

MARCEL HEIDLINDEMANN

Dissertation

Chemoenzymatische
Mehrstufen-Prozesse
zur enantioselektiven Synthese
chiraler Alkohole

Universität Bielefeld

Chemoenzymatische
Mehrstufen-Prozesse
zur enantioselektiven Synthese
chiraler Alkohole

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
an der Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von Dipl.-Chem.
MARCEL HEIDLINDEMANN
aus Bünde

Marcel Heidlindemann, *Chemoenzymatische Mehrstufen-Prozesse zur enantioselektiven Synthese chiraler Alkohole*

© November 2014

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von April 2011 bis November 2014 an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld in der Arbeitsgruppe Organische Chemie I angefertigt. Die wissenschaftliche Anleitung der vorliegenden Dissertation oblag Prof. Dr. Harald Gröger.

Als Dissertation genehmigt von der
Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld
unter Begutachtung von:

REFERENT:

Prof. Dr. Harald Gröger
Organische Chemie I
Universität Bielefeld

KORREFERENT:

Prof. Dr. Norbert Sewald
Organische Chemie III
Universität Bielefeld

Danksagung

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. Harald Gröger, möchte ich neben der exzellenten wissenschaftlichen Betreuung dieser Arbeit im Besonderen dafür danken, dass er mir einen völlig neuen Blick auf synthetisch-chemische Herausforderungen gezeigt hat. Unter seiner Anleitung bin ich in vielen Bereichen gereift und zu einem besseren Chemiker geworden - und dies nicht nur, weil ich mir zusätzlich zu meiner klassischen Ausbildung das Themenfeld der Biokatalyse erarbeiten konnte. Gerade in diesem Zusammenhang bin ich dankbar für den ein oder anderen fokussierenden, dabei jedoch nicht reglementierenden Eingriff zu Beginn neuer Projekte, der die verschiedenen Schwerpunktthemen dieser Arbeit letztendlich in die Form gebracht hat, in der sie hier präsentiert werden. Auch bin ich dankbar für das Vertrauen, das er mir entgegengebracht hat, denn nur so konnte ich meine Eigenständigkeit weiterentwickeln und Erfahrungen machen, die mir in meiner beruflichen Zukunft von großem Wert sein werden.

Prof. Dr. Norbert Sewald möchte ich für die bereitwillige und freundliche Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Albrecht Berkessel (Universität zu Köln) sowie Herrn Prof. Dr. Werner Hummel vom Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für den regen Ideenaustausch im Rahmen verschiedener Kooperationsprojekte. Außerdem gilt mein Dank Frau Dr. Ulla Létinois, Herrn Dr. Thomas Netscher und Herrn Dr. Werner Bonrath (DSM Nutritional Products), die das (*R*)-Pantolacton-Projekt durch den fachlichen Austausch und ihre industrielle Sichtweise bereichert haben. Darüber hinaus danke ich EVONIK INDUSTRIES für die Bereitstellung des Favor SXM 9155[®] Superabsorbers im Rahmen einer Hochschulspende und für die Erfahrungen, die ich als Teilnehmer des Chemtogether @ Evonik 2012 in Essen machen konnte.

Weiterhin danke ich allen Personen, die durch ihre Mitarbeit an verschiedenen, individuellen Forschungsprojekten im Rahmen ihrer Ausbildung bzw. ihres Studiums nicht nur einen wissenschaftlichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet, sondern auch meinen Laboralltag bereichert haben. Namentlich sind dies in alphabetischer Reihenfolge: Martin Aschenbrenner, Christoph Butenuth, Vanessa Koch, Oliver Kracker, Hanna März, Marius Schröder, Anna Schwartzen, Vanessa Vollmer und Robin Warner. Mit zeitweise drei Mitarbeitern gleichzeitig fühlte sich das bereits wie eine richtige, kleine Arbeitsgruppe an.

Ein besonderer Dank gilt der guten Seele der OC I, unserem CTA Herrn Thomas Geisler, dessen Hilfsbereitschaft und unterstützende Arbeit nicht hoch genug eingeschätzt werden kann. Während meiner gesamten Promotion gab es kein Problem, das Thomas nicht in Rekordzeit gelöst hat. Auch Frau Arja Gaestel möchte ich für ihr Engagement und ihre Unterstützung in Verwaltungsangelegenheiten danken.

Danken möchte ich ebenso meinen Laborkollegen Katharina Tenbrink und Dr. Philipp Böhm, die mir mit ihrer fachlichen Kompetenz oft weiter geholfen und gleichzeitig mit ihrer offenen, freundlichen Art ein unheimlich angenehmes Arbeitsumfeld geschaffen haben.

Ein gesonderter Dank geht an all diejenigen, die mich abseits des wissenschaftlichen Alltags begleitet haben - oder anders ausgedrückt Kollegen, die zu Freunden wurden. Zum einen ist dies die „Nerd-Truppe“, die so etwas wie einem Stammtisch noch am nächsten kommt, bestehend aus Dr. Jens Eberhard, Björn Kowalewski, Dr. Florian May, Dr. Alexander Moreth und Dr. Sebastian Wiegmann als aktuellen sowie Dr. Michael Peter und Steffen Schwarz als ehemaligen Mitgliedern. Unter Einbezug der Diplomarbeitszeit besteht die derzeitige Konstellation schon seit über vier Jahren - und jede Woche freue ich mich auf's Neue darauf, euch zu sehen.

Zum anderen sind dies die lieben Menschen, mit denen ich immer gern meine Zeit verbringe, wie Dr. Giuseppe Rulli, Dr. Philipp Böhm, Elena Herman, Wilko Greschner, Nina Brinkmann und Tobias Klein.

Nicht vergessen werden sollen an dieser Stelle die mit der OC I befreundeten Arbeitskreise der BC I, BC III und PC III, sowie allen Mitgliedern der „alten OC I (AK Prof. Mattay)“ mit denen im Laufe der letzten Jahre der ein oder andere schöne Grillabend verbracht wurde.

Gar nicht genug danken kann ich meiner Familie für ihre unermüdliche und beharrliche Unterstützung zu jedem Zeitpunkt meiner Promotion aber auch während meines Studiums. Natürlich gab es auch mal Momente in denen ich grummelig oder einsilbig war, aber ihr hattet stets den richtigen Riecher für das, was mir gut tut: Sei es durch das von Mudder spontan gekochte Lieblingsessen, aufmunternde Worte oder ein taktisch kluges „in Ruhe lassen“. Ohne diesen familiären Rückhalt wäre ich sicher nie an diesem Punkt meiner akademischen Laufbahn angelangt. Dafür danke ich euch! Zu guter Letzt habe ich in dieser Zeit auch mein persönliches Glück mit meiner Freundin Carolin gefunden, die überdies durch Ratschläge, Diskussionen, Anregungen und Korrekturen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	CHEMOENZYMATISCHE SYNTHESE VON 1,3-DIOLEN.....	9
2.1	Motivation und Zielsetzung.....	9
2.2	Stand der Wissenschaft.....	15
2.2.1	Synthesestrategien zur Darstellung von 1,3-Diole.....	15
2.2.2	Prolin und seine Derivate als Katalysatoren der asymmetrischen Aldolreaktion (AAR).....	21
2.2.3	Enzymatische Ketonreduktion mit Alkoholdehydrogenasen.....	25
2.2.4	Immobilisierung von Biokatalysatoren: Verfahren und Anwendungsbeispiele	33
2.3	Ergebnisse und Diskussion	39
2.3.1	Ketonreduktion mit immobilisiertem Biokatalysator	39
2.3.1.1	Synthese der Referenzverbindungen und Etablierung der Analytik	39
2.3.1.2	Verwendung einer superabsorbierten Alkoholdehydrogenase aus <i>Rhodococcus species</i> im wässrigen Medium	43
2.3.1.3	Verwendung einer superabsorbierten Alkoholdehydrogenase aus <i>Rhodococcus species</i> im organischen Solventien	47
2.3.2	Darstellung des Aldolproduktes in organischen Medien	53
2.3.2.1	Synthese der Referenzverbindungen und Etablierung der Analytik	53
2.3.2.2	Darstellung von (<i>R</i>)-12 im organischen Medium.....	57
2.3.2.3	Exkurs 1) Mechanistische Betrachtung der Prolinamidkatalysierten Aldolreaktion.....	61
2.3.3	Untersuchungen zum Einfluss der Autoxidation des Substrates auf die Reaktionsdynamik der Aldolreaktion.....	65
2.3.3.1	Exkurs 2) Theoretische Betrachtung der Aldehydoxidation.....	67
2.3.3.2	Aerobe Oxidation von 3-Chlorbenzaldehyd (13) im wässrigen und organischen Milieu.....	69
2.3.3.3	Vermeidung der Cokatalysatorgenerierung durch Autoxidation: Asymmetrische Aldolreaktion unter Ausschluss von Sauerstoff.....	73
2.3.4	Chemoenzymatische Zwei-Stufen-Eintopf-Synthese des Diols (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-10	77
3	CHEMOENZYMATISCHE SYNTHESE VON (<i>R</i>)-PANTOLACTON	81
3.1	Motivation und Zielsetzung.....	81
3.2	Stand der Wissenschaft.....	85

3.2.1	Histidin als Katalysator für gekreuzte Aldolreaktionen zwischen enolisierbaren Aldehyden	85
3.2.2	Vitamine, Pantothersäure und Pantolacton	91
3.3	Ergebnisse und Diskussion.....	103
3.3.1	Synthese der Referenzverbindungen und Etablierung der Analytik.....	103
3.3.2	Organokatalytische Synthese des Aldolproduktes.....	109
3.3.2.1	Katalysatorscreening und der Einfluss von Wasser auf die organokatalytische Aldolreaktion	109
3.3.2.2	Optimierung einzelner Reaktionsparameter	115
3.3.2.3	Einfluss von Additiven	119
3.3.2.4	Synthese von (<i>R</i>)-86 unter Verwendung optimierter Reaktionsbedingungen	123
3.3.3	Biokatalytische Darstellung von (<i>R</i>)-Pantolacton.....	125
3.3.3.1	Auswahl des Biokatalysators und Optimierung einzelner Reaktionsparameter.....	125
3.3.3.2	Voruntersuchungen zur chemoenzymatischen Synthese von (<i>R</i>)-Pantolacton	131
3.3.3.3	Aufhebung der thermodynamischen Limitierung des biokatalytischen Schlüsselschrittes durch <i>in situ</i> Produktentfernung (ISPR).....	135
3.3.4	Chemoenzymatische Zwei-Stufen-Eintopf-Synthese von (<i>R</i>)-Pantolacton.....	141
3.3.5	Recyclierung des Biokatalysators	145
4	ZUSAMMENFASSUNG.....	147
4.1	Chemoenzymatische Synthese von 1,3-Diolen	147
4.2	Chemoenzymatische Synthese von (<i>R</i>)-Pantolacton	151
5	SUMMARY	157
5.1	Chemoenzymatic Synthesis of 1,3-Diols	157
5.2	Chemoenzymatic Synthesis of (<i>R</i>)-Pantolactone.....	161
6	EXPERIMENTELLER TEIL.....	167
6.1	Verwendete Chemikalien und Geräte.....	167
6.2	Allgemeine Methoden.....	171
6.3	Arbeitsvorschriften	175
6.3.1	Chemoenzymatische Synthese von 1,3-Diolen.....	175
6.3.1.1	Diolsynthesen.....	175
6.3.1.2	Aldolreaktionen.....	180
6.3.2	Chemoenzymatische Synthese von (<i>R</i>)-Pantolacton	190
6.3.2.1	Aldolreaktionen.....	190
6.3.2.2	Biokatalytische Synthese von (<i>R</i>)-Pantolacton.....	204

7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	221
8	SCHEMATAVERZEICHNIS.....	224
9	TABELLENVERZEICHNIS	227
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	228
11	LITERATURVERZEICHNIS	233

1 Einleitung

Enzyme in der chemischen Synthese einzusetzen ist heute weit mehr als eine Labor-kuriosität – vielmehr hat sich die Biokatalyse wegen ihrer hohen Selektivität und umweltfreundlichen Reaktionsführung bei milden Bedingungen zur Methode der Wahl entwickelt und Einzug in unser tägliches Leben gehalten.^{*} Dabei ist die Anwendung von Biokatalysatoren zur Herstellung eines Produktes mit definierten Eigenschaften keine Errungenschaft der neuzeitlichen Industrie, wie ein Blick in die Geschichte zeigt: So ist die Kunst der Käseerei beinahe so alt wie der moderne Menschen selbst.

Erste Aufzeichnungen über das Geheimnis der Käseherstellung durch Zugabe von zerkleinerten Teilen, insbesondere der Schleimhaut, des vierten Magens (Labmagen) junger Kälber zu Milch gehen bis in das 5. Jahrtausend v. Chr. zurück und liegen damit noch vor der Ausbildung der ersten staatlichen Gebilde vor rund 6000 Jahren.^[2,3] Zwar wurde die Fähigkeit der im Lab enthaltenen Aspartat-Endopeptidase Chymosin zur Spaltung des Milcheiweißes Kasein, was zur Koagulation der Milch führt,^[4] über die Jahrtausende zur Herstellung von Süßmilchkäsen ausgenutzt und findet sogar Erwähnung in Schriften Aristoteles, der die besonders hohe Wirksamkeit von Hirsch- bzw. Rehlab hervorhob,^[5] die weltweit erste Kommerzialisierung erfolgte jedoch erst 1874 durch den dänischen Chemiker Christian HANSEN.^[6] Ihm gelang die Extraktion des Enzyms aus getrockneten Kälbermägen. Die Gründung seines noch heute bestehenden und weiterhin im Bereich der Lebensmittelchemie arbeitenden Unternehmens ‚Chr. Hansen‘ zum Vertrieb dieser standardisierten Enzympräparate darf als Meilenstein und Geburtsstunde der modernen Biotechnologie gesehen werden.^[6]

Heute entfällt ungefähr die Hälfte aller technischen Enzymenwendungen auf die Lebensmittel- und Getränkeindustrie (Abbildung 1.1).^[7] So nutzt beispielsweise die Backwarenindustrie gleich mehrere synergetische Biokatalyseprozesse aus. Während die Verwendung des ersten von Menschen großtechnisch eingesetzten Ganzzellkatalysators Hefe bei der Brotherstellung nicht mehr wegzudenken ist – immerhin würde unser Brot ohne die Verstoffwechslung von Stärke durch *Saccharomyces cerevisiae* und der hiermit einhergehenden Kohlendioxidfreisetzung gar nicht erst aufgehen – können darüber hinaus gezielt weitere enzymatische Umsetzungen genutzt werden, um den kulinarischen Anforderungen an das Lebensmittel gerecht zu werden. Amylasen hydrolysieren Stärke zu kurzkettigeren Fragmenten oder einzelnen Glucosemolekülen, wodurch der Brotlaib noch stärker aufgeht, länger weich bleibt und eine erhöhte Lagerstabilität aufweist. Lipasen bauen Triglyceride im Teig ab und führen im Backvorgang zu einer gleichmäßigeren Kruste, während diese durch den Einsatz von Glucoseoxidasen (Gluconsäurebildung aus Glucose) stabil und knackig gehalten wird.^[8,9]

^{*} Einen sowohl im didaktischen als auch wissenschaftlichen Kontext hervorzuhebenden Überblick über biotechnologische Verfahren und ihre Implementierung in (industrielle) Herstellungsmethoden stellt das Buch „Biotechnologie verständlich“ von H. DELLWEG dar, welches dem interessierten Leser als weiterführende Literatur empfohlen sei, da im Rahmen dieser Arbeit nur ausgewählte Beispiele Erwähnung finden können.^[1]



Abbildung 1.1. Einsatzgebiete technischer Enzyme nach Industriezweigen.^[10]

Selbst in der Getränkeindustrie oder bei der Fertigung von Süßwaren haben Enzyme Einzug gefunden, ohne dass dieses auf den ersten Blick ersichtlich ist. Tatsächlich ist die großtechnische Stärkeverzuckerung zur Herstellung von Fructose-Glucose-Sirup (HFCS, high fructose corn sirup), einem Süßungsmittel, das heutzutage in zahllosen Lebensmitteln enthalten ist und in den USA die Verwendung von Zucker in Softdrinks fast vollständig verdrängt hat, mit zehn Millionen Jahrestonnen der produktionsstärkste enzymatische Prozess weltweit.^[11]

Doch auch andere Industriezweige wurden durch technische Enzyme revolutioniert, deren Einsatz weder aus den Herstellungsprozessen noch aus unserem Alltag wegzudenken ist. So musste Wäsche vor rund einhundert Jahren noch stundenlang vorbehandelt, geschrubbt und bei hohen Temperaturen behandelt werden. Dies änderte sich 1914 durch die Erfindung von „Burnus“ (Abbildung 1.2), dem ersten Schmutzlöser auf Enzyimbasis, durch Otto Röhm dramatisch.^[12] Heute finden die in „Burnus“ eingesetzten, Eiweiß-spaltenden Proteasen in über 80% aller Waschmittel Anwendung.^[11] Zudem lösen Lipasen Fett-, Cellulasen Gras- und Amylasen gezielt Stärkeverschmutzungen – und das alles bereits bei Temperaturen zwischen 20 und 40°C.^[13,14]

Der Einsatz von Enzymen wird neben ihrer ökologischen Attraktivität (im Gegensatz zu Chemikalien sind sie problemlos vollständig biologisch abbaubar) wegen des verringerten Wasser- und Energieverbrauchs von bis zu 50% so auch ökonomisch unverzichtbar.^[2]



Abbildung 1.2. Beispiele für Produkte, die auf Enzymbasis wirken (1. Reihe links: Oropon, Beizmittel mit Proteasen; 1. Reihe mittig: Burnus, das erste Waschmittel mit Proteasen; 2. Reihe mittig: Diabetes Blutmessgerät mit Glucoseoxidaseteststreifen; 3. Reihe links: Chymosin enthaltende Labmischung für die Käseherstellung) bzw. bei deren Herstellung biokatalytische Schlüsselschritte implementiert sind (1. Reihe rechts: Penicillin; 2. Reihe links: Bier; 2. Reihe rechts: HFCS-haltiges Erfrischungsgetränk; 3. Reihe rechts: lactosefreie Milch).^[15]

Enzyme lassen unser Brot und unseren Wein (Entfernung des Korkgeschmacks durch Laccase-katalysierte Umsetzung des Bitterstoffs 2,4,6-Trichlorphenol)^[16] besser schmecken, helfen uns bei der Herstellung von Käse, Bier (Glucanasen erleichtern die Filtration durch den Abbau von Glucanen aus der Braugerste, Glucoamylasen redu-

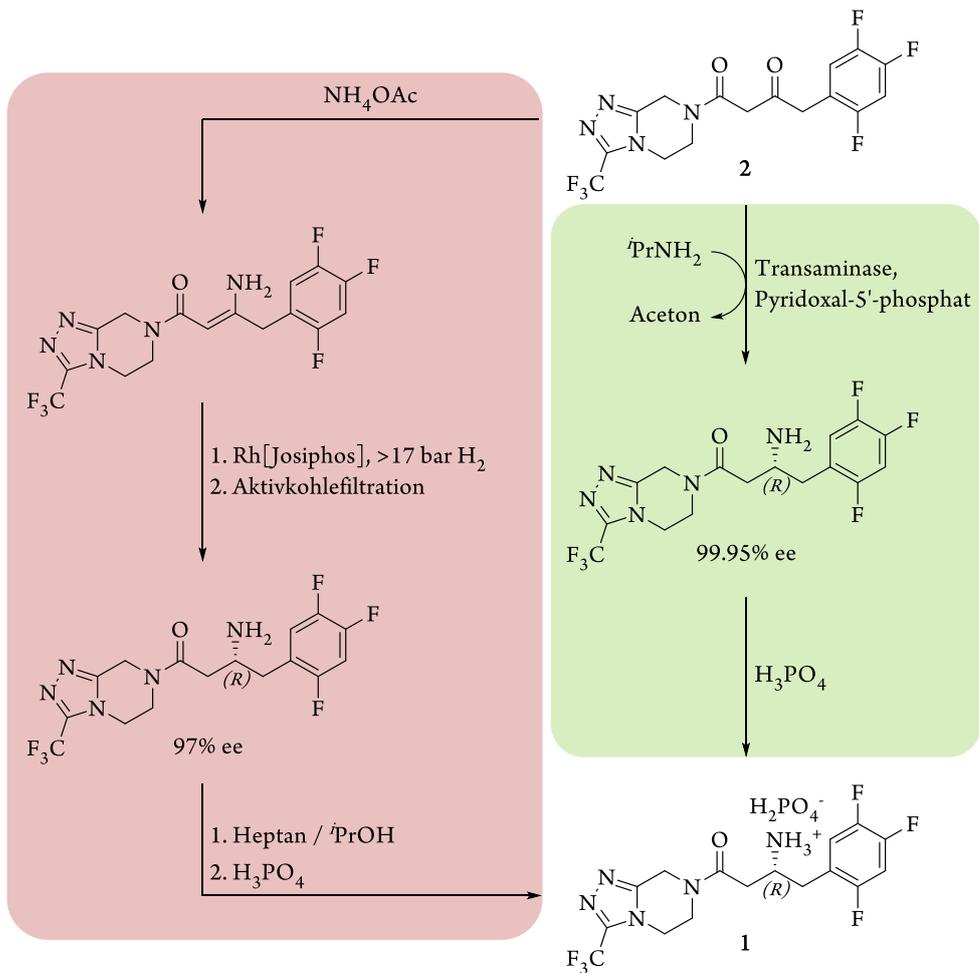
zieren den Brennwert)^[8] und Fruchtsäften (Pectinasen erleichtern die Trennung von Fruchtfleisch und Schale, Arabinasen enttrüben den Rohsaft),^[8] ermöglichen als Biosensoren Diabetespatienten die Blutzuckerkontrolle (Glucoseoxidase setzt Glucose elektrochemisch zu quantifizierbaren Mengen Gluconsäure um)^[17] und lassen auch lactoseintolerante Menschen Genuss an Milchprodukten finden (Lactase spaltet Lactose und verdaut das Nahrungsmittel *in vitro* vor).^[2]

Doch gerade im chemisch-synthetischen Kontext können Enzyme noch viel mehr. Die chemische Industrie erkannte frühzeitig, dass der Einsatz von Biokatalysatoren bei der Herstellung von Pharmazeutika unvergleichliche Vorteile bietet – insbesondere dann, wenn der Wirkstoff ein oder mehrere optisch aktive Zentren aufweist. Über die Hälfte aller heute verwendeten Medikamente sind chiral und die Medizingeschichte lehrt uns, dass die enantiomerenreine Herstellung eines Wirkstoffs unabdingbar ist.^[18,19] So zeigen beispielsweise pharmakologische Studien über die Wirkung von Enantiomerenpaaren im Fall von (*R*)-konfigurierten Babbitursäurederivaten eine beruhigende und narkotisierende Wirkung während das (*S*)-Analogon Krampfanfälle auslöst.^[20] D-Penicillamin* kann zur Behandlung der Wilson Krankheit oder bei arthritischen Beschwerden eingesetzt werden,^[21] während L-Penicillamin als Pyridoxininhibitor auf den menschlichen Körper hochtoxisch wirkt.^[22]

Die Implementierung enzymatischer Syntheseschritte in bestehende Produktionsprozesse oder ein alternative Zugang zu pharmakologisch aktiven Wirkstoffen durch biokatalytische Verfahren kann sich dabei im doppelten Sinne als vorteilhaft erweisen. Ein viel beachtetes Beispiel beschrieben SAVILE *et al.* 2010 in *Science*.^[23] Im Vergleich zur etablierten, chemischen Syntheseroute von Sitagliptin (**1**, Arzneistoff zur Behandlung von *Diabetes mellitus* Typ 2) kann ausgehend vom Prositagliptinketoamid **2** nicht nur die optische Reinheit des Wirkstoffs auf 99.95% gesteigert werden (Schema 1.1). Gleichzeitig lassen sich mit der biokatalytischen Darstellungsmethode auch der Gesamtumsatz um 13% auf 92% sowie die Produktivität (kg Produkt pro Liter pro Tag) bei einer Substratkonzentration von 200 g/L um 53% steigern, während umweltrelevante Faktoren des Prozesses signifikant verbessert werden konnten: Der Abfall wird um 19% verringert und zur Herstellung des Antidiabetikums werden keinerlei Schwermetalle benötigt.^[23] Außerdem kommt das enzymatische Verfahren ohne spezielle Hochdruckapparaturen aus.

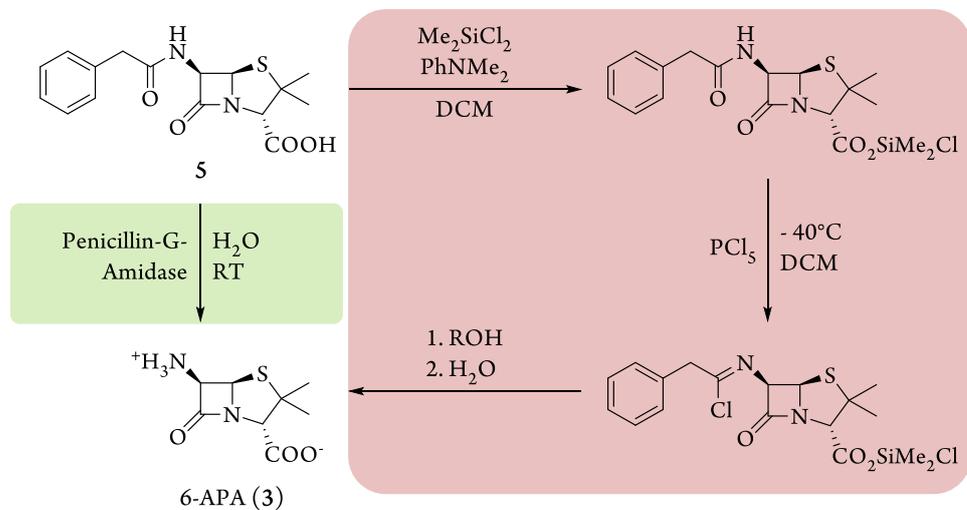
SAVILE *et al.* konnten zeigen, dass die Biokatalyse bei der großtechnischen Produktion von Blockbuster-Wirkstoffen wie Sitagliptin, welches allein 2013 mit einem globalen Jahresumsatzvolumen von vier Milliarden Dollar vertrieben wurde,^[24,25] nicht nur als Alternative zu klassisch-chemischen Synthesen zu sehen ist. Vielmehr hat sich der biokatalytische Zugang zu Wirkstoffvorläufern wegen seiner ökologischen und ökonomischen Vorteile teilweise bereits als Methode der Wahl etabliert: So werden die Penicillinvorstufe 6-Aminopenicillinsäure (6-APA, **3**) und der Cephalosporinvorläufer 7-Aminocephalosporinsäure (7-ACA, **4**) halbsynthetisch aus den fermentativ zugänglichen Bausteinen Penicillin G (**5**) respektive Cephalosporin C (**6**) gewonnen.^[26,27] Der Jahresbedarf an 6-APA liegt schätzungsweise bei 8000 Tonnen.^[28]

* Handelsnamen: Cuprimine, Depen oder Metalcaptase.



Schema 1.1. Chemische (links, rot) und biokatalytische (rechts, grün) Synthese von Sitagliptin.

Rein chemisch lässt sich die Darstellung des bicyclischen β -Lactams **3** nur unter Verwendung von hoch giftigem Phosphorpentachlorid realisieren, wobei die Einführung und spätere Abspaltung einer Silylschutzgruppen unumgänglich ist (Schema 1.2).

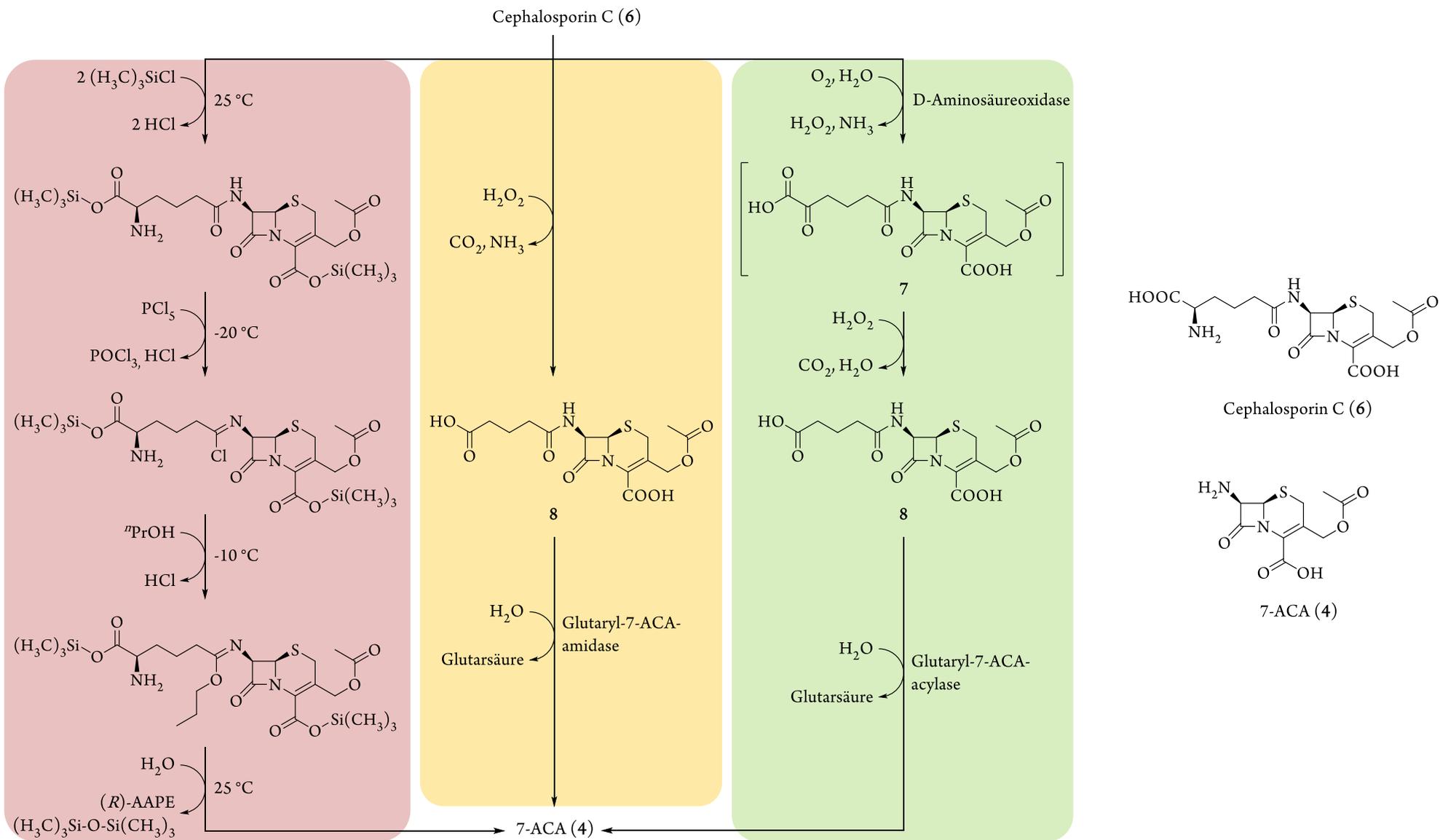


Schema 1.2. Chemische (rot) und enzymatische (grün) Darstellung von 6-Aminopenicillinsäure (**3**).

Weiterhin bedarf diese Methode stark abgesenkte Temperaturen sowie den strikten Ausschluss von Feuchtigkeit, während die biokatalytische Route in Wasser und bei Raumtemperatur in nur einem einzelnen Schritt zum Ziel führt. Ähnlich effizient verläuft die heutzutage angewendete chemoenzymatische Darstellung von 7-ACA (Schema 1.3).^[26,27]

Die Weltjahresproduktion des β -Lactamantibiotikums 7-ACA wird mit 3000 Tonnen pro Jahr beziffert und verläuft chemisch, wie die Darstellung von 6-APA, unter Einsatz toxischer Verbindungen (Schema 1.3, roter Pfad).^[29] Die von Asahi Chemical Industry bereits seit 1973 industriell genutzte Route zur Herstellung von 7-ACA (**4**) kombiniert dabei die chemische Oxidation von Cephalosporin C (**6**) zu Glutaryl-7-ACA (**8**) mit der hocheffizienten enzymatischen Deacylierung mittels einer Glutaryl-7-ACA-amidase (Schema 1.3, oranger Pfad).^[26] Heute kann auch der Oxidationsschritt enzymatisch durchgeführt werden: Hierbei wird das Substrat **6** zunächst mit einer entsprechenden D-Aminosäureoxidase zum Intermediat α -Ketoadipyl-7-ACA (**7**) oxidiert (Schema 1.3, grüner Pfad). Dieses reagiert spontan unter Decarboxylierung zur 7-ACA-Vorstufe **8** weiter und kann analog des chemoenzymatischen Verfahrens biokatalytisch zu 7-ACA umgesetzt werden. Im bienzymatischen Prozess reduzieren sich die Chemikalien bei der Herstellung von 7-ACA zu natürlich vorkommenden Aminosäuren und Zucker als Substrate bzw. Nährmedium für die fermentative Produktion der Vorstufe Cephalosporin C sowie Wasser und Sauerstoff. Als Abfall entstehen ausschließlich Kohlendioxid und Glutarsäure. Die isolierte Säure kann wiederum als Edukt zur Herstellung von 1,5-Pentandiol, einem Biopolymerbaustein, genutzt werden kann.^[30]

Ein Ende der Erfolgsgeschichte Biokatalyse ist nicht in Sicht – im Gegenteil. Sie hat den Makel einer Laborkuriosität längst abgelegt und sich zur Methode der Wahl entwickelt.^[31] So lag der weltweit erwirtschaftete Umsatz mit Produkten aus Biotransformationen 2006 bereits bei 80 Milliarden Euro.^[32] Aufgrund des rasanten Wachstums dieses Marktsegments beziffern neuere Quellen den Umsatz für 2010 allerdings bereits auf 85 Milliarden Euro – allein in den USA.^[33] Heute beträgt der Anteil von Produktionsverfahren, die auf biokatalytischen Methoden basieren, in der chemischen Industrie etwa fünf Prozent. Bis zum Jahr 2025 wird ein Anstieg auf 10 bis 20 Prozent erwartet.^[11]



Schema 1.3. Chemische (rot), chemoenzymatische (orange) und bienzymatische (grün) Darstellung von 7-Aminocephalosporinsäure (4). (*R*)-AAPE = (*R*)-2-Amino adipinsäure-6-propylester.

2 Chemoenzymatische Synthese von 1,3-Diolen

2.1 Motivation und Zielsetzung

Der Umsatz mit pharmazeutischen Erzeugnissen lag 2012 weltweit bei etwa 962 Mrd. US-Dollar.^[34] Den größten Absatzmarkt stellt hierbei Nordamerika dar, das einen Anteil von 36% (349 Mrd. US-Dollar) ausmacht. Bis 2020 wird ein Wachstum des Gesamtumsatzes mit Pharmawirkstoffen auf bis zu 1,5 Bio. US-Dollar prognostiziert. Mit 14% liegt der Anteil der internen Forschungs- und Entwicklungs-Ausgaben der pharmazeutischen Industrie hierbei deutlich über dem Durchschnitt des verarbeitenden Gewerbes oder der Chemieindustrie (beide circa 3%).^[34] Da von rund 10.000 Verbindungen, die am Anfang der Medikamentenentwicklung als Wirkstoff in Frage kommen, da sie ein krankheitsrelevantes Ziel im Organismus adressieren, in der Regel lediglich eine den behördlichen Zulassungsprozess erfolgreich absolviert, sind diese hohen Forschungsaufwendungen der Pharmaindustrie allerdings auch von existenzieller Bedeutung für die Entwicklung neuer, pharmakologisch aktiver Substanzen.

Ein häufig auftretendes Strukturmotiv dieser Pharmazeutika sind chirale 1,3-Diole.^[35] So ist diese wichtige Teilstruktur in diversen Makrolidantibiotika wie Dermostatin A,^[36] Spongistatin 1,^[37-39] Mycoticin A,^[40,41] Nystatin A1^[42] oder Amphotericin B,^[43] welche insbesondere bei systemischen und chronische Pilzinfektionen als Antimykotika zum Einsatz kommen, vertreten (Abbildung 2.1).

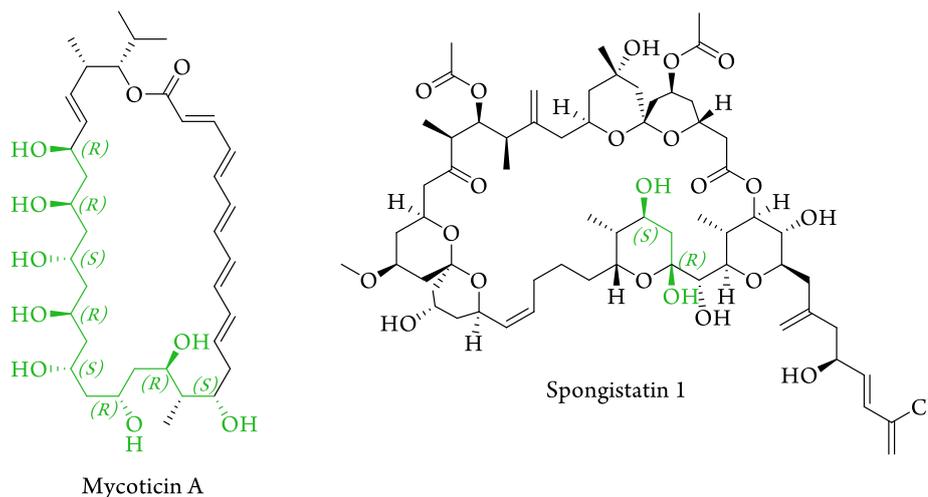


Abbildung 2.1. Beispiele für Makrolidantibiotika mit 1,3-Diolteilstrukturen (grün markiert).

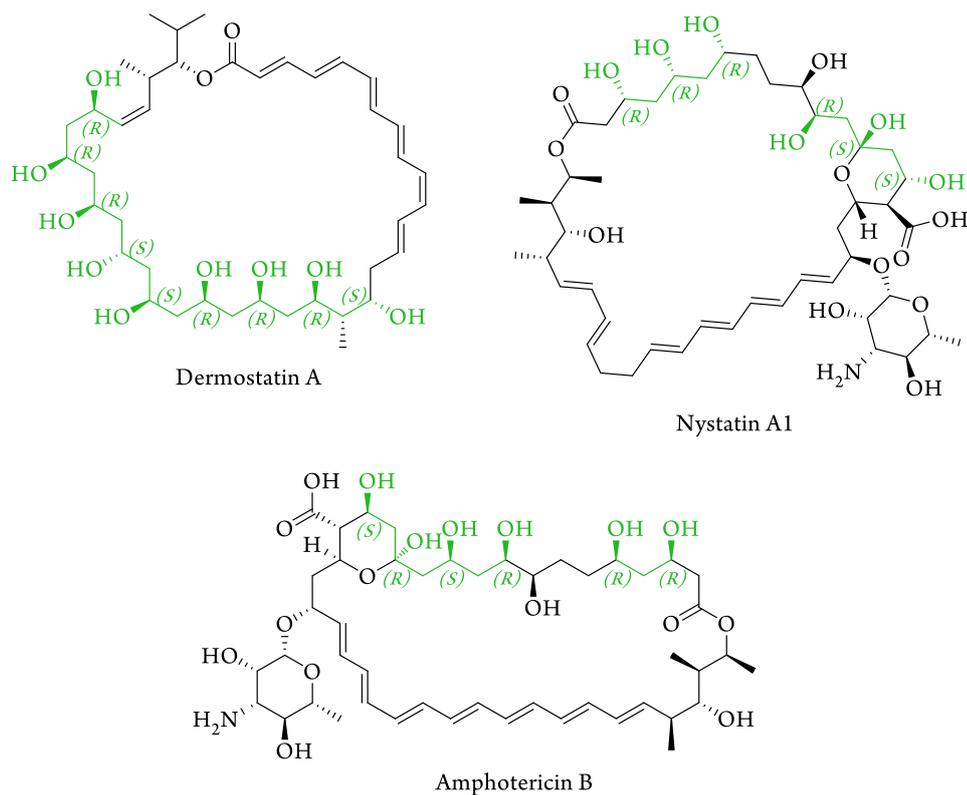


Abbildung 2.1. (Forts.) Weitere Beispiele für Makrolidantibiotika mit 1,3-Diolteilstrukturen.

Weiterhin finden sich chirale 1,3-Diolbausteine in verschiedensten HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren wie Atorvastatin,^[44,45] Cerivastatin,^[46,47] Rosuvastatin,^[48,49] Pitavastatin,^[50] Fluvastatin^[51,52] oder Pravastatin,^[53] die allesamt zur Behandlung von Hypercholesterinämie verwendet werden, dem antiosteoporotisch und immunsystemmodulierend wirkenden Secosteroid Calcitriol^[54-57] sowie dem bei chronisch venöser Insuffizienz als unterstützendes Therapeutikum wirkenden Ruscogenin (Abbildung 2.2).^[58,59]

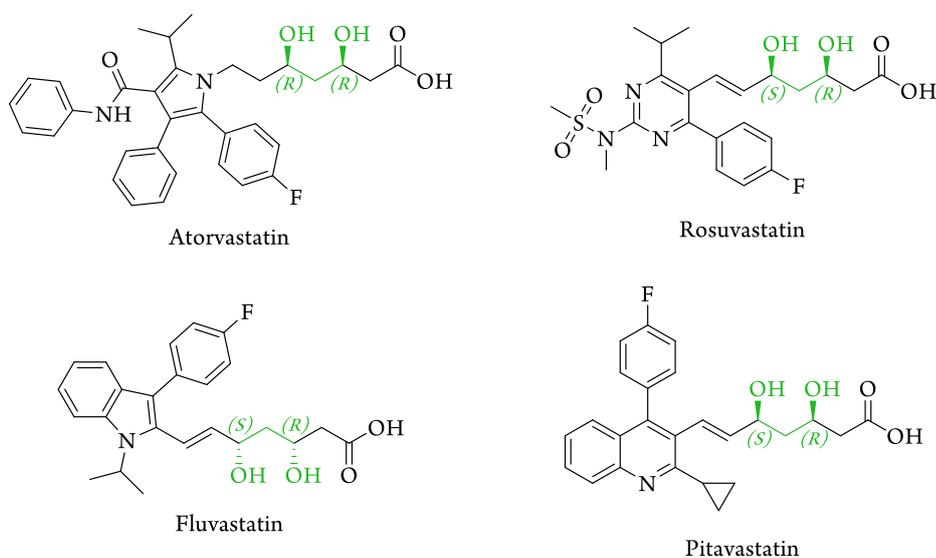


Abbildung 2.2. Beispiele für pharmakologische Wirkstoffe mit 1,3-Diolmotiv.

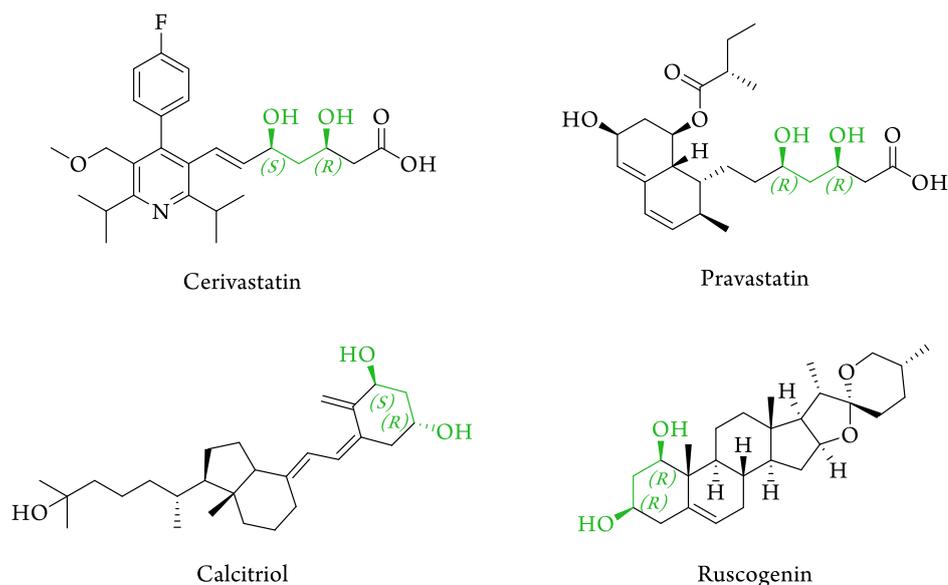
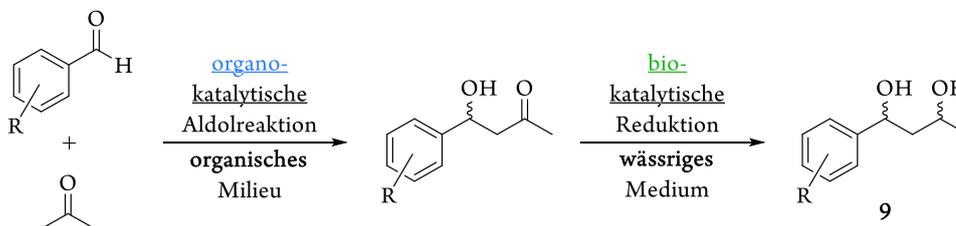


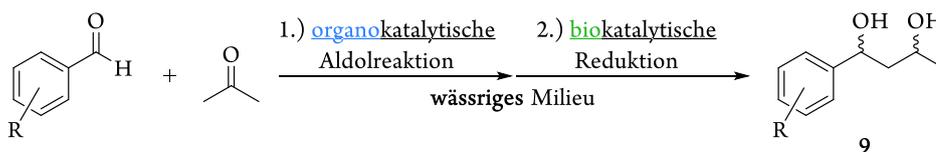
Abbildung 2.2. (Forts.) Weitere Beispiele für pharmakologische Wirkstoffe mit 1,3-Diolmotiv.

Im Kontext der Wirkstoffentwicklung ist aus synthetischer Sicht besonders wichtig, asymmetrische Synthesestrategien zur gezielten Darstellung eines einzigen Diastereomers auszuarbeiten. Als vielversprechende Vorgehensweise hat sich der sequentielle Aufbau beider Stereozentren erwiesen. Für Phenylderivat-substituierte 1,3-Butandiole wie **9** hat sich hierbei das von BAER *et al.* entwickelte, chemoenzymatische Verfahren etabliert (Schema 2.1).^[60]



Schema 2.1. Sequentieller Aufbau von 1,3-Diolen nach BAER *et al.*

In der Forschungsgruppe GRÖGER konnte in späteren Arbeiten die Kombination einer organokatalytischen, asymmetrischen Aldolreaktion mit einer nachfolgenden, enzymatischen Reduktion ohne Isolierung des Aldolintermediates durch den Einsatz kompatibler, wässriger Lösungsmittelsysteme in beiden Einzelschritten realisiert werden (Schema 2.2).^[61]



Schema 2.2. Sequentieller Aufbau von 1,3-Diolen ohne Isolierung der Zwischenstufe.

Das Ziel des ersten Schwerpunktes dieser Doktorarbeit ist nun die (Weiter-)Entwicklung einer nachhaltigen 1,3-Diolsynthesesequenz auf Basis der beschriebenen Vorarbeiten. Zu diesem Zweck sollen beide Katalysatorsysteme der chemoenzymatischen, modularen Synthese als Immobilisate zur Anwendung kommen, um die Basis für ein zukünftiges Prozessdesign nach Abbildung 2.3 zu legen.

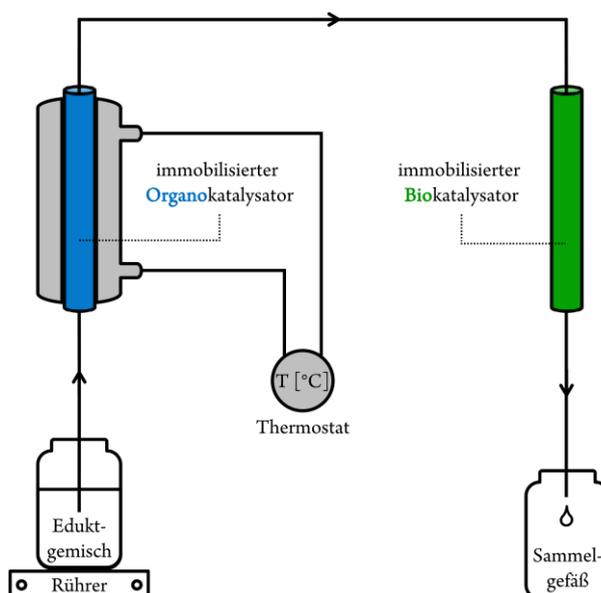
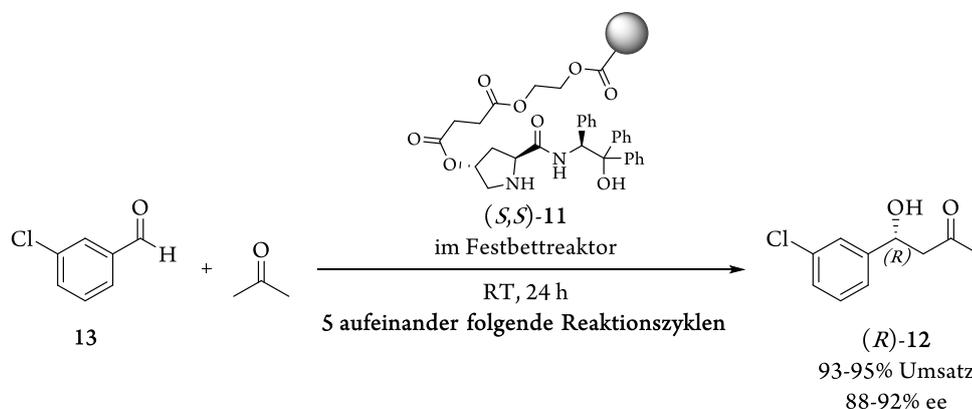


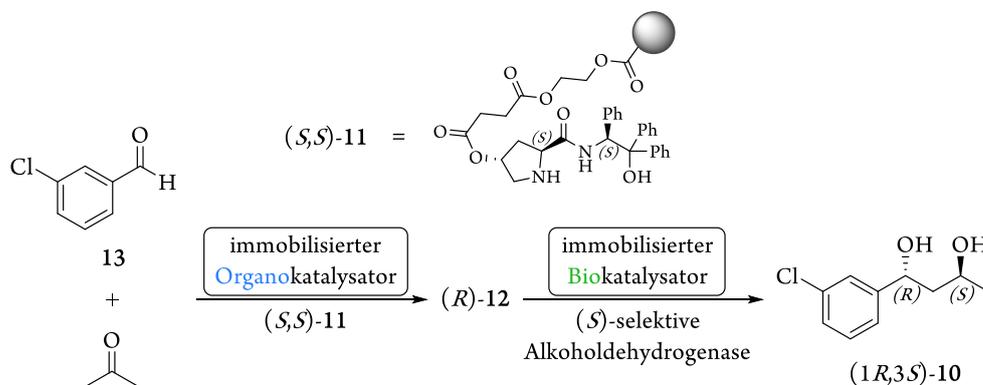
Abbildung 2.3. Schematischer Aufbau eines kontinuierlichen Durchflussreaktor-Konzeptes zur chemoenzymatischen Darstellung von 1,3-Diolen.

Als Modellsystem wird im Rahmen dieser Arbeit die gut untersuchte Darstellung von 1-(3-Chlorphenyl)butan-(1*R*,3*S*)-diol ((1*R*,3*S*)-**10**) gewählt.^[60-65] KRISTENSEN *et al.* gelang im Arbeitskreis HANSEN bereits die Heterogenisierung des verwendeten Organokatalysators an einem Polystyrolträger.^[66-68] RULLI *et al.* konnten anschließend zeigen, dass sich das resultierende Prolinamid-Immobilisat (*S,S*)-**11** im Festbettreaktor verlustfrei über mehrere Cyclen zur Darstellung des Aldolintermediates (*R*)-4-(3-Chlorphenyl)-4-hydroxybutan-2-on ((*R*)-**12**) aus 3-Chlorbenzaldehyd (**13**) und Aceton wiederverwendet werden (Schema 2.3).^[69]



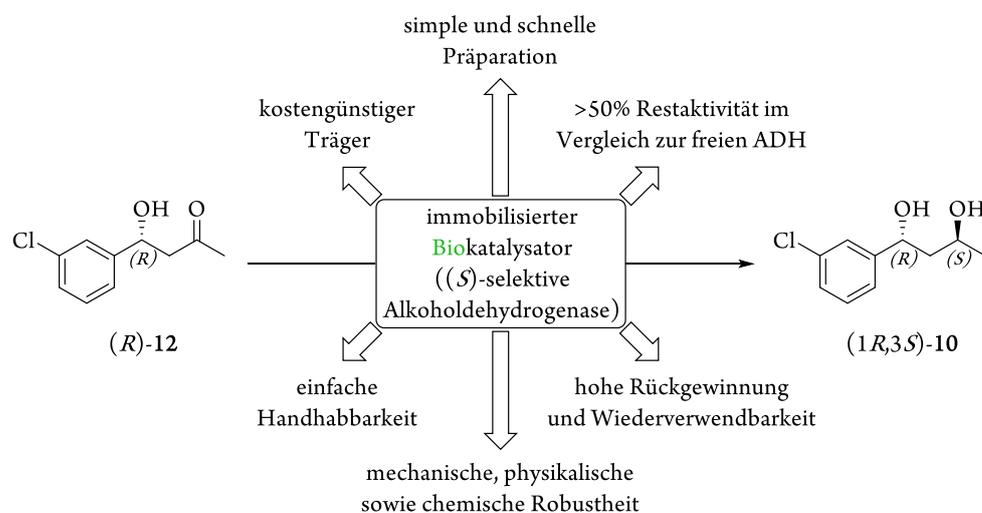
Schema 2.3. Darstellung des Aldolproduktes (*R*)-**12** mit dem von KRISTENSEN und HANSEN entwickelten Organokatalysator (*S,S*)-**11** nach RULLI.^[69]

Die Herausforderung besteht nun 1.) in der effizienten Immobilisierung einer Alkoholdehydrogenase entsprechender Selektivität und 2.) der Implementierung beider Einzelschritte in einer kombinierten Synthesesequenz (Schema 2.4).



Schema 2.4. Sequentieller Aufbau von $(1R,3S)\text{-}10$ unter Verwendung immobilisierter Katalysatoren. Oben: Struktur des von KRISTENSEN *et al.* entwickelten Prolinamidimmobilisates $(S,S)\text{-}11$.

Ein besonderes Augenmerk liegt zunächst auf der Heterogenisierung des Biokatalysators (zweiter Schritt der Synthesesequenz aus Schema 2.4). Um den Anforderungen eines nachhaltigen Prozessdesigns sowie der ökonomischen Attraktivität der Syntheseroute gerecht zu werden sollte 3.) das für die Immobilisierung verwendete Trägermaterial gut zugänglich sein. Idealerweise muss der Träger nicht synthetisiert werden und ist kostengünstig kommerziell erhältlich. Das Immobilisat sollte sich 4.) möglichst simpel und 5.) mit geringem Zeitaufwand präparieren lassen. Hierbei sollte 6.) die Immobilisierungseffizienz im Bezug auf die Restaktivität des Enzyms im Vergleich zur freien Alkoholdehydrogenase bei mindestens 50% liegen Darüber hinaus sollte die heterogenisierte ADH, sowohl im Kontext der praktischen Synthesearbeiten als auch der Rückgewinnung und Wiederverwendung, 7.) eine einfache Handhabbarkeit sowie 8.) eine hohe physikalische, mechanische und chemische Robustheit besitzen.



Schema 2.5. Anforderungen an das Biokatalysatorimmobilisat bei der Synthese von $(1R,3S)\text{-}10$ aus $(R)\text{-}12$.

Eine Übersicht der Anforderungen an das Biokatalysatorimmobilisat ist in Schema 2.5 gezeigt. Nach der erfolgreichen Darstellung eines ADH-Immobilisates, welches alle genannten Kriterien erfüllt, soll die Optimierung des isolierten Biotransformationsschrittes sowohl im Hinblick auf eine möglichst hohe Katalyseeffizienz (erreichbarer Umsatz bzw. Enantiomerenüberschuss und Diastereomerenverhältnis des Diols ($1R,3S$)-**10**) als auch der Recyclierbarkeit des verwendeten Immobilisates folgen.

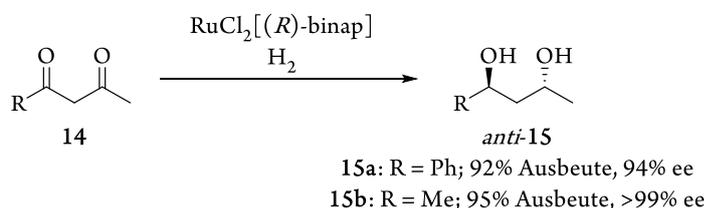
Sobald das heterogene Biokatalysatorsystem für die enzymatische Synthese von ($1R,3S$)-**10** aus (R)-**12** etabliert werden konnte, soll die Kombination mit der von RULLI *et al.* beschriebenen, organokatalytischen Aldolreaktion unter Verwendung des immobilisierten Prolinamids (S,S)-**11** gemäß Schema 2.4 erfolgen. Um die Basis für ein zukünftiges Prozessdesign nach Abbildung 2.3 zu schaffen müssen hierfür kompatible Reaktionsbedingungen – insbesondere im Bezug auf das verwendete Solvenssystem – gefunden werden, da die Darstellung von ($1R,3S$)-**10** ohne die Aufarbeitung oder Isolierung des Hydroxyketons **12** gelingen soll.

2.2 Stand der Wissenschaft

2.2.1 Synthesestrategien zur Darstellung von 1,3-Diolen

Wie in Kapitel 2.1 gezeigt stellen 1,3-Diolteilstrukturen wichtige Motive in pharmazeutischen Wirkstoffen dar. Im Folgenden werden ausgewählte Beispiele diskutiert, mit welchen Methoden diese Verbindungsklasse synthetisch zugänglich ist.*

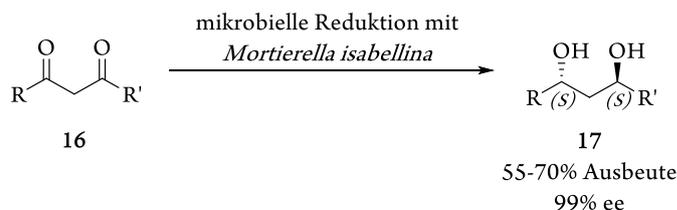
Zur direkten Erzeugung beider Stereozentren von 1,3-Diolen in einem Schritt hat sich nach wegweisenden Arbeiten von NOYORI^[71] die nach ihm benannte, durch Biaryl-bisphosphino-Ruthenium homogen katalysierte, asymmetrische Hydrierung etabliert.^[72] Obwohl das Verfahren hocheffektiv verläuft, sind auf diesem Wege in der Regel ausschließlich *anti*-Diole wie **15** zugänglich (Schema 2.6).



Schema 2.6. *Anti*-selektive Hydrierung nach NOYORI.

Analoge Ruthenium-katalysierte Versuche zur Synthese von *syn*-Diolen lassen sich nur in Einzelfällen realisieren und bedürfen neben geänderten Chelatliganden am Zentralmetall harsche Bedingungen (60°C, 100-130 bar H₂, bis zu 235 Stunden Reaktionsdauer).^[70] So lässt sich beispielsweise 3,5-Dioxo-methylhexanoat zwar zum *syn*-Diol umsetzen, der Enantiomerenüberschuss liegt mit <5% jedoch weit unter den Spezifikationen für pharmakologische Wirkstoffe.^[73]

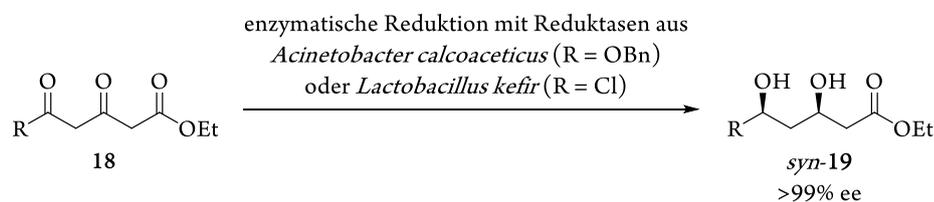
Einen alternativen Zugang zu 1,3-Diolen bei mildereren Reaktionsbedingungen stellt die biokatalytische Reduktion von 1,3-Diketonen dar. Obwohl hierbei in den meisten Fällen β -Hydroxyketone erhalten werden,^[74,75] konnte die mikrobielle Doppelzentrenreduktion in ausgedehnten Screeningstudien von FAUVE und VESCHAMBRE für die Alkyldione **16a-d** gezeigt werden. Allerdings wurden auch hier, wie bei der NOYORI-Hydrierung, ausschließlich die *anti*-Produkte **17a-d** erhalten (Schema 2.7).^[76]



Schema 2.7. Mikrobielle Reduktion verschiedener 1,3-Diketone (**16a/17a**: R = Me, R' = Me; **16b/17b**: R = Me, R' = Et; **16c/17c**: R = Et, R' = Et; **16d/17d**: R = Et, R' = *n*-Pr).

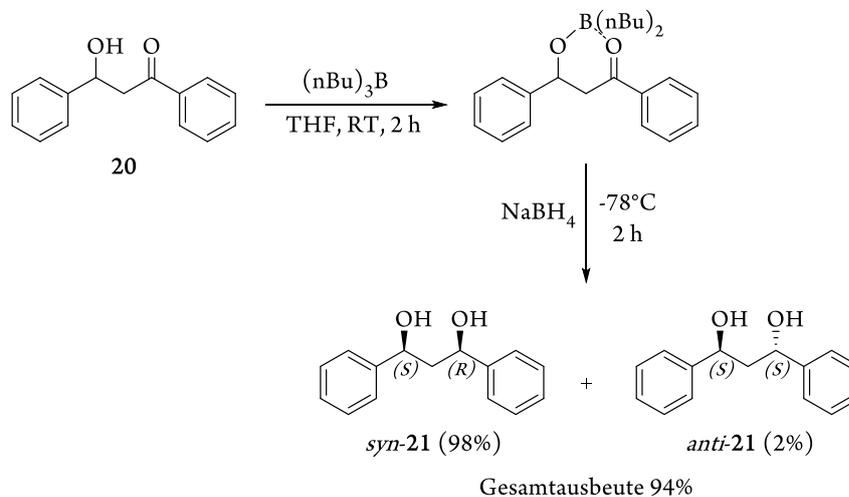
* Eine umfangreichere Zusammenfassung bietet der Übersichtsartikel von BODE *et al.*^[70]

PATEL *et al.* und MÜLLER *et al.* konnten jedoch zeigen, dass die Darstellung von *syn*-Diolen auf biokatalytischem Wege gelingt, sobald das 1,3-Dionmotiv als Teilstruktur von Ketoestern auftritt (Schema 2.8).^[77,78] Die Produkte werden hierbei zwar hochselektiv gebildet, die Synthesestrategie lässt sich jedoch nicht generalisieren. So merkten auch BODE *et al.* an, dass 1,3-Diolsynthesen *de facto* anfällig für kleinste Änderungen in der Eduktgeometrie oder den Reaktionsbedingungen sind.^[70]



Schema 2.8. Enzymatische Reduktion von 1,3-Diketoestern.

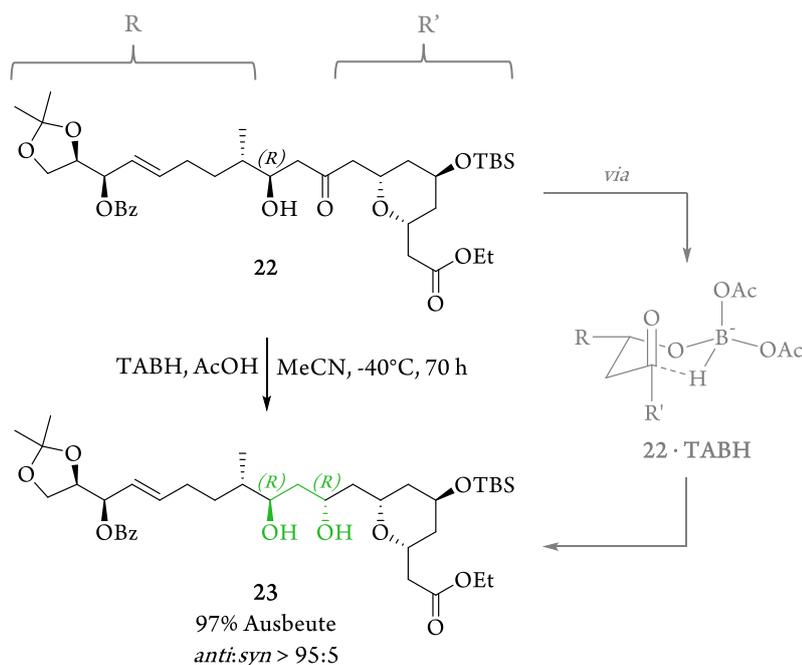
Um dennoch auf Zielmoleküle maßgeschneiderte Syntheselösungen zur Darstellung von 1,3-Diolteilstrukturen definierter Konfiguration zu finden bedarf es somit Methoden, die sich möglichst variabel einsetzen lassen. Vorteilhaft sind hier modulare Prozesse, mit denen sich durch die Wahl geeigneter Agenzien aus einer Ausgangsverbindung verschiedene Produkte herstellen lassen. Im Kontext der 1,3-Diolsynthese kann dies chemisch durch die stereoselektive Reduktion prochiraler β -Hydroxyketone erreicht werden, die je nach Reaktionsbedingungen und Katalysatoren, Reagenzien oder Mediatoren zu *syn*- oder *anti*-Diolen führen kann.^[70]



Schema 2.9. *Syn*-selektive Reduktion von β -Hydroxy-1,3-diphenylpropanon (**20**).

Besitzt das Reduktionsmittel beispielsweise die Fähigkeit, an der Hydroxylfunktion zu binden und einen intramolekularen Hydridtransfer zu initiieren, wird vorzugsweise das *anti*-Produkt gebildet. Wird dem Hydroxyketon allerdings ein Additiv zur Vororientierung des Substrates zugegeben, führt eine nachfolgende, intermolekulare Hydridaddition zum *syn*-Diol. Letztere wird zumeist nach der weit verbreiteten Methode von NARASAKA und PAI unter Verwendung stöchiometrischer Mengen chelatisierender Borane und Reduktionsmittel durchgeführt (Schema 2.9).^[79,80]

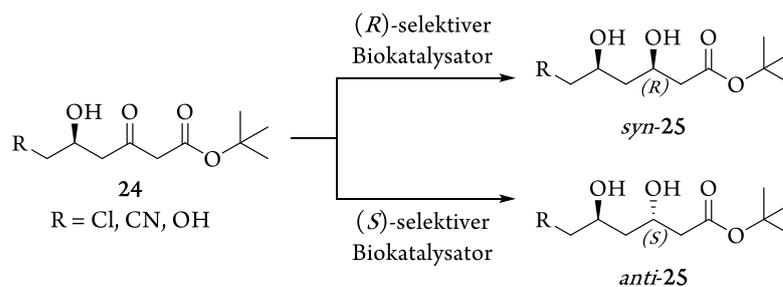
Anti-Diole sind aus β -Hydroxyketonen in guten Ausbeuten und hohen Diastereoselektivitäten unter anderem über die Umsetzung mit Samariumiodid in einem Gemisch aus Wasser, THF und Triethylamin,^[81] der stereoselektiven Tishchenko-Reaktion^[82] oder der Reduktion mit Tetramethylammoniumtriacetoxyborhydrid (TABH) zugänglich.^[83,84] Letzterer Ansatz führt über einen säurekatalysierten Ligandenaustausch eines Acetatrestes von TABH durch das Substrat zur Ausbildung eines entsprechenden Alkoxydiacetoxyborhydridintermediates (beispielhaft als **22**·TABH für die Synthese des Leucascandrolid A-Baustein **23** in Schema 2.10 gezeigt). Der anschließende intramolekulare Hydridübertrag führt zum *anti*-Produkt.^[85]



Schema 2.10. *Anti*-selektive Reduktion zum Leucascandrolid A-Baustein **23**.

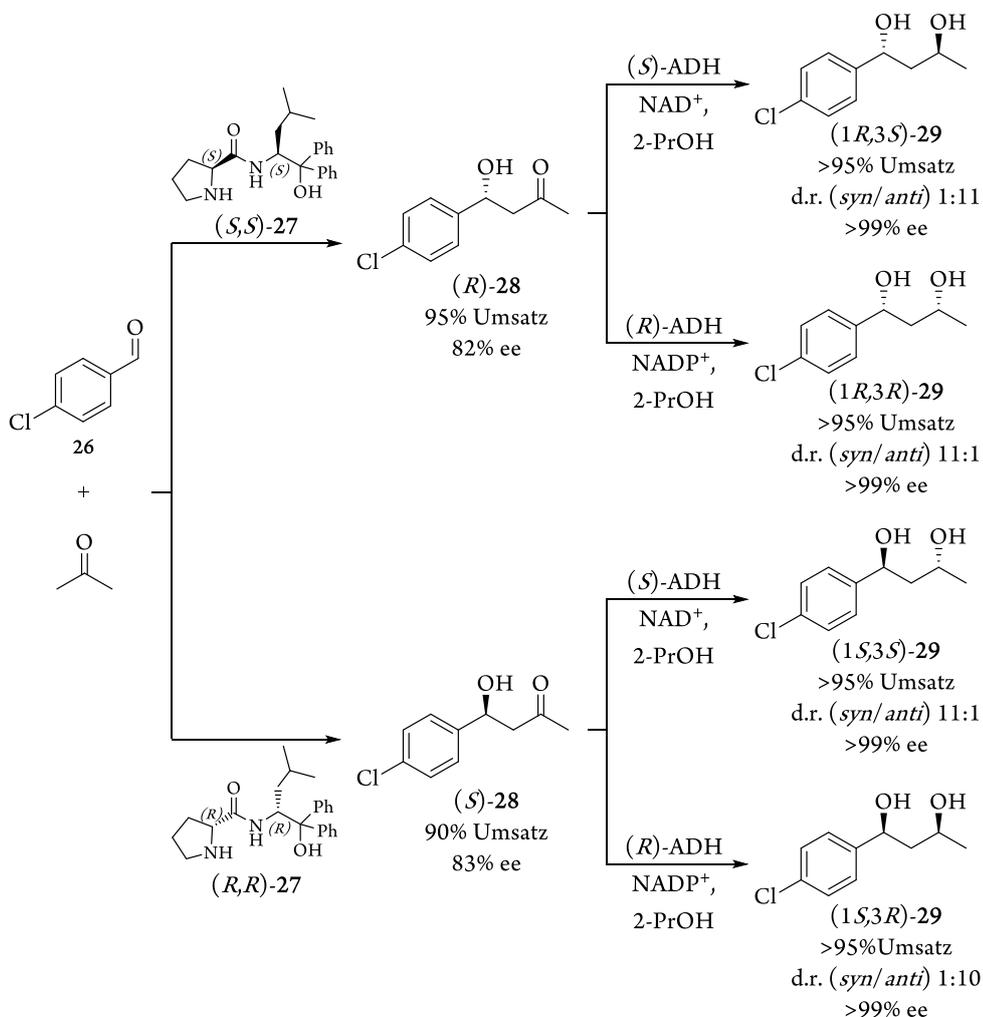
Bemerkenswert ist, dass in dem in Schema 2.10 gezeigten Beispiel ausschließlich die Reduktion mit TABH zielführend ist und sich das β -Hydroxyketon **22** sowohl bei der Umsetzung mit Samariumiodid als auch unter Tishchenko-Bedingungen als inert erweist, obwohl für alle Methoden Umsetzungen einer Vielzahl von Substraten gezeigt werden konnten.^[70]

Neben den hier vorgestellten, klassisch-chemischen Prozessen, denen allen gemein ist, dass stöchiometrische Mengen an Reduktionsmitteln und/oder chelatisierenden Reagenzien eingesetzt werden müssen, konnten auch Biotransformationen von β -Hydroxyketonen realisiert werden. Als vorteilhaft erweist sich hierbei, dass die enzymatische Reduktion eines gegebenen Substrates sowohl katalytisch verläuft, als auch durch die Wahl des Biokatalysators gezielt zum *syn*- oder *anti*-Produkt führt, ohne dass größere Änderungen an den Reaktionsbedingungen vorgenommen werden müssen (Schema 2.11).^[86-88]



Schema 2.11. Diastereoselektive Biotransformation von verschiedenen 1,3-Diketoestern in ihre *syn*- und *anti*-Diolen.

Werden die β -Hydroxyketone hierbei enantiomerenrein eingesetzt, lassen sich gezielt alle vier möglichen Diastereomere der 1,3-Diole **25** erzeugen. Als beeindruckendes Beispiel sei hier das von BAER *et al.* beschriebene, modulare System zur hochselektiven Synthese der 1,3-Diole **29** auf Basis einer chemoenzymatischen Reaktionsführung genannt (Schema 2.12).^[60]

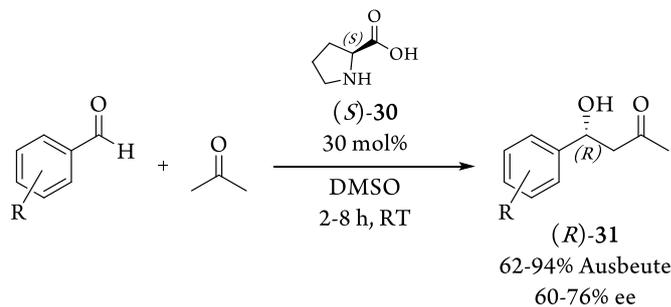


Schema 2.12. Chemoenzymatische, diastereoselektive Darstellung von *syn*- und *anti*-Diolen nach BAER *et al.*

In sequentieller Weise wird das erste Stereozentrum zunächst per asymmetrischer Aldolreaktion generiert und in einer nachfolgenden, diastereoselektiven Biotransformation das Diol erzeugt. Je nach eingesetztem Organokatalysator und Enzym gelingt so die gezielte Darstellung nur eines definierten 1,3-Diols. RULLI *et al.* konnten später zeigen, dass sich das Synthesekonzept auch auf ein geändertes Substitutionsmuster am aromatischen Ring übertragen und der Gesamtprozess weiter optimieren lässt. In der im wässrigen Medium durchgeführten Eintopf-Synthese werden Diastereomenverhältnisse von > 25:1 bei Enantiomerenüberschüssen von >99% erreicht.^[61]

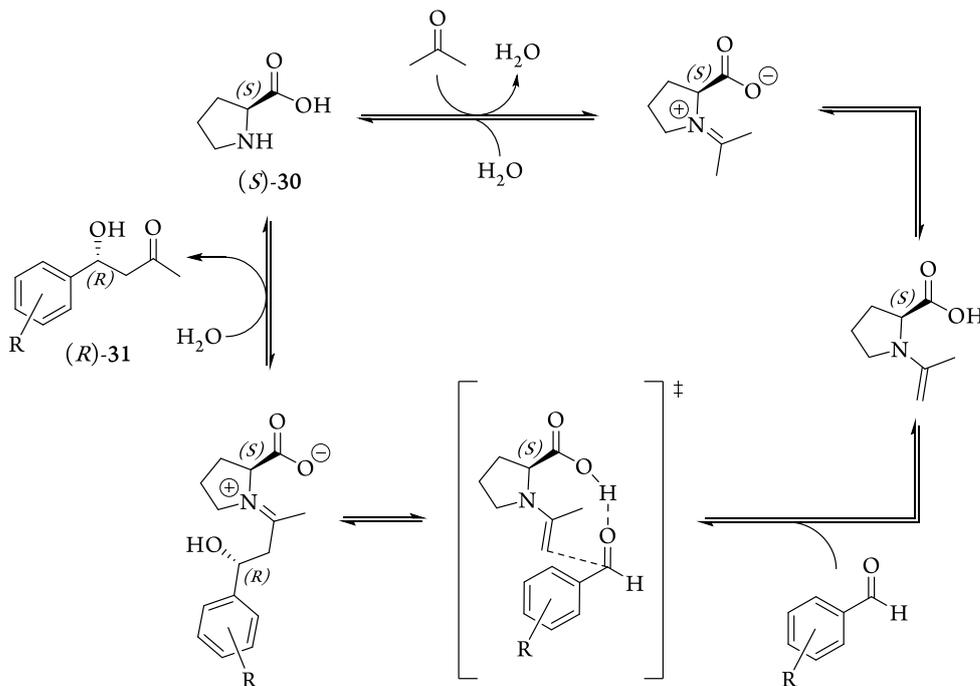
2.2.2 Prolin und seine Derivate als Katalysatoren der asymmetrischen Aldolreaktion (AAR)

Seit der Pionierarbeit von LIST und BARBAS^[89] im Jahr 2000 hat sich die durch kleine, organische Moleküle katalysierte intermolekulare, asymmetrische Aldolreaktion (AAR)^[90-93] zwischen Aldehyden und Ketonen als vielseitig anwendbare C-C-Knüpfungsreaktionen etabliert.^[94-98] Zu den am häufigsten genutzten Strukturmotiven der hierbei verwendeten Katalysatoren gehört das Prolingerüst, wobei frühe Versuche noch auf der Verwendung der unfunktionalisierten Aminosäure **30** in hoch siedenden bzw. toxischen Lösungsmitteln wie DMSO und DMF sowie Katalysatorbeladungen von bis zu 30 mol% basierten (Schema 2.13).^[89,90]



Schema 2.13. Prolin-katalysierte, asymmetrische Aldolreaktion von Aceton mit substituierten Benzaldehyden (**31a**: R = H; **31b**: R = *p*-Br, **31c**: R = *p*-NO₂, **31d**: R = *o*-Cl).

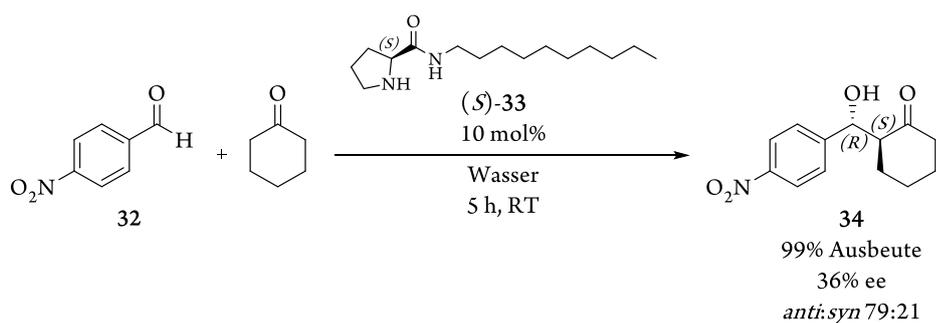
Formal ähnelt die *in situ* Ausbildung eines Enaminintermediates dabei dem Katalysmechanismus von Klasse 1 Aldolasen (Schema 2.14).^[99-106]



Schema 2.14. Katalysmechanismus der Prolin-katalysierten Aldolreaktion zwischen Aceton und Benzaldehyden.^[107,108]

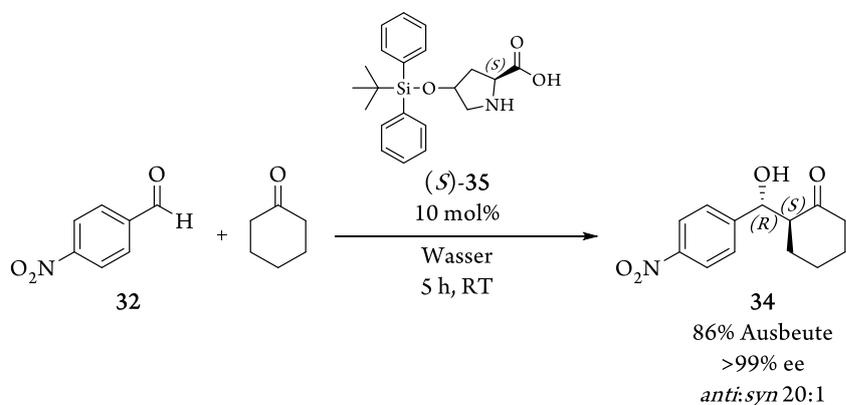
Dennoch zeigten frühe organokatalytische Systeme im Gegensatz zu ihrem enzymatischen Analogon verminderte Umsätze und einen teilweisen oder vollständigen Verlust der Enantioselektivität in wasserreichen Reaktionsmilieus.^[92,93,109-112]

In vielen Fällen konnten jedoch Umsatzsteigerungen bzw. verbesserte Selektivitäten der Prolin(derivat)-katalysierten AAR erreicht werden, wenn den jeweiligen organischen Solventien in kleinen Mengen Wasser als Additiv zugesetzt wurde.^[113-119] Die ersten Prolin-basierten Organokatalysatoren, die in Wasser als Lösungsmittel verwendet werden konnten, wurden 2006 unabhängig voneinander von BARBAS^[120] und HAYASHI^[121,122] vorgestellt.



