteine für die Synthese von Vitaminen, Antibiotika sowie einigen Duft- und Naturstoffen. Stückler et al. studierten elf Enzyme der OYE-Familie zur Reduktion von Methyl-2-hydroxymethacrylaten **16** mit unterschiedlichen Schutzgruppen (Schema 3).^[21] OYE1–OYE3 aus *Saccharomyces* sp. und YqjM aus *Bacillus subtilis* haben sich als gute Katalysatoren für diese Reduktion erwiesen. Das nicht geschützte Substrat Methyl-2-hydroxymethacrylat (**16a**) konnte mit nahezu perfekter Stereoselektivität (99 % ee) mit ganzen Zellen zur entsprechenden *R*-Propionatverbindung **17a** umgesetzt werden. OYE1 zeigte bei der Nutzung von NADH als reduzierendem Kofaktor die höchste Umsatzrate von 37 %. Der Schutz der Hydroxygruppe mit Allylether **16b** und Benzylether **16c** führte indes zu höheren Umsatzraten, wobei alle elf eingesetzten Enzyklen Aktivitäten gegenüber diesen Substraten zeigten. OYE3 sowie XenA aus *Pseudomonas putida* setzten diese mit ausgezeichneter *R*-Stereopräferenz nahezu quantitativ

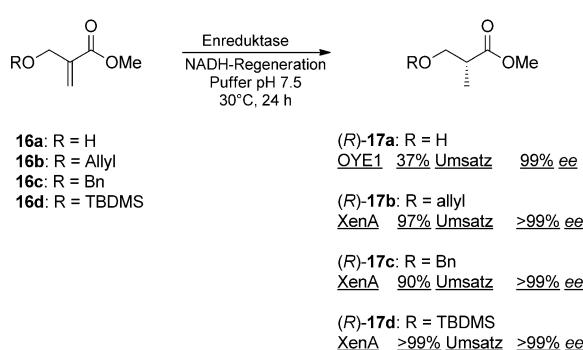
tativ um (97 %). Allein XenA war in der Lage, das sperrige *tert*-Butyldimethylsilyloxyderivat **16d** mit hohem Enantiomerenüberschuss (> 99 % ee) und Umsatz (99 %) zu reduzieren.

Chirale γ -Aminosäuren und ihre Derivate werden für die Behandlung von Störungen des zentralen Nervensystems getestet. Für die asymmetrische Synthese von γ -Aminobuttersäure(GABA)-Derivaten haben Fryszkowska et al. eine neue Methode entwickelt, bei der sie Reduktasen als eine effiziente Alternative zur klassischen Katalyse nutzen. β -Acryl- β -cyanpropansäurederivate wurden aus den entsprechenden Arylacetonitrilen und Glyoxalsäuren synthetisiert und in Bioreduktionen mit OYE eingesetzt. Rohextrakte aus *Clostridium sporogenes* DSM795, *Ruminococcus productus* DSM3507 und *Acetobacterium woodii* DSM1030 katalysierten die Bildung der jeweiligen *S*- β -Aryl- β -cyanpropansäuren in quantitativen Ausbeuten (> 99 %) und mit exzellenten Enantioselektivitäten (bis zu > 99 % ee). Um eine Racemisierung der Produkte unter den vorliegenden wässrigen Reaktionsbedingungen zu minimieren, wurden alle Reaktionen bei pH 7 durchgeführt. Diese Strategie wurde in einer chemoenzymatischen, asymmetrischen Synthese genutzt, um (*S*)-Baclofen [(*S*)-**20**] ausgehend vom Kaliumsalz der (*Z*)-2-(4-Chlorphenyl)-3-cyanpropensäure (**18**) über das Zwischenprodukt (*S*)-**19** herzustellen (Schema 4).^[29]

Enzyklen wurden darüber hinaus auch für die Reduktion von α -Alkoxyacycloenonen zu Acyloinen eingesetzt. Hierfür wurden unterschiedliche O-Schutzgruppen von Methyl (**21a**) und **22b**) über Propyl (**21c**), Allyl (**21b**) bis zu Benzyl (**21d** und **22a**) verwendet.^[30] Chirale Acyloine werden in diversen Prozessen als Zwischenprodukte eingesetzt. Die Konfiguration der O-geschützten Acyloine kann über die



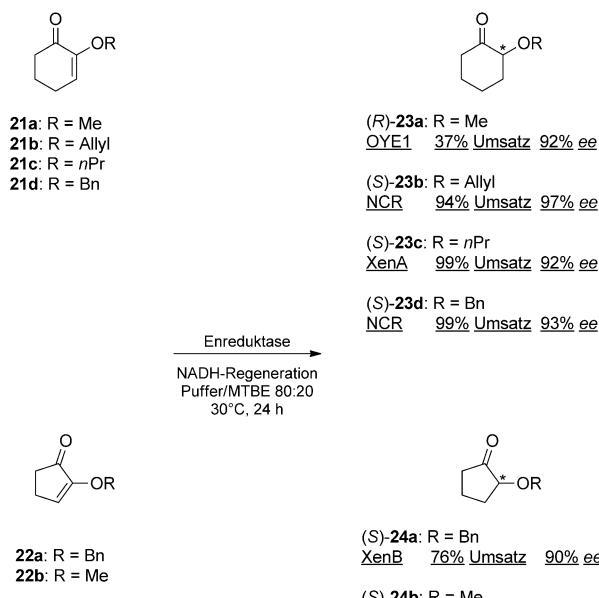
Schema 4. Enantioselektive biokatalytische Reduktion des 3-Cyanpropensäuresalzes bei der Synthese von (*S*)-Baclofen.



Schema 3. Asymmetrische Bioreduktionen von Methyl-2-hydroxymethacrylatderivaten für die Produktion von „Roche-Estern“. Bn = Benzyl, TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl.

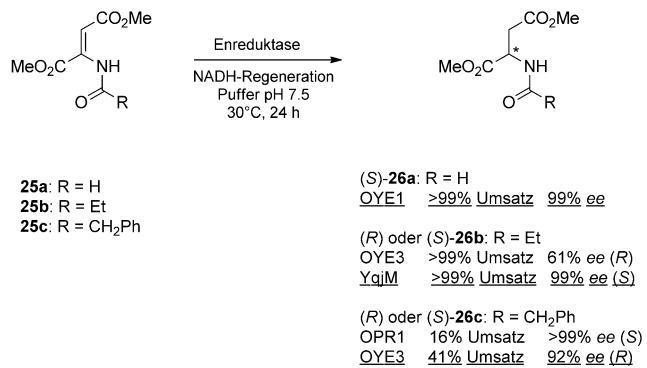
Größe der Schutzgruppe gesteuert werden. Cyclohexenonderivate mit Methylschutzgruppen führten zur Bildung von *R*-konfigurierten Acyloinen, während längerkettige Analoga (Propyl, Allyl und Benzyl) mit sehr hohen Enantiomerenüberschüssen (92–97 % ee) zu den spiegelbildlichen *S*-Produkten umgesetzt wurden. Die Reaktionen wurden mit 20 % (v/v) *tert*-Butylmethylether als Kosolvans durchgeführt. Interessanterweise wurde mit den Cyclopentenonderivaten kein Wechsel der Enantioselektivität beobachtet. Es wurden ausnahmslos *S*-Acyloinprodukte (*S*)-**24a,b** (bis zu > 99 % ee; Schema 5) gebildet.

Chirale Aminosäuren sind wichtige Bausteine und Zwischenprodukte für die chemische und pharmazeutische Industrie. Kürzlich wurden zur asymmetrischen Synthese von Aminosäuren α,β -Dehydroaminoäurederivate als Substrate



Schema 5. Asymmetrische Synthese von O-geschützten Acyloinen mithilfe von Enzytassen.

für Enzytassen verwendet (Schema 6).^[31] Unter Standardbedingungen wurde der N-Acylaminofumarsäurediester **25a** mit OYE1 und OYE3 aus *Saccharomyces* sp. umgesetzt, wobei für (*S*)-**26a** quantitative Ausbeuten und hohe Stereo-selektivitäten erzielt wurden (99% ee). Eine Verlängerung der Amidkette des Substrats zu Propionyl (**25b**) führte mit der Reduktase OYE3 zur Umkehrung der Stereopräferenz mit einem moderaten Enantiomerenüberschuss [61% ee für

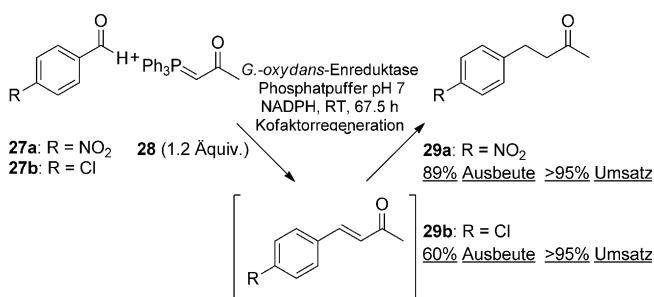


Schema 6. Asymmetrische Bioreduktion von α,β -Dehydroaminoäurederivaten.

(*R*)-**26b**]. Im Unterschied dazu erzeugte das aktivste Enzym YqjM aus *Bacillus subtilis* das *S*-Enantiomer von **26b** mit einem hohen Umsatz (> 99%) und einer hohen Stereo-selektivität (99% ee). Ein ähnlicher Wechsel der Konfiguration konnte bei Verwendung der N-Phenylacetylenschutzgruppe (**25c**) beobachtet werden: Während OYE3 das *R*-Enantiomer erzeugte [92% ee für (*R*)-**26c**], konnte das *S*-Enantiomer mit

einem hohen Enantiomerenüberschuss (> 99% ee) mithilfe von OPR1 erhalten werden.

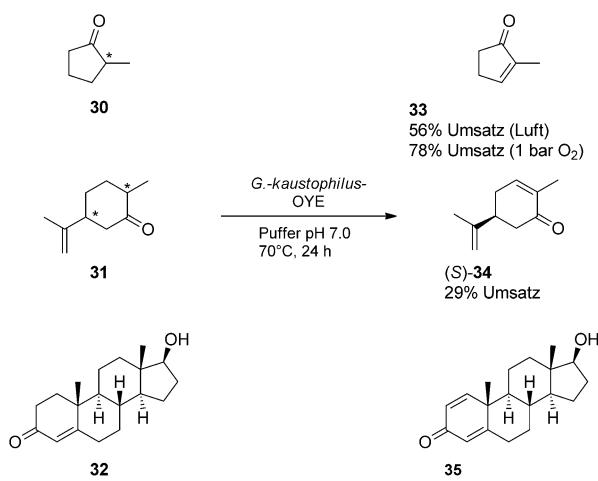
Die asymmetrische Reduktion von Citral und Ketoisorphon mit einer großen Auswahl von Enzytassen wurde detailliert beschrieben. Bei allen Untersuchungen wurden entweder geringe Selektivitäten oder geringe Umsätze beobachtet. Dies konnte mit der Reduktase aus *Gluconobacter oxydans*,^[32] welche die enantioselektive Hydrierung von Citral (Mischung aus Geranal und Neral) und Ketoisorphon in guten Ausbeuten und Selektivitäten ermöglicht, behoben werden.^[33] Studien bezüglich der Kofaktorabhängigkeit der Reduktase zeigten, dass bei der Reduktion NADPH gegenüber NADH mit achtfach höherer Spezifität bevorzugt wird. Kürzlich wurde dieses Enzym in einer chemoenzymatischen Kaskade zusammen mit einer Wittig-Reaktion eingesetzt (Schema 7).^[34]



Schema 7. Kombination einer Wittig-Reaktion mit einer enzymatischen C=C-Bindungsreduktion.

In dieser Kaskadenreaktion wurden *p*-Nitro- und *p*-Chlorbenzaldehyd (**27a** bzw. **27b**) mit äquimolaren Mengen des Ylids **28** vollständig in das α,β -ungesättigte Keton umgesetzt. Die anschließende enzymatische Reduktion mithilfe einer Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* führte zur Bildung der Ketone **29a** bzw. **29b** in hohen Ausbeuten.

Ein weiteres Beispiel der katalytischen Vielfalt von Enzytassen zeigt die enzymatische Desaturierung einer C-C-Bindung in Nachbarschaft zu einer Carbonylgruppe. Schmittmayer et al. haben kürzlich die enzymatische Desaturierung anhand von Studien der thermostabilen OYE aus *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263 (*GkOYE*) veröffentlicht.^[27] *GkOYE* ist in der Lage, typische Substrate wie Cyclopentenon und Cyclohexenon in Gegenwart von NADPH bei 70°C zu reduzieren. Zusätzlich zur erwarteten Reduktion des Enons katalysiert *GkOYE* auch die Rückreaktion, die „Entsättigung“ der C-C-Bindung (Schema 8). Diese Reaktion erfolgt, ohne dass irgendein Nicotinamid-oxidierender Kofaktor nötig wäre, wenn auch auf Kosten von molekularem Sauerstoff. Unterschiedliche Substrate (einschließlich Testosteron) wurden getestet, wobei Umsätze bis zu 78% erzielt wurden. Um die Regio- und Enantioselektivität dieser Dehydrierungsreaktionen zu bestimmen, wurden unterschiedlich substituierte cyclische Ketone als Substrate untersucht. Die Dehydrierung von 2-Methylcyclopentanon (**30**) führte zu 2-Methylcyclopentenon (**33**; 56% in Luftatmosphäre und 78% mit 1 bar O₂), allerdings mit niedriger Stereopräferenz, da beide Enantiomere mit vergleichbaren Raten umgesetzt wurden.

**Schema 8.** Selektive OYE-katalysierte Ketondehydrierung.

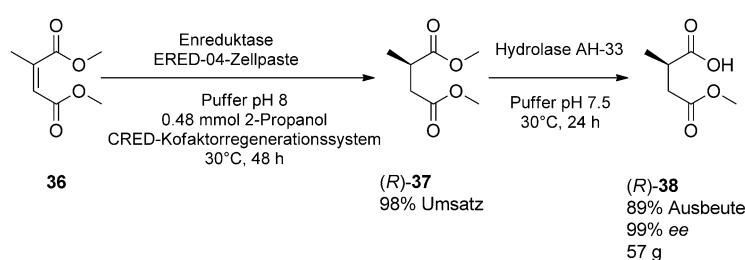
Von den getesteten Substraten konnte nur Dihydrocarvon (**31**), innerhalb von 24 h, selektiv umgewandelt werden (> 99 % ee, S-Enantiomer). Die OYE-katalysierte Desaturierung ebnet neue Synthesewege zu einer Vielzahl α,β -ungesättigter Carbonylverbindungen. Beispiele sind die Synthesen neuer Ketosteroide **35** sowie kleiner α,β -ungesättigter Ketone, die oft zu wertvollen Geschmacks- und Aromastoffen gehören.

Mitglieder der OYE-Familie und ihre Homologen sind für die enzymatische Synthese einer großen Zahl wertvoller Produkte eingesetzt worden. Enantiomerenreines (*R*)-Flurbiprofen sowie Derivate davon wurden mithilfe der thermophilen Reduktase YqjM aus *Bacillus subtilis* synthetisiert.^[35] Darüber hinaus wurden Enreduktasen für die Herstellung von Methyl-(*S*)-2-brombutanoat verwendet.^[36] Brombutanoate sind nützliche Zwischenprodukte bei der Synthese von therapeutischen Wirkstoffen gegen nicht insulinabhängigen Typ2-Diabetes Mellitus. Auch die schrittweise Synthese des Duftstoffes Dihydrocarveol durch Kombination einer En- mit einer Carbonylreduktase wurde kürzlich beschrieben.^[37]

Die Retrosynthese eines wertvollen Monosäureintermediats führte bei Almac zu einem Verfahren unter Verwendung einer Enreduktase in Kombination mit einer Hydrolase. Mitarbeiter von Almac entwickelten dabei einen Prozess für die Herstellung monoacider Bausteine in einem Drei-Enzym-Eintopfverfahren im 70-g-Maßstab (Schema 9).^[38] 70 g des Diesters **36** wurden mit 70 g der Enreduktase ERED-04 (SelectAZyme ESK-1300 Screeningkit) innerhalb von 48 h zu 98 % umgesetzt. Das Produkt (*R*)-**37** wurde anschließend mit 25 g der Hydrolase AH-33 unter stetiger Kontrolle des pH-Werts zur Monosäure (*R*)-**38** hydrolysiert. 57 g des *R*-Enantiomers der Monosäure (*R*)-**38** wurden als einziges Produkt mit hohem Umsatz und hoher Enantioselektivität (99 % ee) hergestellt. Darüber hinaus wurde der NADH-Kofaktor mithilfe einer lösungsmittelstabilen Carbonylreduktase (A131 aus dem SelectAZyme CRED Enzymkit) regeneriert, wobei 2-Propanol zu Aceton oxidiert wurde. Dieses hocheffi-

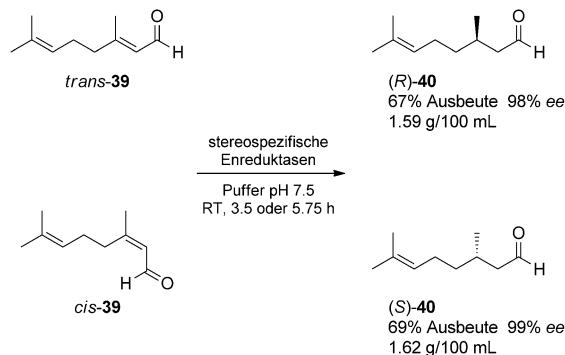
fiziente NADH-Regenerationssystem wurde von Glück et al. entwickelt.^[39]

Um einen alternativen Zugang zu beiden Enantiomeren von Citronellal als chirale Bausteine zu erlangen, studierte die Gruppe von Stewart eine Bibliothek aus 17 Enzymen. Eine einfache Aufreinigung der Biokatalysatoren wurde durch die Expression der Enzyme als Glutathion-S-Transferase(GST)-Fusionsproteine ermöglicht. Aus diesem Set von Enreduktasen wurden OYE2.6 aus *Pichia stipites* und NemA aus *E. coli* als aufgereinigte Enzyme in einem Einphasensystem eingesetzt, um Citral mit guter *R*- bzw. *S*-Selektivität zu reduzieren (Schema 10).^[40] Hierbei wurde Geranal (*trans*-**39**), das *trans*-Isomer von Citral, als Substrat für die biokatalytische Alkenreduktion verwendet. In größerem Maßstab wurde ein mit Ammoniumsulfat behandeltes Extrakt von GST-OYE2.6 eingesetzt, um innerhalb von 5.75 h Geranal (*trans*-**39**) zu 1.59 g (*R*)-Citronellal [(*R*)-**40**] umzusetzen

**Schema 9.** Reaktionskaskade für die Synthese von Monosäuren in großem Maßstab.

(Ausbeute 67 %, Umsatz 95 %). Mit einer ähnlichen Strategie wurde das *cis*-Isomer Neral (*cis*-**39**) durch ein Extrakt von GST-NemA umgesetzt. Hierzu wurde Neral in drei gleich großen Teilen zur Reaktion gegeben, um innerhalb von 3.5 h 1.62 g (*S*)-Citronellal [(*S*)-**40**] in einer Ausbeute von 69 % (> 98 % Umsatz, 99 % ee) zu erhalten.