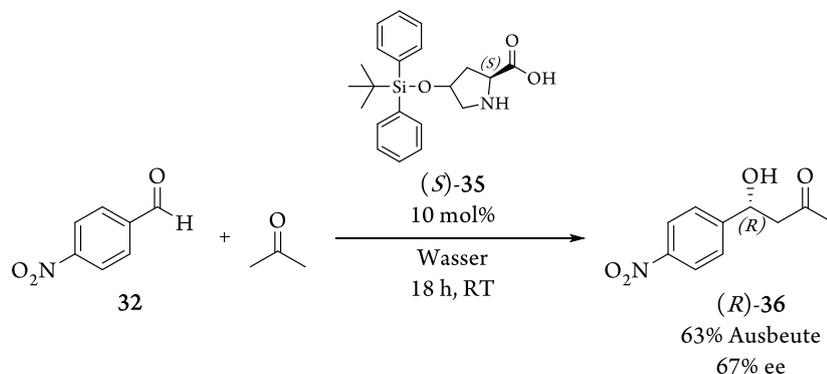
Schema 2.15. Decyl-Prolinamid-katalysierte AAR zwischen Cyclohexanon und *p*-Nitrobenzaldehyd (**32**) in Wasser.

Während BARBAS mit verschiedenen alkylsubstituierten Prolinamiden zwar die Katalysatorbeladung auf 10 mol% senken konnte, wurden hohe Katalysatoraktivitäten in Wasser nur für mit dem Lösemittel nicht mischbare Edukte wie Cyclohexanon und *p*-Nitrobenzaldehyd (**32**) erhalten (Schema 2.15).^[120] Ohne den Zusatz weiterer Cokatalysatoren wie chiralen Sulfonsäuren oder Carbonyl-aktivierenden Lewisäureadditiven wurden hingegen nur mäßige Selektivitäten erreicht. Bei gleichen Reaktionsbedingungen, Katalysatormengen und Edukten wird mit dem von HAYASHI entwickelten Hydroxyprolinerivat (*S*)-**35** zwar ein minimal niedrigerer Umsatz detektiert, das Aldolprodukt kann allerdings praktisch enantiomerenrein (>99% ee) erhalten werden (Schema 2.16).^[122]



Schema 2.16. TBDPS-Prolylether-katalysierte AAR zwischen Cyclohexanon und *p*-Nitrobenzaldehyd (**32**) in Wasser.

Weiterhin ermöglicht der HAYASHI-Katalysator (*S*)-**35** die Umsetzung einer wasser-mischbaren Akzeptorkomponente wie Aceton. Anzumerken ist jedoch, dass die Effizienz der Aldolreaktion im Vergleich zur Verwendung hydrophober Edukte sinkt. Trotz verlängerter Reaktionszeiten werden geringere Umsätze und Selektivitäten erzielt (Schema 2.17).



Schema 2.17. TBDPS-Prolylether-katalysierte AAR von Aceton mit *p*-Nitrobenzaldehyd (**32**) in Wasser.

In der Folgezeit wurde in vielen Forschungsgruppen ein enormer Aufwand betrieben, Prolin-basierte Organokatalysatoren zu entwickeln, die sich in rein wässrigen Medien wie „Mikroaldolasen“^[89,108] verhalten. Den Vertretern dieser Katalysatorklasse sind folgende Strukturmerkmale gemein: Sie besitzen 1.) einen Pyrrolidinring, 2.) keine freien Carbonsäuregruppen, 3.) sterisch anspruchsvolle Substituenten am Katalysatorrückgrat, sowie 4.) funktionelle Gruppen, die als Wasserstoffbrückendonoren fungieren können (Abbildung 2.4).^[123-126]

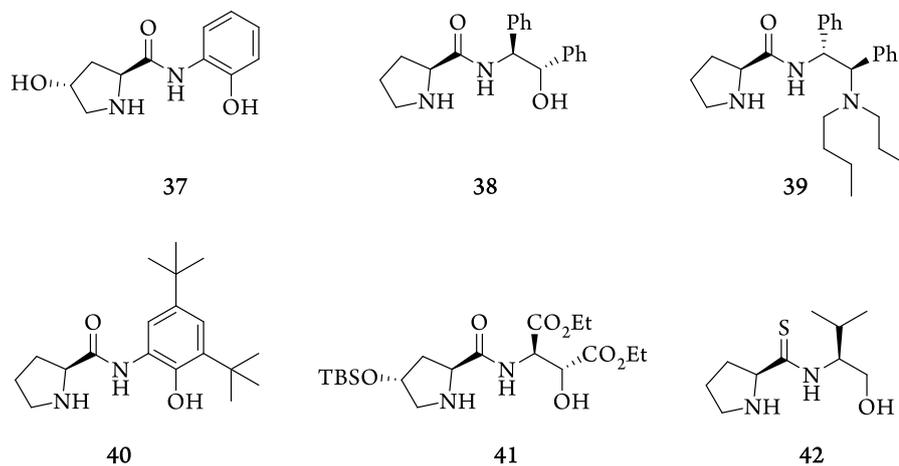
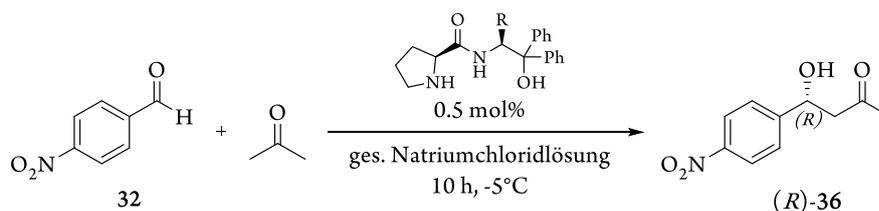


Abbildung 2.4. Einige Beispiele für Prolin-basierte Organokatalysatoren, die in wässrigen Medien eingesetzt werden können.

Obwohl heute anerkannt ist, dass die effizientesten Organokatalysatoren für asymmetrische Aldolreaktionen im wässrigen Medium auf Prolinbasis solche sind, die eine Amideinheit sowie Wasserstoffdonoren besitzen, lassen sich dennoch nicht alle Verbindungen dieser Klasse für wassermischbare Edukte einsetzen.^[127]

Bemerkenswerte Ausnahmen stellen die von SINGH entwickelten Katalysator (*S,S*)-**27** und (*S,S*)-**43** dar (Schema 2.18).^[128,129]

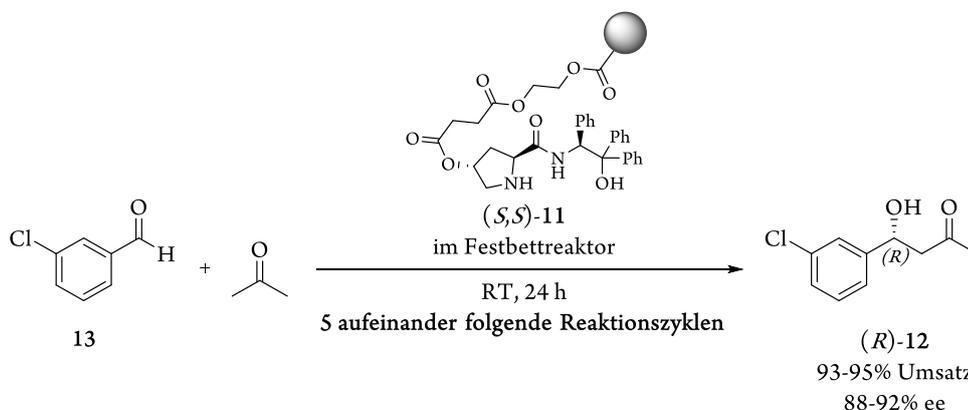


mit (*S,S*)-**27** (R = *i*-Bu): 78% Ausbeute, 86% ee
 mit (*S,S*)-**43** (R = Ph): 80% Ausbeute, 85% ee

Schema 2.18. Prolinamid-katalysierte AAR zwischen Aceton und *p*-Nitrobenzaldehyd (**32**) nach SINGH.

Zwar liegt der erreichte Enantiomerenüberschuss für das Aldolprodukt (*R*)-**36** in dem von BARBAS etablierten Referenzsystem aus Aceton und *p*-Nitrobenzaldehyd (**32**) nur bei 86%, bei geänderten Substitutionsmustern am Donoraldehyd werden jedoch in vielen Fällen Produkte mit optischen Reinheiten von >99% erhalten. Hierbei findet die AAR vollständig im wässrigen Medium statt und genügt so den Kriterien einer nachhaltigen Prozessführung, etwa im Hinblick auf die Vermeidung von ökologisch bedenklichen Lösungsmitteln.^[130,131] Der Zusatz von Additiven oder Cokatalysatoren ist nicht notwendig. Des Weiteren gelingt die Umsetzung im Gegensatz zu L-Prolin oder seinem Derivat (*S*)-**35** statt mit 30, respektive 10 mol% bereits mit 0.5 mol% (*S,S*)-**27** bzw. (*S,S*)-**43**.

KRISTENSEN *et al.* gelang 2009 im Arbeitskreis HANSEN die Heterogenisierung des letztgenannten Prolinamidkatalysators (*S,S*)-**43** durch Copolymerisation mit Styrol und Divinylbenzol.^[66-68] In einer Kooperationsarbeit mit RULLI konnte nachfolgend das Recyclingpotential des Organokatalysatorimmobilisates gezeigt werden. So ließen sich für die AAR zwischen Aceton und 3-Chlorbenzaldehyd (**13**) im Festbettreaktor in mehreren nacheinander durchgeführten Reaktionszyklen für (*R*)-**12** stets Umsätze von über 93% bei 90±2% ee erreicht werden (Schema 2.19).^[69]



Schema 2.19. Die Heterogenisierung des Prolinamidkatalysators ermöglicht eine Mehrzyklenreaktionsführung.

2.2.3 Enzymatische Ketonreduktion mit Alkoholdehydrogenasen

Obwohl die Natur einen immens großen Fundus zur katalytischen Umsetzung verschiedenster Substrate bietet, wurde die Verwendung von Biokatalysatoren auf industrieller Ebene im Vergleich zu etablierten, chemischen Methoden lange Zeit als nicht kompetitiv angesehen.^[132,133] Hauptursächlich hierfür waren, trotz milder Reaktionsbedingungen und teilweise beachtlicher Selektivitäten, zumeist schlechte Produktivitäten, zu hohe Katalysator- und Prozesskosten sowie die problematische Abtrennung der Biomasse vom Produkt.^[132] Historisch gesehen liegen viele dieser Probleme in der Verwendung von Wildtyporganismen als Biokatalysatoren begründet. Die eingesetzten Stämme, oft Hefen, wuchsen nur langsam, zeigten selten Toleranzen gegen hohe Substrat- oder Produktkonzentrationen und führten wegen der Anwesenheit verschiedenster, nicht erwünschter Enzyme zu Neben- oder Folgereaktionen.^[133] Nachdem Anfang der 1980er Jahre rekombinante DNA-Techniken etabliert, mit Hilfe von Genomsequenzierungen einzelne Enzyme identifiziert und diese aus entsprechenden Expressionssystemen überexprimiert werden konnten, setzte sich in der Synthese chiraler Verbindungen in den letzten Jahrzehnten zunehmend der Einsatz isolierter Enzyme durch. Diese besaßen, im Vergleich zur Verwendung von Wildtyp-Ganzzellbiokatalysatoren wie Hefen, einen signifikant erhöhten Proteinanteil der Biomasse und waren mit den modernen Methoden zudem leicht zugänglich.

Zu den mittlerweile in großen Mengen kommerziell verfügbaren, isolierten Enzymen gehören Ketoreduktasen (KREDs, Enzymklasse EC 1.1.1.X),* welche die stereoselektive Reduktion prochiraler Carbonylverbindungen katalysieren (Schema 2.20).

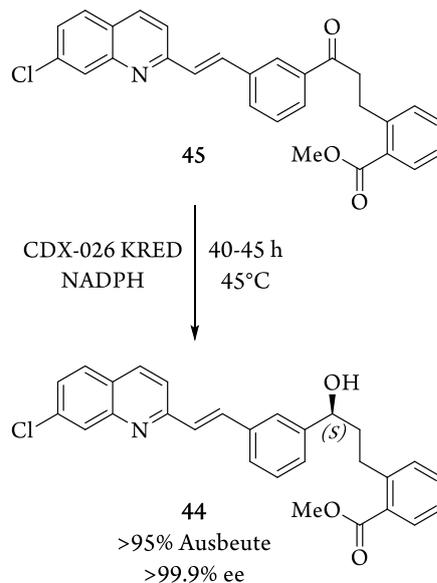


Schema 2.20. Allgemeines Schema zur enzymatischen Reduktion von Carbonylverbindungen mittels Ketoreduktasen.

Heute gehört die enzymatische Ketonreduktion zu den etablierten Synthesemethoden, welche auch industriellen Ansprüchen genügen.^[136-139] Diverse Synthesepharmakologisch aktiver Stoffe lassen sich bereits biokatalytisch darstellen. So ist beispielsweise die Synthese der Montelukast-Vorstufe **44** im 230 kg Maßstab und einer Substratkonzentration von 100 g/L möglich (Schema 2.21).^[140] Die verwendete Ketoreduktase CDX-026 ist kommerziell von Codexis erhältlich.^[135]

Die Reduktion erfolgt hierbei, wie bei allen Enzymen dieser Klasse, durch die Übertragung eines Hydrids aus dem natürlichen Coenzym NAD(P)H, welches in stöchiometrischen Mengen benötigt wird, auf das Substrat. Im Allgemeinen lässt sich diese Biotransformation in folgenden Schritten zusammenfassen: 1.) Die Ausbildung eines trimeren Komplexes aus Enzym, reduziertem Cofaktor und Substrat, 2.) den Hydridtransfer vom Coenzym auf die Carbonylverbindung und 3.) die Freisetzung des chiralen Reduktionsproduktes aus dem Enzym-(oxidierten)Cofaktor-Komplex.^[133]

* Syncozymes bietet über 150,^[134] Codexis beinahe 300 verschiedene KREDs an.^[135]



Schema 2.21. Biokatalytische Darstellung des Montelukast-Precursors **44**.

Der Hydridtransfer auf das sp^2 -hybridisierte Keton (Schritt 2) ist dabei stereochemisch auf vier Wegen (E1 - E4) möglich, die sich durch die Kombination 1.) eines *re*- oder *si*-Seitenangriffs sowie 2.) den Übertrag des pro-*R* (H_R) oder pro-*S* (H_S) Wasserstoffs vom Nicotinamidcofaktor ergeben (Abbildung 2.5).^[141,142]

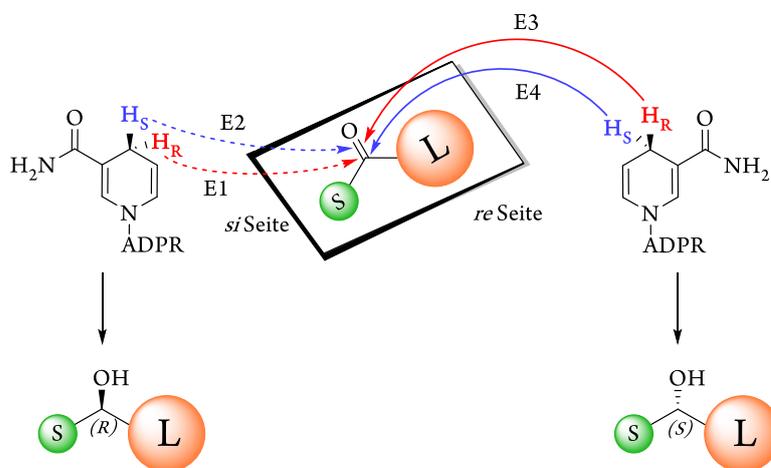


Abbildung 2.5. Stereochemisches Modell der Hydridübertragung von NAD(P)H auf ein Keton. L steht hierbei für einen großen, S für einen kleinen Rest. ADPR = Adenosindiphosphatribosyl.

Der stereochemische Ausgang einer enzymkatalysierten Ketonreduktion lässt sich hierbei mit Hilfe der PRELOG-Regel vorhersagen.^[143] Asymmetrische Reduktionen nach E1 oder E2 führen zum (*R*)-Produkt, E3 und E4 zum (*S*)-Alkohol. Ausschlaggebend für die (*S*)- oder (*R*)-Selektivität der jeweiligen Ketonreduktase ist jedoch in allen Fällen die relative Ausrichtung von Cofaktor und Carbonylverbindung zueinander. Dies wird in der aktiven Tasche des Enzyms durch die Präorientierung des Coenzym sowie die Fixierung des Substrates erreicht.

Letzteres ist durch die Koordination des Carbonylsauerstoffs an Metallionen wie Zink (z. B. bei ADHs des Menschen, aus Pferdeleber oder Bäckerhefe sowie AtCAD5 aus *Arabidopsis thaliana*)^[144-147] oder Eisen (wie beispielsweise bei der ADH-4 aus *Saccharomyces cerevisiae*, 4-Hydroxybutyratdehydrogenase aus *Clostridium kluyveri*, Methanoldehydrogenase aus *Bacillus methanolicus* oder der Alkoholdehydrogenase aus *Zymomonas mobilis*)^[148-150] bzw. die metallfreie ionische Anbindung des Substrates (etwa bei *Drosophila lebanoniensis* ADH oder HGDH aus *Acidaminococcus fermentans*)^[151,152] möglich (Abbildung 2.6).

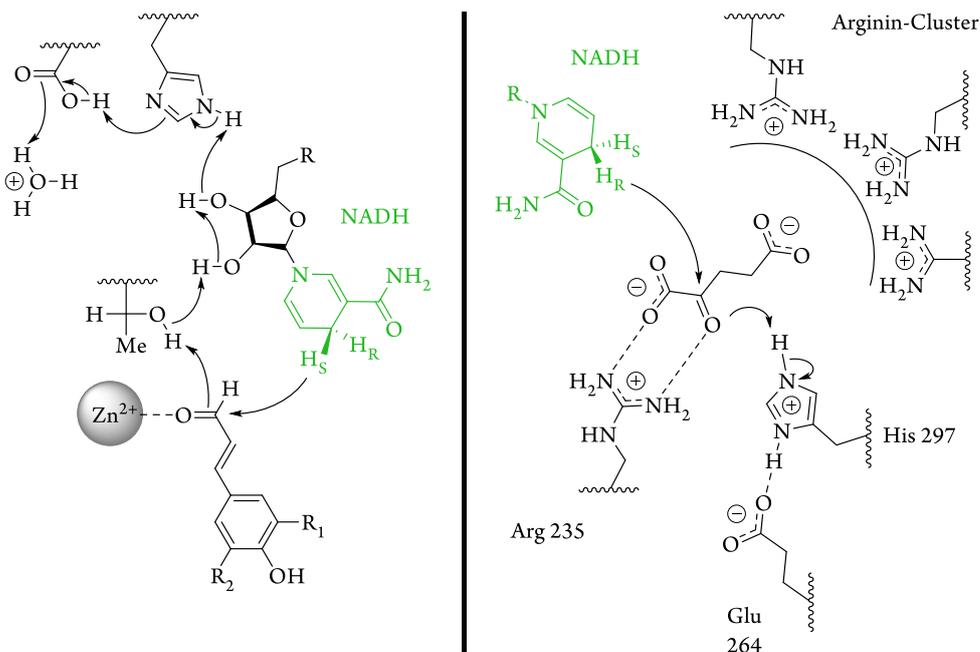
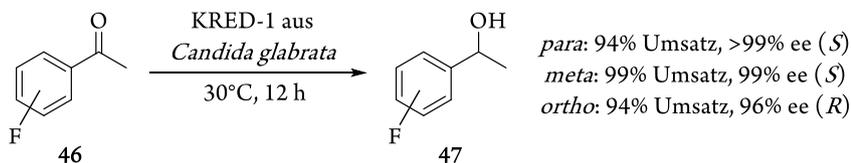


Abbildung 2.6. Mechanismen der enzymatischen Reduktion (links: Zimtalkoholdehydrogenase AtCAD5 aus *Arabidopsis thaliana*, rechts: Hydroxyglutaratdehydrogenase aus *Acidaminococcus fermentans*).

Ein beeindruckendes Beispiel dafür, wie kompliziert das Zusammenspiel aller Teilaspekte der enzymatischen Reduktion sein kann, beschrieben LIANG *et al.* 2013 für die isolierte Ketoreduktase 1 aus *Candida glabrata*.^[153] Sie konnten zeigen, dass sich das stereochemische Resultat der Biotransformation allein in Abhängigkeit des Derivatisierungsmusters am Substrat **46** vollständig umkehren lässt (Schema 2.22).



Schema 2.22. Enzymatische Reduktion Fluor-substituierter Acetophenone mit *Candida glabrata* KRED.

Erklärt werden kann dies durch zusätzliche, spezifische Wechselwirkungen bestimmter Aminosäurereste (im vorliegenden Beispiel werden Wasserstoffbrücken mit Tyr175 und Ser134 postuliert) in der aktiven Tasche des Enzyms, die die Substratbindung und -orientierung zusätzlich zu der Fixierung am Carbonylsauerstoff beeinflussen können.

Eine Einteilung der Vertreter der Enzymklasse EC 1.1.1.X kann im Allgemeinen dennoch auf Basis des Hydridtransfers nach E1 – E4 erfolgen. Während die Übertragung nach dem E4-Modus bisher unbekannt ist, lassen sich beispielsweise die Dehydrogenasen aus *Pseudomonas* sp.^[154] oder *Lactobacillus kefir*^[155] der E1-, die Reduktasen aus *Geotrichum candidum*^[156] und *Mucor javanicus*^[157] der E2-, sowie die ADHs aus *Moraxella* sp.,^[158] *Thermoanaerobium brokii*,^[141] Pferdeleber^[159] oder Bäckerhefe^[143] der E3-Klasse zuordnen. Im Allgemeinen ist die Anzahl an Enzymen mit PRELOG-Stereospezifität wesentlich größer als die mit anti-PRELOG-Spezifität und die meisten KREDs übertragen in einem *re*-Seitenangriff den pro-*R*-Wasserstoff des Cofaktors auf das Substrat (E3-Mechanismus).^[141] Dennoch wurden in den letzten Jahrzehnten auch zahlreiche Reduktasen mit (*R*)-Selektivität identifiziert und in der asymmetrischen Synthese chiraler Verbindungen eingesetzt. Heute sind sowohl (*R*)- als auch (*S*)-Alkohole im Substratkonzentrationsbereich um 100 g/L auf biokatalytischem Wege gut zugänglich (Abbildung 2.7).^[132,160]

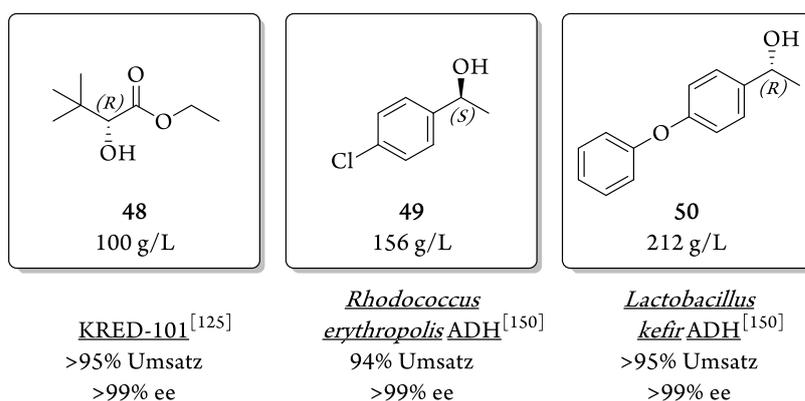
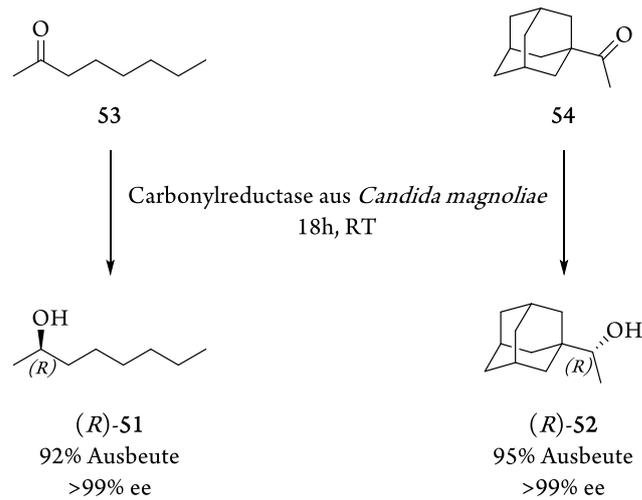


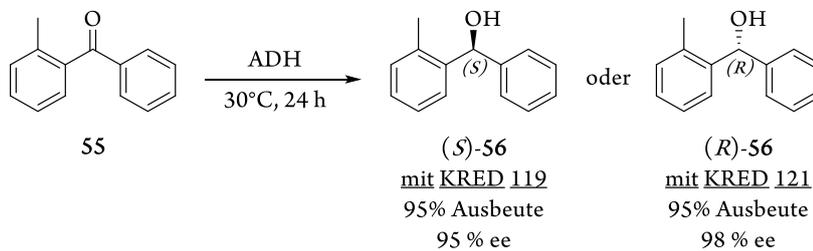
Abbildung 2.7. Beispiele für biokatalytische Reduktionsprodukte im Konzentrationsbereich um 100 g/L.

Speziell im Labormaßstab wurden große Erfolge bei der biokatalytischen Reduktion auch sterisch anspruchsvollerer Substrate erzielt. So kann mit der KRED aus *Candida magnoliae* neben der Synthese von (*R*)-2-Octanol ((*R*)-**51**) auch die Darstellung von (*R*)-1-Adamantylethanol ((*R*)-**52**) in nahezu optischer Reinheit realisiert werden (Schema 2.23).^[161]



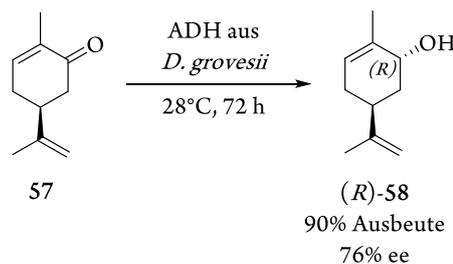
Schema 2.23. Biotransformation von 2-Octanon (**53**, links) bzw. Adamantylethanon (**54**, rechts) mittels der KRED aus *Candida magnoliae*.

Durch die kontinuierliche Weiterentwicklung rekombinanter Expressionsmethoden und die intensive Sequenzierungsarbeit ganzer Genkarteen unterschiedlicher Organismen ist die Anzahl isolierter Reduktasen in den letzten Jahrzehnten stark angestiegen. Die enorme Fülle verfügbarer Reduktasen liefert mittlerweile maßgeschneiderte Lösungen für die biokatalytische Synthese chiraler Alkohole abseits der in Abbildung 2.5 vereinfacht dargestellten Substratbeschaffenheit (ein großer und ein kleiner Rest).



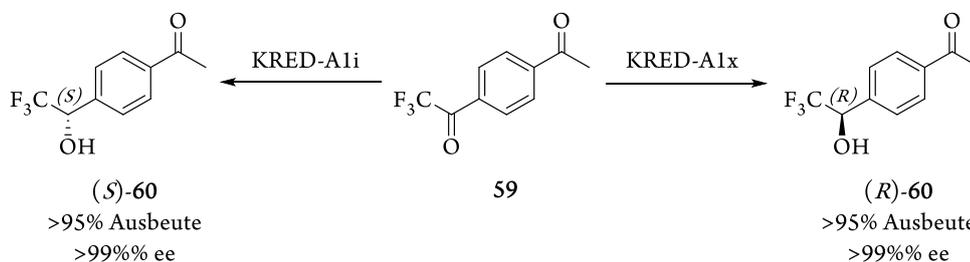
Schema 2.24. Asymmetrische Reduktion eines Biarylketons.

So können auch Carbonylverbindungen mit zwei großen Resten wie Biarylketone^[162] asymmetrisch zu den entsprechenden (*R*)- und (*S*)-Produkten **56** umgesetzt (Schema 2.24) bzw. Naturstoffe wie Carvon (**57**), die eine Enoneinheit besitzen, selektiv reduziert werden (Schema 2.25).^[163]



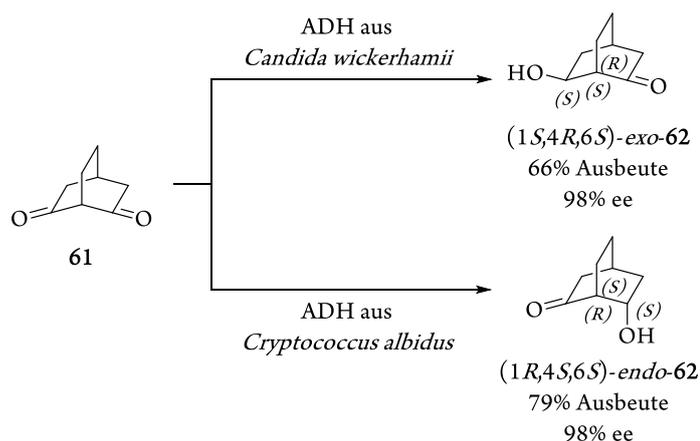
Schema 2.25. Asymmetrische Reduktion von Carvon (**57**).

Ebenso stehen heute auch Biokatalysatoren zur Verfügung, die nicht nur enantio-, sondern auch chemo- oder regioselektive Reduktionen katalysieren können. Beispielsweise lassen sich Diketone mit elektronisch unterscheidbaren Substituenten wie 1-(4-Acetylphenyl)-2,2,2-trifluoethanon (**59**) zum enantiomerenreinen Monoalkohol **60** umsetzen (Schema 2.26).^[164,165]



Schema 2.26. Beispiele für chemoselektive Biotransformationen mit Ketoreduktasen.

Noch bemerkenswerter ist die von BOTES *et al.* veröffentlichte, diastereoselektive Monoreduktion von Bicyclo[2.2.2]octan-2,6-dion (**61**), die gezielt zum *endo*- bzw. *exo*-Produkt **62** führt (Schema 2.26).^[166]



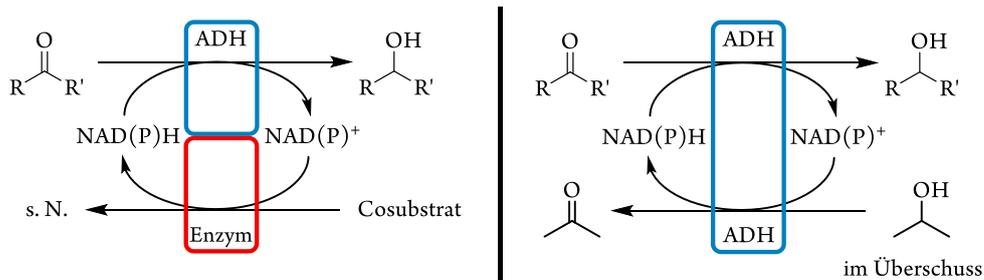
Schema 2.27. Beispiele für regioselektive Biotransformationen mit Ketoreduktasen.

Da bei der Anwendung biokatalytischer Verfahren keine Schutzgruppen eingeführt werden müssen und chemokatalytische Synthesen bei der Umsetzung anspruchsvoller Substrate wie **59** oder **61** zumeist Racemate liefern,^[166,167] sind Enzyme mehr als nur eine Ergänzung zu etablierten Methoden.

Um jedoch auch unter dem Gesichtspunkt der Prozessökonomie mit chemischen Verfahren konkurrieren zu können, bedarf es neben einem einfachen Zugang zum (Bio)Katalysator ein kostengünstiges Reduktionsmittel. Die Hydridquellen aller Reduktionen mittels Ketoreduktasen sind natürliche Coenzyme (NAD(P)H, siehe auch Abbildung 2.5 und Abbildung 2.6), deren Herstellung im Vergleich zu klassischen Hydridreagenzien wie NaBH_4 , LiAlH_4 oder Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H) wesentlich kostenintensiver ist.*

* Preis pro 100 g in Euro: NaBH_4 (55), LiAlH_4 (104), DIBAL-H (182). Preis pro 1 g in Euro: NADH (594), NADPH (1600).^[168]

Um die unökonomische Verwendung großer Mengen reduzierten Cofaktors zu vermeiden wurden Methoden entwickelt, den stöchiometrischen Einsatz dieses Reduktionsäquivalents zu umgehen.^[169-172] Die Regenerierung oxidierter Cofaktormoleküle kann durch Zuschalten einer zweiten Reaktion erreicht werden, bei der ein Cosubstrat verbraucht und das Coenzym wieder in seine reduzierte Form überführt wird. Im bienzymatischen Ansatz wird die biokatalytische Reduktion mit einer zweiten, enzymkatalysierten Umsetzung gekoppelt, die in entgegengesetzter Redoxrichtung unter Verbrauch von NAD(P)^+ NAD(P)H (re)generiert (Schema 2.28).



Schema 2.28. Enzym- (links) und substratgekoppelte (rechts) Cofaktorregenerierung. N. = stöchiometrisch auftretendes Nebenprodukt.

Verbreitete Regenerierungssysteme sind hierbei (Enzym/Cosubstrat) Glucosedehydrogenase/Glucose,^[173,174] Formiatdehydrogenase/Formiat,^[175-177] Phosphitdehydrogenase/Phosphit^[178,179] oder Hydrogenase/molekularer Wasserstoff.^[180,181] Allen Systemen ist gemein, dass ein weiteres Enzym benötigt wird. Dieses muss sowohl günstig verfügbar sein als auch eine hohe Aktivitäten bzw. Stabilität unter den Reaktionsbedingungen der enzymatischen Reduktion besitzen. Weiterhin müssen die stöchiometrischen Nebenprodukte zusätzlich vom Reaktionsprodukt abgetrennt werden. Als ökonomisch attraktive und effiziente Alternative hat sich die substratgekoppelte Cofaktorregenerierung etabliert (Schema 2.28, rechts). Hierbei katalysiert die für die Reduktion des Substrates verwendete KRED gleichzeitig die Oxidation eines niedermolekularen „Opferalkohols“ wie Isopropanol.^[155,182] Da beide Schritte generell reversible sind, wird die thermodynamische Gleichgewichtslage in der Regel durch die Zugabe eines Überschusses an Alkohol produktseitig verschoben.^[133] Durch den Einsatz von Reduktasen hoher Stabilität gegenüber organischen Solventien, wie der ADH aus *Rhodococcus* sp., die einen Lösungsmittelanteil von 50 Vol-% toleriert,^[183] konnten unter substratgekoppelter Cofaktorregenerierung bereits industriell relevante Prozesse wie die Produktion von 2-Butanol oder 4-Chlor-3-(*S*)-hydroxybuttersäureethylester mit weit unterstöchiometrischen Mengen an NAD(P)H realisiert werden.^[184,185]

2.2.4 Immobilisierung von Biokatalysatoren: Verfahren und Anwendungsbeispiele

Obwohl die Biokatalyse mittlerweile Einzug in die industrielle organische Synthese,^[186-193] insbesondere in den Bereichen der Produktion von pharmakologischen Wirkstoffen, Feinchemikalien oder Biotreibstoffen,^[194-198] gehalten hat, ist ihre breite Anwendung oft aufgrund fehlender Langzeitstabilität oder der schwierigen Rückgewinnung und Wiederverwendung der eingesetzten Enzyme eingeschränkt. Diese limitierenden Faktoren lassen sich jedoch erfolgreich mit Hilfe der Immobilisierung des Biokatalysators adressieren.^[199-202] Obwohl der erste biokatalytische Prozess unter Verwendung eines immobilisierten Enzyms, der im industriellen Maßstab durchgeführt wurde, bereits vor beinahe 50 Jahren produktionsreife erlangte,^[203] beinhalten nur circa 20% aller Biotransformationsprozesse Enzyme in immobilisierter Form.^[194,204] Geschuldet ist dies den für jeden Herstellungsprozess individuellen Anforderungen an den heterogenisierten Katalysator, wodurch Universallösungen ausgeschlossen sind.^[205] Infolgedessen wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Immobilisierungsmethoden entwickelt, von denen im Folgenden beispielhaft eine Auswahl solcher vorgestellt wird, die eines Träger(material)s bedürfen (Abbildung 2.8). Für trägerfreie Heterogenisierungen von Biokatalysatoren, beispielsweise durch (spontane) Selbstimmobilisierung mittels Quervernetzung, sei auf Übersichtsartikel zum Thema CLECs (cross-linked enzyme crystals)^[206] bzw. CLEAs (cross-linked enzyme aggregates)^[207] verwiesen.^[208,209]

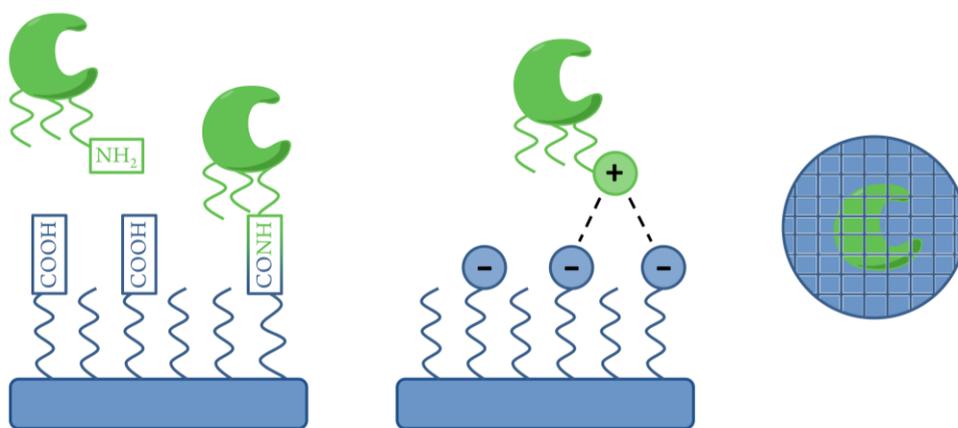
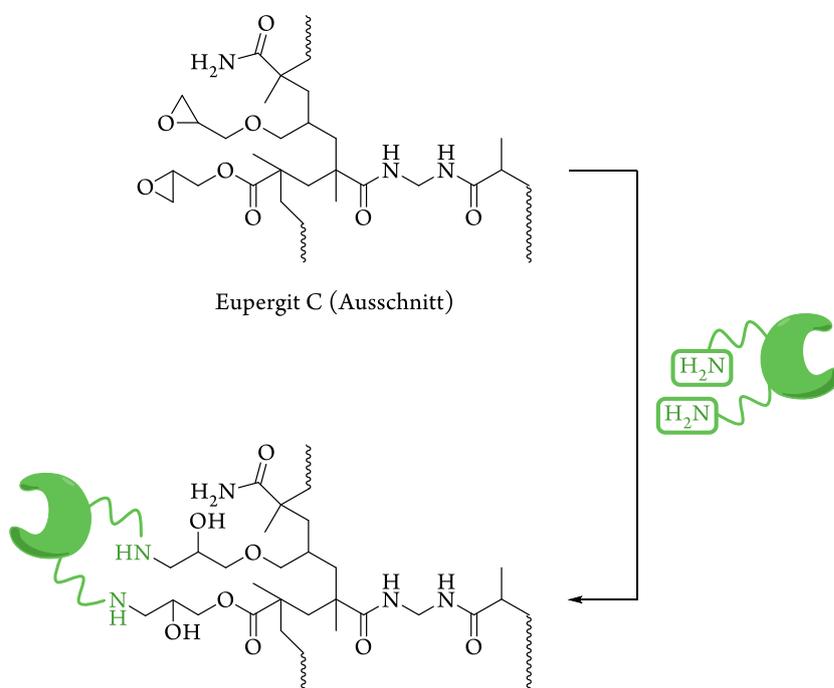


Abbildung 2.8. Ausgewählte Immobilisierungsmethoden (links: Kovalente Verbrückung durch Ausbilden von Amidbindungen; mitte: nicht-kovalente Anbindung des Enzyms durch ionische Wechselwirkungen mit dem Trägermaterial; rechts: Einkapselung des Enzyms in einer Matrix). Das Enzym ist hierbei in grün, das Trägermaterial in blau dargestellt.

Ein nach prozesstechnischen Kriterien idealer Träger vereint chemische Inertheit mit ausreichender Stabilität, Langlebigkeit, Regenerierbarkeit, physikalischer Widerstandsfähigkeit, einfacher Handhabung sowie einer hohen Kosteneffizienz.^[210] Die Immobilisierung eines Biokatalysators auf einer solchen Matrix ermöglicht neben der vereinfachten Abtrennung des Enzyms, welche eine Kontaminierung des Produkt-(gemisches) durch den Katalysator verhindert, vor allem seine Wiederverwendung in aufeinander folgenden Reaktionszyklen.

Insbesondere bei der Verwendung kostenintensiver Enzyme entscheidet sich anhand der Recyclierbarkeit, ob sich ein Produktionsprozess nach ökonomischen Gesichtspunkten realisieren lässt. Einhergehend mit der meist gleichzeitig erhöhten Stabilität immobilisierter Biokatalysatoren im Bezug auf thermische oder durch Solventien verursachte Denaturierung werden im Vergleich zur homogenen Biotransformation auch höhere Produktivitäten erzielt. So können pro Kilogramm immobilisierter Penicillin G Amidase 600 kg 6-Aminopenicillinsäure (6-APA) synthetisiert werden.^[201] Mit an Cellulose immobilisierter Glucoseisomerase lassen sich im Produktionsmaßstab sogar 11000 kg Fructose-Glucose-Sirup (HFCS, high fructose corn sirup) pro Kilogramm Immobilisat herstellen.^[211]

Die Grundvoraussetzung für die Gestaltung solcher nachhaltigen Biotransformationen ist die Langlebigkeit des heterogenen Katalysators unter Prozessbedingungen. Zu den robustesten Immobilisaten gehören solche, bei denen das Enzym kovalent an der Matrix gebunden ist. Weit verbreitet ist hierbei die Anbindung über Amidbrücken (Abbildung 2.8, links). In Gegenwart von Promotoren wie Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) können die Carbonsäurefunktionalitäten eines Trägermaterials mit *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) in Aktivester überführt werden, die mit freien Amingruppen am Enzym zu Amiden abreagieren.^[212-215] Häufig geschieht die Anknüpfung über die ϵ -Aminfunktion von Lysin. Als vorteilhaft erweist sich die hohe Reaktivität der Aminosäure sowie ihre Häufigkeit in der Enzymoberfläche.^[216] Als kommerzielle Variante der kovalenten Enzymbindung haben sich Träger mit Oxiranresten, wie Eupergit C® (Evonik Industries), etabliert (Schema 2.29).



Schema 2.29. Kovalente Immobilisierung eines Enzyms (in grün dargestellt) an Eupergit C.

Eupergit C® ist ein makroporöses Copolymersystem aus *N,N'*-Methylen-bis-acrylamid, Glycidylmethacrylat, Allyl-glycidylether und Methacrylamid mit einem mittleren Porendurchmesser von 25 nm.^[217]

Der Träger ist über die gesamte pH-Skala von 0-14 stabil und findet aufgrund seiner chemischen, sowie auch mechanischen Robustheit Anwendung im industriellen Maßstab.^[218,219] Als Beleg für die außerordentliche Langlebigkeit eines Eupergit-Enzym-Immobilisates sei an dieser Stelle die Heterogenisierung der Penicillin Amidase genannt, die nach über 800 Reaktionscyclen eine konservierte Restaktivität von 60% aufweist.^[220]

Der intrinsische Nachteil kovalenter Immobilisierungsmethoden liegt allerdings in der Anbindungsart selbst. Allen Trägern ist die hohe Dichte an bindungsbildenden Funktionalitäten gemein. Enzyme werden so, aufgrund ihrer Größe, in der Regel multi-kovalent gebunden, wodurch zufällige Orientierungen relativ zum Träger zustande kommen. Da keine Möglichkeit zur Vorausrichtung des Enzyms oder der direkten Begrenzung der Bindungsanzahl besteht, resultieren ungewollte Konformationsänderungen durch die irreversible chemische Veränderung des Biokatalysators, was die Aktivität des Enzyms drastisch verringern kann.^[221-223] So werden zwar in der Regel hohe bis nahezu quantitative Immobilisierungsausbeuten erreicht, die relative Aktivität des Biokatalysators kann jedoch im Vergleich zum freien Enzym bis auf 15% absinken.^[224]

Um den Anteil unfunktionaler Biomasse zu verringern, bieten sich nicht-kovalente Immobilisierungsmethoden an, bei denen das Enzym nicht durch irreversible, chemische Veränderungen inaktiviert wird. Hohe Kompatibilitäten weisen hierbei wasserunlösliche Biopolymerträger wie beispielsweise Chitosan,^[225,216] Cellulose,^[227-229] Stärke,^[230] Pectin^[231] oder Sepharose^[232] auf. Ausgenutzt wird bei diesem Immobilisierungskonzept die Nettooberflächenladung von Enzymen, die je nach pH-Wert und isoelektrischem Punkt verschieden sein kann, sich jedoch mit Rechenmodellen gut voraussagen lässt.^[233] Wird ein Trägermaterial entsprechend entgegengesetzter Ladung verwendet, führt die Ausbildung stark polarer, ionischer Wechselwirkungen zur Immobilisierung des Enzyms (Abbildung 2.9).

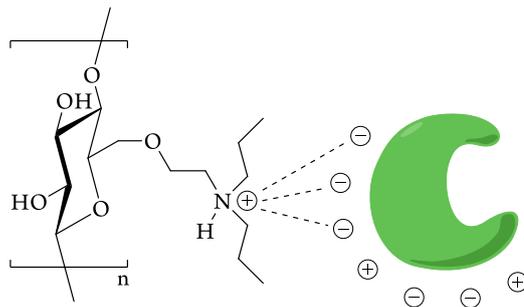
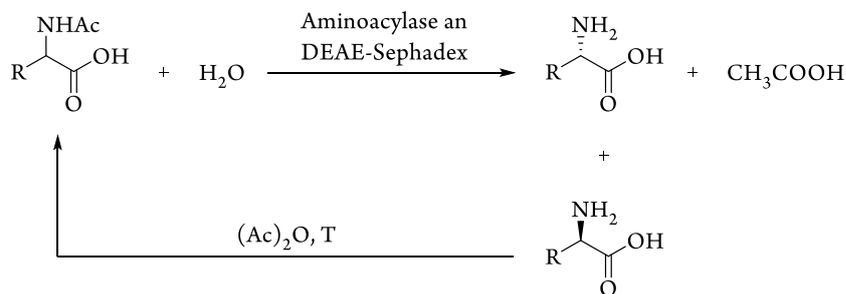


Abbildung 2.9. Schematische Darstellung der Anbindung eines Enzyms (in grün dargestellt) über ionische Wechselwirkungen an DEAE-Sephadex.

Zwar ist die Anbindung des Biokatalysators wesentlich schwächer als durch kovalente Verbrückungen, jedoch muss das Enzym chemisch nicht verändert werden, wodurch seine native Form während der Heterogenisierung weitestgehend konserviert wird.^[234] Ein Anwendungsbeispiel der Immobilisierung *via* ionischer Wechselwirkungen, das von industrieller Bedeutung ist, stellt der TANABE-Prozess zur Racematspaltung *N*-acylierter Aminosäuren dar (Schema 2.30).^[203]

Hierbei wird eine Aminoacylase aus *Aspergillus oryzae* an DEAE-Sephadex (Diethylaminoethylcellulose) im Festbettreaktor verwendet.



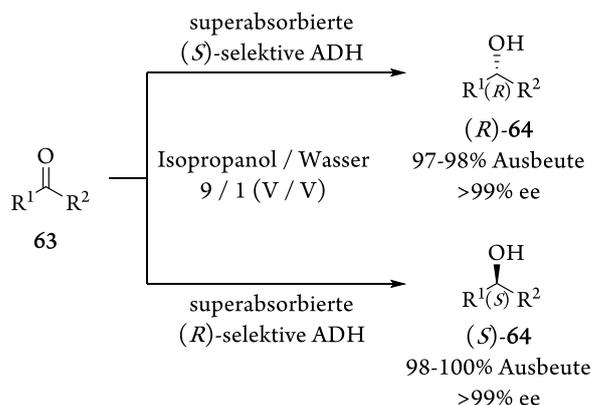
Schema 2.30. Racematspaltung acylierter Aminosäuren mittels immobilisierter Aminoacylase (TANABE Prozess).

Prinzipiell können in gleicher Weise auch nicht-natürliche Träger zum Einsatz kommen. Ebenso geeignet sind beispielsweise Ionentauscher wie Amberlit.^[235,236] Wie bei anderen verbreiteten, nicht-kovalenten Heterogenisierungsmethoden wie der Adsorption an makroporösen Trägern wie Celite oder Accurel,^[237-239] liegt der Nachteil der ionischen Anbindung von Biokatalysatoren in den nur schwach ausgeprägten Wechselwirkungen zwischen Enzym und Träger. Hierdurch scheidet eine Verwendung solcher Immobilisate in wässrigen Medien meist aus, da das Enzym leicht vom Träger heruntergewaschen bzw. abgelöst wird.^[205,224] Eine Recycling ist somit ausgeschlossen. Des Weiteren kann die Orientierung der adsorbierten bzw. durch ionische Wechselwirkungen am Träger gehaltenen Enzyme, ähnlich wie bei kovalenten Immobilisierungsmethoden, nicht beeinflusst werden. In zufälliger Anordnung bilden sich zumeist mehrere heterogene Schichten, wodurch die Enzymaktivität aufgrund sterischer Hinderung vermindert sein kann.^[240]

Um ein Höchstmaß an Enzymnativität zu gewährleisten, können Biokatalysatoren auch gänzlich ohne chemische Modifikationen oder den Zusatz von Detergenzien in wiederverwendbare Aggregate überführt werden, indem das Enzym in ein Polymernetzwerk eingebracht wird. Hierbei wird der Katalysator rein physikalisch zurückgehalten, sobald die Porengröße des Trägermaterials kleiner als die des Enzyms ist. In der Regel werden diese Einschluss- oder Einkapselungsimmobilisate *in situ* durch Zugabe eines oder mehrerer Enzyme zur Monomermischung hergestellt.^[224,241] Durch Zufügen entsprechender Polymerisationsinitiatoren wird der Biokatalysator anschließend im Netzwerk eingeschlossen, behält hierbei aber seine konformationelle Freiheit.* Breite Anwendung haben Silicium-basierte Sol-Gele gefunden, die je nach Precursorzusammensetzung und Polymerisationsbedingungen Netzwerke unterschiedlicher Struktur und Porosität aufweisen.^[242-244] Als nicht-silikonbasierte Polymerträger haben sich epoxidaktivierte Hydrogele bzw. Polyvinylalkohole etabliert.^[245-247]

* Im wörtlichen Sinne sind diese Einschlusskonstrukte zwar keine Immobilisate, da das Enzym als „frei“ angesehen werden kann und formal keine oder nur minimale Wechselwirkungen mit dem Trägermaterial ausgebildet werden, in der Literatur hat sich der Begriff jedoch für alle heterogenisierten Biokatalysatoren etabliert.

Obwohl die Aktivität von Einschlussimmobilisaten aufgrund des eingeschränkten Massentransfers limitiert ist und in der Regel geringere Enzymbeladungen als mit den zuvor diskutierten Immobilisierungsmethoden erzielt werden,^[248] bietet diese Art der Heterogenisierung dennoch viele Vorteile: Die Immobilisate sind mechanisch robust, chemisch – beispielsweise gegen organische Lösungsmittel – sowie thermisch stabil und besitzen sowohl unter Prozess- als auch unter Lagerungsbedingungen erhöhte Lebenszeiten.^[224,241] Entscheidend ist hierbei, dass ihre Synthese wenig zeitaufwendig ist und keiner chemischen Modifikation des Enzyms bedarf, was die Methode insbesondere für die Heterogenisierung solcher Biokatalysatoren wertvoll macht, die durch Funktionalisierungen deaktiviert werden.^[240] Weiterhin können leicht mehrere Enzyme nebeneinander immobilisiert werden, wodurch heterogen katalysierte Kaskadenreaktionen ermöglicht werden. Sollten das Enzym und die verwendeten Monomerbausteine inkompatibel sein, können auch vorgefertigte Polymere verwendet werden. Als beeindruckendes Beispiel sei hier die Immobilisierung von Alkoholdehydrogenasen aus *Lactobacillus brevis* sowie *Thermoanaerobicum* sp. an dem kommerziellen, superabsorbierendem Polymer Favor® (Evonik) zur enzymatischen Reduktion prochiraler Ketone wie **63a-c** genannt (Schema 2.31).^[249,250]



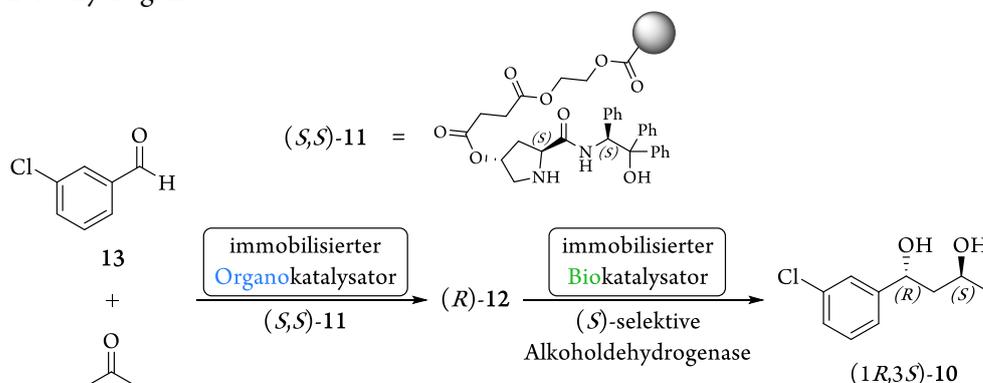
Schema 2.31. Enzymatische Reduktion mittels superabsorbierter Alkoholdehydrogenase (**64a**: $\text{R}^1 = \text{Ph}$, $\text{R}^2 = \text{Me}$; **64b**: $\text{R}^1 = 4\text{-Pyridyl}$, $\text{R}^2 = \text{Me}$; **64c**: $\text{R}^1 = \text{EtOOCCH}_2$, $\text{R}^2 = \text{Me}$).

In wässrigem Isopropanol gelang die hochselektive Umsetzung diverser Ketone mit >97% Ausbeute und >99% ee. Hierbei wurden in vier aufeinander folgenden Reaktionscyclen unter Verwendung desselben Immobilisates weder die Auswaschung des Katalysators noch eine verminderte Aktivität beobachtet. Bemerkenswert ist hierbei, dass es gelang, den für die enzymatische Reduktion notwendigen Cofaktor NAD^+ ebenfalls im Superabsorber zu immobilisieren. Derartige Coimmobilisate aus Enzym(en) mitsamt ihrer Cofaktoren lassen sich mit den zuvor diskutierten Methoden wie der kovalenten oder ionischen Anbindung nicht realisieren.

2.3 Ergebnisse und Diskussion

2.3.1 Ketonreduktion mit immobilisiertem Biokatalysator

Das Ziel des ersten Schwerpunktes dieser Doktorarbeit ist die (Weiter)Entwicklung einer nachhaltigen 1,3-Diolsynthesesequenz. Als Modellsystem wird im Rahmen dieser Arbeit die gut untersuchte Darstellung von 1-(3-Chlorphenyl)butan-(1*R*,3*S*)-diol ((1*R*,3*S*)-**10**) gewählt.^[60-65] Beide Katalysatorsysteme der chemoenzymatischen, modularen Synthese sollen hierbei, wie in Schema 2.32 gezeigt, als Immobilisate zur Anwendung kommen. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei zunächst auf der Heterogenisierung des Biokatalysators (zweiter Schritt der Synthesesequenz aus Schema 2.32). Wichtige Aspekte sind hierbei die Auswahl eines geeigneten Trägers, die Untersuchung der Recyclierbarkeit des Immobilisates sowie die Einzelschrittoptimierung der isolierten Biotransformation unter Verwendung der heterogenisierten Alkoholdehydrogenase.



Schema 2.32. Sequentieller Aufbau von 1-(3-Chlorphenyl)butan-(1*R*,3*S*)-diol ((1*R*,3*S*)-**10**) unter Verwendung immobilisierter Katalysatoren.

2.3.1.1 Synthese der Referenzverbindungen und Etablierung der Analytik

Wie in früheren Arbeiten bereits gezeigt, werden beim Einsatz hochspezifischer Alkoholdehydrogenasen (ADH) aus *Rhodococcus species* (Rsp) oder *Lactobacillus kefir* (Lk) zur asymmetrischen Reduktion des isolierten Aldolproduktes (*R*)-**12** keine Neben- oder Zerfallsprodukte detektiert.^[62-65] NMR-spektroskopische Untersuchungen der aus entsprechenden Biotransformationen erhaltenen Rohproduktgemische zeigen ausschließlich charakteristische Signalsätze des Substrates (*R*)-**12** bzw. des Diols (1*R*,3*S*)-**10** (beispielhaft in Abbildung 2.10 gezeigt).

Für das gewählte Modellsystem sind, wie in Abbildung 2.10 verdeutlicht, alle nicht-aromatischen Signalsätze von (*R*)-**12** und (1*R*,3*S*)-**10** spektroskopisch unterscheidbar. Für alle in diesem Kapitel beschriebenen Umsatzberechnungen werden die gut voneinander getrennten Signale bei 5.04 und 5.13 ppm verwendet, die jeweils das Proton am (*R*)-konfigurierten Stereozentrum abbilden.

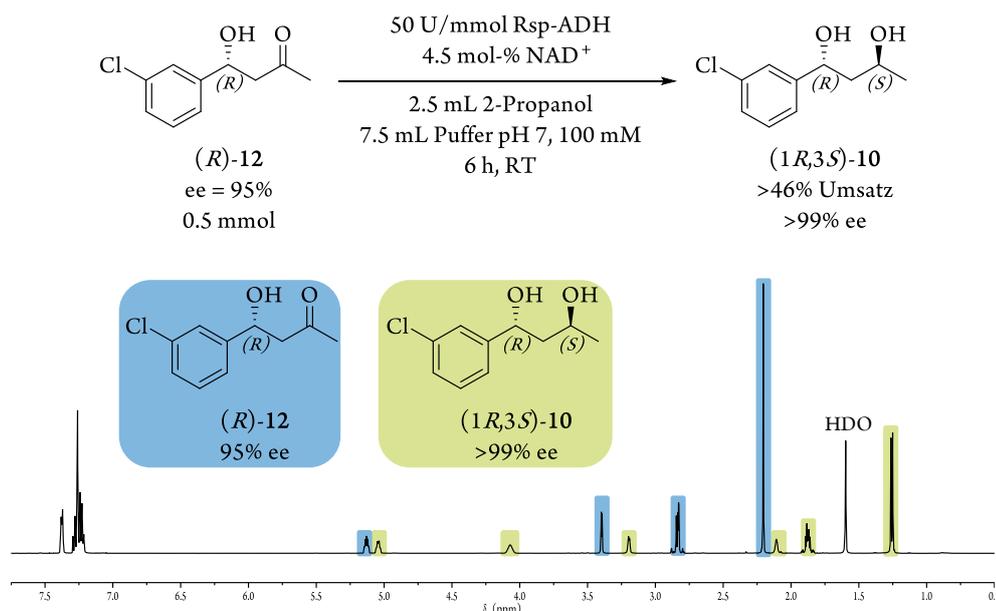


Abbildung 2.10. Oben: Reaktionsgleichung zur enzymatischen Darstellung von (1*R*,3*S*)-10 aus (*R*)-12. Unten: ¹H-NMR-Spektrum des entsprechenden Rohproduktgemisches bestehend aus (*R*)-12 (95% ee, blau) und dem Diol (1*R*,3*S*)-10 (>99% ee, grün) bei 46% Umsatz.

Eine Umsatzberechnung auf dieser Basis kann durch Korrelation der Integralverhältnis der beiden Signale bei 5.04 ppm (zugehörig zu (1*R*,3*S*)-10) und 5.13 ppm ((*R*)-12) erfolgen. Wegen des Fehlens von Neben- oder Zerfallsprodukten ergeben sich für den Gesamtumsatz (U_{ges}) und den auf die Bildung von (1*R*,3*S*)-10 produktbezogenen Umsatz (U_{Pr}):

$$U_{\text{ges}} [\%] = 1 - (FI_{5.13 \text{ ppm}} \cdot (FI_{5.13 \text{ ppm}} + FI_{5.04 \text{ ppm}})^{-1}) \cdot 100$$

$$U_{\text{Pr}} [\%] = FI_{5.04 \text{ ppm}} \cdot (FI_{5.13 \text{ ppm}} + FI_{5.04 \text{ ppm}})^{-1} \cdot 100$$

mit FI_x = Flächenintegral des NMR-Signals bei x ppm.

Die erhaltenen Werte werden im Folgenden jeweils gerundet und in ganzen Zahlen angegeben.

Zur Validierung der in dieser Arbeit verwendeten Methodik zur Enantioselektivitätsbestimmung der enzymatischen Reduktion werden zunächst analog des literaturbekannten, modularen Systems zum schrittweisen Aufbau der Stereozentren von 1,3-Diolen auf Basis von 3-Chlorbenzaldehyd (13) (1*R*,3*R*)-10 und (1*R*,3*S*)-10 hergestellt.^[60,61]

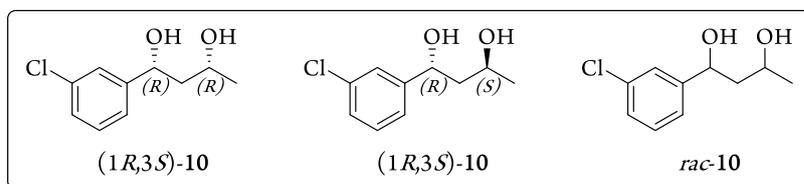


Abbildung 2.11. Referenzverbindungen für die Etablierung der Analytik.

Die Darstellung des racemischen Diols *rac*-**10** als Gemisch aus *syn* und *anti* erfolgt hierbei in einer sequentiellen Synthese. Abweichend von etablierten Vorschriften^[61,65] gelingt die Darstellung des prochiralen β -Hydroxyketons *rac*-**12** unter Verwendung von Natriumhydroxid anstelle von methanolischer Ammoniaklösung. Die anschließende Reduktion mit Natriumborhydrid liefert *rac-syn*-**10** und *rac-anti*-**10** in einem Verhältnis von 2:1 (*syn:anti*). Das für die Etablierung der HPLC-Analytik verwendete Diastereomergemisch wurde in einem Verhältnis von 1.0:1.1 (*syn:anti*) verwendet (Abbildung 2.12).

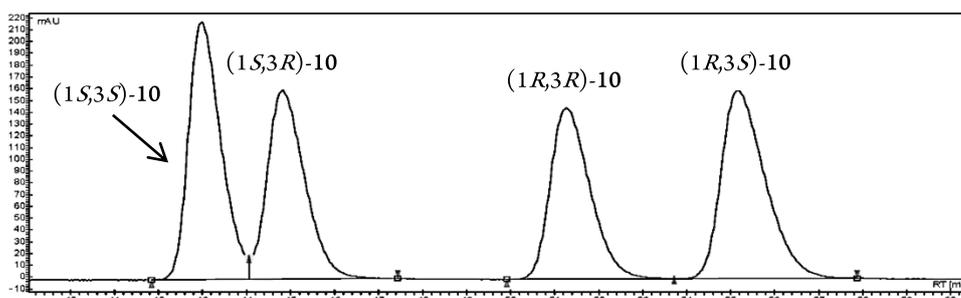


Abbildung 2.12. HPLC-Chromatogramm der Mischung aus *rac-syn*-**10** und *rac-anti*-**10**. Messbedingungen: Chiralpak® OJ-H Säule, temperiert auf 30°C; Laufmittel CO₂:Isopropanol 97:3 (V:V), flow 1.0 mL/min. Als Retentionszeiten werden erhalten: $t_r = 43.0$ min ((*S,S*)-**10**), 44.8 min ((*S,R*)-**10**), 51.2 min ((*R,R*)-**10**) und 55.2 min ((*R,S*)-**10**).

Die unvollständige Trennung der Signale bei $t_r = 43.0$ min ((*S,S*)-**10**) und 44.8 min ((*S,R*)-**10**) kann hierbei vernachlässigt werden, da im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich (*R*)-konfiguriertes Aldolprodukt (*R*)-**12** mit einem Enantiomerenüberschuss von >95% ee als Substrat Verwendung findet. Die hieraus resultierende Trennschärfe der Methode ist in Abbildung 2.13 gezeigt. Ein 1:1 (n:n) Gemisch aus (*1R,3R*)-**10** und (*1R,3S*)-**10** mit Diastereomerenverhältnissen von jeweils >35:1 dr zeigt Basislinientrennung der jeweiligen Unterschussdiastereomere (*1S,3R*)-**10** und (*1S,3S*)-**10**.

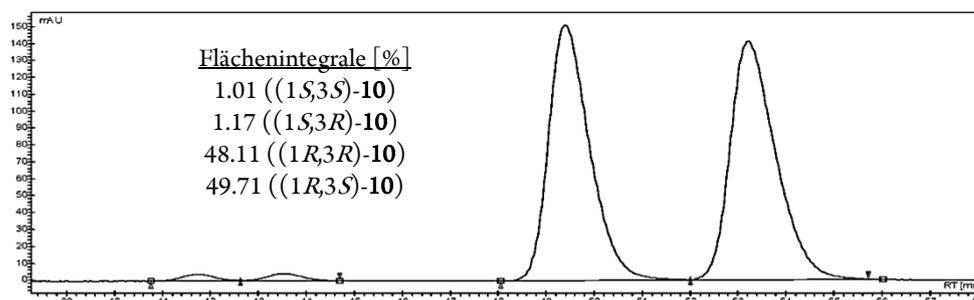


Abbildung 2.13. HPLC-Chromatogramm einer 1:1 Mischung aus (*1R,3R*)-**10** und (*1R,3S*)-**10**. Messbedingungen: Chiralpak® OJ-H Säule, temperiert auf 30°C; Laufmittel CO₂:Isopropanol 97:3 (V:V), flow 1.0 mL/min. Als Retentionszeiten werden erhalten: $t_r = 41.8$ min ((*S,S*)-**10**), 43.5 min ((*S,R*)-**10**), 49.4 min ((*R,R*)-**10**) und 53.2 min ((*R,S*)-**10**).

In Kreuzversuchen kann weiterhin gezeigt werden, dass der höchste noch exakt detektierbare Wert für die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses für (1*R*,3*R*)-**10** bei 99% ee bzw. für (1*R*,3*S*)-**10** bei 99.5% ee liegen.

Wie der Vergleich zwischen den Chromatogrammen aus Abbildung 2.12 und Abbildung 2.13 zeigt, führen technisch bedingte Abweichungen während der Messungen zu Retentionszeitverschiebungen, wobei das jeweilige Signalmuster erhalten bleibt. Bei Verschiebungen von $\Delta t_R > 2$ min sowie allen Chromatogrammen, bei denen eine eindeutige Zuordnung der Signale fraglich ist, werden die Analysemischungen durch kreuzweises Aufstocken der fraglichen Proben mit dem korrespondierenden Diastereomerenmisch aus *rac-syn*-**10** und *rac-anti*-**10** oder der entsprechenden Gegenanantiomeren-angereicherten Verbindung (*R,R*)-**10** respektive (*R,S*)-**10** überprüft. Weiterhin kann eine eindeutige Zuordnung der Signale mit Hilfe supplementärer ¹H-NMR-Spektren erreicht werden.

2.3.1.2 Verwendung einer superabsorbierten Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus species* im wässrigen Medium

Aus vorherigen Arbeiten zum Einsatz superabsorbierter ADHs unter Verwendung von Acetophenon als Modellsubstrat ist bekannt, dass sich sowohl mit Rsp- als auch Lk-ADH-Immobilisaten produktbezogene Umsätze von >90% realisieren lassen.^[65] Allerdings wurden hierbei, ähnlich wie in dem von JEROMIN vorgestellten System, Enzymaktivitäten von >1000 U/mmol Substrat eingesetzt.^[65,249,250]

Um die Anwendbarkeit dieser Immobilisate zur Synthese von 1,3-Diolen hingegen unter Prozessbedingungen abschätzen zu können, wird im Folgenden ein Rsp-ADH-Immobilisat verwendet, dessen Enzymbeladung deutlich niedriger ist und in dem Bereich (10 bis 62 U/mmol) liegt, der bei der Verwendung des nicht heterogenisierten Biokatalysators für die Reduktion des β -Hydroxyketons **12** zur Anwendung kommt.^[60,61,63-65] Hierzu werden 190 μ L (50 U) des Enzymrohextraktes (265 U/mL) zusammen mit 15 mg (4.5 mol%) NAD^+ , gelöst in 180 μ L Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM), auf 63 mg Favor SXM 9155[®] Superabsorber von Evonik Industries gegeben, mit 13 μ L Isopropanol versetzt und die Suspension 10 min gerührt. Nachdem sich das Gemisch gallertartig verfestigt hat werden 510 μ L 2-Propanol zugegeben und für weitere 10 min gerührt. Das durch den Enzymrohextrakt blassgelb gefärbte Hydrogel wird abgesaugt, mit 255 μ L 2-Propanol gewaschen und 15 min am Luftstrom getrocknet. Es werden 160 mg mechanisch voneinander trennbare, adhäsive Gelkugeln mit einem Restwassergehalt von 60% (m/m) erhalten. Die Immobilisierungseffizienz lässt sich im Bezug auf die enzymatische Restaktivität analog zu der von JEROMIN beschriebenen Methode ermitteln.^[249] Hierzu wird ein Anteil des Hydrogels in einen großen Überschuss Puffer gegeben – es werden in etwa 20 mL Puffer pro 50 mg Superabsorberimmobilisat verwendet – und der Überstand anschließend spektrophotometrisch vermessen. Die entsprechende gravimetrische Aktivität des Immobilisates ergibt sich rechnerisch aus dem hierbei verwendeten Gesamtvolumen korreliert mit dem Gesamtgewicht des Hydrogels.

Das für die folgende Biotransformation von (*R*)-**12** im wässrigen Medium verwendete Coimmobilisat aus Rsp-ADH und NAD^+ besitzt eine Aktivität von 0.2 U/mg, was einer Immobilisierungseffizienz von 64% entspricht. Nach 24 h beträgt der erzielte produktbezogene Umsatz beim Einsatz von 80 mg des Immobilisates (respektive 16 U bzw. 32 U/mmol) in 25 Vol-% 2-Propanol >95% (Abbildung 2.14, Cyclus 1). Das Diol (1*R*,3*S*)-**10** wird dabei in >99% ee erhalten und spiegelt frühere Ergebnisse bei der Verwendung nicht-immobilisierter ADHs wieder.^[60,61,63-65] Wie in diesen Arbeiten bereits etabliert, findet die Oxidation von Isopropanol als substrat-gekoppeltes Cofaktorregenerierungssystem Anwendung (entsprechend Kapitel 2.2.3, Schema 2.28).

Um die Wiederverwendbarkeit des superabsorbierten Coimmobilisates aus ADH nebst Cofaktor zu zeigen, wird das nach der Umsetzung abgetrennte Immobilisat für den erneuten Einsatz in weiteren, analogen Reaktionscyclen isoliert. Hierfür wird das gesamte Reaktionsgemisch samt Hydrogel zunächst über eine Glasfilterfritte abgesaugt und das Immobilisat mit 256 μ L 2-Propanol nachgewaschen.

Die vereinigten Filtrate werden anschließend drei Mal mit je 10 mL Dichlormethan extrahiert, das Solvens am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand NMR-spektroskopisch untersucht (siehe Kapitel 2.3.1.1). Die Wiederfindung der Gesamtstoffmenge von >95% indiziert die Aufarbeitungsmethode dabei als robust und garantiert so die valide Umsatzanalytik.

Dem Hydrogel, dessen Morphologie sich zwischen den Cyclen bzw. während seiner Isolierung nicht ändert, werden anschließend frisches Solvens sowie Substrat zugefügt, jedoch weder Cofaktor noch Enzym. Nach weiteren 24 h Reaktionszeit wird ein produktbezogener Umsatz von 40% (>99% ee) erreicht. Beim dritten aufeinander folgenden Einsatz desselben Immobilisates kann kein Umsatz zum Diol (1*R*,3*S*)-10 detektiert werden (Abbildung 2.14).

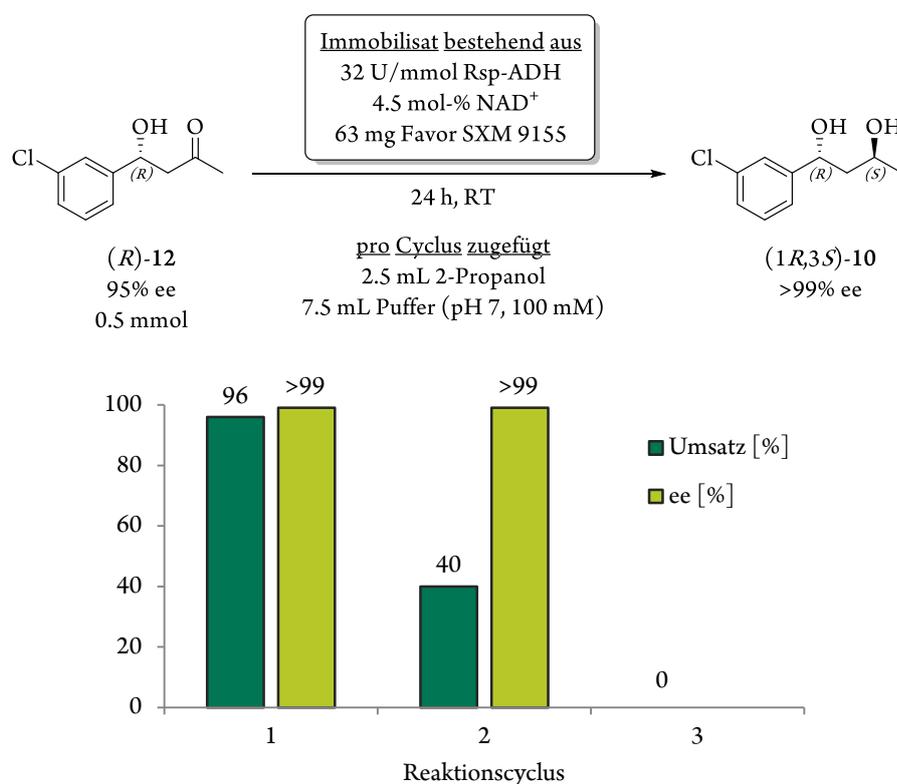


Abbildung 2.14. Recyclingversuche zur Synthese von (1*R*,3*S*)-10 mittels immobilisierter Rsp-ADH.

Als Erklärung für den beobachteten Umsatzrückgang bei gleichbleibend hoher Enantioselektivität von >99% lässt sich das Auswaschen (leaching) des Enzyms bzw. des Cofaktors vermuten. Ähnliche Effekte wurden bereits für Systeme beobachtet, bei denen Biokatalysatoren nicht-kovalent, also rein physikalisch – beispielsweise durch Adsorption an geeignete Trägermaterialien wie EP-100 oder Celite – immobilisiert wurden.^[239,241] Es wird postuliert, dass derartige Anbindungen zu schwache Wechselwirkungen zwischen Träger und Enzym ausbilden, so dass sich der Katalysator leicht auswaschen lässt.^[241]

Eben solche schwachen Anbindungskräfte sind jedoch auch in dem von JEROMIN postulierten Bindungsmechanismus der Einkapselung des Enzyms im Polymer Netzwerk des Superabsorbers zu erwarten.^[249] Die Struktur des Superabsorberhydrogels ähnelt hierbei literaturbekannten Systemen, welche das „Einfangen“ von Biokatalysatoren in Polyvinylalkoholgelen (PVA-Gele) beschreiben.^[246,251-254] Während Ganzzellkatalysatoren in solchen Hydro- oder Kryogelsystemen erfolgreich eingesetzt werden konnten, führten analoge Versuche mit freien Enzymen aufgrund ihrer wesentlich geringeren Dimensionen und der damit verbundenen freien Beweglichkeit durch die Hydrogelporen zum Auswaschen der Biokatalysatoren.^[241]

2.3.1.3 Verwendung einer superabsorbierten Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus species* im organischen Solventien

Neben dem Kunstgriff der Quervernetzung des Enzyms zum Zweck der Molekulargewichtserhöhung,^[255] welche den Rückhalt des Enzyms im Hydrogel zur Folge hat, besteht die Möglichkeit, das Enzym derivatisierungsfrei nicht-kovalent im Hydrogel zu halten. Dies geschieht durch Zugabe organischen, nicht wassermischbaren Lösungsmittels zum Hydrogel, wodurch dieses als wässriges Kompartiment fungiert (Abbildung 2.15).^[241]

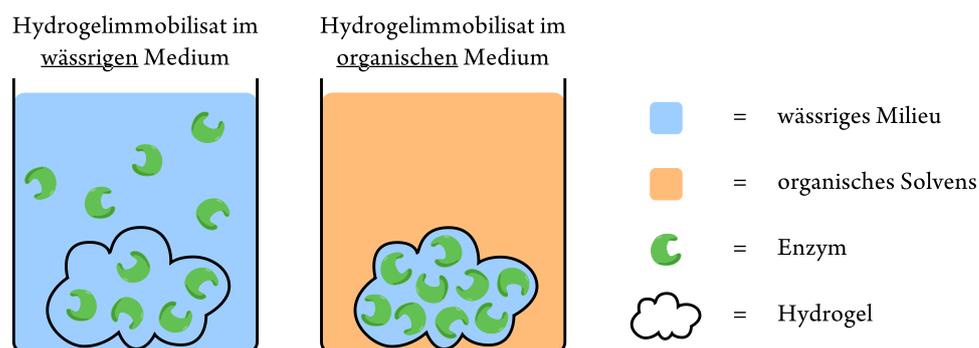


Abbildung 2.15. Schematische Darstellung eines Hydrogelimmobilisates im wässrigen Medium (links) bzw. in einem organischen, mit Wasser nicht mischbaren Solvens (rechts). Im homogenen Solvenssystem (bezogen auf die eingeschlossene, wässrige Phase im Hydrogel und das umgebende Lösungsmittel) links ist der Rückhalt des Enzyms klein, der Übergang in den Lösungsmittelüberstand führt zum "leaching". Rechts bedingt die Phasentrennung zwischen Hydrogel und organischem Solvens den Rückhalt des Enzyms im wässrigen Kompartiment.

Entsprechende Lösungsansätze wurden bereits erfolgreich in den Gruppen um ANSORGE-SCHUMACHER und KROUTIL durchgeführt.^[256-258] Hierbei konnten einerseits überexprimierte Carbonylreduktasen in Ganzzellkatalysatoren erfolgreich in mikro-wässrigen Reaktionsmedien mit 99% (V/V) organischen Solventien eingesetzt werden.^[257,258] Andererseits gelang aber auch der Einsatz isolierter Enzyme, wie beispielsweise der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir*, in PVA Kügelchen, wenn *n*-Hexan als Lösungsmittel verwendet wurde.^[256] Letzterer Ansatz, der aufgrund der Zugabe von organischem Lösungsmittel zur Ausbildung eines wässrigen Kompartiments im organischen Solvens führt, kann schematisch als „artifizielle Ganzzelle“ beschrieben werden, da die wässrig/organische Grenzschicht des Hydrogels der abschirmenden Zellwand entspricht.

Um die im wässrigen Reaktionsmilieu beobachteten leaching-Effekte zu minimieren werden im Folgenden analoge Versuchsreihen in nicht wassermischbaren organischen Solventien durchgeführt (Abbildung 2.16). Im Gegensatz zu rein wässrigen Medien muss hierbei allerdings der Reaktionsparameter der Wasseraktivität (a_w) beachtet werden.^[259-262] Diese beschreibt die über alle Phasen des Systems (Hydrogel bzw. wässriges Kompartiment, organisches Lösungsmittel, Gasraum) gleich verteilte verfügbare Wassermenge, wobei sich die lokale Konzentration unterscheiden kann.^[259]

Da die Enzymaktivität direkt von der verfügbaren Wassermenge der Phase, in der sich der Biokatalysator befindet, abhängt und diese im Allgemeinen bei sinkender Wasseraktivität ebenfalls abnimmt, müssen Änderungen dieses Parameters vermieden werden.^[258,259]

Während sich der Wasserwert im wässrigen Milieu bei der Wiederverwendung des selben Immobilisates durch Zugabe frischen Puffers nicht ändert (siehe Kapitel 2.3.1.2), akkumuliert sich ein anteiliger Wasserverlust des Hydrogels über folgende Reaktionscyclen im organischen Milieu. Aus diesem Grund wird das jeweils verwendete Lösungsmittel mit Wasser vorgesättigt (was einem a_w der organischen Phase von 1 entspricht). Um einer Erhöhung des organischen (Lösungsmittel)Anteils im wässrigen Kompartiment vorzubeugen wird außerdem eine wesentlich geringere Menge Isopropanol zur Cofaktorregenerierung verwendet, da große Mengen des Alkohols als Phasenvermittler wirken und so auch zum Verlust von Wasser aus dem Hydrogel führen würden.

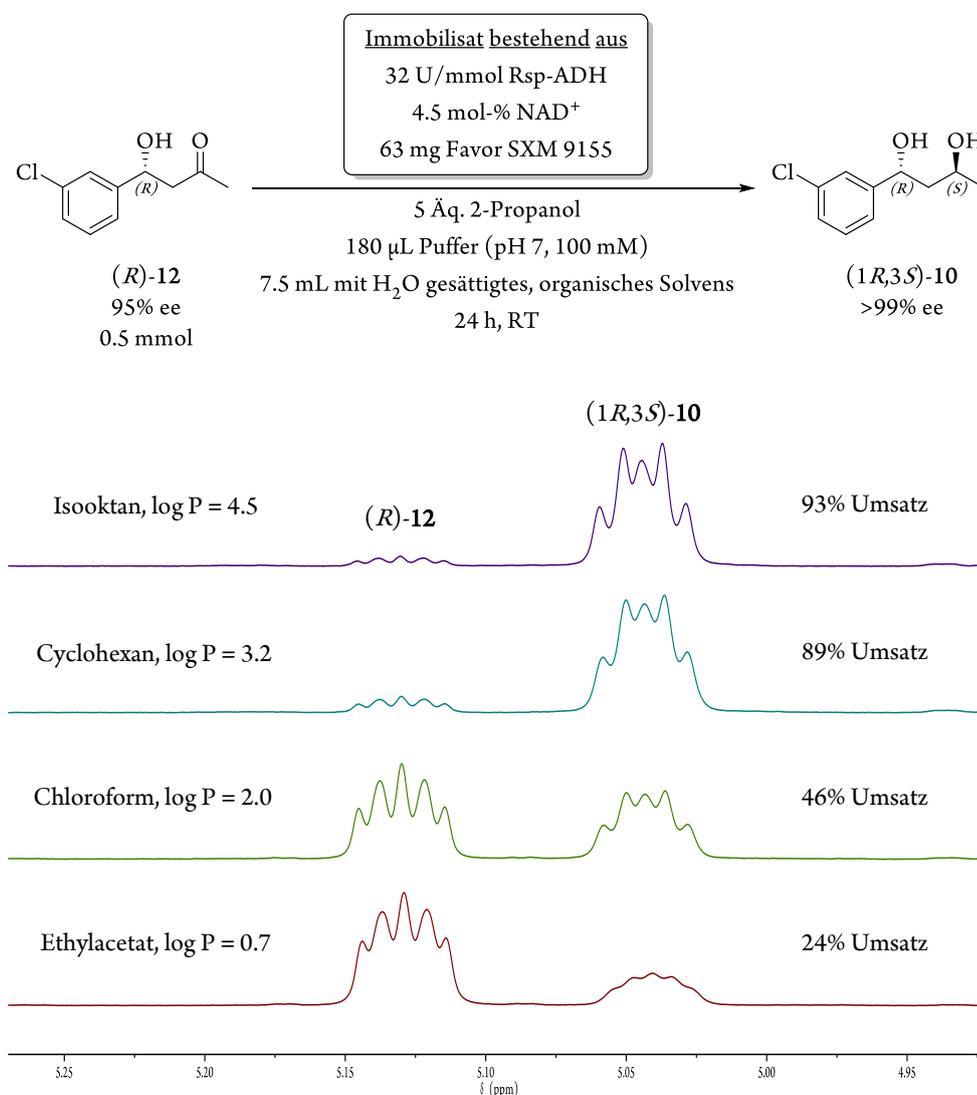


Abbildung 2.16. ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchungen der Synthese von (1R,3S)-10 mittels immobilisierter Rsp-ADH in organischen Lösungsmitteln.

Wird die Biotransformation des Substrates (*R*)-**12** in Solventien unterschiedlicher Polarität durchgeführt, so zeigt sich eine signifikante Abhängigkeit des erzielten, produktbezogenen Umsatzes vom log P Wert des jeweiligen Lösungsmittels. Während bei der Verwendung von polarem Ethylacetat ($\log P = 0.7$)* nach 24 h Reaktionszeit lediglich ein Umsatz von 24% detektiert wird, liefern unpolare Lösungsmittel wie Cyclohexan ($\log P = 3.2$)* oder Isooktan ($\log P = 4.5$)* im selben Zeitraum vergleichbar hohe Umsatzraten wie sie bei der Verwendung von freier bzw. heterogenisierter Rsp-ADH im wässrigen Milieu erzielt werden (siehe Kapitel 2.3.1.2).^[60,61,63-65] In allen Fällen wird das Diol (1*R*,3*S*)-**10** nahezu enantiomerenrein mit >99% ee erhalten.

Der beobachtete Effekt lässt sich mit dem intrinsischen Lösungsvermögen der verwendeten Solventien erklären. Je polarer das verwendete Lösungsmittel, desto größer werden im vorliegenden System die Substrat/Solvens-Wechselwirkungen und desto stärker ist die Solvation. Dies führt zu einem verminderten Verteilungskoeffizienten des Substrats (*R*)-**12** zwischen wässrigem und organischem Kompartiment, was, bei einem angenommenem hohen K_M -Wert, eine verminderte Reaktionsrate zur Folge hat. Wird hingegen ein schlecht solvatisierendes Lösungsmittel wie Isooktan verwendet, steigt die Reaktionsrate durch die Verschiebung des Verteilungskoeffizienten hin zum wässrigen Kompartiment.

Obwohl alle Lösungsmittel mit Wasser vorgesättigt sind und hierdurch ein Austrag des im Hydrogel gebundenen Wassers in die organische Phase vermieden wird, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein anteiliger Durchtritt des Lösungsmittels in das Hydrogelkompartiment zur Deaktivierung der immobilisierten ADH führt. Dieses würde ebenfalls zu geringeren Umsatzraten beim Einsatz von Lösungsmitteln niedriger log P Werte führen.

Aus prozesstechnischer Sicht ist bemerkenswert, dass trotz der Verwendung von nur 1/13 der Isopropanolmenge, die im wässrigen Medium eingesetzt wird (siehe Kapitel 2.3.1.2), im organischen Milieu dennoch eine effektive Cofaktorregenerierung gewährleistet werden kann und nahezu gleiche Umsätze erzielt werden. Des Weiteren entfällt bei der vorliegenden Versuchsführung die Extraktion des Diols (1*R*,3*S*)-**10** aus der wässrigen Phase. Alle in Abbildung 2.16 gezeigten Umsätze sind durch einfaches Dekantieren und anschließendes Nachwaschen des Immobilisates mit wenigen Millilitern Lösungsmittel zu erzielen. Das Extraktionsvermögen von Cyclohexan, Chloroform oder Ethylacetat reicht hierbei aus, um eine Wiederfindungsrate von >95% im Bezug auf die Gesamtmassenbilanz von (1*R*,3*S*)-**10** und (*R*)-**12** zu gewährleisten. Das bei der Reaktion verwendete Lösungsmittel ist hier gleich dem Extraktionsmittel. Isooktan erweist sich hingegen als schlechtes Extraktionsmittel, weshalb das Immobilisat nach Reaktionen in diesem Solvens mit Ethylacetat nachgewaschen wird, um eine Wiederfindungsrate von >95% und damit die Validität der Umsatzbestimmung gemäß Kapitel 2.3.1.1 zu gewährleisten.

* Die log P Werte sind der Arbeit von LAANE *et al.* entnommen.^[263]

Der Nachweis der verstärkten Rückhaltung des Enzyms im Hydrogelkompartiment im Vergleich zum wässrigen System aus Kapitel 2.3.1.2 kann im Folgenden durch Recyclingstudien gezeigt werden (Abbildung 2.17). Hierbei wird das Reaktionsgemisch nach jedem Cyclus vom Immobilisat abdekantiert und im Gegensatz zu obiger Vorschrift auch bei der Verwendung von Isooktan mit dem jeweiligen Lösungsmittel nachgewaschen um prozesstechnisch unvorteilhafte Lösungsmittelwechsel zwischen den Cyclen zu vermeiden.

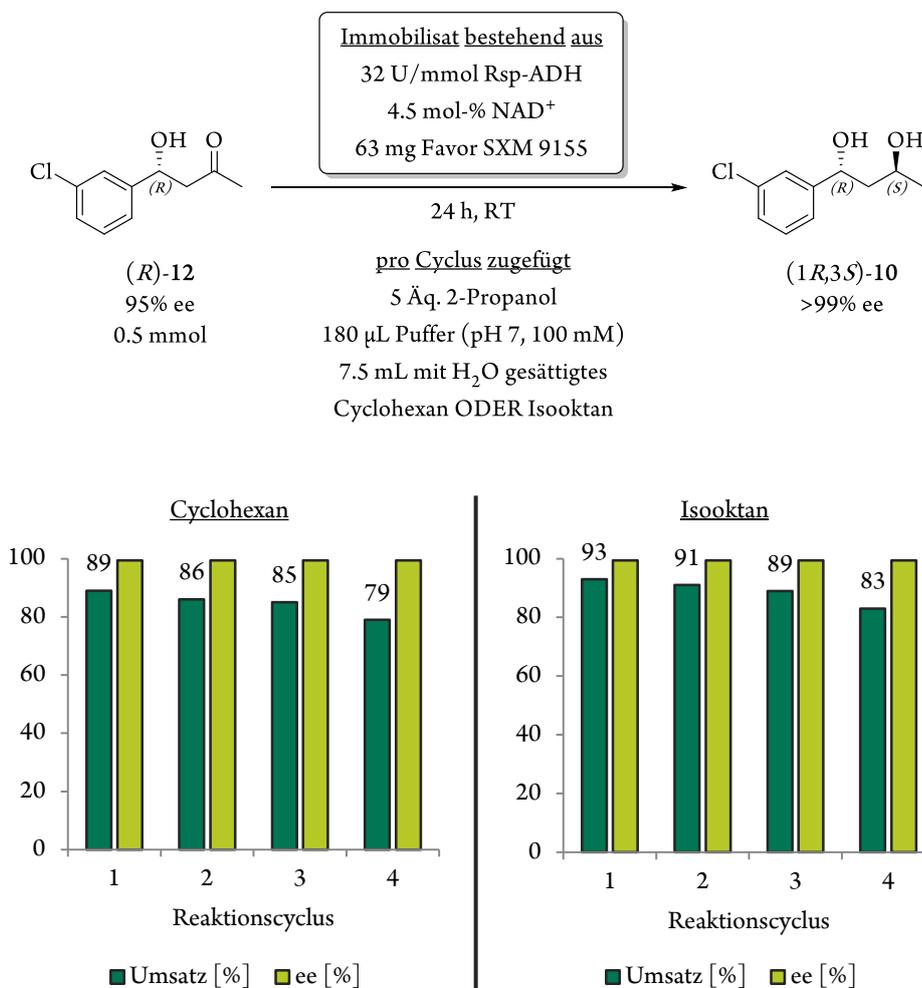


Abbildung 2.17. Recyclingversuche zur Synthese von (1*R*,3*S*)-10 mittels immobilisierter Rsp-ADH im organischen Milieu (links: in Cyclohexan; rechts: in Isooktan).

Während für das gute Extraktionsmittel Cyclohexan so eine Wiederfindungsrate von >95% für die Summe aus Substrat (R)-12 und Produkt (1*R*,3*S*)-10 erhalten wird, liegt diese im Fall von Isooktan aufgrund des geringeren Extraktionsvermögens im Bezug auf (R)-12 und (1*R*,3*S*)-10 bei maximal 80%. Beiden Systemen ist gemein, dass der durchschnittliche Umsatzverlust pro Cyclus bei lediglich 2.5% liegt, während im wässrigen Medium bereits nach dem zweiten Cyclus keine Umsetzung detektierbar ist. Weiterhin liegt die Enzymaktivität der eingesetzten Rsp-ADH über vier Cyclen gemittelt bei 8 U/mmol (R)-12, was unterhalb des Wertes von 10 bis 62 U/mmol bei der Verwendung freien Enzyms liegt.^[60,61,63-65] Gleiches trifft auf die verwendete Menge an Coenzym zu, die gemittelt bei 1.1 mol% im Vergleich zu 4.5 mol% NAD⁺ bei analoger Versuchsführung im Wässrigen liegt.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass ein derivatisierungsfreies, effektives Verfahren zur Coimmobilisierung der Rsp-ADH sowie des Cofaktors NAD⁺ auf dem ökonomisch vorteilhaften und hochverfügbaren Superabsorberpolymer Favor SXM 9155[®] etabliert werden konnte. Bei einer Immobilisierungseffizienz von 64% besitzt das Immobilisat exzellente Recyclingeigenschaften, wobei bereits wenige Äquivalente Isopropanol zur effektiven Cofaktorregenerierung genügen. Im Vergleich zum analogen wässrigen System besitzt das Coimmobilisat in Cyclohexan eine niedrigere Katalysatorbeladung bei gleichzeitiger Herabsetzung der notwendigen Cofaktormenge. Da die Biotransformation vollständig im organischen Medium durchgeführt werden kann, wird ein anschließender Extraktionsschritt obsolet, was die gesamtprozess-technische Effizienz weiter erhöht.

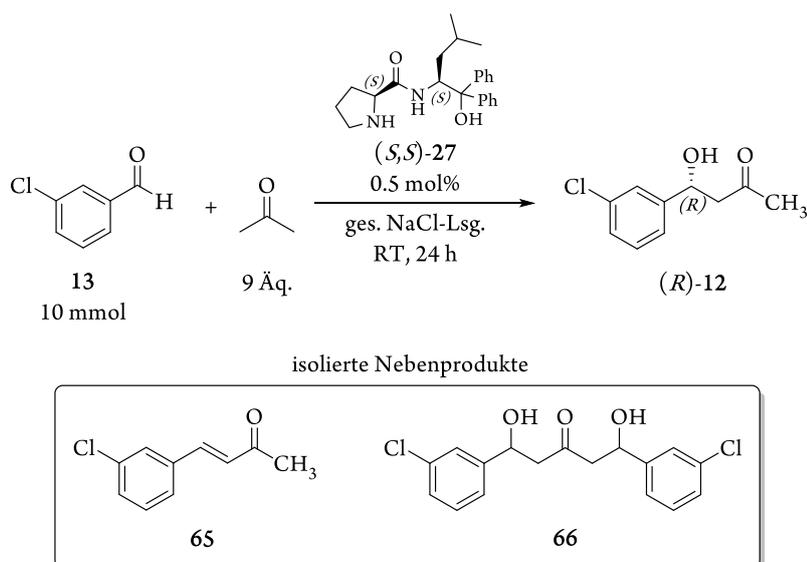
2.3.2 Darstellung des Aldolproduktes in organischen Medien

Zur Realisierung eines gemäß Schema 2.4 (siehe Kapitel 2.1) verlaufenden chemoenzymatischen Gesamtprozesses von 1,3-Diolen auf Basis von Chlorbenzaldehyden ist die Kompatibilität der beiden Einzelschritte obligatorisch. Das in früheren Arbeiten etablierte sequentielle Syntheseverfahren, in dem isolierte Synthesestufen Verwendung finden, konnte bereits erfolgreich im wässrigen Milieu eingesetzt werden.^[61,63] Mit dem ursprünglich von SINGH entwickelten Prolinamidderivat (*S,S*)-27 wurde ein Organokatalysator gefunden, der die Synthese des Aldolproduktes (*R*)-12 im Wässrigen ermöglichte.^[128] RULLI *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass eine Heterogenisierung des Katalysators durch Copolymerisation des monomeren Prolinderivates mit Styrol und Divinylbenzol möglich ist und sich das Immobilisat in einem semikontinuierlichen Durchflussreaktor einsetzen lässt.^[62,65]

Da das in dieser Arbeit etablierte Biokatalysatorimmobilisat (siehe Kapitel 2.3.1.2 und 2.3.1.3) zur Reduktion des Aldolproduktes (*R*)-12 aufgrund des beobachteten leaching-Effektes nicht mit einer Prozessführung im wässrigen Milieu vereinbar ist, wird im Folgenden die Kompatibilität mit der asymmetrischen Aldolreaktion hergestellt.

2.3.2.1 Synthese der Referenzverbindungen und Etablierung der Analytik

Um quantitative Vergleiche mit den bereits etablierten Systemen zu gewährleisten,^[62,128] werden zunächst alle Nebenprodukte, die in früheren Arbeiten bei der Aldolreaktion zwischen 3-Chlorbenzaldehyd (**13**) und Aceton bereits identifiziert wurden (Schema 2.33),^[64,65] als Referenzverbindungen synthetisiert.



Schema 2.33. Benchmarksynthese zur Darstellung von (*R*)-12 im wässrigen Milieu (oben) und die bei der Synthese identifizierten Nebenprodukte (unten).

Nachfolgend lassen sich sowohl eine $^1\text{H-NMR}$ spektroskopische Umsatz- als auch eine Enantiomerenüberschussbestimmung etablieren und validieren.

Der tatsächliche Anteil der Nebenprodukte im Rohprodukt ist stark von den Reaktionsbedingungen abhängig.^[65] Das bei Aldolreaktionen am häufigsten auftretende Nebenprodukt **65** entsteht durch die anschließende Dehydratisierung des gebildeten β -Hydroxyketons. Die resultierende α,β -ungesättigte Carbonylverbindung wird in einer Mannich-Reaktion/Eliminierung-Sequenz meist irreversibel gebildet, da sie gegenüber dem entsprechenden Aldolprodukt thermodynamisch bevorzugt ist.^[264] Der Anteil des durch Folgereaktion eines β -Hydroxyketons wie (*R*)-**12** mit einem weiteren Akzeptoraldehyd entstehenden Bis-Aldolproduktes **66** hängt in starkem Maße von der Stöchiometrie der Edukte ab.^[265] Alle Komponenten können NMR-spektroskopisch voneinander unterschieden und nebeneinander im Rohprodukt nachgewiesen werden (Abbildung 2.18). Die Umsatzbestimmung erfolgt analog zu der in Kapitel 2.3.1.1 beschriebenen Berechnung auf Basis der Flächenintegrale des NMR-Spektrums aus dem Rohproduktgemisch. Die erhaltenen Werte werden auf halbe Prozente gerundet angegeben.

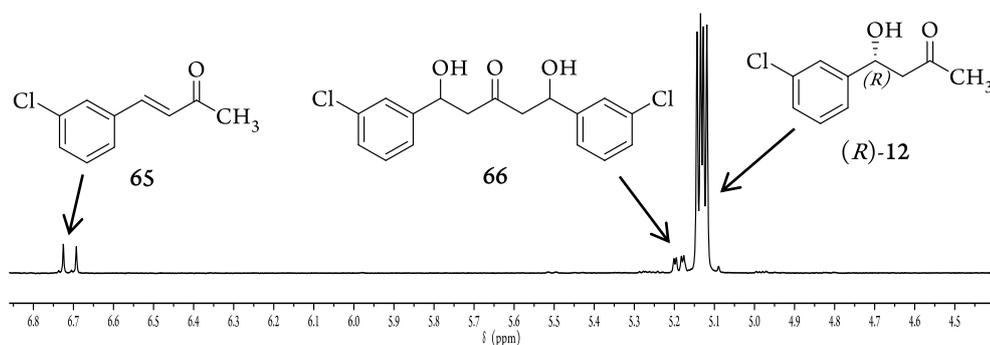
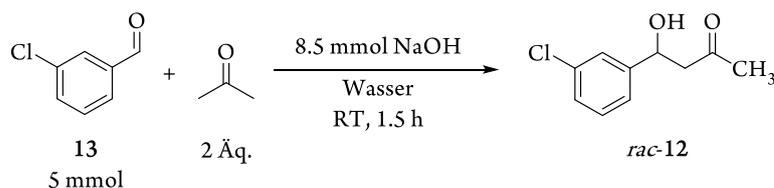


Abbildung 2.18. Ausschnitt des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums des Rohproduktgemisches der in Schema 2.33 gezeigten Benchmarkreaktion. Charakteristische, gut voneinander getrennte Signale liegen bei 5.12 ppm (dt) für (*R*)-**12**, 5.19 ppm (dd) für das Bis-Aldolprodukt **66** und 6.73 ppm (d) für das Kondensationsprodukt **65**.

Die gezielte Darstellung des Kondensationsproduktes **65** gelingt in literaturanaloger Weise mit Hilfe von Pyrrolidin und Benzoesäure in einer Ausbeute von 8%, wobei auf jegliche Reaktionsoptimierung verzichtet wurde.^[266] Die Zuweisung des Signals bei 5.19 ppm im Rohproduktspektrum zum Bis-Aldolprodukt erfolgt durch Literaturabgleich.^[65]

Zur Etablierung einer HPLC-Analytik zwecks Enantiomerenüberschussbestimmung wird zunächst das racemische Aldolprodukt *rac*-**12** gemäß Schema 2.34 synthetisiert.



Schema 2.34. Darstellung des racemischen Aldolproduktes *rac*-**12** im Basischen.

Der Umsatz von 30% ist dabei für chromatographische Zwecke vollkommen ausreichend, weshalb die Reaktion zu diesem Zeitpunkt gestoppt wird. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung kann *rac*-**12** in einer Ausbeute von 8% neben Kleinstmengen des Kondensationsproduktes **65** isoliert werden. Entscheidende Messparameter zu der auf dem Racemat *rac*-**12** basierenden ee-Wert-Bestimmung – wie die verwendete Festphase (Chiralcel® AD-H) oder die Laufmittelpolarität (5 Vol-% 2-Propanol) – sind dabei zwar aus früheren Arbeiten bekannt,^[64,65] die Analytikmethode muss jedoch auf die Verwendung von überkritischem Kohlendioxid als unpolare Laufmittelkomponente in einer superkritischen Fluidchromatographie (SFC) angeglichen, evaluiert und neu etabliert werden. Der per SFC erhaltene ee-Wert liegt mit 5 Vol-% 2-Propanol in CO₂ als Laufmittel bei <0.5% (Abbildung 2.19).

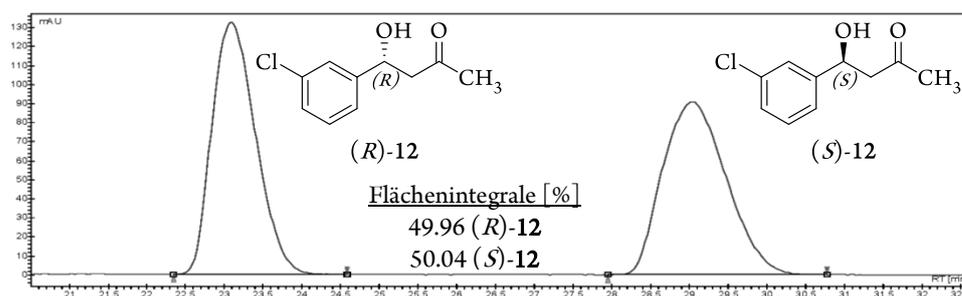


Abbildung 2.19. HPLC-Chromatogramm des racemischen Aldolproduktes *rac*-**12** mit <0.5% ee. Messbedingungen: Chiralpak® AD-H Säule, temperiert auf 40°C; Laufmittel CO₂:Isopropanol 95:5 (V:V), flow 1.8 mL/min. Als Retentionszeiten werden $t_r = 23.1$ min (*R*)-**12** und $t_r = 29.0$ min (*S*)-**12** erhalten.

Wie in Kapitel 2.3.1.1 bereits beschrieben können messtechnisch bedingte Retentionszeitabweichungen nicht vermieden werden. Das Signalmuster bleibt allerdings in jedem Fall erhalten. Bei Verschiebungen von $\Delta t_R > 2$ min werden die Messungen durch kreuzweises Aufstocken der fraglichen Proben mit den korrespondierenden Gegenenantomeren-angereicherten Verbindungen (*R*)-**12** respektive (*S*)-**12** verifiziert.

2.3.2.2 Darstellung von (*R*)-12 im organischen Medium

Um die Kompatibilität der Aldolreaktion mit einer in Cyclohexan ablaufenden Bio-transformation zu gewährleisten, werden für die Reaktionsführung zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen: entweder wird die Reaktion zwischen 3-Chlorbenzaldehyd (**13**) und Aceton in Substanz oder ebenfalls in Cyclohexan durchgeführt.

Obwohl die Darstellung des 4-Chlor-substituierten Derivates von (*R*)-**12** bereits in Substanz gelang,^[61,63] zeigen analoge Ansätze mit Aldehyd **13** im vorliegenden System niedrige Umsätze um 40% (Tabelle 2.1, Einträge 2 und 3). Im Vergleich zur Referenzsynthese im wässrigen Medium (gesättigte Natriumchloridlösung) werden außerdem verschlechterte Selektivität beobachtet (vergleiche Eintrag 1 und 3 bzw. 2 und 4).

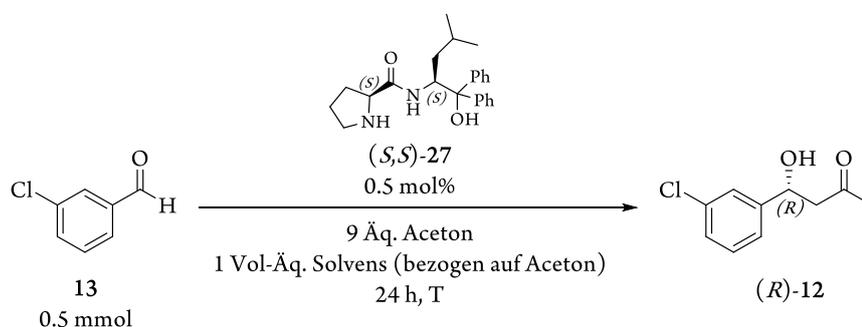


Tabelle 2.1. Versuchübersicht zur Synthese von (*R*)-**12** im wässrigen und organischen Medium.

Eintrag	Solvens	T [°C]	U _{ges} ^{a)} [%]	U _{Pr} ^{b)} [%]	65 ^{c)} [%]	66 ^{d)} [%]	ee ((<i>R</i>)- 12) [%]
1 ^{e)}	ges. NaCl-Lsg.	RT	86.5	80	4	3	95
2 ^{e)}	ges. NaCl-Lsg.	10	85	80	3	2	97
3 ^{e)}	Aceton	RT	42	38	2	1.5	83
4 ^{e)}	Aceton	10	39.5	36	1	2	91
5 ^{e)}	Cyclohexan	RT	96	89	5	2	83
6 ^{e)}	Cyclohexan	10	98	92	3	3.5	92
7 ^{f)}	Cyclohexan	10	80	74	1.5	4.5	89
8 ^{g)}	Cyclohexan	10	74	69	1	3.5	90

a) Gesamtumsatz bezogen auf den Verbrauch des Substrates **13**; b) Produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von (*R*)-**12**; c) Substanzbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung des Alkens **65**; d) Substanzbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung des Bis-Aldolproduktes; e) Verwendung einer bereits länger gelagerten Charge (C1) des Aldehyds **13** von ABCR f) Verwendung einer neuen Charge (C2) des Aldehyds **13** von TCI Europe; g) Aldehyd **13** aus Charge C2 wird vor der Umsetzung frisch destilliert.

Das im Vergleich zum wässrigen System schlechte Ergebnis der Umsetzung im organischen Milieu deckt sich mit den in der Literatur veröffentlichten Daten von VISHNUMAYA *et al.* für die Synthese von (*R*)-**12** mit (*S,S*)-**27**.^[128,129] Der Effekt lässt sich mit der Struktur des Organokatalysators selbst erklären.

Während frühe Versuche zur asymmetrischen Aldolreaktion (AAR) mit Prolin noch hohe Katalysatormengen von bis zu 30 mol% benötigten und zumeist in DMSO oder DMF durchgeführt wurden,^[89-93] trugen DFT-Rechnungen^[267-270] und empirische Daten^[271-273] sukzessive zum tieferen Verständnis des Katalysemechanismus bei und führten so zu Organokatalysatorklassen, die verschiedene Strukturmerkmale in sich vereinen. So besitzen moderne Katalysatoren neben einem Pyrrolidin- oder Thiazolidinring keine freien Carbonsäurefunktionalitäten und sind sowohl mit sperrigen, hydrophoben Resten als auch Wasserstoffdonorgruppen ausgestattet (siehe Abbildung 2.4 sowie Schema 2.18).^[123-129,274-285]

Der Erfolg dieser Prolinderivatkatalysatoren der „zweiten Generation“, welche in Wasser teilweise bereits effektive Umsetzungen bei der Verwendung von 1 mol% und niedriger ermöglichen,^[123-125,129,274] beruht auf dem hydrophoben Effekt. Während die Ausbildung von Wasserstoffbrücken den Übergangszustand stabilisiert, schirmt das hydrophobe Rückgrat des Katalysators das Enaminintermediat ab. Weiterhin führt die Umsetzung von mit Wasser nicht mischbaren Ketonen oder Aldehyden (wie dem hier verwendeten 3-Chlorbenzaldehyd (**13**)) zur Ausbildung von feinen Emulsionen im wässrigen Medium, in deren konzentrierter organischer Phase hohe Konzentrationen der Substraten und des Katalysators vorliegen.^[120,129,274]

Umso erstaunlicher ist das Ergebnis der in Cyclohexan, also im homogenen Reaktionsgemisch durchgeführten AAR (Tabelle 2.1, Einträge 5 und 6). Obwohl hier der in der Literatur als Triebkraft postulierte hydrophobe Effekt des Lösungsmittels fehlt, werden beinahe quantitative Umsätze verzeichnet, die entsprechend sogar höher als die in gesättigter Natriumchloridlösung liegen (vergleiche Tabelle 2.1 Eintrag 1 und 5 bzw. 2 und 6). Der leichte Selektivitätsverlust ist hierbei vernachlässigbar, da die erzielbaren ee-Werte temperaturabhängig sind (vergleiche Tabelle 2.1 Eintrag 3 und 4 bzw. 5 und 6) und sich im gegebenen Reaktionszeitraum ohne Umsatzverlust verbessern lassen.^[128,129,274]

Das gute Ergebnis lässt sich jedoch bei Verwendung einer anderen Charge des Akzeptoraldehyds **13** nicht wiederholen (siehe Tabelle 2.1 Eintrag 7). Obwohl die vom Hersteller angegebene Reinheit von 97% innerhalb der Spezifikation dieser Arbeit liegt (>95%, siehe Kapitel 6.1) und keinerlei Veränderungen am System vorgenommen werden, wird ein um beinahe 20% verminderter Umsatz von 80% detektiert. Wird der Aldehyd unmittelbar vor der AAR destillativ aufgereinigt, wobei laut ¹H-NMR Spektroskopie eine Reinheit von >99% erreicht wird, sinkt der Umsatz sogar noch leicht weiter auf 74% (vergleiche Tabelle 2.1 Eintrag 6, 7 und 8). Eine Erklärung liefert die NMR-spektroskopische Untersuchung der verwendeten Substrate (Abbildung 2.20).

Der Vergleich zwischen den Substratchargen zeigt Signalunterschiede im Bereich von $\delta = 7.43$ und 7.95 bis 8.15 ppm. Der auf 3-Chlorbenzaldehyd (**13**) bezogene molare Anteil der Verunreinigung beträgt entsprechend der Reinheitsspezifikation des Herstellers nur wenige Prozent (<3%) und ließ sich mit Hilfe des Destillationsrückstandes sowie der gezielten Oxidation von **13** (siehe hierzu Kapitel 6.3.1.2.3) als korrespondierende 3-Chlorbenzoesäure (**67**) identifizieren.

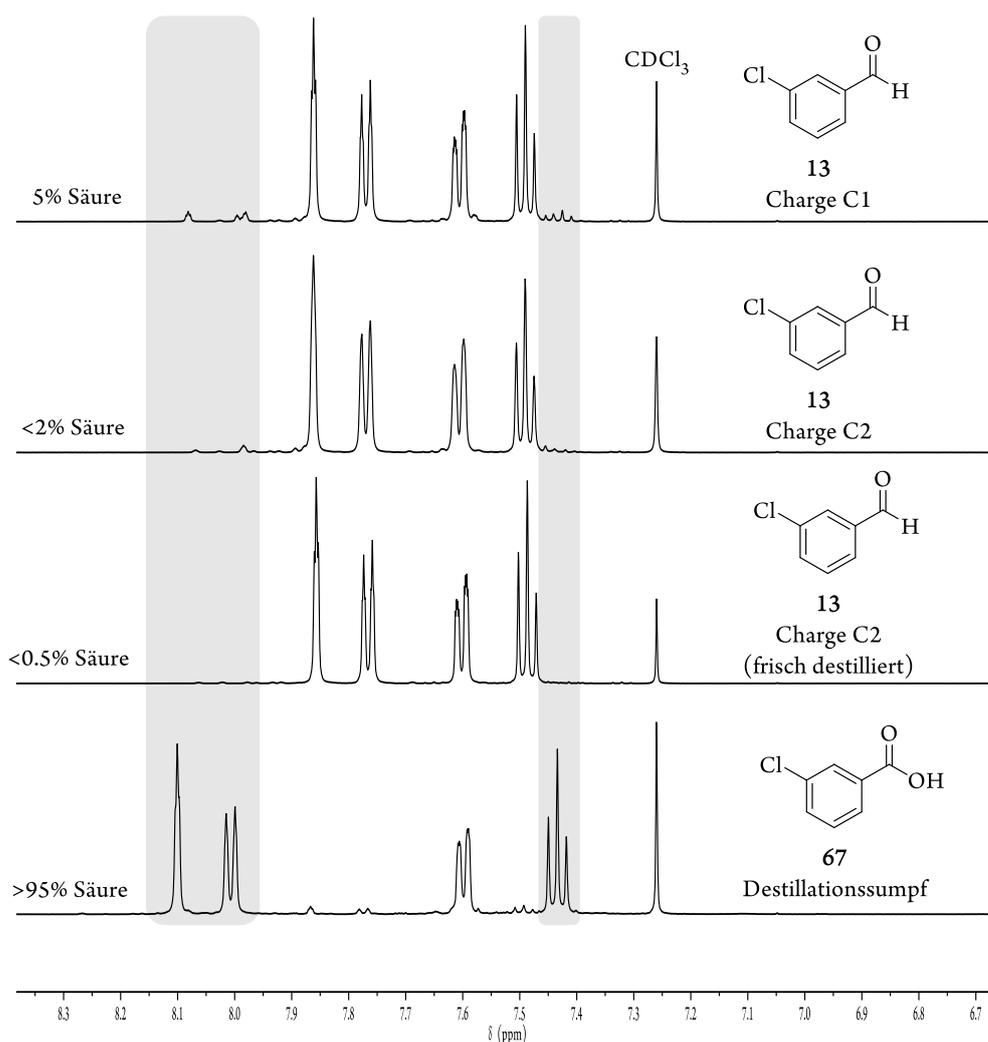


Abbildung 2.20. $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der verschiedenen Substratchargen (vergleiche Tabelle 2.1).

Da spektroskopisch keine weiteren Verunreinigungen oder Fremdstoffe neben 3-Chlorbenzaldehyd (**13**) und seiner Säure nachgewiesen werden können, ist zu vermuten, dass bereits ein geringer Säureanteil (im Fall von Eintrag 5 und 6 aus Tabelle 2.1 <5%) im Substrat einen signifikanten Einfluss auf die Reaktionsdynamik besitzt. Entsprechend wird ein niedrigerer Umsatz detektiert, sobald der Anteil der 3-Chlorbenzoesäure (**67**) wie in Eintrag 7 auf <2% sinkt oder fehlt (Eintrag 8). Verifizieren lässt sich diese These durch gezielten Zusatz von zwei bis fünf Prozent der Säure **67** zum Reaktionsgemisch (Tabelle 2.2).

Im Vergleich des „internen Benchmarks“ der Synthese von (*R*)-**12** in Cyclohexan unter Verwendung der mit Säure verunreinigten Charge des Substrats **13** (Tabelle 2.1, Eintrag 6) mit dem frisch destillierten Substrat bei Zugabe von 5 mol% Säure (Tabelle 2.2, Eintrag 1) können sowohl Umsatz als auch Selektivität reproduziert werden. Der produktbezogene Umsatz sinkt aufgrund des erhöhten Nebenproduktanteils durch Kondensation leicht auf 83%.

Der Dehydratisierung des Aldolproduktes (*R*)-**12** kann sowohl durch ein Absenken der Reaktionstemperatur als auch durch Einsatz geringerer Mengen Säure (2% statt 5%) entgegen gewirkt werden (vergleiche Tabelle 2.2, Eintrag 1 und 2 bzw. 3 und 4).

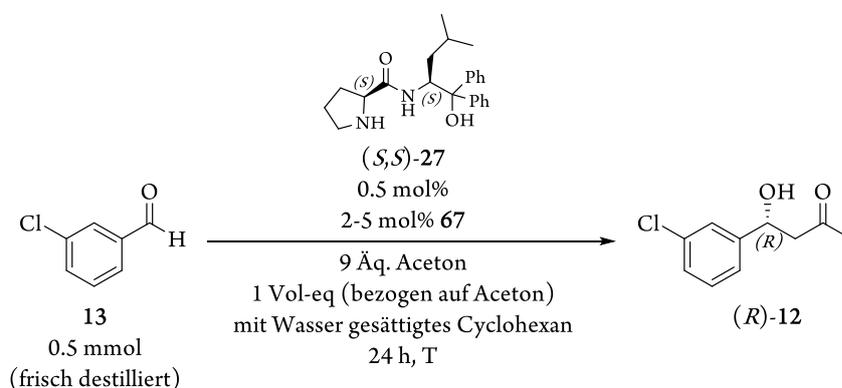


Tabelle 2.2. Versuchsübersicht zur Synthese von (*R*)-**12** in Cyclohexan unter Zugabe von 3-Chlorbenzoesäure (**67**).

Eintrag	67 [mol%]	T [°C]	U _{ges} ^{a)} [%]	U _{Pr} ^{b)} [%]	65 ^{c)} [%]	66 ^{d)} [%]	ee ((<i>R</i>)- 12) [%]
1	5	10	94	83	7.5	3.5	93
2	2	10	96.5	90	2.5	3.5	92
3 ^{e)}	2	RT	95	85.5	7	2.5	84
4 ^{e)}	2	10	98	91	3.5	3.5	93
5 ^{e)}	2	3	95	91	2	2	95.5

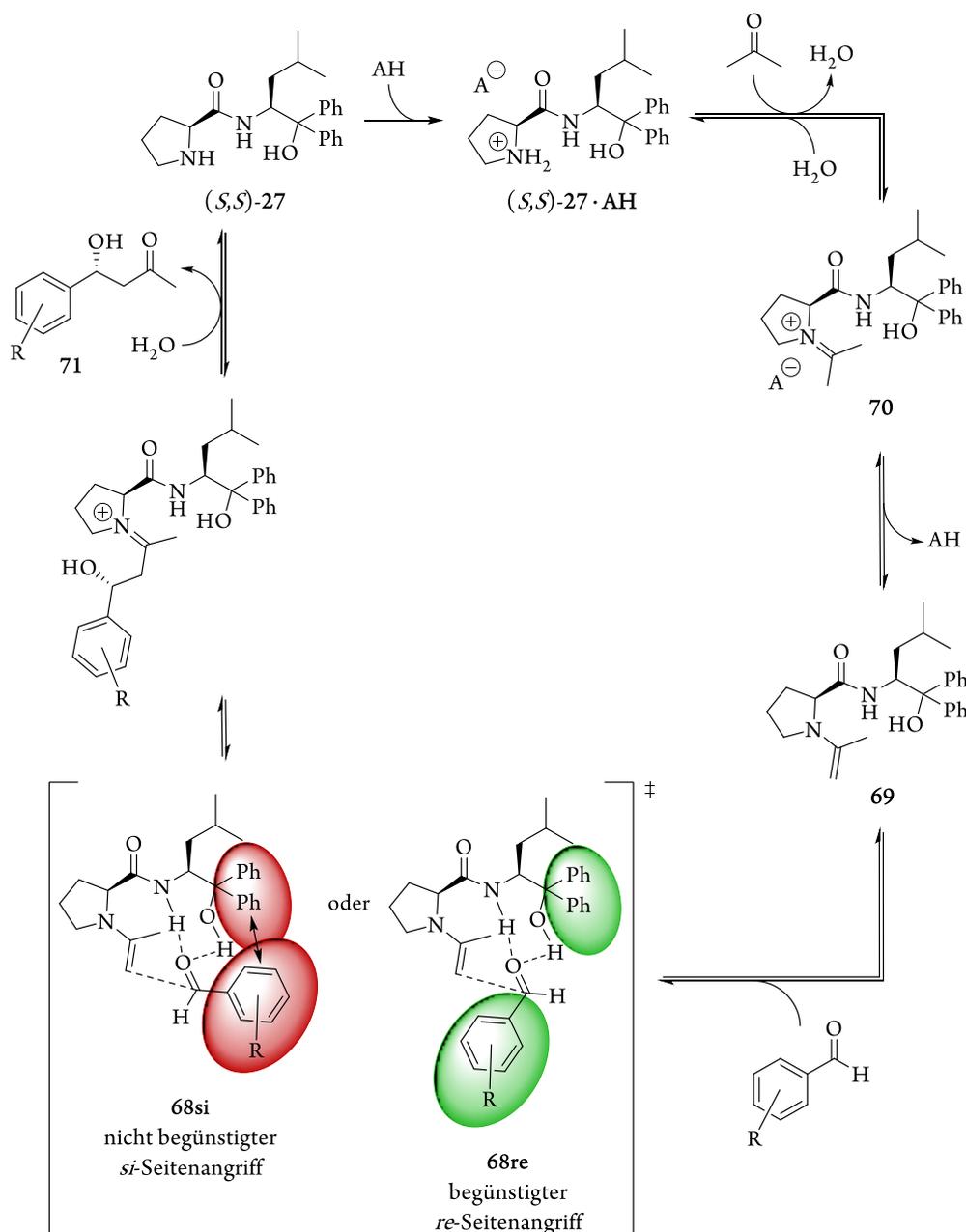
a) Gesamtumsatz bezogen auf den Verbrauch des Substrates **13**; b) Produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von (*R*)-**12**; c) Substanzbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung des Alkens **65**; d) Substanzbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung des Bis-Aldolproduktes **66**; e) Reaktion wurde unter Schutzgas durchgeführt.

Durch externen Zusatz von 3-Chlorbenzoesäure kann (*R*)-**12** in Cyclohexan unter optimierten Temperaturbedingungen in ebenso hoher Enantiomerenreinheit von 95.5% ee wie im wässrigen System erhalten werden, wobei der produktbezogene Umsatz mit 91% sogar leicht höher liegt (vergleiche Tabelle 2.1, Eintrag 1 und Tabelle 2.2, Eintrag 5).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Kompatibilität der AAR mit einer anschließenden Biotransformation unter Einsatz des in dieser Arbeit etablierten Superabsorberimmobilisates der Rsp-ADH vollständig hergestellt werden konnte. Unter Einsatz von 2 mol% des Säureadditives **67** kann die Synthese von (*R*)-**12** mit beinahe quantitativem Umsatz von 95 bis 98% (91% produktbezogener Umsatz) und hoher Enantiomerenreinheit von über 95% ee realisiert werden. Die durch (*S,S*)-**27** katalysierte AAR findet hierbei im unpolaren Solvens Cyclohexan statt – einem Lösungsmittel, welches im Kontext der Prolin(derivat)-katalysierten Aldoladdition bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde.^[123-129,274-285]

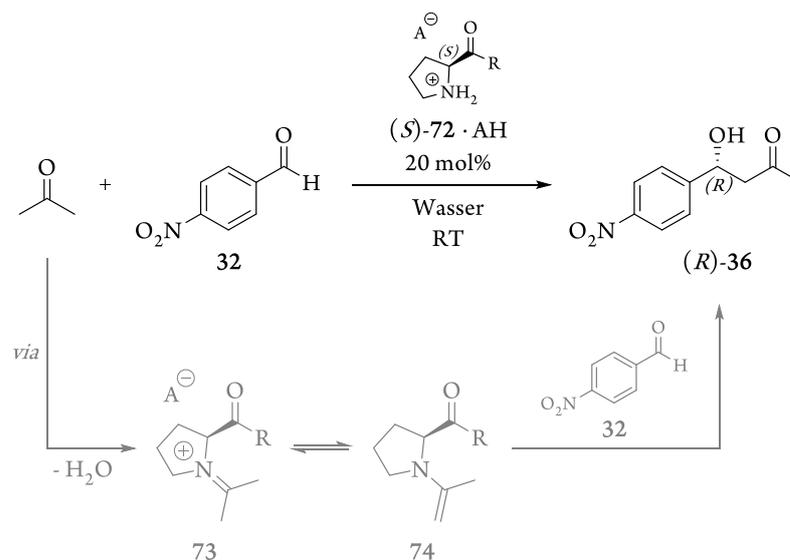
2.3.2.3 Exkurs 1) Mechanistische Betrachtung der Prolinamid-katalysierten Aldolreaktion

Um den in Kapitel 2.3.2.2 beschriebenen Einfluss eines Säurekatalysators auf die Reaktionsdynamik der asymmetrischen Aldolreaktion (AAR) zu verstehen, bedarf es einer genaueren mechanistischen Betrachtung der im Katalysezyklus auftretenden Intermediate sowie der möglichen Nebenreaktionen. Während die Enantioselectivität der AAR auf der Stufe der Aldoladdition bestimmt wird (vergleiche die Übergangszustände **68si** und **68re** in Schema 2.35), ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Ausbildung des Enamins **69** (siehe auch Kapitel 2.2.2).^[269,272,273,286]



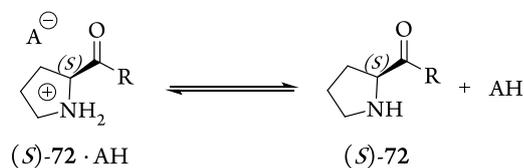
Schema 2.35. Erweiterter Mechanismus der Prolinamid-katalysierten AAR unter Einbezug eines Säureadditives.

Bereits kurz nach den wegweisenden Arbeiten von LIST^[89-91] und BARBAS^[89,92,93] zur Prolin-katalysierten intermolekularen, direkten Aldolreaktion zwischen Aldehyden und Ketonen wurde erkannt, dass sich diese Enaminbildung durch Zugabe geeigneter Additive beschleunigen lässt.^[272,273,287] Als vielversprechende Cokatalysatoren zeigten sich hierbei Brønstedsäuren. So konnten CHIMNI *et al.* zeigen, dass Prolinderivate der allgemeinen Struktur (*S*)-**72** als Katalysatoren der AAR höhere Umsätze und Selektivitäten liefern, sobald diese durch die Zugabe von Protonensäuren in die korrespondierenden Iminiumspezies (*S*)-**72**·**AH** überführt werden (Schema 2.36).^[115,275,276]



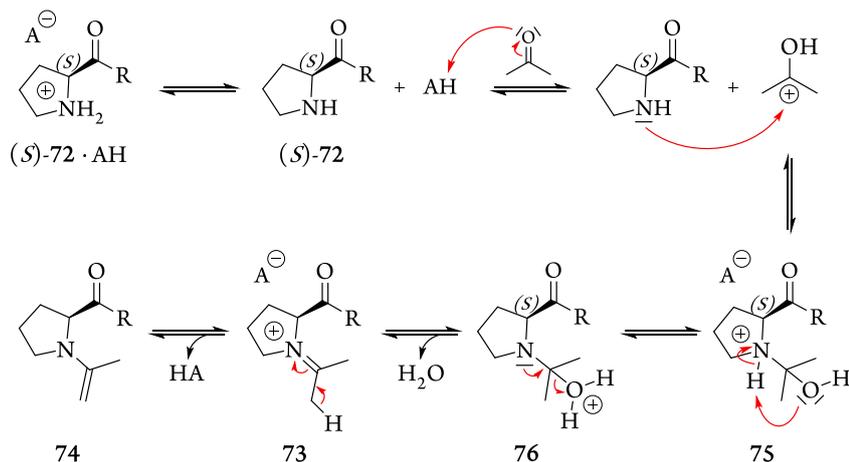
Schema 2.36. Umsetzung von 4-Nitrobenzaldehyd **32** und Aceton in einer durch ein protoniertes, chirales Prolinamid katalysierten asymmetrischen Aldolreaktion.

Obwohl die erhöhte Katalysatoreffizienz von (*S*)-**72**·**AH** im Vergleich zu (*S*)-**72** aufgrund der durch die Protonierung am Pyrrolidinstickstoff herabgesetzten Nucleophilie im Kontext eines nucleophilen Angriffs auf Aceton und der Ausbildung einer entsprechenden Iminiumverbindung (analog Struktur **70** aus Schema 2.35) dabei zunächst kontraintuitiv erscheint, lässt sich die beobachtete Reaktionsdynamik auf Basis des in Schema 2.37 dargestellte Dissoziationsgleichgewicht erklären.^[115]



Schema 2.37. Dissoziationsgleichgewicht zwischen (*S*)-**72**·**AH** und (*S*)-**72**.

Analog zu klassischen Iminsynthesen durch die Kondensation von Aminen mit Carbonylverbindungen lässt sich die Iminium- (Strukturen **70** und **73**) bzw. Enaminbildung (Strukturen **69** und **74**) zwar unter neutralen Bedingungen realisieren, der Vorgang kann jedoch protonenkatalysiert durch die Aktivierung der Carbonylkomponente beschleunigt werden (Schema 2.38).^[272,273,288]



Schema 2.38. Mechanismus der Enaminbildung zwischen einem protonierten Prolinderivatkatalysator $(S)\text{-72}\cdot\text{AH}$ und Aceton.

Die Verwendung eines protonierten Organokatalysators der allgemeinen Struktur $(S)\text{-72}\cdot\text{AH}$ – beispielsweise durch die *in situ* Neutralisation desamins mit einer entsprechenden Säure im Reaktionsgemisch der AAR – führt durch die vorgelagerte Dissoziation zu $(S)\text{-72}$ und HA zur Aktivierung der Carbonylverbindung (im vorliegenden Beispiel aus Schema 2.38 Aceton) durch Protonierung. Das protonierte Aminol 75 reagiert anschließend unter Umprotonierung zur kationischen Spezies 76 weiter, welche unter Wasserabspaltung die Iminiumverbindung 73 bildet. Die Deprotonierung von 73 führt abschließend zur Regenerierung des katalytischen Protons sowie Enamin 74 , welches unter den Bedingungen der AAR mit einer Akzeptorkomponente weiterreagieren kann (siehe Schema 2.35). In welcher Größenordnung der Umsatz bei der Verwendung protonierter Organokatalysatoren gesteigert werden kann hängt dabei zwar auch von allgemeinen Reaktionsparametern wie dem verwendeten Lösungsmittel, welches die Dissoziation begünstigen oder hemmen kann, ab, von MAYER und SPENCER wurde jedoch gefunden, dass die nucleophile Katalyse im Allgemeinen umso effektiver wird, je weiter die Basenstärke des Aminkatalysators abgesenkt wird.^[115,276,289]

Neben der Auswirkung auf die Reaktionskinetik durch Verschieben der Gleichgewichtslage auf Seiten des Enaminintermediates 69 beeinflussen Brønstedtsäurekatalysatoren indirekt auch den stereoselektiven Ausgang der asymmetrischen Aldolreaktion. Allen Prolinamid-basierten Organokatalysatorsystemen ist das Strukturmotiv des Pyrrolidinrings gemein, dessen intrinsische Basizität zur Bildung racemischen Aldolproduktes gemäß den klassischen Bedingungen der basenkatalysierten Aldoladdition führen kann.^[288,290] Diese unselektive Nebenreaktion lässt sich durch die Ausbildung der Pyrrolidiniumspezies $(S,S)\text{-27}\cdot\text{AH}$ unterdrücken.^[273]

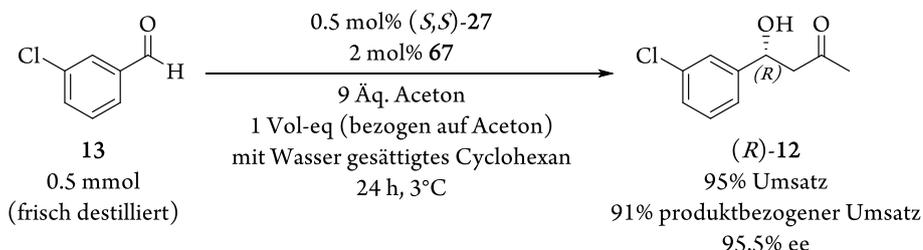
Die Auswahl des Säureadditives richtet sich hierbei nach dem Derivatisierungsmuster des ProlinGrundgerüsts, welches einerseits den pK_a -Wert des Pyrrolidinrings leicht verändert. Andererseits besitzen die Donorsubstituenten der Seitenkette moderner Katalysatoren funktionelle Gruppen mit Säure/Base-Motiven, wobei bereits kleine Änderungen die Ausbildung der stabilisierenden Wasserstoffbrücken (siehe Struktur 68) beeinflussen kann.

Eine exakte Voraussage des effektivsten Säurecokatalysators, der die unselektive Basenkatalyse unterdrücken kann ohne die Potenz des Organo-katalysators durch verminderte Ausbildung von Wasserstoffbrücken herabzusetzen, gestaltet sich aus diesem Grund schwierig. Üblicherweise werden in der Literatur deshalb äquimolare Gemische aus einem gegebenen Organokatalysator mit Additiven unterschiedlicher Säurestärken auf ihre katalytische Aktivität und Selektivität hin untersucht. In vielen Fällen lassen sich so Protonensäuren mäßiger Stärke, wie Essigsäure^[116,120,284,287,291] ($pK_a=4.76$)^[292] oder Benzoesäure ($pK_a=4.2$)^[292] bzw. ihre Derivate^{*, [118,124,125,127,272,279,281,287,296,297]} als optimale Cokatalysatoren für die AAR zwischen Benzaldehyden und Aceton bzw. Cyclohexan unter Einsatz eines Prolinamidkatalysators identifizieren. Da sich mit verschiedenen Benzoesäurederivaten sehr feinschrittig eine große Bandbreite an pK_a -Werten abdecken lässt, eignet sich diese Stoffklasse im Besonderen für die genaue Abstimmung der Säurestärke des Cokatalysators auf die Eigensäurekonstante des verwendeten Organokatalysators.

* Die pK_a -Werte von Benzoesäurederivaten unterscheiden sich je nach Substitutionsmuster und Funktionalität, wobei die jeweiligen ortho-substituierten Verbindungen aufgrund des Nachbargruppeneffektes die stärksten Säuren darstellen.^[293] Hier einige Beispiele (BS=Benzoessäure): $pK_a = 2.05$ (2-Amino-BS), 3.07 (3-Amino-BS), 2.38 (4-Amino-BS);^[294] 2.21 (2-Nitro-BS), 3.46 (3-Nitro-BS), 3.40 (4-Nitro-BS); 2.98 (2-Hydroxy-BS), 4.12 (3-Hydroxy-BS), 4.54 (4-Hydroxy-BS), 3.89 (2-Methyl-BS), 4.28 (3-Methyl-BS), 4.35 (4-Methyl-BS).^[295]

2.3.3 Untersuchungen zum Einfluss der Autoxidation des Substrates auf die Reaktionsdynamik der Aldolreaktion

Eine kritische Betrachtung der Rohproduktspektren der in Kapitel 2.3.2.2 etablierten asymmetrischen Aldolreaktion (AAR) zwischen 3-Chlorbenzaldehyd (**13**) und Aceton in Cyclohexan (Schema 2.39) zeigt eine besondere Auffälligkeit.



Schema 2.39. Darstellung von (*R*)-**12** in Cyclohexan unter Zugabe von 2 mol% der zur Ausgangsverbindung **13** korrespondierenden Benzoesäure **67**.

So können nach 24 Stunden in allen Versuchen Säureanteile bestimmt werden, die minimal über denen der anfänglich verwendeten Stöchiometrien liegen. Selbst bei der Verwendung säurefreien 3-Chlorbenzaldehyds (**13**) finden sich Spuren ($\approx 1\%$) der korrespondierenden 3-Chlorbenzoesäure (**67**, Abbildung 2.21), während sich der Anteil bei Versuchen unter Einsatz von 2-5 mol% 3-Chlorbenzoesäure nach 24 Stunden im Schnitt um 1-3% erhöht.

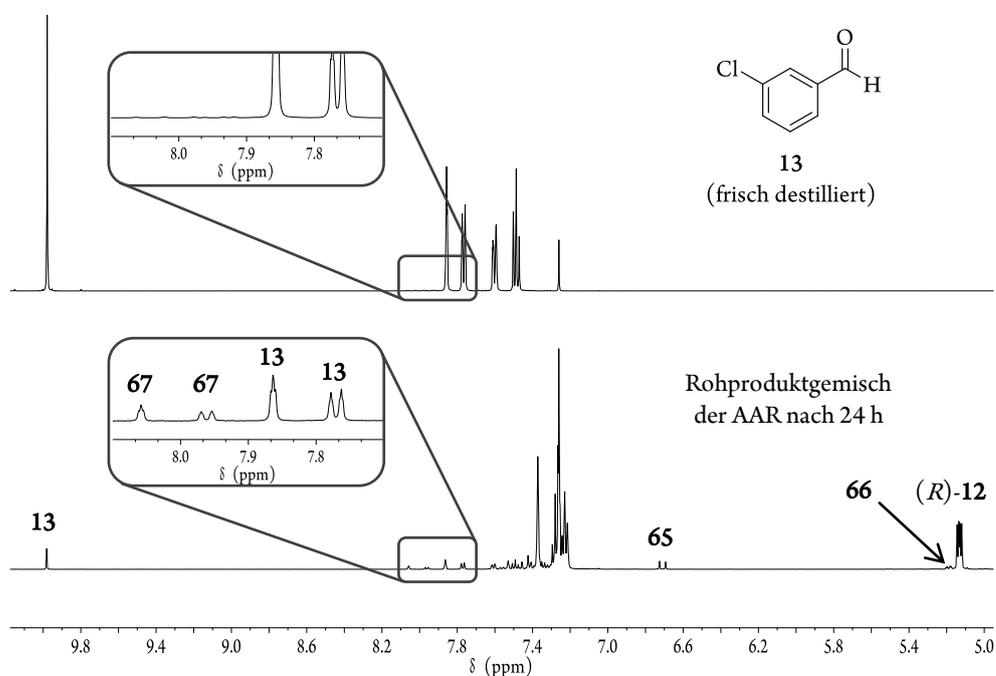
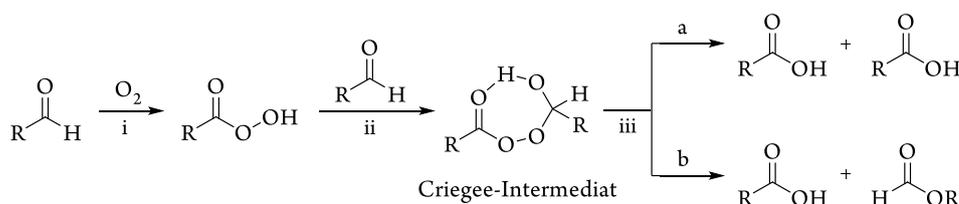


Abbildung 2.21. Vergleich der Spektren frisch destillierten 3-Chlorbenzaldehyds (**67**, oben) und dem Rohproduktgemisch der AAR (unten). Der Übersichtlichkeit halber wird auf die Darstellung des gesamten Messbereichs verzichtet und ausschließlich Signale zwischen 5.0 und 10.1 ppm gezeigt.

Da, wie bereits gezeigt, selbst geringe Mengen 3-Chlorbenzoesäure (**67**) einen signifikanten Einfluss auf die Reaktionsdynamik der AAR ausüben, kann unter Einbezug der literaturbekannten Oxidationsempfindlichkeit von Aldehyden^[298] vermutet werden, dass der Cokatalysator auch durch Autoxidation des Substrates *in situ* gebildet werden kann. Im Folgenden wird überprüft, ob die autoxidative Cokatalysatorgenerierung in signifikantem Maße auftritt.

2.3.3.1 Exkurs 2) Theoretische Betrachtung der Aldehydoxidation

Die aerobische Oxidation von Aldehyden mit Luftsauerstoff gehört mit einer Atomeffizienz von bis zu 100% zu den effektivsten Reaktionen der organischen Chemie (Schema 2.40).^[131,299] Jüngste Veröffentlichungen berichten in diesem Zusammenhang von katalysator- und solvensfreien Durchführungen,^[300,301] die allen Kriterien der „Grünen Chemie“ genügen.^[302]



Schema 2.40. Reaktionsschema der aerobischen Oxidation von Aldehyden. i) (freie) Radikalkettenreaktion; ii) nucleophile Addition; iii) Umlagerung über a) Hydrid- oder b) Alkyl/Arylwanderung.

Bei tendenziell zwei möglichen Umlagerungsmöglichkeiten (Pfad a und b, Schema 2.40, Schritt iii) des hierbei aus dem Aldehyd und Sauerstoff gebildeten Criegee-Intermediates dominiert in den meisten Fällen die Hydridwanderung (Pfad a), wodurch ein stöchiometrischer Umsatz zur korrespondierenden Säure ermöglicht wird.^[300,301]

Im industriellen Maßstab werden Aldehydoxidationen zumeist in organischen Solventien durchgeführt, wobei ein Sauerstoffgasstrom durch die Lösung geleitet wird. Als geschwindigkeitslimitierender Schritt kann der Sauerstoffmassentransfer aus der Gasphase identifiziert werden,^[301] da die Konzentration molekularen Sauerstoffs in allen gängigen Lösungsmitteln gering ist.^[303,304] Wird jedoch ein ausreichender Massentransfer gewährleistet, können in kürzester Zeit große Mengen Aldehyd oxidiert werden. Während VANOYE sich die Oberflächenvergrößerung innerhalb eines Durchflussreaktors zunutze machte,^[300] wurde von SHAPIRO eine elegante Methode der Oxidation „an Wasser“ vorgestellt (Schema 2.41).^[298]



Schema 2.41. Oxidation von Benzaldehyd an Wasser.

Durch die Bildung einer fein verteilten Emulsion nicht-wassermischbaren Benzaldehyds mit Wasser wird eine analoge Oberflächenvergrößerung erreicht, die den direkten Massentransfer von Luftsauerstoff in die Substratphase ermöglicht. Auf diesem Weg können innerhalb von 12 Stunden 83% Benzaldehyd oxidiert werden,^[298] während im solvensfreien Verfahren nach VANOYE innerhalb von 15 Minuten 5% Benzoesäure generiert werden.

2.3.3.2 Aerobe Oxidation von 3-Chlorbenzaldehyd (13) im wässrigen und organischen Milieu

Ob die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse der aeroben Oxidation von Benzaldehyd^[298] mit Luftsauerstoff auf 3-Chlorbenzaldehyd (13) übertragbar sind, kann anhand von Oxidationskinetiken in verschiedenen Lösungsmittelsystemen überprüft werden. Zum einen lässt sich so feststellen, ob sich die Oxidationsempfindlichkeit unsubstituierter Benzaldehyds auf das in dieser Arbeit verwendete Chlorderivat übertragen lässt. Zum anderen können vergleichende Studien zeigen, ob auch dann ein ausreichender Sauerstoffmassentransfer gewährleistet ist, wenn der Aldehyd in einem organischen Solvens gelöst vorliegt.

Unter exakt gleichen Versuchsbedingungen wie sie in Kapitel 2.3.2.2 zur Darstellung von (*R*)-12 beschrieben sind, wird der Fortschritt der Säurebildung durch Autoxidation frisch destillierten 3-Chlorbenzaldehyds (13) sowohl in gesättigter Natriumchloridlösung als auch in Cyclohexan NMR-spektroskopisch erfasst (Abbildung 2.22). Einzig der Organokatalysator (*S,S*)-27 wird nicht zugesetzt, um die Oxidation unabhängig von der asymmetrischen Aldolreaktion (AAR) untersuchen zu können.

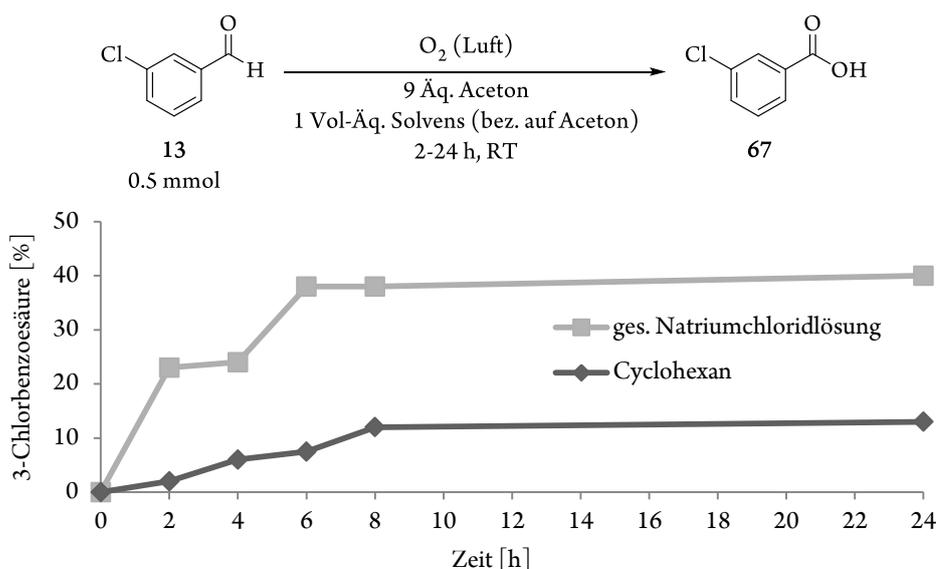


Abbildung 2.22. Autoxidationskinetik von 3-Chlorbenzaldehyd (13) in gesättigter Natriumchloridlösung und Cyclohexan.

Im heterogenen Gemisch des in früheren Arbeiten etablierten, wässrigen Benchmarksystems mit gesättigter Natriumchloridlösung^[61,65,128] lassen sich die Ergebnisse SHAPIROS bestätigen.^[298] Wie bei der Verwendung von Benzaldehyd an Wasser zeigt auch die Emulsion aus 3-Chlorbenzaldehyd und Natriumchloridlösung einen raschen Verlauf der aeroben Oxidation. Bereits nach zwei Stunden ist beinahe ein Viertel, nach 24 Stunden 40% des Substrates autoxidativ zur Säure umgesetzt. Im Vergleich hierzu zeigt das homogene Gemisch aus 3-Chlorbenzaldehyd in Cyclohexan zwar ebenfalls einen steten Anstieg der Säurekonzentration, der Stoffmengenanteil an 3-Chlorbenzoessäure liegt jedoch zu jedem Messzeitpunkt unterhalb des Wertes im wässrigen Milieu.

Um den beobachteten Lösungsmittelleffekt erklären zu können bedarf es neben der verallgemeinerten, qualitativen Literaturlausage bezüglich der generell schlechten Löslichkeit molekularen Sauerstoffs in gängigen Lösungsmitteln^[303,304] der genaueren Kenntnis der lokalen Sauerstoffkonzentrationen.

Während die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser gut untersucht ist, finden sich nur wenige Arbeiten, die organischer Solventien bezüglich ihres Lösungsvermögens für Sauerstoff untersucht haben.^[305-308] Diese ursprünglich in Ostwald-Koeffizienten ausgedrückten Werte^[309,310] wurden von BATTINO in einem Übersichtsartikel zusammengefasst, auf ein einheitliches Bezugssystem referenziert und als stoffmengenanteilige Löslichkeiten ausgedrückt um so ein breites Spektrum an Lösungsmitteln abzubilden.^[303] Für die Sauerstofflöslichkeit in Wasser, ausgedrückt in Millilitern Sauerstoff pro Liter, ergibt sich so:

$$c \left[\frac{mL}{L} \right] = \frac{\chi_1 \cdot 4.689 \cdot 10^6}{V_T^0 \left[\frac{mL^3}{mol} \right]} \quad (1)^{[303]}$$

mit χ_1 = Molenbruch von Sauerstoff bei einem Partialdruck von 101.325 kPa; V_T^0 = molares Volumen von Wasser bei der Temperatur T.

Um hieraus einen für alle Lösungsmittel gültigen Term zu generieren, wird Gleichung 1 wie folgt um stoffspezifische Kenngrößen erweitert:

$$c = \frac{\chi_1 \cdot V_L \left[\frac{L}{mol} \right] \cdot F_{O_2} \cdot \rho_{O_2} \left[\frac{kg}{m^3} \right]}{\frac{M_S \left[\frac{g}{mol} \right]}{\rho_S \left[\frac{g}{mL} \right]} \cdot M_{O_2} \left[\frac{g}{mol} \right]} \quad (2)$$

mit χ_1 = Molenbruch von Sauerstoff bei einem Partialdruck von 101.325 kPa; V_L = molares Volumen von Luft; F_{O_2} = Faktor des anteiligen Sauerstoffvolumens an Luft; ρ_{O_2} = Dichte von Sauerstoff; M_S = Molekulargewicht des Lösungsmittels; ρ_S = Dichte des Lösungsmittels; M_{O_2} = Molekulargewicht von Sauerstoff.

Mit $V_L = 22.4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (molares Volumen eines idealen Gases bei Normbedingungen),^[311] $F_{O_2} = 0.2094$ (Volumenanteil an Sauerstoff in trockener Luft bei $p = 101.325 \text{ kPa}$),^[303] $\rho_{O_2} = 1.429 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ (Dichte von Sauerstoff bei Normbedingungen)^[312] und $M_{O_2} = 32 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ergibt sich nach Umformung:

$$c \left[\frac{mol}{mL} \right] = \frac{\chi_1 \cdot 4.69 \cdot 10^3 \left[\frac{mL}{mol} \right] \cdot 0.001429 \left[\frac{g}{mL} \right]}{\frac{M_S \left[\frac{g}{mol} \right]}{\rho_S \left[\frac{g}{mL} \right]} \cdot 32 \left[\frac{g}{mol} \right]} \quad (3)$$

mit χ_1 = Molenbruch von Sauerstoff bei einem Partialdruck von 101.325 kPa;^[303] M_S = Molekulargewicht des Lösungsmittels; ρ_S = Dichte des Lösungsmittels.

Bei 25°C ergibt sich so für Wasser mit $\chi_1 = 2.3 \cdot 10^{-5}$ eine Sauerstoffkonzentration von $0.27 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$. Für Aceton ($\chi_1 = 8.4 \cdot 10^{-4}$) und Cyclohexan ($\chi_1 = 12.34 \cdot 10^{-4}$) werden bei gleicher Temperatur jeweils $c = 2.40 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ erhalten. Obwohl kleinere Näherungen wie die Annahme von Luft als idealem Gas oder die Verwendung von sauerstoffspezifischen Kenngrößen, die für das Gas bei 0°C gelten, in die Berechnung einfließen, stimmen die Rechenergebnisse mit den von QUARANTA empirisch gefundenen Werten für Wasser und Aceton überein, weshalb auch die errechnete Sauerstoffkonzentration in Cyclohexan als ausreichend valide angenommen werden kann.^[304]

Bei der Verwendung der organischen Solventien liegt die Sauerstoffkonzentration insgesamt rund neunmal höher als in Wasser, die Oxidationsgeschwindigkeit sowie der erzielte Umsatz sind jedoch in Wasser wesentlich höher. Dieses kontraintuitive Ergebnis lässt sich mit der Emulsionsbildung des Aldehyds in Wasser erklären. Hierdurch ist nicht die Sauerstoffkonzentration in Wasser, sondern vielmehr die verfügbare Menge an Sauerstoff aus der Luft relevant.

Für die Synthese von (*R*)-**12** wird ein verschlossener Kolben mit 10 mL Nennvolumen, sowohl während der AAR als auch für die obigen Oxidationsversuche, benutzt. Das jeweils verwendete Acetonvolumen beträgt 337 μL , hinzu kommen 337 μL gesättigter Natriumchloridlösung bzw. Cyclohexan sowie 71 μL 3-Chlorbenzaldehyd. Da das Totvolumen des Kolbenhalses das Gesamtvolumen der Edukte und Lösungsmittel übersteigt, kann letzteres für die Berechnung der Sauerstoffmenge in der Gasphase des Reaktionsgefäßes vernachlässigt werden. Für 10 mL Luft ergibt sich mit einem Sauerstoffvolumenanteil von 20.94%, einer Dichte von $1.423 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ und einem Molekulargewicht von $32 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ eine Stoffmenge von $n = 93.12 \mu\text{mol}$ an molekularem Sauerstoff. Bei einer Atomeffizienz von 100% stehen somit $186.24 \mu\text{mol}$ atomaren Luftsauerstoffs zur Autoxidation des Aldehyds zur Verfügung. Dem gegenüber stehen im wässrigen 1.80 μmol bzw. im rein organischen Milieu 3.24 μmol atomaren Sauerstoffs.

Da die in der flüssigen Phase gelöste Sauerstoffmenge bei einer Ansatzgröße von 0.5 mmol 3-Chlorbenzaldehyd in beiden Systemen weniger als 1% Säure generieren kann, ist für die Autoxidation des Aldehyds ausschließlich die verfügbare Menge an Luftsauerstoff ausschlaggebend. Hierbei bestätigen sich am vorliegenden Modellsystem die von SHAPIRO für andere Aldehyde gefundenen Ergebnisse:^[298] Während die Oxidation des Aldehyds an Wasser einer Umsetzung in Substanz entspricht,^{*} ist die Oxidationsrate im organischen Solvens durch den Sauerstoffmassentransport von der Gas- in die organische Phase limitiert.

In gleichem Maße lässt sich die verminderte Oxidationsgeschwindigkeit im wässrigen System ab sechs Stunden Reaktionszeit erklären. So bildet die entstehende Säure **67** durch Ausfällung (Schmelzpunkt: 153-157°C, Löslichkeit in Wasser: 0.3-0.4 g/L)^[168] an der Luft/Substrat-Grenzphase eine feste Schicht, die den Sauerstofftransport zunehmend einschränkt. Unter Einbezug der größten Fehlerquellen bei Berechnung der Gesamtsauerstoffmenge, insbesondere der nicht exakt quantifizierten externen Zustandsgrößen wie beispielsweise des Luftvolumens im Kolben, kann aufgrund des verfügbaren Sauerstoffs (im geschlossenen System 186 μmol + Anteil, der im Solvens gelöst ist) dennoch von einem Maximalumsatz von circa 40% (500 μmol Ansatz **13**) ausgegangen werden, welcher nach sechs Stunden bereits beinahe erreicht ist.

^{*} Siehe Kapitel 6.3.1.2.3: Bei der solvensfreien Oxidation von 3-CBA mit Luftsauerstoff wird nach 24 h im offenen Kolben ein Umsatz von 43% detektiert.

2.3.3.3 Vermeidung der Cokatalysatorgenerierung durch Autoxidation: Asymmetrische Aldolreaktion unter Ausschluss von Sauerstoff

Um den Einfluss der autoxidativ gebildeten 3-Chlorbenzoesäure während der AAR zu quantifizieren, werden Versuche unter Sauerstoffausschluss durchgeführt. Frisch destillierter, säurefreier 3-Chlorbenzaldehyd wird sowohl im wässrigen als auch im organischen Benchmarksystem mit Aceton umgesetzt. Vor der Verwendung werden die Lösungsmittel sowie Aceton durch wiederholte Ultraschallcyclen unter Unterdruck entgast. Zwischen den Cyclen wird mit Argon belüftet und das Schutzgas durch die jeweiligen zu entgasenden Stoffe geleitet. Die AAR wird nach mehrmaligem Tauschen der Atmosphäre im Reaktionskolben unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt und mit den entsprechenden, nicht entgasten Gemischen verglichen.

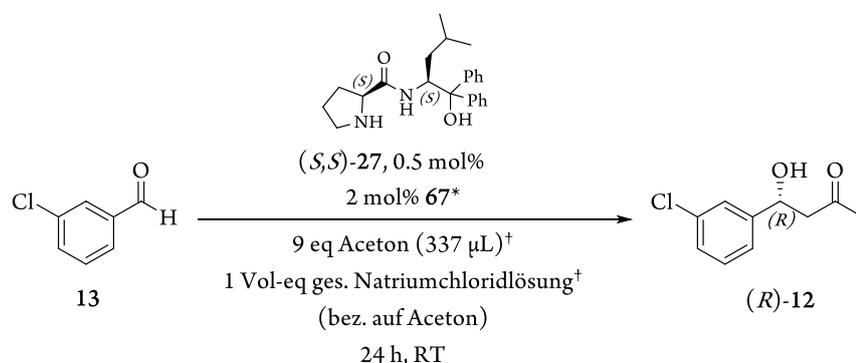


Tabelle 2.3. Einfluss der Autoxidation auf die Synthese von (R)-12 im wässrigen Medium (* = optionale Zugabe; † = optional entgast).

Eintrag	Zugabe von 67	Solvens entgast	U _{ges} ^{a)} [%]	U _{Pr} ^{b)} [%]	65 ^{c)} [%]	66 ^{d)} [%]	67 ^{e)} [%]	ee ((R)-12) [%]
1 ^{f)}	×	✓	68	59	0	9.5	0	82.5
2	×	×	82	71.5	0.5	10	0.5	82
3 ^{f)}	✓	✓	91.5	83.5	4	2.5	1	93
4	✓	×	90	83	3	2.5	1	94

a) Gesamtumsatz bezogen auf den Verbrauch des Substrates **13**; b) Produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von (R)-12; c) Substanzbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung des Alkens **65**; d) Substanzbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung des Bis-Aldolproduktes **66**; e) während der Reaktionsdauer durch Autoxidation erzeugter Anteil der Säure am Rohprodukt; f) Reaktion unter Schutzgas.

Im wässrigen Medium kann hierbei ein signifikanter Umsatzrückgang beobachtet werden, sobald die Reaktion unter Sauerstoffausschluss durchgeführt wird. Während für die AAR unter Luftausschluss ein Umsatz von 68% detektiert wird, liegt dieser im aeroben System bei 82% (vergleiche Tabelle 2.3 Eintrag 1 und 2). Die Ergebnisse korrelieren hierbei mit der autoxidativen Bildung geringer Mengen an 3-Chlorbenzoesäure (**67**) im letzteren System.

Wird die Säure **67** bereits zu Beginn der Reaktion zugefügt, unterscheiden sich die Umsatzraten der aeroben und anaeroben Durchführung nur marginal (vergleiche Tabelle 2.3 Eintrag 3 und 4), jedoch erhöht sich die Enantiomerenreinheit des Aldolproduktes um mehr als 10% ee. Gleichzeitig wird die Bildung des Nebenproduktes **66** um den Faktor vier verringert (vergleiche Tabelle 2.3 Eintrag 2 und 4). Dadurch, dass das Säureadditiv erst während der Reaktion gebildet wird, gewinnen sowohl die Aldoladdition von Aceton an (*R*)-**12** als auch die basenkatalysierte, unselektive Aldolreaktion zum racemischen Produkt *rac*-**12** an Bedeutung (siehe hierzu auch Exkurs 1 in Kapitel 2.3.2.3).^[288,290] Beide Effekte sind in der Eigenbasizität des Prolinamidkatalysators begründet. Solange keine Säure die Basizität des Imidazolringes von (*S,S*)-**27** neutralisiert, kann (*S,S*)-**27** als Brønstedbase durch Deprotonierung von Aceton die Bildung von Propen-2-olat ermöglichen, welches entgegen des Enaminmechanismus⁴ zur Bildung von *rac*-**12** führt. Da das Aldolprodukt **12** eine minimal höhere CH-Acidität als Aceton aufweist,^{*} ist die Enolbildung durch Deprotonierung weiter begünstigt und führt in Abwesenheit von **67** zur erhöhten Bildung von **66**.

Obwohl die Oxidationskinetik von 3-Chlorbenzaldehyd (**13**) in gesättigter Natriumchloridlösung einen raschen Anstieg der 3-Chlorbenzoesäure-Konzentration zeigt (siehe Abbildung 2.22), werden bei aerober Reaktionsführung der AAR nach 24 Stunden lediglich 0.5 mol% der Säure detektiert (Tabelle 2.3, Eintrag 2). Da die Versuche bei standardisierter Rührgeschwindigkeit und gleichen Bedingungen durchgeführt werden, lässt sich als einziger Unterschied die Anwesenheit des Prolinamids (*S,S*)-**27** ausmachen. Gründe für den Einfluss des Organokatalysators auf die Oxidationsrate des Aldehyds – denkbar wäre beispielsweise eine Aggregatbildung mit dem Substrat **13** – können zum jetzigen Zeitpunkt nicht genannt werden. Festzuhalten bleibt aber, dass bereits 0.5 mol% 3-Chlorbenzoesäure (**67**) ausreichen, um die Produktbildung zu beschleunigen.

Analog zu den Versuchen im wässrigen Milieu zeigen sich in Cyclohexan die gleichen Tendenzen: Die optische Reinheit des Aldolproduktes (*R*)-**12** ist im anaeroben System durch die Abwesenheit des Säurecokatalysators **67** vermindert, sowohl Gesamt- als auch produktbezogener Umsatz liegen niedriger als beim analogen Versuch an Luft (vergleiche Tabelle 2.4 Eintrag 1 und 2). Im organischen Solvens sind diese Effekte jedoch stärker ausgeprägt als im wässrigen Vergleichssystem (vergleiche Tabelle 2.3 Eintrag 1 und 2 mit Tabelle 2.4 Eintrag 1 und 2).