Die Substratselektivitäten und -promiskuitäten wie auch Stereoselektivitäten der OYE-Familienmitglieder und ihrer Analoga sind in zahlreichen Studien untersucht worden. Trotz vieler Erfolge bei der Generierung vielzähliger chiraler Bausteine mit Enreduktasen gibt es bis dato kein effizientes

**Schema 10.** Biokatalytische Produktion von (*R*)- und (*S*)-Citronellal im Gramm-Maßstab.

Enzym aus der Familie der Enreduktasen für die Reduktion 3-Alkyl-substituierter cyclischer Alkene. Um das Substratspektrum der Enreduktase YqjM aus *Bacillus subtilis* zu erweitern, wurde gerichtete Evolution mithilfe iterativer Sättigungsmutagenese (ISM) angewendet. Durch Röntgenstrukturanalyse von YqjM wurden 20 Aminosäurepositionen als potenzielle Mutationsstellen für die Sättigungsmutagenese ausgewählt. Im ersten Durchgang der gerichteten Evolution konnten neun Mutanten identifiziert werden, die eine gesteigerte Aktivität gegenüber *m*-Methylcyclohexenon zeigten. Wildtyp-YqjM ergab nur einen geringen Umsatz (3%) und moderate Enantioselektivität (77% ee, *R*-Enantiomer) für dieses Modellsubstrat. Außerdem wurden *R*- und *S*-selektive Varianten identifiziert, die Enantiomerenüberschüsse von bis zu 91% (*R*) bzw. 84% (*S*) lieferten. Eine Doppelmutation führte zu einer 130-fachen Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit (99% Umsatz) bei gleichbleibender hoher Enantioselektivität (*R*-Enantiomer bis zu 94% ee). Im Falle des *S*-selektiven Systems zeigten zwei Doppelmutanten relativ hohe Enantioselektivitäten (bis zu 99% ee), aber geringe Umsätze (<20%). Die Aktivitäten und Selektivitäten dieser YqjM-Varianten wurden anschließend anhand einer Reihe von 3-substituierten Cyclohexenon- und Cyclopentenonanaloga getestet. Substrate mit verschiedenen Alkylresten wie auch einer zweiten funktionellen Gruppe (Esterfunktion) wurden reduziert und lieferten dabei die Produkte mit exzellenten Enantiomerenüberschüssen und Umsätzen (99% ee bzw. 99%).^[41]

3. Enzyme zur Herstellung chiraler Amine und Aminosäuren

Chirale Aminosäuren und Amine sind wichtige Verbindungen für eine Vielzahl von Pharmazeutika, Agrochemikalien und anderen Spezialchemikalien.^[42] Klassische chemische Methoden zur Herstellung von enantiomerenreinen Aminen und Aminosäuren umfassen die Trennung durch Kristallisation mit chiralen Carbonsäuren,^[43,44] die asymmetrische Reduktion von C=N-Bindungen,^[45] die „Dutch-Resolution“,^[46] die Bucherer-Bergs-Varianten der Strecker-Synthese^[47] und die Übergangsmetall-katalysierte Amido-carbonylierung.^[48] Enzymatische Methoden zur Bereitstellung von enantiomerenreinen Aminen und Aminosäuren sind indes nicht nur beschränkt auf Lipase- oder Acylase-katalysierte kinetische Racematspaltungen.^[44,49] Eine Alternative zur Synthese von Aminen und nichtnatürlichen Aminosäuren bietet die enantioselektive Desymmetrisierung von 3,4-substituierten *meso*-Pyrrolidinen durch die Variante D5 der Monoaminoxidase MAO-N aus *Aspergillus niger*.^[50] Die Fähigkeit, stereospezifische Reaktionen zu katalysieren, hat auch das Forschungsinteresse an Aminosäuredehydrogenasen angeregt. Mitglieder der Aminosäuredehydrogenase-Superfamilie sind wegen ihrer katalytischen Eigenschaften und Stereospezifitäten interessante Enzyme. Sie katalysieren die reversible NAD(P)⁺-gekoppelte, oxidative Desaminierung von Aminosäuren.^[51] Durch Ändern der Spezifität einer Leucindehydrogenase mithilfe von Protein-Engineering konnte eine Aminodehydrogenase entwickelt werden, die

chirale Amine aus prochiralen Ketonen und Ammoniak herstellt.^[52] Darüber hinaus haben sich Strategien der Deracemisierung mit einer enantioselektiven Aminoxidase in Kombination mit einem chemischen Reduktionsmittel^[53] sowie die Umsetzung von Ketonen zu Aminen mit Transaminasen (Aminotransferasen) als erfolgreich erwiesen. Die Verwendung von Ammoniak-Lyasen und Aminomutnasen für die asymmetrische Synthese von Aminosäuren und chiralen Aminen ist eine weitere Option. In Abschnitt 3 werden Vorteile und Anwendungsbeispiele von Transaminasen, Ammoniak-Lyasen und Aminomutnasen sowie die Schwierigkeiten, die mit der Anwendung dieser Enzyme verbunden sind, genauer diskutiert. Für einen detaillierteren Überblick über Transaminasen^[54–56] sowie Ammoniak-Lyasen und Aminomutnasen^[57–59] in der Biokatalyse verweisen wir den Leser auf entsprechende Übersichtsartikel.

3.1. Transaminasen als Biokatalysatoren

In den letzten Jahren wurden viele Fortschritte bei der Entwicklung von Transaminasen hin zu effektiven Biokatalysatoren zur Bereitstellung von enantiomerenangereicherten und -reinen Aminen erzielt.^[55,60–62] Transaminasen (EC 2.6.1.x) sind Pyridoxol-5'-phosphat(PLP)-abhängige Enzyme, welche die direkte Aminierung von Ketonen zu Aminen in hohen Ausbeuten und Enantioselektivitäten katalysieren; dafür benötigen sie die NH₂-Gruppe eines Dornormoleküls (Abbildung 4).^[56,60]

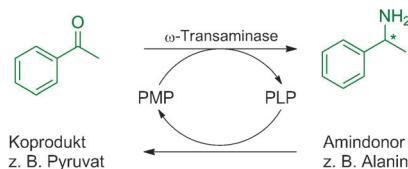


Abbildung 4. Synthese von Aminen mit ω -Transaminasen. PMP = Pyridoxamin-5'-phosphat.

Mehr als 20 ω -Transaminasen mit ähnlichen Substratspezifitäten, jedoch unterschiedlicher mikrobieller Herkunft wurden bis dato charakterisiert. Diese werden zur Produktion von chiralen Aminen und Aminosäuren wie folgt eingesetzt: die kinetische Racematspaltung racemischer Amine zu einem enantiomerenreinen Produkt und Keton mit einer theoretischen Ausbeute von $\leq 50\%$ (Abbildung 5a); die asymmetrische Synthese von enantiomerenreinen Aminen und Aminosäuren aus prochiralen Ketonvorstufen in einer Ausbeute von $\leq 100\%$ (Abbildung 5b); die Deracemisierung eines Racemats mit 100% theoretischer Ausbeute (Abbildung 5c).^[63]

Bei der Synthese enantiomerenreiner Amine und Aminosäuren wird der asymmetrische Syntheseansatz bevorzugt, da im Unterschied zur kinetischen Racematspaltung eine theoretische Ausbeute von 100% erzielt werden kann. Eine ebenso hohe Ausbeute kann durch eine Deracemisierung erreicht werden. Die Synthese von enantiomerenreinen

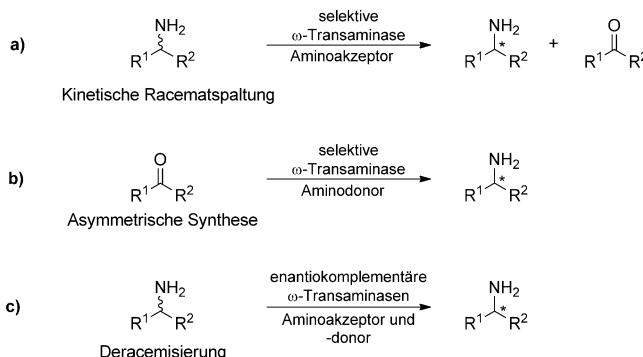


Abbildung 5. ω -Transaminase-katalysierte Reaktionen.

Aminen durch Deracemisierung wurde bisher über dynamisch-kinetische Racematspaltung (DKR) oder durch Einsatz zweier enantiokomplementärer ω -Transaminasen in einem zweistufigen Eintopfverfahren realisiert.^[64,65] Dem vorgeschlagenen Mechanismus zufolge bildet das Amindonorsubstrat eine Schiff-Base mit dem PLP-Kofaktor, gefolgt vom Auftreten eines Chinoidmoleküls infolge einer vorausgegangenen Deprotonierung. Eine darauffolgende Protonierung und Hydrolysereaktion führen zu Pyridoxamin-5'-phosphat (PMP) sowie zum entsprechenden Keton. Die Enantiospezifität resultiert vermutlich aus einer nicht bevorzugten Koordination eines der Enantiomere (Abbildung 6). Diese Enzyme zeigen hohe Selektivitäten, und durch ihre Anwendung in organischen Lösungsmitteln mit Isopropylamin als Amindonor lässt sich ihr Einsatzgebiet noch erweitern. Die höchste Aktivität (99% Umsatz) wurde bei der Synthese von enantiomerenreinen Aminen in *tert*-Butylmethylether als organischem Lösungsmittel beobachtet. Darüber hinaus führt die Verwendung von organischem Lösungsmittel zu einer besseren Zugänglichkeit von Isopropylamin, was bei der Bioaminierung für eine Reihe von Ketonen festgestellt wurde.^[66]

Eine große Hürde bei der asymmetrischen Synthese von chiralen Aminen aus achiralen Ketonen ist das ungünstige

Reaktionsgleichgewicht. Um die Reaktion in Richtung der Produkte zu verschieben, ist die Entfernung des Koprodukts, das bei der Desaminierung des Amindonors gebildet wird, entscheidend. Es gibt mehrere enzymatische Strategien für die Entfernung des Koprodukts Pyruvat (Alanin als Amindonor) und die Veränderung des thermodynamisch ungünstigen Gleichgewichtes.

Die Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetaldehyd und CO_2 mit der Pyruvatdecarboxylase (PDC) ist ein einfacher Prozess der Pyruvatentfernung. Darüber hinaus wird auch gerne die Acetolactatsynthase eingesetzt, um zwei Moleküle Pyruvat in Acetolactat umzuwandeln, das anschließend zu Acetoins und CO_2 zerfällt. Für diese beiden Methoden wird ein erheblicher Überschuss von Alanin als Amindonor benötigt, jedoch ist im Unterschied zu anderen Methoden kein weiteres Kofaktorregenerationssystem nötig. Ein weiterer Vorteil dieser Systeme ist die Bildung von CO_2 und die damit verbundene, irreversible Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zugunsten der Produkte.^[67] Die Reduktion von Pyruvat durch die Lactatdehydrogenase ist eine ebenfalls häufig angewendete Methode. Da die Lactatdehydrogenase den Kofaktor NADH benötigt, werden zur Regeneration entweder die Formiatdehydrogenase und Formiat oder die Glucosedehydrogenase und Glucose sowie ein Überschuss an Alanin eingesetzt.^[68] Außerdem ist es auch möglich, Alanin als Amindonor wiederzugewinnen, indem das gebildete Pyruvat regeneriert wird. Dafür werden Aminosäuredehydrogenasen (oftmals Alanindehydrogenase) verwendet, die das α -Ketosäurenebenprodukt reduktiv aminieren. Das dabei verbrauchte NAD(P)H wird durch Standardregenerationssysteme wie Formiat und Formiatdehydrogenase (FDH) oder Glucose und Glucosedehydrogenase (GDH) wiedergewonnen.^[68]

Bei der kinetischen Racematspaltung von racemischen Aminen wird Pyruvat als Aminakzeptor in stöchiometrischen Mengen benötigt. Hierbei erfordert der Prozess zur Pyruvatregenerierung den Einsatz einer Aminosäureoxidase, die die In-situ-Oxidation des Alaninamindonors in Gegenwart von molekularem Sauerstoff katalysiert. Darüber hinaus haben Wang et al. eine asymmetrische Synthese von Aminen ohne

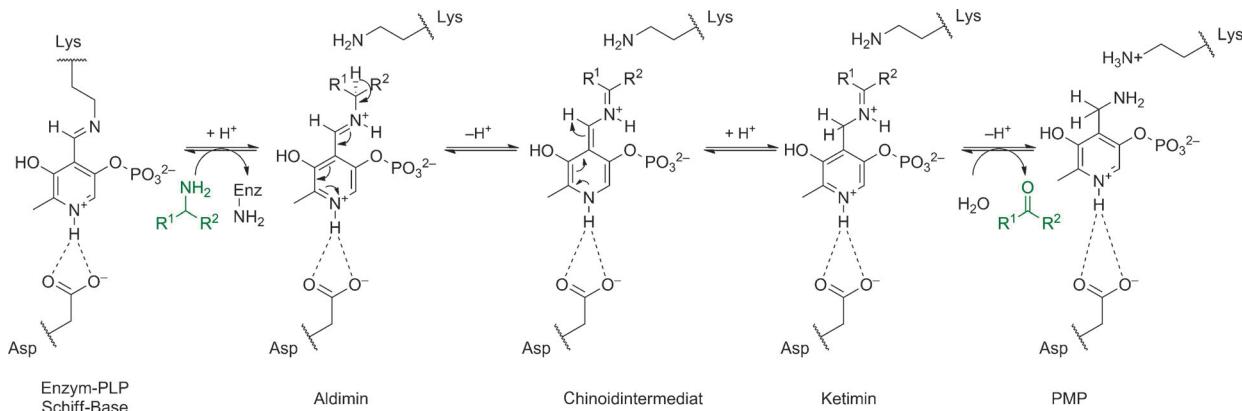
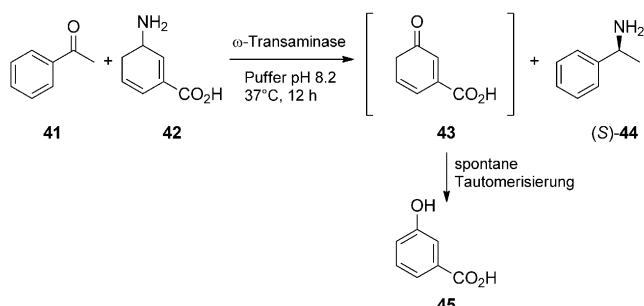


Abbildung 6. Die Transaminasereaktion ist in zwei Schritte unterteilt: 1) eine oxidative Desaminierung eines Amindonors und 2) eine reduktive Aminierung eines Aminakzeptors. Im ersten Schritt wird PLP als Trägermolekül verwendet, um die Aminogruppe und Elektronen für den zweiten Schritt zur Verfügung zu stellen. Eine Protonenumlagerung mit anschließender Hydrolyse wandelt PLP reversibel in PMP um. Die Aminogruppe wird nachfolgend auf den Aminakzeptor übertragen, wodurch das PLP regeneriert wird.

zusätzliche Regeneration des Amindonor für unterschiedliche ω -Transaminasen vorgestellt. Dabei wurde die kommerziell verfügbare 3-Aminocyclohexa-1,5-dienkarbonsäure (**42**) als Amindonor eingesetzt (Schema 11). Das erzeugte Keton **43** wird durch die nachfolgende Tautomerisierung zu 3-Hydroxybenzoësäure (**45**) aus der Reaktion entfernt. So konnte (*S*)-**44** selektiv hergestellt werden (99 % Umsatz, > 99 % ee).^[70]

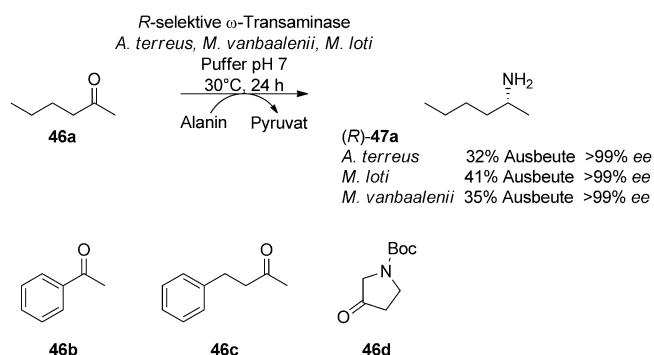


Schema 11. Asymmetrische Synthese chiraler Amine mit einem artifiziellen Amindonor.

3.2. Synthese chiraler Amine

Bislang wurden mehr als 20 *S*-selektive ω -Transaminasen beschrieben und charakterisiert.^[60] Wegen der Tatsache, dass bisher nur ein Transaminaseenzym mit *R*-Selektivität (aus *Arthrobacter* sp.)^[71] identifiziert und charakterisiert worden ist, haben Höhne et al. einen computergestützten Ansatz entwickelt, um *R*-selektive Transaminasen zu identifizieren. Dies ermöglicht es, arbeits- und screeningintensive, gerichtete Evolutionsmethoden zu umgehen (Schema 12).^[72] Diese Herangehensweise basiert auf der Identifizierung von Schlüsselkriterien des studierten Enzyms durch Strukturanalysen und anschließender Entwicklung und Anwendung eines sequenzbasierten Algorithmus. Auf diese Weise konnten 21 Gensequenzen für mutmaßlich *R*-selektive Transaminasen identifiziert werden, von denen 17 Enzyme tatsächlich die gewünschte *R*-Selektivität aufwiesen. Aus einer Plattform von vier Ketonen **46a–d** erwies sich 2-Hexanon (**46a**) mit drei neu identifizierten Transaminasen aus *Aspergillus terreus*, *Mycobacterium vanbaalenii* und *Mesorhizobium loti* als das beste Substrat. (*R*)-2-Aminohexan [(*R*)-**47a**] konnte in moderaten Ausbeuten (32–41 %) und mit sehr hohen Enantiomerenüberschüssen (> 99 %) synthetisiert werden.

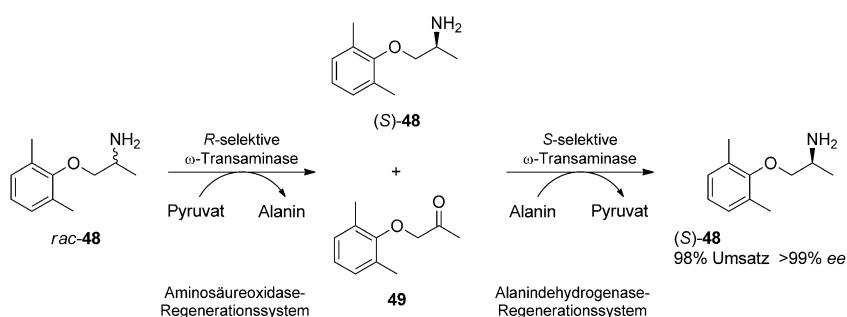
Erst kürzlich wurde die Deracemisierung von α -chiralen, primären Aminen mit ω -Transaminasen beschrieben.^[65,73] Abhängig von der Reihenfolge der eingesetzten enantiokomplementären Enzyme konnte ein Zugang sowohl zu den *S*- als auch zu den *R*-Produkten ermöglicht werden. Als Konsequenz daraus wurde die Deracemisierung von 1-(2,6-Dimethylphenoxy)-2-propanamin (Mexiletin, *rac*-**48**), einem oral einsetzbaren



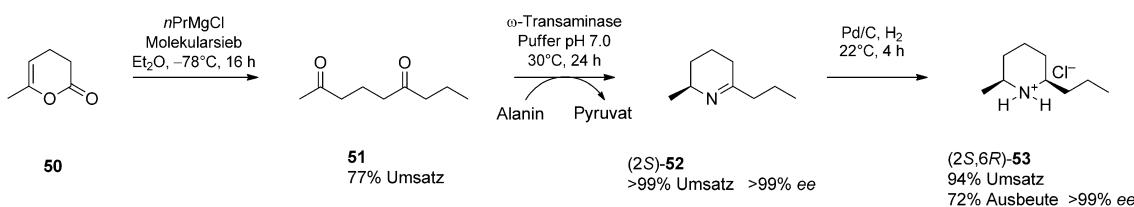
Schema 12. Asymmetrische Synthese von *R*-Aminen mithilfe neu identifizierter, *R*-selektiver Transaminasen. Boc = *tert*-Butyloxycarbonyl.

Antiarrhythmikum, genauer analysiert (Schema 13). Die Vorschrift für diese Deracemisierung basiert auf einem zweistufigen Eintopfprozess und umfasst eine kinetische Racematspaltung gepaart mit einem stereoselektiven Aminierungsschritt, die durch stereokomplementäre Transaminasen katalysiert wird. Die Synthese von enantiomerenreinem (*R*)-Mexiletin [(*R*)-**48**; > 99 % ee] über **49** wurde durch den Einsatz der Transaminasen aus *Chromobacterium violaceum* (CV- ω TA) wie auch ATA-117 mit hohen Umsätzen (> 99 %) ermöglicht. Parallel dazu konnte nach 24 h Reaktionszeit durch die Kombination der beiden kommerziellen Transaminasen ATA-117 und ATA-113 das *S*-Produkt (*S*)-**48** (> 99 % ee) mit einem ausgezeichneten Umsatz (98 %) erhalten werden.^[74]

Überdies ermöglichen ω -Transaminasen ohne die Verwendung von Schutzgruppen die regio- und stereoselektive asymmetrische Monoaminierung von aliphatischen 2,6-Diketonen (Schema 14). Simon et al. haben in diesem Zusammenhang die Synthese des natürlichen Alkaloids (+)-Dihydropinidin [(2*S*,6*R*)-**53**], eines potenziellen Fraßschutzmittels (Ernährungsblocker) gegen den Fichtenrüsselkäfer *Hylobius abietis*, beschrieben. Von Dihydropyran-2-on (**50**) ausgehend wurde in drei Stufen (2*S*,6*R*)-**53** in einer Ausbeute von 72 % und mit einem Enantiomerenüberschuss von > 99 % erhalten. Die Synthese des Dehydropiperidin-Zwischenprodukts **52** wurde über das entsprechende 2,6-Diketon **51** mithilfe der ω -Transaminase aus *Chromobacterium violaceum* mit einem sehr hohen Umsatz (> 99 %) und einer ausgezeichneten Selektivität (> 99 % ee) ermöglicht.^[75]



Schema 13. ω -Transaminasen-katalysierter Deracemisierungsprozess von Mexiletin zur Herstellung des *S*-Isomers.

**Schema 14.** Synthese von (2S,6R)-53 durch Einsatz einer ω -Transaminase.

Amine sind eine vielseitige Gruppe von Verbindungen, die in der organischen Synthese häufig eingesetzt werden. Aus diesem Grund ist die Transformation von einfach zugänglichen Alkoholen zu Aminen eine wichtige Reaktion für die Synthese einer Vielzahl organischer Stoffe. Die gängigsten Methoden zur Synthese von Aminen aus Alkoholen sind reduktive Aminierungen sowie die Umwandlung von Alkoholen in die entsprechenden Azide und deren anschließenden Reduktion. Alternativ dazu können Amine auch über eine artifizielle zweistufige Multienzymkaskade erhalten werden.

Für die asymmetrische Aminierung von sekundären Alkoholen zu den entsprechenden α -chiralen primären Aminen wurde ein artifizielles Multienzymnetzwerk entwickelt und optimiert. Die Kombination einer Alkoholdehydrogenase mit einer Transaminase führte unter optimierten Reaktionsbedingungen zu hoher Umsetzung (bis zu 91 %) des Alkohols.^[76] Ein ähnliches System wurde für die Herstellung von Diaminen vorgestellt (Schema 15).^[77] Dabei wurde die thermostabile Alkoholdehydrogenase aus *Bacillus stearothermophilus* (ADH-hT) mit der ω -Transaminase aus *Chromobacterium violaceum* kombiniert, und Diamine wurden mit exzellenten Umsätzen erhalten. Hierfür wurden die Diole 54a,b zu den entsprechenden Aldehyd-funktionalisierten Zwischenprodukten 55a,b oxidiert, die wiederum mithilfe von Transaminasen zu den Aminen 56a,b umgesetzt wurden, aus denen über die Intermediate 57a,b die Diamine 58a,b erhalten wurden. Eine Alanin-dehydrogenase wurde zur Kofaktorregenerierung eingesetzt. Im Falle von 1,8-Octandiol (54a) wurden 98 % des Ausgangsmaterials umgewandelt (46 % Diamin 58a und 52 % Aminoalkohol 56a). Im Unterschied dazu resultierte die Transformation von 1,10-Decandiol (54b) in der vollständigen Bildung des Diaminprodukts (99 % Diamin 58b, < 1 % 56b). Um die Löslichkeit der Diole 54a,b

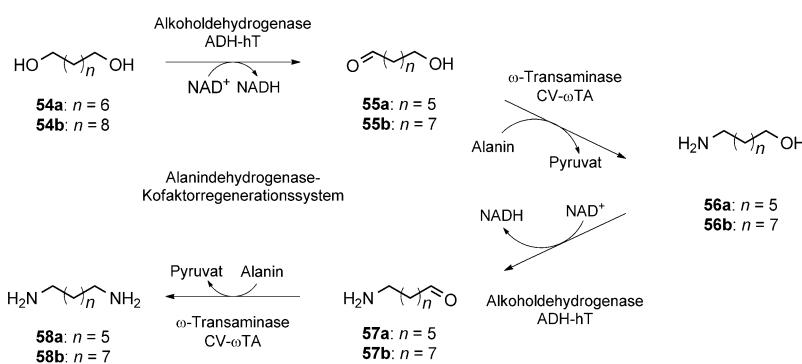
zu steigern, wurde das wassermischbare Lösungsmittel 1,2-Dimethoxyethan [10 % (v/v)] eingesetzt. Die Diaminierung von 54b wurde zusätzlich dazu im präparativen Maßstab (174 mg Substrat) durchgeführt. Nach 20 h Reaktionszeit konnte ein Umsatz von 94 % bei einer Ausbeute an isoliertem Diaminprodukt 58b von 74 % erreicht werden.

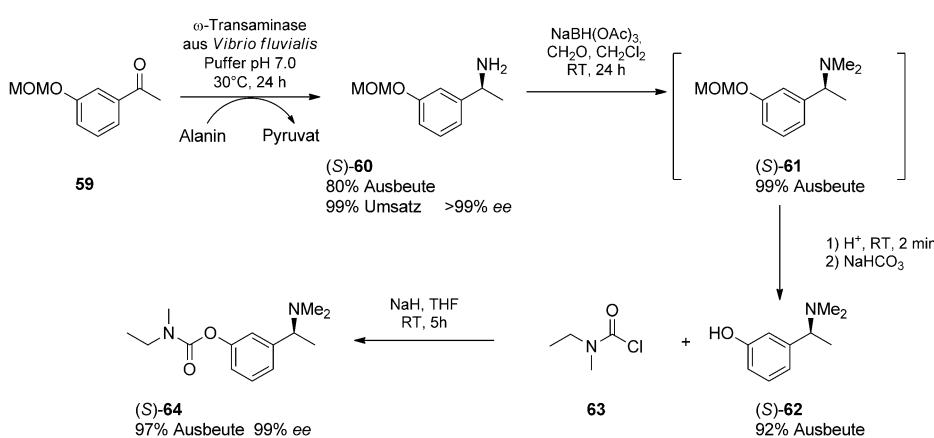
Ein biokatalytischer Prozess in Gegenwart von ω -Transaminasen wurde zur Herstellung von (S)-Rivastigmin, einem Alzheimermedikament, entwickelt (Schema 16). Der Schlüsselbaustein für die Rivastigminsynthese, das Methoxymethylether-geschützte α -Methylbenzylamin 60, wurde aus dem entsprechenden Acetophenonsubstrat 59 durch eine enzymkatalysierte, asymmetrische Transaminierung mit stereokomplementären ω -Transaminasen erhalten. Um die Löslichkeit des Substrats und somit die Reaktionsgeschwindigkeit zu steigern, wurden DMSO oder CH₂Cl₂ als Kosolventien [10 % (v/v)] verwendet. Mit der ω -Transaminase aus *Vibrio fluvialis* konnte (S)-60 in 80 % Ausbeute (99 % Umsatz) und mit ausgezeichneter Enantiomerenreinheit (>99 % ee) hergestellt werden. Das entsprechende *R*-Enantiomer (*R*)-60 wurde mithilfe des stereokomplementären Enzyms ATA-117 in einer moderaten Ausbeute von 56 % (76 % Umsatz), jedoch mit hohem Enantiomerenüberschuss von 98 % hergestellt. Zudem wurde die MOM-geschützte Aminvorstufe 59 in einem chemoenzymatischen, vierstufigen Syntheseverfahren eingesetzt. (S)-Rivastigmin [(S)-64] konnte in diesem Prozess in einer Gesamtausbeute von 71 % und mit einem Enantiomerenüberschuss von 99 % erhalten werden.^[78]

In einer Kooperation ist es Merck und Codexis vor kurzem gelungen, molekulare Modellierung mit gerichteter Evolution zu kombinieren, um die Spezifität und Stabilität einer Transaminase deutlich zu verbessern. So konnte ein etablierter, Rhodium-basierter, chiraler Katalysator in einem industriellen Prozess durch eine Transaminase ersetzt werden.

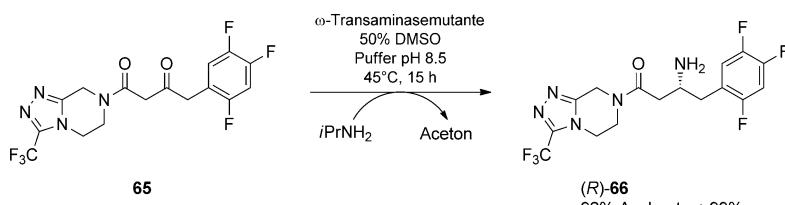
Das Maßschneidern der *R*-selektiven, kommerziell verfügbaren Transaminase ATA-117 durch Protein-Engineeringing lieferte ein Enzym mit gesteigerter Aktivität für die Synthese von Sitagliptin [(*R*)-66], einem Diabeteswirkstoff (Schema 17). Docking-Studien mit dem Prositagliptinketon-Substrat 65 legten nahe, dass das Enzym nicht in der Lage sein würde, das sterisch anspruchsvolle Keton im aktiven Zentrum zu binden.

Nach elf Runden der Evolution wurde ein finales Enzym mit insgesamt 27 Mutati-

**Schema 15.** Aminierung von Diolen mithilfe einer artifiziellen Multienzymkaskade.



Schema 16. Chemoenzymatische asymmetrische Synthese von (S)-Rivastigmin. MOM = Methoxymethyl-Schutzgruppe.



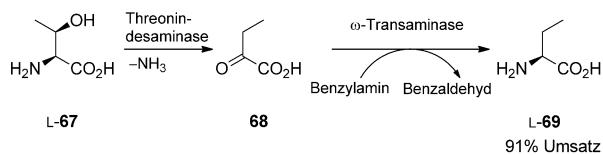
Schema 17. Evolviertes Transaminasekatalysator zur Synthese von Sitagliptin.

tionen erhalten, das eine um vier Größenordnungen höhere Aktivität als das Wildtypenzym zeigte. Gleichzeitig wurde eine chemische Prozessentwicklung hinsichtlich der Stabilität des Enzyms gegenüber hohen Konzentrationen an Substrat, DMSO (Kosolvens) und dem Amindonor Isopropylamin sowie erhöhter Prozesstemperatur durchgeführt. Im optimierten finalen Prozess waren 6 g L⁻¹ der entwickelten Transaminasevariante ausreichend, um innerhalb von 15 h Reaktionszeit (45°C, 50 % DMSO) 200 g L⁻¹ Prositagliptinketon (**65**) in das enantiomerenreine Sitagliptinprodukt [(*R*)-**66**; Ausbeute 92 %, > 99 % ee] umzusetzen.^[79]

Unter all den Biokatalysatoren zur Synthese von nicht-natürlichen α - und β -Aminosäuren sind ω -Transaminasen die bedeutendsten. Enantiomerenreine nichtnatürliche Aminosäuren sind sehr wertvolle Wirkstoffe für die pharmazeutische und kosmetische sowie Lebensmittel-, Chemie- und Agrarindustrie.^[62,80] Zur Herstellung verschiedener Aminosäuren wurden Transaminasen für den Transfer von Aminogruppen

mit anderen Reaktionen gekoppelt. Park et al. kombinierten in einem Eintopfverfahren die Threonindesaminase (TD) und ω -Transaminase (ω -TA) miteinander (Schema 18). In dieser Enzymkaskade wurde aus L-Threonin (**L-67**) über das 2-Oxobutyratintermediat **68** ein Zugang zu L-Homoalanin (**L-69**) generiert. Bei der Umwandlung von **L-67** zu **68** wurde eine *S*-spezifische Threonindesaminase aus *E. coli* (ilvA) verwendet. Daraufhin wurde eine neuartige ω -Transaminase aus *Paracoccus denitrificans* (PD1222) für die asymmetrische Synthese von **68** mithilfe von Benzylamin als Amindonor eingesetzt. Durch diese gekoppelte Enzymreaktion konnte nach 5 h Reaktionszeit **L-69** mit 91 % Umsatz und > 99 % ee erhalten werden.^[81]

Ein ähnliches System wurde zur simultanen Herstellung von L-Aminosäuren und R-Aminen aus den entsprechenden α -Ketosäuren und racemischen Aminen durch die Verwendung einer Tyrosin-Aminotransferase und einer ω -Transaminase beschrieben.^[82] Wegen der breiten Substratspezifitäten von Transaminasen können diese in der Synthese von anderen industriellen Synthesebausteinen, wie Aminoalkoholen, eingesetzt werden. Der stereospezifische Transfer der Aminogruppe mithilfe von Transaminasen kann auch an andere enzymkatalysierte C-C-Bindungsbildungen gekoppelt werden. In diesem Zusammenhang wurde eine zweistufige Synthese von chiralen Aminoalkoholen aus achiralen Ausgangsverbindungen durch Kombination einer Transketolase und einer Transaminase entwickelt. Mit dieser Eintopfsynthese wurden der Zugang zu 2-Amino-1,3,4-butaniatriol und 2-Aminopen-tan-1,3-diol über eine biokatalytische asymmetrische C-C-Bindungsknüpfung sowie der stereospezifische Transfer einer Aminogruppe auf ein L-Erythrulose- oder ein (3*S*)-Dihydroxy-pentanon-Zwischenprodukt untersucht.^[83] Aminoalkohole sind eine wichtige Stoffklasse und werden als chirale Auxiliare und Liganden in der organischen und medizinischen Chemie verwendet. Zusätzlich dazu haben fluorierte α -Aminosäuren aufgrund ihrer pharmakologischen Wirkung großes Interesse geweckt. In diesem Sinne haben Bea et al. die asymmetrische Synthese von (*R*)-Fluoralanin aus 3-Fluorpyruvat und (*S*)- α -Methylbenzylamin als Amindonor mit der rekombinanten ω -Transaminase aus *Vibrio fluvialis* JS17 untersucht. Um einer etwaigen Produktinhibierung entgegenzuwirken, wurde bei diesem Ansatz ein extraktives, zweiphasiges Reaktionssystem zur Synthese von (*R*)-Fluoralanin verwendet. (*R*)-Fluoralanin wurde mit 70 % Umsatz und einem Enantiomerenüberschuss von > 99 % gewonnen.^[84]

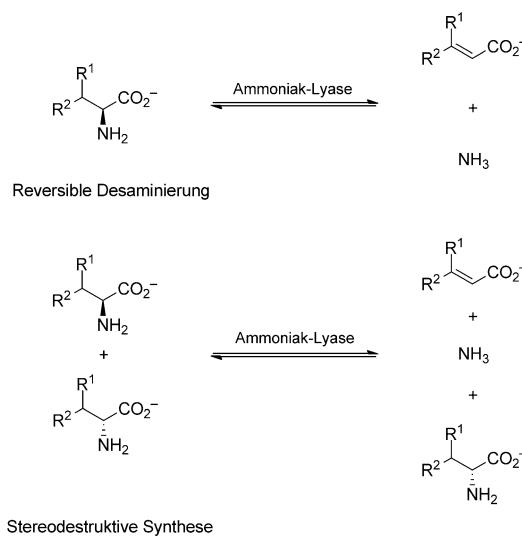


Schema 18. Eintopfverfahren für die Umwandlung von L-Threonin zu L-Homoalanin. Reaktionsbedingungen: 10 mM Substrat, 20 mM Benzylamin, 1 μ M PLP, Puffer pH 7.0, 37°C, 300 min.

3.3. Aminosäure-Ammoniak-Lyasen

Anders als Transaminasen bewirken Aminosäure-Ammoniak-Lyasen eine elektrophile Katalyse ohne Einsatz eines Metalls oder sonstigen Kofaktors. Ammoniak-Lyasen sind in der Lage, Kohlenstoff-Stickstoff-Bindungen ohne Hydrolyse- oder Oxidationsmechanismen zu spalten. Es gibt eine Reihe von Ammoniak-Lyasen, welche die reversible Bildung von α,β -ungesättigten Bindungen durch Eliminierung von Ammoniak aus ihren Aminosäuresubstraten katalysieren. Aromatische-Aminosäure-Ammoniak-Lyasen katalysieren die reversible Desaminierung aromatischer Aminosäuren, wie Phenylalanin, Tyrosin und Histidin, zu ihren achiralen, α,β -ungesättigten Carbonsäuren.^[57,59,85] Außerdem konnten zwei weitere Familienmitglieder, und zwar Aspartat-Ammoniak-Lyase und 3-Methylaspartat-Ammoniak-Lyase, identifiziert und charakterisiert werden.^[86] Ammoniak-Lyase-katalysierte Reaktionen können für die Synthese von natürlichen und nichtnatürlichen Aminosäuren verwendet werden. Dies gelingt entweder durch die Aminierung von α,β -ungesättigten Carbonsäuren oder durch die kinetische Racematspaltung von Aminosäureracematen (Abbildung 7).