Generell ist festzustellen, dass im Organischen alle (Neben)Reaktionen langsamer ablaufen. Während in gesättigter Natriumchloridlösung unter Sauerstoffausschluss nach 24 Stunden ein produktbezogener Umsatz von 59% erreicht wird, liegt dieser in Cyclohexan bei lediglich 30%. Gleichzeitig werden nur 2.5% des Bis-Aldolproduktes **66** erhalten, welches im Wässrigen bei analoger Versuchsführung einen Anteil von 10% am Rohproduktgemisch ausmacht. Im Gegensatz zum wässrigen System liegen in Cyclohexan alle Substanzen nebeneinander in einer homogenen Phase vor, wodurch die Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit durch den hydrophoben Effekt einer Substratemulsion in Wasser nicht zum Tragen kommt.^[129,274]

^{*} Grundlage ist die Berechnung der Azidität des α -Protons mit Hilfe des strukturbasierten Berechnungszusatzmoduls zum Marvin[®] Zeichenprogramm von ChemAxon.^[313] pK_a (CH_3 , Aceton) = 25, (CH_2 , **12**) = 24.

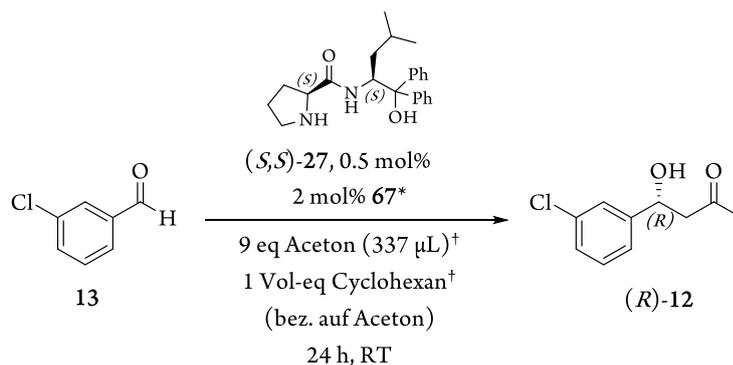


Tabelle 2.4. Einfluss der Autoxidation auf die Synthese von (*R*)-**12** im organischen Medium (* = optionale Zugabe; † = optional entgast).

Eintrag	Zugabe von 67	Solvens entgast	U _{ges} ^{a)} [%]	U _{Pr} ^{b)} [%]	65 ^{c)} [%]	66 ^{d)} [%]	67 ^{e)} [%]	ee ((<i>R</i>)- 12) [%]
1 ^{f)}	×	✓	33	30	1	2.5	0	76.5
2	×	×	51	46	2	3	0.5	79.5
3 ^{f)}	✓	✓	93	84	6	2.5	1	83
4	✓	×	94	86	4	2.5	1	83

a) Gesamtumsatz bezogen auf den Verbrauch des Substrates **13**; b) Produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von (*R*)-**12**; c) Substanzbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung des Alkens **65**; d) Substanzbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung des Bis-Aldolproduktes **66**; e) während der Reaktionsdauer durch Autoxidation erzeugter Anteil der Säure am Rohprodukt; f) Reaktion unter Schutzgas.

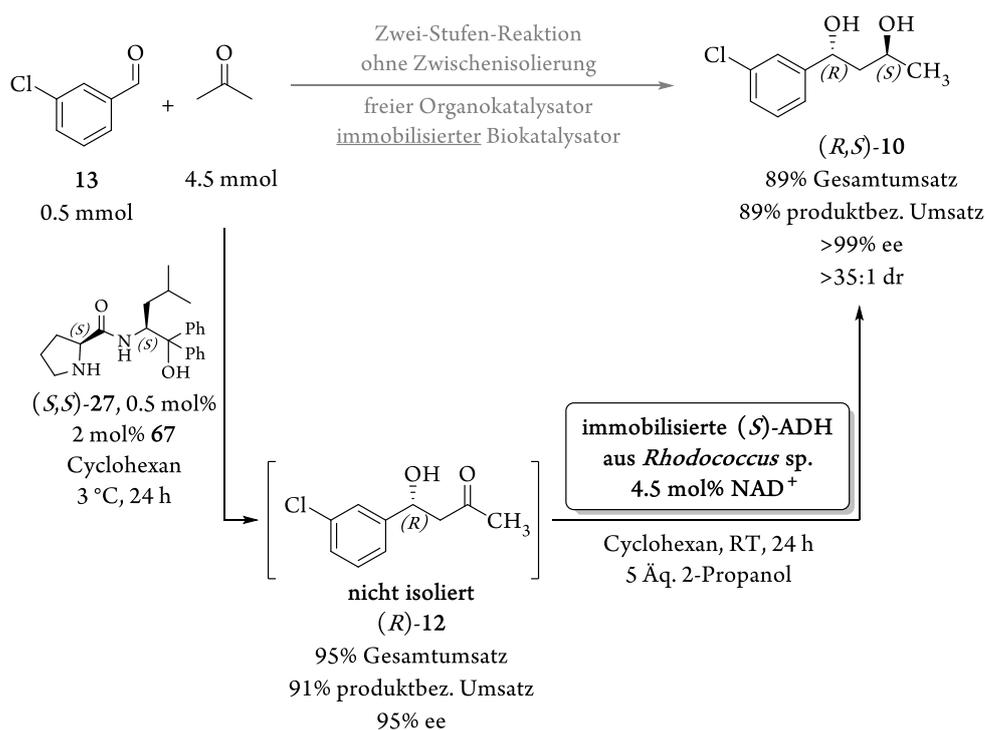
Festzuhalten bleibt, dass die Anwesenheit von (Luft)Sauerstoff bei der AAR zwischen 3-Chlorbenzaldehyd und Aceton einen signifikanten Einfluss auf die Reaktionsdynamik besitzt. Durch Autoxidation des Aldehyds werden auf der Zeitachse der Reaktion geringe Mengen an 3-Chlorbenzoesäure gebildet, welche als Brønstedsäure sowohl geschwindigkeits- als auch selektivitätssteigernd auf die Bildung von (*R*)-**12** wirken.

Da die Oxidationsempfindlichkeit von Aldehyden in der Literatur gut beschrieben ist,^[131,298-301] kann vermutet werden, dass die Generierung geringer Mengen an Säure durch Luftsauerstoff auch in anderen Modellsystemen der AAR zwischen Aldehyden und Ketonen einen Einfluss auf die beschriebenen Umsätze und Enantiomerenüberschüsse besitzt. So wurden in verschiedenen Veröffentlichungen zwar die jeweils korrespondierenden Säuren der für die AAR eingesetzten Aldehyde als effektive Additive identifiziert, ein Zusammenhang zur Oxidation des Aldehyds und einer *in situ* Erzeugung des Säurekatalysators wurde aber nicht hergestellt.^[118,124,127,279,281,296,297]

2.3.4 Chemoenzymatische Zwei-Stufen-Eintopf-Synthese des Diols (1*R*,3*S*)-10

Nachdem durch die Realisierung der asymmetrischen Aldolreaktion zwischen 3-Chlorbenzaldehyd und Aceton in Cyclohexan die Kompatibilität mit der in dieser Arbeit etablierten Biotransformation des Aldolproduktes (*R*)-12 durch die am Superabsorber immobilisierte Rsp-ADH erreicht werden konnte, wird eine Prozessführung gemäß Schema 2.4 möglich. Hierbei werden beide Einzelschritte, möglichst ohne Aufarbeitung des Intermediates, in einer Zwei-Stufen-Eintopf-Synthese des Diols kombiniert.

Um die vollständige Kompatibilität der Einzelschritte zu validieren und abzuschätzen, ob sich die bei der asymmetrischen Aldolreaktion (AAR) in geringen Mengen auftretenden Nebenprodukte (siehe Kapitel 2.3.2.2) oder das zugesetzte Säureadditiv destabilisierend oder –aktivierend auf die ADH-katalysierte Biotransformation auswirken, wird zunächst die gut untersuchte, mit freiem Prolinamidkatalysator (*S,S*)-27 etablierte AAR mit der enzymatischen Reduktion durch immobilisierte Rsp-ADH in Cyclohexan kombiniert (Schema 2.42). Die Gegenwart des Organokatalysators hat, wie bereits gezeigt wurde, indes keinen Einfluss auf die Biotransformation.^[64,65]



Schema 2.42. Chemoenzymatische Darstellung von (1*R*,3*S*)-10 in Cyclohexan unter Verwendung des freien Organokatalysators (*S,S*)-27.

Die Ansatzgröße an 3-Chlorbenzaldehyd entspricht hierbei dem Benchmarksystem aus Kapitel 2.3.2.2. Das Aldolprodukt (*R*)-12 wird bei 3°C mit einem produktbezogenen Umsatz von 91% und 95% ee erhalten.

Nach dem Entfernen aller flüchtigen Bestandteile im Vakuum wird das Rohprodukt, bestehend aus (*R*)-**12** und niedermolaren Anteilen des Alkens **65**, des Bis-Aldolproduktes **66** sowie 3-Chlorbenzoesäure erneut in Cyclohexan aufgenommen. Es werden 80 mg des nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift 3 (AAV3, Kapitel 6.3.1.1.3) präparierten ADH-Immobilisates mit einer Aktivität von 0.2 U/mg zugefügt, woraus sich rechnerisch eine minimal höheren Katalysatorbelastung von 34.5 U/mmol (*R*)-**12** im Vergleich zum Benchmarksystem aus Kapitel 2.3.1.3 (32 U/mmol) ergibt. Nach 24 Stunden wird (*1R,3S*)-**10** mit einem produktbezogenen Umsatz der Biotransformation von 89% erhalten. Hierbei sind weder die erzielte Umsatzrate, noch die Enantio- oder Diastereoselektivität im Vergleich zum enzymatischen Benchmark aus Kapitel 2.3.1.3 verändert. Der produktbezogene Gesamtumsatz von 3-Chlorbenzaldehyd zu (*1R,3S*)-**10** errechnet sich so zu 81%.

Es zeigt sich, dass keine der im Rohprodukt von (*R*)-**12** enthaltenen Komponenten einen Einfluss auf die enzymatische Reduktion des Aldolproduktes mit Hilfe der heterogenisierten Rsp-ADH besitzt. Die Ergebnisse aus Kapitel 2.3.1.3 für die Verwendung des isolierten β -Hydroxyketons (*R*)-**12** können exakt reproduziert werden. Eine Aussage darüber, ob auch die aus der AAR stammenden Nebenprodukte **65** oder **66**, wie bereits in früheren Arbeiten für freie Alkoholdehydrogenasen beschrieben,^[64,65] durch die superabsorbierte Rsp-ADH zu ihren korrespondierenden Alkoholen reduziert werden, kann nicht getroffen werden. Beide Carbonylverbindungen liegen zu circa 2% im Rohproduktgemisch vor. Eine anteilige enzymatische Reduktion führt hierdurch zu Stoffmengenanteilen der Alkohole, die unterhalb der Detektionsgrenze der verwendeten NMR-spektroskopischen Umsatzbestimmung liegen.

Auf eine Extraktion, Aufarbeitung oder Aufreinigung des Rohproduktes (*R*)-**12** kann bei der vorgestellten Reaktionsführung vollständig verzichtet werden. Lediglich das Entfernen überschüssigen Acetons ist obligatorisch, um eine ungünstige Gleichgewichtslage bei der folgenden Biotransformation zu vermeiden, da nur wenige Äquivalente Isopropanol zur substratgekoppelten Cofaktorregenerierung verwendet werden.

Um diese vielversprechenden Ergebnisse auf eine Prozessführung unter kombinierter Verwendung sowohl eines immobilisierten Bio- als auch Organokatalysators übertragen zu können, wird die katalytische Aktivität verschiedener Prolinamidkatalysatoren ähnlicher Struktur motive bezüglich der AAR in Cyclohexan evaluiert. Neben dem bereits erfolgreich eingesetzten *iso*-Butylderivat (*S,S*)-**27** kommen das Phenylanalogon (*S,S*)-**43** sowie der von KRISTENSEN *et al.* an Polystyrolkugeln immobilisierte Katalysator (*S,S*)-**11** zum Einsatz (Tabelle 2.5).^[65-68]

Im Vergleich zur Katalyse mittels (*S,S*)-**27** zeigt das Phenylderivat (*S,S*)-**43** unter gleichen Versuchsbedingungen eine leicht erhöhte Produktbildungsrate und optische Reinheit des Aldolproduktes (*R*)-**12**, wobei sich die gesteigerte Katalysatoraktivität mit den Literaturdaten von VISHNUMAYA deckt.^[128,129] Mit der von KRISTENSEN heterogenisierten Version des Phenylderivates lassen sich die Ergebnisse der AAR für (*S,S*)-**27** im Rahmen der Fehlergrenzen der verwendeten Analytik jedoch exakt reproduzieren.

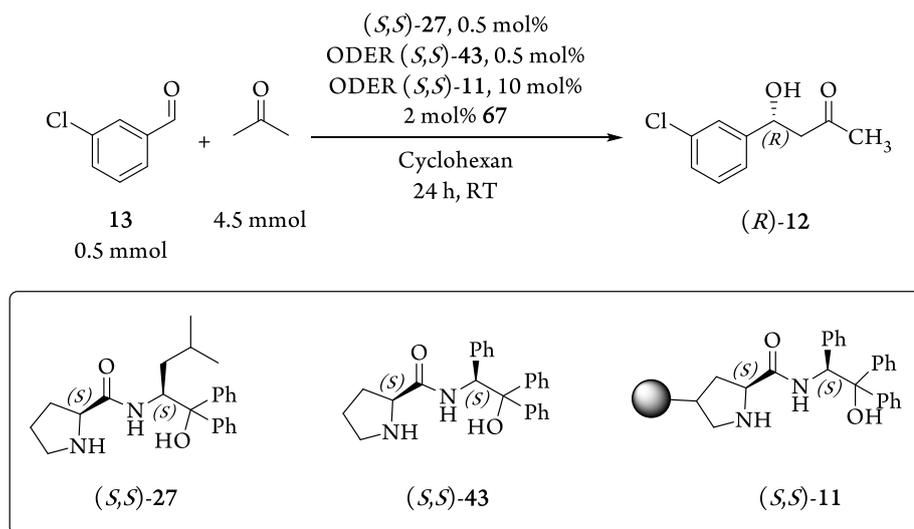


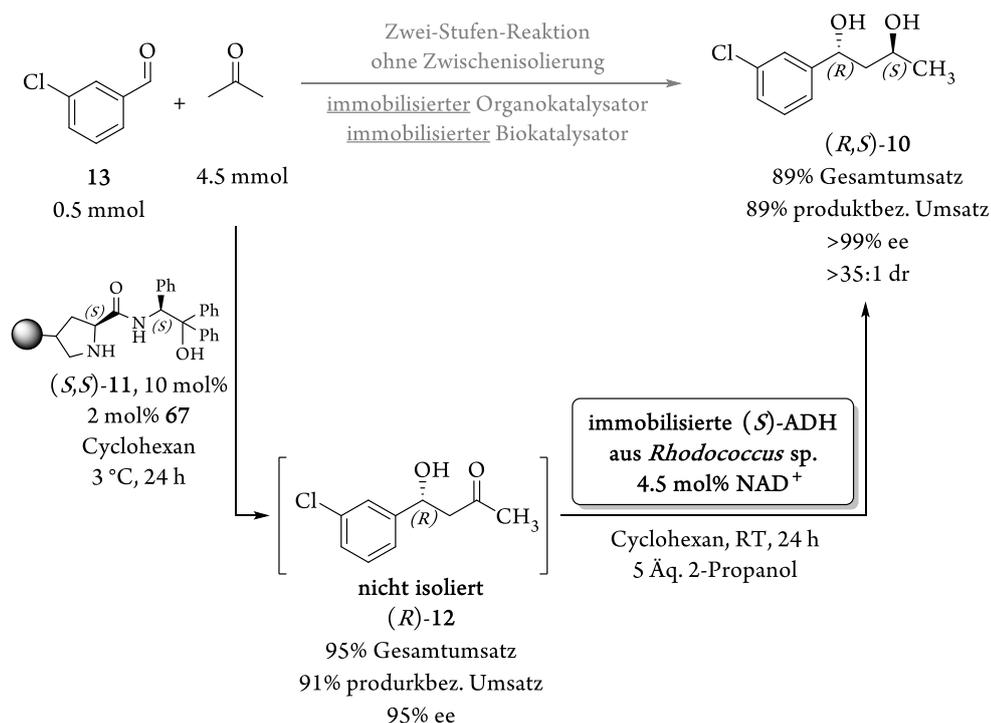
Tabelle 2.5. Darstellung von (R) -12 unter Verwendung verschiedener Prolinamidkatalysatoren in Cyclohexan.

Eintrag	Katalysator	$U_{\text{ges}}^{\text{a)}$ [%]	$U_{\text{Pr}}^{\text{b)}$ [%]	65 ^{c)} [%]	66 ^{d)} [%]	ee ((R) -12) [%]
1	(S,S) -27	95	85.5	7	2.5	84
2	(S,S) -43	94.5	89	2.5	1.5	89
3	(S,S) -11	96.5	85.5	7.5	1.5	84

a) Gesamtumsatz bezogen auf den Verbrauch des Substrates **13**; b) produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von (R) -12; c) substanzbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung des Alkens **65**; d) substanzbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung des Bis-Aldolproduktes **66**.

Die erhöhte Katalysatorbelastung von 10 mol% liegt hierbei in der Struktur des Prolinamidimmobilisates selbst begründet. Für eine Diskussion der makromolekularen Umgebung und den Herausforderungen der Copolymerisierungsmethode zur Synthese des Immobilisates sei auf die Arbeiten von RULLI und HANSEN verwiesen.^[65,69]

Die nahezu identischen Ergebnisse der (S,S) -27- und (S,S) -11-katalysierten AAR sollten die vorherigen Resultate aus Tabelle 2.5 nach Angleichen der Katalysatorbelastung für den Aldoladditionsschritt auf einen Prozess unter Verwendung sowohl des immobilisierter Organo- als auch Biokatalysators übertragbar machen (Schema 2.43). Die Durchführung des chemoenzymatischen Prozesses ist hierbei analog zu der in Schema 2.42 gezeigten. Der einzige Unterschied besteht im Abdekantieren des Rohproduktgemisches von (R) -12 vom Organokatalysatorimmobilisat und nachwaschen mit wenig Cyclohexan. Die guten Ergebnisse aus der Kombination des mit freiem Organokatalysator (S,S) -27 erhaltenen β -Hydroxyketons (R) -12 mit der nachfolgenden Biotransformation lassen sich hierbei vollständig auf den Prozess unter Verwendung heterogenisierter Katalysatorsysteme übertragen.



Schema 2.43. Chemoenzymatische Darstellung von (1*R*,3*S*)-**10** in Cyclohexan unter Verwendung des heterogenisierten Organokatalysators (*S,S*)-**11**.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die chemoenzymatische Synthese von (1*R*,3*S*)-**10** gemäß einer Prozessführung nach Schema 2.4 etabliert werden konnte. Durch Kombination des Styrol-gebundenen Prolinamidkatalysators (*S,S*)-**11** mit einer superabsorbierten Rsp-ADH kann das Diol (1*R*,3*S*)-**10** ohne Aufreinigung oder Isolierung des β -Hydroxyketonintermediates mit einem produktbezogenen Gesamtumsatz von 81% aus 3-Chlorbenzaldehyd dargestellt werden. Da die gesamte Synthesesequenz in Cyclohexan durchgeführt wird, wird das Produkt ohne Extraktion durch einfaches Entfernen des Lösungsmittels erhalten.

3 Chemoenzymatische Synthese von (*R*)-Pantolacton

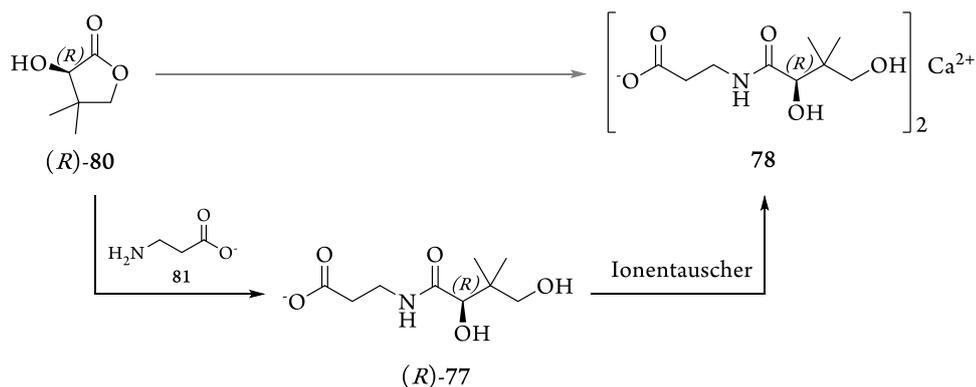
3.1 Motivation und Zielsetzung

Auf der Basis aktueller Marktzahlen gehen Analysten davon aus, dass der globale Vitaminmarkt bis 2015 einen Wert von 2.5 Milliarden Euro haben und bis 2018 eine konstante, jährliche Wachstumsrate von 6% aufweisen wird.^[314,315] Bereits heute werden jedes Jahr Vitamine im Produktionsvolumen von über 350 000 Tonnen großtechnisch hergestellt.^[316] In der langen Liste großer Vitaminproduzenten* finden sich neben mittelständischen, stark spezialisierte Firmen auch global agierende Unternehmen der weltweiten Top 50 wie Sanofi SA, Pfizer Inc., BASF SE oder Royal DSM N.V.^[314,315]

Zu den Vitaminen mit großer Anwendungsbreite gehört Vitamin B₅ ((*R*)-Pantothensäure ((*R*)-77-H)), kommerziell zumeist als D-Calciumpantothenat (**78**) vertrieben), welches als unterstützendes Therapeutikum bei Hyperlipidämie zum Einsatz kommen kann,^[317] die Wundheilung beschleunigt,^[318] in Kosmetikprodukten^[319] zu finden ist und sowohl in der Humanernährung wie auch als Supplement in Tierfutter Verwendung findet, da es als essenzieller Bestandteil des Coenzym A an vielen Prozessen im Protein-, Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel beteiligt ist.^[320,321] Insbesondere in der Futtermittelmittelsparte ist die Gewinnspanne jedoch klein: So beträgt der Marktpreis für ein Kilogramm ‚feed grade‘ D-Calciumpantothenat (z. B. von BASF unter dem Markennamen Lutavit® Calpan 98% erhältlich) im Mittel nur 6.50 Euro.^[322]

Aufgrund der geringen Gewinnmarge basiert der industriell etablierte Herstellungsprozess von **78** deshalb auf kostengünstigen Chemikalien wie Isobutanal (**79**) und dem C1-Baustein Formaldehyd, aus denen die stereogene Vorstufe (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) gewonnen werden kann.^[323-325] Das Lacton wird anschließend mit β-Alaninat (**81**) zur Pantothensäure kondensiert und an Ionentauschern zum Calciumsalz **78** umgesetzt (Schema 3.1).^[326]

* Vollständige Liste der Hauptproduzenten von Vitaminen: Adisseo France S.A.S, Archer Daniels Midland Co., 7 Day Health Corp., ABH Nature's Products Inc., AIE Pharmaceuticals Inc., Aland (Jiangsu) Nutraceutical Co. Ltd., Atlantic Essential Products Inc., Atrium Innovations Inc., Bactolac Pharmaceutical Inc., Bluebonnet Nutrition Corp., CSPC Pharmaceutical Group Ltd., Danisco A/S, Glanbia Nutritionals Deutschland GmbH, Kirkman Group Inc., Lonza Group Ltd., Nattopharma ASA, Nature's Plus, NBTY Inc., North China Pharmaceutical Corp., Nulab Inc., Nutricap Labs, Nutrilite, Nutrilo GmbH, ParkAcre Enterprises Ltd., Pharmavite LLC, Private Label Nutraceuticals LLC, Schiff Nutrition International Inc., Thorne Research Inc., Vertellus Specialties Inc. und Zhejiang Hangzhou Xinfu Pharmaceutical Co. Ltd., Sanofi SA, Pfizer Inc., BASF SE und Royal DSM N.V.

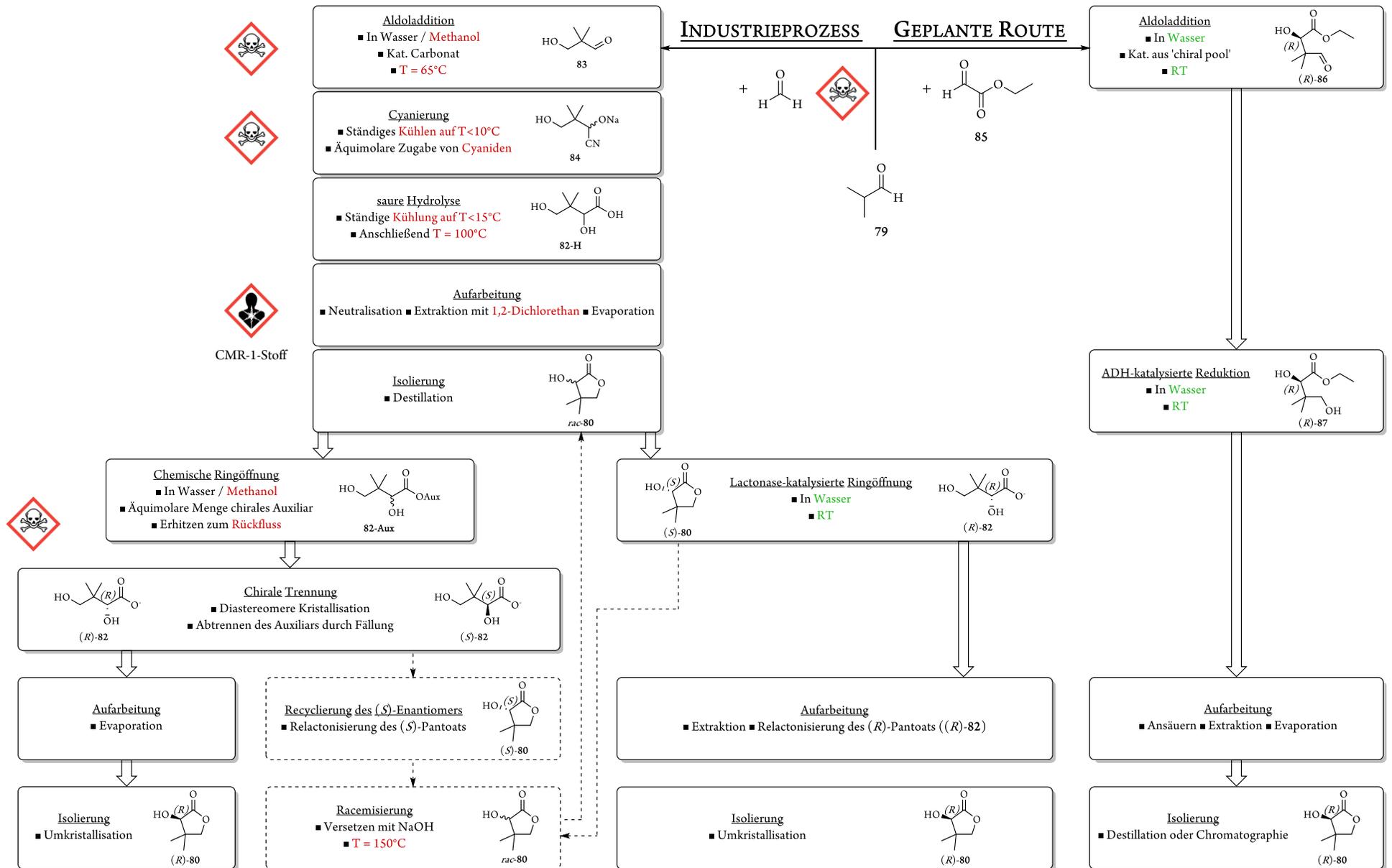


Schema 3.1. Darstellung von Calciumpantothenat (**78**) durch Kondensation von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) und β -Alaninat (**81**).

Rein chemisch führt der Zugang zu (*R*)-**80** zunächst über sein racemisches Analogon *rac*-**80**, welches anschließend durch Zugabe chiraler Auxiliare mittels diastereomerer Kristallisation in seine Enantiomere getrennt wird (Schema 3.2, linker Zweig).^[327,328] Limitiert wird diese klassische Racematspaltung durch ein theoretisches Ausbeutemaximum von 50% sowie die notwendige Abtrennung und Aufreinigung der chiralen Hilfsstoffe. Im Produktionsmaßstab werden allerdings zumeist Ausbeuten unter 50% erreicht, da die optische Reinheit des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-**80**) nach einmaliger Kristallisation unzureichend ist. Zur Produktivitätssteigerung können Mutterlaugen und (*S*)-**80** zwar gesammelt, anschließend unter basischen Bedingungen racemisiert und in den Trennungskreislauf zurückgeführt werden, jedoch werden zusätzliche Extraktions-, Trennungs- und Transformationsschritte benötigt.

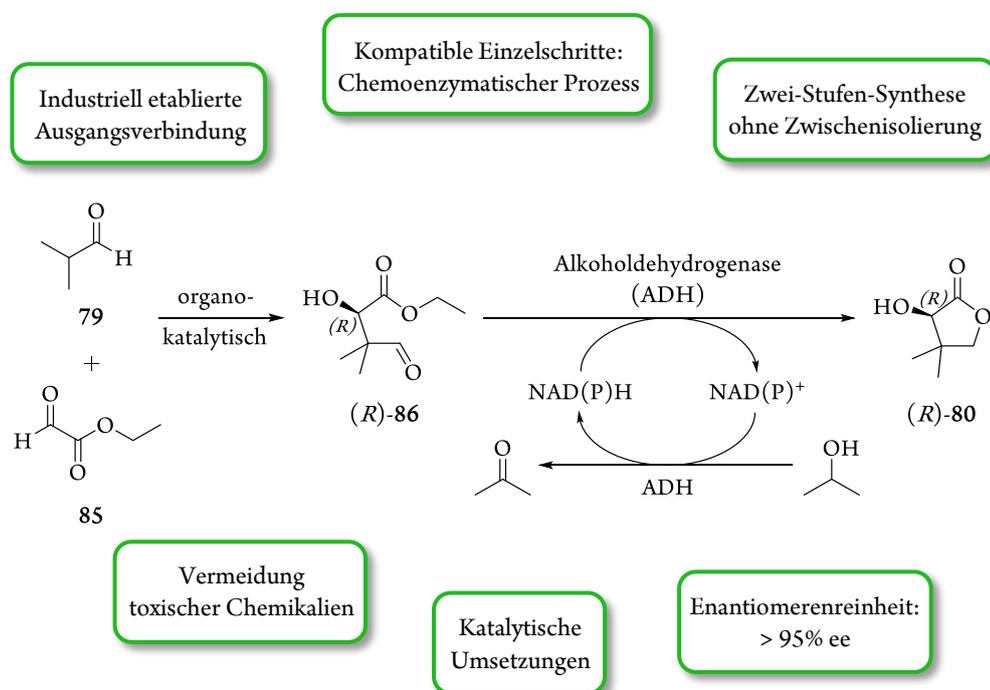
Als biokatalytische Alternative zur chemischen Racematspaltung hat sich vor rund 15 Jahren die stereoselektive Ringöffnung des racemischen Pantolactons (*rac*-**80**) mit Lactonohydrolasen (LH) etabliert.^[329,330] D-spezifische LHs überführen das (*R*)-Enantiomer aus dem Racemat *rac*-**80** in sein aliphatisches Pantoat (**82**), welches extraktiv vom zurückbleibenden (*S*)-Pantolacton ((*S*)-**74**) abgetrennt werden kann (Schema 3.2, mittig).

Im Vergleich zur diastereomeren Kristallisation werden hierbei zwar Arbeitsschritte gespart und (*R*)-**80** unter milden Bedingungen und ohne organische Lösungsmittel gewonnen, beide Verfahren basieren jedoch auf der vorhergehenden Synthese des Racemats *rac*-**80** aus giftigem, von der Weltgesundheitsorganisation als karcinogen eingestuftem Formaldehyd und der Verwendung toxischer Chemikalien (Cyanide) bzw. Lösungsmittel (Methanol).^[331] Weiterhin wird das eingesetzte Extraktionsmittel 1,2-Dichlorethan von der europäischen Chemikalienagentur als besonders besorgniserregend (stark krebserzeugend) gelistet.^[332] Zusätzlich bedürfen Einzelschritte der Industriemethode energieintensive Vorgänge wie starkes Erwärmen oder konstante Kühlung der Reaktionsmischung.



Schema 3.2. Schematische Darstellung der Arbeitsschritte der großtechnischen Methode (links) bzw. der geplanten Syntheseroute (rechts) zur Herstellung von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-80). Durchgezogene Linien und Pfeile zeigen den Prozessverlauf, gestrichelte Recyclingsschritte. Gezeichnete Strukturen bilden das/die Produkt/e des jeweiligen Schrittes ab. Energetisch intensive bzw. ökologisch/toxikologisch bedenkliche Schritte sind rot, unbedenkliche grün markiert.

Das Ziel des zweiten Schwerpunktes dieser Doktorarbeit ist es nun, einen unter ökologischen und toxikologischen Gesichtspunkten optimierten Prozess zur Synthese des stereogenen Vitamin B₅-Bausteins (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) zu realisieren, der möglichst allen Kriterien der „Grünen Chemie“ genügt (Schema 3.2, rechter Zweig).^[302,333] Dieser soll von der industriell etablierten, hochverfügbaren Startverbindung Isobutanal (**79**) ausgehen und in möglichst wenigen Arbeitsschritten zum Produkt führen. Das Lacton soll dabei ohne den Einsatz giftiger oder bedenklicher Chemikalien mit einem Enantiomerenüberschuss von mindestens 95% ee dargestellt werden, wobei der aktive Aufbau des Stereozentrums im Prozess implementiert sein soll. Um die Gesamteffizienz der Route zu maximieren sollen möglichst keine Zwischenisolierungen von Intermediaten durchgeführt werden und ausschließlich katalytische Umsetzungen Anwendung finden. Die verwendeten Katalysatoren sollen hierbei entweder kostengünstig – beispielsweise aus dem ‚chiral pool‘ – verfügbar oder mehrfach wiederverwendbar sein.



Schema 3.3. Zielsetzungsparameter der nachhaltigen Pantolactonsynthese.

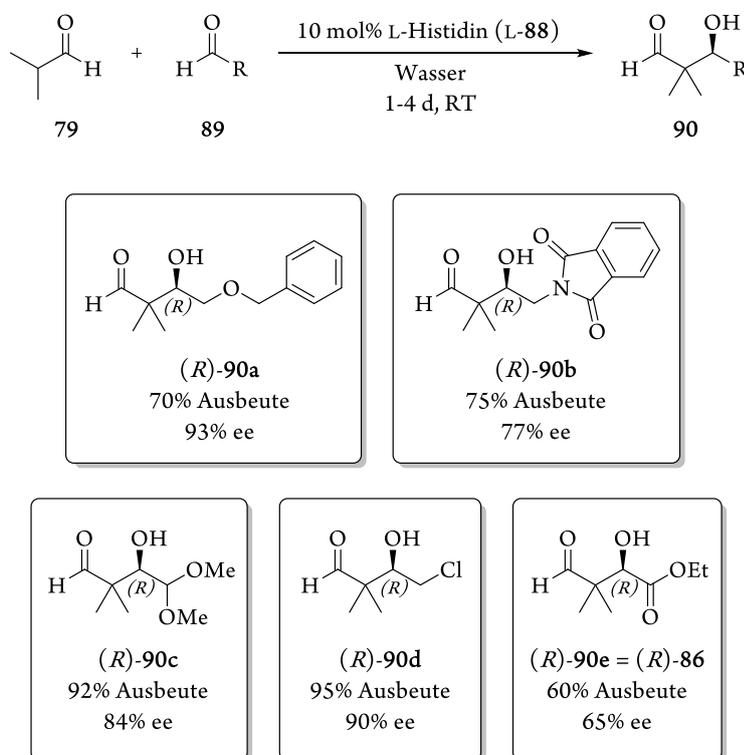
Um alle Aspekte in einer Synthesesequenz (Schema 3.3) verwirklichen zu können, sollen die Vorteile verschiedener Katalysewege miteinander kombiniert werden. Zunächst soll Isobutanal (**79**) in einer organokatalytischen Aldolreaktion umgesetzt werden, wobei die Stereoinformation an dieser Stelle durch die asymmetrische Reaktionsführung eingeführt wird. Anschließend soll eine stereoselektive, biokatalytische Reduktion zur Umsetzung und nachfolgenden Lactonisierung des (*R*)-konfigurierten Aldolproduktes (*R*)-**86** führen. Die Regenerierung des Cofaktors soll hierbei vorzugsweise wie in Kapitel 2.3.1.2 beschrieben (siehe auch Kapitel 2.2.3, Schema 2.28) monoenzymatisch, das heißt durch dieselbe Alkoholdehydrogenase, die für die Biotransformation eingesetzt wird, gelingen (in Schema 3.3 ist beispielhaft die Oxidation von Isopropanol zur substratgekoppelten Cofaktorregenerierung dargestellt; näheres siehe Kapitel 2.2.3).

3.2 Stand der Wissenschaft

3.2.1 Histidin als Katalysator für gekreuzte Aldolreaktionen zwischen enolisierbaren Aldehyden

Obwohl mit der Prolin(derivat)-Katalyse sowohl bei der intra- als auch intermolekularen Aldolreaktionen große Erfolge erzielt wurden, bleibt die Substratbreite im Batchverfahren auf die Verwendung nicht-enolisierbarer Aldehyde als Akzeptor- sowie Ketonen als Donorkomponente beschränkt.^[94-98] Zwar ist auch der Einsatz zweier enolisierbarer Aldehyde *per se* möglich, gestaltet sich aber aufgrund von Nebenreaktionen - insbesondere der Selbstkondensation der Substrate^[264] - schwierig und erfordert entweder den unökonomischen Einsatz eines großen Überschusses einer Eduktkomponente^[334] oder zeitintensive, in der Regel nur im Labormaßstab praktikable (Spritzen)Pumptechniken.^[335] Eine weitere Restriktion Prolin(derivat)-katalysierter, asymmetrischer Aldolreaktionen (AARs) resultiert aus der thermodynamischen Instabilität des entsprechenden Enaminintermediates bei der Verwendung α -verzweigter Aldehyde, welche aus diesem Grund ausschließlich als Akzeptorkomponente reagieren. Der Aufbau von Aldolprodukten mit α -quartären Kohlenstoffen kann somit nicht realisiert werden.

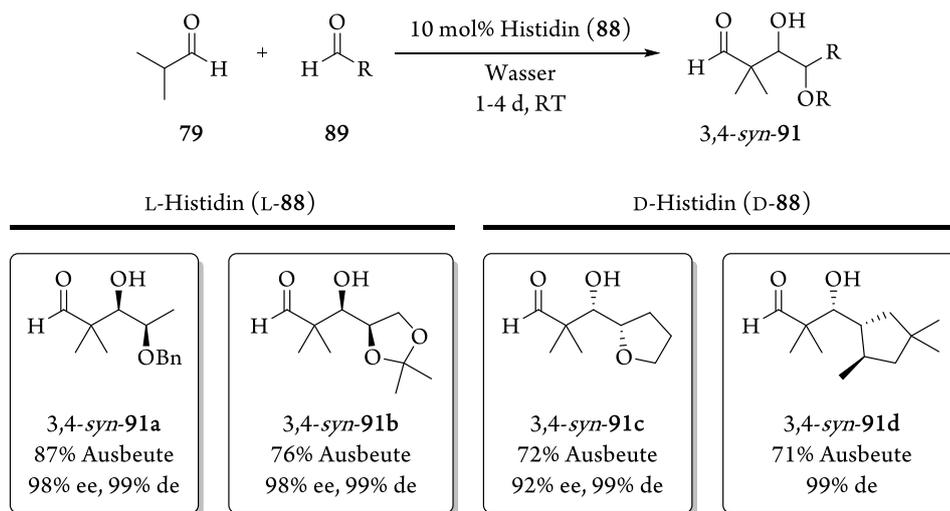
Beide Problemstellungen konnten im Arbeitskreis um MAHRWALD erfolgreich adressiert und durch den Einsatz von Histidin (**88**) als Organokatalysator gelöst werden (Schema 3.4).^[336]



Schema 3.4. Histidin-katalysierte gekreuzte Aldolreaktion zwischen enolisierbaren Aldehyden.

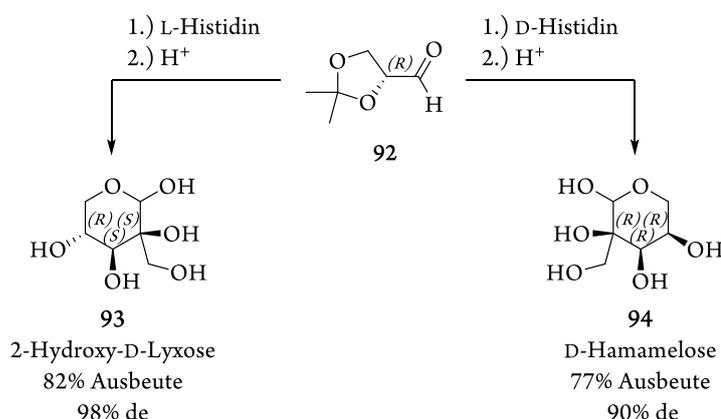
Die Aminosäure zeigt hierbei eine bemerkenswerte Chemoselektivität, die durch die elektronische Struktur der Substrate **89** bestimmt wird. So reagieren elektronenreiche Aldehyde in Histidin-katalysierten asymmetrischen Aldolreaktionen ausschließlich als En-, elektronenarme Aldehyde einzig als Carbonylkomponenten (Schema 3.4).*

Weiterhin konnten α -verzweigte Aldehyde hoch diastereoselektiv zu den entsprechenden *syn*-Addukten **91** umgesetzt werden (Schema 3.5). Unter den milden Reaktionsbedingungen werden weder die Racemisierung der Ausgangsverbindungen noch die Epimerisierung der Produkte detektiert.^[336]



Schema 3.5. Histidin-katalysierte gekreuzte Aldolreaktion von Isobutanal (**79**) und verzweigten Aldehyden führt zu *syn*-Produkten **91**.

Durch die gezielte Homoaldoladdition chiraler Aldehyde wie (*R*)-Isopropylidenglyceraldehyd ((*R*)-**92**) lässt sich je nach Konfiguration des Organokatalysators auch die Darstellung von Naturstoffen bzw. -bausteinen, in diesem Fall 2-Hydroxymethyl-D-lyxose (**93**) und D-Hamamelose (**94**), realisieren (Schema 3.6).^[336]



Schema 3.6. Histidin-katalysierte Homoaldoladdition von (*R*)-Isopropylidenglyceraldehyd.

* Analog zur organokatalytischen Aldolreaktion mit Prolin ist in Histidin-katalysierten Synthesen auch die Umsetzung von Aldehyden mit Ketonen^[337-341] oder zweier Ketone möglich.^[342,343] Evaluiert werden soll an dieser Stelle jedoch lediglich die gekreuzte AAR zwischen enolisierbaren Aldehyden.

Während der Mechanismus der Prolin-katalysierten Aldolreaktion mittlerweile aufgeklärt und entscheidende Intermediate kristallografisch^[344] und spektroskopisch^[271,345,346] nachgewiesen werden konnten, ist relativ wenig über die Art der Stereinduktion bei der Verwendung anderer proteinogener Aminosäuren als Organokatalysatoren bekannt.^[347-349] Im Vergleich zu Prolin (**30**), dessen stereochemisch bestimmender Katalyseschritt die Ausbildung eines Zimmermann-Traxler-artigen Übergangszustand zwischen dem Enamin und der elektrophilen Carbonylkomponente ist (siehe Kapitel 2.2.2, Schema 2.14),^[350] unterscheidet sich Histidin (**88**) in drei Punkten: 1.) Die Enaminbildung erfolgt am primären Stickstoff der Aminosäure, wodurch die C_α-N-Bindung frei drehbar bleibt, während das Prolylanalogon geometrisch durch den starren Pyrrolidinring fixiert wird. 2.) Die von Histidin abgeleiteten Enaminverbindungen besitzen eine N-H-Bindung, dessen Proton, konkurrierend zum Wasserstoffatom der C-terminalen Säurefunktion, das entstehende Alkoxid abfangen bzw. stabilisieren kann.^[107] 3.) In Wasser liegt Histidin als zwitterionische, am Imidazolring protonierte Spezies vor. Die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke vom Imidazoliumring kann so potentiell das Enamin-Carbonyl-Intermediat stabilisieren.

Während Punkt 2.) strittig bleibt – frühere Ergebnisse bzw. Berechnungen zeigten, dass der Protonentransfer vom Stickstoff energetisch weitaus höher liegt als der analoge Übertrag von der Säurefunktionalität aus^[349] – ist der Einfluss der Seitenketten primärer Aminosäuren als Organokatalysatoren auf die Effizienz bzw. Selektivität der asymmetrischen Aldolreaktion schlecht untersucht (im Fall von Histidin Punkt 3.). Lediglich bei der Verwendung von Tryptophan wurden von JIANG *et al.* N-H--- π -Wechselwirkungen zwischen Enamin und dem Imidazolring der Seitenkette als Erklärung für die beobachtete Stereoselektivität postuliert.^[348]

Für Histidin konnten die Gruppen um HOUK und MAHRWALD mittels quantenmechanischer Berechnungen eine analoge Beteiligung des Stickstoffheterocyclus‘ an der Stabilisierung des Enaminintermediates in der AAR feststellen. Für die Histidin-katalysierte Reaktion zwischen Isobutanal (**79**) und verschiedenen Aldehydakzeptoren wurden vier Übergangszustände **95a-d** identifiziert, die entweder die Wasserstoffbrückenbindung über die Seitenkette (**95a** und **95b**) oder den Säurerest abbilden (**95c** und **95d**, Abbildung 3.1).^[351]

Unabhängig von verschiedenen Resten (R = CH₂Cl, CH(OMe)₂, CO₂Et, CH₂SBn, CH₂*i*-Pr) ergibt sich als Übergangszustand niedrigster Gibbs-Energie (ΔG^\ddagger) hierbei der *Re*-Seitenangriff des über den Imidazolring stabilisierten Enamins auf die Carbonylkomponente, welcher zur Ausbildung des experimentell gefundenen Überschussenantiomers führt. Die Struktur nächsthöherer, relativer freier Energie ($\Delta\Delta G^\ddagger$, im Mittel +0.6 kcal/mol) ist durch den *Si*-Seitenangriff des über den C-Terminus der Aminosäure per Wasserstoffbrückenbindung fixierten Enamins auf den Akzeptor gegeben und führt zum empirisch bestimmten Unterschussenantiomer. Die in Abbildung 3.1 als ‚nicht begünstigt‘ bezeichneten Übergangszustände haben mit Werten von $\Delta\Delta G^\ddagger = +1.0$ bis +3.9 kcal/mol einen entsprechend geringen Anteil an der Wahrscheinlichkeitsverteilung. Die als ‚begünstigt‘ errechneten Strukturen folgen hierbei Seebachs Regel zur Topologie des Übergangszustandes von C-C-Bindungsbildungsreaktionen, nach der Zustände niedriger Energie mit minimierten *gauche*-Wechselwirkungen einhergehen.^[352]

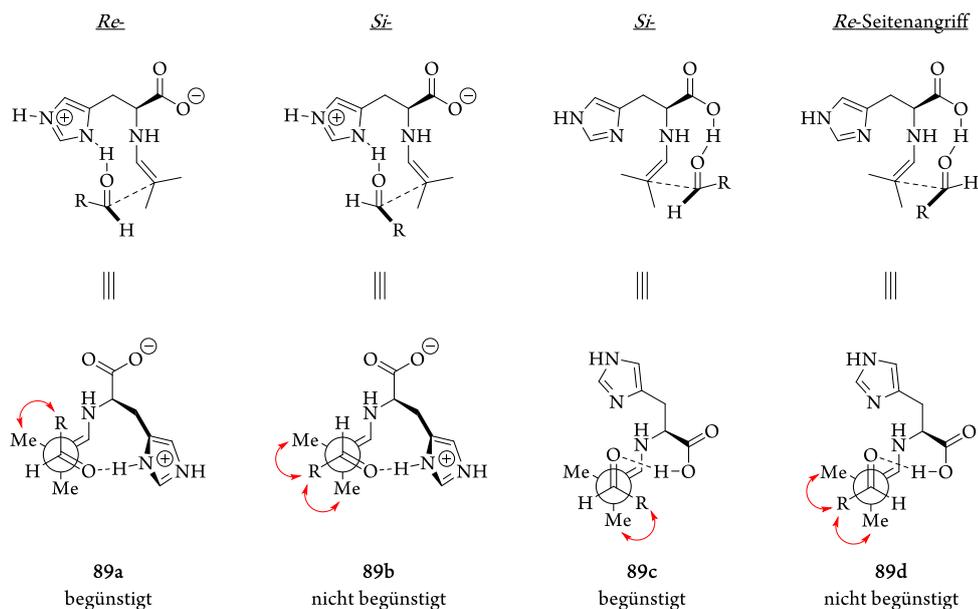


Abbildung 3.1. Übergangszustände der Histidin-katalysierten Aldolreaktion zwischen Isobutanal (**79**) und einem Akzeptoraldehyd. Oben: *Re*- und *Si*-Seitenangriffe niedrigster Energie unter Berücksichtigung einer Wasserstoffbrückenausbildung zwischen Enamin und Imidazoliumring (**95a** und **95b**) bzw. der Carbonsäure (**95c** und **95d**). Unten: Newman-Projektionen der Übergangszustände entlang der sich bildenden C-C-Bindungsachse. Rot eingezeichnet: Abstoßende *gauche*-Wechselwirkungen.

Obwohl der stereochemische Ausgang der Histidin-katalysierten AAR mit den durchgeführten, quantenmechanischen Berechnungen gut vorausgesagt werden kann (Tabelle 3.1), lässt sich die Selektivität der Reaktion nicht im erwarteten Maß durch gezielte Derivatisierungen am Organokatalysatorgerüst auf Basis der Übergangszustandsstrukturen verändern.^[351]

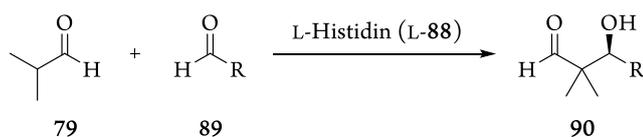
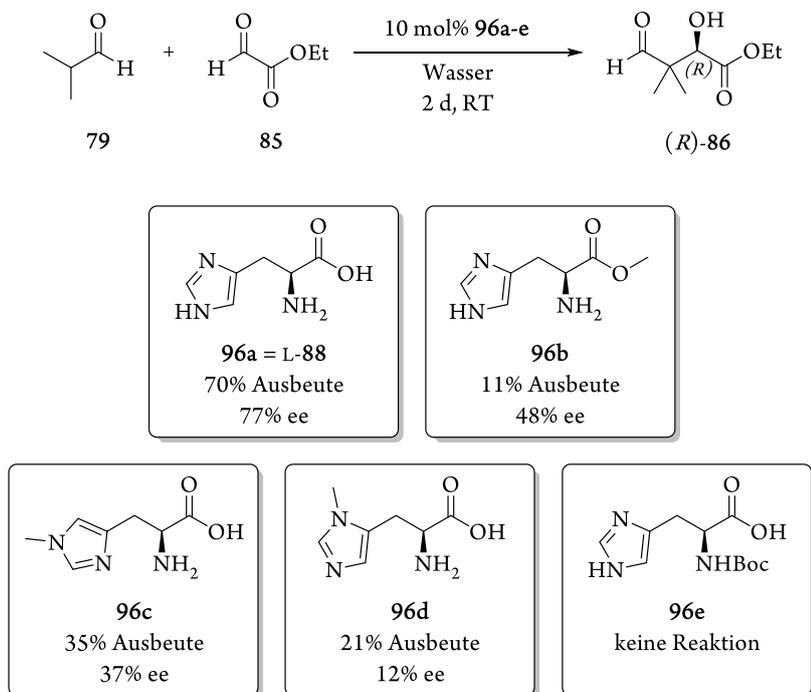


Tabelle 3.1. Berechnete und empirisch gefundene ee-Werte für die Histidin-katalysierte, gekreuzte Aldolreaktion zwischen Isobutanal (**79**) und verschiedenen Aldehyden.

Eintrag	R	ee (ber.) ^{a)} [%]	ee (gef.) ^{b)} [%]	Überschussenantiomer
1	CH ₂ Cl	75	90	(<i>R</i>)
2	CO ₂ Et	80	77	(<i>R</i>)
3	CH ₂ <i>i</i> -Pr	54	56	(<i>S</i>)

a) Berechneter Enantiomerenüberschuss; b) empirisch gefunder Enantiomerenüberschuss.

Erwartungsgemäß sollte die Veresterung des Carbonsäurerestes die Stabilisierung des Enamins über den C-Terminus der Aminosäure unterbinden. Da der über den Heterocyclus stabilisierte, zum Unterschussenantiomer führende *Si*-Seitenangriff (Abbildung 3.1, Struktur **95b**, nicht begünstigt) energetisch weitaus höher liegt als der entsprechende *Re*-Seitenangriff (Struktur **95a**, begünstigt),^[351] sollte die optische Reinheit des Aldolproduktes bei der Verwendung eines Histidinesters im Vergleich zur Histidin-Katalyse steigen (Schema 3.7).



Schema 3.7. Aldoladdition von Isobutanal (**79**) und Ethylglyoxylat (**85**) unter Verwendung von L-Histidin (**L-88**) und seinen Derivaten **96b-e** als Katalysatoren.

Es zeigt sich jedoch, dass sowohl Funktionalisierungen am Carbonsäurerest als auch an der Seitenkette zu verschlechterten Selektivitäten und Reaktivitäten führen, woraus geschlossen werden kann, dass die als isoliert betrachteten Wechselwirkungen aus Abbildung 3.1 zwar für qualitative Vorhersage des stereochemischen Ausgangs der AAR ausreichen, den tatsächlichen Mechanismus der Reaktion aber nur teilweise wiedergeben. Als Reaktionszentrum kann allerdings, wie erwartet, die primäre Aminfunktionalität bestätigt werden.

Festzuhalten bleibt jedoch in jedem Fall, dass sich bei der Verwendung des Organokatalysators Histidin α -verzweigte Aldolprodukte darstellen lassen, deren Synthese mit „klassischen“ Prolin(derivat)systemen nicht realisierbar ist. Mit kleinen, auch verzweigten Akzeptoraldehyden lassen sich hierbei teilweise gute Selektivitäten von >90% ee (Schema 3.4), unter Verwendung chiraler Carbonylkomponenten sogar bis 98% ee (99% de) erzielen (Schema 3.5).^[336,351,353]

3.2.2 Vitamine, Pantothensäure und Pantolacton

Vitamine sind kleine, organische Moleküle, die dem Organismus nicht als Energieträger dienen, sondern für andere, lebenswichtige Funktionen benötigt werden. Sie können vom Stoffwechsel jedoch nicht oder nicht in ausreichendem Maße synthetisiert werden und müssen entsprechend als solche oder als Vorstufen mit der Nahrung aufgenommen werden müssen.^[354] Vitamine gehören zu den essenziellen Stoffen und sind häufig Bausteine von Enzymen oder prosthetischen Gruppen.

Dass ein Mangel an diesen essenziellen Verbindungen einen gestörten Metabolismus und die Beeinträchtigung vitaler Funktionen zur Folge hat, wurde 1906 von HOPKINS (Abbildung 3.2, 1. v. l.) derart ausgedrückt, dass „kein Tier allein auf Basis einer Nahrung, die ausschließlich aus reinem Eiweiß, Fett, Kohlenhydraten, Salz und Wasser besteht, überleben kann.“ – eine Erkenntnis, die die Suche nach sogenannten ‚Wachstumsfaktoren‘ anstieß.^[355]



Abbildung 3.2. Pioniere der Vitaminforschung. Von links nach rechts: Frederick G. Hopkins, Takaki Kanehiro, Christiaan Eijkman, Casimir Funk.^[356]

Dass diese tatsächlich mit der Nahrung aufgenommen werden müssen wurde zwar bereits 1885 vom japanischen Marinearzt KANEHIRO (Abbildung 3.2, 2. v. l.) beschrieben, als erste ‚echte‘ naturwissenschaftliche Untersuchung einer Vitaminmangelerkrankung aufgrund falscher Ernährung werden jedoch EIJKMANS (Abbildung 3.2, 3. v. l.) Beobachtungen zur bis dahin unerklärlichen Beri-Beri-Krankheit bewertet. Dieser stellte 1897 fest, dass neben dem Personal und den Patienten eines Militärhospitals auch die gehaltenen Hühner der Einrichtung typische Symptome der im Volksmund als Schafsgang bezeichneten Krankheit zeigten. Ihm fiel auf, dass die Tiere mit demselben Reis gefüttert wurden, den auch die Menschen zu essen bekamen. Interessanterweise traten die Krankheitssymptome erst nach der Einführung europäischer Reisschälmaschinen auf. Wie bereits TAKAKI über zehn Jahre zuvor führte auch EIJKMAN den Ausbruch der Krankheit auf Mangelernährung zurück und konnte zeigen, dass das Beimengen der entfernten Silberhäutchen des Reis‘ bzw. die Zugabe von Reiskleie zu geputztem, weißem Reis die Krankheit heilen konnte.^[357]

Die provokante Aussage EIJKMANS, weißer Reis könne giftig sein, nahm der polnische Biochemiker FUNK (Abbildung 3.2, 4. v. l.) 1912 zum Anlass, sich intensiv mit der Charakterisierung des ‚Gegengiftes‘ zu beschäftigen. Noch im gleichen Jahr gelang ihm die Isolierung einer bioaktiven Substanz aus Reiskleie, deren Gabe Patienten mit Beri-Beri heilen konnte.

Zwar wurde die Struktur des isolierten Thiamins (heutige Bezeichnung Vitamin B₁, Abbildung 3.3) erst 1936 aufgeklärt,^[358,359] FUNK prägte allerdings aufgrund seiner Erkenntnis, es handle sich bei der Verbindung um ein Amin, dessen Aufnahme für den menschlichen Organismus lebensnotwendig sei, den Kunstbegriff des ‚vitamins‘.^[360] Er postulierte, dass sich Mangelkrankheiten durch Nahrungszusätze entsprechender Mangelsubstanzen, die er Vitamine nannte, nicht nur behandeln, sondern auch vorbeugen ließen.^[361]

Obwohl viele der heute bekannten Vitamine keine Aminfunktionalität besitzen, hat sich der Name dank FUNK etabliert – nicht zuletzt deswegen, weil in der Folge auch andere Krankheiten als Ergebnisse von Mangelernährung identifiziert und mit Vitaminen behandelt werden konnten (Rachitis: Vitamin D,^[362] Pellagra: Vitamin B₃,^[363,364] Skorbut: Vitamin C; Strukturen in Abbildung 3.3 gezeigt).^[365,366] Bis 1941 wurden alle medizinisch als essenziell geltenden* 13 Vitamine identifiziert,^[367] strukturell aufgeklärt und nach der 1916 von MCCOLLUM eingeführten Klassifizierung mit Großbuchstaben (A, B, C, D;^[368] später E und K)^[369] eingeordnet.

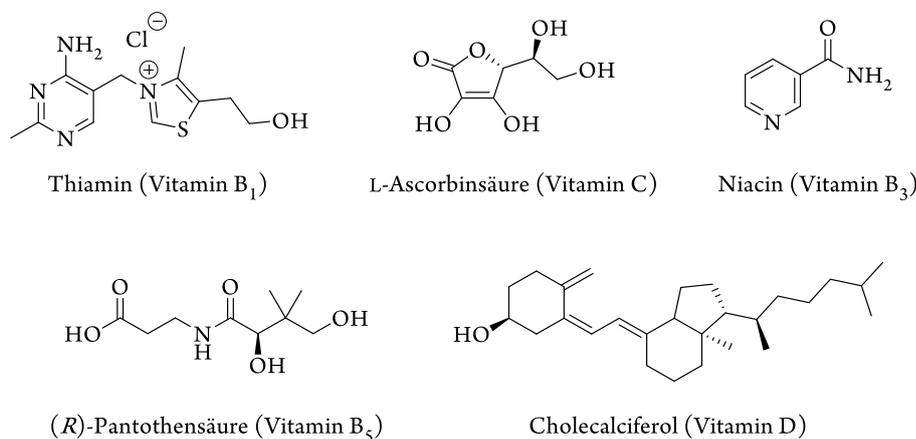
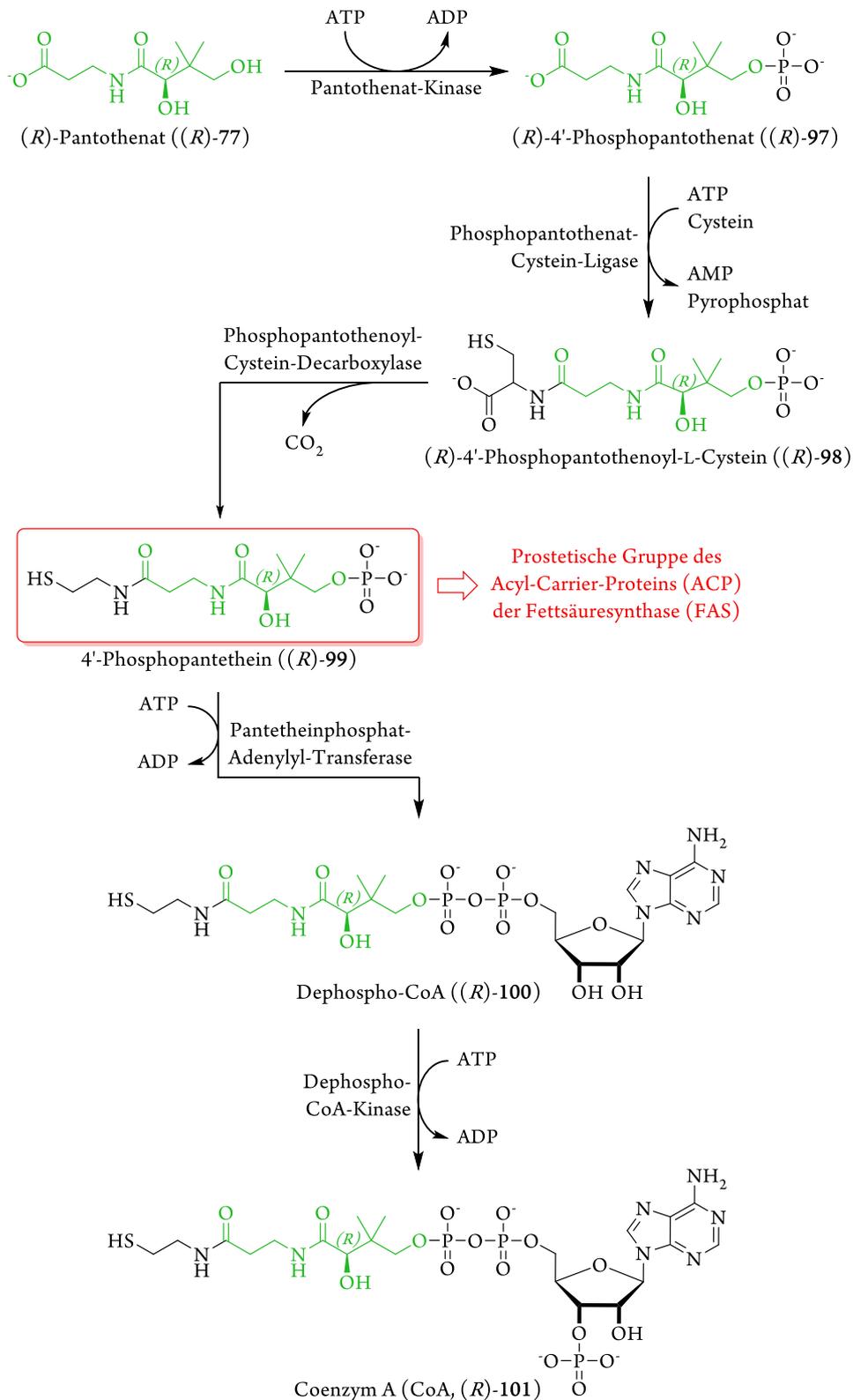


Abbildung 3.3. Strukturen einiger Vitamine.

Zu den Vitaminen, die nach der klassischen Einordnung als Wachstumsfaktoren gelten sowie der modernen Klassifizierung als Substanzen, welche unerlässlich für die Aufrechterhaltung der Vitalfunktionen des (menschlichen) Organismus[‘] sind, entsprechen gehört Vitamin B₅ ((*R*)-Pantothensäure). Nach ersten Experimenten über den Einfluss verschiedener, synthetischer Nährmedien auf die Proliferation von Hefen beschrieb WILLIAMS die Existenz einer oder mehrerer bis dahin unbekannter, von ihm noch nicht isolierter Substanzen, die in ihrer Wirkung dem „beri-beri-preventing vitamin“ (Vitamin B₁) ähnlich seien.^[370] 1931 schließlich gelang ihm auf dieser Basis die Entdeckung eines weiteren, wasserlöslichen Vitamins der B-Gruppe.^[371] Die als (*R*)-Pantothensäure identifizierte Substanz wurde rasch als der entscheidende Wachstumsfaktor bei Hefen identifiziert^[372,373] – eine Eigenschaft, die die Verbindung auch bei Untersuchungen anderer Organismen (Milchsäurebakterien, Hühner, Mäuse, Ratten) zeigte.^[374-378]

* Nach strengen Gesichtspunkten gilt dies nur für 11 der 13, da Vitamin D und B₃ unter bestimmten Voraussetzungen vom Körper synthetisiert werden und damit auch als nicht-essenziell eingestuft werden können.

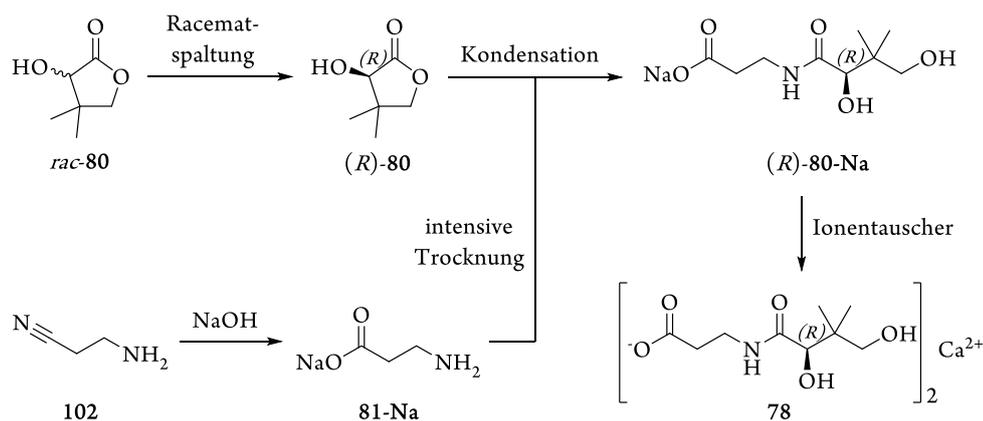
In Mangelernährungsstudien mit defizitären Mengen an Vitamin B₅ oder durch ausschließliche Gabe des antagonistisch wirkenden (*S*)-Enantiomers^[379] konnte in den folgenden Jahren die Einbindung in den Säugetiermetabolismus aufgeklärt werden.



Schema 3.8. Biosynthese von Coenzym-A (CoA, (*R*)-101).

Neben Versuchen an Schweinen,^[380] Hunden und Kälbern^[381] zeigten auch Untersuchungen am Menschen* das eine Vitamin-B₅-Hypovitaminose zu Symptomen wie der pathologischen Veränderung der Haut (Läsionen) und den Haaren, Müdigkeit, Schlaflosigkeit, Depressionen, tauben oder schmerzenden Muskeln, Hormonstörungen, allgemeinen Immunschwächeerscheinungen, Verwirrung, Muskelkrämpfen, Apathie, Parästhesie, Anämie, Hypoglykämie, Niereninsuffizienz oder hepatischer Enzephalopathie führen kann.^[382-388] Wie das hauptsächlich während des zweiten Weltkriegs beobachtete, auf Vitamin-B₅-Mangel zurückzuführende „burning feet“-Syndrom lassen sich die meisten der genannten Symptome auf einen gestörten Coenzym-A-Haushalt zurückführen,^[389-391] für dessen Biosynthese der stereogene Baustein (*R*)-Pantothensäure (bzw. das entsprechende Carboxylat (*R*)-77) essenziell ist (Schema 3.8).^[392] Weiterhin lassen sich bei Vitamin-B₅-Mangel diverse Störungen des Gastrointestinaltraktes feststellen, die sich für gewöhnlich in Magenschmerzen und Übelkeit sowie Appetitlosigkeit zeigen und mit einem gestörten Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel einhergehen.^[386] Ursächlich ist hierbei die unzureichende Biosynthese von 4'-Phosphopantethein ((*R*)-99), einem Intermediat der CoA-Synthese, welches die prostetische Gruppe des Acyl-Carrier-Proteins (ACP) der Fettsäuresynthase (FAS) bildet (Schema 3.8).^[320,321]

Zwar lassen sich, übereinstimmend mit der FUNK'schen Feststellung,^[361] sämtliche Krankheitsbilder dieser Hypovitaminose durch die ausreichende Aufnahme des Spurenstoffs Vitamin B₅ sowohl erfolgreich behandeln als auch vorbeugen. In den Ernährungswissenschaften wurde jedoch schon früh erkannt, dass eine angemessene Versorgung nur über die Laborsynthese des Wirkstoffes gewährleistet werden konnte. In der Folge wurden Darstellungsverfahren zur industriellen Produktion von (*R*)-Pantothensäure ((*R*)-77-H) entwickelt.^[367] Großtechnisch wird das Vitamin heute über die Kondensation von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-80) mit Alanin oder seinen Derivaten hergestellt (Schema 3.9).^[326,393-395]

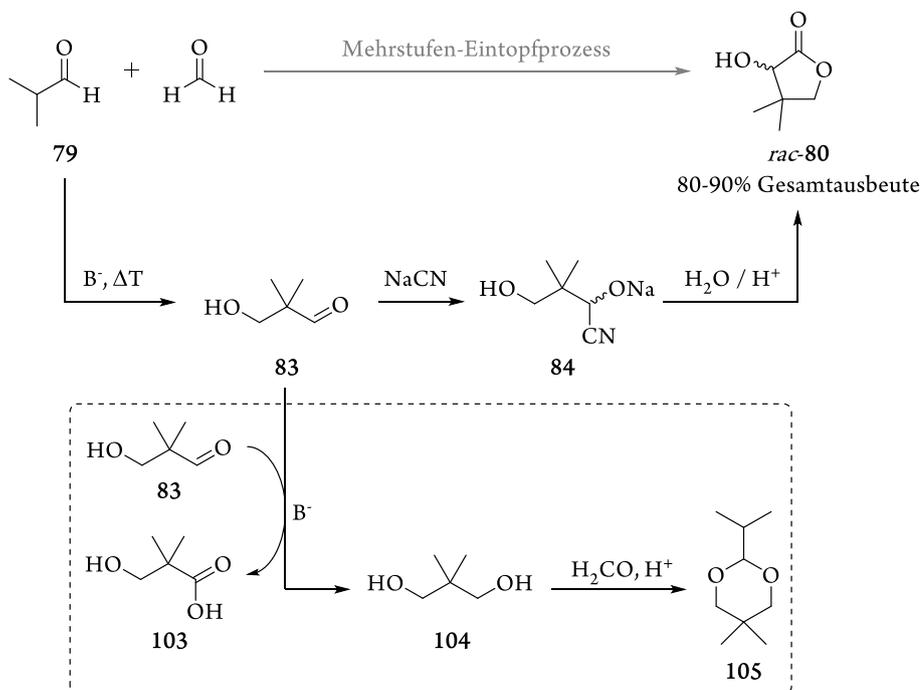


Schema 3.9. Industrielle Synthese von Vitamin-B₅ ((*R*)-77-H) bzw. seiner kommerziellen Form Calciumpantothenat (78).

* Neben vereinzelten Studien mit freiwilligen Probanden^[382] handelt es sich hierbei zumeist um medizinische Beobachtungen und Aufzeichnungen während starker Hungerperioden bzw. unterernährter Soldaten oder Kriegsgefangener.^[383]

Die Stabilität von Vitamin B₅ ist stark pH-abhängig und liegt zwischen vier und fünf. Sowohl im saureren als auch basischeren Medium wird (*R*)-Pantothensäure hydrolytisch zu (*R*)-Pantoinensäure* (oder seinen Salzen) und β-Alanin (**81-H**) gespalten.^[396] Da auch seine monovalenten Salze stark hygroskopisch wirken hat sich als kommerzielle Form das stabile Calciumsalz **78** etabliert.^[388] So wurde (*R*)-Calciumpantothenat (**78**) im Jahr 2002 weltweit mit einem Volumen von über 9000 Tonnen und einem Marktwert von 200 Millionen Dollar hergestellt.^[397] Ende 2009 wurden bereits globale Produktionszahlen von 13.000 Tonnen erreicht.^[398] Prognostizierte Wachstumszahlen gehen von einer jährlichen Produktionssteigerung von drei bis fünf Prozent aus.^[398]

Da ausschließlich das (*R*)-Enantiomer biologische Aktivität zeigt^[399-401] und die Stereoinformation über den Lactonbaustein **80** eingeführt wird, ist für die Wirksamkeit des synthetischen hergestellten Wirkstoffes Vitamin-B₅ einzig die (möglichst selektive) Darstellung von (*R*)-**80** entscheidend.^[326] Das Lacton wird großtechnisch zunächst als Racemat *rac*-**80** aus Isobutanal (**79**), Formaldehyd und Cyanidsalzen dargestellt (Schema 3.10).^[323-326,367]

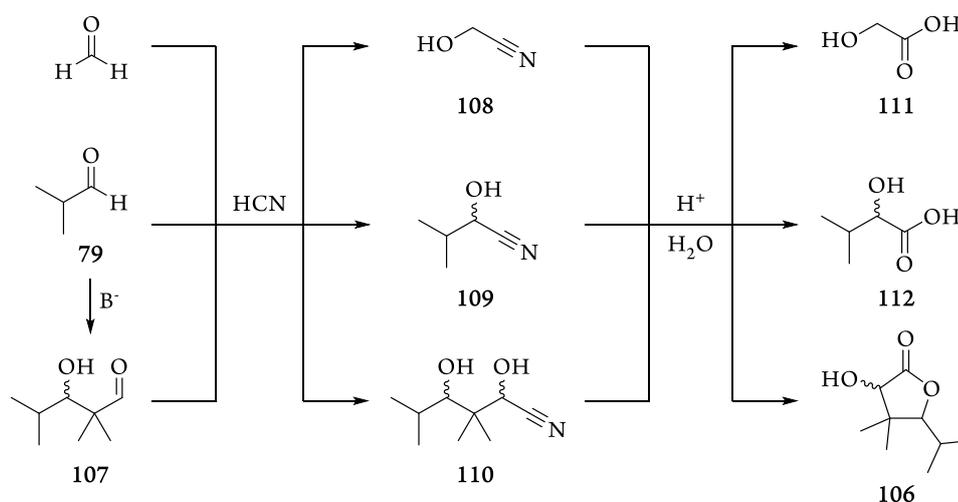


Schema 3.10. Großtechnische Synthese des racemischen Pantolactons (*rac*-**80**). Im gestrichelten Kasten: Nebenreaktionspfad über die Disproportionierung des Aldolproduktes **83** im basischen Milieu.

Schlüsselschritte der Sequenz sind hierbei die baseninduzierte Aldoladdition der beiden Aldehyde gefolgt von der Hydrocyanierung des Aldolproduktes **83**. Unter stark sauren Bedingungen wird das Cyanhydrin **84** anschließend verseift. Die Cyclisierung zum Lacton *rac*-**80** erfolgt spontan, wobei Ausbeuten zwischen 80 und 90% für die Eintopf-Synthese beschrieben sind.^[323-325]

* Im sauren Milieu eliminiert (*R*)-Pantoinensäure ((*R*)-**82-H**) rasch Wasser und cyclisiert zum (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**), was formal der Rückreaktion der in Schema 3.9 gezeigten Syntheseroute darstellt.

Obwohl sich diese Zahlen im Labormaßstab reproduzieren lassen, gewinnen Nebenreaktionen auf der verlängerten Zeitskala des analogen Industrieprozessen an Bedeutung. So werden im technischen Maßstab eines 2000 mol Ansatzes Formaldehyd allein acht Stunden für die Aldolreaktion, sechs Stunden für die Cyanidzugabe und zehn Stunden für die Hydrolyse des Cyanhydrins **84** benötigt.^[397] Neben der zum Diol **104** führenden Disproportionierung des Aldolproduktes **83** in einer Cannizzaro-Reaktion^[402] werden auch das Dioxan **105** (gestrichelter Kasten in Schema 3.10) sowie das Pantolactonderivat **106** (Schema 3.11) in signifikanten Mengen gefunden. Zusammengenommen ergibt sich mit den in Schema 3.11 dargestellten Seitenreaktionspfaden der Edukte ein Nebenproduktanteil von > 10%, wodurch im großen Maßstab für *rac*-**80** lediglich Ausbeute zwischen 73 und 78% realisiert werden können.^[397]

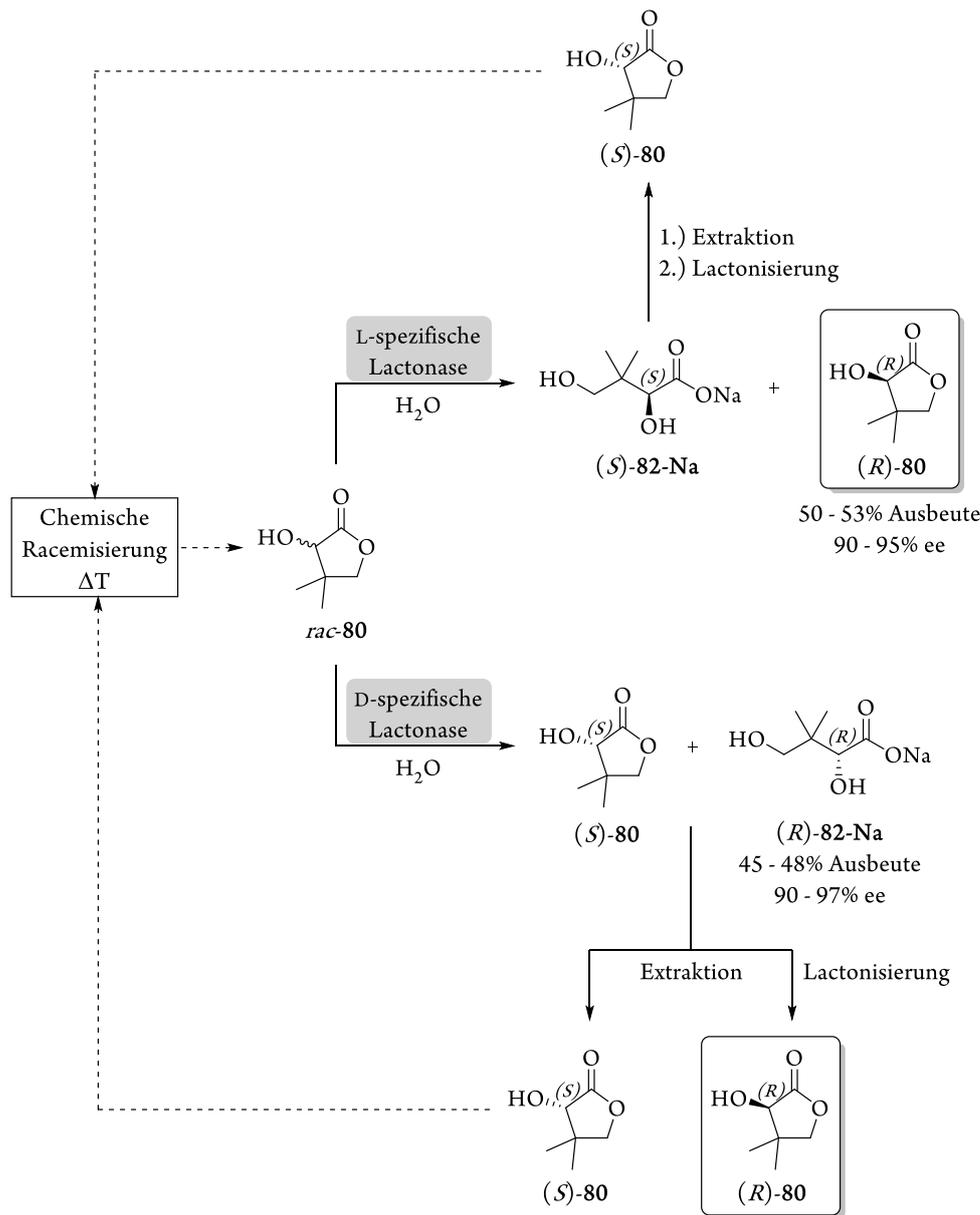


Schema 3.11. Nebenreaktionspfade der Edukte bei der Pantolactonsynthese.

Obwohl die von Formaldehyd ausgehende Syntheseroute viele Nebenprodukte liefert und auch aus ökologischer sowie toxikologischer Sicht nicht unbedenklich ist – so werden pro Kilo Produkt 0.26 kg Cyanid eingesetzt, wobei der leichte Überschuss bei der sauren Hydrolyse zur Bildung von hochgiftiger Blausäure führt – hat sich dieser Weg wegen seiner geringen Prozesskosten und der guten Abtrennbarkeit der Nebenprodukte etabliert und stellt auch heute noch die Methode der Wahl dar.^[367]

Für die Racematspaltung von *rac*-**80** sind etliche Verfahren bekannt. Rein chemische Zugänge zu (*R*)-**80** machen sich die diastereomere Kristallisation mit chiralen Auxiliaren wie (+)-3-Aminoethylpinan aus (-)- α -Pinen,^[403] Dehydroabietylamin aus Piniennharz,^[404,405] (1*R*)-3-*endo*-Aminoborneol,^[406] D(-)-Galactamine,^[407] Cinchonaalkaloiden^[408] oder Chinin zunutze,^[327,328] wobei ausschließlich letztere Methode bis zur industriellen Reife weiterentwickelt wurde.^[367,409]

Enzymatisch gelingt die Trennung der racemischen Pantolactons (*rac*-**80**) durch die Lipase-katalysierte Veresterung des (*S*)-Enantiomers^[410] oder die Acetylierung des Lactons, kombiniert mit der nachgeschalteten, selektiven Hydrolyse des Lactonesters.^[411-414] Mikrobielle Methoden basieren hingegen meist auf der stereoselektiven Hydrolyse des Racemats *rac*-**80** mit *S*-^[415-417] oder *R*-selektiven Lactonasen (Schema 3.12).^[416,418-420]



Schema 3.12. Lactonase-katalysierte Racematspaltung von *rac*-80.

Die 1995 von SHIMIZU *et al.* isolierte, D-spezifische Pantolacton-Hydrolase (DPH) aus *Fusarium oxysporum* wurde 1999 von Fuji/Daiichi Chemicals kommerzialisiert und wird seitdem großtechnisch als Calciumalginat-Immobilisat eingesetzt.^[329,330,421,422] Die heterogenisierte DPH zeigt hierbei auch nach 180 Reaktionscyclen noch 70% seiner Ausgangsaktivität, was den enzymatischen Prozess im Vergleich zu chemischen Methoden insbesondere unter ökologischen Gesichtspunkten überlegen macht (-49% Wasserverbrauch, -62% biochemischer Sauerstoffbedarf (BOD),^[423] -30% CO₂-Ausstoß).^[418]

In späteren, unabhängigen Versuchsreihen konnten SHIMIZU *et al.* für Fuji/Daiichi Chemicals^[415] und Kessler *et al.* für BASF^[417,424] die L-spezifische Pantolactonhydrolasen (LPH) aus *Agrobacterium tumefaciens* identifizieren. Während beim Einsatz der DPH zur Racematspaltung von *rac*-80 der Umweg über das aliphatische Natriumpantoat (82-Na) notwendig ist (Schema 3.12, unten), liefert LPH zwar direkt (R)-Pantolacton ((R)-80, Schema 3.12, oben), ein hoher Enantiomerenüberschuss

wird aber nur bei quasi-quantitativen Umsätzen des ungewollten Enantiomers erreicht.

(*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) wird jedoch nicht nur als Baustein in der industriellen Vitamin-B₅-Herstellung benötigt, sondern hat auch breite Anwendung in der chemischen Synthese gefunden. So ist optisch reines (*R*)-**80** ein weit verbreitetes, chirales Auxiliär,^[425-432] und zeigt inhibitorisches Potential bei Milchsäurebakterien und Malaria.^[433,434] Weiterhin dient es als entscheidende Vorstufe bei der Darstellung des Bakterizids und Provitamins (*R*)-Panthenol ((*R*)-**113**),^[435] dem nootropisch wirkenden Antidepressivum Pantogam® ((*R*)-Homopantothenensäure, (*R*)-**114**)^[436-438] oder von (*R*)-Pantoyltaurin ((*R*)-**115**), das das Wachstum von Streptococcen, Pneumococcen, *Plasmodium relictum* und bestimmten Stämmen Diphtherie auslösender Bakterien hemmen kann^[439,440] (Abbildung 3.4).

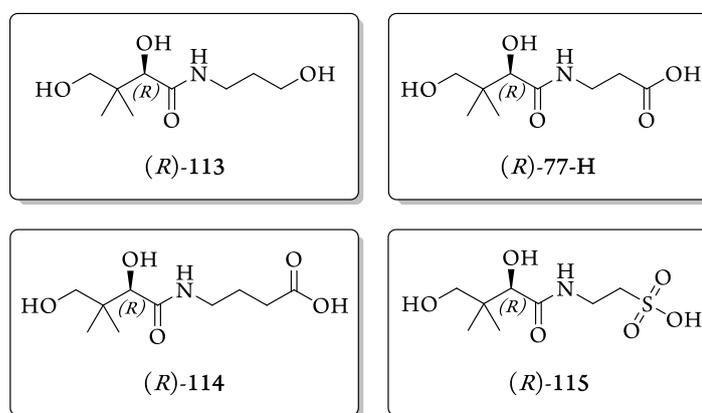
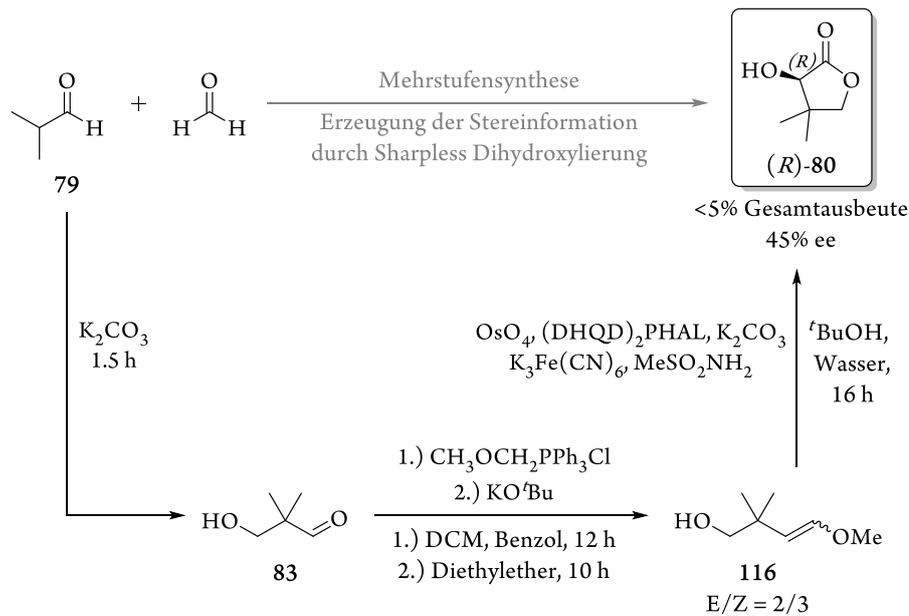


Abbildung 3.4. Von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) abgeleitete, pharmakologisch aktive Wirkstoffe.

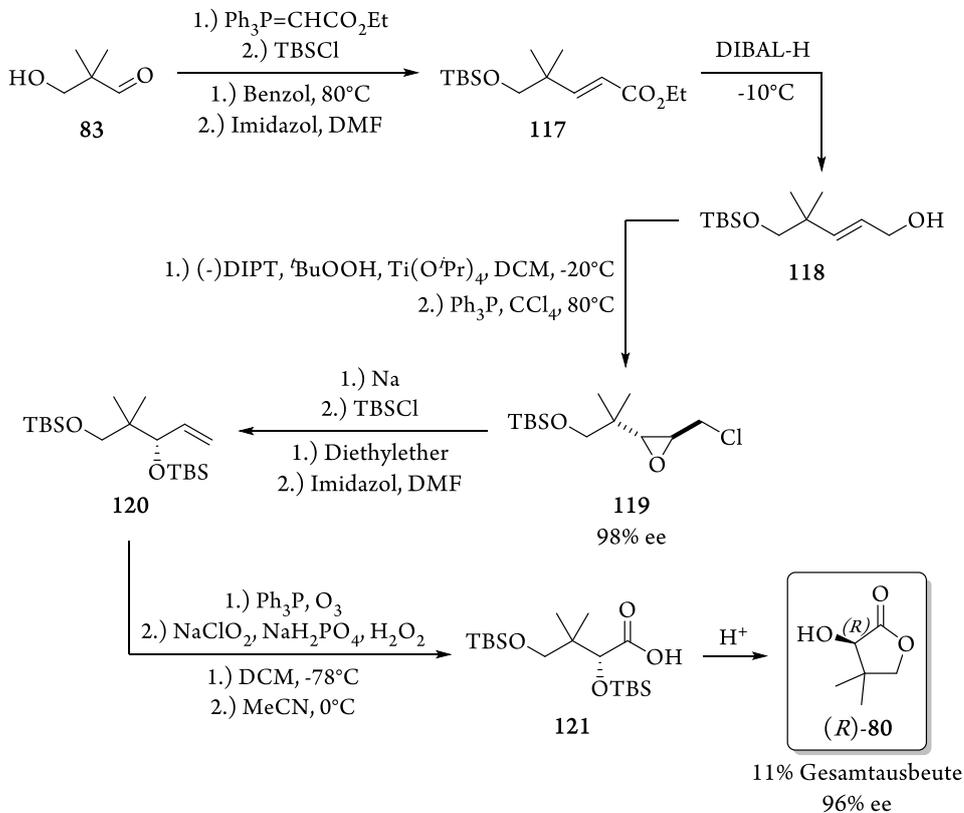
Aufgrund seiner großen Anwendungsbreite ist die hohe Verfügbarkeit von (*R*)-**80** von entscheidender Bedeutung. So wurden neben der Racematspaltung von *rac*-**80** verschiedene Konzepte zur direkten Synthese von (*R*)-**80** entwickelt. Rein chemische Zugänge, die auf industriell etablierten Bausteinen wie Isobutanal (**79**) oder seinem Aldoladditionsprodukt mit Formaldehyd basieren (vergleiche hierzu Kapitel 3.1, Schema 3.2), führen beispielsweise über die asymmetrische SHARPLESS Dihydroxylierung^[441] oder Epoxidierung.^[442] Erstere Methode konnte, obwohl für seine breite Anwendbarkeit in der hochselektiven Darstellung vicinaler Dirole bekannt,^[443] nicht in zufriedenstellendem Maße auf die Synthese von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) übertragen werden (Schema 3.13).^[444]

Die 1999 von UPADHYA *et al.* vorgestellte Reaktionsabfolge startet analog des großtechnischen Prozesses bei Isobutanal (**79**) und Formaldehyd und verläuft über das aus einer anschließenden Wittig-Reaktion stammenden Intermediat **116**. Zwar kann (*R*)-**80** durch eine anschließende SHARPLESS Dihydroxylierung gewonnen werden, der Einsatz von Schwermetallverbindungen wie Osmiumtetroxid und Kaliumhexacyanoferrat(III) sowie des kostenintensiven, chiralen Cokatalysators (DHQD)₂PHAL macht den Prozess im Vergleich zur Industriereferenz (Synthese racemischen Pantolactons (*rac*-**80**) und anschließende diastereomere Kristallisation mit Chinin: 40 – 45% Gesamtausbeute, 99% ee) bei einer Gesamtausbeute von <5% und 45% ee nicht konkurrenzfähig.^[444]



Schema 3.13. Von Isobutanal (**79**) ausgehende Synthese von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) mit Hilfe der SHARPLESS Dihydroxylierung. (DHQD)₂PHAL = 1,4-Bis(9-O-dihydrochinidinyl)phthalazin.

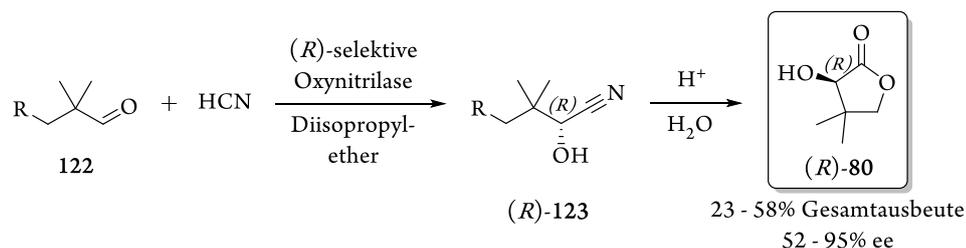
RAO *et al.* veröffentlichte im gleichen Zeitraum eine Route zur Darstellung der Vitamin-B₅-Vorstufe (*R*)-**80** mit Hilfe der SHARPLESS Epoxidierung (Schema 3.14).^[445]



Schema 3.14. Synthese von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) mit Hilfe der SHARPLESS Epoxidierung. TBSCl = *tert*-Butyldimethylsilylchlorid, DIBAL-H = Diisobutylaluminiumhydrid, (-)DIPT = (-)Diisopropyltartrat.

Zwar ließ sich die Enantiomerenreinheit des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-**80**) in der Titan-tetraisopropoxid-katalysierten Synthese im Vergleich zu UPADHYAS Ansatz auf 96% ee verbessern, die Synthese beinhaltete ausgehend von Isobutanal (**79**) allerdings elf Schritte und ist wegen seiner hohen Komplexität und Abfallmenge wenig praktikabel.

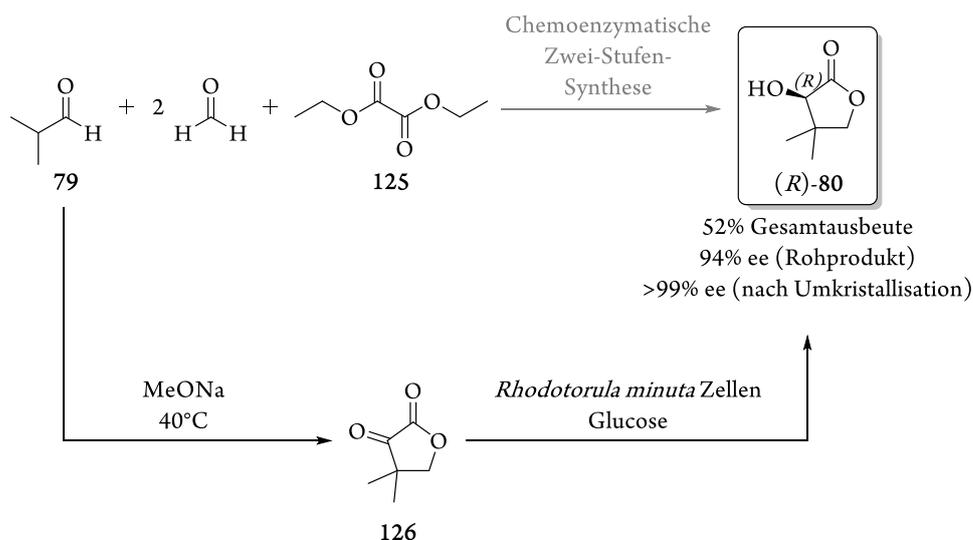
Beinahe zur gleichen Zeit fanden EFFENBERGER *et al.* (Degussa AG) einen alternativen, biokatalytischen Zugang zu (*R*)-**80**. Analog zum etablierten Industrieprozess verläuft die Synthese über ein Cyanhydrin, jedoch wird die Stereoinformation bereits auf dieser Zwischenstufe durch eine Oxynitrilase-katalysierte Hydrocyanierung des Aldolproduktes **122** eingeführt (Schema 3.15).^[446]



Schema 3.15. Enzymatischer Zugang zu (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) unter Verwendung einer (*R*)-selektiven Oxynitrilase. **122a**/*(R)*-**123a**: R = OH; **122b**/*(R)*-**123b**: R = OMe; **122c**/*(R)*-**123c**: R = OEt; **122d**/*(R)*-**123d**: R = OCH₂CH=CH₂; **122e**/*(R)*-**123e**: R = OBz; **122f**/*(R)*-**123f**: R = Cl; **122g**/*(R)*-**123g**: R = Br; **122h**/*(R)*-**123h**: R = OC(O)Me.

Die Biotransformation des Aldehyds **122a**, welcher dem Aldolprodukt **83** der klassischen Racematsynthese von *rac*-**80** entspricht (siehe Schema 3.2), zeigte jedoch mit 60% Ausbeute und 61% ee nur eine mäßige substratspezifische Aktivität und Selektivität bei der Synthese des entsprechenden Cyanhydrins **123a**. Vielversprechender war hier der Einsatz *O*-geschützter Aldehydderivate wie **122b** oder **122f**, die in wenigen Stunden quantitativ und hochselektiv (96, respektive 92% ee) umgesetzt werden konnten.^[446] Die optische Reinheit des Intermediates (*R*)-**123** bleibt bei der anschließenden sauren Hydrolyse, gefolgt von spontaner Lactonisierung zu (*R*)-**80**, in jedem Fall nahezu unverändert. Die Gesamtausbeuten liegen, je nach Substituent der zuvor zu synthetisierenden Vorstufe **122**, zwischen 23 und 58%.^[446] Der über die Monomethylierung von 2,2-Dimethyl-1,3-propandiol (**124**) und anschließende Oxidation zugängliche *O*-methylierte Aldehyd **122b** (Schema 3.15, R = OMe) liefert hierbei zwar mit einer Ausbeute von 58% und 95% ee vergleichbare Werte für (*R*)-**80** wie die Industriereferenz, für seine Darstellung werden jedoch hochtoxisches Methyljodid und Pyridiniumchlorochromat benötigt.^[447-449]

Die bislang einzige bekannte Route zur Darstellung von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**), die von dem industriell etablierten Grundstoffen Isobutanal (**79**) und Formaldehyd ausgeht und keine darüber hinaus gehenden toxischen Chemikalien benötigt, ist der in den späten 1980er Jahren von SHIMIZU *et al.* veröffentlichte, chemoenzymatische Prozess unter Verwendung einer mikrobiellen Reduktion mit *Rhodotorula minuta* Zellen als stereochemisch entscheidendem Reaktionsschritt (Schema 3.16).^[450]



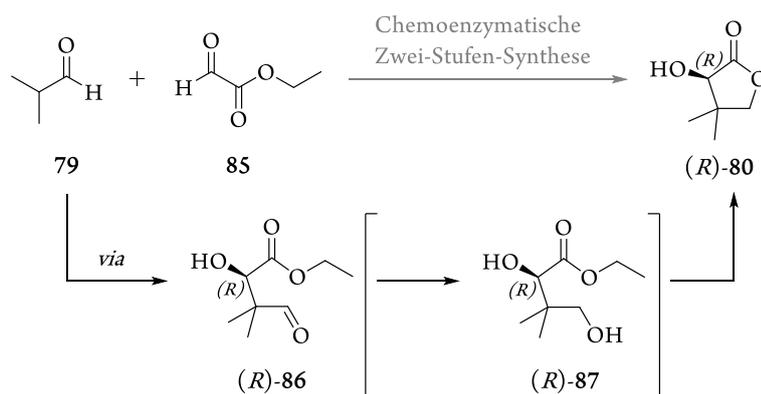
Schema 3.16. Chemoenzymatische Pantolactonsynthese nach SHIMIZU *et al.*

Die Darstellung der Ketopantolactonzwischenstufe **126** wird in einem Eintopfverfahren aus Isobutanal (**79**), Formaldehyd, Diethyloxalat (**125**) und Natriummethanolat realisiert. Die Ausbeute des Intermediates **126** ist durch die Bildung verschiedener Nebenprodukte und der notwendigen destillativen Aufreinigung des Dions auf 65% begrenzt.^[450] Die anschließende mikrobielle Reduktion verläuft hochselektiv und liefert gute Ausbeuten zwischen 82 und 90%, allerdings werden pro Gramm (*R*)-**80** 1.5 g trockener Zellmasse zur Herstellung benötigt.^[450] Die Gesamtausbeute von 52% bei 94% ee (99% nach Umkristallisation) ist mit der Industriereferenz vergleichbar. Der Prozess ist jedoch, insbesondere im Vergleich mit den zuvor diskutierten Methoden, mit lediglich zwei Stufen (plus zwei Aufarbeitungsschritten) wesentlich kürzer und kostengünstiger. Ein Upscaling über den Grammmaßstab wurde bislang, vermutlich insbesondere wegen des großen Bedarfs mikrobiellen Zellmaterials, nicht unternommen.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 Synthese der Referenzverbindungen und Etablierung der Analytik

Um den Gesamtprozess der (*R*)-Pantolactonherstellung auf jeder Reaktionsstufe quantitativ erfassen zu können, müssen zunächst sämtliche Referenzverbindungen bzw. Intermediate dargestellt werden (Kurzschema in Schema 3.17, vollständige Syntheseroute in Kapitel 3.1).



Schema 3.17. Kurzschema der geplanten (*R*)-Pantolactonsyntheseroute.

Die Synthese des racemischen Aldolproduktes *rac*-86 gelingt hierbei analog wie in der Literatur beschrieben^[353] im Multi-Gramm-Maßstab. Nach destillativer Aufreinigung lassen sich neben dem Aldehyd *rac*-86 keinerlei Fremdsignale detektieren (Abbildung 3.5, oben). Die Überführung der Verbindung in seinen korrespondierenden, primären Alkohol *rac*-87 lässt sich chemisch zwar durch die Reduktion mit Natriumborhydrid realisieren, die Spezies ist jedoch instabil und cyclisiert spontan zum Pantolacton *rac*-80. Das Lacton selbst ist kommerziell erhältlich und wird in einer Reinheit von >99% zur Etablierung der analytischen Methoden eingesetzt (Abbildung 3.5, unten).

Eine Umsatzanalytik der Gesamtsynthese lässt sich nachfolgend auf Basis zur Verfügung stehenden Verbindungen *rac*-86 und (*R*)-80 mit Hilfe einer Gaschromatographie-Kalibriergeraden etablieren. Hierzu werden Stammlösungen der beiden Stoffe im Massenkonzentrationsbereich zwischen 0.5 und 5.0 mg/mL hergestellt und diese in Mehrfachbestimmung vermessen um abweichende, gerätebedingte Fehlwerte nivellieren zu können. Zur Erstellung der Kalibriergeraden werden die berechneten Flächenintegrale der stoffspezifischen Signale mit den eingestellten Massenkonzentrationen korreliert. Aus den einzelnen gemittelten Messwerten wird anschließend softwaregesteuert eine Regressionsgerade erstellt (Abbildung 3.6), welche in die Messmethode implementiert wird. Bei Folgemessungen unbekannter Massenkonzentrationen werden diese auf Basis der detektierten Flächenintegrale berechnet.

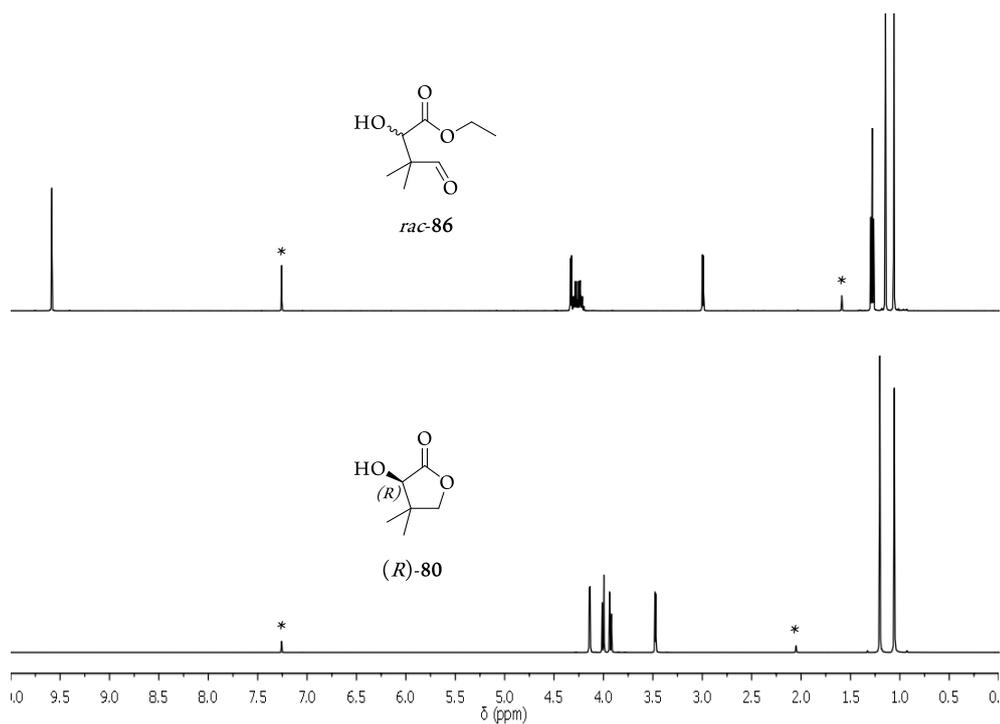


Abbildung 3.5. ¹H-NMR-Spektren des Aldolproduktes *rac*-86 (oben) sowie von (R)-Pantolacton ((R)-80, unten). * = Solvenssignal.

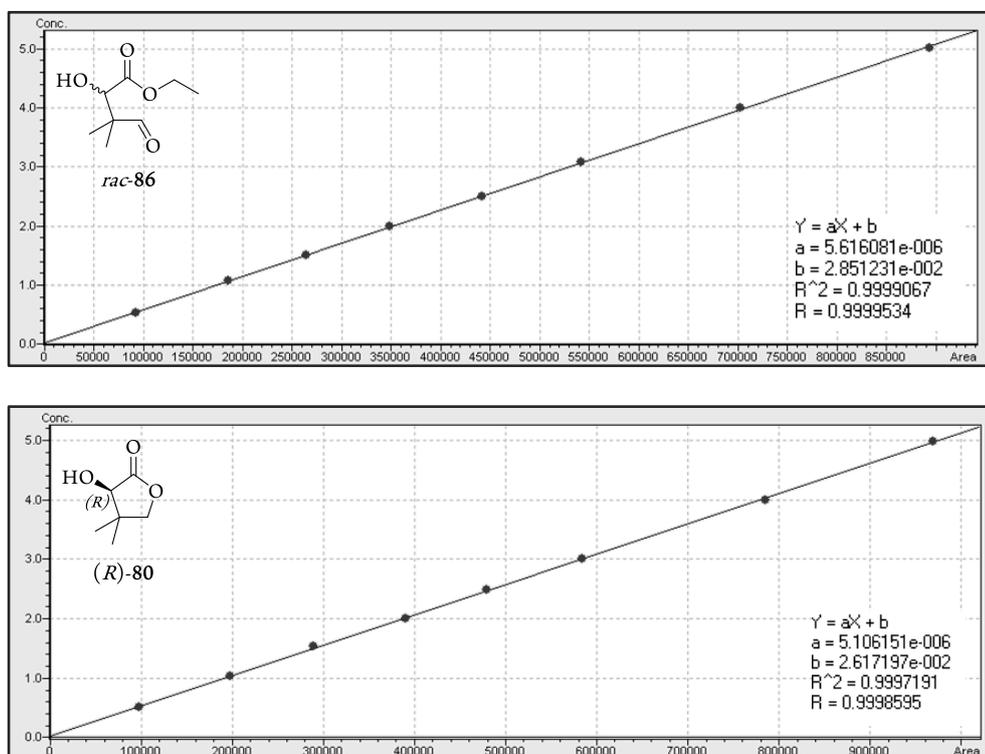


Abbildung 3.6. GC-Kalibriergeraden für *rac*-86 (oben) und (R)-80 (unten).

Der Retentionszeitunterschied der Analyten liegt bei Testmessungen mit >0.6 min und Basislinientrennung bei einer Gesamtmessdauer von nur drei Minuten hierbei sehr hoch (Abbildung 3.7). Da sowohl das Aldolprodukt *rac-86* als auch das Lacton (*R*)-**80** nebeneinander nachweisbar sind, kann die Absolutbestimmung beider Verbindungen sowohl für die Aldoladdition als auch die nachfolgenden Biotransformation mit derselben Methode realisiert werden.

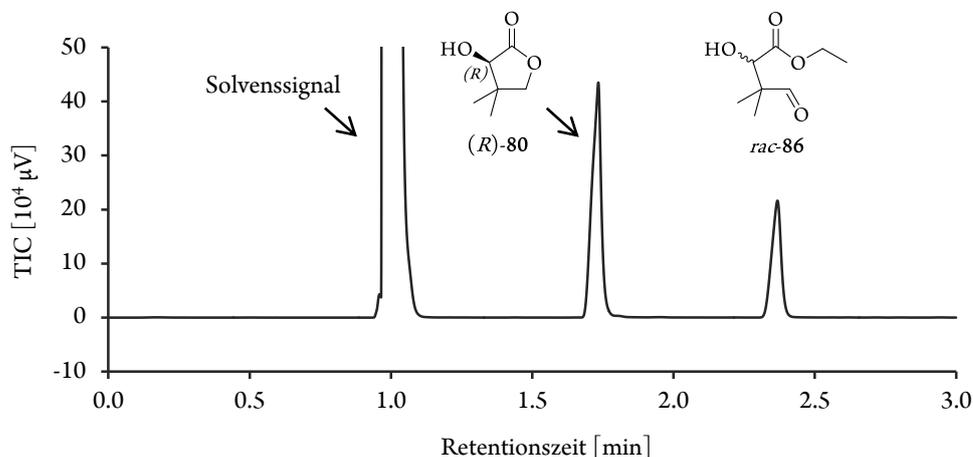


Abbildung 3.7. Exemplarisches Gaschromatogramm einer Reaktionsmischung (achirale Rxi-5ms Säule von Restek®; isotherme Messung bei 140°C; t_r (**80**)= 1.7 min, t_r (**86**)= 2.4 min).

Die Validität der Messergebnisse kann anschließend durch die Präparation von Mischungen willkürlicher Massenkonzentrationen erfolgen (Tabelle 3.2). Im Schnitt zeigen sich hierbei lediglich Abweichungen von einem Prozent, die Maximalabweichung liegt mit drei Prozent niedrig.

Tabelle 3.2. Validierungsmessungen zur Überprüfung der Kalibriergeraden.

(<i>R</i>)- 80 (Einwaage) [mg/mL]	(<i>R</i>)- 80 (gemessen) [mg/mL]	<i>rac</i> - 86 (Einwaage) [mg/mL]	<i>rac</i> - 86 (gemessen) [mg/mL]
3.00	3.00	3.00	3.02
4.00	4.01	4.00	4.08
5.00	5.02	5.00	5.05
1.59	1.57	1.41	1.47
1.59	1.57	1.41	1.43
1.59	1.56	1.41	1.44
1.59	1.58	1.41	1.43
4.47	4.48	2.48	2.43
4.47	4.48	2.48	2.40
4.47	4.47	2.48	2.42
4.47	4.47	2.48	2.45

Der Gerätefehler lässt sich durch wiederholte Analysen derselben Probe abschätzen und erbringt ebenfalls einen Wert von maximal drei Prozent, weshalb diese Methode zur Umsatzbestimmung als robust angesehen werden darf. Die auf Basis der per GC erhaltenen Massenkonzentrationen rückgerechneten Umsätze werden gerundet in ganzen Prozenten angegeben.

Die Enantiomertrennung des Pantolactons erfolgt per chiraler Gaschromatographie. Zur Etablierung wird zunächst kommerziell erhältliches, racemisches Pantolacton (*rac*-**80**) vermessen. Anschließend werden durch Mischung mit (*R*)-**80** definierte Enantiomerenreinheiten des Analyten simuliert (Abbildung 3.8). Bei konstant gehaltenen Konzentrationen können so die Enantiomere den jeweiligen Signalen zugeordnet werden.

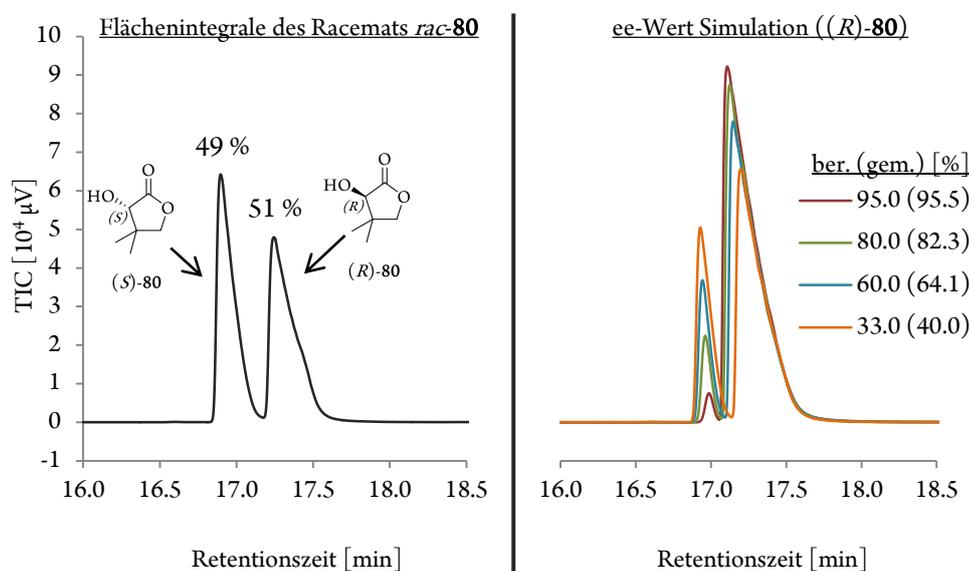


Abbildung 3.8. Enantiomertrennung racemischen Pantolactons (*rac*-**80**) mittels chiraler Gaschromatographie (links) und ee-Wert Simulation für (*R*)-**80** (rechts). ber. = berechnet, gem. = gemessen. Die Messungen werden auf einer Rt- β DEXm Säule von Restek® bei folgendem Temperaturschema durchgeführt: 10 min bei 80°C, Heizrate: 10°C/min bis auf 120°C, 10 min bei 120°C halten. Als Retentionszeiten ergeben sich: $t_r = 17.9$ min ((*S*)-**80**), 18.2 min ((*R*)-**80**).

Zwar kann das Racemat nicht vollständig basisliniengetrennt detektiert werden, wodurch Abweichungen in der ee-Wert Bestimmung auftreten können. Der Fehler wird jedoch bei höheren Enantiomerenüberschüssen für (*R*)-**80** immer kleiner (Abbildung 3.8, rechts). Bei der angestrebten Mindestenantiomerenreinheit von 95% (siehe Kapitel 3.1) beträgt die Abweichung lediglich 0.5%.

Die Auftrennung des racemischen Aldolproduktes *rac*-**86** gelingt mittels chiraler HPLC in einem Flächenintegralverhältnis von (*S*)-**86** zu (*R*)-**86** von 49 zu 51 (Abbildung 3.9). Die Zuweisung der Signale erfolgt anschließend durch kreuzweises Aufstocken der Analyselösung mit (*R*)- bzw. (*S*)-angereichertem Aldehyd **86**.

Alle in den folgenden Kapiteln beschriebenen ee-Werte werden auf halbe Prozente gerundet angegeben.

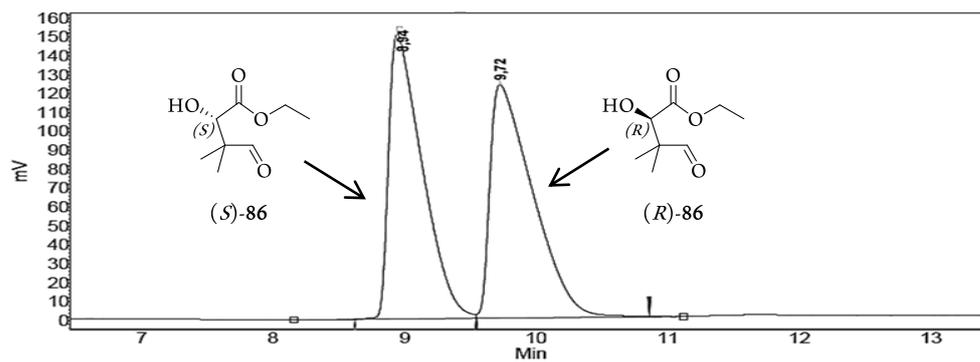


Abbildung 3.9. HPLC-Chromatogramm racemischen Aldolproduktes *rac*-**86**. Messbedingungen: Chiralpak® OD-H Säule, temperiert auf 20°C; Laufmittel CO₂:Hexan:Isopropanol 90:9:1 (V:V), flow 1.0 mL/min; Detektion bei 212 nm. Als Retentionszeiten ergeben sich: $t_r = 8.9$ min ((S)-**86**), 9.7 min ((R)-**86**).

3.3.2 Organokatalytische Synthese des Aldolproduktes

3.3.2.1 Katalysatorscreening und der Einfluss von Wasser auf die organokatalytische Aldolreaktion

Gemäß des Schemas aus Kapitel 3.1 (Schema 3.3) zur Darstellung optisch reinen (*R*)-Pantolactons ((*R*)-**80**) aus dem industriell gut etablierten Baustein Isobutanal (**79**) besteht die erste Herausforderung der Syntheseroute in der möglichst effizienten und selektiven Darstellung des Aldoladditionsproduktes (*R*)-**86**.

Im Gegensatz zu der in Kapitel 2.3.2.22.1 vorgestellten Synthese des β -Hydroxyketons (*R*)-**12** ist eine analoge Versuchsführung zur Darstellung von (*R*)-**86** unter Verwendung des Organokatalysators (*S,S*)-**27** aufgrund der Beschaffenheit der Edukte nicht möglich. Während enolisierbare, α -unverzweigte Aldehyde in Prolin(derivat)-katalysierten Aldolreaktionen sowohl als En-, also Donor-, als auch als Carbonyl-, also Akzeptorkomponente reagieren können, agieren α -verzweigte Aldehyde wegen des erhöhten sterischen Anspruchs ausschließlich als Akzeptor.^[353] Erklärt werden kann dieses empirische Ergebnis durch die thermodynamische Destabilisierung des entsprechenden Prolin(derivat)-Enaminintermediates bei der Verwendung verzweigter Aldehyde.^[451] Die Ausbildung des quaternären, stereogenen Zentrums des Aldolproduktes (*R*)-**86** kann bei der Verwendung nicht-enolisierbaren Glyoxylsäureethylesters **85** und α -verzweigtem Isobutanal (**79**) folglich nicht durch die in dieser Arbeit bereits etablierten Methoden auf Basis der Prolinamid-katalysierten asymmetrische Aldolreaktion (AAR) gelingen. Entsprechend liefern Negativtests mit L-Prolin (**30**) oder (*S,S*)-**27** einen Umsatz von 0% (Tabelle 3.3, Eintrag 1 und 2).

Um den Rahmenbedingungen der effizienten und gleichzeitig ökonomischen Prozessplanung zur Synthese des Aldehydintermediates (*R*)-**86** gerecht zu werden, beschränkt sich ein einleitendes Katalysatorscreening auf die Verwendung enantiomerenreiner, gut zugänglicher und dadurch kostengünstiger Verbindungen aus dem chiralen Pool.^[452,453] Im Besonderen haben sich hier bei ähnlichen Eduktsystemen bereits verschiedene Aminosäuren als potente Organokatalysatoren bewährt.^[94-96,454]

Analog der Screeningvorschriften von JIANG zur aminosäurenkatalysierten AAR zwischen Nitrobenzaldehyd und Cyclohexanon werden im Folgenden proteinogene Aminosäuren auf ihre Katalyseeffizienz bezüglich der Umsetzung von Isobutanal (**73**) mit Ethylglyoxylat **85** evaluiert (Tabelle 3.3).^[348,455] Im Gegensatz zur Literaturvorschrift werden die Substrate jedoch äquimolar eingesetzt.

Unter den L-konfigurierten Aminosäuren befinden sich lediglich vier, die nach 24 Stunden einen Umsatz >10% liefern, wobei ausschließlich Histidin zum (*R*)-konfigurierten Aldehyd (*R*)-**86** führt. Die hohe Chemoselektivität und Aktivität Histidins bei der Katalyse asymmetrischer Aldolreaktionen zwischen elektronenarmen und -reichen Aldehyden wurde bereits in der Gruppe um MAHRWALD beschrieben und 2009 für die Synthese von (*R*)-**86** publiziert (siehe auch Kapitel 3.2.1, Schema 3.4).^[353,456]

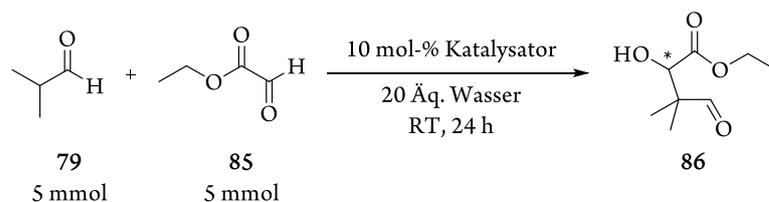


Tabelle 3.3. Aminos\u00e4rescreening zur Darstellung des Aldehyds **86**.

Eintrag	Katalysator ^{a)}	Umsatz [%] ^{b)}	ee (86) [%]
1	Prolin	0	n. b.
2	(<i>S,S</i>)- 27	0	n. b.
3	Histidin	25	37 (<i>R</i>)
4	Arginin	8	n. b.
5	Tryptophan	2	n. b.
6	Serin	0	n. b.
7	Asparagins\u00e4ure	0	n. b.
8	Phenylalanin	9	n. b.
9	Isoleucin	6	n. b.
10	Leucin	22	11 (<i>S</i>)
11	Valin	17	35 (<i>S</i>)
12	Methionin	18	12 (<i>S</i>)
13	Cystein	7	n. b.
14	Threonin	4	n. b.
15	Lysin	4	n. b.
16	Tyrosin	1	n. b.

a) Alle verwendeten Aminos\u00e4uren sind *L*-konfiguriert; b) Produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von **86**; n. b. = nicht bestimmt.

Allerdings wurden im Gegensatz zur Vorgehensweise nach JIANG bei gleichen Eduktverh\u00e4ltnissen weniger \u00c4quivalente (5.55) Wasser f\u00fcr die Umsetzung benutzt sowie die Reaktionszeit auf vier Tage verl\u00e4ngert, wodurch sich sowohl Umsatz (60%) als auch Enantiomeren\u00fcberschuss (65%) des Produktes (*R*)-**86** erh\u00f6hen lie\u00dfen. In welchem Ausma\u00df sich die einzelnen, im System nach MAHRWALD ver\u00e4nderten, Parameter auf die Darstellung von (*R*)-**86** auswirken, l\u00e4sst sich in isolierten Optimierungsversuchen evaluieren.

Obwohl Prolin kein Enaminintermediat mit Isobutanal (**79**) ausbilden kann, lassen sich aufgrund des gleichen Katalysemechanismus¹ f\u00fcr Prolin erhaltene Ergebnisse auf die hier vorliegende Problemstellung \u00fcbertragen. Sowohl Prolin (**30**) als auch Histidin (**88**) aktivieren Donorcarbonylverbindungen \u00fcber die Ausbildung des entsprechenden Enamins.^[269,271,336,344-346,457]

Unabhängig von der Art der Stabilisierung des Übergangszustandes (vergleiche Kapitel 2.2.2, Schema 2.14 und Kapitel 3.2.1, Abbildung 3.1) sind die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte die Ausbildung und Disaggregation dieses Intermediates.^[269,286] Beide Gleichgewichte lassen sich protonengesteuert verschieben (siehe hierzu auch Kapitel 2.3.2.3, Schema 2.35),^[272,273,287] wobei Lösungsmittel, welche Protonentransfers fördern, einen beschleunigenden Effekt auf die Umsatzrate der AAR ausüben sollten.^[116] Entsprechend wurde Wasser im Zusammenhang mit Aminosäurekatalysierten, gekreuzten Aldoladditionen als wirksames (Co)Solvens identifiziert.^[113-119,347,348,455,458,459] Allen genannten Publikationen ist gemein, dass die Anwesenheit von Wasser sich zwar im Vergleich zum wasserfreien, rein organischen Solvenssystem beschleunigend auf die Reaktionsdynamik auswirkt, größere Mengen jedoch einen gegenteiligen Effekt bewirken. Die jeweils empirisch bestimmte, optimale Wassermenge hängt hierbei von den verwendeten Edukten (siehe Vermerk zum „hydrophoben Effekt“ in Kapitel 2.3.2.3) sowie der Löslichkeit des Aminosäurekatalysators ab. So ist L-Prolin mit 1500 g/L* gut,^[461] L-Histidin mit 38 g/L schlecht wasserlöslich.^[462] Werden, wie in den literaturbekannten Referenzreaktionen,^[113-119,347,458,459] mit Wasser nicht mischbare Substrate in Wasser-Solvens-Gemischen umgesetzt, führen hohe Wasseranteile bei Prolin entsprechend zur Phasenseparierung zwischen Katalysator und Edukten, während Histidin durch Ausfällen entzogen wird.

Um eine hohe Prozessökonomie zu gewährleisten, wird zur Darstellung des Aldolproduktes (*R*)-**86** neben Isobutyraldehyd (**79**) technischer Glyoxylsäureethylester (**85**) in Toluol (50 Gew.-%) verwendet. Im wasserfreien System kann aufgrund der nahezu vollständigen Unlöslichkeit des Katalysators in dem rein organischen Milieu ein faktisch inertes Verhalten des Histidins detektiert werden (Abbildung 3.10).

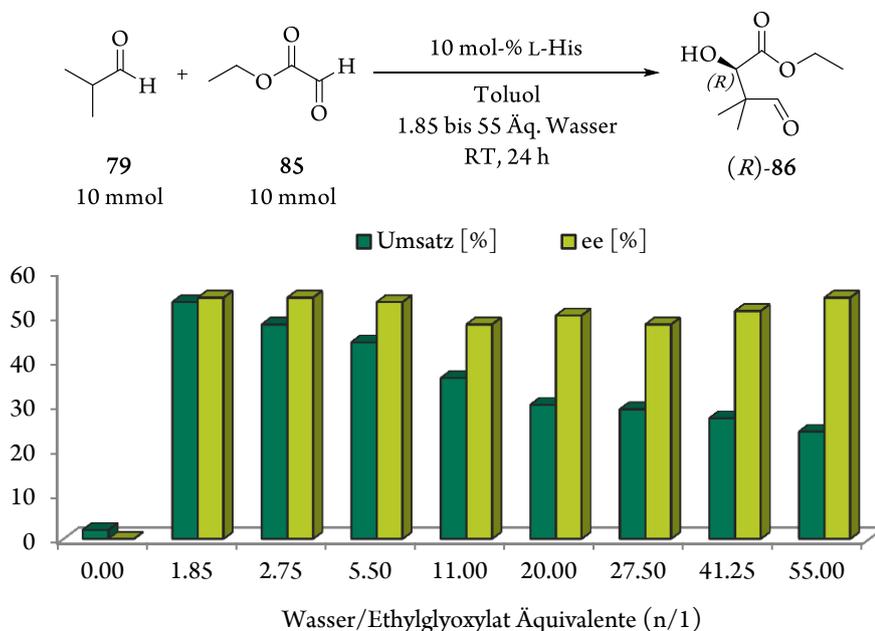


Abbildung 3.10. Darstellung von (*R*)-**86** unter veränderten Wassermengen. Auf der x-Achse sind dabei die Stoffmengenäquivalente (n) Wasser pro mol Ethylglyoxylat in n/1 angegeben. n=0 entspricht einer wasserfreien Reaktionsführung.

* Das Sicherheitsdatenblatt von Sigma Aldrich gibt einen Wert von 115 g/L an.^[460]

Der Zusatz weniger Äquivalente Wasser hingegen führt zu einem sprunghaften Anstieg sowohl des Umsatzes als auch der optischen Reinheit des Aldolproduktes. Bei zunehmenden Wasseranteilen sinkt der Umsatz kontinuierlich, wobei die Selektivität beinahe unbeeinflusst bleibt. Erklären lässt sich dies durch die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches. Während Isobutanal (**79**) eine nur eine mäßige Wasserlöslichkeit von 75 g/L aufweist,^[463] liegt diese für Ethylglyoxylat **85** bei 394 g/L.^{[464]*} Im wasserarmen Medium werden so, ähnlich wie in Kapitel 2.3.2.2 für die AAR zwischen 3-Chlorbenzaldehyd und Aceton beschrieben, in der Emulsion Kompartimente hoher Edukt- und Katalysatorkonzentration erzeugt. Im wasserreichen Medium lösen sich der Glyoxylsäureethylester **85** sowie L-Histidin in Wasser, während Isobutanal (**79**) hauptsächlich in der organischen Phase verbleibt. Einerseits wirkt so die Phasentrennung der Edukte, andererseits die zunehmend niedrigere Konzentration der Stoffe in der wässrigen Phase bei Erhöhung des Wasseranteils geschwindigkeitsvermindernd.

Im Vergleich der von MAHRWALD beschriebenen Lösungsmittelzusammensetzung (5.5 Äquivalente Wasser) mit dem umsatzstärksten Screeningergebnis aus Abbildung 3.10 (1.85 Äquivalente Wasser) zeigen sich kleinere Unterschiede in der Reaktionskinetik (Abbildung 3.11). Innerhalb von 24 Stunden überschreitet der erzielte Umsatz im wasserärmeren System die 50% Marke, während dies im wasserreicheren Lösungsmittelgemisch erst nach 48 Stunden der Fall ist. Im Allgemeinen verläuft die AAR im wasserarmen Milieu zwar schneller, jedoch mit geringfügig verringerter Selektivität. Bei weiter verlängerten Reaktionszeiten nivellieren sich die ee-Werte in beiden Solvenssystemen auf 50±2%.

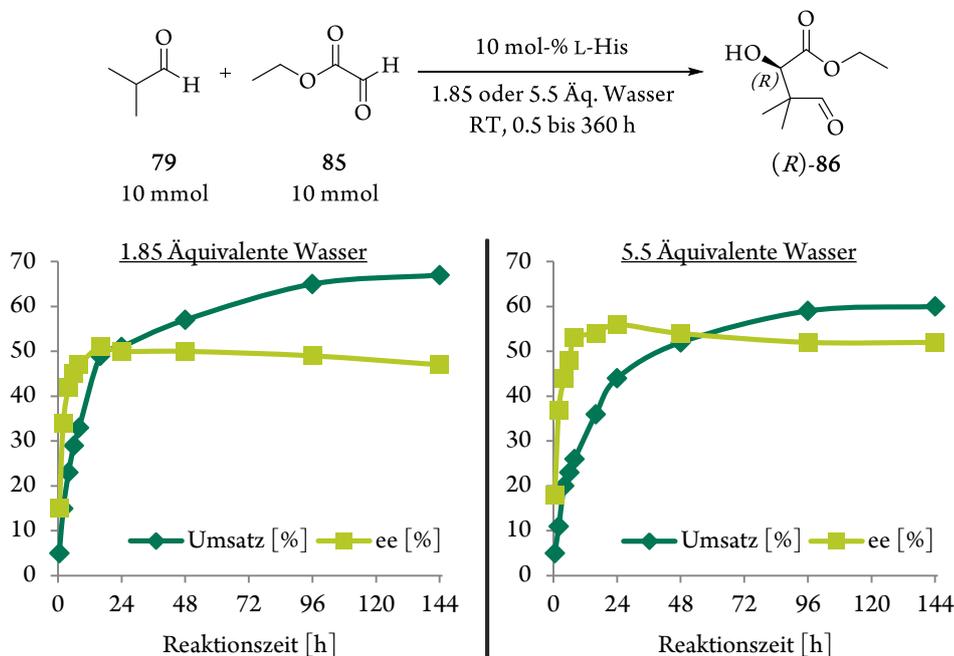
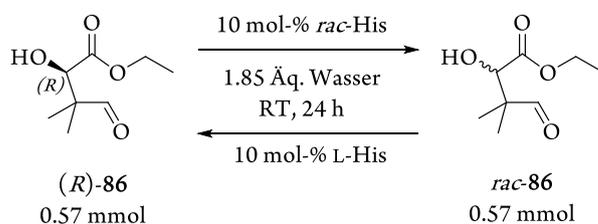


Abbildung 3.11. Vergleich der Reaktionskinetik im wasserärmeren (links) und -reicherem (rechts) Lösungsmittelsystem.

* Die Berechnung mittels Advanced Chemistry Development ACD/Labs Software v11.02 liefert einen Wert von 112 g/L.^[465]

Auffällig ist jedoch in beiden Fällen, dass die optische Reinheit des Aldolproduktes (*R*)-**86** im Verlauf der Reaktionsdauer zunimmt, bis sich ein Endwert eingestellt hat. Aus vorherigen Arbeiten zur AAR mit Prolinderivatkatalysatoren ist bekannt, dass die Selektivität der asymmetrischen Aldolreaktion unter diesen Bedingungen keine intrinsische zeitliche Abhängigkeit aufweist.^[61,64,65] Gleichwohl ist von RULLI die Abnahme der Enantiomerenreinheit des Aldolproduktes unter thermodynamischen Reaktionsbedingungen mit der Zeit beschrieben, die auf die Racemisierung des β -Hydroxyketons zurückzuführen ist.^[65,69]

Um die anfängliche Racemisierung des Aldolproduktes (*R*)-**86** oder den Entzug eines Enantiomeres durch Weiterreaktion mit Histidin auszuschließen, werden kreuzweise Kontrollexperimente durchgeführt. Unter den Reaktionsbedingungen des Benchmarkversuches werden sowohl der enantiomerenangereicherte Aldehyd (*R*)-**86** mit racemischem Histidin, als auch der racemische Aldehyd *rac*-**86** mit L-Histidin versetzt. In beiden Fällen kann nach 24 Stunden keine Änderung des ee-Wertes detektiert werden.



Schema 3.18. Untersuchungen zur Retroaldolreaktion mit (*R*)-**86** und racemischem Histidin bzw. *rac*-**86** und L-Histidin.

Eine Erklärung für die beobachtete Zeitabhängigkeit der Parameter Umsatz und Selektivität mag in der Struktur des Histidins an sich sowie dem zweiphasigen Reaktionsgemisch liegen. Da der isoelektrische Punkt von Histidin im neutralen pH-Bereich liegt, ist es die einzige proteinogene Aminosäure, die unter physiologischen Bedingungen sowohl als Protonendonator als auch -akzeptor fungieren kann.^[466] So kann einerseits als Nebenreaktion zur AAR die unselektive, durch Histidin als Base katalysierte Aldolreaktion angenommen werden.^[288,290] Andererseits ist die Ausbildung von Histidinaggregaten denkbar, die eine veränderte Reaktivität und Selektivität im Vergleich zum Monomer aufweisen, wie sie bereits für prolinkatalysierte Systeme postuliert wurden.

Während PIHKO die zeitabhängige Zunahme des ee-Wertes des Aldolproduktes bei der Reaktion zwischen Aceton und *p*-Trifluormethylbenzaldehyd in Wasser bei Anwesenheit bestimmter Basen auf ein vorgelagertes Aktivierungsgleichgewicht zurückführte,^[116] postulierten BLACKMOND und Mitarbeiter die Ausbildung eines Produkt/Katalysatoraggregates.^[467] Durch dieses könnten sich die Katalysatoreigenschaften durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Produkt und Katalysator verändern. Weiterhin wurde in diesen Arbeiten das geänderte Lösungsverhalten dieser Aggregate diskutiert.

Da in verschiedenen, heterogenen Solvensgemischen nicht-lineare Effekte bezüglich des ee-Wertes beobachtet werden konnten, wurde davon ausgegangen, dass zeitabhängig konzentriertere Edukt/Katalysatorphasen entstehen können, diese jedoch strukturbedingt unterschiedlich gut solvatisiert werden können. Durch komparative Solvensstudien konnte nachfolgend gezeigt werden, dass die Nicht-linearität des Effektes nur bei bestimmten Lösungsmitteln auftritt.^[468,469] Die Hypothesen der Gruppe um BLACKMOND konnten 2012 von DUANGDEE teilweise durch den Nachweis eines parasitären Substrat/Katalysatoradduktes bestätigt werden.^[470]

Welche der beschriebenen bzw. postulierten Nebenreaktions-, Solvatations- oder Aggregationsgleichgewichte im vorliegenden, ebenfalls zweiphasigen Gemisch aus Ethylglyoxylat **85**, Isobutanal (**79**) und L-Histidin in Wasser/Toluol für die zeitabhängige Veränderlichkeit des ee-Wertes verantwortlich sind, steht allerdings nicht im zentralen Interesse dieser Arbeit.

3.3.2.2 Optimierung einzelner Reaktionsparameter

Obwohl sich im wasserärmeren Lösungsmittelgemisch (1.85 Äquivalente Wasser) durch längere Reaktionszeiten höhere Umsätze erzielen lassen (vergleiche Kapitel 3.3.2.1, Abbildung 3.11) steht eine möglichst hohe Prozesseffizienz im Fokus dieser Arbeit. Daher wird als Referenzsystem für die folgenden, sukzessiven Optimierungsversuche die AAR mit einer Reaktionszeit von 24 Stunden gewählt.

Zwar ist in der Literatur die große Substratbreite der Histidin-katalysierten AAR beschrieben, jedoch fehlen gängige Versuche zur Abschätzung des Einflusses einzelner Reaktionsparameter auf die Gleichgewichtslage und Selektivität der Reaktion.^[353,456] Im Allgemeinen sollte sich ein Absenken der Temperatur positiv auf die optische Reinheit des Aldolproduktes auswirken, wie Literaturbeispiele bei der Verwendung primärer und sekundärer Aminkatalysatoren zeigen.^[65,129,270,279,297] Gleichzeitig besteht meist ein nicht-linearer, aber kontinuierlicher Trend zu höheren Umsätzen bei höheren Temperaturen. Im vorliegenden System zur Synthese von (*R*)-**86** wird ein Selektivitätsmaximum bei 10°C detektiert, während die Umsatzrate über den erfassten Temperaturbereich nahezu linear ansteigt (Abbildung 3.12).

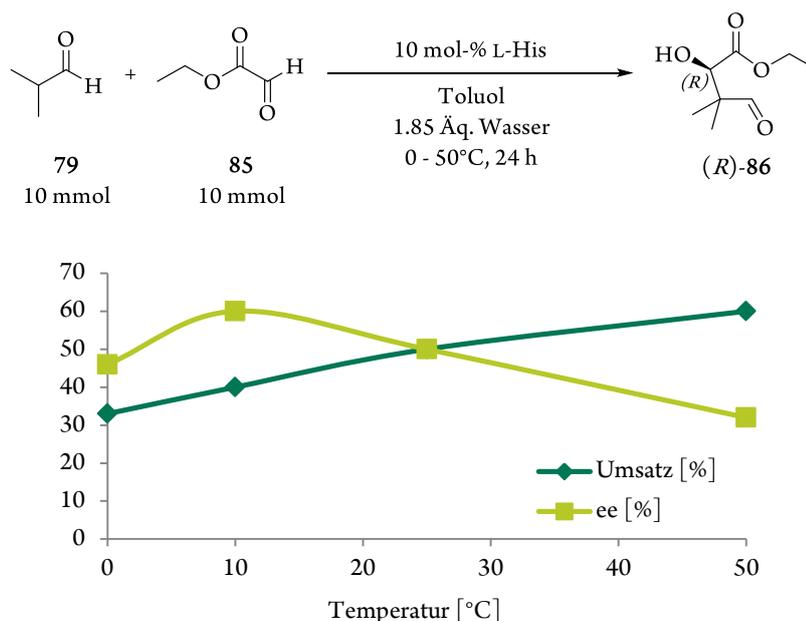


Abbildung 3.12. Darstellung von (*R*)-**86** bei verschiedenen Reaktionstemperaturen.

Ein weiteres Absenken der Reaktionstemperatur auf unter 0°C lässt sich wegen des Ausfallens von Histidin nicht mit den in Abbildung 3.12 gezeigten Werten vergleichen und ist hier deshalb nicht dargestellt. Die Existenz eines optimalen Temperaturbereiches mag ein weiteres Indiz für die oben erwähnten Katalysatoraggregate sein, die sich temperatur-, und damit aktivierungsenergieabhängig, bilden bzw. unterschiedliche Morphologien oder Konformationen einnehmen können. Im Rahmen dieser Arbeit wird sich jedoch im Hinblick auf die Gestaltung des Gesamtprozesses auf phänomenologische Untersuchungen beschränkt und keine weiterführenden Versuche zum Nachweis dieser Aggregate durchgeführt.

Um die von Aminkatalysatoren bekannte, unselektive Basenkatalyse zum racemischen Aldolprodukt *rac*-**86**,^[288,290] welche bei der Verwendung von Histidin aufgrund der Seitenkettenbasizität eine besondere Rolle zukommt (siehe Kapitel 3.3.2.1),^[466] zu unterdrücken, wurde von PIHKO vorgeschlagen, das Reaktionsgemisch zu puffern.^[116] Entsprechende Versuche unter Ersatz des Wasseranteils im Benchmarksystem durch Puffer sind in Abbildung 3.13 gezeigt.

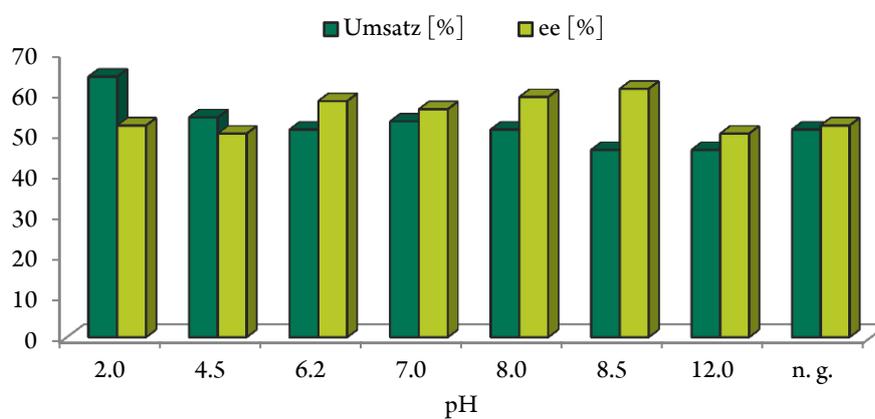
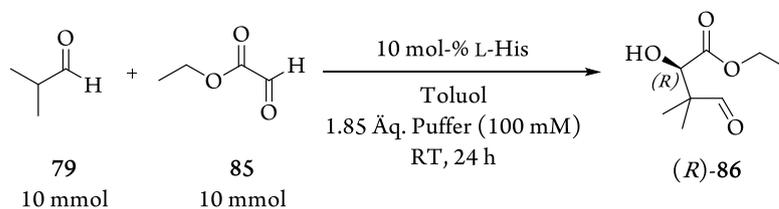


Abbildung 3.13. Darstellung des Aldehyds (*R*)-**86** im gepufferten Reaktionsgemisch (n. g. = ungepuffert).

Ein äquimolarer Einsatz des Puffers im Bezug auf Histidin lässt sich im vorliegenden Benchmarksystem dabei nicht realisieren, da höher konzentrierte Pufferlösungen als 100 mM zum Ausfallen des Histidins führen. Beim Einsatz größerer Mengen 100 mM Puffers wird hingegen das Verhältnis Wasser/Katalysator verändert, welches ebenfalls einen Einfluss auf die Reaktionskinetik besitzt. Die untersuchten Puffersysteme können so höchstens eine Tendenz aufzeigen.

Im Vergleich zum ungepufferten Referenzsystem (Abbildung 3.13, Eintrag ‚n. g.‘) werden im sauren Milieu (pH 2.0) bei gleicher Selektivität ein höherer Umsatz, im Bereich um pH 7±1 bei gleichem Umsatz höhere ee-Werte detektiert. Die Nicht-Linearität der Messergebnisse ist hierbei auf die komplexe Struktur des Aminosäurekatalysators zurückzuführen. Die Protolysegleichgewichte von Histidin sind im Vergleich zu anderen proteinogenen Aminosäuren kleinschrittiger verschiebbar, zudem liegt der isoelektrische Punkt im neutralen pH-Bereich.^[466]

Wie von LAM und SCHEFFLER gezeigt wurde sind sowohl der Imidazolring, als auch der C- und N-Terminus in den Katalysemechanismus integriert.^[336,351] So führen Derivatisierungen an jedem der drei Strukturelemente zu geringeren Umsätzen und einer verschlechterten Selektivität der AAR, jedoch mit unterschiedlichen Beträgen (siehe hierzu auch Kapitel 3.2.1).

Obwohl alle in diesem Kapitel dargestellten, produktorientierten Syntheschemata eindirektionale Reaktionspfeile zeigen, handelt es sich immer um Gleichgewichtsreaktionen, wobei die Einzelparameteroptimierungen die jeweilige Lage des Gleichgewichtes verschieben. Das Einstellen dieser Homöostase lässt sich durch Langzeitversuche zeigen (vergleiche den asymptotischen Verlauf der Umsatzkurve in Abbildung 3.11). Eine Verschiebung des Gleichgewichtes ist nach dem LE CHATELIER-BRAUNschen Prinzip des kleinsten Zwanges allerdings ebenso durch eine veränderte Eduktstöchiometrie möglich.^[471] Entsprechende Versuche unter Erhöhung der Donoraldehydmenge sind in Tabelle 3.4 gezeigt.

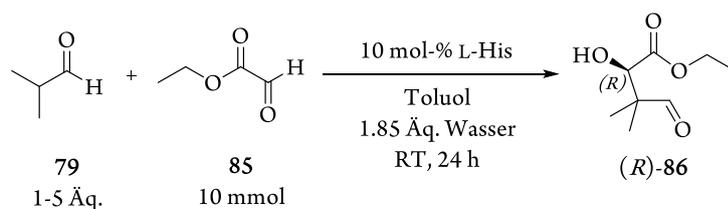


Tabelle 3.4. Veränderung der Eduktstöchiometrie bei der Synthese von (*R*)-**86**.

Eintrag	Äq. Isobutanal (79)	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((<i>R</i>)- 86) [%]
1	1	53	56
2	2	62	65
3	3	64	66
4	4	65	67
5	5	68	67

a) Produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von (*R*)-**86**, ermittelt per GC-Kalibriergeraden.

Durch die Verdopplung der Isobutanaläquivalente lässt sich nicht nur, wie erwartet, der Umsatz der AAR erhöhen sondern auch die Selektivität positiv beeinflussen, was wiederum ein Indiz für die Existenz eines zu dem von DUANGDEE *et al.* beschriebenen analogen Substrat/Katalysatoradduktes sein mag.^[470] Aus ökonomischen Gründen werden für die im folgenden Kapitel durchgeführten Versuche zwei Äquivalente Isobutyraldehyd (**79**) verwendet, obwohl mit drei bis fünf Äquivalenten noch minimale Umsatzsteigerungen erreicht werden.

3.3.2.3 Einfluss von Additiven

Obwohl sich die Katalysemechanismen von Histidin und Prolin(derivaten) in der Stabilisierung des Übergangszustandes unterscheiden, verlaufen beide über die Ausbildung von Enaminen.^[269,271,336,344-346,457] Wie in Kapitel 2.2.2 bzw. 3.3.2.1 beschrieben, lassen sich sowohl die Enaminbildung als auch –disaggregation nach Anlagerung der Akzeptorkomponente beschleunigen, wenn ein protisches (Co)Solvens wie Wasser für die AAR verwendet wird.^[116,269,286] Im vorliegenden Benchmarksystem ist die Zugabe von Wasser jedoch wegen der unterschiedlichen Löslichkeiten der Komponenten und der hieraus resultierenden Kompartimentierung limitiert.

Um sowohl den geschwindigkeitsbeschleunigenden Effekt von Wasser auszunutzen als auch das Reaktionsgemisch zu homogenisieren und der Phasentrennung entgegenzuwirken, können Alkohole als Additive von Nutzen sein. Diese wirken als Phasenvermittler und können den intramolekularen Protonentransfer des Enaminintermediates unterstützen. Als Alkohol bietet sich im Hinblick auf die Kombination mit der enzymatischen Reduktion des Aldehyds (*R*)-**86** unter substratgekoppelten Co-faktorregenerierung Isopropanol an, da dieses mit dem zweiten Schritt des Gesamtprozesses vollständig kompatibel wäre (siehe Kapitel 3.1).

Interessanterweise zeigt sich sowohl ein Umsatz- als auch Selektivitätsmaximum, wenn der Alkohol und Wasser nahezu äquimolar eingesetzt werden (Abbildung 3.14).

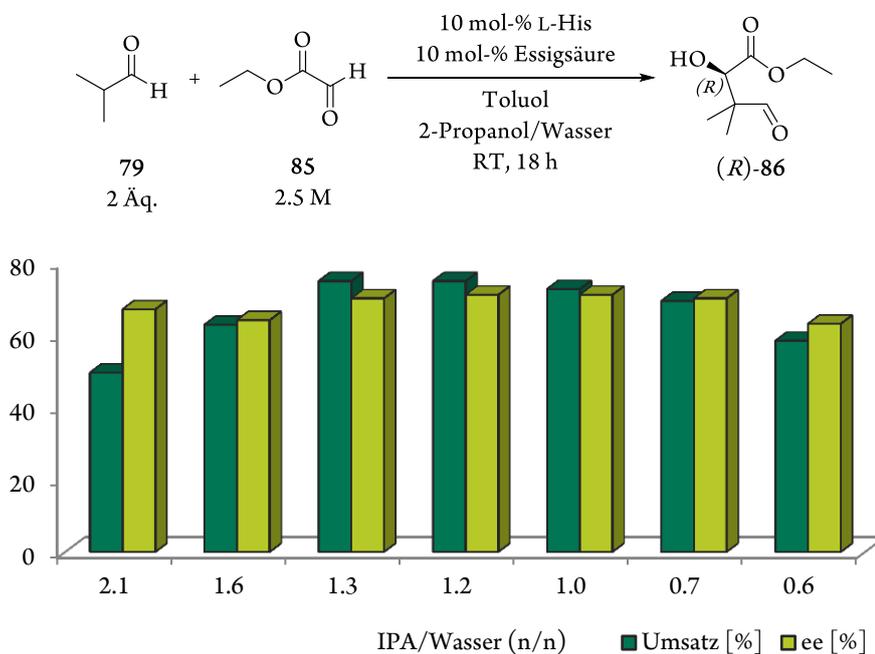


Abbildung 3.14. Synthese von (*R*)-**86** mit 2-Propanol als Additiv.

In den Randbereichen des untersuchten Alkohol/Wasser Spektrums können Umsätze von 50% (2-Propanol/Wasser 2.1) und 58% (2-Propanol/Wasser 0.6) detektiert werden, die signifikant unterhalb des optimalen Bereichs von 2-Propanol/Wasser (1.0-1.3) liegen.

Die hier erhaltenen Umsätze von 73 bis 75% lassen auf einen synergetischen Effekt der beiden Lösungsmittel im Vergleich zu ihren analogen wasserreicheren oder -ärmeren Solvensgemischen schließen.

Die ee-Werte im optimalen Solvensbereich liegen mit 71% leicht über dem für die Isopropanol-freie Umsetzung erhaltenen Wert von 65%. Gesetzt dem Fall, dass dieser Effekt auf die beschleunigte Protonierung durch Zugabe des phasenvermittelnden Alkohols zurückzuführen ist, kann angenommen werden, dass hierdurch eine unselektive Basenkatalyse als Nebenreaktion unterdrückt oder verlangsamt wird bzw. sich das gewünschte Enamingleichgewicht rascher einstellt. Analoge mechanistische Begründungen und Versuche konnten in dieser Arbeit bereits für die Verwendung des Katalysators (*S,S*)-**27** gezeigt werden (siehe Kapitel 2.3.2.2 und 2.3.2.3). Ob sich die Erkenntnisse der Prolinamid-katalysierten AAR auf die Verwendung von Histidin übertragen lassen, lässt sich durch die Zugabe von Additiven zum Reaktionsgemisch verifizieren (Tabelle 3.5).

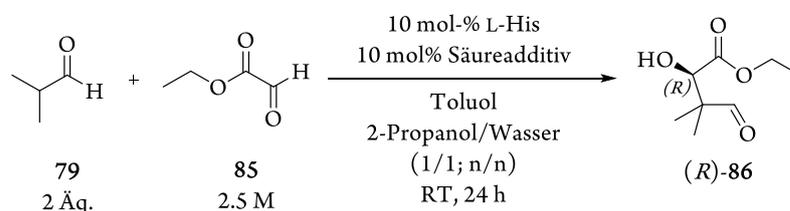


Tabelle 3.5. Cokatalysatorscreening zur Darstellung des Aldehyds (*R*)-**80**.

Eintrag	Cokatalysator	pK_a	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((<i>R</i>)- 86) [%]
1	---	---	73	71
2	DBN	0.90 (pK_B)	35	43
3	NaAc	9.25 (pK_B)	34	57
4	KAc	9.25 (pK_B)	38	59
5	Sc(OTf) ₃	4.96	32	23
6	TFA	0.26	65	65
7	Salicylsäure	2.75	74	72
8	Ameisensäure	3.77	84	67
9	L-Milchsäure	3.87	86	71
10	Benzoessäure	4.17	89	75
11	<i>m</i> -Toluylsäure	4.28	85	75
12	Zimtsäure	4.44	83	75
13	Essigsäure	4.76	78	75
14	Pivalinsäure	5.02	85	75
15	Laurinsäure	5.78	82	72
16	Harnsäure	5.82	74	74

a) Produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von (*R*)-**86**, ermittelt per GC-Kalibriergeraden.

Obwohl für Basenadditive in anderen Aminosäure-katalysierten Aldolreaktionen bereits Umsatzratensteigerungen berichtet wurden,^[472,473] verlangsamten diese die AAR im Vergleich zum Histidin-katalysierten Referenzsystem (vergleiche Tabelle 3.5, Einträge 1 bis 4). In allen Fällen sinkt hierbei auch die Selektivität der Reaktion, wobei besonders im Fall von DBN davon ausgegangen werden kann, dass die Base selbst zu einem gewissen Anteil die unselektive Nebenreaktion zum racemischen Produkt *rac*-**86** katalysiert. Auch der von BARBAS^[120,273] und PENHOAT^[474] beschriebene umsatzsteigernde Effekt durch die Zugabe von Lewis-Säuren wie Scandiumtriflat lässt sich nicht auf das vorliegende System übertragen (vergleiche Eintrag 1 und 5). Im Zusammenhang mit Prolin(derivat)-katalysierten Aldolreaktionen findet sich in der Literatur häufig die Aktivierung der Carbonylkomponenten durch Brønstedsäuren.^[115,116,118,120,123-125,127,272,275-277,281,282,284,291,296,475] Auch beim Einsatz von Histidin als Organokatalysator können mit Additiven mittlerer Säurestärke Umsatzsteigerungen um bis zu 26% erreicht werden (Eintrag 10), wobei sich der ee-Wert von (*R*)-**86** im pK_a-Bereich zwischen vier und fünf im Vergleich zum Benchmarkversuch auf 75% verbessern lässt (Einträge 10 bis 14).

Obwohl die Beschleunigung der Aldolreaktion durch die vorgelagerte Protonierung des Aminosäurekatalysators im Fall von Prolin mechanistisch begründet wurde^[270,267,268,344] und die entsprechenden Zwischenstufen analytisch nachgewiesen werden konnten,^[271-273] kann der Effekt nicht allein durch die Säurestärke eines Additives erklärt werden. So wird in der Literatur diskutiert, ob bei ähnlichen Säurekonstanten die korrespondierenden Basen der verwendeten Brønstedsäuren einen sterischen Effekt auf die Reaktion ausüben können.^[287] Ebenso wird in Betracht gezogen, dass sich die funktionellen Gruppen der Additive stabilisierend bzw. destabilisierend auf das Enaminintermediat auswirken.^[272]

Am vorliegenden System lassen sich diese Postulate beispielhaft erkennen. Obwohl die Säurestärken der langkettigen, aliphatischen Laurin- (Eintrag 15) und der aromatischen Harnsäure (Eintrag 16) faktisch identisch sind, werden dennoch verschiedene Umsätze von 82, respektive 74% bei der Synthese von (*R*)-**86** detektiert, was auf die strukturellen Unterschiede zwischen den beiden Additiven zurückgeführt werden kann. Ebenso erweist sich die sterisch anspruchsvolle Pivalinsäure (85% Umsatz, Eintrag 14) im Vergleich zur unverzweigten Essigsäure (78% Umsatz, Eintrag 13) trotz nur minimaler Abweichungen im pK_a-Wert als effektiverer Cokatalysator. Die elektronischen Eigenschaften der Substituenten eines Benzoessäurederivates vergleichbarer Säurestärke zeigen hingegen, anders als von GRYKO *et al.* für die Prolinthioamid-katalysierte AAR von Aceton und *p*-Nitrobenzaldehyd gezeigt, im vorliegenden System nur einen geringen Unterschied in ihren Cokatalysatoreigenschaften (Eintrag 10 und 11).^[272]

Obwohl der Einsatz von Brønstedsäuren mittlerer Stärke im Solvensgemisch aus Isopropanol und Wasser nach 24 Stunden (*R*)-**86** mit einem Umsatz von annähernd 90% bei 75% ee liefert, bleibt abschließend zu klären, ob die veränderte Gleichgewichtslage der AAR sowie die verbesserte Selektivität allein durch das Säureadditiv hervorgerufen wird. Der Effekt des organischen Cosolvens lässt sich hierbei durch komparative Solvensstudien evaluieren (Abbildung 3.15).

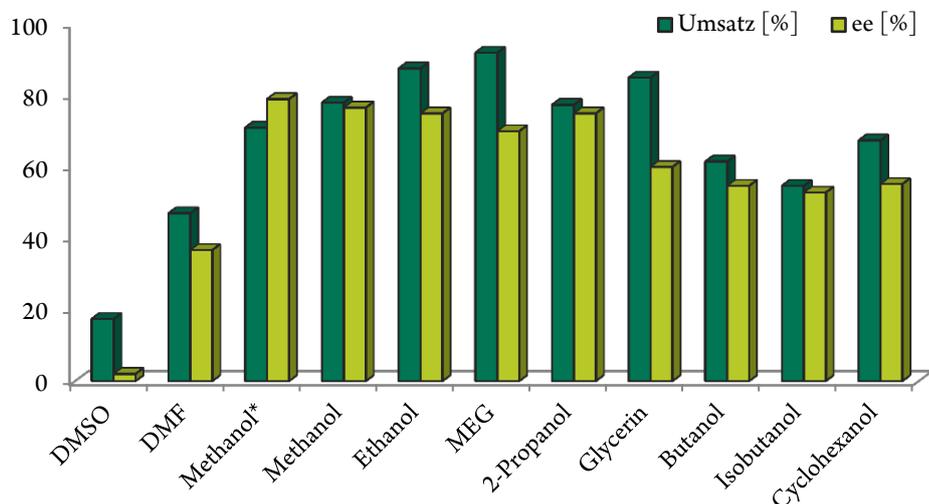
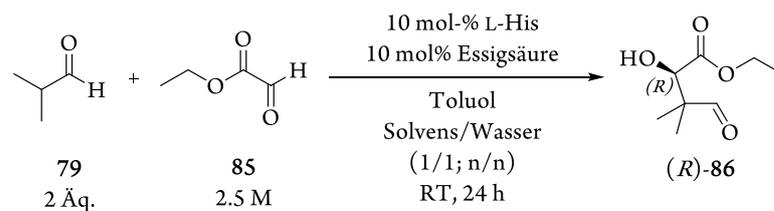
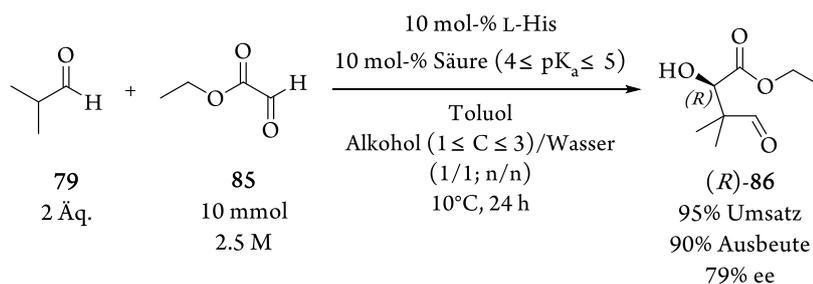


Abbildung 3.15. Cosolvensscreening zur Darstellung des Aldehyds (R)-86. * = Reaktion bei 7°C.

Die in der Literatur für Prolin(derivat)- oder Pyrrolidin-katalysierte Aldolreaktionen häufig benutzten (Co)Solventien DMSO und DMF liefern im Vergleich zum Isopropanolreferenzsystem sowohl wesentlich schlechtere Umsätze als auch Selektivitäten.^[89-93,115,116,125,268,272,273,474] Obwohl all diese Gemische homogen sind und immer das gleiche Säureadditiv benutzt wird, lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass ein polar protisches Cosolvens im Vergleich zu polar aprotischen Lösungsmitteln synergistisch zur Histidin-katalysierten AAR beiträgt. Bestätigt wird diese Vermutung durch vergleichenden Einsatz verschiedener Alkoholhomologe. Hierbei liefern alle Alkohole bessere Ergebnisse als DMSO und DMF, wobei sich kürzerkettige Alkohole als 2-Propanol bei gleichbleibend hoher Selektivität umsatzsteigernd auswirken. Ihre höheren Homologen führen hingegen zu geringeren Umsätzen und ergeben das Aldolprodukt (R)-86 in geringerer optischer Reinheit. Werden höherwertige Alkohole als Cosolventien verwendet (vergleiche Ethanol und Ethylenglycol (MEG) bzw. Isopropanol und Glycerin), zeigt sich eine leicht positive Deviation im Umsatz, wobei der ee-Wert des Aldehyds (R)-86 leicht sinkt.