Aromatische-Aminosäure-Ammoniak-Lyasen enthalten eine elektrophile 4-Methylenimidazol-5-on(MIO)-Gruppe zur Substrataktivierung.^[87,88] MIO wird durch einen spontanen Ringschluss innerhalb einer konservierten Alanin-Serin-Glycin-Sequenz unter Wasserabspaltung gebildet.^[87,89] Der genaue Mechanismus der Ammoniakeliminierung ist seit fast 50 Jahren umstritten. Zuerst wurde ein E₁cb-Mechanismus



Reversible Desaminierung

Ammoniak-Lyase

Stereodestruktive Synthese

Abbildung 7. Ammoniak-Lyase-katalysierte stereoselektive Synthese von Aminosäuren durch zwei unterschiedliche Strategien.

postuliert, der Jahre später von der Annahme eines Friedel-Crafts-Mechanismus abgelöst wurde. Hierbei wurde ein Friedel-Crafts-Angriff der MIO-Gruppe auf die Phenylgruppe der aromatischen Aminosäure L-Phenylalanin postuliert (Abbildung 8).^[90]

Eine aktuelle Arbeit von Bartsch und Bornscheuer über die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase aus *Petroselinum crispum* liefert auf der Grundlage von Docking-Studien und Mole-

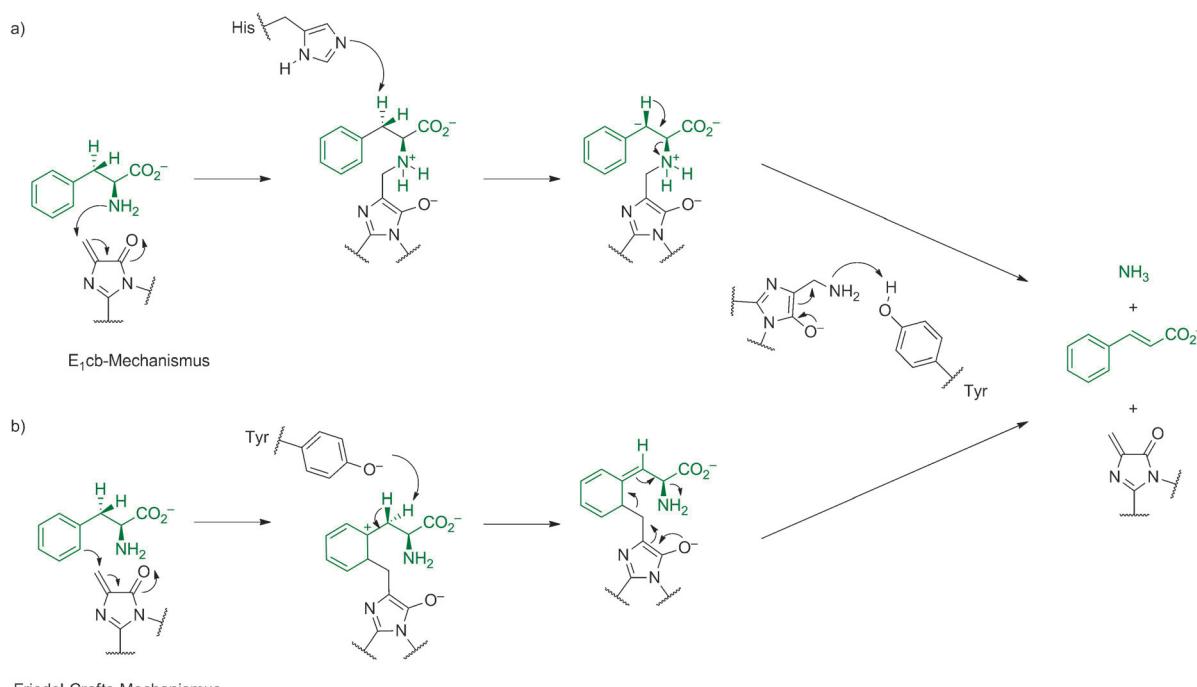
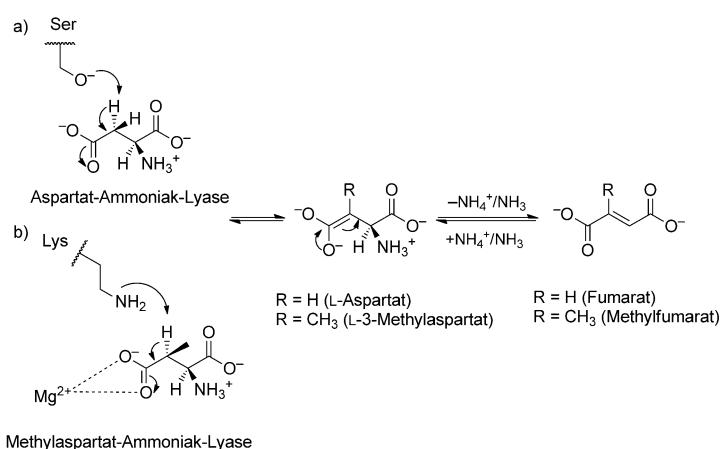


Abbildung 8. Die beiden postulierten Mechanismen für MIO-abhängige Ammoniak-Lyasen: a) E₁cb-Mechanismus, mit einem elektrophilen Angriff der MIO-Gruppe auf die Aminogruppe des Substrats; b) Friedel-Crafts-Mechanismus, eingeleitet durch einen elektrophilen Angriff von MIO auf den aromatischen Ring. Insgesamt führen beide Mechanismen zur Aktivierung und einer darauffolgenden Abstraktion des β -Protons, gefolgt von einer Ammoniakeliminierung und der Regeneration der MIO-Gruppe. Histidin (E₁cb-Mechanismus) oder Tyrosin (Friedel-Crafts-Mechanismus) fungieren als katalytische Basen, um das Proton von C3 zu abstrahieren.

kuldynamiksimulationen neue Erkenntnisse zum Mechanismus dieses Enzyms: Anscheinend können beide Mechanismen – der Friedel-Crafts- ebenso wie der E_{1cb}-Mechanismus – bei der Desaminierung aromatischer Aminosäuren auftreten.^[91]

Die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL, EC 4.3.1.5) ist ein wichtiges Pflanzenenzym, das die Umwandlung von L-Phenylalanin in *trans*-Zimtsäure katalysiert. *trans*-Zimtsäure ist eine Vorstufe für verschiedene Phenylpropanoide wie Lignine, Flavonoide und Cumarine. Zahlreiche PALs wurden aus Mikroorganismen isoliert, besonders aus Hefen, mit vielen Beispielen aus den rot pigmentierten Hefen der *Rhodotorula*-Spezies.^[92] PAL ist für L-Phenylalanin spezifisch, jedoch wird auch L-Tyrosin in geringerem Maße als Substrat akzeptiert.^[59] PAL-Enzyme wurden genutzt, um unterschiedliche Phenylring-substituierte, polycyclisch-aromatische sowie heterocyclische L-Arylalanine sowie den L-Phenylalaninmethylester durch Addition von Ammoniak an die entsprechende Doppelbindung umzusetzen.^[93]

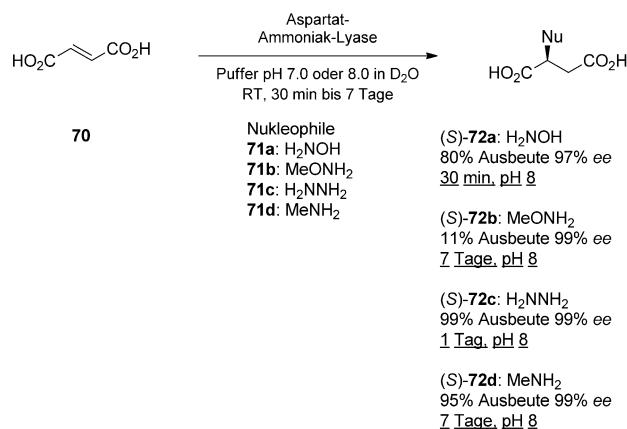
Ein weiteres Mitglied der Ammoniak-Lyasefamilie, die Aspartat-Ammoniak-Lyase (EC 4.3.1.1), auch als Aspartase bezeichnet, spielt eine wichtige Rolle beim bakteriellen Stickstoffmetabolismus. Dieses Enzym katalysiert unter Freisetzung von Ammoniak die reversible Umwandlung von L-Aspartat zu Fumarat. Die Aspartat-Ammoniak-Lyase ist eines der spezifischsten Enzyme, die bis dato beschrieben worden sind. Dies wird daran deutlich, dass bei der Desaminierungsreaktion L-Aspartat durch kein anderes Substrat ersetzt werden kann. Die hohe Selektivität der Aspartat-Ammoniak-Lyase gegenüber dem natürlichen Substrat limitiert die praktischen Anwendungsmöglichkeiten dieses Enzyms. Trotzdem wird die Aspartase-katalysierte Umkehrreaktion – die Aminierung von Fumarat – kommerziell bei der industriellen Produktion des künstlichen Süßstoffes Aspartam (*N*-L- α -Aspartyl-L-phenylalanin-1-methylester) eingesetzt.^[94] Ein Überschuss an Ammoniak ist nötig, um das Gleichgewicht von Fumarat zu L-Aspartat zu verschieben. Darüber hinaus ist die 3-Methylaspartat-Ammoniak-Lyase (MAL, EC 4.3.1.2) zu erwähnen, da sie eine breitere Substratspezifität als Aspartase aufweist. MALs wurden in mehreren anaeroben Enterobakterien identifiziert. Die natürliche Funktion der MAL ist die reversible Ammoniakeliminierung von L-*threo*-3-Methylaspartat und L-*erythro*-3-Methylaspartat zu *trans*-Methylfumarat. Für die Umkehrreaktion wurde eine Vielzahl an substituierten Aminen und Fumaraten eingesetzt, wobei substituierte Methylasparte erhalten wurden.^[58] Für beide Ammoniak-Lyasen wurde ein allgemeiner Säure-Base-Reaktionsmechanismus mit einem Enolatintermediat vorgeschlagen (Abbildung 9). Im Fall der Aspartase sind die Carboxylat-Sauerstoffatome an Wasserstoffbrücken-Netzwerken mit Serin- und Threonin- (C1-Carboxylatgruppe) oder Threonin-, Lysin- und Asparagin-Aminosäureresten (C4-Carboxylatgruppe) beteiligt. Bei der MAL unterstützen Glutamin und Histidin ein Mg²⁺-Ion bei der Koordination durch die C1-Carboxylatgruppe, während ein Threonin, das Cystein und Glutamin an die C4-Carboxylatgruppe koordinieren.^[86]



Methylaspartat-Ammoniak-Lyase

Abbildung 9. Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der a) Aspartat- und b) Methylaspartat-Ammoniak-Lyasen. Eine Base (Serin oder Lysin) im aktiven Zentrum deprotoniert das Substrat an der C3-Position. Es bildet sich ein Enolatintermediat, das durch Aminosäurereste oder im Fall von MAL durch ein Mg²⁺-Ion stabilisiert wird. Im nächsten Schritt führt die Abspaltung von Ammoniak zu Bildung des (Methyl-)Fumaratintermediats.

Ammoniak-Lyasen werden als Biokatalysatoren zur Herstellung von enantiomerenreinen Aminosäuren eingesetzt. Obwohl die Aspartat-Ammoniak-Lyase eine sehr hohe Spezifität gegenüber Aspartat als Substrat zeigt, konnten Weiner et al. zeigen, dass Ammoniak als Nukleophil durch verschiedene Amine **71a-d** substituiert werden kann (Schema 19). Hierbei wurden die stereoselektiven Aminie-

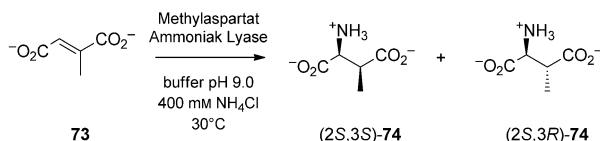


Schema 19. Biokatalytische Synthese von N-substituierten Aspartaten mit Aspartat-Ammoniak-Lyase.

rungen von Fumarat mit kleinen Aminnukleophilen wie Hydroxylamin (**71a**), Hydrazin (**71c**), Methoxylamin (**71b**) und Methylamin (**71d**) per ¹H-NMR-Spektroskopie in Phosphatpuffer/D₂O nachgewiesen. Somit konnte gezeigt werden, dass die thermostabile Ammoniak-Lyase aus *Bacillus* sp. YM55-1 in der Lage ist, die Nukleophile **71a** wie auch **71c** zu akzeptieren. Fumarat (200 mM) wurde in Puffer innerhalb von 30 min bzw. 24 h Inkubationszeit vollständig umgesetzt. Im Unterschied dazu wurden **71b** und **71d** nach sieben Tagen Inkubationszeit in Ausbeuten von 11 bzw. 95 % zu den entsprechenden N-substituierten Aspartaten umgesetzt.^[95]

Methylaspartat-Ammoniak-Lyase (MAL) aus *Clostridium tetanomorphum* ist in der Lage, die stereo- und regioselektive Addition von Ammoniak an Derivate von 2-Methylfumarat zu katalysieren, was zur Bildung von verschiedenen 3-Alkyl- und 3-Halogen-substituierten Aspartaten führt.^[96] Darüber hinaus konnten auch geringe Aktivitäten mit kleinen, substituierten Aminen und Fumaratsubstraten beobachtet werden.^[97] Unlängst wurde ein strukturbasiertes Engineering dieser Lyase beschrieben. Somit konnten unterschiedliche Aspartatderivate aus substituierten Amin- und Fumaratsubstraten synthetisiert werden.^[98]

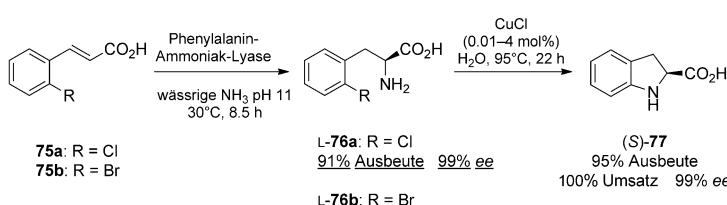
Strukturelle Determinanten in Bezug auf Aktivität und Stereospezifität der MAL aus *Clostridium tetanomorphum* wurden durch ortsgerichtete Mutagenese studiert. Hierfür wurde die Struktur der verwandten MAL aus *Clostridium amalonaticus* dazu herangezogen, drei Aminosäuren der aktiven Tasche aus diesem Enzym für diesen Mutageneseansatz zu identifizieren. Diese drei Aminosäuren sind wichtig für die Aktivität und Stereospezifität von MAL-katalysierten Reaktionen. Dies hat Raj et al. dazu angeregt, durch strukturbasierte Mutagenese die Diastereoselektivität der 3-Methylaspartat-Ammoniak-Lyase zu modifizieren (Schema 20).



Schema 20. Von Methylaspartat-Ammoniak-Lyase katalysierte Aminierung von Methylfumarat.

MAL katalysiert reversibel die schnelle *anti*- und die viel langsamere *syn*-Addition von Ammoniak an 2-Methylfumarat (**73**) zu den Produkten (2*S*,3*S*)-3-Methylaspartat [(2*S*,3*S*)-**74**] und (2*S*,3*R*)-3-Methylaspartat [(2*S*,3*R*)-**74**]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die generierten Mutanten bei der Aminierung von Methylfumarat alleinig (2*S*,3*S*)-**74** produzieren. Das andere Diastereomer konnte nicht detektiert werden.^[99]

Kürzlich haben Lange et al. einen Syntheseweg beschrieben, der Biokatalyse mit Ammoniak-Lyasen und homogene Katalyse zur Bildung der enantiomerenreinen (S)-2-Indolincarbonsäure [(S)-**77**], eines Schlüsselintermediats für ACE-Inhibitoren, vereinigt (Schema 21; ACE = Angiotensin-konvertierendes Enzym). Herkömmlicherweise erfolgt die Herstellung dieser Verbindung durch Synthese der racemischen Vorstufe über Fischer-Indolsynthese, gefolgt von einer klassischen oder enzymatischen Racematspaltung. In diesem



Schema 21. Chemoenzymatische asymmetrische Synthese von (S)-2-Indolincarbonsäure.

neuen Syntheseweg wurde eine enantioselektive, PAL-katalysierte (DSMPAL01, *Rhodotorula glutinis*) Addition von Ammoniak an die *o*-substituierten Zimtsäurederivate **75a,b** mit einer Kupfer-katalysierten Ringschlussreaktion der L-*o*-Halogenphenylalanine L-**76a,b** gekoppelt. Ammoniak wurde als wässrige Lösung [13 % (v/v)] im Überschuss eingesetzt. In den Cyclisierungsreaktionen konnte das Produkt (S)-**77** in exzellenter Ausbeute (95 %) und Enantioselektivität (99 % ee) hergestellt werden. Optimierte Bedingungen zum Ringschluss beider halogenierter Phenylalanine L-**76a,b**, inklusive eines weiteren Kristallisationsschrittes, ermöglichten es letztlich, (S)-2-Indolincarbonsäure [(S)-**77**] nach einem zusätzlich Kristallisationsschritt in einer Gesamtausbeute von 60 % und mit einem Enantiomerenüberschuss von 99 % ee herzustellen.^[100]

3.4. Aminomutasen

Aminomutasen sind eine Unterfamilie der MIO-enthaltenden Enzyme, deren katalytische Eigenschaften in den letzten Jahren großes Interesse geweckt haben. Sie sind Bestandteil der Biosynthese von β -Aminosäuren in strukturell unterschiedlichsten Naturstoffen und darüber hinaus wichtige Bausteine in der pharmazeutischen Industrie.^[101] Die Phenylalanin-Aminomutase ist in der Lage, aromatische β -Aminosäuren durch eine stereospezifische Isomerisierung von α -Aminosäuren oder α -Phenylalanine herzustellen.

Die große Sequenzhomologie zwischen Aminomutasen und Ammoniak-Lyasen lässt darauf schließen, dass sich beide Enzyme mechanistisch ähneln und dass sich erstgenannte eventuell aus den letzgenannten entwickelt haben.^[102] Diese Annahme wird von der Tatsache gestützt, dass Aminomutassen die 1,4-konjugierte Readdition des Amins an das Zimtsäureintermediat katalysieren können. Diese Reaktion ist reversibel.^[103]

Kürzlich wurde ein Mechanismus für Aminomutasen vorgeschlagen. Die schrittweise Isomerisierung des Substrats erfolgt im ersten Schritt durch eine heterolytische Abspaltung des migrierenden Protons und der Aminogruppe (Abbildung 10). Durch die Rotation des Zimtsäureintermediats im aktiven Zentrum wird die Anlagerung der Aminogruppe auf der gegenüberliegenden Seite ermöglicht. Die Carboxylat-Sauerstoffatome bilden im aktiven Zentrum der Phenylalanin-Aminomutase zahlreiche Wasserstoffbrücken mit Aminosäuren.^[104]

Enantiomerenreine β -Aminosäuren, die im Unterschied zu α -Aminosäuren nicht sehr häufig in der Natur zu finden sind, stellen wertvolle Bausteine für die Synthese von Peptidmimetika und bioaktiven Molekülen dar. In diesem Zusammenhang haben Wu et al. die enantiomerenreine Synthese von nichtnatürlichen α - und β -Aminosäuren mithilfe der Phenylalanin-Aminomutase (PAM) erforscht. PAM hat ein breites Substratspektrum und katalysiert die Umwandlung von α -Phenylalanin in β -Phenylalanin mit exzellenten Enantiomerenüberschüssen (> 99 %). Die Addition von Ammoniak an das Zimtsäureintermediat resultiert normalerweise in einem 1:1-Ver-

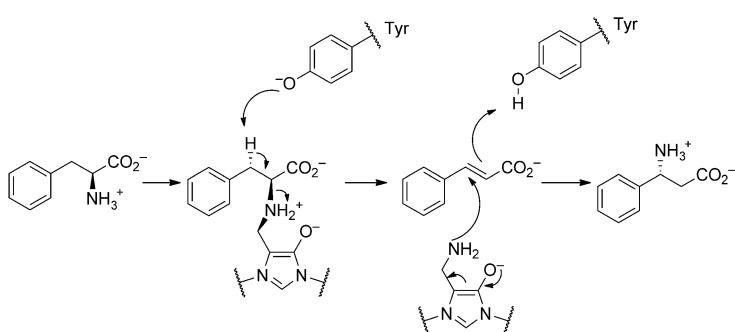


Abbildung 10. Reaktionsmechanismus der Aminomutase. Das Substrat bindet passend für die Abspaltung des Protons und des Amins in das aktive Zentrum. Nach der Deprotonierung des Substrats durch eine Tyrosinbase sowie dem nucleophilen Angriff des Amins auf die MIO-Gruppe erfolgen die Abspaltung von MIO-NH₂ und die Bildung der Zimtsäure. Nach Rotation des Zimtsäureintermediates wird die Aminogruppe in β-Position angelagert und das Substrat in α-Position protoniert, wodurch durch die β-Aminosäure in R-Konfiguration gebildet wird.

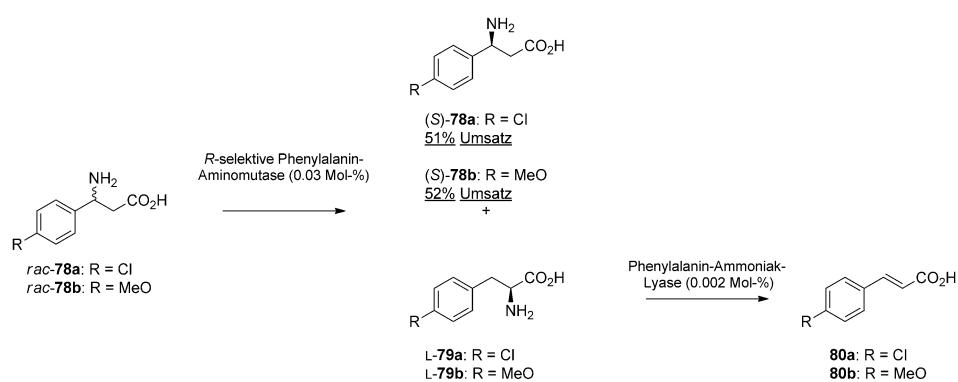
hältnis von α- zu β-Phenylalanin mit ausgezeichneter Enantioselektivität für beide Isomere (> 99 % ee). Die besten Ergebnisse für die Synthese von β-Aminosäuren wurden erzielt, wenn Zimtsäuredervate mit einem Methyl- oder Methoxy-substituenten an der p-Position verwendet wurden (nur 4–14 % des α-Produkts konnten beobachtet werden). Dagegen führten Zimtsäuresubstrate mit einer Nitrosubstitution am aromatischen Ring zur Addition der Aminogruppe an der α-Position (98-proz. Bildung des α-Produkts). Die Absolutkonfiguration des Produkts konnte mit L für α-Phenylalanin und R für β-Phenylalanin bestimmt werden.^[101]

Wie erwähnt, ist die Bildung eines Produktgemisches aus α- und β-Aminosäuren bei der asymmetrischen Addition von Ammoniak ein großer Nachteil beim Einsatz von Aminomutasen. Für die Trennung von Gemischen aus α- und β-Phenylalaninen wurde eine Isomeren-selektive Flüssig-flüssig-Extraktion (ILLE) mit [PdCl₂(PPh₃)₂] beschrieben. Dieser Flüssigextraktionsschritt ist eine Verfeinerung der Enantiomeren-selektiven Flüssig-flüssig-Extraktion (ELLE). Bei dieser Extraktion wird der enantiomerenreine Wirt (host) als Extraktionsmittel genutzt, sodass eine enantiospezifische und reversible Reaktion mit dem racemischen Substrat ermöglicht wird.^[105] Durch den Einsatz dieser Methoden konnte ein optimiertes Extraktionssystem für die Aufreinigung von β-Phenylalanin aus einem Reaktionsgemisch der PAM-katalysierten, enantioselektiven Addition von Ammoniak an trans-Zimtsäure erhalten werden.^[106] Des Weiteren haben Wu et al. die Phenylalanin-Aminomutase aus *Taxus chinensis* durch Struktur- und Mechanismusbasiertes Protein-Engineering in eine selektive β-Lyase umgewandelt. Damit wurde die

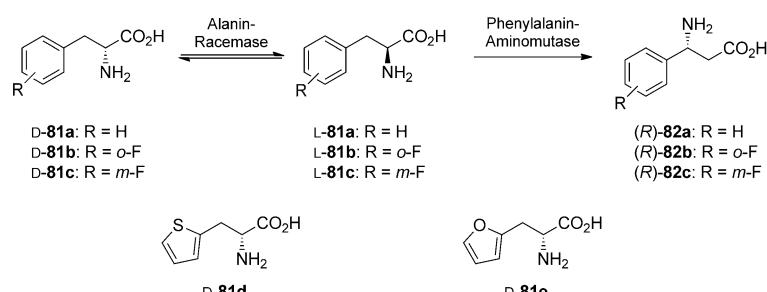
Synthese von beinahe reinem (R)-β-Phenylalanin und seinen Derivaten durch die asymmetrische Aminierung von Zimtsäure erreicht.^[107]

Zur Herstellung von S-β-Phenylalaninen wurde kürzlich eine PAM-PAL-basierte Kaskade ausgehend von aromatischen β-Aminosäureracematen beschrieben. Wu et al. haben einen solchen biokatalytischen Prozess entwickelt, um enantiomerenreines (S)-β-Phenylalanin herzustellen (Schema 22). Hierbei katalysierte im ersten Schritt PAM aus *Taxus chinensis* die stereoselektive Isomerisierung von (R)-β-Phenylalaninen (R)-78a,b zu den jeweiligen L-Phenylalaninprodukten L-79a,b. Die Isomerisierung wurde mit der Abspaltung der Aminogruppe von den α-Aminosäuren verknüpft. Diese von PAL (*Rhodosporidium toruloides*) katalysierte Umsetzung führte zur Bildung der Zimtsäuren 80a,b. Unter Anwendung dieser biokatalytischen Tandemreaktion konnten nach einer Reaktionszeit von 48 h die (S)-β-Phenylalanine (S)-78a,b mit exzellenten Enantiomerenüberschüssen (> 99 % ee) in quantitativen Ausbeuten produziert werden.^[108]

Darüber hinaus konnte PAM in dynamisch-kinetischen Racematspaltungen mit einer Vielfalt von substituierten α-Arylalaninen 81a–e zur Synthese von (R)-β-Arylalaninen (R)-82a–e eingesetzt werden (Schema 23). Hierfür wurde die Aminomutase-katalysierte Isomerisierung an einen Alanin-Racemase-katalysierten Epimerisierungsschritt gekoppelt. Eine PAM aus Pflanzen der Familie der Eibengewächse (*Taxus*) wurde hierbei für die stereospezifische Isomerisierung von L-Arylalaninen L-81a–e zu (R)-β-Arylalaninen (R)-82a–e genutzt. Um dem unvorteilhaften Gleichgewicht der Aminomutasereaktion sowie der damit verbundenen Anreicherung der D-Arylalaninomere D-81a–e entgegenzuwirken, wurde der Katalyseschritt der Aminomutase an eine Racemisierung der α-Phenylalanine gekoppelt. Hierfür wurde eine Pyridoxal-5'-phosphat-abhängige Alanin-Racemase aus *Pseudomonas putida* KT2440 genutzt. Durch die Kombination dieser beiden Enzyme konnten enantiomerenreine (R)-β-Arylalanine aus den entsprechenden α-Arylalaninracematen D,L-81a–e mit hohen Enantiomerenüberschüssen (> 99 % ee) generiert werden. Eine Reihe von



Schema 22. Biokatalytischer Prozess für die Bereitstellung von enantiomerenreinen β-Phenylalaninderivaten. Konditionen für die biokatalytische Tandemreaktion: Puffer pH 8.8, 3 % Glycerin, 27 °C, 48 h.



Schema 23. Dynamisch-kinetische Racematspaltung von α -Aryllalaninen zur Bildung von enantiomerenreinen β -Aryllalaninen. Reaktionsbedingungen: Puffer pH 8.0, 5% Glycerin, 31 °C, 20 h.

nichtnatürlichen *o*- und *m*-substituierten α -Aryllalaninen L-81a-c und β -heterocyclischen α -Alaninen L-81d-81e wurde in dieser gekoppelten Racemase-Aminomutase-Reaktion eingesetzt.^[109] Hierbei konnten höhere Umsätze (4–19 Mol-%) als bei der herkömmlichen kinetischen Racematspaltung festgestellt werden.

4. Biokatalyse als Alternative zur Generierung chiraler Epoxide und Epoxidringöffnungsprodukte

Die chirale Herstellung von Epoxiden durch chemische Synthese erfordert teure Katalysatoren und resultiert oftmals in Produkten mit moderaten Enantiomerüberschüssen. In der letzten Dekade wurden Biokatalysatoren zu interessanten Synthesehilfsmitteln für die kinetische Racematspaltung von Epoxiden sowie für die stereoselektive Ringöffnungsreaktion von Epoxidverbindungen entwickelt.^[110,111] Dies führte zu zahlreichen Patentanmeldungen bei BASF, DSM und Codexis.^[112] Epoxidhydrolasen (EHs) katalysieren die enantioselektive Hydrolyse von Epoxiden und können daher in der Synthese von chiralen Epoxiden und 1,2-Diolen eingesetzt werden. Halohydrin-Dehalogenasen (HHDH) katalysieren die Transformation vicinaler Halohydride in die jeweiligen Epoxide. Zusätzlich dazu können HDHH-Enzyme auch für die stereoselektive Ringöffnung von Epoxiden mit unterschiedlichsten Nukleophilen genutzt werden. Hierbei nutzen EH und HHDH verschiedene Reaktionsmechanismen. Die meisten EHs enthalten das Strukturmotiv der α/β -Hydrolasen mit ihrer katalytischen Triade. Teil dieser Triade ist ein nukleophiles Aspartat, das den regioselektiven Angriff auf eines der beiden Kohlenstoffatome des Oxiranrings durchführt. Dabei bildet sich eine kovalente Zwischenstufe, deren Esterbindung hydrolysiert wird (Abbildung 11a). Im Unterschied zu den Reaktionen der klassischen Epoxidhydrolasen, die über einen zweistufigen Mechanismus unter Bildung eines kovalenten Enzym-Substrat-Komplexes ablaufen, hydrolysiert Limonen-1,2-Epoxidhydrolase (LEH) ihre Substrate in einem einzigen Schritt.^[113] Hierbei katalysiert die LEH aus *Rhodococcus erythropolis* die direkte Hydrolyse des Epoxids durch die Aktivierung eines Wassermoleküls im aktiven Zentrum des Enzyms (Abbildung 11b). Dem gegenüber umfasst der für HHDH vorgeschlagene Mechanismus die Aktivierung des Epoxids durch Wasserstoffbrücken sowie

den darauffolgenden Angriff eines Nukleophils, das in einer Halogenidbindetasche gebunden vorliegt (Abbildung 11c).

4.1. Epoxidhydrolasen

Epoxidhydrolasen sind ubiquitär und können dementsprechend in einer Vielzahl von Organismen gefunden werden.^[114] Während anfänglich hauptsächlich Enzyme aus Säugetieren untersucht wurden, rückten in den 1990er Jahren mikrobielle Epoxidhydrolasen in den Fokus. Obwohl EHs auf Wasser als Nukleophil beschränkt sind, haben sie in der organischen

Synthese dennoch großes Interesse auf sich gezogen. Mithilfe dieser Enzyme können chirale Epoxide durch kinetische Racematspaltungen der racemischen Substrate hergestellt und 1,2-Diole in enantiokonvergenten Prozessen aus racemischen Epoxiden synthetisiert werden. Zunächst beschränkten sich biokatalytische Studien oft auf monosubstituierte Epoxide, wie Derivate von Styroxid sowie verschiedene Arylglycidolether. Studien zur Transformation von disubstituierten Epoxiden haben in den letzten Jahren zu einer deutlichen Verbreiterung des Anwendungsspektrums dieser Enzyme geführt. Die Prozesse mit diesen Kofaktor-unabhängigen Enzymen zeichnen sich durch kurze Reaktionszeiten, hohe Enantiomerreinheiten und Substratkonzentrationen aus.

Faber et al. haben kinetische Racematspaltungen einer Vielzahl von 2,2-disubstituierten Epoxiden mit Epoxidhydrolasen aus verschiedenen Mikroorganismen untersucht.^[115] Viele dieser 2,2-disubstituierten Substrate tragen eine Methylgruppe. Nach diesen ersten Erfolgen haben weitere Studien gezeigt, dass auch sterisch anspruchsvollere Substrate für die kinetischen Racematspaltungen verwendet werden können. Zusammen mit den gut etablierten monosubstituierten Verbindungen ermöglichen diese die enantioselektive Synthese verschiedener endständiger Epoxide, der wohl nützlichsten Untergruppe dieser Verbindungsklasse. Das *trans*-Spiroepoxid **rac-83** ist ein wichtiger Baustein für die Synthese von pharmakologisch interessanten 11-Heterosteroïden. Die kinetische Racematspaltung des Epoxidsubstrats gelang durch Verwendung zweier enantiokomplementärer Enzyme, und zwar der Epoxidhydrolase aus *Aspergillus niger* (*AnEH*) und der Limonen-1,2-Epoxidhydrolase (LEH).^[116] *AnEH* ermöglicht den Zugang zum Epoxid (*R,R*)-**83** mit hoher Enantioselektivität (99 % ee), während LEH mit vergleichbarer Selektivität (98 % ee) das Epoxid (*S,S*)-**83** auflöst. Präparative Umsetzungen (1-g-Maßstab) mit hohen Substratkonzentrationen (100 g L⁻¹ *AnEH* oder 8 g L⁻¹ LEH) zeigten gute Ausbeuten (Schema 24).

Des Weiteren haben Monfort et al. einen effizienten Prozess zur Herstellung des enantiomerenreinen Antimykotikum-Schlüsselbausteins D0870 der Azolklassen beschrieben.^[117] Die kommerziell verfügbare *AnEH* wurde in diesem Prozess für die kinetische Racematspaltung des 2,2-disubstituierten Epoxids **rac-86** mit einer Substratkonzentration von 500 g L⁻¹ in einem Wasser/DMSO-Zweiphasensystem einge-

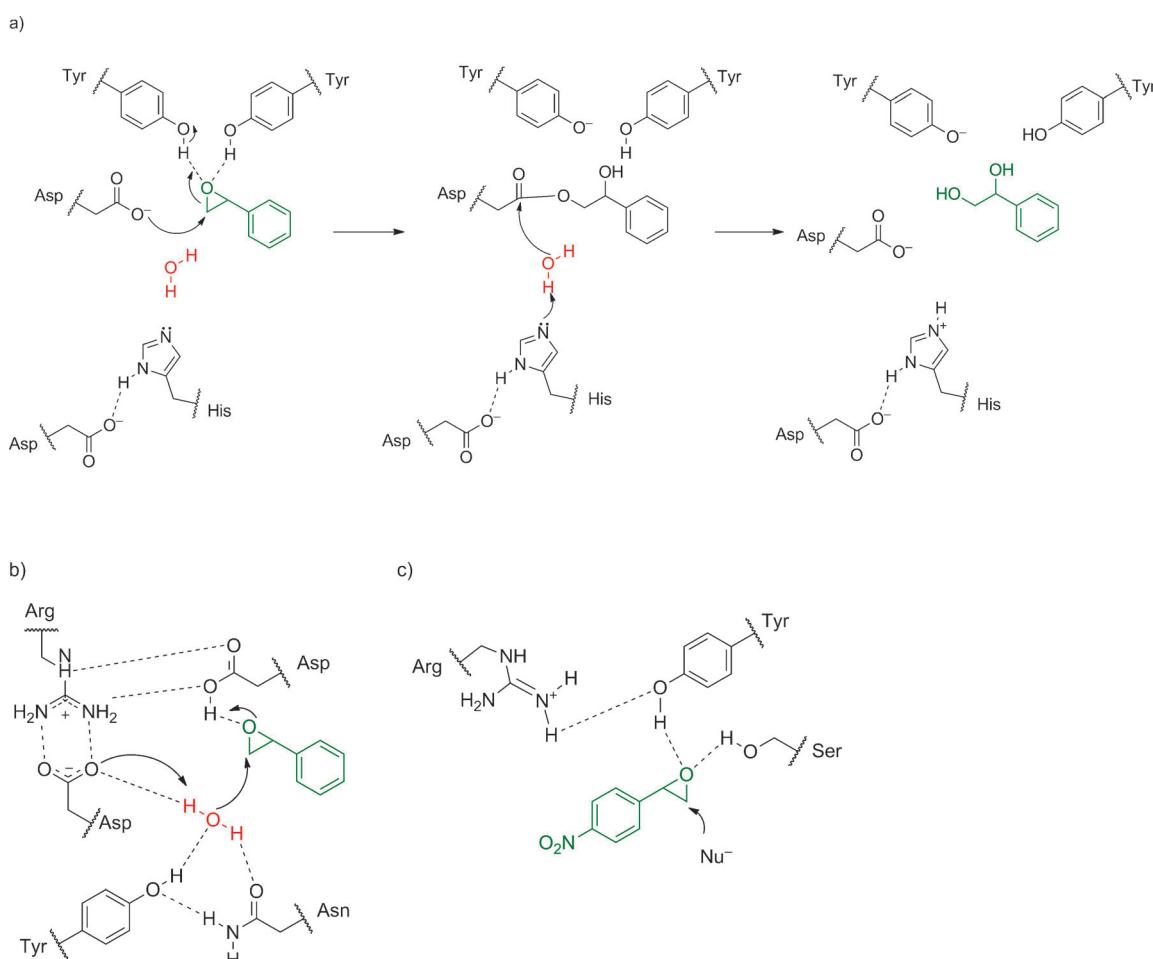
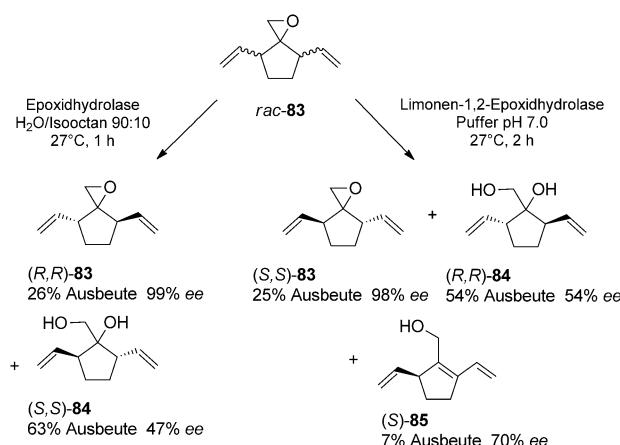


Abbildung 11. a) Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus für Epoxidhydrolasen umfasst die Polarisierung des Epoxids durch zwei Tyrosinreste (Bildung von Wasserstoffbrücken mit dem Epoxidsauerstoffatom), den nukleophilen Angriff des Aspartats gewöhnlich am sterisch weniger gehinderten Kohlenstoffatom sowie die Hydrolyse des Enzym-Substrat-Esterintermediats. b) Im Unterschied dazu läuft der Mechanismus der Limonen-1,2-Epoxidhydrolasen ohne die Bildung eines kovalenten Enzym-Substrat-Intermediats ab. Bei diesem Mechanismus positionieren Tyrosin und Asparagin ein Wassermoleköl in einer für den Epoxidangriff günstigen Position. Es wird angenommen, dass eine Aspartat-Arginin-Aspartat-Triade an der Protonierung und Deprotonierung während der Reaktion beteiligt ist. Ein Aspartat der Triade gibt ein Proton an den Oxiranring des Substrats ab, während das andere Aspartat das Wasser deprotoniert und so den nukleophilen Angriff ermöglicht. Das Arginin der Triade positioniert die beiden Aspartat-Carboxylate und unterstützt darüber hinaus die Stabilisierung der Ladung. c) In der Katalyse der Halohydrin-Dehalogenasen sind die Aminosäuren Serin, Tyrosin sowie Arginin involviert, die an der Aktivierung des Epoxids beteiligt sind. Dies ermöglicht die Ringöffnung über ein Halogenid. Das konservierte Serin ermöglicht die korrekte Positionierung des Substrats. Das Arginin hingegen spielt eine bedeutende Rolle bei der Absenkung des pK_a -Wertes des katalytisch aktiven Tyrosins.