3.3.2.4 Synthese von (*R*)-**86** unter Verwendung optimierter Reaktionsbedingungen

Zusammenfassend setzt sich das optimierte Reaktionsgemisch für die organokatalytische Synthese von (*R*)-**86** bezogen auf den Akzeptor Ethylglyoxylat **85** aus zwei Äquivalenten des Donors Isobutanal (**79**) sowie jeweils 10 mol% L-Histidin und einem Brønstedsäurekatalysators im pK_a -Bereich zwischen vier und fünf in einem äquimolaren Alkohol/Wasser-Solvenssystem zusammen. Der verwendete Alkohol ist hierbei monovalent und besitzt eine Kettenlänge kleiner drei (Schema 3.19).



Schema 3.19. Optimierte Reaktionsbedingungen zur Darstellung des Aldehyds (*R*)-**86**.

Die höchste Enantiomerenreinheit des Aldolproduktes wird bei 10°C erzielt. Bei dieser Temperatur kann beim Einsatz von Methanol und Benzoesäure ein Umsatz von 95% bei 79% ee erhalten werden. Ein analoger Versuch mit Isopropanol und Essigsäure liefert (*R*)-**86** mit jeweils 79% Umsatz und ee. Die isolierte Ausbeute nach Destillation liegt in beiden Fällen um 5% niedriger als die erzielten Umsätze.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Effizienz der Synthese des Aldolproduktes (*R*)-**86** durch schrittweise Optimierung im Vergleich zum Literaturbenchmark (60% Ausbeute, 65% ee, 4 d Reaktionszeit)^[353,456] signifikant erhöht werden konnte.

3.3.3 Biokatalytische Darstellung von (*R*)-Pantolacton

Gemäß des Schemas aus Kapitel 3.1 (Schema 3.3) zur Darstellung optisch reinen (*R*)-Pantolactons ((*R*)-**80**) aus dem industriell gut etablierten Baustein Isobutanal (**79**) besteht die zweite Herausforderung der Syntheseroute in der biokatalytischen Reduktion des Aldoladditionsproduktes (*R*)-**86**. Hierbei müssen gleichzeitig mehrere Kriterien erfüllt werden, um mit dem rein chemischen Industrieprozess konkurrieren zu können: Die Reduktion muss sowohl 1.) effektiv als auch 2.) hochselektiv verlaufen. Des Weiteren soll 3.) die Umsetzung des Aldehyds (*R*)-**86** biokatalytisch gelingen. Alle drei Charakteristika können von Alkoholdehydrogenasen erfüllt werden, wobei verbunden mit Kriterium 3.) als weitere Herausforderung 4.) die Kopplung mit einer *in situ* Cofaktorregenerierung auftritt.

3.3.3.1 Auswahl des Biokatalysators und Optimierung einzelner Reaktionsparameter

Die erste Aufgabe im Zusammenhang mit der Biotransformation des Aldolproduktes (*R*)-**86** zum (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) besteht in der Auswahl einer adäquaten ADH, welche alle oben genannten Kriterien erfüllt. So muss gewährleistet sein, dass das nicht natürliche Substrat (*R*)-**86** nicht nur akzeptiert wird, sondern möglichst noch eine hohe (*R*)-Selektivität erreicht werden kann, um die optische Reinheit des Lactons im Vergleich zum Aldolprodukt (*R*)-**86** weiter zu erhöhen. Gleichzeitig sollte die ADH neben der Reduktion zum Lacton auch die substratgekoppelte Regenerierung des Cofaktors durch die Oxidation des Cosubstrates effektiv katalysieren. Hohe Umsatzraten werden also nur erhalten, wenn die verwendete ADH in reduktiver Richtung eine starke Präferenz für das Substrat (*R*)-**86** aufweist, die spezifische Aktivität in oxidativer Richtung jedoch nur für das Cosubstrat Isopropanol hoch ist.

Einleitende Versuche mit aufgereinigtem, racemischem Substrat zeigen, dass der Aldehyd (*R*)-**86** nur schlecht von der Lk-ADH akzeptiert wird (Tabelle 3.6, Eintrag 1), wohingegen sowohl die Rsp-ADH als auch die ADH-200 signifikante Umsatzraten und Selektivitäten aufweisen (vergleiche Eintrag 2 und 3). Eine analoge Darstellung ausgehend vom enantiomerenangereicherten Edukt identifiziert die ADH-200 unter den gewählten Reaktionsbedingungen im Vergleich zur Rsp-ADH als um den Faktor zwei aktiver (vergleiche Eintrag 4 und 5).

Die Selektivität der ADH-200 lässt sich im Folgenden durch den vergleichenden Einsatz von racemischem, (*S*)- und (*R*)-konfiguriertem Substrat **86** quantifizieren (Tabelle 3.7).^[476,477] Im Allgemeinen erfolgt die kinetische Betrachtung einer enzymatischen Racematspaltung nach dem von SIH^[478] auf der theoretischen Basis von SHARPLESS^[479] und FAJANS^[480] etablierten, dimensionslosen E-Wert, welcher dem in der Chemokatalyse verbreitetem Stereoselektivitätsfaktor *S* mathematisch gleicht.^[481-483] Bei der Kenntnis der Reaktionsparameter Umsatz (*c*) sowie der *e*-Werte des Substrates (*e_S*) und des Produktes (*e_P*) kann die spezifische, über den Reaktionsverlauf gleichbleibende und nur von der Reaktionsumgebung abhängige Selektivität bestimmt werden.

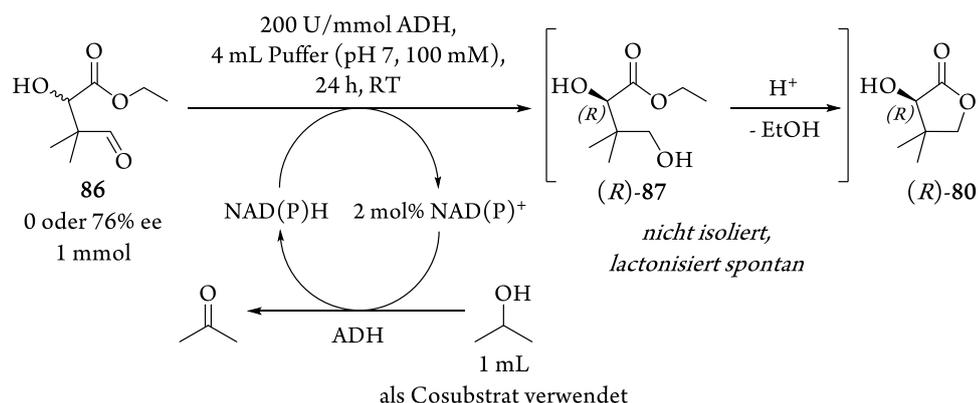


Tabelle 3.6. Screening der Alkoholdehydrogenasen.

Eintrag	ee (86) [%]	ADH	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((R)-80) [%] ^{b)}
1	0	<i>Lactobacillus kefir</i>	< 5	n. b.
2	0	<i>Rhodococcus</i> sp.	36	36
3	0	ADH-200	51	40
4	76	<i>Rhodococcus</i> sp.	35	90
5	76	ADH-200	70	90

a) Produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von (R)-80, ermittelt per GC-Kalibriergeraden;

b) nach säulenchromatographischer Aufreinigung, n. b. = nicht bestimmt.

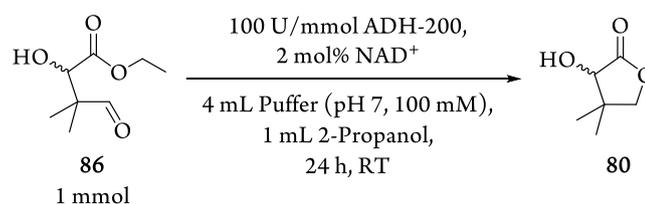


Tabelle 3.7. Untersuchungen der Enzymselektivität bei Verwendung der ADH-200.

Eintrag	ee (86) [%]	Umsatz [%] ^{a)}	Stoffmengenverlust [%]	ee (80) [%] ^{b)}
1	74 (<i>S</i>)	18	36	40 (<i>S</i>)
2	0 (rac)	27	44	54 (<i>R</i>)
3	78 (<i>R</i>)	49	44	93 (<i>R</i>)

a) Produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von (R)-80, ermittelt per GC-Kalibriergeraden;

b) nach säulenchromatographischer Aufreinigung.

Durch Umsetzungen von (R)-86, (rac)-86 und (S)-86 kann die (R)-Selektivität der verwendeten ADH-200 gezeigt werden. So werden nach 24 Stunden Reaktionszeit in jedem Fall (R)-angereicherte Produkte 80 gefunden.

Auffällig ist jedoch in allen Versuchen, dass die Summe aus verbleibender Stoffmenge des Substrates und der des Produktes unter 50% der eingesetzten Gesamtstoffmenge liegt. Unabhängig von der Konfiguration des Substrates vermindert sich die Gesamtstoffmenge im Reaktionsgemisch um $40\pm 4\%$. Da weder NMR-spektroskopisch noch mit Hilfe der Gaschromatographie Nebenreaktionsprodukte detektiert werden können, kann angenommen werden, dass entweder das Produkt oder das Edukt im gegebenen Reaktionssystem instabil sind. Da hierdurch die Bestimmung der Selektivität auf Basis des nicht valide bestimmbareren Umsatzes unzulässig ist, erfolgt die Abschätzung des E-Wertes aufgrund der umsatzunabhängigen Gleichung (3), in welche ausschließlich die relativen Werte der Enantiomerenreinheiten von Substrat und Produkt einfließen.^[484]

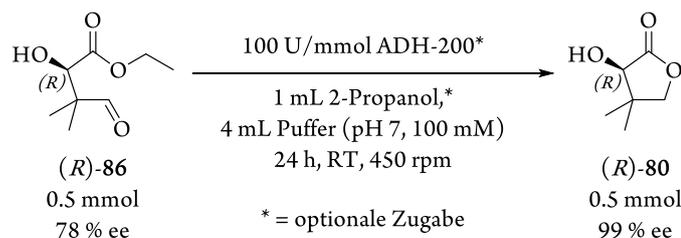
$$E = \frac{\ln\left[\frac{1-ee_S}{1+\left(\frac{ee_S}{ee_P}\right)}\right]}{\ln\left[\frac{1+ee_S}{1+\left(\frac{ee_S}{ee_P}\right)}\right]} = \frac{\ln\left[\frac{ee_P(1-ee_S)}{ee_P+ee_S}\right]}{\ln\left[\frac{ee_P(1+ee_S)}{ee_P+ee_S}\right]} \quad (3)^{[484]}$$

Für die Umsetzung des racemischen Substrates *rac*-**86** ergibt sich bei einem Enantiomerenüberschuss von 65% für das verbleibende Aldolprodukt ein E-Wert von 6. Der hohe Fehler in der Umsatzbestimmung lässt sich nachfolgend auch rechnerisch nachvollziehen, wenn $E = 6$ in Gleichung (2) eingesetzt wird.^[485]

$$E = \frac{\ln[1-c-c\cdot ee_P]}{\ln[1-c+c\cdot ee_P]} \quad (4)^{[485]}$$

Nach Umformung ergibt sich so auf Basis des ee-Wertes für das Reduktionsprodukt ein Umsatz (c) von 55%, welcher nahezu um den Faktor zwei größer ist als der detektierte Wert von 27% (Tabelle 3.7, Eintrag 2).

Um abzuschätzen, welche der beiden Komponenten im Reaktionsgemisch instabil ist, werden nachfolgend Stabilitätstests durchgeführt. Unter Reaktionsbedingungen analog zu Tabelle 3.7 zeigen weder *rac*-**80** noch (*R*)-**80** nach 24 Stunden einen Stoffmengenverlust oder eine Abweichung im ee-Wert. Ausgeschlossen werden können hierdurch auch die Racemisierung oder Öffnung des cyclischen Esters **80** durch Hydrolyse. Wird jedoch in einer analogen Versuchsanordnung bei Abwesenheit des Cofaktors NAD^+ ein äquimolares Gemisch aus Substrat (*R*)-**86** und Pantolacton (*R*)-**80** vorgelegt, wird nach 24 Stunden ein Gesamtstoffmengenverlust von 20% detektiert, wobei die Stoffmenge an Lacton um 30% steigt (Tabelle 3.8, Eintrag 1). Zum einen lässt sich hieraus schließen, dass in der Enzymformulierung bereits geringe Mengen an Cofaktor enthalten sein müssen, die bei Anwesenheit des Cosubstrates 2-Propanol analog Tabelle 3.6 *in situ* das Reduktionsäquivalent NADH erzeugen und die Umsetzung des Aldolproduktes ermöglichen. Zum anderen liegt die Rückgewinnung des Eduktes nach der Extraktion des Substanzgemisches lediglich bei 30%. Um auszuschließen, dass das die Umsetzung übersteigende Stoffmengendefizit des Aldehyds (*R*)-**86** durch die extraktive Aufarbeitung bedingt ist, wird diese für einen simulierten Umsatz von 50% mit einem 1/1 Gemisch der beiden Verbindungen durchgeführt. Die Aufarbeitung analog Kapitel 6.3.2.1.2 erbringt allerdings in beiden Fällen keine Hinweise eines Massenverlustes, weshalb die Instabilität des Substrates (*R*)-**86** im Reaktionsmilieu der Biotransformation indiziert scheint.

**Tabelle 3.8.** Untersuchungen zur Substratstabilität.

Eintrag	Enzym	2-Propanol	n (80) ^{a)} [mmol]	n (86) ^{a)} [mmol]	Δn (80) [mmol]	Δn (86) [mmol]	Σ Verlust (n) [%]
1	✓	✓	0.65	0.15	+ 0.15	- 0.35	20
2	✓	✗	0.54	0.36	+ 0.04	- 0.14	10
3	✗	✓	0.50	0.36	± 0.00	- 0.14	14

a) Per GC-Kalibriergeraden bestimmte Stoffmenge nach 24 h Reaktionszeit.

Um zu differenzieren, ob der beobachtete Stoffmengenverlust enzym- oder lösungsmittelspezifisch ist, werden nachfolgend komparative Untersuchungen in Abwesenheit des Cosolvens (Tabelle 3.8, Eintrag 2) bzw. der ADH (Eintrag 3) durchgeführt. Während die Generierung des Pantolactons (*R*)-**80** im ersten Fall wegen der fehlenden Cofaktorregenerierung durch die in der Enzymformulierung enthaltene NADH-Menge limitiert ist, wird bei Abwesenheit der ADH kein Umsatz detektiert. Die Wiederfindung von (*R*)-**80** liegt hierbei mit 0.5 mmol bei 100%. Für (*R*)-**86** wird jedoch in beiden Fällen eine Stoffmengendifferenz von 0.14 mmol bzw. 28% gefunden, wodurch der Substanzverlust für das Substrat bei einer Reaktionsdauer von 24 Stunden unter Einbezug der Messungenauigkeiten mit 20 bis 30% bemessen werden kann. Wie bereits beschrieben lassen sich weder der Zerfallspfad noch die –produkte spektroskopisch oder spektrometrisch genauer untersuchen. Angenommen werden kann, dass die gebildeten Fragmente niedermolekular und hoch flüchtig sind und somit nicht im Rohproduktgemisch nachgewiesen werden können.

Da sich die Substratinstabilität auf das verwendete Lösungsmittelgemisch zurückführen lässt, wird zunächst untersucht, ob eine Verlangsamung des Abbaus durch eine geänderte Lösungsmittelzusammensetzung erreicht werden kann. Ein erhöhter organischer Anteil könnte hierbei in zweierlei Hinsicht vorteilhaft sein. Zum einen würde so ein hydrolytisch bedingter Zerfall zurückgedrängt, zum anderen führt die Erhöhung der Isopropanolkonzentration gemäß Tabelle 3.6 zur produktseitigen Gleichgewichtsverschiebung. Entsprechend führt die Umsetzung im 25 Vol-% Isopropanolgemisch (Tabelle 3.9, Eintrag 2) im Vergleich zum 20 Vol-% Benchmark (Eintrag 1) zu einer Umsatzverbesserung von 20%, wobei der Gesamtstoffmengenverlust um beinahe den gleichen Prozentsatz sinkt.

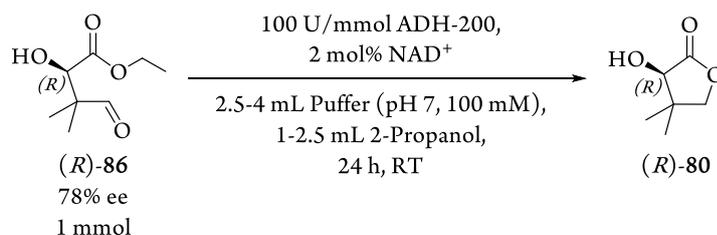


Tabelle 3.9. Darstellung von $(R)\text{-}80$ bei veränderter Isopropanolkonzentration.

Eintrag	2-Propanol/Puffer [V/V]	Umsatz [%] ^{a)}	Stoffmengenverlust [%]	ee ($(R)\text{-}80$) [%] ^{b)}
1	20/80	49	44	93
2	25/75	69	20	95
3	50/50	54	29	96

a) Produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von $(R)\text{-}80$, ermittelt per GC-Kalibriergeraden;

b) nach säulenchromatographischer Aufreinigung.

Wird die Isopropanolkonzentration weiter gesteigert, sinkt der Umsatz infolge verminderter Enzymaktivität oder –stabilität auf 54% und spiegelt so beinahe das Ergebnis des Referenzversuches wieder (Eintrag 3). Der Stoffmengenverlust liegt leicht höher und im oben erwähnten, zu erwartenden Bereich zwischen 20 und 30%. Ein gleichwertiger Einfluss auf die Reaktionsdynamik kann im Referenzsystem mit 20 Vol-% Isopropanol ebenfalls durch den Ersatz von 2 durch 5 mol% NAD^+ beobachtet werden. In letzterem Fall werden 71% Umsatz bei einem Stoffmengenverlust von 22% erhalten, welches dem Ergebnis aus Tabelle 3.9 (Eintrag 2) gleicht. Folglich kann die produktseitige Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts direkt durch den Einsatz größerer Mengen des (*in situ* generierten) Reduktionsmittels bzw. indirekt durch höhere Konzentrationen des Reduktionsäquivalents Isopropanol erreicht werden. Beide Ansätze sind jedoch limitiert: Der Cofaktor ist kostenintensiv und hohe Alkoholkonzentrationen deaktivieren oder destabilisieren den Biokatalysator.

Da der Zerfall des Substrates hingegen weitestgehend unabhängig von der Zusammensetzung des gewählten Reaktionsmilieus in der gleichen Größenordnung detektiert wird, muss im Zuge der Optimierung des Einzelschrittumsatzes die Biotransformation rascher bzw. effektiver ablaufen als die konkurrierende Substratersetzung. Dies kann, abseits der bereits beschriebenen Optionen, beispielsweise durch die Änderung des pH-Wertes gelingen, welcher einen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität besitzt (Abbildung 3.16).

Um den pH-Einfluss auf die Reaktionen isoliert betrachten zu können, wird als Vergleichssystem der Referenzversuch bei neutralem pH-Wert im wasserreicheren Medium (Puffer/Isopropanol 1/4 [V/V]) gewählt. Bei gleichbleibend guter Selektivität liegt das Umsatzmaximum der Biotransformation im leicht basischen Puffer pH-Bereich zwischen 8.0 und 8.5. Bei einer Enantiomerenreinheit von 95% ee kann $(R)\text{-}80$ mit einem Umsatz von 67% gewonnen werden (vergleiche Tabelle 3.9, Eintrag 1: 49% Umsatz, 93% ee bei pH = 7). Der Stoffmengenverlust liegt hierbei jedoch mit 21% weiterhin im Bereich der Referenzreaktion bei neutralem pH-Wert.

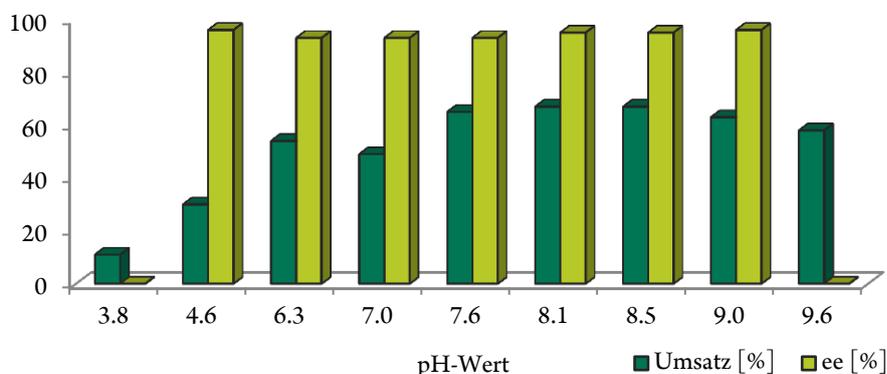
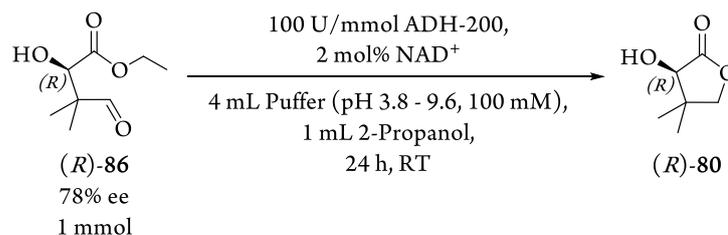


Abbildung 3.16. Darstellung von (R)-80 bei veränderten pH-Werten.

Im Hinblick auf die Prozessökonomie und -effizienz kann jedoch positiv vermerkt werden, dass sowohl der Umsatz als auch die Selektivität der enzymatischen Reduktion im Bereich zwischen 100 und 800 mM (R)-86 unabhängig von der Eduktkonzentration ist (Tabelle 3.10).

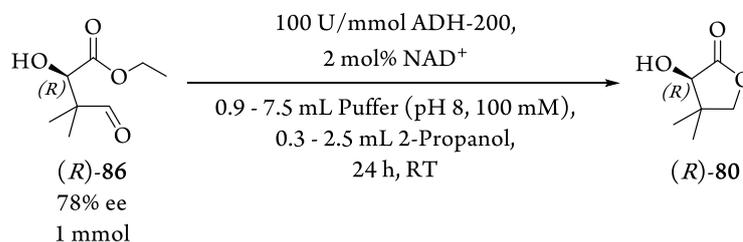


Tabelle 3.10. Darstellung von (R)-80 bei unterschiedlichen Eduktkonzentrationen.

Eintrag	V (Puffer) [mL]	V (2-Propanol) [mL]	c ((R)-86) [mM]	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((R)-80) [%] ^{b)}
1	7.500	2.500	100	55	94
2	4.000	1.000	200	67	95
3	3.000	1.000	250	69	95
4	1.875	0.625	400	69	95
5	0.938	0.313	800	71	96

a) Produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von (R)-80, ermittelt per GC-Kalibriergeraden;

b) nach säulenchromatographischer Aufreinigung.

Während eine hohe Verdünnung der Reaktanden zu einem leichten Umsatzrückgang führt (Tabelle 3.10, Eintrag 1), werden im Bereich von 250 bis 800 mM Substratkonzentration stabile Umsatzraten von 70±1% erhalten (Eintrag 3 bis 5).

3.3.3.2 Voruntersuchungen zur chemoenzymatischen Synthese von (*R*)-Pantolacton

Nachdem aus aufgereinigtem Aldolprodukt (*R*)-**86** mit Hilfe der ADH-200 (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) mit Umsätzen um 70% und Enantiomerenüberschüssen von 95-96% ee erhalten werden kann, liegt die zweite Herausforderung der Gesamtsyntheseroute von (*R*)-**80** in der Kombination der organokatalytischen Aldolreaktion mit der nachfolgenden Biotransformation. Hierbei soll das Aldolprodukt im Hinblick auf die Gesamtprozessökonomie und -effizienz möglichst ohne Aufarbeitung oder Isolierung verwendet werden. Vergleichende Versuche zeigen hierbei, dass der Einsatz eines nicht aufgereinigten Reaktionsgemisches der asymmetrischen Aldolreaktion nach entsprechendem Aufpuffern der Mischung im Vergleich zum Referenzversuch unter Verwendung frisch destillierten Aldehyds (*R*)-**86** von 69% auf 33% sinkt (vergleiche Tabelle 3.11 Eintrag 1 und 2).

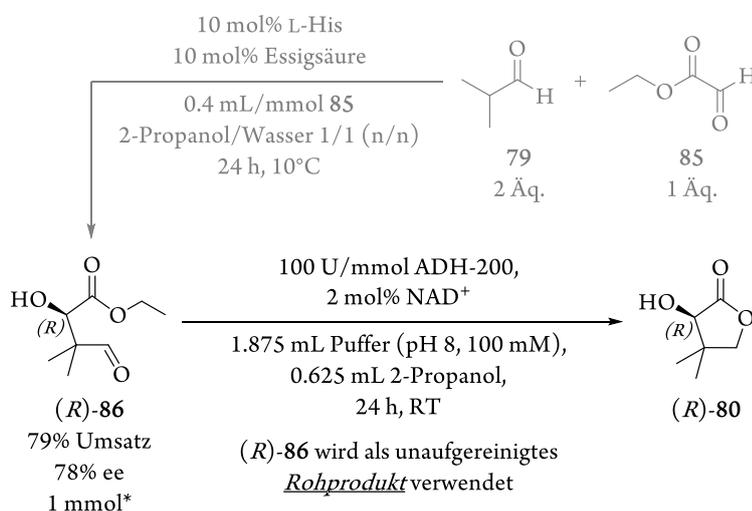


Tabelle 3.11. Darstellung von (*R*)-**80** bei unterschiedlichen Eduktkonzentrationen. * Die Ansatzgröße der AAR wird so gewählt, dass nach 24 Stunden eine Produktbildung von 1 mmol erreicht wird.

Eintrag	Versuchsbedingungen	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((<i>R</i>)- 80) [%] ^{b)}
1	Referenzversuch mit aufgereinigtem Aldolprodukt	69	95
2	unaufgereinigte Reaktionslösung der AAR	33	n.b.
3	Extraktion, dann Abdestillieren der flüchtigen Bestandteile	64	96
4	Abdestillieren aller flüchtigen Bestandteile der Reaktionslösung	66	96

a) Produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von (*R*)-**80**, ermittelt per GC-Kalibriergeraden;

b) nach säulenchromatographischer Aufreinigung; n. b. = nicht bestimmt.

Ursächlich für den Umsatzrückgang können bei der Verwendung des Rohproduktreaktionsgemisches mehrere Faktoren sein.

Zum einen bilden die Eduktreste der AAR Konkurrenzsubstrate für die enzymatische Reduktion. Die auf Acetessigester bezogenen, relativen, photospektrometrisch bestimmten Aktivitäten der ADH-200 berechnen sich für die Bestandteile des Gemisches wie folgt: (*R*)-**86** (106%), Isobutanal (**79**) (113%), Ethylglyoxylat (**85**) (0%). Bei einer Ansatzgröße von 1.28 mmol des Aldehyds **85** und einem produktbezogenen Umsatz von 79% zum Aldolprodukt (*R*)-**86** verbleiben gemäß Tabelle 3.11 neben 1 mmol (*R*)-**86** 1.5 mmol Isobutanal (**79**) und 0.25 mmol Glyoxylsäureethylester (**85**) im Rohproduktgemisch. Da letztere Verbindung kein umsetzbares Substrat der ADH-200 darstellt, kann ihr Einfluss auf den Umsatzrückgang vernachlässigt werden. Die kompetitiven Edukte (*R*)-**86** und Isobutyraldehyd (**79**) werden jedoch mit beinahe gleichen Aktivitäten umgesetzt, wodurch sich der verminderte Umsatz von 33% auf Basis des Stoffmengenverhältnisses der beiden Substrate auch rechnerisch nachvollziehen lässt.*

Zum anderen können sowohl der Organokatalysator wie auch das Brønstedsäureadditiv einen Einfluss auf die enzymatische Reduktion, entweder durch Hemmung, Deaktivierung oder Destabilisierung des Biokatalysators haben. Werden beide nach der AAR durch Extraktion abgetrennt und das Konkurrenzsubstrat Isobutanal (**79**) destillativ entfernt, wird der Umsatz der Referenzreaktion trotz des Einsatzes unaufgereinigten Aldolrohproduktes beinahe erreicht (Tabelle 3.11, Eintrag 3). Werden ausschließlich die flüchtigen Bestandteile (Isobutanal (**79**) und anteilig 2-Propanol) entfernt, wobei der Organokatalysator im Rohproduktgemisch verbleibt, wird ein Umsatz von 66% detektiert (Eintrag 4).

Der isolierte Einfluss der Einzelbestandteile des Rohproduktgemisches der AAR auf die enzymatische Reduktion lässt sich weiterhin durch gezielte Zugabe zu aufgereinigtem Aldolprodukt quantifizieren (Tabelle 3.12). Hierbei zeigt das Additiv Essigsäure einen nur minimalen Einfluss auf die Reaktionsdynamik (Tabelle 3.12, Eintrag 3), der sich rechnerisch durch die säureinduzierte pH-Wertänderung nachvollziehen lässt. Unter der Annahme vollständiger Dissoziation senken 0.1 mmol Säure den pH-Wert des Puffers im vorliegenden Fall um circa 0.5 Einheiten,^[292] wodurch die Ergebnisse des Pufferscreenings wiedergespiegelt werden (vergleiche Abbildung 3.16). Während geringe Mengen Toluol, resultierend aus der Lösung technischen Ethylglyoxylats (**85**) in diesem Solvens, den Umsatz um einige Prozent senken (Eintrag 2), beeinflusst der Organokatalysator Histidin die Biotransformation nicht (Eintrag 4). Der Einfluss von Isobutanal (**79**, Eintrag 5) wurde bereits oben diskutiert.

Als nicht aus der organokatalytischen Aldolreaktion stammende Komponente wird Aceton als Additiv verwendet, um die intrinsische Generierung eines weiteren Konkurrenzsubstrates während der enzymatischen Reduktion abzubilden. Aceton entsteht während der Reaktion *in situ* durch die Oxidation von 2-Propanol (Tabelle 3.6), welches obligatorisch für die substratgekoppelte Cofaktorregenerierung ist. Im äquimolaren Gemisch aus (*R*)-**86** und Aceton wird somit, bei angenommener quantitativer Kupplung der Alkoholoxidation an die Reduktion des Aldolproduktes, ein Umsatz zum Pantolacton (*R*)-**80** von 50% bezüglich der Acetonmenge simuliert.

* Der produktbezogene Umsatz eines 1.5/1 (n/n) Gemisches aus Isobutanal und (*R*)-**86** liegt bei der Annahme gleicher spezifischer Aktivitäten für (*R*)-**80** rechnerisch bei 28%.

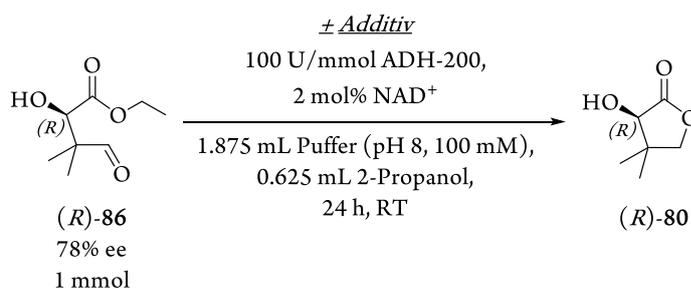


Tabelle 3.12. Synthese von (R) -80 unter Zugabe einzelner, aus der Aldolreaktion stammender Verbindungen.

Eintrag	Additiv	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((R) -80) [%] ^{b)}
1	--	69	95
2	10 bis 20 % (V/V) Toluol	63	95
3	10 mol% Essigsäure	67	95
4	10 mol% L-His	71	94
5	1 Äq. Isobutyraldehyd (79)	42	96
6	1 Äq. Aceton	48	97

a) Produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von (R) -80, ermittelt per GC-Kalibriergeraden;

b) nach säulenchromatographischer Aufreinigung.

Im Vergleich zum Referenzversuch ohne Additiv sinkt der Umsatz von 69% auf 48%, wenn von Beginn der Biotransformation an bereits Aceton im System vorhanden ist (Eintrag 6). Dass Aceton in diesem Fall als konkurrierendes Substrat zu (R) -86 auftreten kann, lässt sich photospektrometrisch durch die auf Acetessigester bezogene relative Aktivität von 36% belegen.

Weiterhin kann das Keton als kompetitiver Inhibitor wirken. Die Inhibierung der ADH lässt sich ausdrücken als:^[486]

$$v_{Aceton} = \frac{v_{normativ}}{\left(1 + \frac{[Aceton]}{K_I}\right)} \quad (5)$$

mit v_{Aceton} = Reaktionsgeschwindigkeit bei Anwesenheit von Aceton; $v_{normativ}$ = Reaktionsgeschwindigkeit bei Abwesenheit von Aceton; $[Aceton]$ = Acetonkonzentration in [mM]; K_I = Inhibierungskonstante für Aceton in [mM].

Da bei der Verwendung der kommerziellen ADH-200 enzymspezifische Kenngrößen wie die spezifische Standardmassenaktivität oder das exakte Molekulargewicht unbekannt sind und eine Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten nach RIEBEL demnach nicht möglich ist,^[487] wird die Inhibierungskonstante K_I durch Ersatz der Reaktionsgeschwindigkeiten mit und ohne Aceton durch die erzielten Umsätze (c) mit (Tabelle 3.12, Eintrag 6) und ohne Aceton (Eintrag 1) angenähert.

$$c_{Aceton} = \frac{c_{normativ}}{\left(1 + \frac{[Aceton]}{K_I}\right)} \quad (6)$$

mit c_{Aceton} = Umsatz der enzymatischen Reduktion bei Anwesenheit von Aceton; $c_{normativ}$ = Umsatz der enzymatischen Reduktion bei Abwesenheit von Aceton; $[Aceton]$ = Acetonkonzentration in [mM]; K_I = Inhibierungskonstante für Aceton in [mM].

Nach K_I umgestellt ergibt sich mit $c_{normativ} = 0.69$, $c_{Aceton} = 0.48$ und $[Aceton] = 400$ mM eine halbmaximale Inhibitorkonzentration von circa 900 mM für Aceton.

Zusammengenommen beeinflusst Aceton die Umsetzung des Aldolproduktes (*R*)-**86** anteilig sowohl als Konkurrenzsubstrat als auch als kompetitiver Inhibitor. Entsprechend verringert sich der Umsatz zum Pantolacton bereits bei dem hier simulierten molaren Verhältnis von Isopropanol/Aceton von 7.6/1 bzw. (*R*)-**86**/Aceton von 1/1 um 21%.

3.3.3.3 Aufhebung der thermodynamischen Limitierung des biokatalytischen Schlüsselschrittes durch *in situ* Produktentfernung (ISPR)

Durch die destillative Abtrennung der flüchtigen Verbindungen im Anschluss an die asymmetrische Aldolreaktion (AAR) können alle in Tabelle 3.12 als Störkomponenten für die Biotransformation identifizierten Verbindungen bereits vor der enzymatischen Reduktion entfernt werden (Isobutanal nahezu quantitativ und Toluol, Essigsäure, Wasser und Isopropanol größtenteils). Während weder das im Rohprodukt neben (*R*)-**86** verbleibende Histidin noch Ethylglyoxylat einen negativen Einfluss auf die Umsetzung zum Pantolacton (*R*)-**80** besitzen, kann die *in situ* Bildung des Konkurrenzsubstrates Aceton nicht vermieden werden. Um die intrinsische, thermodynamische Limitierung der enzymatischen Reduktion bei gleichzeitiger substratgekoppelter Cofaktorregenerierung zu überwinden, muss das Gleichgewicht der Isopropanoloxidation möglichst weit auf Seiten des Acetons liegen. Da dies nicht analog klassisch chemischer Betrachtungen durch die Erhöhung der 2-Propanolmenge erreicht werden kann (vergleiche Tabelle 3.9 und Tabelle 3.10)^[486] bleiben zwei mögliche Lösungsansätze für die Problemstellung. So kann 1.) die Verwendung einer alternativen ADH, welche eine geringere spezifische Aktivität für die Reduktion von Aceton aufweist bzw. weniger stark durch das Keton inhibiert in Betracht gezogen werden. Als Alternative kann 2.) auf Basis des bestehenden Systems die Verschiebung des Alkohol/Aceton Gleichgewichtes durch Entfernen des Ketons erreicht werden.

Letzteres lässt sich prozesstechnisch durch das Konzept der *in situ* Entfernung einer Komponente aus einem Stoffgemisch realisieren. Im vorliegenden Reaktionsgemisch bietet sich wegen der großen Siedepunktunterschiede zwischen Edukt (*R*)-**86** (245°C)*, Produkt (*R*)-Pantolacton (120°C bei 20 mbar)^[489] und dem stöchiometrisch auftretenden Nebenprodukt Aceton (55°C)^[490] die produktseitige Verschiebung des Gleichgewichts durch konstantes Verdampfen des Acetons an. Ein Austreiben des Acetons durch Erhitzen des Reaktionsgemisches ist hierbei allerdings nicht empfehlenswert, da bei Temperaturen über RT niedrigere Selektivitäten der enzymatischen Reduktion beobachtet werden (Tabelle 3.13, vergleiche Eintrag 3, 4 und 5).

Wird die Biotransformation am Siedepunkt des Acetons durchgeführt, sinkt der Umsatz der Reaktion durch Deaktivierung oder Destabilisierung der ADH. Weiterhin steigt der Stoffmengenverlust durch den Zerfall des Substrates (*R*)-**86** an (Eintrag 6). Außerdem ist zu beachten, dass Isopropanol und Wasser in einem dem Aceton ähnlichen Bereich siedend. Das Azeotrop der beiden Stoffe besitzt einen Siedepunkt von 80°C^[491] und kann beim Entfernen des Acetons unbeabsichtigt, zumindest anteilig, ebenfalls dem Gemisch entzogen werden und die Gleichgewichtslage der Reduktion so zur Eduktseite verschoben werden. Ein alternativer Lösungsansatz macht sich die großen Unterschiede im Dampfdruck (P) der drei Stoffe zu Nutze: $P_{25^\circ\text{C}} [\text{kPa}] = 24.7$ (Aceton),^[490] 4.3 (Isopropanol),^[491] 3.2 (Wasser).^[492]

* Der empirisch bestimmte Siedepunkt (Kapitel 6.3.2.1.3) liegt bei 0.1 mbar bei 65°C. Wird eine Siedepunktserniedrigung von 15°C pro Druckhalbierung angenommen, ergibt sich bei Atmosphärendruck ein Wert von 245°C.^[488]

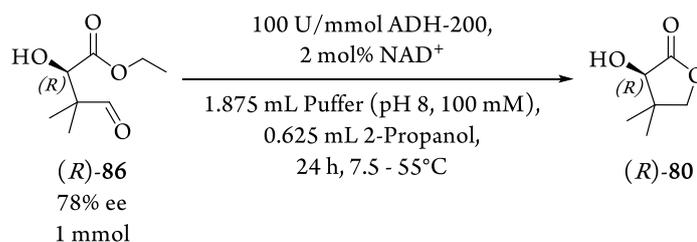


Tabelle 3.13. Darstellung von (R)-80 bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen.

Eintrag	T [°C]	Umsatz [%] ^{a)}	Stoffmengenverlust [%]	ee ((R)-80) [%] ^{b)}
1	7.5	40	44	98
2	12.5	44	45	96
3	RT	69	20	95
4	35	72	23	89
5	45	77	20	88
6	55	54	42	n. b.

a) Produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von (R)-80, ermittelt per GC-Kalibriergeraden;

b) nach säulenchromatographischer Aufreinigung; n. b. = nicht bestimmt.

Ausgehend vom vorliegenden Reaktionssystem berechnen sich die Stoffmengenanteile des ternären Gemisches dieser drei Verbindungen bei angenommener quantitativer Kupplung der Isopropanoloxidation an die Reduktion des Aldolproduktes (R)-86 bei einem Umsatz von 50% und einer Einwaage von 174 mg Aldolprodukt (1 mmol) in der flüssigen Phase zu 92.78% Wasser (1.875 mL, 104.2 mmol), 6.78% 2-Propanol (0.625 mL, 8.1 mmol zum Zeitpunkt null; 7.6 mmol nach 50% Umsatz des Substrates durch Oxidation zu Aceton) und 0.45% Aceton (0.0 mmol zum Zeitpunkt null; 0.5 mmol nach 50% Umsatz des Substrates durch Oxidation von Isopropanol). Nach dem Raoult'schen Gesetz ergibt sich so für den Gesamtdampfdruck (P_{ges}) mit den jeweiligen Stoffmengenanteilen χ_n :^[493]

$$P_{\text{ges}} = \chi_{\text{Wasser}} \cdot P_{\text{Wasser}} + \chi_{\text{Isopropanol}} \cdot P_{\text{Isopropanol}} + \chi_{\text{Aceton}} \cdot P_{\text{Aceton}} \quad (7)$$

Durch Einsetzen wird für P_{ges} ein Wert von 3.37 kPa erhalten. Die Stoffmengenanteile in der Gasphase (Y_x) errechnen sich hieraus durch:

$$Y = \frac{P_x}{P_{\text{ges}}} \quad (8)$$

Für die prozentualen Stoffmengenanteile der Einzelverbindungen in der Gasphase werden im ternären Gemisch 88.06% Wasser, 8.65% Isopropanol und 3.30% Aceton erhalten. Somit liegt der Anteil an Aceton in der Gasphase um etwa den Faktor 7.5 höher als in der flüssigen Phase, während sich dieser für 2-Propanol nur leicht (1.25 mal höher) und für Wasser faktisch nicht (um den Faktor 1.05 niedriger) ändert. Das konstante Entfernen des Gasraumes ermöglicht so das effektive Entziehen von Aceton aus dem Reaktionsgleichgewicht und eine Verschiebung hin zum Reduktionsprodukt, wodurch die thermodynamische Limitierung des Systems umgangen wird.

Prozesstechnisch lässt sich dies in einer Unterdruckapparatur mit Kondensator,^[494] durch Pervaporation mit geeigneten Trennmembranen^[495] oder durch das Austreiben der flüchtigen Bestandteile des Gemisches im Gasstrom (ISPR, *in situ* Produktentfernung) realisieren.^[495-498] Als ökonomisch attraktives und ökologisch unbedenkliches Trägergas bietet sich ungereinigte Druckluft an (Abbildung 3.17).

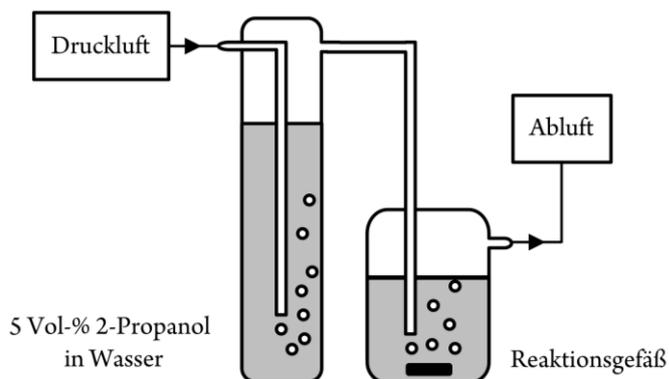


Abbildung 3.17. Schematische Darstellung einer Reaktion unter ISPR (*in situ* Produktentfernung)-Bedingungen.

Diese wird kontinuierlich durch das Reaktionsgemisch geleitet und schleppt so alle (leicht) flüchtigen Komponenten aus dem System. Da hierbei, wie oben erwähnt, anteilig auch Wasser und Isopropanol entfernt werden, wird der Gasstrom mit beiden Lösungsmitteln vorgesättigt. Empirisch wurde gefunden, dass eine 5 Vol-% wässrige Isopropanollösung in einer vorgeschalteten Gaswaschflasche ausreicht, um die Konzentration der beiden Stoffe im Reaktionsansatz konstant zu halten.^[499] Da nach dem Konzept der *in situ* Entfernung von Aceton die Umsetzung des Aldolproduktes (*R*)-**86** von der Isopropanolkonzentration entkoppelt wird, ist bereits die Verwendung von 1.1 Äquivalenten des Alkohols, bezogen auf das Substrat, ausreichend (Abbildung 3.18).

Werden bei der Umsetzung, wie im Referenzsystem ohne ISPR, 100 U/mmol ADH-200 verwendet (Abbildung 3.18, Eintrag 1), wird nach 24 Stunden Reaktionszeit ein Umsatz von 85% bei 81% ee des Produktes detektiert. Einerseits liegt die Umsatzrate damit zwar signifikant höher als im Benchmarksystem (vergleiche Tabelle 3.10, Eintrag 3: 69%), die Enantiomerenreinheit des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-**80**) ist mit 81% im Vergleich zu 95% ohne ISPR allerdings deutlich niedriger und ähnelt stark dem Enantiomerenüberschuss des Eduktes (78%). Spektroskopisch lassen sich für das Rohprodukt von Eintrag 1 keine Verbindungen neben (*R*)-**80** erkennen. Wird die eingesetzte Enzymmenge bei gleichbleibender Reaktionsdauer auf 50, 25 oder 10 U/mmol reduziert, werden unter ISPR-Bedingungen in allen Fällen 83-85% produktbezogene Umsätze erhalten, wobei sich kein Substrat mehr nachweisen lässt. Die Selektivität der Biotransformation bleibt hierbei unbeeinflusst und liefert (*R*)-**80** in 80-81% ee.

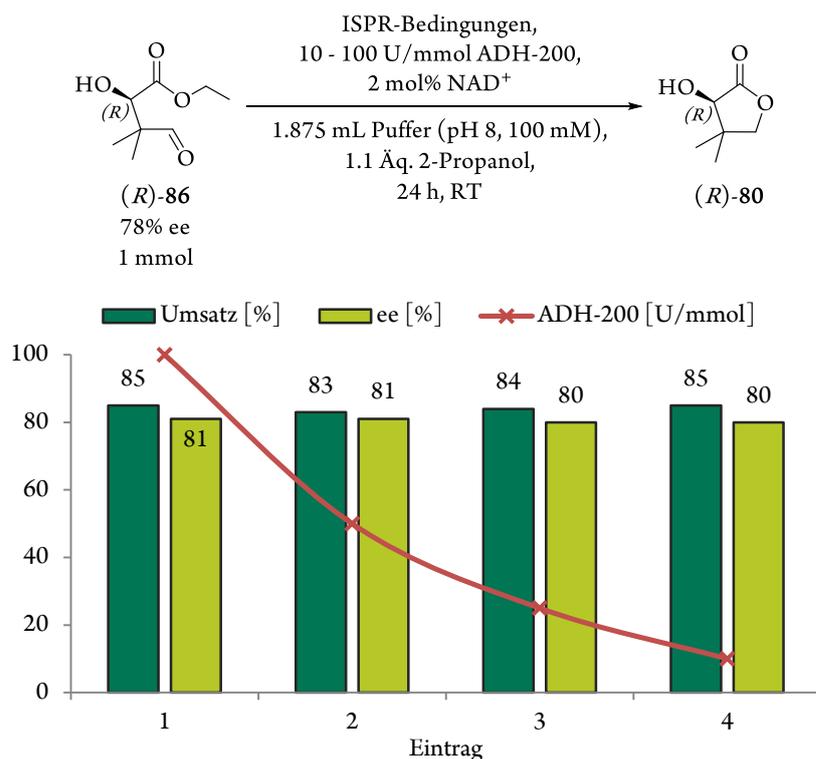


Abbildung 3.18. Darstellung von (*R*)-**80** unter ISPR-Bedingungen.

Da in allen Fällen reines (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) erhalten wurde, dessen optische Reinheit der des Eduktes bis auf wenige Prozent gleicht, kann angenommen werden, dass die enzymatische Reduktion unter ISPR-Bedingungen im gewählten Zeitfenster derart stark auf die Produktseite verschoben ist, dass die anfängliche Selektivität des Enzyms mit Fortschreiten der Reaktion überschrieben wird. Unter Berücksichtigung der bereits diskutierten Instabilität des Substrates im wässrigen Reaktionsmilieu entspricht der produktbezogene Umsatz zum (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) von 85% bei dieser Reaktionsführung dem Komplettumsatz des Eduktes.* Demgemäß sollte sich durch sukzessives Verkürzen der Reaktionsdauer die Selektivität widerherstellen lassen (Abbildung 3.19).

Entsprechend werden bei Reaktionszeiten von drei oder zwei Stunden bei gleichbleibendem Umsatz signifikante ee-Wertverbesserungen auf 88, respektive 95% detektiert. Wird bis auf eine halbe Stunde verkürzt, lässt sich (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) beinahe enantiomerenrein (98% ee) erhalten, wobei der Umsatz bei 58% liegt.

* Die fehlende Substratstoffmenge von 15% kann, wie bereits zuvor beschrieben, nicht spektroskopisch erfasst werden. Bei einer angenommenen Fragmentierung des Eduktes (*R*)-**86** in kleinere, flüchtige Komponenten werden diese ebenso aus dem Reaktionsgemisch entfernt wie Aceton.

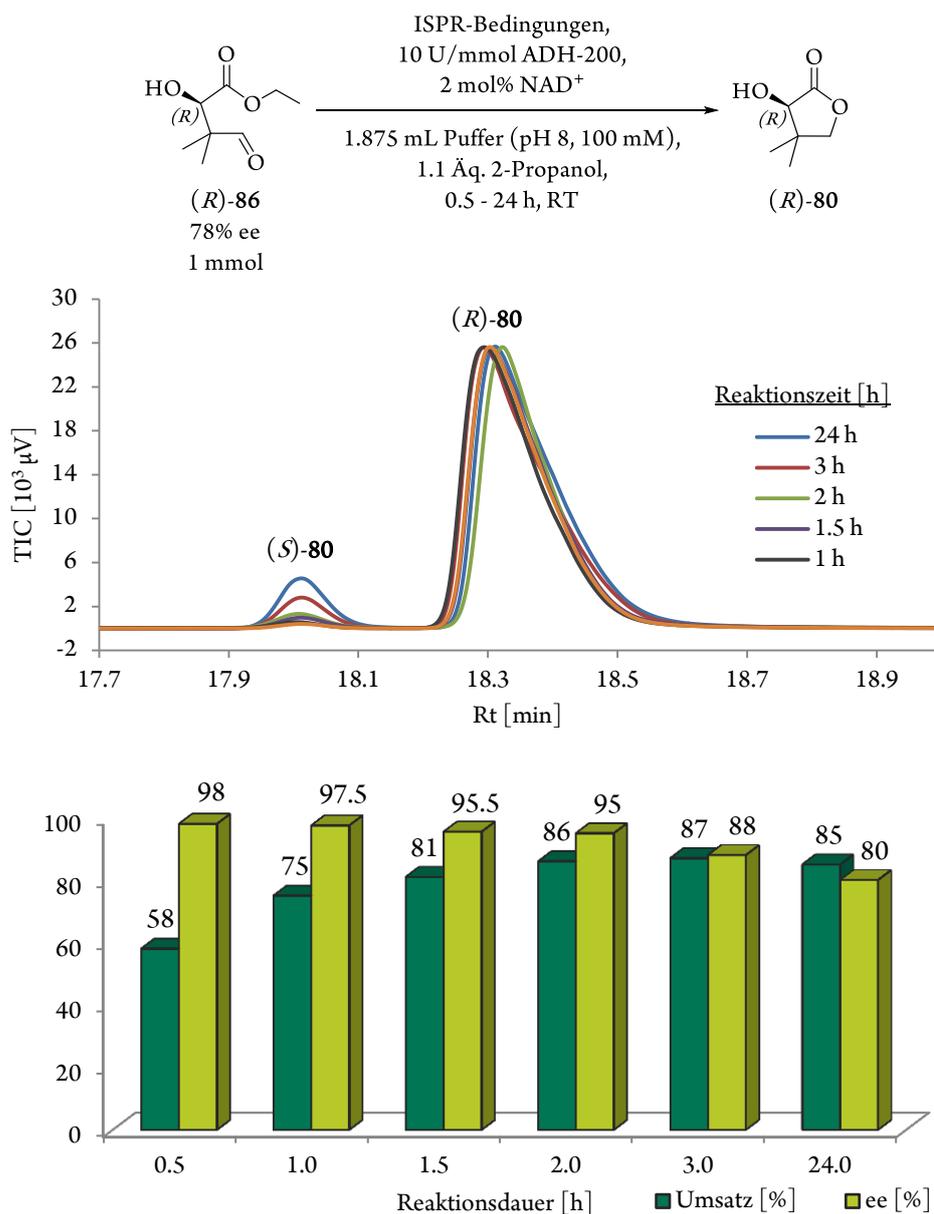
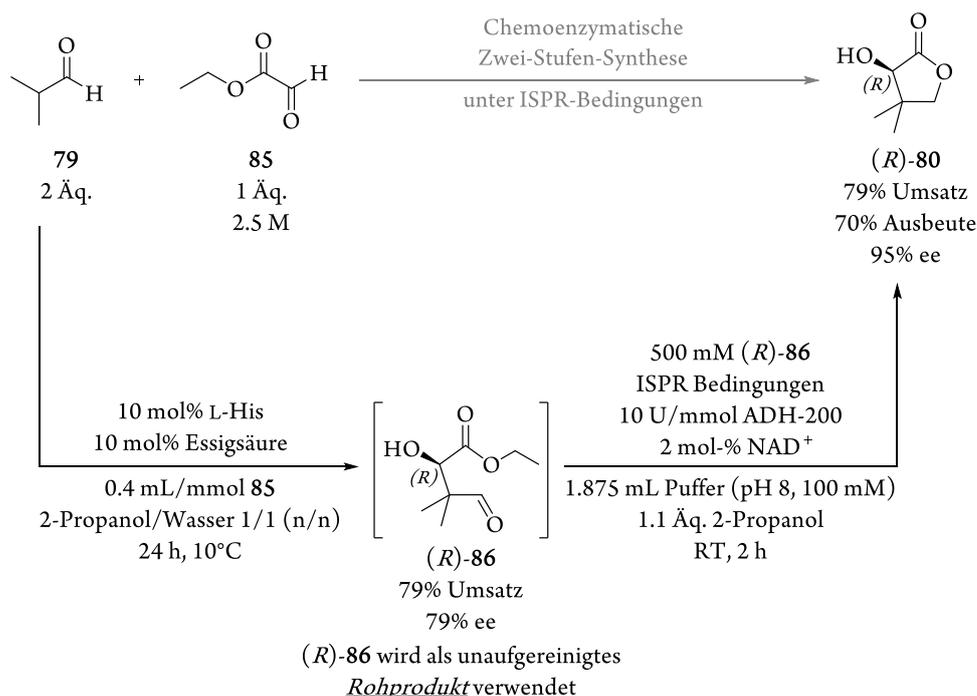


Abbildung 3.19. Oben: Zeitliche Abhängigkeit des erhaltenen Enantiomerenüberschusses bei der Synthese von **(R)-80**, normiert auf das **(R)**-Enantiomer. Unten: Darstellung von **(R)-80** bei unterschiedlicher Reaktionsdauer.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass unter Einsatz des ISPR-Verfahrens die eingesetzte Aktivität der ADH-200 von 100 auf 10 U/mmol gesenkt und gleichzeitig die Reaktionszeit von 24 auf zwei Stunden verkürzt werden kann. Hierbei wird im Vergleich zum Referenzsystem ohne Entfernung des Nebenproduktes Aceton bei gleichbleibend hoher Selektivität ein signifikant höherer produktbezogener Umsatz von 86% erzielt. Die Widerfindungsrate des Substrates liegt im Schnitt bei 5-7%, was zu einer Zersetzungsrate von **(R)-86** unter 10% führt. In welchem Maß die Reaktionskinetik durch die Aufhebung der thermodynamischen Limitierung oder das Fehlen des kompetitiven Inhibitors Aceton im Einzelnen beeinflusst wird, kann nicht abschließend geklärt werden, da beide Effekte invariabel miteinander verbunden sind.^[486]

3.3.4 Chemoenzymatische Zwei-Stufen-Eintopf-Synthese von (*R*)-Pantolacton

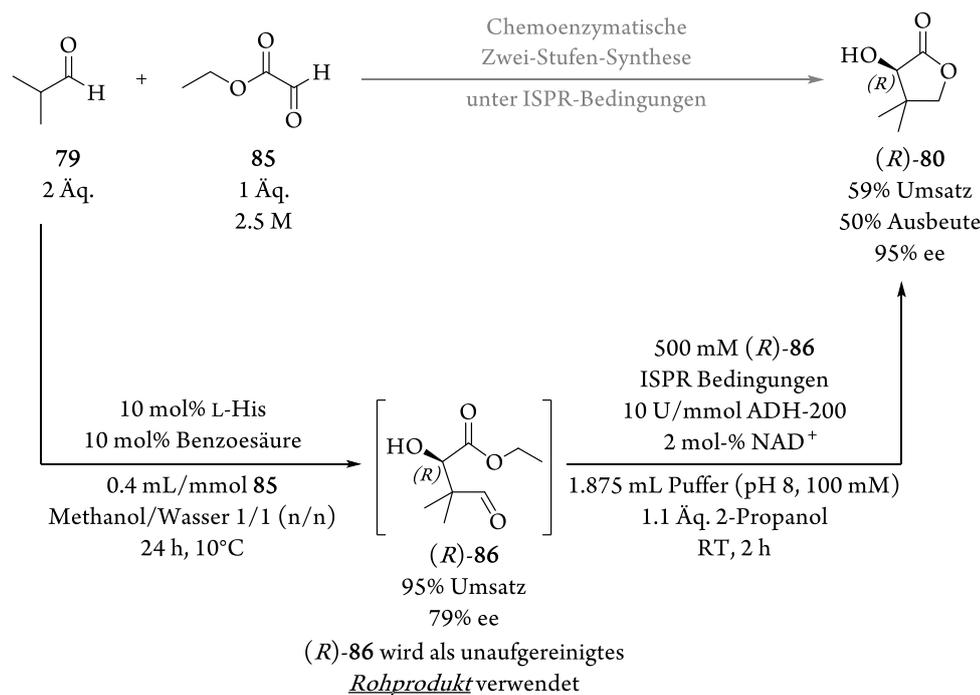
Nach erfolgter Einzelschrittoptimierung und Identifizierung eventueller Störkomponenten kann die organokatalytische, asymmetrische Aldolreaktion zum Aldehyd (*R*)-**86** mit der nachfolgenden Biotransformation zum Pantolacton (*R*)-**80** im Sinne einer chemoenzymatischen Zwei-Stufen-Eintopf-Synthese kombiniert werden (Schema 3.20).



Schema 3.20. Chemoenzymatische Darstellung von (*R*)-**80** ohne Isolierung der Zwischenstufe (*R*)-**86**.

Analog zu Kapitel 3.1 wird das Aldolprodukt hierbei nach der essigsäurecatalysierten AAR nicht isoliert oder aufgereinigt. Zur Abtrennung des Konkurrenzsubstrates Isobutanal (**79**) wird das Rohproduktgemisch vor der Biotransformation im Vakuum eingengt und flüchtige Bestandteile entfernt. Anschließend wird der viskose Rückstand in Puffer suspendiert und unter ISPR-Bedingungen biokatalytisch zum Lacton reduziert. Im Vergleich zur Umsetzung des aufgereinigten Aldolproduktes unter identischen Bedingungen wird ein um 8% niedrigerer Umsatz detektiert (vergleiche Abbildung 3.19), wobei die Größenordnung des Umsatzrückgangs den komparativen Versuchen ohne *in situ* Entfernung des Acetons und 24 Stunden Reaktionszeit entspricht (vergleiche Tabelle 3.11, Eintrag 1 und 4).

Wird das aus der Einzelschrittoptimierung als umsatzstärkstes System identifizierte Gemisch aus Benzoesäure in Methanol für die AAR eingesetzt (siehe Kapitel 3.3.2.4, Schema 3.19), sinkt der Umsatz der nachfolgenden enzymatischen Reduktion auf 59% (Schema 3.21).



Schema 3.21. Chemoenzymatische Darstellung von (R)-80 bei Verwendung von Benzoessäure als Cokatalysator der AAR.

Da auch hier, analog zur Umsetzung von Isobutanal (79) und Ethylglyoxylat (85) mit Essigsäure in Isopropanol, alle flüchtigen Bestandteile des Gemisches auf der Zwischenstufe des Aldolproduktes (R)-86 entfernt werden, kann das organische Co-solvens nicht ursächlich für den Umsatzrückgang der Biotransformation sein. Im Gegensatz zur essigsäurecokatalysierten AAR verbleibt Benzoessäure jedoch im Rohprodukt. Obwohl der pH-Wert des Puffers in der nachfolgenden Umsetzung hierdurch auf circa 7.2 absinkt,^[292] was, wie für das aufgereinigte Aldolprodukt bereits gezeigt wurde, die Aktivität der ADH senkt (siehe Abbildung 3.16), können auch die intrinsischen Stoffeigenschaften der Benzoessäure einen Einfluss auf die Reaktionsdynamik ausüben. Da sowohl die Säure noch (R)-86 schlecht wasserlöslich sind, bildet sich während der Biotransformation eine Emulsion mit einer konzentrierten organischen Phase aus beiden Stoffen aus. Denkbar ist neben einem hierdurch geänderten Löslichkeitsverhalten des Aldehyds (R)-86 im Bezug auf den Phasenübergang in das wässrige Milieu auch eine beschleunigte Zersetzung des Eduktes. Bekräftigt wird dies durch den Vergleich der Stoffmengenverluste der beiden Eintopf-Synthesen. Während der Gesamtstoffmengenverlust bei der Verwendung von Essigsäure als Additiv <6% beträgt, liegt dieser im analogen Ansatz mit Benzoessäure bei 19%.

Festzuhalten bleibt aber, dass sich die AAR zur Synthese des Aldolproduktes (R)-86 erfolgreich mit der nachfolgenden Biotransformation unter ISPR-Bedingungen kombinieren lässt. (R)-Pantolacton ((R)-80) kann so ohne Zwischenisolierung, -extraktion oder -aufreinigung des Intermediates dargestellt werden. Die Entfernung flüchtiger Bestandteile aus dem Rohproduktgemisch der Aldolreaktion ist jedoch obligatorisch. Bei einer Gesamteduktkonzentration von 7.5 M im ersten und 500 mM im zweiten Schritt der Synthesesequenz wird (R)-80 mit einem Gesamtumsatz von 63% bzw. einer -ausbeute von 55% und 95% ee erhalten.

Während die erzielte Ausbeute sowie die Enantiomerenreinheit des Lactons (*R*)-**80** in der gleichen Größenordnung wie bei dem bisher einzigen chemoenzymatischen Zugang zu (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) auf Isobutanalbasis nach SHIMIZU (52% Ausbeute, 94% ee vor Umkristallisation) liegt,^[450] werden im Besonderen auf der Stufe der Biotransformation sämtliche Prozessparameter der Literatursyntheseroute übertroffen:

Bei einer im Vergleich zu 14.5 Stunden wesentlich kürzeren Reaktionszeit von zwei Stunden wird eine signifikant höhere Eduktkonzentrationen von 500 mM (vergleiche <80 mM)^[450] erreicht. Die hierbei für die enzymatische Reduktion notwendige Menge an Biomasse pro Gramm Substrat, als Koeffizient in [g/g] angegeben, liegt mit 0.06 g/g um den Faktor 25* niedriger als für die publizierte Umsetzung mit *Rhodotula minuta* Ganzzellen (1.5 g/g).^[450] Der Vergleich kann hierbei allerdings nur rein qualitativ geführt werden, da berücksichtigt werden muss, dass eine Reaktionsführung unter Einsatz isolierter, aufgereinigter Enzyme im Vergleich zur Verwendung mikrobiellen Zellmaterials bereits intrinsisch geringere Biomassen bedingt.^[500] Eine quantitative Beurteilung auf Basis der jeweiligen Anteile aktiven Enzyms an der verwendeten Gesamtbiomasse (im Fall des Literatursystems getrocknete *R. minuta* Ganzzellen, im in dieser Arbeit etablierten Prozess kommerziell erhältliche, lyophilisierte ADH-200) kann aufgrund fehlender Literaturdaten nicht abgegeben werden.

Die erreichte Produktivität des biokatalytischen Teilschrittes liegt mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 33 g_{(*R*)-**80**·L⁻¹·h⁻¹} allerdings um den Faktor 50 höher als im Referenzsystem (0.67 g_{(*R*)-**80**·L⁻¹·h⁻¹}).^[450] So kann mit dem in dieser Arbeit entwickelten Biotransformationsprozess innerhalb einer Stunde eine Produktmenge an (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) hergestellt werden, für die nach der Literatursynthese volle zwei Tage benötigt werden.^[450]

* Für den chemoenzymatischen Zugang zu (*R*)-**80** wurde lyophilisierte ADH-200 mit einer gravimetrischen Aktivität von 0.9 U/mg verwendet. Im Zuge dieser Arbeit kamen jedoch auch Enzymchargen mit bis zu 10 U/mg zum Einsatz, deren analoge Verwendung den Faktor auf >260 erhöhen würden.

3.3.5 Recycling des Biokatalysators

Um bei feststehenden Reaktionsbedingungen die Gesamtprozessökonomie der chemoenzymatischen Darstellung von (*R*)-**80** weiter zu erhöhen, können nicht verbrauchte Komponenten in die Synthesesequenz zurückgeführt werden. Auf Seiten der Aldolreaktion wird überschüssiges Isobutanal (**79**) zusammen mit Wasser, Isopropanol, Toluol und Essigsäure im Vakuum aus dem Rohproduktgemisch entfernt und lässt sich aus dieser komplexen Mischung nur schwer wieder isolieren. Auch das Rückführen des kompletten Gemisches ist unzulässig, da sich die Zusammensetzung in mehreren Versuchen nicht exakt reproduzieren lässt. Eine ähnlich zu der von RULLI *et al.* vorgestellten Heterogenisierung des Organokatalysators gestaltet sich aufgrund fehlender Anbindungsstellen am Histidingerüst schwierig.^[65,69] Wie LAM *et al.* zeigen konnten, führen Derivatisierungen sowohl am C-Terminus wie auch am Imidazolring zur Absenkung der katalytischen Aktivität, während die Funktionalisierung am N-Terminus die notwendige Enaminbildung vollständig unterdrückt (siehe Kapitel 3.2.1, Schema 3.7).^[351]

Auf Seiten der enzymatischen Reduktion wird Isopropanol unter ISPR-Bedingungen quasistöchiometrisch eingesetzt. Die Wiederverwertung des Puffers ist wegen zunehmender Übersäuerung durch im Rohprodukt der asymmetrischen Aldolreaktion (AAR) verbleibende Essigsäure in Folgecyclen unzuverlässig. Eine zu der in dieser Arbeit (siehe Kapitel 2.3.1.3) etablierten Methode der Recycling des Biokatalysators samt Coenzym durch Heterogenisierung an superabsorbierendem Polymer und die Durchführung der enzymatischen Reduktion im organischen Solvens ist mit der kontinuierlichen Entfernung von Aceton durch ISPR nicht vereinbar. Wie Versuche hierzu zeigen, werden organische Lösungsmittel durch den Gasstrom ebenso ausgelesen wie Aceton.

Als alternativer Recyclingansatz bietet sich eine derivatisierungs- und trägerfreie Rückhaltung des Enzyms im Reaktionsgefäß an. Diese kann durch Verwendung einer Größenausschlussmembran mit entsprechender Nominalmassengrenze (MWCO) erreicht werden (Abbildung 3.20).

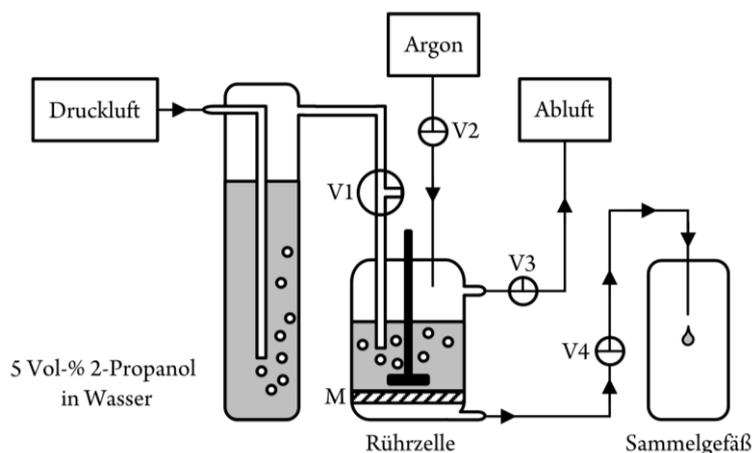


Abbildung 3.20. Rückhaltung des Biokatalysators bei der Darstellung von (*R*)-**80** unter ISPR-Bedingungen. V = (Absperr)Ventil, M = Größenausschlussmembran.

Die Biotransformation wird hierbei in einer Rührzelle mit MWCO-Membran (10 kDa) unter ISPR-Bedingungen durchgeführt (Ventil 1 und 3 geöffnet, analog Abbildung 3.17). Nach entsprechender Reaktionsdauer wird das Gemisch durch Anlegen eines Argonüberdrucks durch die Membran in ein Sammelgefäß filtriert, wobei die ADH zurück bleibt (Ventil 1 und 3 geschlossen, Ventil 2 und 4 offen). In jedem Folgezyclus wird der Enzymrückstand erneut in Puffer aufgenommen und mit Isopropanol, Substrat und Cofaktor versetzt. Um jeden Einzelcyclus quantifizieren zu können, werden alle Filtrate getrennt voneinander gesammelt, einzeln aufgereinigt und die Umsätze per GC-Kalibriergeraden bestimmt (Abbildung 3.21).

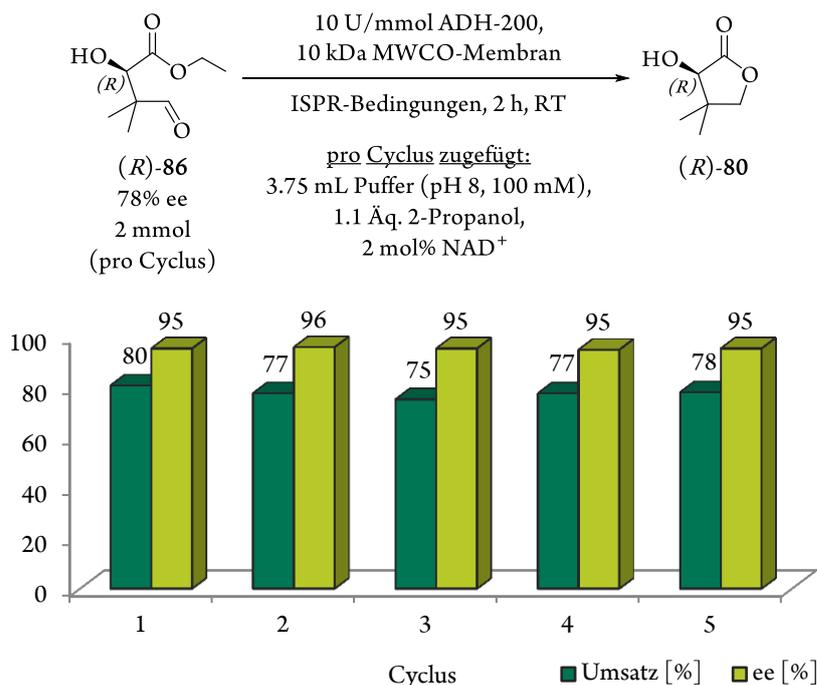


Abbildung 3.21. Recyclingversuche zur Synthese von (R)-80 unter Rückhalt der ADH.

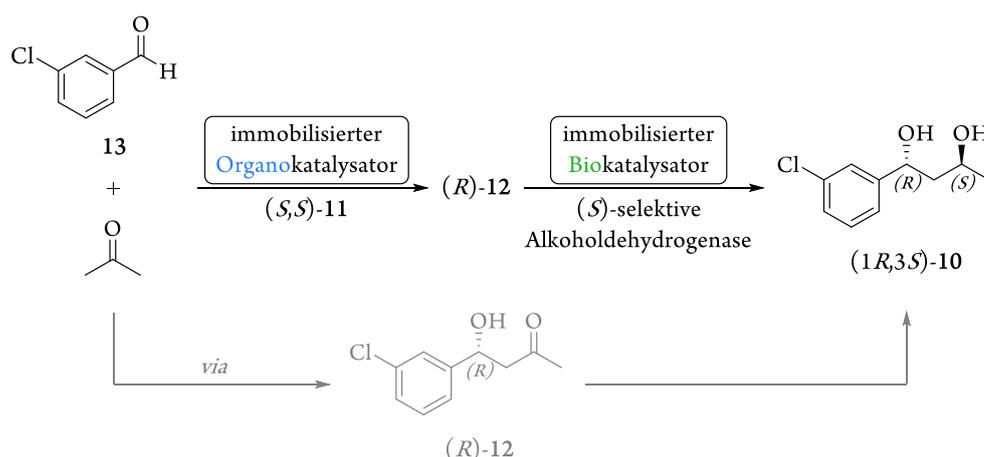
Im Rahmen der Fehlergrenzen werden hierbei in jedem Cyclus Umsätze von $77 \pm 2\%$ sowie ein konstant hoher ee-Wert von 95% erhalten, womit das Ergebnis des ISPR-Benchmarkversuches ohne Rückhaltung der ADH exakt reproduziert wird (vergleiche Schema 3.20). Rechnerisch vermindert sich die pro Cyclus eingesetzte Enzymaktivität bei fünf Reaktionscyclen und ursprünglich eingesetzten 10 U/mmol ADH-200 auf 2 U/mmol bzw. die notwendige Menge an Biomasse pro Gramm Substrat auf 12 mg/g.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Biotransformation von (R)-86 unter ISPR-Bedingungen vollständig mit der derivatisierungs- und trägerfreien Recyclingung des Enzyms unter Verwendung einer Größenausschlussmembran kombinierbar ist. Es kann angenommen werden, dass sich die eingesetzte Enzymaktivität noch unter 2 U/mmol senken lässt, da sich innerhalb der aufgezeichneten fünf Reaktionscyclen keinerlei Umsatzrückgang oder Selektivitätsverlust detektieren lässt.

4 Zusammenfassung

4.1 Chemoenzymatische Synthese von 1,3-Diolen

Das Ziel des ersten Schwerpunktes dieser Doktorarbeit war die Heterogenisierung einer Alkoholdehydrogenase und die Etablierung eines chemoenzymatischen Zweistufenprozesses zur Synthese von 1,3-Diolen, in den der von KRISTENSEN *et al.* immobilisierte Organokatalysator (*S,S*)-**11** implementiert werden kann (Schema 4.1).^[66-68] Der Biokatalysator sollte hierbei an einem gut verfügbaren, ökonomisch attraktiven Trägermaterial immobilisiert werden. Das möglichst simpel und wenig zeitintensiv zu präparierende Immobilisat sollte darüber hinaus eine hohe Wiederverwendbarkeit über mehrere Reaktionscyclen aufweisen. Als Modellsystem wurde die bereits gut untersuchte Darstellung von 1-(3-Chlorphenyl)butan-(1*R*,3*S*)-diol ((1*R*,3*S*)-**10**) gewählt.^[60-65]



Schema 4.1. Sequentieller Aufbau von (1*R*,3*S*)-**10** unter Verwendung immobilisierter Katalysatoren. In grau abgebildet: Aldolproduktzwischenstufe (*R*)-**12**.

Für die Präparation des Enzymimmobilisates wurde der Superabsorber Favor SXM 9155[®], der bereits erfolgreich für die nicht-kovalente Anbindung von Alkoholdehydrogenasen eingesetzt werden konnte,^[65,249,250] als Trägermaterial gewählt. Das Coimmobilisat aus (*S*)-selektiver Rsp-ADH und NAD⁺ zeigte im Modellsystem bei Belastungen mit niedriger Aktivität jedoch starke Auswaschungserscheinungen im wässrigen Medium, wobei nach drei Cyclen kein Umsatz mehr detektiert werden konnte. Durch die Verwendung des Hydrogelimmobilisates in mit Wasser gesättigten, hydrophoben, organischen Solventien wie Cyclohexan oder Isooktan konnte jedoch eine Kompartimentierung des Biokatalysators sowie des Cofaktors und des Edukts (*R*)-**12** bzw. Diols (1*R*,3*S*)-**10** erreicht werden. Im organischen Solvens zeigt das Superabsorber-Coimmobilisat hierbei nicht nur exzellente Recyclingeigenschaften, es genügen auch bereits wenige Äquivalente Isopropanol zur effektiven Cofaktorregenerierung (Abbildung 4.1).

Aufgrund der guten Recyclierbarkeit besitzt das Coimmobilisat im organischen Lösungsmittel im Vergleich zum analogen, wässrigen System eine niedrigere Katalysatorbeladung bei gleichzeitiger Herabsetzung der notwendigen Cofaktormenge. Da die Biotransformation vollständig im organischen Medium durchgeführt werden kann, wird ein anschließender Extraktionsschritt obsolet, was die Effizienz des Gesamtprozesses weiter erhöht.

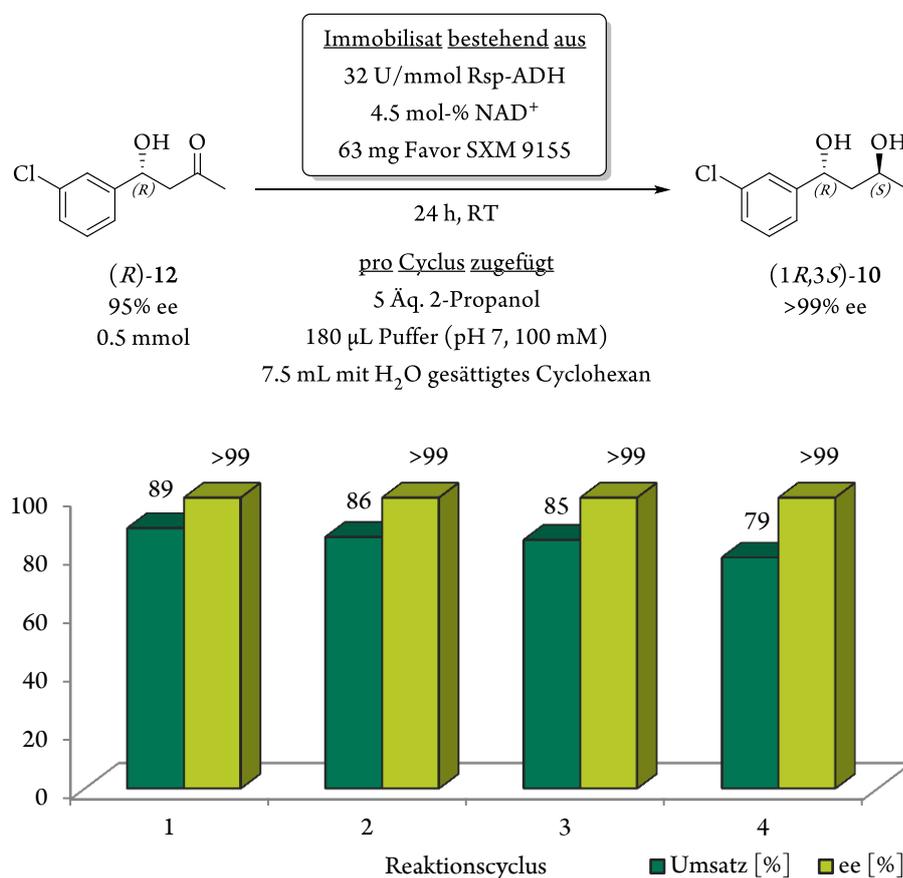


Abbildung 4.1. Recyclingversuche zur Synthese von (1*R*,3*S*)-10 mittels immobilisierter Rsp-ADH in Cyclohexan.

Die geplante, chemoenzymatische Synthese von (1*R*,3*S*)-10 unter ausschließlicher Nutzung heterogenisierter Katalysatoren gelang anschließend durch die vorgeschaltete, organokatalytische Aldolreaktion mit dem von RULLI *et al.* beschriebenen Prolinamid (*S,S*)-11. Im Vergleich zu den bereits veröffentlichten Ergebnissen für dieses Katalysatorsystem im wässrigen Medium^[62-65] müssen dem Reaktionsgemisch in dem mit der nachfolgenden Biotransformation kompatiblen Lösungsmittel Cyclohexan einige Stoffmengenprozent 3-Chlorbenzoesäure (**67**) als Cokatalysator zugesetzt werden. Durch die Zugabe des Säureadditives **67** kann (*R*)-12 dann allerdings mit beinahe quantitativem Umsatz von 95% (91% produktbezogener Umsatz) und hoher Enantiomerenreinheit von 95% ee erhalten werden (Schema 4.2).

Durch Kombination des Styrol-gebundenen Prolinamidkatalysators (*S,S*)-11 mit einer superabsorbierten Rsp-ADH kann das Diol (1*R*,3*S*)-10 ohne Aufreinigung oder Isolierung des β -Hydroxyketon-intermediates mit einem produktbezogenen Gesamtumsatz von 81% aus 3-Chlorbenzaldehyd **13** dargestellt werden (Schema 4.2).

Durch Autoxidation des Aldehyds **13** werden im Verlauf der Reaktion geringe Mengen an 3-Chlorbenzoesäure (**67**) gebildet, welche als Brønstedsäure sowohl geschwindigkeits- als auch selektivitätssteigernd auf die Bildung von (*R*)-**12** wirken (Abbildung 4.2).