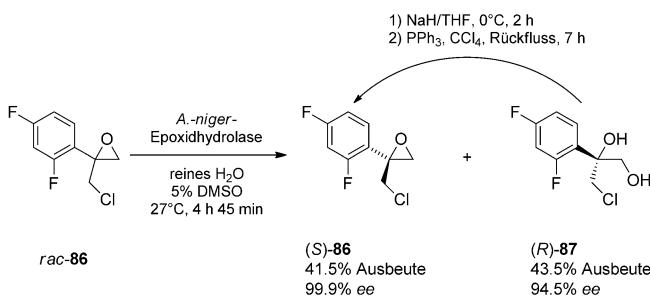
setzt (Schema 25). Nach etwas weniger als fünf Stunden Reaktionszeit konnten unter diesen präparativen Bedingungen die Produkte erhalten werden. Sowohl das nichtreagierende Epoxid (*S*)-**86** (41.5 % Ausbeute, 99.9 % ee) als auch das Diol (*R*)-**87** (43.5 % Ausbeute, 94.5 % ee) wurden in nahezu enantiomerenreiner Form und moderaten Ausbeuten isoliert. Als Ergänzung wurde darüber hinaus noch die chemische Cyclisierung des Diols (*R*)-**87** zum Epoxid (*S*)-**86** beschrieben, womit die Gesamtsynthese einen enantiokonvergenten Prozess darstellt.

Die asymmetrische biokatalytische Hydrolyse von 1,2-disubstituierten Epoxiden ist ein häufiger Syntheseschritt zur Generierung der entsprechenden 1,2-Diole (Schema 26). Auch wenn *meso*-Epoxide nur eine sehr kleine Untergruppe *cis*-disubstituierter Epoxide darstellen, ist ihre Desymmetri-

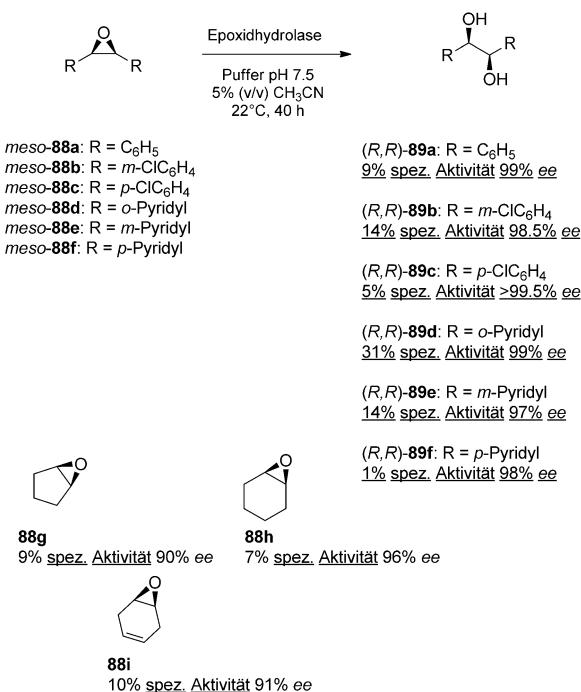
sierung ein interessanter Weg zur Generierung von *trans*-Diole in hohen Ausbeuten (100 % theoretische Ausbeute). Ein bedeutender Schritt bei der enzymatischen Hydrolyse der *meso*-Epoxide *meso*-**88a–i** wurde 2004 von Forschern der Firma Diversa gemacht.^[118] Ein auf Sequenzen und Aktivitäten basierendes Screening von DNA-Datenbanken verschiedener Umweltproben führte zur Identifizierung von mehr als 50 neuen mikrobiellen Epoxidhydrolasen. Für drei dieser Epoxidhydrolasen (BD10721, BD9883, BD8877) konnte nachgewiesen werden, dass sie die Bildung der *R,R*-Diole (*R,R*)-**89a–i** aus unterschiedlichsten heterocyclischen, acyclischen sowie sperrigen *meso*-Epoxiden **88a–i** katalysieren. (*R,R*)-**89a–i** wurden mit hohen Enantiomerenüberschüssen und Umsatzraten gebildet. Außerdem konnten das Synthesepotenzial und die einfache Durchführbarkeit anhand



Schema 24. Kinetische Racematspaltung des *trans*-Spiroepoxids *rac*-83 mit der Epoxidhydrolase AnEH und der Limonen-1,2-Epoxidhydrolase.



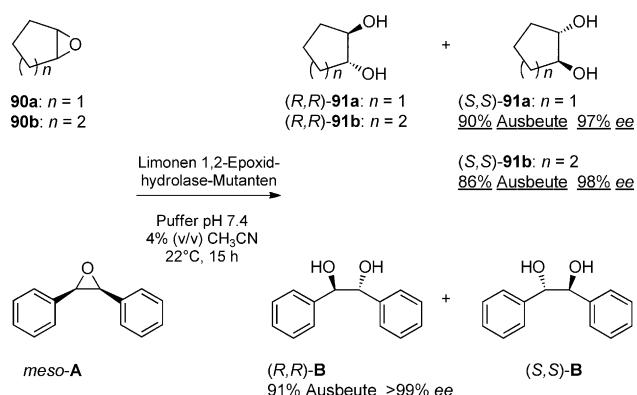
Schema 25. Kinetische Racematspaltung von *rac*-86 mit der käuflichen Epoxidhydrolase aus *Aspergillus niger*.



Schema 26. Epoxidhydrolase-katalysierte Desymmetrisierung von meso-Epoxiden.

der Umsetzung von 1 g *cis*-Stilben (\rightarrow *meso*-88a) mit 109 mg Zelllysat demonstriert werden. (*R,R*)-Diphenyl-1,2-ethandiol [(*R,R*)-89a] konnte in einer Ausbeute von 83% und mit 99% ee isoliert werden. Diese Studien beschreiben erste *S,S*-Diol-produzierende Epoxidhydrolasen für die Desymmetrisierung von *meso*-Epoxiden. Die spezifischen Aktivitäten dieser Enzyme waren jedoch deutlich geringer als die der *R,R*-Diol-produzierenden Epoxidhydrolasen.

Jüngst haben Zheng et al. iterative Sättigungsmutagenese (ISM) zur Optimierung der Stereoselektivität der LEH angewendet.^[119] Die Enantioselektivität dieses Enzyms gegenüber nichtnatürlichen Substraten ist sehr gering, was sich nachteilig auf die Anwendung als Synthesekatalysator auswirkt. Durch Gruppierung von Aminosäuren der aktiven Tasche sowie iterative Durchführung der Sättigungsmutagenese mithilfe eines reduzierten Aminosäurealphabets mussten weniger als 5000 Mutanten analysiert werden. Hierbei wurde für das Screening die Desymmetrisierung von Cyclopentenoxid **90a** als Modellsubstrat angewendet (Schema 27).

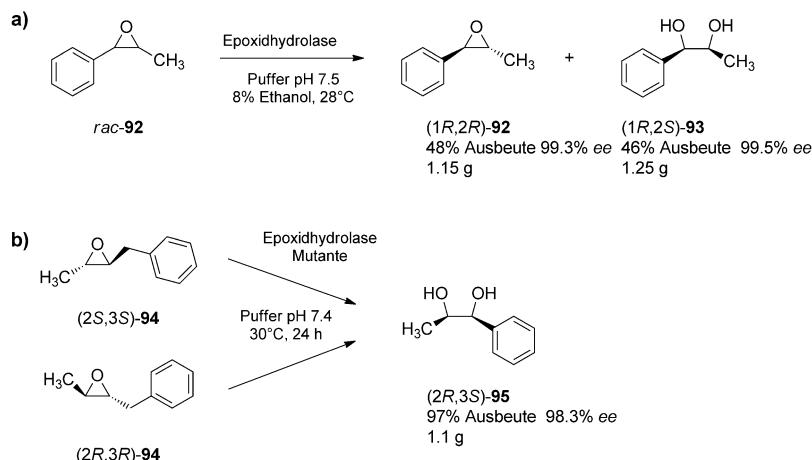


Schema 27. Aufskalierung der Desymmetrisierung ausgewählter meso-Epoxide mit Limonen-1,2-Epoxidhydrolasemutanten.

Während Wildtyp-LEH einen Enantiomerenüberschuss von nur 14% *R,R* zeigte, wurden Mutanten identifiziert, die eine verbesserte *R,R*-Selektivität und eine invertierte *S,S*-Selektivität aufwiesen. Die Mutante H178 setzte das Testsubstrat **90a** in das *S,S*-Diol (*S,S*)-**91a** (93% ee) mit invertierter Stereoselektivität um, während die Mutante H173 (*R,R*)-**90a** mit verbesserter Enantioselektivität (80% ee) bildete. Das Substratspektrum der besten Mutanten wurde weiter untersucht, wobei sich die Varianten als exzellente Katalysatoren für die Desymmetrisierung weiterer meso-Epoxide, und zwar *meso*-**90b** und *meso*-**A**, erwiesen. Zusätzlich wurden drei *meso*-Epoxide für eine Aufskalierung (Substratkonzentration von bis zu 30 g L⁻¹) ausgewählt. Hohe Enantioselektivitäten (97–99% ee) und Ausbeuten (86–91%) konnten so erreicht werden, wobei das Substrat **A** die höchste Ausbeute ergab (Schema 27). Dies demonstriert die Effektivität der ISM als Protein-Engineering-Methode zur Generierung enantioselektiver Katalysatoren. Zusammenfassend wurden LEH-Varianten für die Desymmetrisierung von *meso*-Epoxiden identifiziert, wobei die *S,S*-Diol-produzie-

renden Mutanten wegen ihres seltenen Auftretens in der Natur von besonderem Interesse sind.

Darüber hinaus wurden auch 1,2-*trans*-disubstituierte Epoxide als Substrate verwendet. Kürzlich haben Kotik und Mitarbeiter eine interessante Epoxidhydrolase (Kau2) aus einer metagenomischen DNA-Bibliothek isoliert.^[111] Außerdem der Stereoselektivität gegenüber verschiedenen monosubstituierten Epoxiden zeigt Kau2 auch eine hohe Enantioselektivität und Aktivität bei der kinetischen Racematspaltung von *trans*-1-Phenyl-1,2-epoxypropan (*rac*-92). Bei einem Aufskalierungsexperiment mit einer Substratkonzentration von 80 g L⁻¹ konnten das 1*R*,2*R*-Epoxid (1*R*,2*R*)-92 (48% Ausbeute, 99.3% ee) und das entsprechende 1*R*,2*S*-Diol (1*R*,2*S*)-93 (46% Ausbeute, 99.5% ee) in hohen Ausbeuten und Enantioselektivitäten isoliert werden (Schema 28a).



Schema 28. Umwandlung von *trans*-disubstituierten Epoxiden mit Epoxidhydrolase.

Ausgehend von zahlreichen erfolgreichen Studien zur Mutagenese von Biokatalysten haben Reetz und Mitarbeiter Methoden der Laborevolution auf *AnEH* angewendet.^[120] Hierbei wurde *trans*-2-Benzyl-3-methyloxiran (**94**) als Substrat eingesetzt, das durch Wildtyp-*AnEH* sehr langsam umgesetzt wird. Zwei Varianten zeigten hohe Enantioselektivitäten ($E > 200$) bei der kinetischen Racematspaltung des Testsubstrats. Mit dem gleichen Racemat wurde zu einem späteren Zeitpunkt mit einer der Mutanten Enantiokonvergenz demonstriert, was die Bildung eines einzelnen enantiomerenreinen Diols (*2R,3S*)-95 aus dem racemischen Substrat **94** ermöglichte. Dieser enantiokonvergente Prozess basiert auf der regioselektiven Hydrolyse von (*2S,3S*)-**94** an der 2-Position bei gleichzeitiger Hydrolyse des enantiomeren (*2R,3R*)-**94** an der 3-Position (Schema 28b). Eine zusätzliche iterative Sättigungsmutagenese dieser Mutante generierte Varianten mit höheren Reaktionsgeschwindigkeiten bei gleichbleibender Enantiokonvergenz (92% Umwandlung, > 99% ee).^[121] In diesem Zusammenhang sollte auch erwähnt werden, dass der Jacobsen-Katalysator nicht in der Lage ist, solche racemischen *trans*-disubstituierten Epoxide **94** umzuwandeln.^[122]

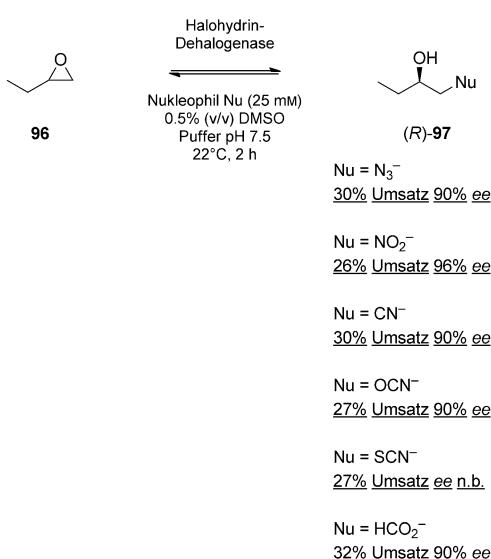
4.2. Halohydrin-Dehalogenasen

Halohydrin-Dehalogenasen (HHDH) sind bakterielle Enzyme, die am biologischen Abbau halogenierter organischer Verbindungen beteiligt und in vielen Mikroorganismen enthalten sind. Die HHDH aus dem Epichlorhydrin-abbauenden Bakterium *Agrobacterium radiobacter* AD1 (HheC) ist bis dato das am meisten erforschte Enzym aus dieser Familie. HheC katalysiert außer der Dehalogenierung von 1,3-Dichlorpropanol sowie 1-Chlorpropan-2,3-diol auch deren Rückreaktion. Die Röntgenkristallstruktur von HheC im Komplex mit verschiedenen Liganden zeigte eine großräumige Halogenidbindetasche und trug damit zu einem besseren Verständnis des katalytischen Mechanismus und der Enantioselektivität dieses Enzyms bei.^[123] HHDHs zeigen

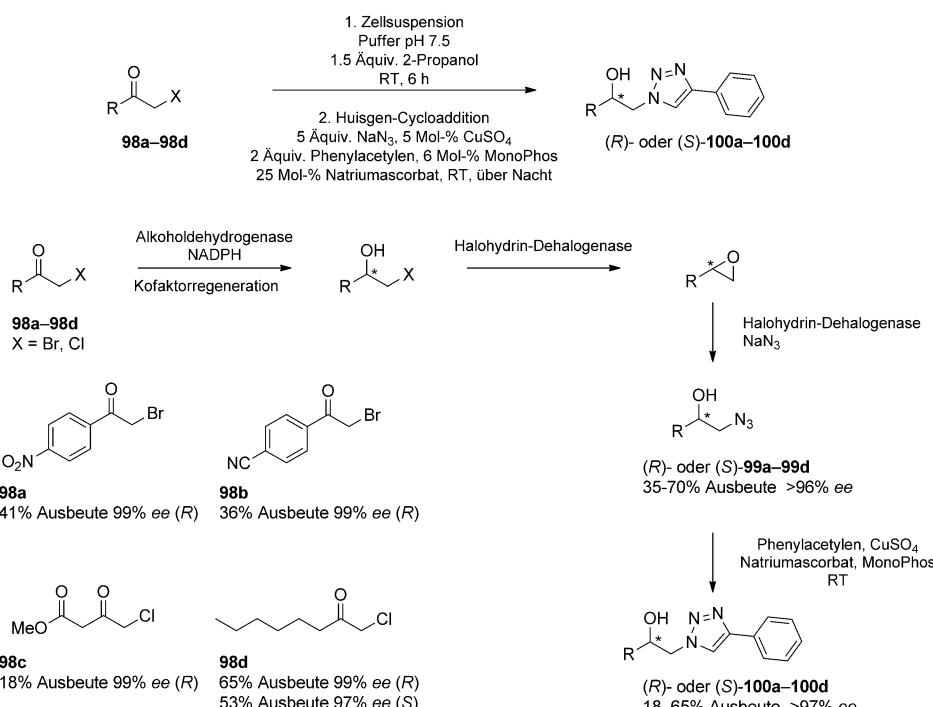
eine hohe Regio- und Enantioselektivität gegenüber aliphatischen und aromatischen Substraten. Dadurch sind sie ein geeignetes Hilfsmittel zur Herstellung von enantiomerenreinen Epoxiden sowie ihrer Ringöffnungsprodukte.^[124] Zusätzlich zu Halogeniden können noch weitere Nukleophile für die Epoxidöffnung verwendet werden, wodurch das Einsatzspektrum für zukünftige Anwendungen erheblich gesteigert wird. Dies ist darauf zurückzuführen, dass β -funktionalisierte Alkohole häufig als reine Enantiomere in der Synthese pharmazeutischer oder biologisch aktiver Verbindungen benötigt werden.

Diesbezüglich haben Janssen und Mitarbeiter nachgewiesen, dass HheC die Epoxidringöffnung mit verschiedenen anionischen Nukleophilen in guten Ausbeuten und mit hohen Enantiomerenüberschüssen katalysiert (Schema 29).^[125] Ferner konnten in präparativen Ansätzen ausreichende Aktivitäten ($k_{\text{cat}} = 2 - 100 \text{ s}^{-1}$) mit Nukleophilen wie Aziden, Cyaniden, Nitriten, Cyanaten sowie Thiocyanaten bei der Ringöffnung von 1,2-Epoxybutan (**96**) als Testsubstrat gezeigt werden. All diesen Reaktionen ist gemein, dass das weniger substituierte Kohlenstoffatom des Epoxids vom Nukleophil mit einer starken Enantiopräferenz für das *R*-Epoxid **97** angegriffen wird. Außer dem Testsubstrat **96** wurden auch weitere, sterisch anspruchsvolle aromatische Substrate und disubstituierte Epoxide mit unterschiedlichen Nukleophilen geöffnet.

Die Kombination von mehreren Katalysatoren in einer Eintopfkaskade ist eine nützliche Methode zur Transformation von einfachen, prochiralen Substraten in enantiomerenreine, hochfunktionalisierte Produkte. Angesichts dieses Vorteils wurden Designerzellen, die einen oder mehrere Biokatalysatoren überexprimieren, in Eintopfreaktionen mit der Huisgen-Cycloadditon kombiniert. So konnten *R*- und *S*-Enantiomere von verschiedenen β -Hydroxytriazolen **100a–d** mit hohen Enantioselektivitäten aus α -Halogenketonen **98a–d** über die zugehörigen Azidintermediate **99a–d** synthetisiert werden (Schema 30).^[126] β -Hydroxytriazole sind blockierende Reagentien für β -Adrenorezeptoren und daher wichtige Arzneimittel.



Schema 29. Durch Halohydrin-Dehalogenase katalysierte, vielseitige Ringöffnungsreaktionen. n.b. = nicht bestimmt.



Schema 30. Enantioselektive Synthese von β -Hydroxytriazolen in einer mehrstufigen Kaskadenreaktion mit Designerzellen.

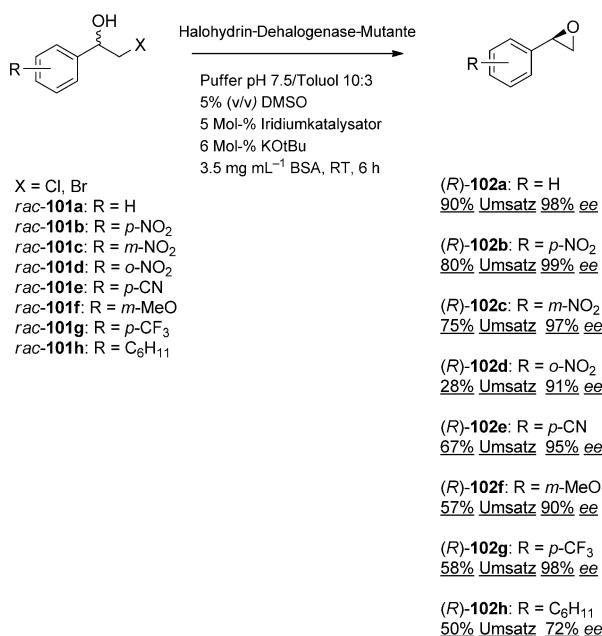
Für die Synthese der β -Hydroxytriazole wurden Zellsysteme konstruiert, die Alkoholdehydrogenasen und HHDHs mit gegensätzlichen Stereoselektivitäten kombinieren. Die zuerst konstruierten Zellen (CT-Zellen) bestanden aus einer überexprimierten *R*-selektiven Alkoholdehydrogenase AdhT aus *Thermoanaerobacter* sp. und der Halohydrin-Dehalogenase HheC aus *Agrobacterium radiobacter* AD1. Die konstruierten *S*-selektiven Zellen (BL-Zellen) setzten sich aus

der Alkoholdehydrogenase AdhL aus *Lactobacillus brevis* und HheBGP1, der Halohydrin-Dehalogenase aus *Mycobacterium* sp. GP1, zusammen. Durch die Verknüpfung der CT-Zellen mit der Huisgen-Cycloaddition konnten gute Resultate mit unterschiedlichen α -Bromketonen erzielt werden. Für Substrate mit elektronenziehenden Gruppen in der *p*-Position des Phenylrings [*p*-NO₂ (**98a**) und *p*-CN (**98b**)] wurden *R*-Produktenantiomere (*R*)-**100a,b** in akzeptablen Ausbeuten (41 bzw. 36 %) und mit hohen Enantiomerenüberschüssen (> 99 %) generiert.

Auf ähnliche Weise wurden zwei weitere aliphatische Substrate, **98c** und **98d**, in Ausbeuten von 18 bzw. 65 % und mit Enantiomerenüberschüssen von 99 % ee umgesetzt. Zur Gewinnung der *S*-Enantiomere des β -Hydroxytriazols wurden BL-Zellen mit umgekehrter Enantiopräferenz angewendet. Da die Halohydrin-Dehalogenase HheB aliphatische Verbindungen bevorzugt umgesetzt, wurde für diese Kaskade **98d** als Substrat verwendet. Das *S*-Produkt (*S*)-**100d** konnte in 53 % Ausbeute und mit einem hohen Enantiomerenüberschuss von 97 % isoliert werden.

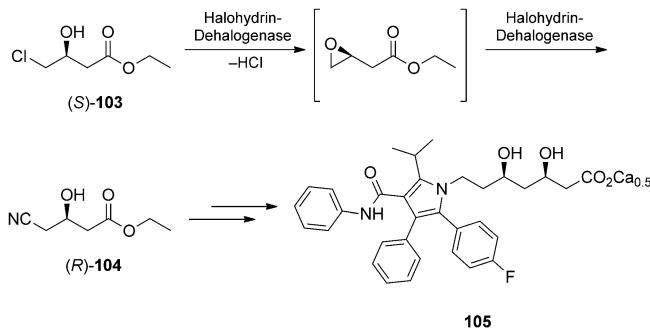
HHDHs wurden auch dazu genutzt, Epoxide enantioselektiv mithilfe kinetischer Racematspaltung zu generieren. In diesem Zusammenhang sind Berichte von Haak et al. zur direkten chemoenzymatischen, dynamisch-kinetischen Racematspaltung auf Interesse gestoßen. Hierbei wurden racemische β -Halogenalkohole **101a–h** zu den *R*-Epoxidenantiomeren (*R*)-**102a–h** umgesetzt.^[127] Während bei der klassischen kinetischen Racematspaltung theoretisch nur eine maximale Ausbeute von 50 % erzielt werden kann, wurde hier dieses Ausbeutelimit durch eine dynamische Racemisierung des verbleibenden Substratenantiomers überwunden. Hierfür wurde ein Iridiumkatalysator eingesetzt. Die dynamisch-kinetische Racematspaltung wurde in einem zweiphasigen Wasser-Toluol-System mit 5 % DMSO als Kosolvans durchgeführt. Als HHDH wurde eine Mutante von HheC verwendet, die durch Zugabe von Rinderserumalbumin (BSA) stabilisiert wurde. Somit konnten aromatische *R*-Epoxide (*R*)-**102a–h** mit guten Umsätzen und Enantioselektivitäten hergestellt werden (Schema 31).

HHDHs wurden des Weiteren bei Epoxidringöffnungen mit nichtnatürlichen Nukleophilen bei der kommerziellen Herstellung des cholesterinsenkenden Mittels Atorvastatin (**105**) eingesetzt. Atorvastatin ist ein aktiver Inhaltsstoff von Lipitor, dessen jährlicher Umsatz über 10 Mrd. Dollar be-



Schema 31. Dynamisch-kinetische Racematspaltung von β -Halogenalkoholen.

trägt. Hierfür wurde eine enzymatische Synthese des chiralen Schlüsselbausteins Ethyl-(*R*)-4-cyan-3-hydroxybutyrat [(*R*)-104] in einem biokatalytischen, zweistufigen Verfahren entwickelt (Schema 32).^[128]



Schema 32. Biokatalytische Synthese eines Zwischenprodukts bei der Produktion von Atorvastatin. Reaktionsbedingungen für die enzymatische Cyanbildung: 70 g Substrat, Puffer pH 7.3, 25-proz. NaCN-Lösung, 40°C, 18 h.

Der erste (hier nicht gezeigte) Schritt umfasst die Keto-reduktase-katalysierte Reduktion von Ethyl-4-chloracetacet zu (*S*)-103. Die enantioselektive Reduktion wurde an eine Kofaktorregeneration gekoppelt, die Glucose als Reduktionsmittel und die NADP⁺-abhängige GDH als Enzym verwendet. Um die Stabilität und Aktivität der Enzyme des Reduktionsschritts bei gleichbleibender Enantioselektivität zu erhöhen, wurde DNA-Shuffling als Enzymtechnik verwendet. Dies führte zu einer 13-fachen Erhöhung der Aktivität von GDH sowie zu einer 7-fachen Erhöhung der Aktivität von (S)-103.

vität bei der Ketoreduktase. Das enantiomerenreine Produkt (*S*)-103 wurde in einer Ausbeute von 96 % und mit einem Enantiomerenüberschuss von 99 % gewonnen.

In einem zweiten Schritt wurde die rekombinante HHDH zur irreversiblen Bildung des Hydroxynitrils (*R*)-104 verwendet. Das Epoxidintermediat wurde unter neutralen pH-Bedingungen mit Cyanid als nichtnatürlichem Nukleophil geöffnet. Um die geringe Aktivität sowie Stabilität der Wildtyp-HHDH bei der Epoxidöffnung mit dem Cyanid zu überwinden, wurde in iterativen Runden DNA-Shuffling angewendet. In der Gegenwart von hohen Konzentrationen des Produkts konnte die Aktivität der HHDH gegenüber der des Wildtyps um das 2500-Fache erhöht werden. Dies führte zu einer hohen Ausbeute an (*R*)-104 (92 %) mit einem exzellenten Enantiomerenüberschuss von > 99 %.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Entwicklungen der letzten zehn Jahre zeigen einen eindeutigen Trend hin zu einem größeren Interesse an enzymatisierten Katalysatoren, wodurch sich die Sichtweise der Biokatalyse in der klassischen organischen Synthesekemie verändert hat. Zurückzuführen ist dies auf die gesteigerten Forschungs- und Entwicklungsaktivitäten, die das Repertoire an Biokatalysatoren um neue Enzyme für gewünschte chemische Reaktionen erweitert haben. Zusätzlich zur Bereitstellung von neuen selektiven Enzymen und Enzymvarianten für individuelle biokatalytische Prozesse ist ein weiterer wichtiger Aspekt die Optimierung von vorhandenen Enzymen in Bezug auf Stabilität unter gegebenen Prozessbedingungen sowie Konzentrationen und Produktionsraten. Die Bereitstellung von Enzym-Toolkits aus einer großen Diversität an Enzymen und Mutanten wird dazu beitragen, den chemischen Raum schneller zu erarbeiten, was einen beschleunigten Technologietransfer zur Industrie ermöglicht. Während mittlerweile Enzyme und ihre Varianten für unterschiedlichste nichtnatürliche Reaktionen eingesetzt werden, besteht weiterhin Verbesserungspotenzial bei der Berücksichtigung von Enzymen in der Retrosynthese. Die Erweiterung der Palette an Enzymen für die organische Synthese wird dazu beitragen, dass die Biokatalyse einen ebenbürtigen Platz neben der Chemokatalyse einnimmt. Dies gilt besonders im Hinblick auf Multi-Enzym-Kaskadenreaktionen, die eine Vielzahl chemischer Eintopftransformationen ermöglichen und so Reaktions- und Aufreinigungsschritte minimieren.

Der Beitrag, den die neue Generation an C=C-reduzierenden sowie C-C-, C-O- und C-N-knüpfenden Biokatalysatoren leistet, wurde hier beschrieben. Die jüngsten Entwicklungen demonstrieren, dass bereits mit einer neuen Generation an Biokatalysatoren, wie Cyclasen, Berberin-Brückenenzyme, Pictet-Spenglerasen oder auch Iminreduktasen inklusive einer von N. J. Turner gewünschten Iminase, gerechnet werden kann. Fortschritte beim Enzym-Engineering, beim De-novo-Protein-Design sowie bei der Suche und Isolierung neuer Enzymfunktionen werden in den kommenden Jahren die Plattform an neuen Biokatalysatoren erweitern. Darüber hinaus präsentieren sich Enzyme mit ihren

spezialisierten Katalysemechanismen als viel breiter einsetzbar, als man noch vor vielen Jahren angenommen hatte. Zahlreiche Studien belegen, dass die vorhandenen katalytischen Zentren analog zur klassischen Katalyse für mechanistisch ähnliche Reaktionen genutzt werden können. Dies bedeutet, dass schon vorhandene und beschriebene Enzyme für die Katalyse von präparativ wertvollen Reaktionen, die bis dato in der Natur nicht beobachtet worden sind, adaptiert werden können. Die Ideen und Fortschritte auf diesem Gebiet („Chemie-basiertes Enzym-Engineering“) sind besonders geeignet für die Bereitstellung von neuen Katalysatoren.

Wir danken Dr. Rainer Stürmer von Stürmer Scientific und Dr. Michael Breuer von der BASF AG für ihre konstruktiven Kommentare zu diesem Aufsatz.

Eingegangen am 15. März 2013

Online veröffentlicht am 12. Februar 2014

- [1] G. Grogan, *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. B* **2009**, *105*, 206–231; A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258–268; K. M. Köller, C.-H. Wong, *Nature* **2001**, *409*, 232–240; S. Panke, M. Held, M. Wubbolts, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 272–279; C. Wandrey, A. Liese, D. Kihumbu, *Org. Process Res. Dev.* **2000**, *4*, 286–290; K. Faber, W. Kroutil, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 181–187; U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–194.
- [2] 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.
- [3] E. Bustó, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504–4523; R. N. Patel in *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnological Industry*, CRC, Boca Raton, **2007**, S. 103–158; R. Schoevaart, M. Van Vliet, *Spec. Chem. Mag.* **2007**, *27*, 38–39; V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B* **2006**, *40*, 111–120; E. Bustó, V. Gotor-Fernandez, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3998–4035.
- [4] M. A. J. Veld, A. R. A. Palmans, *Adv. Polym. Sci.* **2010**, *237*, 55–78.
- [5] D. Liu, P. Trodler, S. Eiben, K. Koschorreck, M. Müller, J. Pleiss, S. C. Maurer, C. Branneby, R. D. Schmid, B. Hauer, *Chem-BioChem* **2010**, *11*, 789–795.
- [6] P.-O. Syréen, E. Lindgren, H. W. Höeffken, C. Branneby, S. Maurer, B. Hauer, K. Hult, *J. Mol. Catal. B* **2010**, *65*, 3–10; S. Warwel, G. Steinke, M. R. Klass, *Biotechnol. Tech.* **1996**, *10*, 283–286; L. N. Monsalve, E. M. Rustoy, A. Baldessari, *Biocatal. Biotransform.* **2011**, *29*, 87–95.
- [7] B. Hauer, B. C. Kvarnström, R. Schmid, S. C. Maurer, P. Trodler, D. Liu, M. Müller, (BASF AG), WO 2009080676 A120090702, **2009**; B. Hauer, D. Häring, C. Branneby, M. Rusnak, D. Liu, R. Schmid, (BASF AG), WO 2007113336 A2 20070607, **2007**; D. Häring, T. L. Herrera, B. Hauer, T. Friedrich, A. Göthlich, (BASF AG), WO 2007063037 A2 20070607, **2007**; D. Häring, U. Meisenburg, B. Hauer, F. Dietsche, (BASF AG), WO 2007014935 A1 20070208, **2007**; B. Hauer, H. W. Höffken, B. C. Kvarnström, H. Schwab, S. Feichtenhofer, M. Buchebner, B. Pohn, (BASF AG), WO 2010007155 A1 20100121, **2010**; B. Hauer, B. C. Kvarnström, K. Hult, A. Magnusson, A. Hamberg, (BASF AG), WO 2011033039 A1 20110324, **2011**.
- [8] J. P. Adams, A. J. Collins, R. K. Henderson, P. W. Sutton, *Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations* (Hrsg.: J. Whittall, P. Sutton), Wiley, Chichester, **2010**, S. 1–82.
- [9] W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 120–126; W. Hummel, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 487–492; A. Weckbecker, H. Gröger, W. Hummel, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2010**, *120*, 195–242; M. L. Hall, A. S. Bommarius, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4088–4110; D. Monti, G. Ottolina, G. Carrea, S. Riva, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4111–4140.
- [10] J. C. Moore, D. J. Pollard, B. Kosjek, P. N. Devine, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1412–1419.
- [11] H. Leisch, K. Morley, P. C. K. Lau, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4165–4222.
- [12] N. J. Turner, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4073–4087; J. H. Schrittweiser, J. Sattler, V. Resch, F. G. Mutti, W. Kroutil, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 249–256; V. Resch, J. H. Schrittweiser, E. Siirila, W. Kroutil, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 793–799.
- [13] M. Brovetto, D. Gamenara, P. S. Mendez, G. A. Seoane, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4346–4403.
- [14] B. M. Nestl, B. A. Nebel, B. Hauer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 187–193; G. A. Strohmeier, H. Pichler, O. May, M. Gruber-Khadjawi, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4141–4164.
- [15] P. Lorenz, J. Eck, *Eng. Life Sci.* **2004**, *4*, 501–504; P. A. Romero, F. H. Arnold, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 866–876; M. J. Dougherty, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, *20*, 486–491; J. D. Bloom, F. H. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 9995–10000; D. Röthlisberger, O. Khermosky, A. M. Wollacott, L. Jiang, J. DeChancie, J. Betker, J. L. Gallaher, E. A. Althoff, A. Zanghellini, O. Dym, S. Albeck, K. N. Houk, D. S. Tawfik, D. Baker, *Nature* **2008**, *453*, 190–195; L. Jiang, E. A. Althoff, F. R. Clemente, L. Doyle, D. Röthlisberger, A. Zanghellini, J. L. Gallaher, J. L. Betker, F. Tanaka, C. F. Barbas III, D. Hilvert, K. N. Houk, B. L. Stoddard, D. Baker, *Science* **2008**, *319*, 1387–1391; J. B. Siegel, A. Zanghellini, H. M. Lovick, G. Kiss, A. R. Lambert, J. L. St. Clair, J. L. Gallaher, D. Hilvert, M. H. Gelb, B. L. Stoddard, K. N. Houk, F. E. Michael, D. Baker, *Science* **2010**, *329*, 309–313.
- [16] W. S. Knowles, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2096–2107; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1998–2007; R. Noyori, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2108–2123; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2008–2022.
- [17] J. W. Yang, M. T. H. Fonseca, N. Vignola, B. List, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 110–112; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 108–110.
- [18] R. Stürmer, B. Hauer, M. Hall, K. Faber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 203–213; C. K. Winkler, G. Tasnádi, D. Clay, M. Hall, K. Faber, *J. Biotechnol.* **2012**, *162*, 381–389.
- [19] C. E. Paul, S. Gargiulo, D. J. Opperman, I. Lavandera, V. Gotor-Fernandez, V. Gotor, A. Taglieber, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 180–183.
- [20] H. S. Toogood, J. M. Gardiner, N. S. Scrutton, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 892–914.
- [21] C. Stückler, T. C. Reiter, N. Baudendistel, K. Faber, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 663–667.
- [22] K. Durchschein, S. Wallner, P. Macheroux, K. Zanger, W. M. F. Fabian, K. Faber, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2346–2351.
- [23] G. Tasnádi, C. K. Winkler, D. Clay, M. Hall, K. Faber, *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1548–1552.
- [24] K. Durchschein, B. Ferreira-da Silva, S. Wallner, P. Macheroux, W. Kroutil, S. M. Glück, K. Faber, *Green Chem.* **2010**, *12*, 616–619.
- [25] K. Durchschein, W. M. F. Fabian, P. Macheroux, K. Zanger, G. Trimmel, K. Faber, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3364–3369.
- [26] S. Gargiulo, D. J. Opperman, U. Hanefeld, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6630–6632.
- [27] M. Schittmayer, A. Glieder, M. K. Uhl, A. Winkler, S. Zach, J. H. Schrittweiser, W. Kroutil, P. Macheroux, K. Gruber, S.