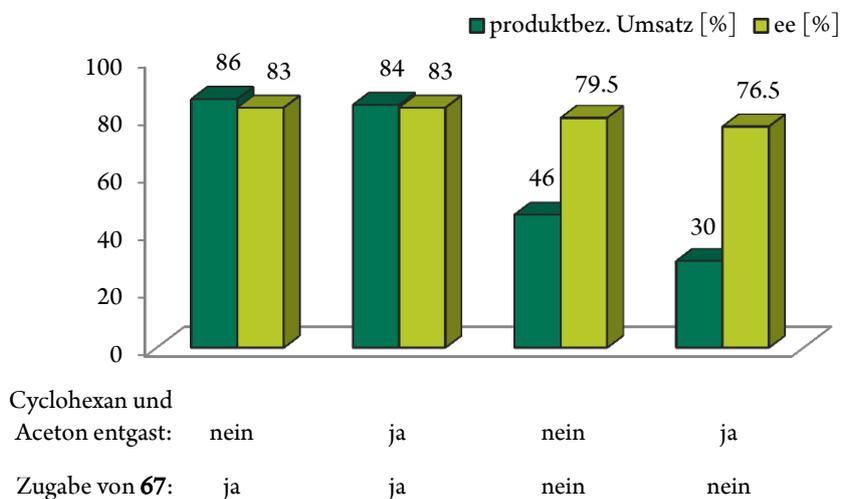
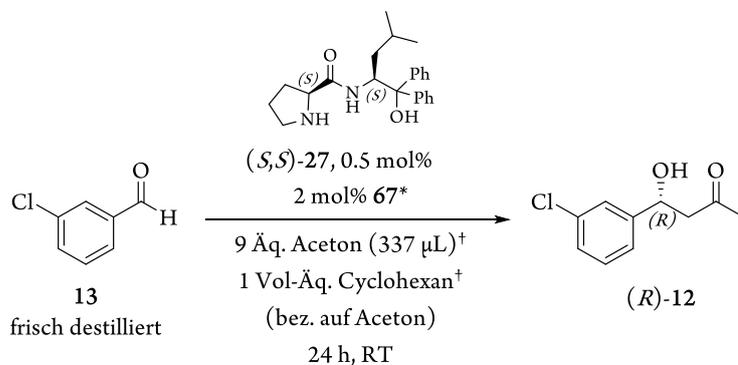
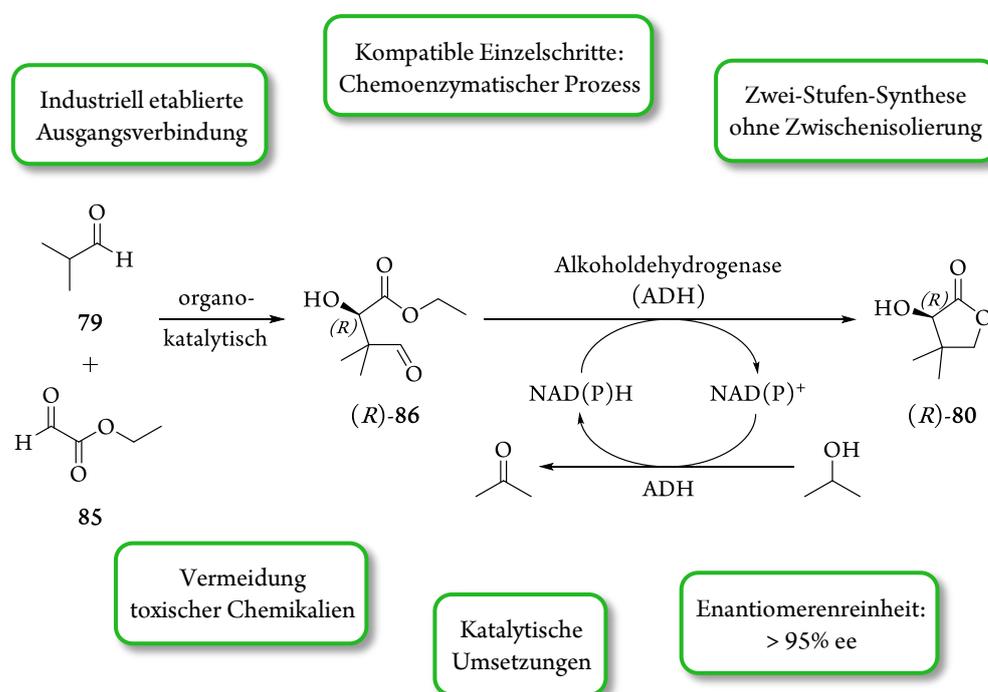


Abbildung 4.2. Einfluss der Autoxidation auf die Synthese von (*R*)-**12** im organischen Medium (* = optionale Zugabe; † = optional entgast).

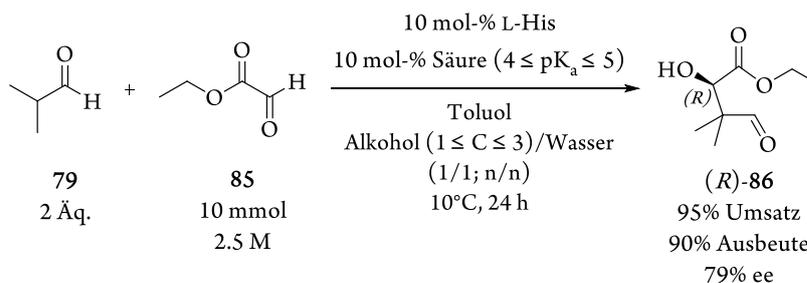
4.2 Chemoenzymatische Synthese von (*R*)-Pantolacton

Das Ziel des zweiten Schwerpunktes dieser Doktorarbeit war die Entwicklung eines nachhaltigen Prozesses zur Darstellung der Vitamin-B₅ Vorstufe (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**), welcher den Prinzipien der „Grünen Chemie“ folgen soll.^[302,333] Ausgehend von dem kostengünstig verfügbaren, industriell etablierten Edukt Isobutanal (**79**) sollte eine chemoenzymatische Zwei-Stufen-Synthese ohne die Isolierung des Intermediates etabliert werden. Hierbei sollten beide Schritte katalytisch ablaufen, keine bedenklichen oder giftigen Chemikalien Verwendung finden und das Stereozentrum selektiv aufgebaut werden um einen Enantiomerenüberschuss von mindestens 95% zu erreichen (Schema 4.3).



Schema 4.3. Zielsetzungsparameter der nachhaltigen Pantolactonsynthese.

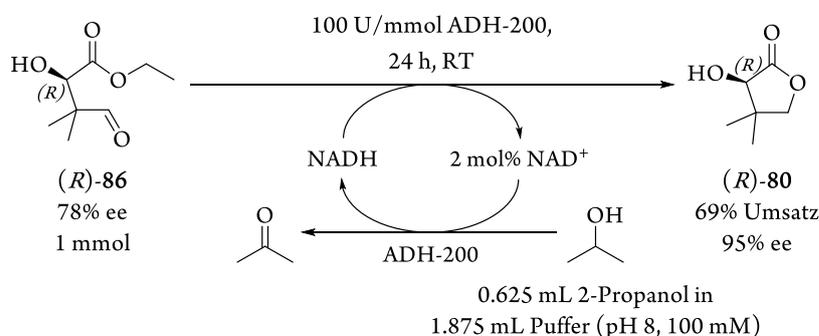
Im Zuge dieser Prozessentwicklung wurde zunächst die von MAHRWALD beschriebene,^[353] Histidin-katalysierte, asymmetrische Aldolreaktion im Hinblick auf die möglichst selektive und effektive Darstellung von (*R*)-**86** optimiert. Das verbesserte Reaktionsgemisch für die organokatalytische Synthese von (*R*)-**86** setzt sich, bezogen auf den Akzeptor Ethylglyoxylat (**85**), aus zwei Äquivalenten des Donors Isobutanal (**79**) sowie jeweils 10 mol% L-Histidin und einem Brønstedsäurekatalysators im pK_a-Bereich zwischen vier und fünf in einem äquimolaren Alkohol/Wasser-Solvenssystem zusammen. Der verwendete Alkohol ist hierbei monovalent und besitzt eine Kettenlänge kleiner drei (Schema 4.4). Der Einsatz von Methanol und Benzoesäure liefert bei 79% ee einen Umsatz von 95%. Die analoge Reaktionsführung mit 2-Propanol und Essigsäure liefert (*R*)-**86** mit 79% Umsatz als auch 79% ee.



Schema 4.4. Optimierte Reaktionsbedingungen zur Darstellung des Aldehyds (R)-86.

Durch schrittweise Parameteroptimierungen konnte (R)-86 im Vergleich zum Literaturbenchmark (60% Ausbeute, 65% ee, 4 d Reaktionszeit)^[353] somit schneller sowie mit höherem Umsatz und optischer Reinheit gewonnen werden, was bereits für sich betrachtet einen großen Fortschritt darstellt.

Für die nachfolgende Biotransformation des Aldolproduktes wurde die ADH-katalysierte Reduktion gewählt. Um den Gesamtprozess möglichst einfach zu halten wurde die substratgekoppelte *in situ* Oxidation von 2-Propanol zu Aceton als Cofaktorregenerierungssystem verwendet. Sowohl die Umsetzung von (R)-86 als auch die Regenerierung des Coenzym können so mit demselben Enzym realisiert werden. Mit der von evocatal® kommerziell erhältlichen ADH-200 kann (R)-Pantolacton ((R)-80) aus dem isolierten und aufgereinigten Aldolprodukt (R)-86 in einem 2-Propanol/Puffer Gemisch in 24 Stunden mit 69% Umsatz und 95% ee erhalten werden (Schema 4.5).



Schema 4.5. Enzymatische Reduktion des Aldolproduktes (R)-86 unter *in situ* Cofaktorregenerierung mit 2-Propanol.

Im Hinblick auf die Kombination des organokatalytischen Teilschrittes (Schema 4.4) mit dieser enzymatischen Reduktion ohne Isolierung des Intermediates (R)-86 erwies sich in Simulationsreihen die thermodynamische Limitierung der Biotransformation als Herausforderung. Während die aus der Aldoladdition stammenden Störkomponenten wie Isobutanal (79), Essigsäure oder Toluol (vergleiche Schema 4.4) leicht durch Evaporation aus dem Reaktionsgemisch des Intermediates abtrennbar sind, hemmt das durch die Cofaktorregenerierung stöchiometrisch auftretende Nebenprodukt Aceton (vergleiche Schema 4.5) die enzymatische Reduktion stark.

Prozesstechnisch konnte die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts hin zum Reduktionsprodukt (*R*)-**86** durch das Austreiben des entstehenden Acetons aus dem Reaktionsgemisch realisiert werden. Mit Hilfe der *in situ* (Neben)Produktentfernung (ISPR) durch konstantes Austragen des Gasraumes (schematischer Reaktionsaufbau in Abbildung 4.3) konnte die thermodynamische Limitierung des Systems umgangen werden.

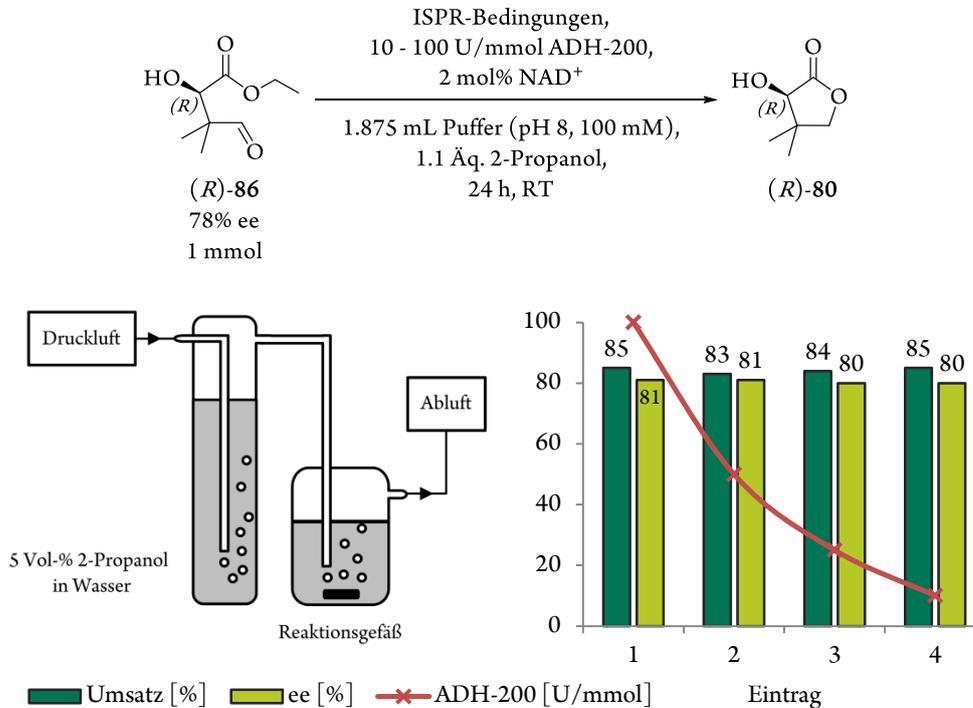


Abbildung 4.3. Links: Schematische Darstellung der Reaktion unter ISPR (*in situ* Produktentfernung)-Bedingungen. Rechts: Erzielte Umsätze und Enantiomerenüberschüsse der enzymatischen Reduktion von (*R*)-**86** unter ISPR-Bedingungen und sukzessiver Verringerung der eingesetzten Enzymaktivität.

Unter ISPR-Bedingungen konnte zwar der Umsatz von 69 auf 85% gesteigert sowie die eingesetzte Enzymaktivität von 100 auf 10 U/mmol gesenkt werden, jedoch wurde (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) mit einem Enantiomerenüberschuss von lediglich 80% erhalten. Die hohe Selektivität der Alkoholdehydrogenase ließ sich jedoch durch sukzessives Verkürzen der Reaktionszeit konservieren. So wurde im Vergleich zum Referenzsystem ohne Entfernung des Nebenproduktes Aceton unter ISPR-Bedingungen bei einer Reaktionszeit von zwei Stunden bei gleichbleibend hoher Selektivität (95% ee) ein signifikant höherer produktbezogener Umsatz von 86% erzielt (Abbildung 4.4).

Die optimierten Einzelschritte wurden anschließend erfolgreich in der angestrebten, chemoenzymatischen Synthesesequenz nach Schema 4.3 miteinander kombiniert. (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) konnte so ohne Zwischenisolierung, -extraktion oder -aufreinigung des Intermediates (*R*)-**86** dargestellt werden (Schema 4.6). Die Entfernung flüchtiger Bestandteile aus dem Rohproduktgemisch der Aldolreaktion ist jedoch obligatorisch.

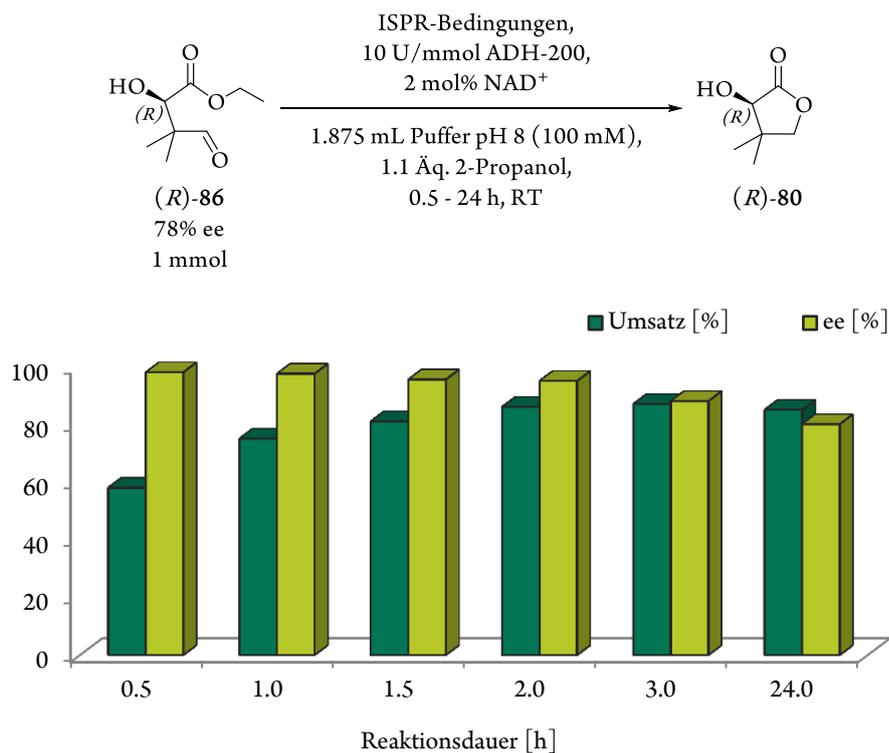
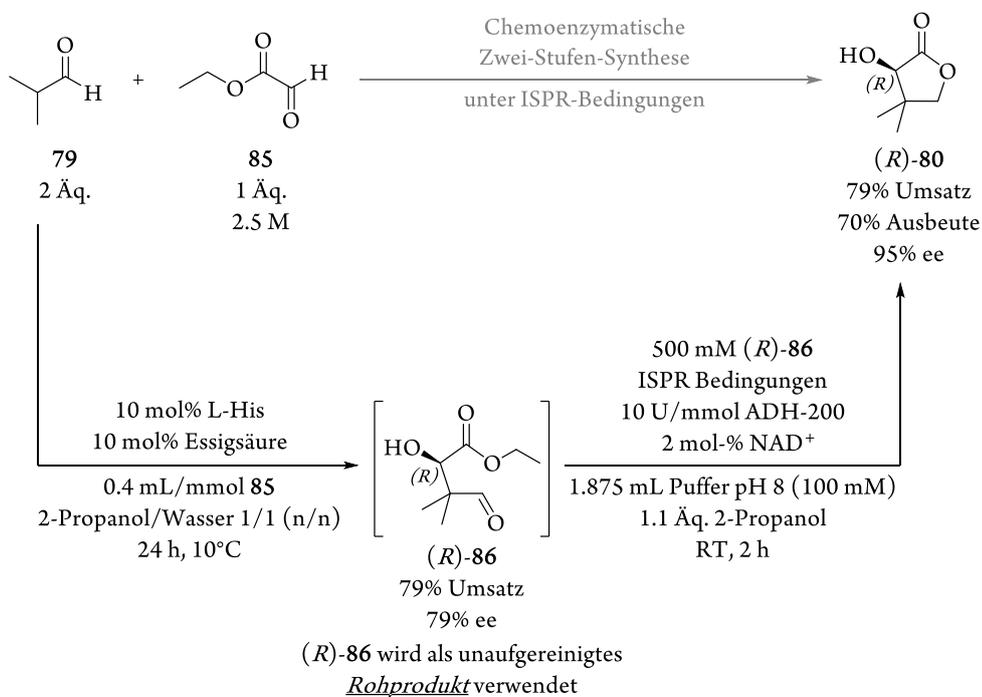


Abbildung 4.4. Einfluss der Reaktionsdauer auf den erzielbaren Umsatz bzw. Enantiomerenüberschuss bei der Darstellung von (R)-80 unter ISPR-Bedingungen.



Schema 4.6. Chemoenzymatische Darstellung von (R)-80 ohne Isolierung der Zwischenstufe (R)-86.

Bei einer Gesamtkonzentration der Edukte von 7.5 M im ersten und 500 mM im zweiten Schritt der Synthesesequenz wird (*R*)-**80** mit einem Gesamtumsatz von 63% bzw. einer –ausbeute von 55% und 95% ee erhalten. Im Vergleich zu dem bisher einzigen chemoenzymatischen Zugang zu (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) auf Isobutanalbasis nach SHIMIZU (52% Ausbeute, 94% ee vor Umkristallisation)^[450] werden im Besonderen auf der Stufe der Biotransformation dabei sämtliche Prozessparameter der Literatursyntheseroute übertroffen: Bei einer im Vergleich zu 14.5 Stunden wesentlich kürzeren Reaktionszeit von zwei Stunden wird eine signifikant höhere Eduktkonzentrationen von 500 mM (Literatur: <80 mM)^[450] erreicht. Die erreichte Produktivität des biokatalytischen Teilschrittes ist dabei mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 33 g_{(*R*)-**80**}·L⁻¹·h⁻¹ gleichzeitig beinahe um den Faktor 50 höher als im Referenzsystem (0.67 g_{(*R*)-**80**}·L⁻¹·h⁻¹).^[450] So kann mit dem in dieser Arbeit entwickelten Biotransformationsprozess innerhalb einer Stunde eine Produktmenge an (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) hergestellt werden, für die nach der Literatursynthese volle zwei Tage benötigt werden.^[450]

Die Nachhaltigkeit des Prozesses kann noch weiter verbessert werden, sobald der Biokatalysator wiederverwendet werden kann. Dieses konnte durch die Kombination der Biotransformation von (*R*)-**86** unter ISPR-Bedingungen mit der derivatisierungs- und trägerfreien Recycling des Enzyms unter Verwendung einer Größenausschlussmembran (MWCO-Membran) erreicht werden. Die eingesetzte Enzymaktivität konnte durch die wiederholte Verwendung in fünf aufeinander folgende Cyclen auf 2 U/mmol gesenkt werden ohne das ein Umsatzrückgang oder Selektivitätsverlust detektieren wurde (Abbildung 4.5).

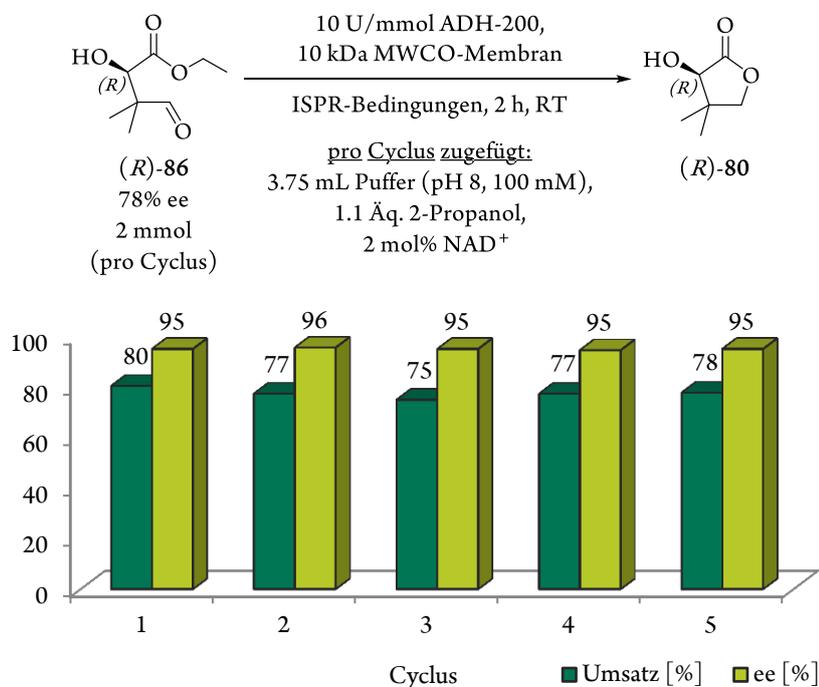


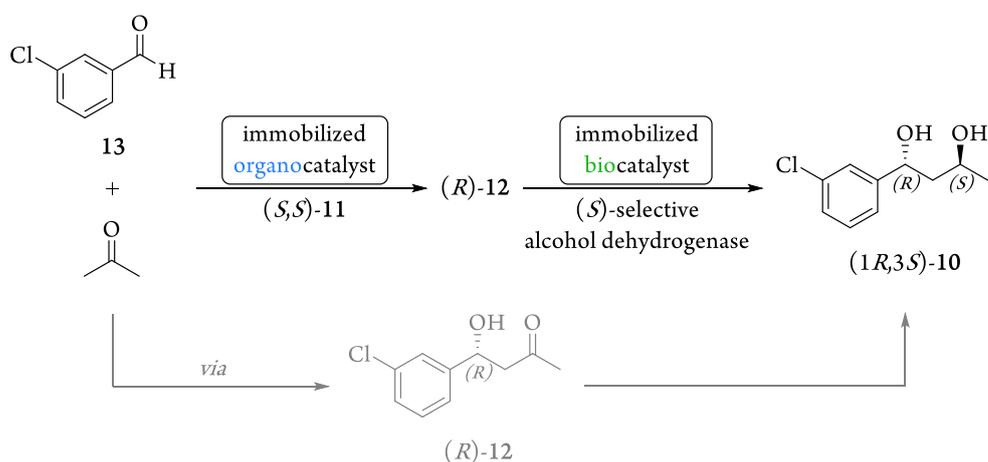
Abbildung 4.5. Recyclingversuche zur Synthese von (*R*)-**80** unter Rückhalt der ADH und ISPR-Bedingungen.

Die in dieser Arbeit etablierte Alternativroute zur Synthese von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) ist im Vergleich zur großtechnischen Herstellung des Vitamin-B₅ Bausteins (vergleiche Kapitel 3.1, Schema 3.2) nicht nur wesentlich kürzer, sie adressiert auch beinahe alle Aspekte der „Grünen Chemie“ erfolgreich. So werden 1.) keine für Mensch oder Umwelt toxischen Stoffe verwendet, 2.) keine Hilfschemikalien wie chirale Auxiliare zur Racematspaltung benutzt, da das Stereozentrum während der Synthese generiert wird und 3.) die Einzelschritte bei Raumtemperatur oder unter lediglich schwacher Kühlung durchgeführt. Der Prozess beinhaltet 4.) keine Arbeitsschritte oder Verbindungen, die ein erhöhtes Gefahren- oder Unfallpotential bergen sowie 5.) ausschließlich katalytische Umsetzungen. Bei der Darstellung von (*R*)-**80** werden 6.) keine Schutzgruppen benötigt und 7.) es kommen aus umwelttechnischer Sicht ausschließlich unbedenkliche (Toluol) oder besonders zu bevorzugende (Wasser, Methanol, 2-Propanol, Aceton) Lösungsmittel zum Einsatz.^[130]

5 Summary

5.1 Chemoenzymatic Synthesis of 1,3-Diols

The aim of this section was the heterogenization of an alcohol dehydrogenase and the establishment of a chemoenzymatic two-step process for the synthesis of 1,3-diols, implementing the immobilized organocatalyst (*S,S*)-**11**, recently developed by KRISTENSEN *et al.* (Scheme 5.1)^[66-68] The biocatalyst immobilisate should be accessible *via* easy and fast preparation on an economically attractive support and show good reusability properties over several reaction cycles. As model system the well-investigated synthesis of (*1R,3S*)-1-(3-chloro-phenyl)butane-1,3-diol ((*1R,3S*)-**10**) was chosen.^[60-65]



Scheme 5.1. Modular synthesis of (*1R,3S*)-1-(3-chlorophenyl)butane-1,3-diol ((*1R,3S*)-**10**) using immobilized catalysts (depicted in grey: aldol reaction intermediate (*R*)-**12**).

For the preparation of the enzyme immobilisate, superabsorbent polymer Favor SXM 9155[®], which has already been successfully applied for the non-covalent binding of alcohol dehydrogenases,^[65,249,250] was chosen as support. However, applying co-superabsorbed (*S*)-selective Rsp-ADH and NAD⁺ for the synthesis of (*1R,3S*)-**10** in an aqueous medium showed severe leaching, rendering the immobilisate useless after three consecutive reaction cycles. In contrast, utilizing the hydrogel immobilisate in water-saturated, hydrophobic organic solvents like cyclohexane led to the compartmentation of hydrophilic and water-immiscible reaction components. While leaching of both, the biocatalyst and the coenzyme out of the polymer matrix was prevented, mass transfer of the starting material (*R*)-**12** and the product (*1R,3S*)-**10** through the hydrogel/organic phase barrier was maintained at a level high enough for an efficient biotransformation (Figure 5.1).

Yielding (1*R*,3*S*)-**10** in >99% ee, the enzyme immobilisate showed not only excellent reusability in organic solvents with just five equivalents of 2-propanol per cycle, but also obviates the need for product extraction as the diol (1*R*,3*S*)-**10** accumulates in the organic phase and can be isolated by simple decantation. Intrinsically, the application of the established superabsorbed coimmobilisate is superior compared to the utilization of free enzyme and cofactor in terms of catalyst loading.

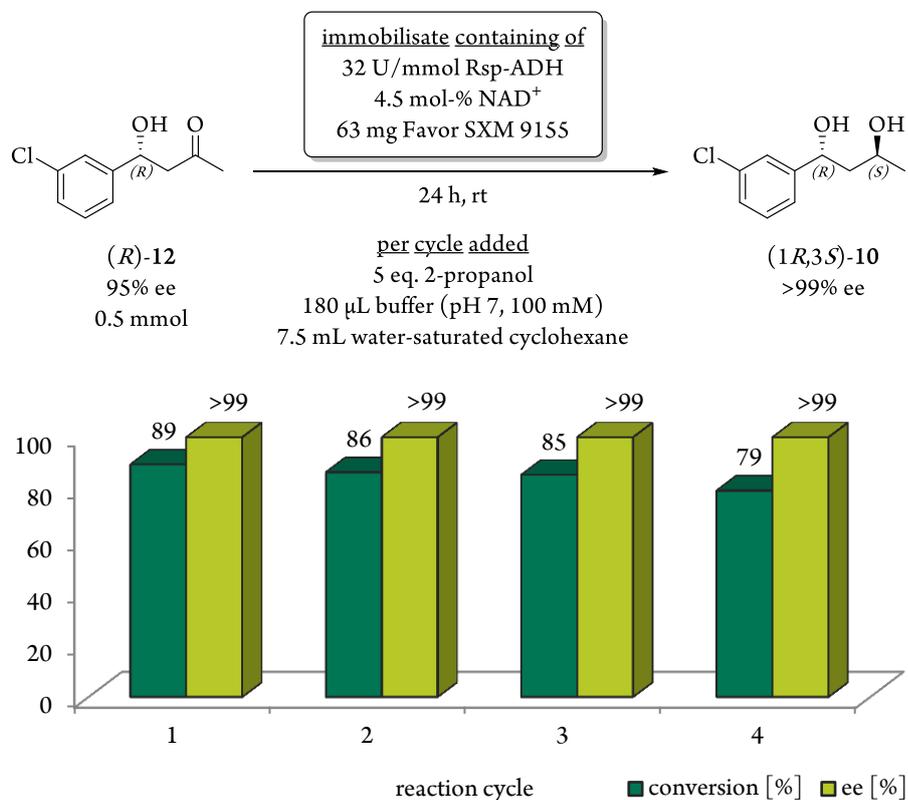
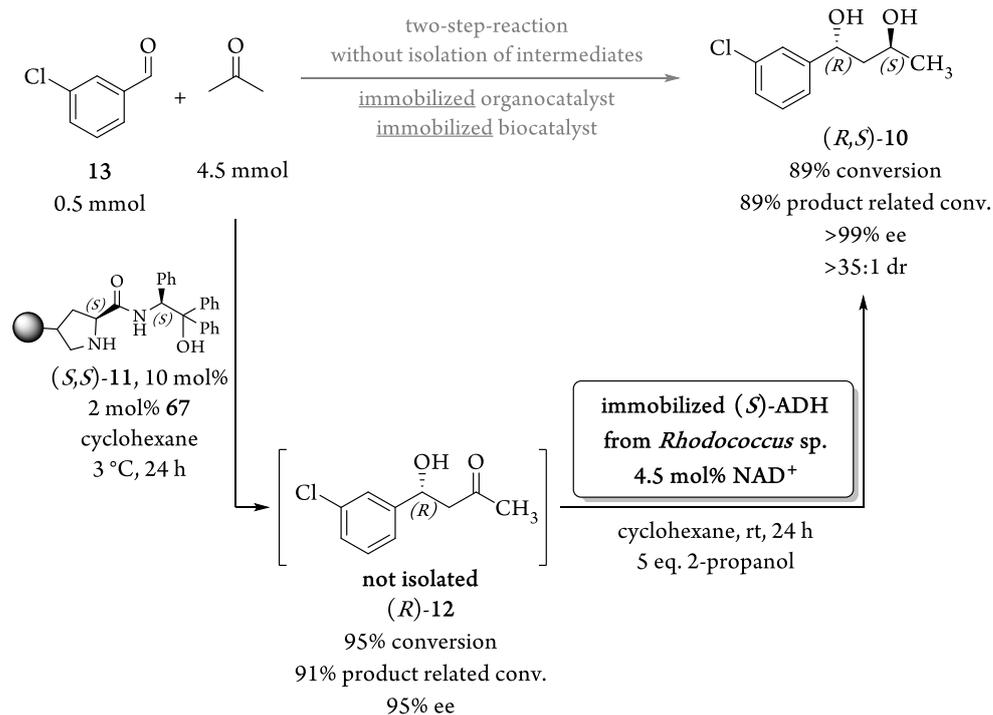


Figure 5.1. Recycling studies on the immobilized Rsp-ADH in cyclohexane.

Setting up a chemoenzymatic process according to Scheme 5.1, implementing the heterogenized organocatalyst (*S,S*)-**11**, afforded the compatibilization of both reaction steps. In comparison to published results for the aldol addition of 3-chlorobenzaldehyde (**13**) and acetone using catalyst (*S,S*)-**11** in aqueous media,^[62-65] a high catalytic performance in cyclohexane was only achieved when 2 mol% of 3-chlorobenzoic acid (**67**) were added to the reaction mixture, facilitating the formation of (*R*)-**12** with high enantiomeric excess of 95% and a nearly quantitative conversion of 95% (91% product related conversion; Scheme 5.2, step one).

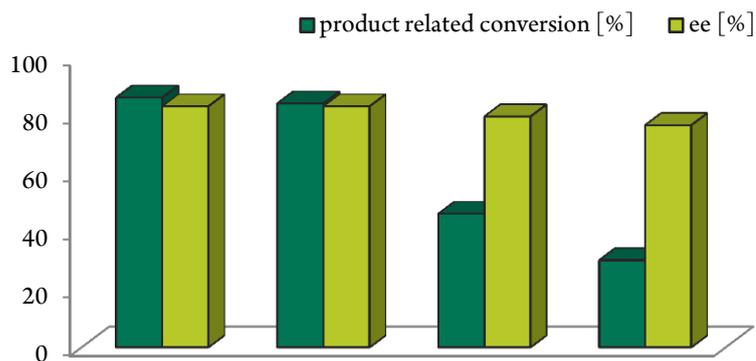
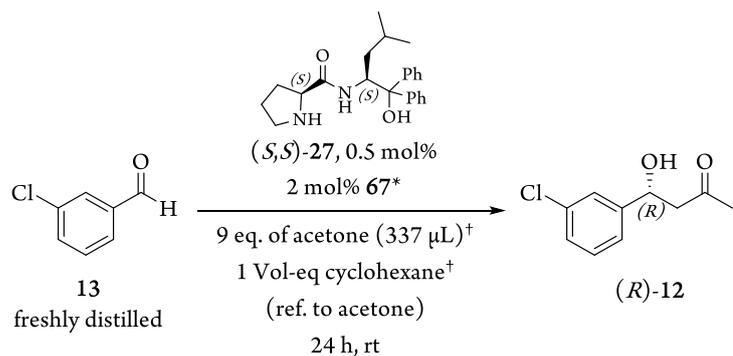
After evaporation of all volatile materials, the crude aldol reaction product mixture is dissolved in cyclohexane and converted to (1*R*,3*S*)-**10** using the above-mentioned superabsorber coimmobilisate. The diol (1*R*,3*S*)-**10** was obtained in a product related conversion of 89% (81% overall product related conversion based on aldehyde **13**) and an excellent enantiomeric excess of >99% with a diastereomeric ratio of >35:1. As the process is running completely in cyclohexane, no extraction of (1*R*,3*S*)-**10** is necessary and the diol product can be obtained by simple evaporation.



Scheme 5.2. Chemoenzymatic synthesis of (*1R,3S*)-**10** using heterogenized catalysts in cyclohexane.

Furthermore, it was observed that the outcome of the asymmetric aldol reaction (AAR) in terms of achievable conversion to (*R*)-**12** and stereoselectivity was influenced by the purity of the starting material **13**. The counter-intuitive relation that distillation of **13** (>99% purity) led to lower conversions in the AAR could be attributed to the sensibility of the aldehyde to oxygen as the corresponding 3-chlorobenzoic acid (**67**) was identified as the sole impurity in substrate formulations of lower purity. In this work the acid **67** was already identified to be an active cocatalyst in the AAR of 3-chlorobenzaldehyde (**13**) and acetone (Scheme 5.2) and as the reaction is carried out under aerobic conditions, it was assumed that autoxidation of the starting material **13** amplifies the formation of (*R*)-**12**.

The influence of autoxidatively formed 3-chlorobenzoic acid (**67**) on the reaction kinetics of the asymmetric aldol reaction between 3-chlorobenzaldehyde (**13**) and acetone was validated by cross-checking. For this purpose the non-immobilized analogue ((*S,S*)-**27**) of (*S,S*)-**11** was used in a reaction setup similar to that shown in Scheme 5.2 (step one). Comparative experiments were conducted using degassed cyclohexane and acetone and optionally the acid was added at the start of the reaction. It was shown that the presence of oxygen and hence the autoxidation of 3-chlorobenzaldehyde (**13**) to its corresponding acid **67** does have a significant influence on the reaction dynamics of the aldol reaction for the acid acts as an efficient cocatalyst (Figure 5.2).



degassed cyclohexane

and acetone used:

no

yes

no

yes

addition of **67**:

yes

yes

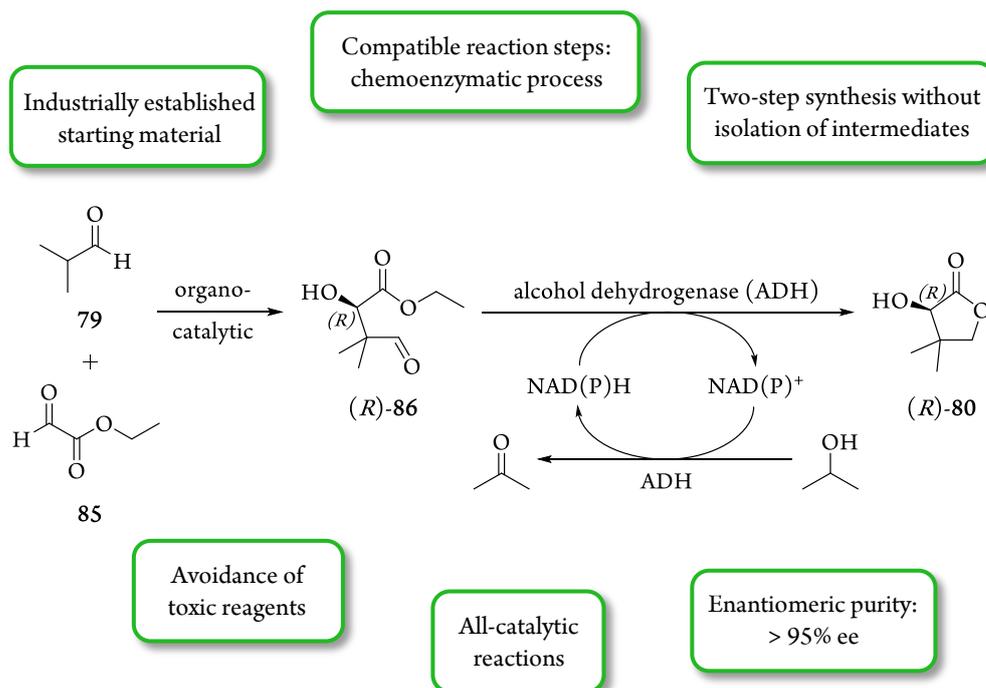
no

no

Figure S.2. Influence of oxygen on the formation of (*R*)-12 in cyclohexane (* = optionally added; † = optionally degassed).

5.2 Chemoenzymatic Synthesis of (*R*)-Pantolactone

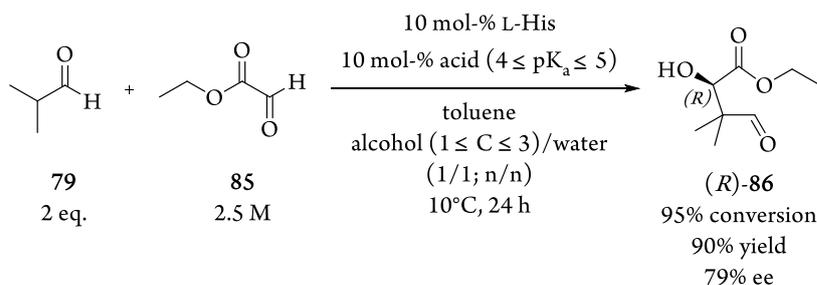
The aim of this section was the development of a sustainable process for the synthesis of the vitamin B₅ precursor (*R*)-pantolactone ((*R*)-**80**), following the principles of “Green Chemistry”.^[302,333] Starting from the highly available, industrially well-established reactant isobutanal (**79**), the lactone (*R*)-**80** should be formed in a chemoenzymatic two-step all-catalytic synthesis without isolation or purification of intermediates. Furthermore, harmful or toxic reagents should be avoided and (*R*)-**80** is needed in an enantiomeric purity of at least 95% ee (Scheme 5.3).



Scheme 5.3. Parameters for the sustainable synthesis of (*R*)-pantolactone ((*R*)-**80**).

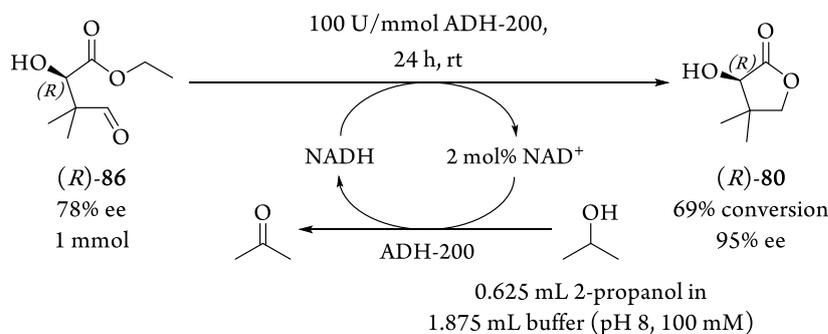
Initial studies were based on the organocatalytic aldol reaction step leading to intermediate (*R*)-**86** published by MAHRWALD.^[353] Subsequent parameter optimization gave an optimized reaction setup consisting of a 2.0:1.0:0.1 molar ratio of isobutanal (**79**):ethyl glyoxylate (**85**):L-histidine in an equimolar mixture of a low molecular monovalent alcohol (C_{≤3}) and water (Scheme 5.4). By adding a Brønsted acid with a pK_a value between four and five and conducting the asymmetric aldol reaction (AAR) at slightly lowered temperatures, the aldol addition product (*R*)-**86** was obtained with up to 95% conversion (90% yield) and 79% ee within 24 hours in the case of methanol and benzoic acid (for comparison: 2-propanol/ acetic acid gave (*R*)-**86** with both 79% conversion and ee).

Compared with the literature benchmark (60% yield, 65% ee, 4 d reaction time),^[353] the setup summarized in Scheme 5.4 leads to the formation of aldol product (*R*)-**86** in shorter reaction time and higher selectivity as well as conversion.



Scheme 5.4. Optimized reaction setup for the synthesis of (*R*)-86.

The following selective reduction was achieved *via* an ADH-catalyzed biotransformation of the aldol product using the substrate-coupled cofactor regeneration approach by simultaneous oxidation of 2-propanol to acetone, accomplished by the same enzyme (Scheme 5.5). Employing the commercially available ADH-200, (*R*)-pantolactone ((*R*)-80) was synthesized from purified (*R*)-86 in 69% conversion with 95% ee.



Scheme 5.5. Enzymatic reduction of the aldol product (*R*)-86 with *in situ* cofactor regeneration using 2-propanol as cosubstrate.

Concerning the combination of this enzymatic reduction with the AAR shown in Scheme 5.4, the challenge for a successful setup of a two-step process without isolation of the intermediate (*R*)-86 turned out to be directly linked to the stoichiometric side product formation of the biotransformation step, namely acetone. As the reduction of (*R*)-86 is related to the oxidation of 2-propanol to acetone due to the substrate-coupled cofactor regeneration system (Scheme 5.5), the unpreventable generation of acetone leads to an impaired conversion rate in the synthesis of (*R*)-pantolactone ((*R*)-80).

Aiming to overcome this thermodynamic limitation, the reaction setup shown in Figure 5.3 was applied. By stripping the low-boiling side product acetone from the reaction mixture with compressed air, the reactivity of the biocatalyst was maintained at maximum rate over the whole reaction time. However, on the same time scale as in Scheme 5.5, using the *in situ* (side) product removal (ISPR) setting gave (*R*)-80 at a significantly lower catalyst loading (10 U/mmol *vs.* 100 U/mmol) with a high conversion of 85% (*vs.* 69%), but at the expense of enantiomeric purity (80% *vs.* 95%).

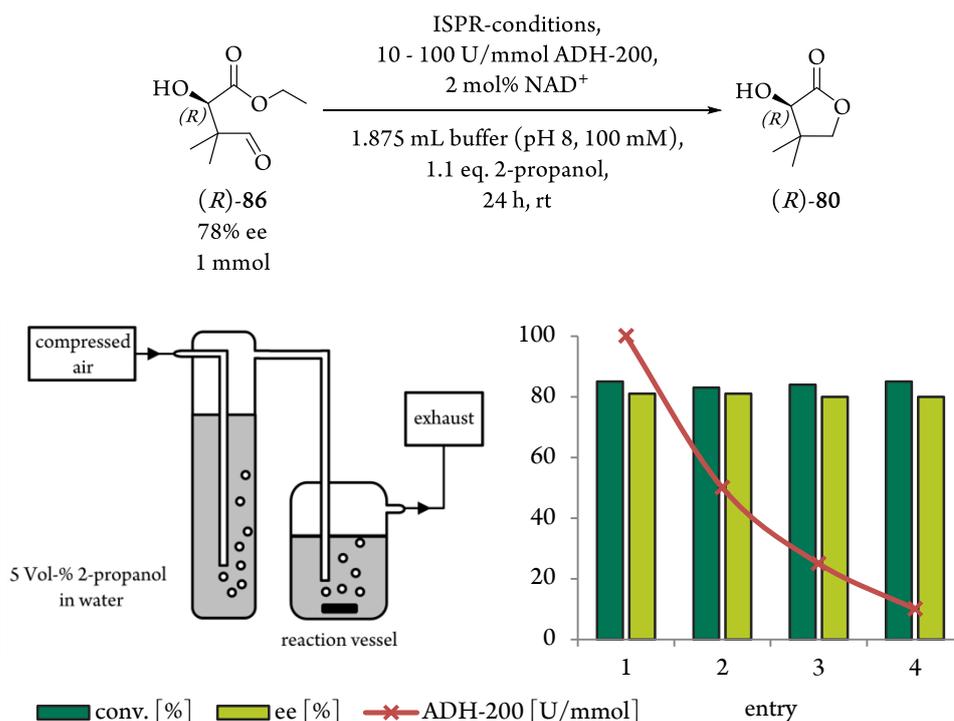


Figure 5.3. At left: schematic setup for a reaction under ISPR (*in situ* product removal)-conditions. At right: conversions and enantiomeric excesses for the enzymatic reduction of (*R*)-**86** under ISPR-conditions and subsequent decrease of the applied enzyme activity.

Continual decreasing the reaction time restored the afore-observed high selectivity of ADH-200. In summary it can be stated that under ISPR-conditions the biotransformation of (*R*)-**86** can be accomplished in only two hours, giving (*R*)-pantolactone ((*R*)-**80**) in 95% ee (86% conversion) with only 1.1 equivalents of 2-propanol (Figure 5.4).

At this point it has to be emphasized that not only a highly efficient biotransformation step for the synthesis of (*R*)-**80** overcoming the thermodynamic limitation of the substrate-coupled cofactor regeneration was established. It was also successfully combined in a chemoenzymatic two-step process without the time consuming isolation of the intermediate (*R*)-**86** (Scheme 5.6). The only obligatory operation is the removal of volatile compounds before reacting (*R*)-**86** to (*R*)-**80**.

With substrate concentrations of 7.5 M for the aldol addition and 500 mM for the biotransformation step, (*R*)-**80** can be synthesized with an overall conversion of 63% (overall yield 55%) and 95% ee. Compared with the (to date sole) chemoenzymatic access to (*R*)-pantolactone ((*R*)-**80**) based on the starting material isobutanal (**79**) by SHIMIZU (52% yield, 94% ee without recrystallisation),^[450] the herein presented reaction sequence is a significant improvement, especially concerning the process parameters of the biotransformation step: Contrary to a reaction time of 14.5 hours and a substrate concentration of less than 80 mM,^[450] the synthesis of (*R*)-**80** can be accomplished in two hours at a substrate concentration of 500 mM, while the space-time-yield is improved nearly fiftyfold from 0.67 g_{(*R*)-**80**·L⁻¹·h⁻¹} to 33 g_{(*R*)-**80**·L⁻¹·h⁻¹}.^[450]

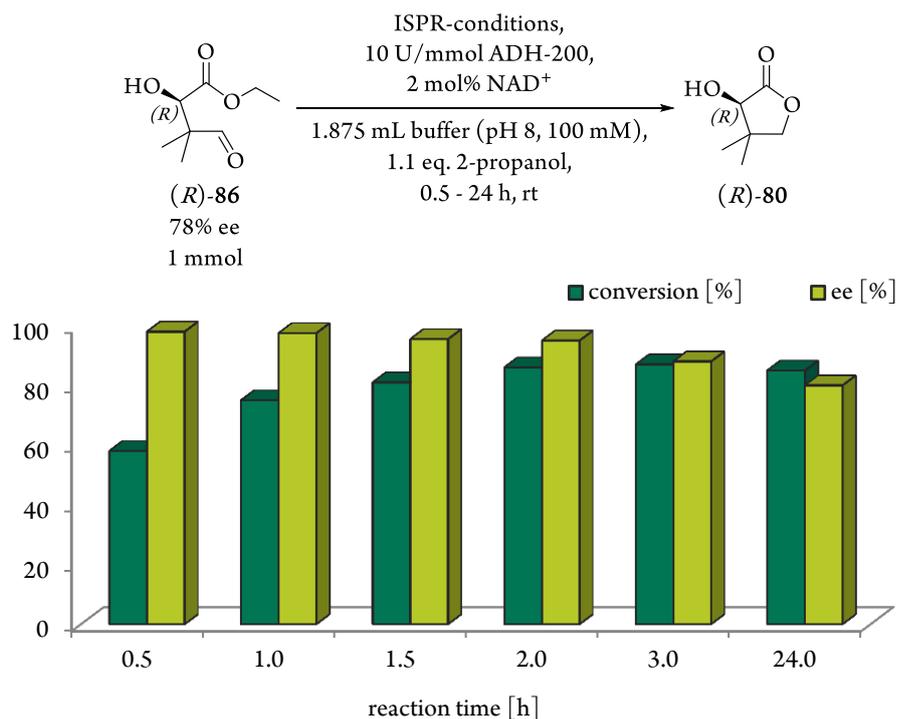
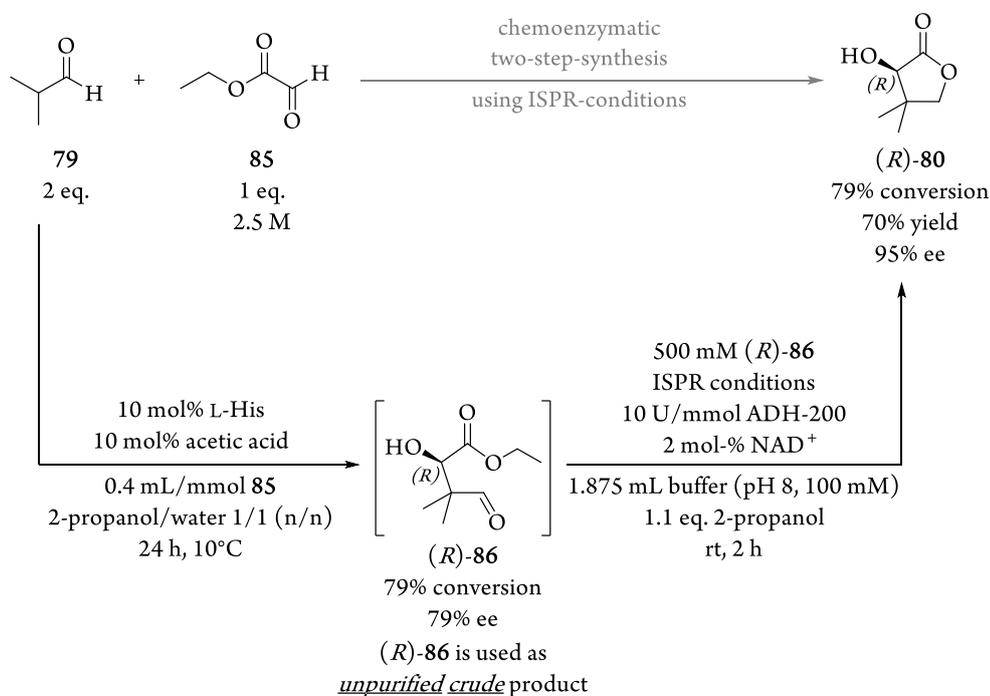


Figure 5.4. Correlated conversions and optical purities of (*R*)-80 at different reaction times using the ISPR setup.



Scheme 5.6. Chemoenzymatic synthesis of (*R*)-pantolactone ((*R*)-80) without purification of intermediates.

In order to further enhance the overall process efficiency, the ISPR-setting was coupled to a support- and derivatization-free recycling of the enzyme using a molecular weight cut-off membrane (MWCO). By means of this setting, the biocatalyst was successfully recycled over five consecutive reactions without any loss in selectivity or enzyme activity, lowering the applied alcohol dehydrogenase activity down to 2 U/mmol (*R*)-**86** (Figure 5.5).

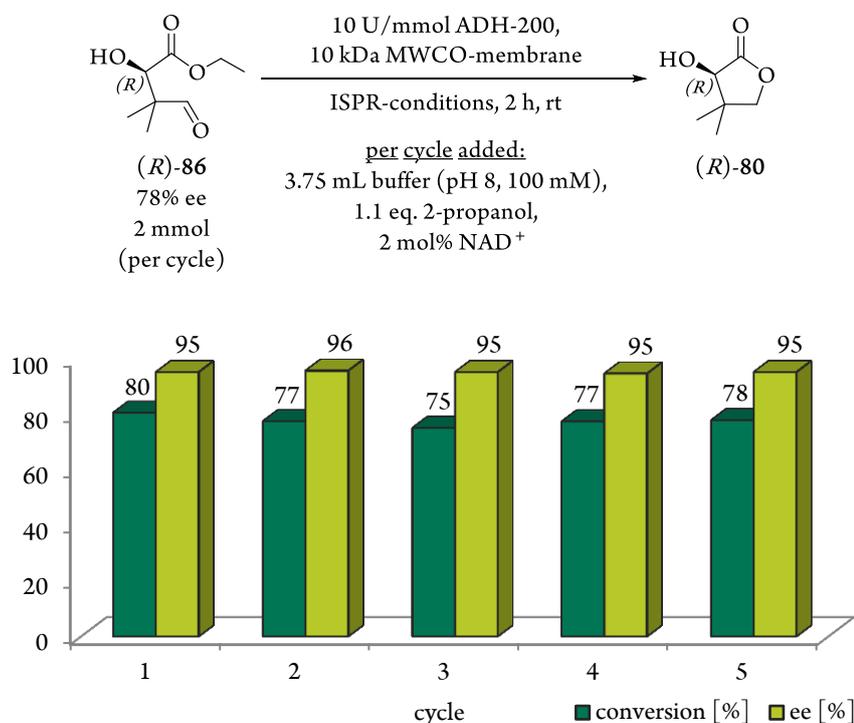


Figure 5.5. Recycling experiments for the synthesis of (*R*)-pantolactone ((*R*)-**80**).

The chemoenzymatic process for the synthesis of (*R*)-pantolactone ((*R*)-**80**) established in this work can be seen as a valuable alternative to the industrial method in many respects: It is less time consuming and does not contain any harmful or toxic reagents. Besides, nearly all criteria with regard to a “Green Synthesis” are fulfilled: No chiral templates or protective groups have to be applied, the stereocenter is build up during the process and not *via* chiral resolution, all steps are catalytic and conducted at room temperature or simply under slight cooling while all solvents are either tolerable and uncritical (toluene) or favoured (water, acetone, methanol, 2-propanol).^[130]

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind kommerziell erhältlich und wurden von abcr GmbH & Co. KG, Acros Organics (Thermo Fisher Scientific), AppliChem GmbH, Carl Roth, Fluka (Sigma-Aldrich) oder TCI Europe N. V. bezogen. Sofern nicht anders angegeben werden alle Reagenzien und Lösungsmittel ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Isobutyraldehyd (**73**) wird ausschließlich nach destillativer Aufreinigung bei Atmosphärendruck (Badtemp.: 75°C, Kopftemp.: 64°C) verwendet. Das Aldolprodukt **86** wird in einer Mindestreinheit von 95% verwendet. Die Überprüfung der Reinheit erfolgt hierbei per ¹H-NMR-Analytik. Sofern der Mindestreinheitswert unterschritten wird erfolgt die Aufreinigung destillativ bei 0.2 mbar (Badtemp.: 95°C, Kopftemp.: 73°C). Die Verunreinigung des verwendeten 3-Chlorbenzaldehyds (**13**) durch 3-Chlorbenzoesäure (**67**) wird stichprobenartig vor der Verwendung des Aldehyds mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Werden hierbei mehr als 5% Säure detektiert, so wird der Aldehyd destillativ bei 0.5 mbar aufgereinigt (Badtemp.: 65°C, Kopftemp.: 46°C). Größere Mengen des Prolinamidkatalysators (*S,S*)-**27** wurden von der Arbeitsgruppe BERKESSEL (Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt. Das analoge Phenylderivat (*S,S*)-**43** wurde von RULLI synthetisiert und konnte im Zuge eines Kooperationsprojektes mit dem Arbeitskreis Hansen (University of Oslo, Norwegen) in der immobilisierten Form (*S,S*)-**11** erhalten werden. Beide Organokatalysatoren wurden freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten Pufferlösungen richten sich nach dem entsprechenden pH-Bereich. pH=3.8-4.6: Essigsäure/Acetatpuffer; pH 6.3-8.1: Kaliumdihydrogenphosphat/Kaliumhydroxid; pH 8.5-9.0: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)/Salzsäure; pH 9.6: Ethanolamin/Salzsäure.

Der Superabsorber Favor SXM9155[®] wurde als Hochschulspende von Evonik Industries AG zur Verfügung gestellt.

Biokatalysatoren und Coenzyme

Die verwendeten Alkoholdehydrogenasen aus *Lactobacillus kefir* (Lk-ADH) und *Rhodococcus* sp. (Rsp-ADH) wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Hummel (Universität Düsseldorf, Institut für molekulare Enzymtechnologie, Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt und als nicht weiter aufgereinigte Zellrohextrakte der Überexprimierung in *E. coli* verwendet.^[501] Die kommerziell erhältliche Alkoholdehydrogenase ADH-200 (Katalognummer 1.1.200, CAS: 9031-72-5) wurde von der evocatal GmbH bezogen.^[502] Die kommerziell erhältliche Glucosedehydrogenase (Bezeichnung: Amano 2) stammt von Amano Enzyme Inc.

Die Cofaktoren NAD(P)H und NAD(P)⁺ wurden von Oriental Yeast Co. Ltd. bezogen.

Chromatographie

Sämtliche säulenchromatographischen Aufreinigungen erfolgen auf Kieselgel (Merck Millipore Kieselgel 60) als stationäre Phase. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen werden mithilfe von Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator auf Aluminiumträgerfolie (F254) durchgeführt. Die Detektion erfolgt per Fluoreszenzlöschung unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm oder unter Zuhilfenahme einer Kaliumpermanganat-Tauchlösung (bestehend aus 3 g Kaliumpermanganat, 20 g Kaliumcarbonat, 5 ml 5% Natriumhydroxidlösung und 300 ml Wasser) unter nachfolgendem Erwärmen.

NMR-Spektroskopie

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen werden an einem 500-MHz-Multiresonanzspektrometer (Avance DRX 500) der Firma Bruker bei einer Messfrequenz von 500.05 MHz und Raumtemperatur aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ (angegeben in ppm) der ^1H -NMR und ^{13}C -NMR-Spektren werden auf Restwasserstoffsignale der verwendeten deuterierten Lösungsmittel referenziert (CDCl_3 $\delta = 7.26$ ppm (^1H), $\delta = 77.16$ ppm (^{13}C); Aceton- d_6 $\delta = 2.05$ ppm (^1H), $\delta = 29.84, 206.26$ ppm (^{13}C); CD_3OD $\delta = 3.31$ ppm (^1H), $\delta = 49.00$ ppm (^{13}C); D_2O $\delta = 4.79$ ppm (^1H)).^[503] Die Spinmultiplizitäten werden als br (broad), s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), dd (Dublettaufspaltung eines Dubletts oder Doppeldublett), dt (Dublettaufspaltung eines Triplets) oder m (Multiplet) angegeben.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Analytische HPLC-Messungen werden mithilfe der überkritischen (oder auch superkritischen) Flüssigkeitschromatographie (SF Chromatographie) mit folgendem Setup erhalten: Sampler/Injector AS-2059-SF Plus (Jasco), Rückdruckregulator BP-2080 Plus (Jasco), Detektor MD-2010 Plus (Jasco), Cryostat F250 (Julabo), Pumpeinheit PU-2080 Plus (Jasco), Entgaser DG-2080-53 (Jasco), net box LC-Net II/ADC (Jasco), Säulenofen CO-2060 Plus (Jasco). Das Laufmittel besteht aus einer Mischung von Kohlenstoffdioxid und entweder reinem Isopropanol oder einem Hexan/Isopropanolgemisch und wird softwaregesteuert vollautomatisch gemischt. Die verwendeten Lösungsmittel besitzen die größtmögliche Reinheit (*HPLC-grade solvent*).

Die Trennung erfolgt an Daicel Chiralpak® AD-H, OD-H oder OJ-H Säulen.

Da technisch bedingte Abweichungen der Retentionszeiten nicht ausgeschlossen werden können, werden die erhaltenen Signale bei signifikanten Abweichungen von $t_r > 2$ min durch kreuzweises Aufstocken der fraglichen Proben durch korrespondierende racemische Gemische oder entsprechenden Gegenenantiomeren-angereicherte Verbindungen verifiziert.

Kryostat

Alle Reaktionen, die nicht bei Raumtemperatur durchgeführt werden und einer externen Temperaturkontrolle bedürfen, werden in einer mit Isopropanol gefüllten Rührzelle mit Kühlmantel durchgeführt. Als Kryostat kommt der Refrigerated Circ Model 1166D von VWR zum Einsatz.

Elementaranalyse

Elementaranalytische Untersuchungen werden am Perkin-Elmer-240 Elementaranalysator durchgeführt.

Gaschromatographie

Quantitative gaschromatographische Messungen zur Umsatzbestimmung werden mit dem GC 2010 Plus (Autoinjector AOC-20i (Shimadzu), Autosampler AOC-20s (Shimadzu)) ausgestattet mit einer Rxi-5ms (Restek®) Säule (25 m Länge, Innendurchmesser 0.2 mm, Schichtdicke 0.33 μm) durchgeführt. Die Messung erfolgt isotherm bei 140°C und einer Dauer von 3 min. Sowohl der Splitinjector als auch der Flammenionisationsdetektor (FID) besitzen eine Temperatur von 230°C.

Analytische Messungen zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit werden mit dem GC 2010 (AOC-20i Autoinjector) unter Verwendung einer Rt- β DEXm (Restek®) Säule (30 m Länge, Innendurchmesser 0.25 mm, Schichtdicke 0.25 μm) bei folgendem Temperaturschema durchgeführt: 10 min bei 80°C, Heizrate: 10°C/min bis auf 120°C, 10 min bei 120°C halten.

UV/Vis-Spektroskopie

Für die photometrische Bestimmung der Enzymaktivität wird das Photometer V-630 von Jasco verwendet.

Rührzelle

Derivatisierungs- und trägerfreie Enzym-Recyclierungsversuche werden in einer 10 mL Rührzelle (Merck Millipore Amicon *stirred cell model* 8010) mithilfe von Ultrafiltrationseinsätzen (Merck Millipore Ultracel PL-10 *ultrafiltration discs*) mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa durchgeführt.

6.2 Allgemeine Methoden

Photometrische Bestimmung der Enzymaktivität bezüglich der Reduktion von Aldehyden und Ketonen

Die Enzymaktivität bezüglich der Reduktion wird spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm durch Messung des Verbrauchs von NAD(P)H durch Oxidation zu NAD(P)⁺ in Gegenwart des Aldehyds oder Ketons als Substrat bestimmt. Hierzu werden Stammlösungen der verschiedenen Substrate (jeweils 10 mM) und eine 12.5 mM NAD(P)H-Lösung in Phosphatpuffer (pH 7.0, 100 mM) hergestellt. Um die Hintergrundaktivität des Enzyms zu bestimmen wird zunächst eine Nullreferenz erstellt. Hierzu wird der nachfolgend beschriebene Photometertest ohne Substrat, das heißt nur mit Puffer, der Cofaktor- und der Enzymlösung, durchgeführt.

In eine 1 mL Messküvette werden 960 µL der entsprechenden Substratlösung und 20 µL der NAD(P)H-Lösung pipettiert. Liegt die gemessene Absorption der so hergestellten Lösung über 1, so wird die Cofaktorstammlösung so lange verdünnt, bis nach Durchmischen mit der Substratlösung eine Absorption kleiner 1 detektiert wird. Anschließend werden 20 µL einer Enzymlösung zugegeben und die Lösung gut durchmischt. Beträgt die Differenz zwischen der gemessenen Absorption vor und nach der Zugabe der Biokatalysatorlösung mehr als 0.05, so wird die Enzymlösung verdünnt (Verdünnungsfaktor *f*). Mit einer entsprechend verdünnten Enzymlösung wird die Kinetikmessung so schnell wie möglich gestartet. Das Messintervall beträgt in der Regel 2 min, wobei eine Datenpunktaufnahme alle 0.5 sec erfolgt.

Zur Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reduktion wird eine Regressionsgerade an den erhaltenen Graphen im Bereich von 0 sec < *t* < 45 sec angelegt. Liegt der Korrelationskoeffizient der Geraden unter 0.98, so wird die Enzymlösung weiter verdünnt und die Messung erneut gestartet. Alle Messungen werden mindestens in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Differenz zwischen der Steigung der Regressionsgeraden bei Vermessen der Nullreferenz und dem entsprechenden Wert, der mit Substrat gemessen wird, bezeichnet den Parameter $\Delta E_{340nm}/t$ in unten gezeigter Gleichung.

$$\frac{U}{mL} = \frac{\Delta E_{340nm} \cdot V_g \cdot f}{t \cdot V_p \cdot \epsilon_{NAD(P)H} \cdot d}$$

mit

<i>d</i> [cm]	Schichtdicke der Küvette
$\Delta E_{340nm}/t$	Abnahme der Absorptionskurve
$\epsilon_{NAD(P)H}$ [ml·µmol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	molarer Extinktionskoeffizient von NAD(P)H
<i>f</i>	Verdünnungsfaktor der Enzym-lösung
<i>U</i> /mL [µmol·min ⁻¹ ·mL ⁻¹]	Units pro Milliliter
<i>V_g</i>	Gesamtvolumen
<i>V_p</i>	Probenvolumen

Die so erhaltenen Werte werden als relative Aktivitäten auf die jeweiligen Standardsubstrate der vermessenen Alkoholdehydrogenasen referenziert.

Als Standardsubstrate werden Acetophenon (Lk-ADH), 4-Chloracetophenon (Rsp-ADH) und Acetessigester (ADH-200) verwendet. Alle in dieser Arbeit für Biotransformationen beschriebenen Enzymaktivitäten beziehen sich auf die jeweiligen Messwerte, die mit dem Standardsubstrat erhalten werden um auch bei der Umsetzung verschiedener Edukte einen gemeinsamen, internen Standard zu gewährleisten.

Reaktionsführung

Wenn nicht anders angegeben, werden alle Reaktionen in geschlossenen Reaktionsgefäßen durchgeführt. Reaktionen unter Aufrechterhaltung einer Argon-Schutzgasatmosphäre werden nach mindestens zweimaligem Austauschen des Gasraumes im Kolben durch das Schutzgas unter Aufsatz eines mit mindestens dem fünffachen Volumen des jeweils verwendeten Reaktionsgefäßes mit Argon befüllten Ballons durchgeführt.

Erstellen einer Kalibriergeraden zur quantitativen Umsatzbestimmung von Pantolacton **80** und Aldolprodukt **86** am Gaschromatographen

Für die Erstellung der Kalibriergeraden werden acht Proben unterschiedlicher Konzentrationen von Pantolacton und aufgereinigtem Aldolprodukt vermessen. Beide Stoffe werden hierbei jeweils zusammen in definierten Mengen in einen 100 mL Messkolben eingewogen und in Ethylacetat gelöst. Aus den acht Stammlösungen definierter Massenkonzentrationen werden jeweils sechs GC-Proben entnommen, um durch Mehrfachbestimmung abweichende, gerätebedingte Fehlwerte nivellieren zu können. Im Massenkonzentrationsbereich von 0.5 bis 5 mg/mL werden beide Stoffe bei der gewählten Messmethode (siehe Kapitel 6.1, Gaschromatographie) zu charakteristischen Retentionszeiten von $t_r=1.7$ min (**80**) und $t_r=2.4$ min (**86**) detektiert. Zur Erstellung der Kalibriergeraden werden die berechneten Flächenintegrale der detektierten Signale mit den eingestellten Massenkonzentrationen korreliert. Aus den einzelnen gemittelten Messwerten wird anschließend softwaregesteuert eine Regressionsgerade erstellt, welche in die Messmethode implementiert wird und bei Folgemessungen unbekannter Massenkonzentrationen diese auf Basis der detektierten Flächenintegrale berechnet.

Chirale GC-Messungen zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von Pantolacton **80**

Zur Quantifizierung der Selektivität der biokatalytischen Darstellung von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) wird ausschließlich säulenchromatographisch aufgereinigtes Material verwendet, da mit dem in dieser Arbeit verwendeten Analysesetup (siehe Kapitel 6.1, Gaschromatographie) keine Basislinientrennung der Signalsätze von Pantolacton **80** und dem Aldolprodukt **86** aus einem Rohproduktgemisch gewährleistet werden kann. Für die Bestimmung des ee-Wertes werden wenige Milligramm des Analyten in 1 bis 1.5 mL Ethylacetat gelöst und ein GC-Einspritzvolumen von 1 bis 5 μ L gewählt. Letzteres wird bei jeder Messung so gewählt, dass die erhaltenen Signale bei $t_r = 17.9$ min ((*S*)-**80**) und 18.2 min ((*R*)-**80**) basisliniengetrennt und mit möglichst hoher Intensität detektiert werden können (vergleiche hierzu auch Kapitel 3.3.1, Abbildung 3.8).

Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von (*R*)-86 per chiraler HPLC

Die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses des Aldolproduktes (*R*)-86 gelingt mit einer auf 20°C temperierten Chiralpak® OD-H Säule (Laufmittel CO₂:Hexan:Isopropanol 90:9:1 (V:V), flow 1.0 mL/min; Detektion bei 212 nm) sowohl mit der isolierten, aufgereinigten Verbindung als auch aus dem Rohproduktgemisch der AAR. Die Konzentration der Analyselösung in Hexan:Isopropanol 99:1 sowie das Einspritzvolumen (1 bis 20 µL) werden so angeglichen, dass möglichst hohe Signalintensitäten (bzw. hohe Signal/Rausch-Verhältnisse) erhalten werden. Als Retentionszeiten ergeben sich $t_r = 8.9$ min für (*S*)-86 und 9.7 min für (*R*)-86.

Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von (*R*)-12 per chiraler HPLC

Die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses des Aldolproduktes (*R*)-12 gelingt mit einer auf 40°C temperierten Chiralpak® AD-H Säule (Laufmittel CO₂:Isopropanol 95:5 (V:V), flow 1.8 mL/min, Detektion bei 220 nm) sowohl mit der isolierten, aufgereinigten Verbindung als auch aus dem Rohproduktgemisch der AAR. Für die Bestimmung des ee-Wertes werden wenige Milligramm des Analyten in 1 mL Hexan:Isopropanol 95:5 gelöst und ein Einspritzvolumen von 1 bis 5 µL gewählt. Das Einspritzvolumen wird dabei so gewählt, dass möglichst hohe Signalintensitäten (bzw. hohe Signal/Rausch-Verhältnisse) erhalten werden. Als Retentionszeiten ergeben sich $t_r = 20.1$ min für (*R*)-12 und 24.9 min für (*S*)-12.

Bestimmung des Enantiomerenüberschusses sowie des Diastereomerenverhältnisses von (*R*)-10 per chiraler HPLC

Die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses des Aldolproduktes (*R*)-12 gelingt mit einer auf 30°C temperierten Chiralpak® OJ-H Säule (Laufmittel CO₂:Isopropanol 97:3 (V:V), flow 1.0 mL/min, Detektion bei 220 nm) sowohl mit der isolierten, aufgereinigten Verbindung als auch aus dem Rohproduktgemisch der AAR. Für die Bestimmung des ee-Wertes werden wenige Milligramm des Analyten in 1 mL Hexan:Isopropanol 97:3 gelöst und ein Einspritzvolumen von 1 bis 5 µL gewählt. Das Einspritzvolumen wird dabei so gewählt, dass möglichst hohe Signalintensitäten (bzw. hohe Signal/Rausch-Verhältnisse) erhalten werden. Als Retentionszeiten ergeben sich $t_r = 44.9$ min ((*S,R*)-10), 45.3 min ((*S,S*)-10), 52.0 min ((*R,R*)-10) und 54.4 min ((*R,S*)-10).

AAuV1: Allgemeine Aufarbeitungsvorschrift 1

Es wird dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

AAuV2: Allgemeine Aufarbeitungsvorschrift 2

Das Reaktionsgemisch wird mit 10 mL Ethylacetat (EE) versetzt und das Reaktionsgefäß nacheinander mit je 20 mL ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und EE nachgespült. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit je 20 mL EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 10 mL ges. Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Trocknungsmittel wird abfiltriert, der Filterkuchen mit EE nachgewaschen und die org. Phase in einem 100 mL Maßkolben aufgefüllt.

AAuV3: Allgemeine Aufarbeitungsvorschrift 3

Bei Versuchen unter ISPR-Bedingungen wird die Druckluftzufuhr vor der Aufarbeitung gestoppt.

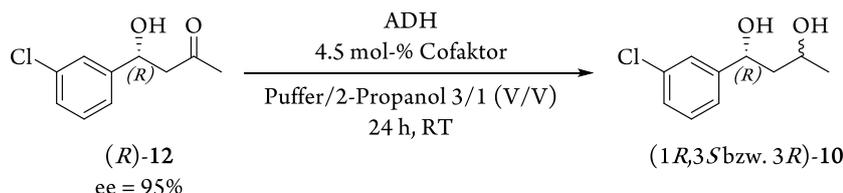
Das Reaktionsgemisch wird mit verdünnter Salzsäure auf $\text{pH} < 2$ gebracht, 15 Minuten bei Raumtemperatur weiter gerührt und mit 30 mL Ethylacetat (EE) extrahiert. Die Phasen werden per Zentrifugation (5 min bei 10000 rpm und 15 °C) getrennt, die wässrige Phase noch zwei Mal mit je 30 mL EE extrahiert und die vereinigten Phasen über einen Phasentrennfilter (MN 616 WA) in einen 100 mL Maßkolben filtriert.

6.3 Arbeitsvorschriften

6.3.1 Chemoenzymatische Synthese von 1,3-Diolen

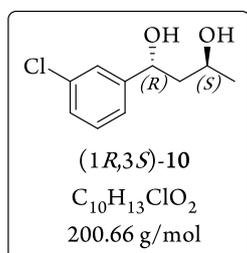
6.3.1.1 Diolsynthesen

6.3.1.1.1 AAV 1: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur enzymatische Reduktion des β -Hydroxyketons (*R*)-12 zu entsprechenden 1,3-Diolen 10



Zu einer Lösung aus 0.5 mmol Aldolprodukt (*R*)-12 in 7.5 mL Phosphatpuffer (100 mM, pH 7) und 2.5 mL Isopropanol werden 4.5 mol% NAD(P)⁺ und bei Verwendung der Alkoholdehydrogenase aus *L. kefir* 3 mg Magnesiumchlorid zugegeben. Unter leichtem Rühren werden 50 U/mmol RR-ADH oder 500 U/mmol LK-ADH hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 24h bei RT gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt gemäß AAuV1.

6.3.1.1.1.1 Darstellung von 1-(3-Chlorphenyl)butan-(1*R*,3*S*)-diol ((1*R*,3*S*)-10)



Die Darstellung erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (AAV1). In einem 10 mL Kolben werden 102.0 mg (0.5 mmol) (*R*)-12 (95% ee) vorgelegt und mit 7,5 mL Phosphatpuffer (100 mM, pH 7) sowie 2.5 mL Isopropanol versetzt. Unter leichtem Rühren werden 95 μ L (265 U/mL, 25 U, 50 U/mmol) RR-ADH und 14 mg (4.5 mol%) NAD⁺ zugegeben und das Reaktionsgemisch 24h bei RT gerührt.

Die Aufarbeitung erfolgt gemäß AAuV1. Analytische Daten werden wie in Kapitel 6.2 beschrieben erhalten.

Produktbezogener Umsatz: >95%

Enantiomerenüberschuss: > 99.5% ee

Diastereomerenverhältnis: dr > 35:1 (*anti:syn*)

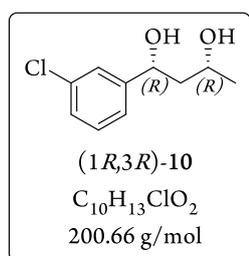
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.38 (s, 1H), 7.30 – 7.21 (m, 3H), 5.05 (dd, $J = 7.2, 3.9$ Hz, 1H), 4.13 – 4.04 (m, 1H), 3.26 – 3.09 (m, 1H), 2.06 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 1.95 – 1.81 (m, 2H), 1.26 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 146.79, 134.53, 129.85, 127.51, 125.95, 123.83, 71.39, 65.69, 45.95, 23.84.

HPLC (Chiralcel® OJ-H bei 30°C, CO₂:Isopropanol 97:3, flow 1.0 mL/min, 220 nm)
 t_r=45.3 min ((*S,S*)-**10**), 54.4 min ((*R,S*)-**10**).

Die analytischen Daten stimmen mit literaturbekannten Werten überein.^[61,65]

6.3.1.1.1.2 Darstellung von 1-(3-Chlorphenyl)butan-(1*R*,3*R*)-diol ((1*R*,3*R*)-**10**)



Die Darstellung erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (AAV1). In einem 10 mL Kolben werden 100.6 mg (0.5 mmol) (*R*)-**12** (95% ee) vorgelegt und mit 7,5 mL Phosphatpuffer (100 mM, pH 7) sowie 2.5 mL Isopropanol versetzt. Unter leichtem Rühren werden 250 µL (992 U/mL, 250 U, 500 U/mmol) LK-ADH und 17 mg (4.5 mol%) NADP⁺ zugegeben und das Reaktionsgemisch 24h bei RT gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt gemäß AAUV1. Analytische Daten werden wie in Kapitel 6.2 beschrieben erhalten.

Produktbezogener Umsatz: >95%

Enantiomerenüberschuss: > 99% ee

Diastereomerenverhältnis: dr > 35:1 (syn:anti)

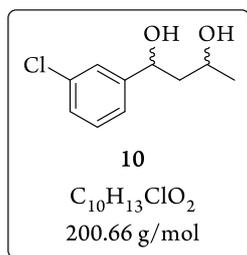
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.38 (s, 1H), 7.30 – 7.20 (m, 3H), 4.93 (dd, *J* = 9.9, 3.0 Hz, 1H), 4.16 (qd, *J* = 6.5, 3.6 Hz, 1H), 3.50 (s, 1H), 2.64 (s, 1H), 1.87 – 1.70 (m, 2H), 1.24 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 146.66, 134.53, 129.92, 127.79, 126.05, 123.92, 74.78, 69.16, 47.22, 24.52.

HPLC (Chiralcel® OJ-H bei 30°C, CO₂:Isopropanol 97:3, flow 1.0 mL/min, 220 nm)
 t_r=44.9 min ((*S,R*)-**10**), 52.0 min ((*R,R*)-**10**).