- Kambourakis, J. D. Rozzell, M. Winkler, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 268–274.
- [28] C. Stückler, N. J. Müller, C. K. Winkler, S. M. Glück, K. Gruber, G. Steinkellner, K. Faber, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 8472–8476.
- [29] A. Fryszkowska, K. Fisher, J. M. Gardiner, G. M. Stephens, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 533–535.
- [30] C. K. Winkler, C. Stückler, N. J. Müller, D. Pressnitz, K. Faber, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *6354*–6358.
- [31] C. Stückler, C. K. Winkler, M. Hall, B. Hauer, M. Bonnekessel, K. Zangerer, K. Faber, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 1169–1173; R. Stürmer, B. Hauer, T. Friedrich, K. Faber, M. Hall, P. Macheroux, C. Stückler, (BASF AG), WO 2009074524 A2 20090618, **2009**.
- [32] P. Schweiger, H. Gross, S. Wesener, U. Deppenmeier, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *80*, 995–1006; B. Yin, X. Yang, G. Wei, Y. Ma, D. Wei, *Mol. Biotechnol.* **2008**, *38*, 241–245; E. Shinagawa, Y. Ano, O. Adachi, K. Matsushita, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 260–264.
- [33] N. Richter, H. Gröger, W. Hummel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 79–89.
- [34] M. Kraußer, T. Winkler, N. Richter, S. Dommer, A. Fingerhut, W. Hummel, H. Gröger, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 293–296.
- [35] J. Pietruszka, M. Schölzel, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 751–756.
- [36] E. Brenna, F. G. Gatti, A. Manfredi, D. Monti, F. Parmeggiani, *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 262–268.
- [37] X. Chen, X. Gao, Q. Wu, D. Zhu, *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 734–738.
- [38] D. Mangan, I. Miskelly, T. S. Moody, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2185–2190.
- [39] K. Tauber, M. Hall, W. Kroutil, W. M. F. Fabian, K. Faber, S. M. Glück, *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 1462–1467.
- [40] D. J. Bougioukou, A. Z. Walton, J. D. Stewart, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8558–8560.
- [41] D. J. Bougioukou, S. Kille, A. Taglieber, M. T. Reetz, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 3287–3305.
- [42] N. J. Turner, R. Carr in *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries* (Hrsg.: R. N. Patel), CRC, Boca Raton, **2007**, S. 743–755.
- [43] C.-D. Graf, J. Rieke-Zapp, (Sanofi), WO 2012019967 A1 20120216, **2012**.
- [44] N. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 114–119.
- [45] S. Guizzetti, M. Benaglia, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 5529–5541; F. Spindler, H.-U. Blaser, *Transition Metals for Organic Synthesis*, Bd. 2 (Hrsg.: M. Beller, C. Bolm), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**, S. 113–123.
- [46] R. M. Kellogg, B. Kaptein, T. R. Vries, *Top. Curr. Chem.* **2007**, *269*, 159–197.
- [47] T. Mita, J. Chen, M. Sugawara, Y. Sato, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1429–1432; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1393–1396; J. Martens, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 379–381; S. J. Zünd, M. P. Coughlin, M. P. Lalonde, E. N. Jacobsen, *Nature* **2009**, *461*, 968–970; Y. Ohfune, K. Sakaguchi, T. Shinada, *ACS Symp. Ser.* **2009**, *1009*, 57–71.
- [48] B. A. Arndtsen, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 302–313; A. J. von Wangelin, H. Neumann, M. Beller, *Top. Organomet. Chem.* **2006**, *18*, 207–221; M. Beller, M. Eckert, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1026–1044; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1010–1027.
- [49] A. Luna, I. Alfonso, V. Gotor, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3627–3629; F. Messina, M. Botta, F. Corelli, M. P. Schneider, F. Fazio, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3767–3769; M. I. Youshko, R. F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 3267–3271; K. Ditrich, F. Balkenhol, W. Ladner, (BASF AG), DE 19534208 A1 19970320, **1997**; F. Balkenhol, B. Hauer, W. Landner, U. Pressler, (BASF AG), DE 4332738 A1 19950330, **1995**.
- [50] V. Köhler, K. R. Bailey, A. Znabet, J. Raftery, M. Helliwell, N. J. Turner, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2228–2230; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2182–2184.
- [51] Y. Li, H. Ogola, Y. Sawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 503–516.
- [52] M. J. Abrahamson, E. Vázquez-Figueroa, N. B. Woodall, J. C. Moore, A. S. Bommarius, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4036–4040; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3969–3972.
- [53] C. J. Dunsmore, R. Carr, T. Fleming, N. J. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2224–2225.
- [54] D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 324–332.
- [55] M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42–51.
- [56] D. Zhu, L. Hua, *Biotechnol. J.* **2009**, *4*, 1420–1431.
- [57] L. Poppe, J. Rétey, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3734–3754; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3668–3688; N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 234–240.
- [58] Y. Asano, Y. Kato, C. Levy, P. Baker, D. Rice, *Biocatal. Biotransform.* **2004**, *22*, 133–140.
- [59] M. J. MacDonald, G. B. D'Cunha, *Biochem. Cell Biol.* **2007**, *85*, 273–282.
- [60] L. H. Andrade, A. V. Silva, P. Milani, D. Koszelewski, W. Kroutil, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2043–2051.
- [61] N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 115–121; M. S. Malik, E.-S. Park, J.-S. Shin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94*, 1163–1171.
- [62] S. Mathew, H. Yun, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 993–1001.
- [63] N. J. Turner, M. D. Truppo, *Chiral Amine Synthese* (Hrsg.: T. C. Nugent), Wiley-VCH, Weinheim, **2010**, S. 431–459.
- [64] D. Koszelewski, D. Clay, K. Faber, W. Kroutil, *J. Mol. Catal. B* **2009**, *60*, 191–194.
- [65] D. Koszelewski, D. Clay, D. Rozzell, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2289–2292.
- [66] F. G. Mutti, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 3409–3413.
- [67] M. Höhne, S. Kühl, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 363–365; H. Yun, B.-G. Kim, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 3030–3033.
- [68] D. Koszelewski, M. Goeritzer, D. Clay, B. Seisser, W. Kroutil, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 73–77; D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, G. M. Gübitz, D. Rozzell, W. Kroutil, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9477–9480; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9337–9340.
- [69] M. D. Truppo, N. J. Turner, J. D. Rozzell, *Chem. Commun.* **2009**, 2127–2129.
- [70] B. Wang, H. Land, P. Berglund, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 161–163.
- [71] A. Iwasaki, Y. Yamada, N. Kizaki, Y. Ikenaka, J. Hasegawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *69*, 499–505.
- [72] M. Höhne, S. Schätzle, H. Jochens, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 807–813; M. Höhne, U. T. Bornscheuer, K. Robins, S. Schätzle (Lonza AG), WO 2011026556 A1 20110310, **2011**.
- [73] I. Lavandera, D. Koszelewski, W. Kroutil, (Angewandte Biokatalyse Kompetenzzentrum GmbH), AT 507050 A1 20100115, **2010**.
- [74] D. Koszelewski, D. Pressnitz, D. Clay, W. Kroutil, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4810–4812.
- [75] R. C. Simon, B. Grischek, F. Zepeck, A. Steinreiber, F. Belaj, W. Kroutil, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6817–6820; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6713–6716.
- [76] K. Tauber, M. Fuchs, J. H. Sattler, J. Pitzer, D. Pressnitz, D. Koszelewski, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haas, W. Kroutil, *Chemistry* **2013**, *19*, 4030–4035.
- [77] J. H. Sattler, M. Fuchs, K. Tauber, F. G. Mutti, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haas, W. Kroutil, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 9290–9293; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9156–9159.

- [78] M. Fuchs, D. Koszelewski, K. Tauber, W. Kroutil, K. Faber, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5500–5502.
- [79] S. Lutz, *Science* **2010**, 329, 285–287; 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; F. G. Mutti, J. Sattler, K. Tauber, W. Kroutil, *ChemCatChem* **2011**, 3, 109–111; A. A. Desai, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 2018–2020; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1974–1976; C. Savile, E. Mundorff, J. C. Moore, P. N. Devine, J. M. Janey, (Codexis Inc.), WO 2010099501 A2 20100902, **2010**; G. Hughes, P. N. Devine, F. J. Fleitz, B. T. Grau, J. Limanto, C. Savile, (Codexis Inc.), WO 2011005477 A1 20100113, **2011**.
- [80] J. Rudat, B. Brucher, C. Syldatk, *AMB Express* **2012**, 2, 11–21.
- [81] E. Park, M. Kim, J.-S. Shin, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, 352, 3391–3398.
- [82] B.-K. Cho, H. J. Cho, S.-H. Park, H. Yun, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, 81, 783–789; B.-K. Cho, H. J. Cho, H. Yun, B.-G. Kim, *J. Mol. Catal. B* **2003**, 26, 273–285.
- [83] C. U. Ingram, M. Bommer, M. E. B. Smith, P. A. Dalby, J. M. Ward, H. C. Hailes, G. J. Lye, *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, 96, 559–569; M. E. B. Smith, B. H. Chen, E. G. Hibbert, U. Kaulmann, K. Smithies, J. L. Galman, F. Baganz, P. A. Dalby, H. C. Hailes, G. J. Lye, J. M. Ward, J. M. Woodley, M. Micheletti, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, 14, 99–107.
- [84] H.-S. Bea, S.-H. Lee, H. Yun, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2011**, 16, 291–296.
- [85] Y. Asano, Y. Kato, C. Levy, P. Baker, D. Rice, *Biocatal. Biotransform.* **2004**, 22, 133–140; L. Poppe, C. Paizs, K. Kovács, F.-D. Irimie, B. Vértesy, L. Pollegioni, S. Servi, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 794, Humana, New York, **2012**, S. 3–19.
- [86] M. de Villiers, V. Puthan Veetil, H. Raj, J. de Villiers, G. J. Poelarends, *ACS Chem. Biol.* **2012**, 7, 1618–1628.
- [87] J. C. Calabrese, D. B. Jordan, A. Boodhoo, S. Sariaslani, T. Vannelli, *Biochemistry* **2004**, 43, 11403–11416.
- [88] H. Ritter, G. E. Schulz, *Plant Cell* **2004**, 16, 3426–3436; T. F. Schwede, J. Rétey, G. E. Schulz, *Biochemistry* **1999**, 38, 5355–5361.
- [89] M. Baedeker, G. E. Schulz, *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 1790–1797.
- [90] K. R. Hanson, E. A. Havir, *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, 141, 1–17; B. Schuster, J. Rétey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 8433–8437; M. Langer, A. Pauling, J. Rétey, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1585–1587; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1464–1465.
- [91] S. Bartsch, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 3412–3415; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 3362–3365.
- [92] R. R. Fritz, D. S. Hodgins, C. W. Abell, *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 4646–4650.
- [93] G. B. D'Cunha, V. Satyanarayan, P. M. Nair, *Enzyme Microb. Technol.* **1994**, 16, 318–322; A. Gloge, B. Langer, L. Poppe, J. Rétey, *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, 359, 1–7; A. Gloge, J. Zon, A. Kovari, L. Poppe, J. Rétey, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 3386–3390; C. Paizs, A. Katona, J. Rétey, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1113–1116.
- [94] M. Wubbolts in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook*, 2. Aufl., (Hrsg.: K. Daruz, H. Waldmann), Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, S. 686–697; A. Liese, K. Seelbach, A. Buchholz, J. Haberland, *Industrial Biotransformations* (Hrsg.: A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey), Wiley-VCH, Weinheim, **2006**, S. 95–392.
- [95] B. Weiner, G. J. Poelarends, D. B. Janssen, B. L. Feringa, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 10094–10100.
- [96] N. P. Botting, M. Akhtar, M. A. Cohen, D. Gani, *Biochemistry* **1988**, 27, 2953–2955.
- [97] M. Akhtar, N. P. Botting, M. A. Cohen, D. Gani, *Tetrahedron* **1987**, 43, 5899–5908; M. S. Gulzar, M. Akhtar, D. Gani, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1997**, 649–656.
- [98] H. Raj, W. Szymanski, J. de Villiers, H. J. Rozeboom, V. P. Veetil, C. R. Reis, M. de Villiers, F. J. Dekker, S. de Wildeman, W. J. Quax, A.-M. W. H. Thunnissen, B. L. Feringa, D. B. Janssen, G. J. Poelarends, *Nat. Chem.* **2012**, 4, 478–484.
- [99] H. Raj, B. Weiner, V. P. Veetil, C. R. Reis, W. J. Quax, D. B. Janssen, B. L. Feringa, G. J. Poelarends, *ChemBioChem* **2009**, 10, 2236–2245.
- [100] B. de Lange, D. J. Hyett, P. J. D. Maas, D. Mink, F. B. J. van Assema, N. Sereinig, A. H. M. de Vries, J. G. de Vries, *ChemCatChem* **2011**, 3, 289–292.
- [101] B. Wu, W. Szymanski, P. Wietzes, S. de Wildeman, G. J. Poelarends, B. L. Feringa, D. B. Janssen, *ChemBioChem* **2009**, 10, 338–344.
- [102] C. L. Steele, Y. Chen, B. A. Dougherty, W. Li, S. Hofstead, K. S. Lam, Z. Xing, S.-J. Chiang, *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, 438, 1–10; W. Mutatu, K. L. Klettke, C. Foster, K. D. Walker, *Biochemistry* **2007**, 46, 9785–9794.
- [103] S. D. Christenson, W. Liu, M. D. Toney, B. Shen, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6062–6063; S. D. Christenson, W. Wu, M. A. Spies, B. Shen, M. D. Toney, *Biochemistry* **2003**, 42, 12708–12718.
- [104] N. D. Ratnayake, U. Wanninayake, J. H. Geiger, K. D. Walker, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 8531–8533; L. Feng, U. Wanninayake, S. Strom, J. Geiger, K. D. Walker, *Biochemistry* **2011**, 50, 2919–2930.
- [105] B. J. V. Verkuij, A. J. Minnaard, J. G. de Vries, B. L. Feringa, *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 6526–6533.
- [106] B. J. V. Verkuij, W. Szymanski, B. Wu, A. J. Minnaard, D. B. Janssen, J. G. de Vries, B. L. Feringa, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 901–903.
- [107] B. Wu, W. Szymanski, G. G. Wybenga, M. M. Heberling, S. Bartsch, S. de Wildeman, G. J. Poelarends, B. L. Feringa, B. W. Dijkstra, D. B. Janssen, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 497–501; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 482–486.
- [108] B. Wu, W. Szymanski, S. de Wildeman, G. J. Poelarends, B. L. Feringa, D. B. Janssen, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, 352, 1409–1412.
- [109] B. M. Cox, J. B. Bilsborrow, K. D. Walker, *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 6953–6959.
- [110] N. Bala, S. S. Chimni, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, 21, 2879–2898; E. J. de Vries, D. B. Janssen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, 14, 414–420; E. Y. Lee, M. L. Shuler, *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, 98, 318–327; M. Widersten, A. Gurell, D. Lindberg, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2010**, 1800, 316–326; M. Kotik, A. Archelas, R. Wohlgemuth, *Curr. Org. Chem.* **2012**, 16, 451–482.
- [111] M. Kotik, V. Stepanek, M. Grulich, P. Kyslik, A. Archelas, *J. Mol. Catal. B* **2010**, 65, 41–48.
- [112] B. Hauer, (BASF AG), WO 2007099107 A1 20070907, **2007**; J. H. Lutje Spelberg, D. B. Janssen, (Rijksuniversiteit Groningen), EP 1158054 A1 20011128, **2001**; D. Mink, J. H. Lutje Spelberg, E. J. de Vries, (DSM IP Assets B.V.), WO 2007137816 A1 20071206, **2007**; D. Mink, S. J. H. Lutje, E. J. de Vries (DSM IP Assets B.V.), WO 2007128469 A1 20071115, **2007**.
- [113] Q. Q. Hou, X. Sheng, J. H. Wang, Y. J. Liu, C. B. Liu, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2012**, 1824, 263–268.
- [114] S. Barth, M. Fischer, R. D. Schmid, J. Pleiss, *Bioinformatics* **2004**, 20, 2845–2847; A. J. Fretland, C. J. Omiecinski, *Chem.-Biol. Interact.* **2000**, 129, 41–59; B. van Loo, J. Kingma, M. Arand, M. G. Wubbolts, D. B. Janssen, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72, 2905–2917.
- [115] W. Krenn, I. Osprian, W. Kroutil, G. Brauneck, K. Faber, *Biotechnol. Lett.* **1999**, 21, 687–690; M. Mischitz, W. Kroutil, U. Wandel, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 1261–

- 1272; I. Osprian, W. Kroutil, M. Mischitz, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 65–71.
- [116] A.-L. Bottalla, M. Ibrahim-Ouali, M. Santelli, R. Furstoss, A. Archelas, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1102–1110.
- [117] N. Monfort, A. Archelas, R. Furstoss, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 601–605.
- [118] L. Zhao, B. Han, Z. Huang, M. Miller, H. Huang, D. S. Marshallshock, Z. Zhu, A. Milan, D. E. Robertson, D. P. Weiner, M. J. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11156–11157.
- [119] H. Zheng, M. T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15744–15751.
- [120] M. T. Reetz, D. Kahakeaw, R. Lohmer, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1797–1804.
- [121] H. Zheng, D. Kahakeaw, J. P. Acevedo, M. T. Reetz, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 958–961.
- [122] E. N. Jacobsen, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 421–431.
- [123] R. M. de Jong, J. J. W. Tiesinga, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, L. Tang, D. B. Janssen, B. W. Dijkstra, *EMBO J.* **2003**, *22*, 4933–4944; R. M. de Jong, J. J. W. Tiesinga, A. Villa, L. Tang, D. B. Janssen, B. W. Dijkstra, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13338–13343.
- [124] J. H. L. Spelberg, L. Tang, R. M. Kellogg, D. B. Janssen, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1095–1102; J. H. L. Spelberg, L. Tang, M. van Gelder, R. M. Kellogg, D. B. Janssen, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1083–1089.
- [125] G. Hasnaoui-Dijoux, M. M. Elenkov, J. H. L. Spelberg, B. Hauer, D. B. Janssen, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1048–1051.
- [126] W. Szymanski, C. P. Postema, C. Tarabiono, F. Berthiol, L. Campbell-Verduyn, S. de Wildeman, J. G. de Vries, B. L. Feringa, D. B. Janssen, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 2111–2115; L. S. Campbell-Verduyn, W. Szymanski, C. P. Postema, R. A. Dierckx, P. H. Elsinga, D. B. Janssen, B. L. Feringa, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 898–900.
- [127] R. M. Haak, F. Berthiol, T. Jerphagnon, A. J. A. Gayet, C. Tarabiono, C. P. Postema, V. Ritleng, M. Pfeffer, D. B. Janssen, A. J. Minnaard, B. L. Feringa, J. G. de Vries, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13508–13509.
- [128] 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.