Die analytischen Daten stimmen mit literaturbekannten Werten überein.^[61,65]

6.3.1.1.2 AAV 2: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von *rac-syn*-**10** und *rac-anti*-**10** als Diastereomergemisch



In einen 50 mL Kolben werden 343 mg (8.5 mmol) Natriumhydroxid in 25 mL destilliertem Wasser gelöst. Es werden 0.74 mL (10 mmol, 2 Äq.) Aceton zugegeben und anschließend 703 mg (570 μ L, 5 mmol) *m*-Chlorbenzaldehyd über einen Zeitraum von 3 min langsam zu getropft. Das Reaktionsgemisch wird für 1.5 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird drei Mal mit je 30 mL Dichlormethan extrahiert,

die vereinigten organischen Phasen mit Wasser neutral gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Säule: \varnothing = 3 cm, Länge: 16 cm; Laufmittel: Cyclohexan:Ethylacetat 5:1 (V/V); R_f = 0.15 oder Chloroform:Aceton 9:1 (V/V); R_f = 0.2) als gelbes Öl erhaltene β -Hydroxyketon **12** (99 mg, 0.5 mmol) wird in 8 mL Methanol/1,4-Dioxan 1/2 (V/V) gelöst und portionsweise mit 190 mg (5 mmol, 10 Äq.) Natriumborhydrid versetzt und 24 h bei RT gerührt. Das viskose, blassgraue Reaktionsgemisch wird mit 2 mL Wasser hydrolysiert und 10 min bei 0°C gerührt. Es wird mit verdünnter Salzsäure neutralisiert, drei Mal mit je 10 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographischer an Kieselgel (Säule: \varnothing = 3 cm, Länge: 16 cm; Laufmittel: Cyclohexan:Ethylacetat 2:1 R_f = 0.15) aufgereinigt. Analytische Daten werden wie in Kapitel 6.2 beschrieben erhalten.

Das Gemisch aus *rac-syn*-**10** und *rac-anti*-**10** wird als farbloses Öl mit einem Diastereomerenverhältnis von 2:1 (*syn:anti*) erhalten. Das für die Etablierung der HPLC-Analytik verwendete Diastereomergemisch wurde in einem Verhältnis von 1:1.1 (*syn:anti*) eingesetzt.

Produktbezogener Umsatz: >95%

Enantiomerenüberschuss: < 1% ee

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.32 (s, 1H), 7.16-7.25 (m, 3H), 4.98 (m, 1H, H-C4-*anti*), 4.84-4.88 (dd, 1H, H-C4-*syn*, ³J = 9.3 Hz, ³J = 3.6 Hz), 3.98-4.15 (m, 2H, H-C2-*anti*, H-C2-*syn*), 3.58 (br s, 1H, OH4-*syn*), 3.28 (br s, 1H, OH4-*anti*), 2.75 (br s, 1H, OH2-*syn*), 2.20 (br s, 1H, OH2-*anti*), 1.66-1.87 (m, 2H), 1.17-1.21 (m, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃, *rac-syn*-**10**): δ (ppm) = 146.66, 134.53, 129.92, 127.79, 126.05, 123.92, 74.78, 69.16, 47.22, 24.52.

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃, *rac-anti*-**10**): δ (ppm) = 146.79, 134.53, 129.85, 127.51, 125.95, 123.83, 71.39, 65.69, 45.95, 23.84

HPLC (Chiralcel® OJ-H bei 30°C, CO₂:Isopropanol 97:3, flow 1.0 mL/min, 220 nm)
t_r=43.0 min ((*S,S*)-**10**), 44.8 min ((*S,R*)-**10**), 51.3 min ((*R,R*)-**10**), 55.2 min ((*R,S*)-**10**).

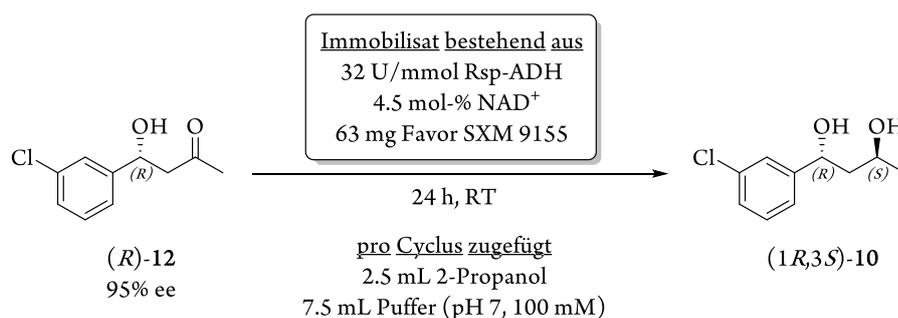
Die analytischen Daten stimmen mit literaturbekanntem Werten überein.^[61,65]

6.3.1.1.3 AAV 3: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Immobilisierung der Rsp-ADH an Superabsorber SXM 9155*

Zur Herstellung der immobilisierten RR-ADH werden 190 μL (50 U) des Enzymrohextraktes (265 U/mL) zusammen mit 15 mg (4.5 mol%) NAD^+ , gelöst in 180 μL Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM), auf 63 mg Favor SXM 9155* Superabsorber von Evonik Industries gegeben, mit 13 μL Isopropanol versetzt und die Suspension 10 min gerührt. Nachdem sich das Gemisch verfestigt hat werden 510 μL 2-Propanol zugegeben und für weitere 10 min gerührt. Das Hydrogel wird abgesaugt, mit 255 μL 2-Propanol gewaschen und 15 min am Luftstrom getrocknet.

Es werden 160 mg immobilisierte RR-ADH mit einem Restwassergehalt von 60 % (m/m) erhalten. Die literaturanaloge, photometrische Aktivitätsbestimmung ergibt einen Wert von 0.2 U/mg.^[249]

6.3.1.1.4 AAV 4: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von (1*R*,3*S*)-10 unter Verwendung der heterogenisierten Rsp-ADH im wässrigen Milieu



In einem 10 mL Kolben werden 80 mg (0.2 U/mg, 16 U, 32 U/mmol) des nach AAV 3 (Kapitel 6.3.1.1.3) hergestellten Immobilisat vorgelegt, mit 7.5 mL Puffer (Kaliumphosphat, pH 7, 100 mM) und 2.5 mL 2-Propanol sowie 100 mg (0.5 mmol) des Aldolproduktes (R)-12 versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT gerührt, über eine Glasfilterfritte abgesaugt und der Rückstand mit 256 μL 2-Propanol nachgewaschen. Das Filtrat wird gemäß AAUV1 aufgearbeitet. Analytische Daten werden wie in Kapitel 6.2 beschrieben erhalten.

In jedem folgenden Cyclus wird das rückgewonnene Immobilisat mit frischem Puffer, 2-Propanol und Edukt (R)-12 versetzt und die Suspension weitere 24 h bei RT gerührt. Die verwendeten Mengen entsprechen den oben genannten, die Isolierung des Diols (R,S)-10 wird analog durchgeführt.

Diastereomerenverhältnis (Cyclus 1 und 2): dr > 35:1 (*anti/syn*)

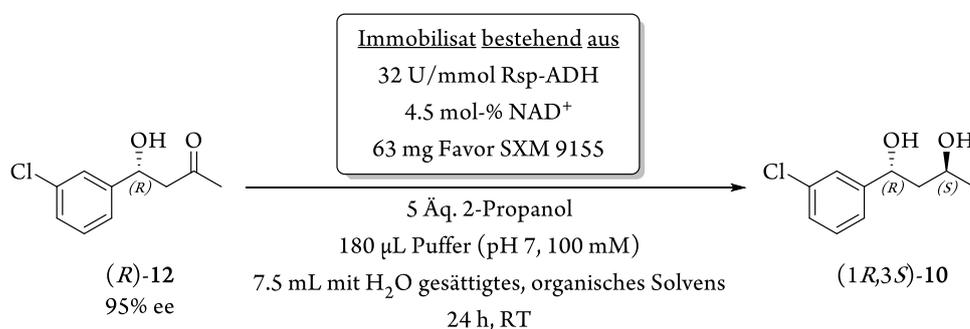
Enantiomerenüberschuss (Cyclus 1 und 2): > 99% ee

HPLC (OJ-H, CO_2 /*iso*-Propanol 97/3, v/v, flow 1,0 ml/min, 30 °C, 220 nm):
 t_r =44.6 min ((*S,S*)-10), 53.8 min ((*R,S*)-10).

Cyclus	Umsatz [%] ^{a)}	Wiederfindungsrate [%]	ee ((1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)- 10) [%]
1	> 95	> 95	> 99
2	40	90	> 99
3	0	89	n.b.

a) produktbezogener Umsatz, ermittelt per ¹H-NMR; n.b. = nicht bestimmt.

6.3.1.1.5 AAV 5: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von (1*R*,3*S*)-**10** unter Verwendung der heterogenisierten Rsp-ADH in organischen Solventien



In einem 10 mL Kolben werden 80 mg (0.2 U/mg, 16 U, 32 U/mmol) des nach AAV 3 (Kapitel 6.3.1.1.3) hergestellten Immobilisat vorgelegt, mit 7.5 mL Puffer (Kaliumphosphat, pH 7, 100 mM) und 2.5 mL 2-Propanol sowie 100 mg (0.5 mmol) des Aldolproduktes (*R*)-**12** versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT gerührt, der Lösungsüberstand abdekantiert und der Rückstand zwei Mal mit je wenigen Millilitern des entsprechenden Lösungsmittels nachgewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Analytische Daten werden wie in Kapitel 6.2 beschrieben erhalten.

In jedem folgenden Cyclus wird dem im Kolben verbleibenden Immobilisat frisches Lösungsmittel zugegeben, 2-Propanol und Substrat (*R*)-**12** zugefügt und die Suspension weitere 24 h bei RT gerührt. Die verwendeten Mengen entsprechen den oben genannten, die Isolierung des Diols (*R,S*)-**10** wird analog durchgeführt.

Die verwendeten Lösungsmittel sind in der nachfolgenden Tabelle gezeigt.

Diastereomerenverhältnis (bei allen Versuchen): dr > 35:1 (*anti/syn*)

Enantiomerenüberschuss (bei allen Versuchen): > 99% ee

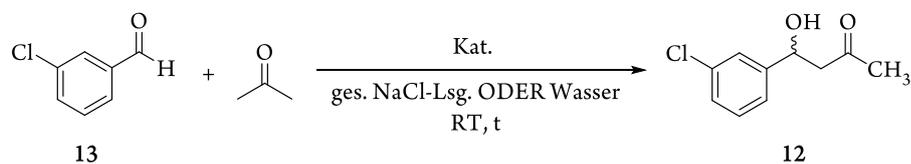
HPLC (OJ-H, CO₂/*iso*-Propanol 97/3, v/v, flow 1,0 ml/min, 30 °C, 220 nm):
 t_r=45.3 min ((*S,S*)-**10**), 54.4 min ((*R,S*)-**10**).

Lösungsmittel	Cyclus	Umsatz [%] ^{a)}	Wiederfindung [%]	ee (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)- 10 [%]
Isooktan	1	93	80	> 99
	2	91	72	> 99
	3	89	75	> 99
	4	83	72	> 99
Cyclohexan	1	89	> 95	> 99
	2	86	> 95	> 99
	3	85	> 95	> 99
	4	79	> 95	> 99
	5 ^{b)}	66	> 95	> 99
Chloroform	1	46	> 95	> 99
	2	24	> 95	> 99
	3	10 ^{c)}	> 95	> 99
Essigester	1	24	> 95	> 99
	2	16 ^{c)}	94	> 99

a) produktbezogener Umsatz, ermittelt per ¹H-NMR, b) der fünfte Cyclus wird nach der Zwischenlagerung des Immobilisates über 11 Tage bei 7 °C durchgeführt, c) nach diesem Cyclus wird die aktuelle Lösungsmittelreihe abgebrochen, da die Umsätze zu gering für eine effektive Prozessführung wären.

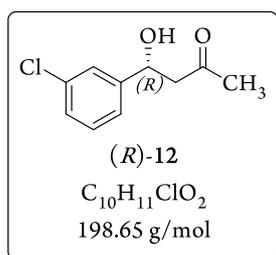
6.3.1.2 Aldolreaktionen

6.3.1.2.1 AAV 6: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese des β -Hydroxyketons **12**



Zu einer Mischung aus 10 mmol *m*-Chlorbenzaldehyd und 20 oder 90 mmol (2 oder 9 Äq.) Aceton werden Wasser oder ges. Natriumchloridlösung und 0.5 mol% Organokatalysator (*S,S*)-**27** oder 8.5 mmol Natriumhydroxid (85 mol%) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 1.5 oder 24 h bei RT gerührt und gemäß AAUV1 aufgearbeitet. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Säule: Ø = 3 cm, Länge: 16 cm; Laufmittel: Cyclohexan : Ethylacetat 5:1 oder Chloroform : Aceton 9:1 (V/V)). Analytische Daten werden wie in Kapitel 6.2 beschrieben erhalten.

6.3.1.2.1.1 Darstellung von (*R*)-12 mit (*S,S*)-27



Die Synthese von (*R*)-12 erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (AAV6). In einem 25 mL Kolben werden 1.41 g (10 mmol) *m*-Chlorbenzaldehyd mit 6.6 mL (90 mmol) Aceton und 6.6 mL dest. Wasser versetzt und 18.33 mg (0.05 mmol, 5 mol%) Singh-Katalysator (*S,S*)-27 zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT gerührt, filtriert und gemäß AAUV1 aufgearbeitet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Säule: Ø = 3 cm, Länge: 16 cm; Laufmittel: Cyclohexan:Ethylacetat 5:1 (V/V); R_f = 0.15 oder Chloroform:Aceton 9:1 (V/V); R_f = 0.2) wird (*R*)-12 als gelbes Öl erhalten. Analytische Daten werden wie in Kapitel 6.2 beschrieben erhalten.

Produktbezogener Umsatz: 82%

Ausbeute: 68%

Enantiomerenüberschuss: 95% ee

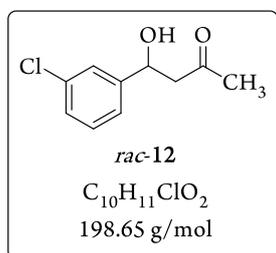
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 7.37 (s, 1H), 7.30 – 7.19 (m, 3H), 5.12 (dt, *J* = 7.8, 3.8 Hz, 1H), 3.40 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 2.89 – 2.80 (m, 2H), 2.20 (s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 208.86, 144.75, 134.46, 129.83, 127.77, 125.88, 123.76, 69.18, 51.75, 30.75.

HPLC (JASCO, AD-H, CO₂/*i*-PrOH 95/5, V/V, flow 1.8 ml/min, 40°C, 220 nm): t_r = 20.1 min ((*R*)-12), 24.9 min ((*S*)-12).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein. ^[61,65]

6.3.1.2.1.2 Darstellung von *rac*-12 mit Natriumhydroxid



Die Synthese von *rac*-12 erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (AAV6). In einen 50 mL Kolben werden 343 mg (8.5 mmol) Natriumhydroxid in 25 mL destilliertem Wasser gelöst. Es werden 0.74 mL (10 mmol, 2 Äq.) Aceton zugegeben und anschließend 703 mg (570 µL, 5 mmol) *m*-Chlorbenzaldehyd (13) über einen Zeitraum von 3 min langsam zu getropft. Das Reaktionsgemisch wird für 1.5 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird drei Mal mit je 30 mL Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser neutral gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das β-Hydroxyketon *rac*-12 wird nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Säule: Ø = 3 cm, Länge: 16 cm; Laufmittel: Cyclohexan:Ethylacetat 5:1 (V/V); R_f = 0.15 oder Chloroform:Aceton 9:1 (V/V); R_f = 0.2) als gelbes Öl erhalten. Analytische Daten werden wie in Kapitel 6.2 beschrieben erhalten.

Produktbezogener Umsatz: 30%

Ausbeute: 8%

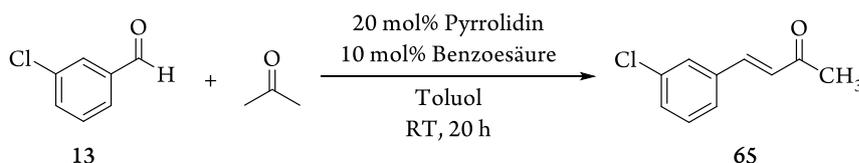
Enantiomerenüberschuss: <0.5% ee

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7.40 (s, 1H), 7.33 – 7.22 (m, 3H), 5.16 (dd, J = 8.0, 4.4 Hz, 1H), 3.42[#] (bs, 1H), 2.89 – 2.83 (m, 2H), 2.23 (s, 3H).

HPLC (JASCO, AD-H, $\text{CO}_2/i\text{-PrOH}$ 95/5, V/V, flow 1.8 ml/min, 40°C, 220 nm): t_r =23.1 min ((*R*)-**12**), 29.0 min ((*S*)-**12**); Chiralcel® OJ-H bei 30°C, CO_2 :Isopropanol 97:3, flow 1.0 mL/min, 220 nm: t_r =20.1 min ((*R*)-**12**), 24.9 min ((*S*)-**12**).

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein ^[65]

6.3.1.2.2 Synthese des Aldolkondensationsproduktes **65**



Zu einer Lösung aus 211 mg (170 μL , 1.5 mmol) 3-Chlorbenzaldehyd (**13**) und 550 μL (7.5 mmol, 5 Äq.) Aceton in 5 mL Toluol werden 26 μL (0.3 mmol, 20 mol%) Pyrrolidin gegeben und das Reaktionsgemisch 1 h bei RT gerührt. Es werden 18.3 mg (0.15 mmol, 10 mol%) Benzoesäure zugegeben und weitere 19 h bei RT gerührt. Das Gemisch wird mit 5 mL Dichlormethan verdünnt, mit 10 mL Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Säule: \varnothing = 3 cm, Länge: 18 cm; Laufmittel: Cyclohexan:Ethylacetat 5:1 (V/V); R_f = 0.35) aufgereinigt. Analytische Daten werden wie in Kapitel 6.2 beschrieben erhalten.

Produktbezogener Umsatz: 30%

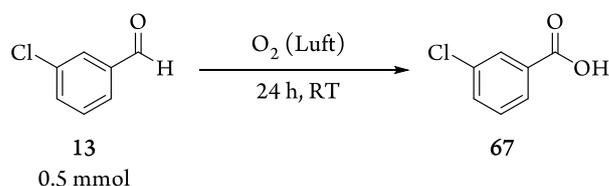
Ausbeute: 8%

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7.55 (t, J = 1.7 Hz, 1H), 7.50 – 7.33 (m, 4H), 6.73 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 2.40 (s, 3H).

HPLC (JASCO, AD-H, $\text{CO}_2/i\text{-PrOH}$ 95/5, V/V, flow 1.8 ml/min, 40°C, 220 nm): t_r =9.4 min.

Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein ^[65]

6.3.1.2.3 Partielle Oxidation von Aldehyd **13** zur qualitativen Identifizierung der Carbonsäure



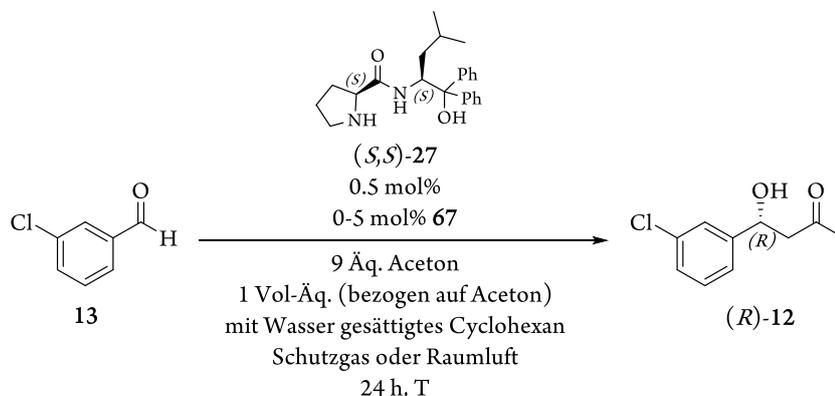
In einem Urglas wird 1 g (7 mmol) 3-Chlorbenzaldehyd (**13**) eingewogen und 24 h offen an der Luft stehen gelassen. Der restliche Aldehyd **13** wird bei 0.5 mbar und 65°C Badtemperatur (46°C Kopftemperatur) von der Carbonsäure **67** abdestilliert.

Produktbezogener Umsatz: 43%

Ausbeute: 43%

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.10 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.64 – 7.57 (m, 3H), 7.43 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H).

6.3.1.2.4 AAV 7: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von (*R*)-**12** in Cyclohexan

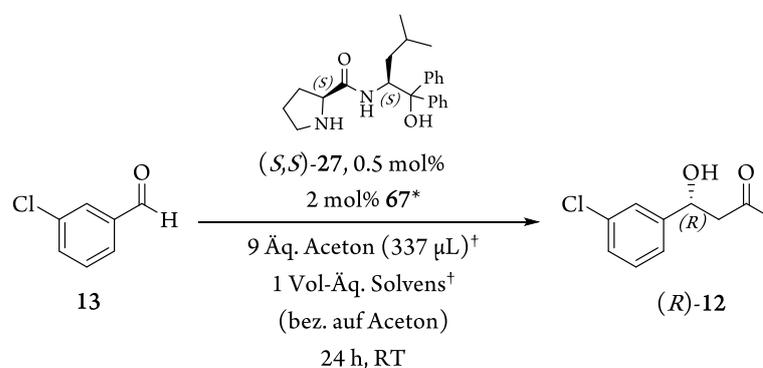


Im Reaktionsgefäß werden 71 mg (0.5 mmol) *m*-Chlorbenzaldehyd (**13**) vorgelegt und in 337 µL (4.5 mmol, 9 Äq.) Aceton und 337 µL (1 Vol-Äq. bezogen auf Aceton) mit Wasser gesättigtem Cyclohexan aufgenommen. Die Lösung wird auf die entsprechende Temperatur gebracht und anschließend 0.5 mol% des Prolinderivates (*S,S*)-**27** zugefügt. Optional erfolgt anschließend die Zugabe von 2-5 mol% *m*-Chlorbenzoesäure **67**. Bei Arbeiten unter Schutzgasatmosphäre wird die Gasphase im Gefäß zwei Mal mit Argon getauscht. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei der eingestellten Temperatur gerührt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die exakten Versuchsbedingungen können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Eintrag	67 [mol%]	T [°C]	U _{ges} ^{a)} [%]	U _{Pr} ^{b)} [%]	65 ^{c)} [%]	66 ^{d)} [%]	ee ((<i>R</i>)- 12) [%]
1 ^{e)}	-	rt	96	89	5	2	83
2 ^{e)}	-	10	98	92	3	3.5	92
3 ^{e)}	-	10	80	74	1.5	4.5	89
4 ^{f)}	-	5	77	71	0	6	93
5 ^{f)}	-	10	74	69	1	3.5	90
6 ^{f)}	5	10	94	83	7.5	3.5	93
7 ^{f)}	2	10	96.5	90	2.5	3.5	92
8 ^{f,g)}	2	RT	95	85.5	7	2.5	84
9 ^{f,g)}	2	10	98	91	3.5	3.5	93
10 ^{f,g)}	2	3	95	91	2	2	95.5

a) Gesamtumsatz bezogen auf den Verbrauch des Substrates **13**; b) Produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von (*R*)-**12**; c) Substanzbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung des Alkens **65**; d) Substanzbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung des Bis-Aldolproduktes; e) Verwendung einer bereits länger gelagerten Charge (C1) des Aldehyds **13** von ABCR f) Verwendung einer neuen Charge (C2) des Aldehyds **13** von TCI Europe; g) Aldehyd **13** aus Charge C2 wird vor der Umsetzung frisch destilliert.

6.3.1.2.5 AAV 8: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Untersuchung des Autoxidationseinflusses auf die Reaktionsdynamik der Aldolreaktion



*, wird optional zugegeben; †, optional entgast

Vorbereitung: Alle Solventien werden wie folgt entgast.

Natriumchloridlösung: Drei Intervalle à 10 min Unterdruck von 150 mbar im Ultraschallbad. Zwischen den Cyclen wird mit Argon belüftet.

Cyclohexan: Drei Intervalle à 10 min Unterdruck von 300 mbar im Ultraschallbad. Zwischen den Cyclen wird mit Argon belüftet.

Aceton: Drei Intervalle à 10 min Unterdruck von 750 mbar im Ultraschallbad.

Zwischen den Cyclen wird mit Argon belüftet.

m-Chlorbenzaldehyd wird frisch destilliert (0.5 mbar, 46°C Kopftemperatur, belüftet mit Argon).

Reaktionen unter Luftausschluss zur Vermeidung der Oxidation:

Unter Argon werden im Gegenstrom 71 mg (0.5 mmol) *m*-Chlorbenzaldehyd (**13**) im Reaktionsgefäß vorgelegt und in 337 μ L (4.5 mmol, 9 Äq.) entgastem Aceton und 337 μ L (1 Vol-Äq. bezogen auf Aceton) mit Wasser gesättigtem Cyclohexan oder gesättigter Natriumchloridlösung (jeweils entgast) aufgenommen. Dem Reaktionsgemisch werden 0.5 mol% des Prolinderivates (*S,S*)-**27** zugefügt. Optional erfolgt anschließend die Zugabe von 2 mol% *m*-Chlorbenzoesäure. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT unter Schutzgas gerührt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Reaktionen unter Luft zur Untersuchung des Säureeinflusses:

Die Reaktionsführung ist analog zu obigem Abschnitt. Die verwendeten Lösungsmittel sind nicht entgast, die Atmosphäre im Kolben ist Luft.

Die exakten Versuchsbedingungen können den nachfolgenden Tabellen entnommen werden.

Wässriges Lösungsmittelsystem

Eintrag	Zugabe von 67	Solvens entgast	U _{ges} ^{a)} [%]	U _{Pr} ^{b)} [%]	65 ^{c)} [%]	66 ^{d)} [%]	67 ^{e)} [%]	ee ((<i>R</i>)- 12) [%]
1 ^{f)}	×	✓	68	59	0	9.5	0	82.5
2	×	×	82	71.5	0.5	10	0.5	82
3 ^{f)}	✓	✓	91.5	83.5	4	2.5	1	93
4	✓	×	90	83	3	2.5	1	94

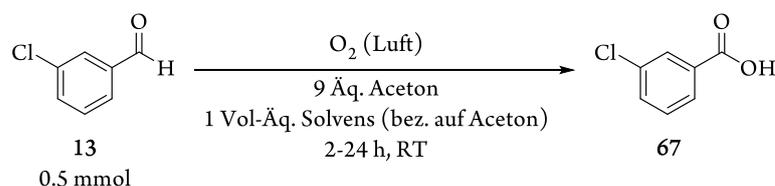
a) Gesamtumsatz bezogen auf den Verbrauch des Substrates **13**; b) produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von (*R*)-**12**; c) substanzbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung des Alkens **65**; d) substanzbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung des Bis-Aldolproduktes **66**; e) während der Reaktionsdauer durch Autoxidation erzeugter Anteil der Säure am Rohprodukt; f) Reaktion unter Schutzgas.

Verwendung von Cyclohexan

Eintrag	Zugabe von 67	Solvens entgast	U _{ges} ^{a)} [%]	U _{Pr} ^{b)} [%]	65 ^{c)} [%]	66 ^{d)} [%]	67 ^{e)} [%]	ee ((<i>R</i>)- 12) [%]
1 ^{f)}	×	✓	33	30	1	2.5	0	76.5
2	×	×	51	46	2	3	0.5	79.5
3 ^{f)}	✓	✓	93	84	6	2.5	1	83
4	✓	×	94	86	4	2.5	1	83

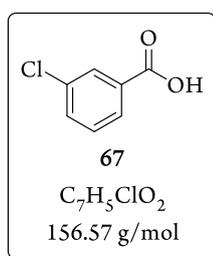
a) Gesamtumsatz bezogen auf den Verbrauch des Substrates **13**; b) produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von (*R*)-**12**; c) substanzbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung des Alkens **65**; d) substanzbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung des Bis-Aldolproduktes **66**; e) während der Reaktionsdauer durch Autoxidation erzeugter Anteil der Säure am Rohprodukt; f) Reaktion unter Schutzgas.

6.3.1.2.6 AAV 9: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Untersuchungen der Autoxidation des Aldehyds 13 in verschiedenen Solvenssystemen



Zu 70.3 mg (0.5 mmol) bei 0.5 mbar und 46°C Kopftemperatur frisch destillierten *m*-Chlorbenzaldehyds werden 4.5 mmol (9 Äq.) Aceton sowie 1 Vol-Äq. (bezogen auf Aceton) Cyclohexan oder gesättigte Natriumchloridlösung gegeben und das Reaktionsgemisch 2 bis 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Oxidationsfortschritt NMR-spektroskopisch untersucht.

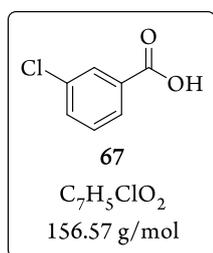
6.3.1.2.6.1 Verwendung von gesättigter Natriumchloridlösung



Zu 70.3 mg (0.5 mmol) bei 0.5 mbar und 46°C Kopftemperatur frisch destillierten *m*-Chlorbenzaldehyds werden 337 μL (4.5 mmol, 9 Äq.) Aceton sowie 337 μL (1 Vol-Äq. bezogen auf Aceton) gesättigte Natriumchloridlösung gegeben und das Reaktionsgemisch 2 bis 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Oxidationsfortschritt NMR-spektroskopisch untersucht.

Zeit [h]	0	2	4	6	8	24
Säure (67) [%]	0	23	24	38	38	40

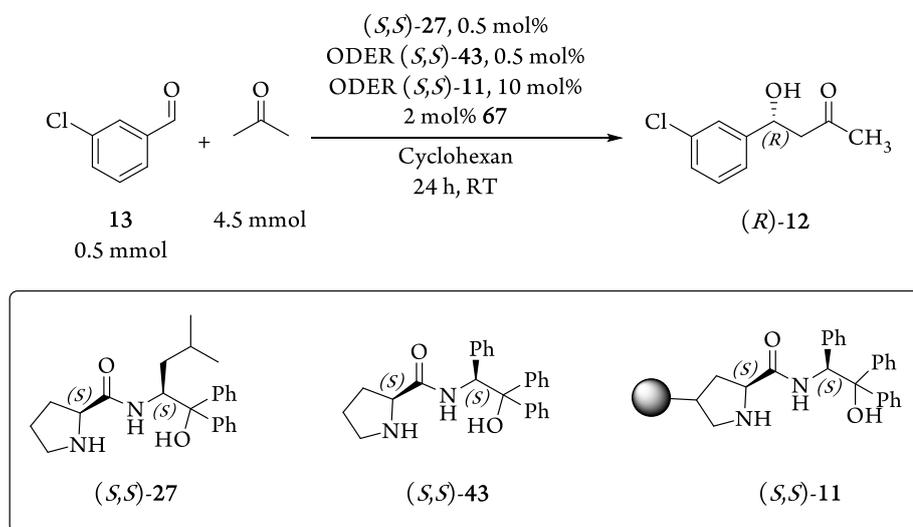
6.3.1.2.6.2 Verwendung von Cyclohexan



Zu 70.3 mg (0.5 mmol) bei 0.5 mbar und 46°C Kopftemperatur frisch destillierten *m*-Chlorbenzaldehyds werden 337 μL (4.5 mmol, 9 Äq.) Aceton sowie 337 μL (1 Vol-Äq. bezogen auf Aceton) gesättigte Natriumchloridlösung gegeben und das Reaktionsgemisch 2 bis 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Oxidationsfortschritt NMR-spektroskopisch untersucht.

Zeit [h]	0	2	4	6	8	24
Säure (67) [%]	0	2	6	7.5	12	13

6.3.1.2.7 AAV 9: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von (*R*)-12 mit verschiedenen Prolinamidkatalysatoren in Cyclohexan



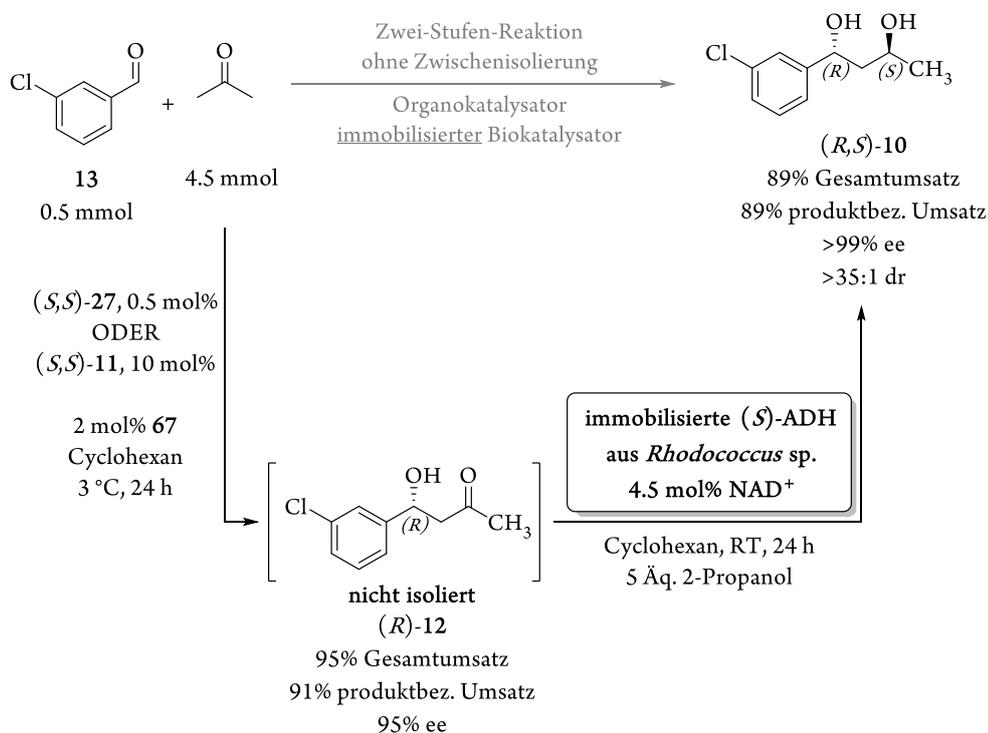
Im Reaktionsgefäß werden 71 mg (0.5 mmol) *m*-Chlorbenzaldehyd (**13**) vorgelegt und in 337 μ L (4.5 mmol, 9 Äq.) Aceton und 337 μ L (1 Vol-Äq. bezogen auf Aceton) mit Wasser gesättigtem Cyclohexan aufgenommen. Der Lösung werden 0.5 mol% des Prolinderivates (S,S) -27 oder (S,S) -43 bzw. 10 mol% des heterogenen Katalysators (S,S) -11 zugefügt sowie 2 mol% *m*-Chlorbenzoesäure (**67**) zugefügt. Die Gasphase im Gefäß wird zwei Mal mit Argon getauscht, das Reaktionsgemisch 24 h bei RT gerührt und das Lösungsmittel anschließend am Rotationsverdampfer entfernt.

Die exakten Versuchsbedingungen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Eintrag	Katalysator	U _{ges} ^{a)} [%]	U _{Pr} ^{b)} [%]	65 ^{c)} [%]	66 ^{d)} [%]	ee ((R) -12) [%]
1	(S,S) -27	95	85.5	7	2.5	84
2	(S,S) -43	94.5	89	2.5	1.5	89
3	(S,S) -11	96.5	85.5	7.5	1.5	84

a) Gesamtumsatz bezogen auf den Verbrauch des Substrates **13**; b) Produktbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung von (R) -12; c) Substanzbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung des Alkens **65**; d) Substanzbezogener Umsatz bezogen auf die Bildung des Bis-Aldolproduktes **66**.

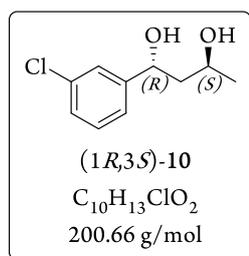
6.3.1.2.8 AAV 10: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur chemoenzymatischen Synthese des Diols (1*R*,3*S*)-10 unter Verwendung des ADH-Immobilisates



Ein Gemisch aus 0.5 mmol 3-Chlorbenzaldehyd (**13**), 0.5 mol% Katalysator (*S,S*)-**27** oder 10 mol% (*S,S*)-**43**, 2 mol% 3-Chlorbenzoesäure (**67**), 9 Äquivalenten (bezogen auf 3-Chlorbenzaldehyd (**13**)) Aceton und 1 Vol-Äquivalent (bezogen auf Aceton) mit Wasser gesättigtes Cyclohexan wird 24h bei 3 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 7.5 mL Cyclohexan aufgenommen.

Zu der Lösung werden 80 mg des nach AAV 3 (Kapitel 6.3.1.1.3) hergestellten Immobilisates und 190 µL Isopropanol gegeben und das Reaktionsgemisch 24 h bei RT gerührt. Die organische Phase wird abdekantiert, das Hydrogel mit 2 mL Cyclohexan nachgewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

6.3.1.2.8.1 Verwendung des freien Organokatalysators (*S,S*)-27



Ein Gemisch aus 70 mg (0.5 mmol) 3-Chlorbenzaldehyd (**13**), 1.5 mg (0.0025 mmol, 0.5 mol%) Katalysator (*S,S*)-**27**, 1.5 mg (0.01 mmol, 2 mol%) 3-Chlorbenzoesäure (**67**), 0.33 mL (4.5 mmol, 9 Äquivalente) Aceton und 0.33 mL (1 Vol-Äquivalent bezogen auf Aceton) mit Wasser gesättigtes Cyclohexan wird 24h bei 3 °C gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in

7.5 mL Cyclohexan aufgenommen.

Zu der Lösung werden 80 mg des nach AAV 3 (Kapitel 6.3.1.1.3) hergestellten Immobilisates (0.2 U/mg, 16 U, 33.5 U/mmol bei einem Umsatz von 95% zum Aldolprodukt **12**) und 190 µL (5 Äquivalente) Isopropanol gegeben und das Reaktionsge-

misch 24 h bei RT gerührt. Die organische Phase wird abdekantiert, das Hydrogel mit 2 mL Cyclohexan nachgewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Analytische Daten werden wie in Kapitel 6.2 beschrieben erhalten.

Als Nebenprodukt der enzymatischen Reduktion wird 3-Chlorbenzylalkohol mit ca. 5% Stoffmengenanteil erhalten ($^1\text{H-NMR}$ Signal bei 4.68 ppm).

Produktbezogener Umsatz ((1*R*,3*S*)-**10**): 89%

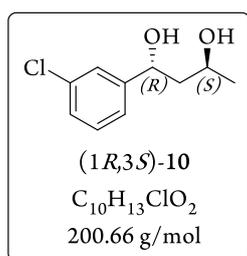
Gesamtumsatz (bezogen auf 3-Chlorbenzaldehyd (**13**)): 85%

Enantiomerenüberschuss ((1*R*,3*S*)-**10**): > 99.5% ee

Diastereomerenverhältnis: dr > 35:1 (*anti:syn*)

HPLC (Chiralcel® OJ-H bei 30°C, CO₂:Isopropanol 97:3, flow 1.0 mL/min, 220 nm): t_r =24.3 min ((*S*)-**12**), 26.1 min ((*R*)-**12**), 45.3 min ((*S,S*)-**10**), 54.5 min ((*R,S*)-**10**).

6.3.1.2.8.2 Verwendung des immobilisierten Organokatalysators (*S,S*)-**11**



Ein Gemisch aus 70 mg (0.5 mmol) 3-Chlorbenzaldehyd (**13**), 78.4 mg (0.05 mmol, 0.64 mmol (*S,S*)-**43**/g Polymerträger, 10 mol%) Katalysator (*S,S*)-**11**, 1.5 mg (2 mol%) 3-Chlorbenzoesäure, 0.33 mL (4.5 mmol, 9 Äquivalente) Aceton und 0.33 mL (1 Vol-Äquivalent bezogen auf Aceton) mit Wasser gesättigtes Cyclohexan wird 24h bei 3 °C gerührt. Der polymergebundene Katalysator (*S,S*)-**11** wird durch Filtration abgetrennt und das Polymer mit 2 mL Cyclohexan nachgewaschen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 7.5 mL Cyclohexan aufgenommen.

Zu der Lösung werden 80 mg des nach AAV 3 hergestellten Immobilisates (0.2 U/mg, 16 U, 33.5 U/mmol bei einem Umsatz von 95% zum Aldolprodukt (*R*)-**12**) und 190 µL (5 Äquivalente) Isopropanol gegeben und das Reaktionsgemisch 24 h bei RT gerührt. Die organische Phase wird abdekantiert, das Hydrogel mit 2 mL Cyclohexan nachgewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Analytische Daten werden wie in Kapitel 6.2 beschrieben erhalten.

Als Nebenprodukt der enzymatischen Reduktion wird 3-Chlorbenzylalkohol mit ca. 5% Stoffmengenanteil detektiert ($^1\text{H-NMR}$ Signal bei 4.68 ppm).

Produktbezogener Umsatz ((1*R*,3*S*)-**10**): 89%

Gesamtumsatz (bezogen auf 3-Chlorbenzaldehyd (**13**)): 85%

Enantiomerenüberschuss ((1*R*,3*S*)-**10**): > 99.5% ee

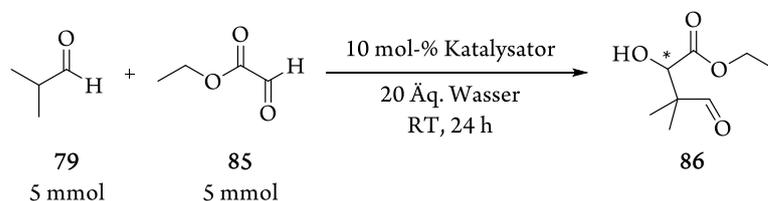
Diastereomerenverhältnis: dr > 35:1 (*anti:syn*)

HPLC (Chiralcel® OJ-H bei 30°C, CO₂:Isopropanol 97:3, flow 1.0 mL/min, 220 nm): t_r =24.6 min ((*S*)-**12**), 26.2 min ((*R*)-**12**), 44.7 min ((1*S*,3*S*)-**10**), 53.3 min ((1*R*,3*S*)-**10**).

6.3.2 Chemoenzymatische Synthese von (*R*)-Pantolacton

6.3.2.1 Aldolreaktionen

6.3.2.1.1 AAV 11: Allgemeine Arbeitsvorschrift zum Katalysatorscreening



Zu einem Zweiphasengemisch aus 990 μL (5 mmol) Ethylglyoxylat (50 % Lösung in Toluol) und einem Äquivalent Isobutyraldehyd (**79**, 5 mmol) werden 10 mol-% L-Aminosäure und 1.8 mL (100 mmol, 20 Äquivalente) Wasser gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 Stunden bei 20 bis 50 °C und 1200 rpm gerührt. Es wird mit gesättigter Ammoniumchloridlösung ausgeschüttelt und die wässrige Phase gemäß AAuV1 aufgearbeitet.

Die exakten Versuchsbedingungen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Eintrag	Katalysator ^{a)}	Umsatz [%] ^{b)}	ee (86) [%]
1	Prolin	0	n. b.
2	(<i>S,S</i>)- 27	0	n. b.
3	Histidin	25	37 (<i>R</i>)
4	Arginin	8	n. b.
5	Tryptophan	2	n. b.
6	Serin	0	n. b.
7	Asparaginsäure	0	n. b.
8	Phenylalanin	9	n. b.
9	Isoleucin	6	n. b.
10	Leucin	22	11 (<i>S</i>)
11	Valin	17	35 (<i>S</i>)
12	Methionin	18	12 (<i>S</i>)
13	Cystein	7	n. b.
14	Threonin	4	n. b.
15	Lysin	4	n. b.
16	Tyrosin	1	n. b.

a) Alle verwendeten Aminosäuren sind L-konfiguriert; b) produktbezogener Umsatz, per GC-Kalibriergeraden bestimmt; n. b. = nicht bestimmt.

6.3.2.1.2 Validierung der Aufarbeitung

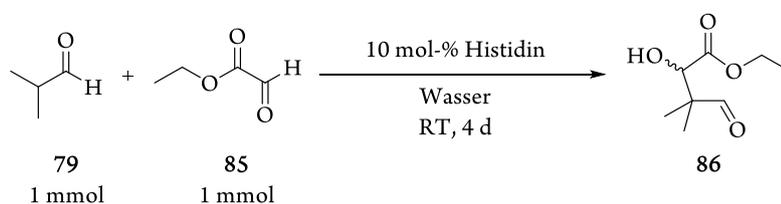
Es werden 100 mg (0.57 mmol) des Aldehyds (*R*)-**86** in 2 mL Toluol gelöst, mit 10 mL Dichlormethan (DCM) versetzt und mit 5 mL gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird zwei Mal mit je 10 mL DCM ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird fünf Minuten bei 40 °C am Rotationsverdampfervollvakuum (17 mbar) gehalten und die Auswaage bestimmt.

Auswaagen: 102 mg, 94 mg, 97 mg (Reinheit laut NMR in allen Fällen >95%)

In einem 10 mL Kolben werden 100 mg (0.57 mmol) des Aldehyds (*R*)-**86** in 30 mL Dichlormethan gelöst, 1 h bei RT gerührt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der so erhaltene, ölige Rückstand wird 1 h bei 40 °C am Rotationsverdampfervollvakuum (17 mbar) gehalten und die Auswaage bestimmt.

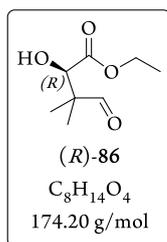
Auswaagen: 97 mg, 100 mg, 99 mg (Reinheit laut NMR in allen Fällen >95%)

6.3.2.1.3 AAV 12: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese des Aldolproduktes **86**



Zu einer Lösung aus 0.1 mmol Histidin in 3 mL Wasser werden je 1 mmol Isobutyraldehyd (**79**) und Ethylglyoxylat (50 % Lösung in Toluol) gegeben. Das zweiphasige Reaktionsgemisch wird vier Tage bei RT gerührt und durch Zugabe von Aceton gequenchet. Es wird mit Essigester extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

6.3.2.1.3.1 Synthese von (*R*)-**86**



Die Synthese erfolgt analog zu AAV12. Zu einer Lösung aus 155 mg (0.1 mmol; 0.1 Äq.) L-Histidin in 3 mL Wasser werden 0.9 mL (1 mmol; 1 Äq.) Isobutyraldehyd (**79**) und 2.0 mL (1 mmol; 1 Äq.) einer 50 %igen (w/w) Ethylglyoxylatlösung in Toluol gegeben. Das zweiphasige Reaktionsgemisch wird vier Tage bei RT gerührt, durch Zugabe von Aceton gequenchet und anschließend drei Mal mit je 5 mL Essigester extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und

das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Als Rohprodukt wurden 1.28 g gelbes Öl erhalten. Der Rückstand wird destillativ aufgereinigt bei 0.09 mbar und einer Kopftemperatur von 65 – 70 °C aufgereinigt. Analytische Daten werden wie in Kapitel 6.2 beschrieben erhalten.

Ausbeute: 60%

Enantiomerenüberschuss: 50% ee

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 9.57 (s, 1H), 4.33 (s, 1H), 4.31–4.18 (m, 2H), 3.05 (s, 1H)*, 1.27 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.06 (s, 3H).

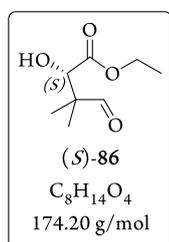
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 202.69, 172.81, 73.61, 62.23, 50.38, 18.18, 16.91, 14.10.

GC (Restek Rxi-5ms) *t*_r = 2.4 min.

HPLC (Chiralpak® OD-H bei 20°C, CO₂:Hexan:Isopropanol 90:9:1, flow 1.0 mL/min, 212 nm) *t*_r = 8.6 min ((*S*)-**86**), 9.1 min ((*R*)-**86**).

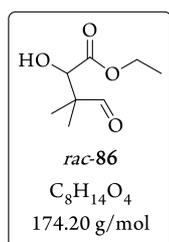
Die analytischen Daten stimmen mit literaturbekannten Werten überein.^[353]

6.3.2.1.3.2 Synthese von (*S*)-**86**



Die Synthese erfolgt analog zu AAV12. Zu einer Lösung aus 155 mg (0.1 mmol; 0.1 Äq.) D-Histidin in 3 mL Wasser werden 0.9 mL (1 mmol; 1 Äq.) Isobutyraldehyd (**79**) und 2.0 mL (1 mmol; 1 Äq.) einer 50 %igen (w/w) Ethylglyoxylatlösung in Toluol gegeben. Das zweiphasige Reaktionsgemisch wird vier Tage bei RT gerührt, durch Zugabe von Aceton gequench und anschließend drei Mal mit je 5 mL Essigester extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Als Rohprodukt wurden 1.22 g gelbes Öl erhalten. Der Rückstand wird destillativ aufgereinigt (0.09 mbar, 65 – 70 °C). (*S*)-**86** kann in einer Ausbeute von 61% mit 51% ee erhalten werden.

6.3.2.1.3.3 Synthese von *rac*-**86**



Die Synthese erfolgt analog zu AAV12. Zu einer Lösung aus 78 mg (0.05 mmol; 0.05 Äq.) D-Histidin und 78 mg (0.05 mmol; 0.05 Äq.) L-Histidin in 3 mL Wasser werden 0.9 mL (1 mmol; 1 Äq.) Isobutyraldehyd (**79**) und 2.0 mL (1 mmol; 1 Äq.) einer 50 %igen (w/w) Ethylglyoxylatlösung in Toluol gegeben. Das zweiphasige Reaktionsgemisch wird vier Tage bei RT gerührt, durch Zugabe von Aceton gequench und anschließend drei Mal mit je 5 mL Essigester extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Als Rohprodukt werden 1.25 g gelbes Öl erhalten.

* Wird teilweise als Dublett mit *J* = 5.8 Hz aufgelöst.

Eintrag	Wasser [Äq.]	Wasser [mL]	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((<i>R</i>)- 86)
1	0	0	2	n. b.
2	1.85	0.333	53	54
3	2.75	0.500	48	54
4	5.50	1.000	44	53
5	11.00	2.000	36	48
6	20.00	3.600	30	50
7	27.50	5.000	29	48
8	41.25	7.500	27	51
9	55.00	10.000	24	54

a) produktbezogener Umsatz, per GC-Kalibriergeraden bestimmt; n. b. = nicht bestimmt

6.3.2.1.5 Untersuchungen zur Retroaldolreaktion

In einem 10 mL Kolben werden 100 mg (0.57 mmol) des Aldehyds (*R*)-**86** mit einem Enantiomerenüberschuss von 78% in 200 µL Wasser suspendiert und das Gemisch mit 10 mol% racemischem Histidin versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT gerührt, drei Mal mit Dichlormethan extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses erfolgte anschließend mittels HPLC.

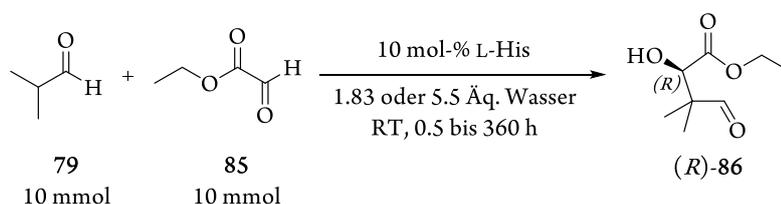
Enantiomerenüberschuss: 78% ee

HPLC (Chiralpak® OD-H bei 20°C, CO₂:Hexan:Isopropanol 90:9:1, flow 1.0 mL/min, 212 nm) t_r=8.6 min ((*S*)-**86**), 9.1 min ((*R*)-**86**).

In einem 10 mL Kolben werden 100 mg (0.57 mmol) des racemischen Aldehyds *rac*-**86** mit einem Enantiomerenüberschuss von 2% in 200 µL Wasser suspendiert und das Gemisch mit 10 mol% L-Histidin versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT gerührt, drei Mal mit Dichlormethan extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses erfolgte anschließend mittels HPLC.

Enantiomerenüberschuss: 3% ee

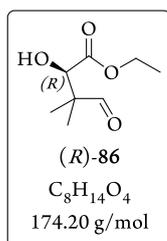
6.3.2.1.6 AAV 14: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur kinetischen Untersuchung der Aldolreaktion in Wasser



Zu einer Suspension aus Ethylglyoxylat, Isobutyraldehyd (**79**, 1 Äq.) und 10 mol% L-Histidin werden 333 μL oder 1 mL Wasser gegeben und das homogene Zweiphasengemisch 0.5 bis 360 h bei RT und 850 rpm gerührt.

Das Reaktionsgemisch wird nach der angegebenen Zeit wie in AAUV2 beschrieben aufgearbeitet. Gemäß Kapitel 6.2 wird der Umsatz mit Hilfe einer GC-Eichgeraden aus der Stammlösung, ee-Werte per HPLC bestimmt.

6.3.2.1.6.1 Kinetischen Untersuchung der Aldolreaktion in Wasser



In einem 10 mL Kolben werden 2.05 g (10 mmol) Ethylglyoxylatlösung in Toluol (50 Gew.-%), 721.1 mg Isobutyraldehyd (**79**, 10 mmol) und 155.15 mg (1 mmol) L-Histidin vorgelegt. Die Suspension wird mit 333 μL oder 1 mL Wasser versetzt und das homogene Zweiphasengemisch 0.5 bis 360 h bei RT und 850 rpm gerührt.

Das Reaktionsgemisch wird nach der in den nachfolgenden Tabellen angegebenen Zeiten wie in AAUV2 beschrieben aufgearbeitet. Gemäß Kapitel 6.2 wird der Umsatz mit Hilfe einer GC-Eichgeraden aus der Stammlösung, ee-Werte per HPLC bestimmt.

Die exakten Versuchsbedingungen können den folgenden Tabellen entnommen werden.

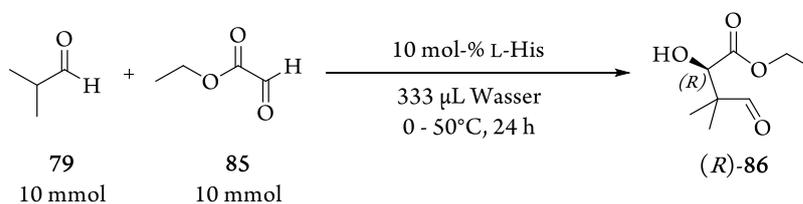
Eintrag	Wasser [Äq.]	Wasser [mL]	Zeit [h]	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((R)-86)
1	1.83	0.333	0.5	5	15
2	1.83	0.333	2	15	34
3	1.83	0.333	4	23	42
4	1.83	0.333	6	29	45
5	1.83	0.333	8	33	47
6	1.83	0.333	16	49	51
7	1.83	0.333	24	50	48
8	1.83	0.333	48	57	50
9	1.83	0.333	96	65	49
10	1.83	0.333	144	67	47

a) produktbezogener Umsatz, per GC-Kalibriergeraden bestimmt..

Eintrag	Wasser [Äq.]	Wasser [mL]	Zeit [h]	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((<i>R</i>)-86)
1	5.5	1	0.5	5	19
2	5.5	1	2	11	40
3	5.5	1	4	20	54
4	5.5	1	6	23	48
5	5.5	1	8	26	54
6	5.5	1	16	34	54
7	5.5	1	24	44	56
8	5.5	1	48	52	54
9	5.5	1	96	59	52
10	5.5	1	360	60	52

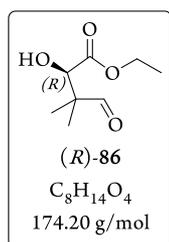
a) produktbezogener Umsatz, per GC-Kalibriergeraden bestimmt..

6.3.2.1.7 AAV 15: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese des Aldehyds (*R*)-86 bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen



Zu einer äquimolaren Mischung aus Isobutanal (**79**) und einer Ethylglyoxylatlösung in Toluol (50 Gew.-%) werden 10 mol% L-Histidin gegeben. Die Suspension wird mit 333 µL Wasser versetzt und das homogene Zweiphasengemisch 24h bei 0 bis 50°C und 850 rpm gerührt. Das Reaktionsgemisch wird wie in AAuV2 beschrieben aufgearbeitet. Gemäß Kapitel 6.2 wird der Umsatz mit Hilfe einer GC-Eichgeraden aus der Stammlösung, ee-Werte per HPLC bestimmt.

6.3.2.1.7.1 Darstellung des Aldehyds (*R*)-86 bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen



In einem 10 mL Kolben werden 2.05 g (10 mmol) Ethylglyoxylatlösung in Toluol (50 Gew.-%), 721.1 mg (10 mmol) Isobutanal (**79**) und 155.15 mg (1 mmol) L-Histidin vorgelegt. Die Suspension wird mit 333 µL Wasser versetzt und das homogene Zweiphasengemisch 24h bei 0 – 50 °C und 850 rpm gerührt. Das Reaktionsgemisch wird wie in AAuV2 beschrieben aufgearbeitet. Gemäß Kapitel 6.2 wird der Umsatz mit Hilfe einer GC-Eichgeraden aus der Stammlösung,

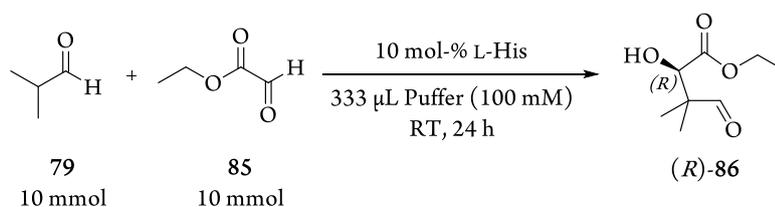
ee-Werte per HPLC bestimmt.

Die exakten Versuchsbedingungen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Eintrag	Temperatur [°C]	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((<i>R</i>)-86)
1	0	33	46
2	10	40	60
3	25	50	50
4	50	60	32

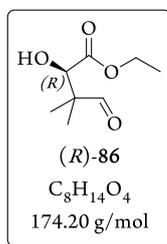
a) produktbezogener Umsatz, per GC-Kalibriergeraden bestimmt.

6.3.2.1.8 AAV 16: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese des Aldehyds (*R*)-86 bei verschiedenen pH-Werten



Zu einer Suspension aus Ethylglyoxylat, Isobutyraldehyd (**79**, 1 Äq.) und 10 mol% L-Histidin werden 333 µL Puffer (pH 2 bis 12) gegeben und das homogene Zweiphasengemisch 24 h bei RT und 850 rpm gerührt. Das Reaktionsgemisch wird wie in AAUV2 beschrieben aufgearbeitet. Gemäß Kapitel 6.2 wird der Umsatz mit Hilfe einer GC-Eichgeraden aus der Stammlösung, ee-Werte per HPLC bestimmt.

6.3.2.1.8.1 Darstellung des Aldehyds (*R*)-86 bei verschiedenen pH-Werten



In einem 10 mL Kolben werden 2.05 g (10 mmol) Ethylglyoxylatlösung in Toluol (50 Gew.-%), 721.1 mg (10 mmol) Isobutanal (**79**) und 155.15 mg (1 mmol) L-Histidin vorgelegt. Die Suspension wird mit 333 µL Puffer (pH 2 bis 12) versetzt und das homogene Zweiphasengemisch 24h bei RT und 850 rpm gerührt. Das Reaktionsgemisch wird wie in AAUV2 beschrieben aufgearbeitet. Gemäß Kapitel 6.2 wird der Umsatz mit Hilfe einer GC-Eichgeraden aus der

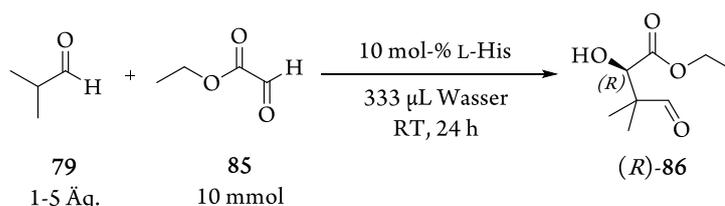
Stammlösung, ee-Werte per HPLC bestimmt.

Die exakten Versuchsbedingungen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Eintrag	pH	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((<i>R</i>)-86)
1	2.0	64	50 – 52
2	4.5	54	48 – 50
3	6.2	51	56 – 58
4	7.0	53	54 – 56
5	8.0	51	57 – 59
6	8.5	46	59 – 61
7	12.0	46	48 – 50

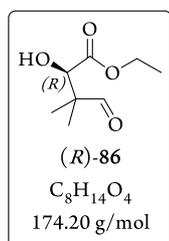
a) produktbezogener Umsatz, per GC-Kalibriergeraden bestimmt.

6.3.2.1.9 AAV 17: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese des Aldehyds (*R*)-86 unter Variation der Eduktstöchiometrie



Zu einer Suspension aus Ethylglyoxylat und 10 mol% L-Histidin werden 333 µL Wasser und 1 bis 5 Äquivalente Isobutyraldehyd (**79**) gegeben. Das homogene Zweiphasengemisch wird 24 h bei RT und 850 rpm gerührt. Das Reaktionsgemisch wird wie in AAV2 beschrieben aufgearbeitet. Gemäß Kapitel 6.2 wird der Umsatz mit Hilfe einer GC-Eichgeraden aus der Stammlösung, ee-Werte per HPLC bestimmt.

6.3.2.1.9.1 Darstellung des Aldehyds (*R*)-86 unter Variation der Eduktstöchiometrie



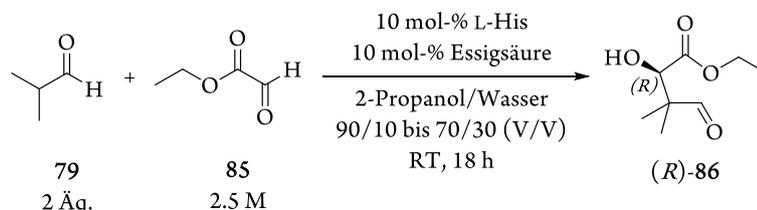
In einem 10 mL Kolben werden 2.05 g (10 mmol) Ethylglyoxylatlösung in Toluol (50 Gew.-%), 721-3605 mg Isobutyraldehyd (**79**, 10-50 mmol, 1-5 Äq.) und 155.15 mg (1 mmol, 10 mol% bezogen auf Ethylglyoxylat) L-Histidin vorgelegt. Die Suspension wird mit 333 µL Wasser versetzt und das homogene Zweiphasengemisch 24h bei RT und 850 rpm gerührt. Das Reaktionsgemisch wird wie in AAV2 beschrieben aufgearbeitet. Gemäß Kapitel 6.2 wird der Umsatz mit Hilfe einer GC-Eichgeraden aus der Stammlösung, ee-Werte per HPLC bestimmt.

Die exakten Versuchsbedingungen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Eintrag	Äq. Isobutanal (79)	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((<i>R</i>)- 86) [%]
1	1	53	56
2	2	62	65
3	3	64	66
4	4	65	67
5	5	68	67

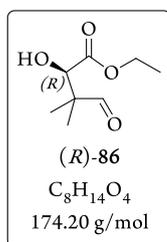
a) produktbezogener Umsatz, per GC-Kalibriergeraden bestimmt.

6.3.2.1.10 AAV 18: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese des Aldehyds (*R*)-**86** unter Verwendung eines Brønstedtsäureadditives in Kombination mit einem polar protischen Cosolvens



Zu einer Mischung aus Isobutanal (**79**, 2 Äq.) und Ethylglyoxylat (1 Äq.) in Toluol (50 Gew.-%) werden Gemische aus 2-Propanol und Wasser mit volumetrischen Zusammensetzungen zwischen 90/10 und 70/30 gegeben. Es werden 10 mol% L-Histidin und Essigsäure (bezogen auf die Unterschussedukt Komponente) zugesetzt und das homogenen Reaktionsgemisch 18 h bei RT und 850 rpm gerührt. Es wird wie in AAV2 beschrieben aufgearbeitet. Gemäß Kapitel 6.2 wird der Umsatz mit Hilfe einer GC-Eichgeraden aus der Stammlösung, ee-Werte per HPLC bestimmt.

6.3.2.1.10.1 Darstellung des Aldehyds (*R*)-**86** unter Verwendung eines Brønstedtsäureadditives in Kombination mit einem polar protischen Cosolvens

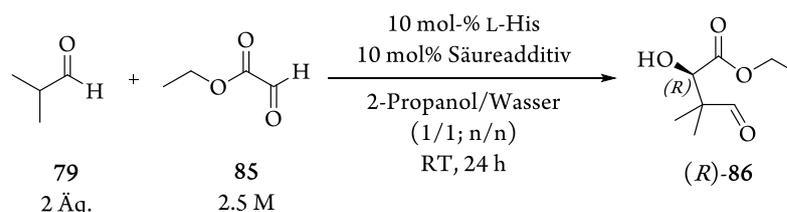


In einem 10 mL Kolben werden 1.02 g (5 mmol) Ethylglyoxylatlösung in Toluol (50 Gew.-%) und 0.9 mL (10 mmol, 2 Äq.) Isobutyraldehyd (**79**) in einem Gemisch aus 2-Propanol und Wasser mit volumetrischen Zusammensetzungen von 90/10 bis 70/30 gelöst. Das Reaktionsgemisch wird mit 77.6 mg (0.5 mmol, 10 mol%) L-Histidin und 30 mg (0.5 mmol, 10 mol%) Essigsäure versetzt und 18 h bei RT und 850 rpm gerührt. Es wird wie in AAV2 beschrieben aufgearbeitet. Gemäß Kapitel 6.2 wird der Umsatz mit Hilfe einer GC-Eichgeraden aus der Stammlösung, ee-Werte per HPLC bestimmt. Die exakten Versuchsbedingungen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Eintrag	2-Propanol/Wasser [V/V]	2-Propanol/Wasser [n/n]	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((<i>R</i>)- 86) [%]
1	90/10	2.1	50	67
2	87/13	1.6	63	64
3	85/15	1.3	75	70
4	83/17	1.2	75	71
5	80/20	1.0	73	71
6	75/25	0.7	69	70
7	70/30	0.6	58	63

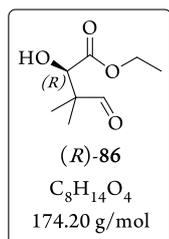
a) produktbezogener Umsatz, per GC-Kalibriergeraden bestimmt.

6.3.2.1.11 AAV 19: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese des Aldehyds (*R*)-**86** bei Verwendung verschiedener Cokatalysatoren



Zu einer Mischung aus Ethylglyoxylatlösung in Toluol (50 Gew.-%) und Isobutyraldehyd (**79**, 2 Äq.) in 1.6 mL 2-Propanol werden 0.4 mL (entspricht einem molaren Verhältnis von Isopropanol/Wasser von 1/1) einer 1.25 M Katalysatorlösung aus L-Histidin und Additiv zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird wie in AAUV2 beschrieben aufgearbeitet. Gemäß Kapitel 6.2 wird der Umsatz mit Hilfe einer GC-Eichgeraden aus der Stammlösung, ee-Werte per HPLC bestimmt.

6.3.2.1.11.1 Darstellung des Aldehyds (*R*)-**86** bei Verwendung verschiedener Cokatalysatoren



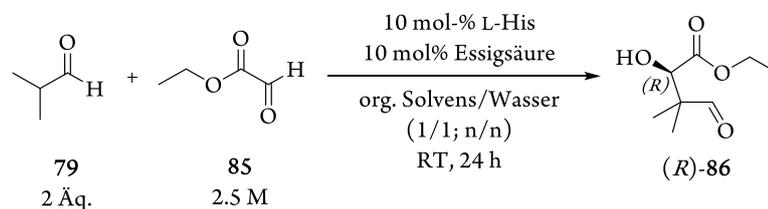
In einem 10 mL Kolben werden 1.02 g (5 mmol) Ethylglyoxylatlösung in Toluol (50 Gew.-%) und 0.9 mL (10 mmol, 2 Äq.) Isobutyraldehyd (**79**) in 1.6 mL 2-Propanol gelöst und 0.4 mL (entspricht einem molaren Verhältnis von Isopropanol/Wasser von 1/1) einer 1.25 M Katalysatorlösung aus L-Histidin (entspricht 10 mol% bezogen auf den Aldehydakzeptor) und Additiv (entspricht 10 mol% bezogen auf den Akzeptor, 1 Äq. bezogen auf Histidin) zugegeben.

Das Reaktionsgemisch wird wie in AAUV2 beschrieben aufgearbeitet. Gemäß Kapitel 6.2 wird der Umsatz mit Hilfe einer GC-Eichgeraden aus der Stammlösung, ee-Werte per HPLC bestimmt.

Eintrag	Cokatalysator	pK_a	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((<i>R</i>)- 86) [%]
1	---	---	73	71
2	DBN	0.90 (pK_B)	35	43
3	NaAc	9.25 (pK_B)	34	57
4	KAc	9.25 (pK_B)	38	59
5	Sc(OTf) ₃	4.96	32	23
6	TFA	0.26	65	65
7	Salicylsäure	2.75	74	72
8	Ameisensäure	3.77	84	67
9	L-Milchsäure	3.87	86	71
10	Benzoesäure	4.17	89	75
11	<i>m</i> -Toluylsäure	4.28	85	75
12	Zimtsäure	4.44	83	75
13	Essigsäure	4.76	78	75
14	Pivalinsäure	5.02	85	75
15	Laurinsäure	5.78	82	72
16	Harnsäure	5.82	74	74

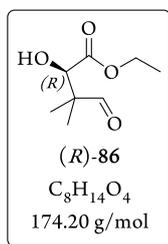
a) produktbezogener Umsatz, per GC-Kalibriergeraden bestimmt.

6.3.2.1.12 AAV 20: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese des Aldehyds (*R*)-**86** bei Verwendung verschiedener polarer, wassermischbarer, organischer Cosolventien



Zu einer 2/1 (n/n) Mischung aus Isobutanal (**79**) und einer Ethylglyoxylatlösung in Toluol (50 Gew.-%) werden 0.4 mL einer 1.25 M Katalysatorlösung aus L-Histidin und Essigsäure gegeben. Dem homogenen Zweiphasengemisch werden (auf Wasser bezogen) äquimolare Mengen polarer, organischer Cosolventien zugegeben und das Reaktionsgemisch 24h bei RT und 850 rpm gerührt. Es wird wie in AAV2 beschrieben aufgearbeitet. Gemäß Kapitel 6.2 wird der Umsatz mit Hilfe einer GC-Eichgeraden aus der Stammlösung, ee-Werte per HPLC bestimmt.

6.3.2.1.12.1 Darstellung des Aldehyds (*R*)-86 bei Verwendung verschiedener polarer, wassermischbarer, organischer Cosolventien



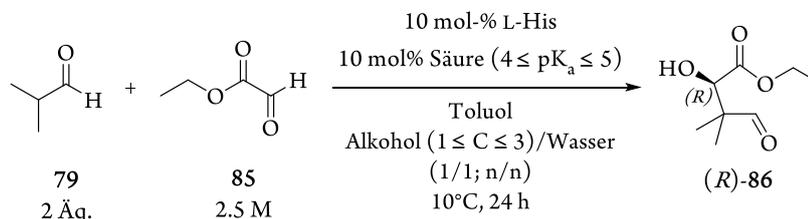
In einem 10 mL Kolben werden 1.02 g (5 mmol) Ethylglyoxylatlösung in Toluol (50 Gew.-%) und 0.9 mL (10 mmol, 2 Äq.) Isobutyraldehyd (**79**) in 20 mmol eines organischen Solvens' gelöst und 0.4 mL (entspricht 20 mmol Wasser) einer 1.25 M Katalysatorlösung aus L-Histidin und Essigsäure zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 850 rpm gerührt. Es wird wie in AAuV2 beschrieben aufgearbeitet. Gemäß Kapitel 6.2 wird der Umsatz mit

Hilfe einer GC-Eichgeraden aus der Stammlösung, ee-Werte per HPLC bestimmt. Die exakten Versuchsbedingungen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Eintrag	Cosolvens	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((<i>R</i>)-86) [%]
1	DMF	47	37
2	DMSO	17	2
3	MeOH	78	77
4	EtOH	88	75
5	Ethylenglykol	92	70
6	2-Propanol	78	75
7	Glycerin	85	60
8	<i>n</i> -BuOH	62	55
9	<i>i</i> -BuOH	55	53
10	Cyclohexanol	67	55

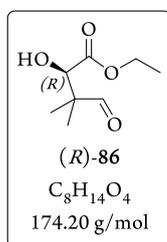
a) produktbezogener Umsatz, per GC-Kalibriergeraden bestimmt.

6.3.2.1.13 AAV 21: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese des Aldehyds (*R*)-86 unter Verwendung optimierter Reaktionsparameter



Zu einer 2/1 (n/n) Mischung aus Isobutanal (**79**) und einer Ethylglyoxylatlösung in Toluol (50 Gew.-%) werden 0.4 mL einer 1.25 M Katalysatorlösung aus L-Histidin und Essigsäure gegeben. Dem homogenen Zweiphasengemisch werden (auf Wasser bezogen) äquimolare Mengen eines monovalenten Alkohols der Kettenlänge kleiner oder gleich vier zugegeben und das Reaktionsgemisch 24 h bei 10 °C und 850 rpm gerührt. Es wird wie in AAV2 beschrieben aufgearbeitet. Gemäß Kapitel 6.2 wird der Umsatz mit Hilfe einer GC-Eichgeraden aus der Stammlösung, ee-Werte per HPLC bestimmt.

6.3.2.1.13.1 Darstellung von (*R*)-86 unter Verwendung optimierter Reaktionsparameter



In einem 10 mL Kolben werden 2.04 g (10 mmol) Ethylglyoxylatlösung in Toluol (50 Gew.-%) und 1.8 mL (20 mmol, 2 Äq.) Isobutyraldehyd (**79**) in 40 mmol Methanol oder Isopropanol gelöst und 0.8 mL (entspricht 40 mmol Wasser) einer 1.25 M Katalysatorlösung aus L-Histidin und Brønstedtsäureadditiv zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 850 rpm gerührt. Es wird wie in AAV2 beschrieben aufgearbeitet. Gemäß Kapitel 6.2 wird der Umsatz mit Hilfe einer GC-Eichgeraden aus der Stammlösung, ee-Werte per HPLC bestimmt.

Produktbezogener Umsatz (Methanol, Benzoessäure): 95%

Ausbeute (Methanol, Benzoessäure): 85 - 90%

Enantiomerenüberschuss (Methanol, Benzoessäure): 79% ee

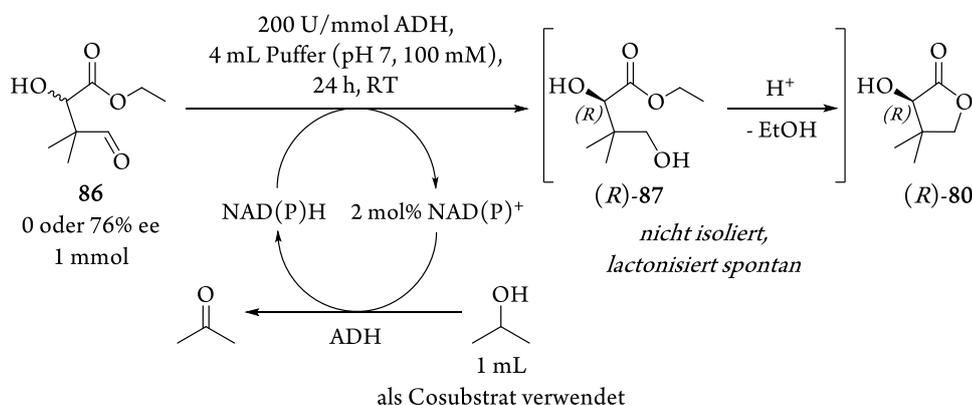
Produktbezogener Umsatz (Isopropanol, Essigsäure): 79%

Ausbeute (Isopropanol, Essigsäure): 70 - 74%

Enantiomerenüberschuss (Isopropanol, Essigsäure): 79% ee

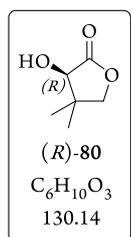
6.3.2.2 Biokatalytische Synthese von (*R*)-Pantolacton

6.3.2.2.1 AAV 22: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur biokatalytischen Umsetzung des Aldehyds **86** mit Alkoholdehydrogenasen



Zu einer Emulsion aus Aldehyd **86** in Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM) und 2-Propanol 4/1 (V/V) werden nacheinander 2 mol% NAD(P)⁺ und 200 U/mmol ADH hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 450 rpm gerührt. Es wird wie in AAuV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des Pantolactons (**80**) wird gemäß Kapitel 6.2 aus den Reinfractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt, der des Substrates per HPLC.

6.3.2.2.1.1 Biotransformation des Aldehyds **86** mit Alkoholdehydrogenasen



In einem 10 mL Kolben werden 175 mg (1 mmol) Aldehyd **86** in 4 mL Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM) und 1 mL 2-Propanol vorgelegt. Es werden nacheinander entweder 13 mg NAD⁺ oder 15 mg NADP⁺ (entspricht jeweils 2 mol%) und 200 U (200 U/mmol Substrat) ADH hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 450 rpm gerührt.

Es wird wie in AAuV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des Pantolactons (**80**) wird gemäß Kapitel 6.2 aus den Reinfractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt, der des Substrates per HPLC.

Die exakten Versuchsbedingungen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Eintrag	ee (86) [%]	ADH	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((<i>R</i>)- 80) [%] ^{b)}
1	0	Lk	< 5	n. b.
2	0	Rsp	36	36
3	0	ADH-200	51	40
4	76	Rsp	35	90
5	76	ADH-200	70	90

a) produktbezogener Umsatz, per GC-Kalibriergeraden bestimmt; b) nach säulenchromatographischer Aufreinigung, n. b. = nicht bestimmt.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 4.11 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 4.03 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 2.50 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 1.24 (s, 3H), 1.08 (s, 3H).

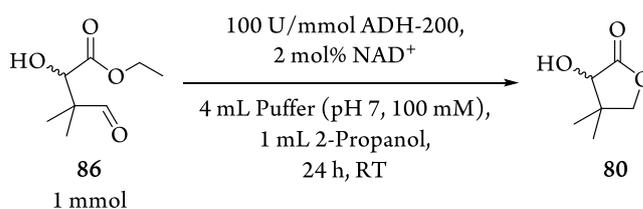
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 177.82, 76.56, 75.86, 41.00, 23.02, 18.94.

GC (Restek Rxi-5ms) *t*_r=1.7 min; (Restek Rt-βDEXm) *t*_r=17.9 min ((*S*)-**80**), 18.2 min ((*R*)-**80**).

Elementaranalyse: C₆H₁₀O₃; Berechnet: C 55.37%, H 7.74%; Gefunden: C 55.56%, H 7.75%.

Die analytischen Daten stimmen mit literaturbekannten Werten überein.^[353]

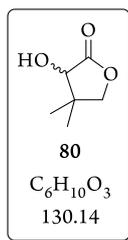
6.3.2.2 AAV 23: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Untersuchung der Selektivität der verwendeten evo-1.1.200 ADH



Aldehyd **86** wird in Puffer (pH 7, 100 mM)/2-Propanol 4/1 (V/V) vorgelegt und 2 mol% Cofaktor sowie 100 U/mmol evo-1.1.200 ADH zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 450 rpm gerührt.

Es wird wie in AAV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des Pantolactons (**80**) wird gemäß Kapitel 6.2 aus den Reifractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

6.3.2.2.1 Untersuchung der Selektivität der verwendeten evo-1.1.200 ADH



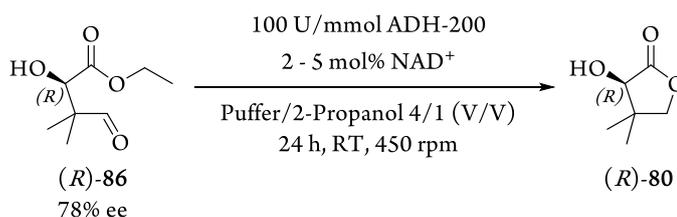
In einem 10 mL Kolben werden 175 mg (1 mmol) Aldehyd **86** in 4 mL Puffer (pH 7, 100 mM) und 1 mL 2-Propanol vorgelegt und 13 mg (2 mol%) NAD⁺ sowie 14 mg (7 U/mg, 100 U, 100 U/mmol) evo-1.1.200 ADH zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 450 rpm gerührt.

Es wird wie in AAUV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des Pantolactons (**80**) wird gemäß Kapitel 6.2 aus den Reinfractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

Die exakten Versuchsbedingungen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Eintrag	ee (86) [%]	Umsatz [%] ^{a)}	Stoffmengenverlust [%]	ee (80) [%] ^{b)}
1	74 (<i>S</i>)	18	36	40 (<i>S</i>)
2	0 (rac)	27	44	54 (<i>R</i>)
3	78 (<i>R</i>)	49	44	93 (<i>R</i>)

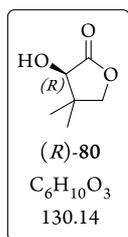
a) produktbezogener Umsatz, per GC-Kalibriergeraden bestimmt; b) nach säulenchromatographischer Aufreinigung.

6.3.2.2.3 AAV 24: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) unter Verwendung unterschiedlicher Cofaktormengen

Zu einer Emulsion aus Aldehyd (*R*)-**86** in Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM) und 2-Propanol 4/1 (V/V) werden nacheinander 2 bis 5 mol% NAD⁺ und 100 U/mmol ADH hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 450 rpm gerührt.

Es wird wie in AAUV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-**80**) wird aus den Reinfractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

6.3.2.2.3.1 Darstellung von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-80) unter Verwendung unterschiedlicher Cofaktormengen



Zu einer Emulsion aus 175 mg (1 mmol) Aldehyd (*R*)-86 in 5 mL Kaliumphosphatpuffer (pH 7, 100 mM)/2-Propanol 4/1 (V/V) werden nacheinander 13 bis 33 mg (2 bis 5 mol%) NAD⁺ und 14 mg (7 U/mg, 100 U, 100 U/mmol) evo-1.1.200 ADH hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 450 rpm gerührt.

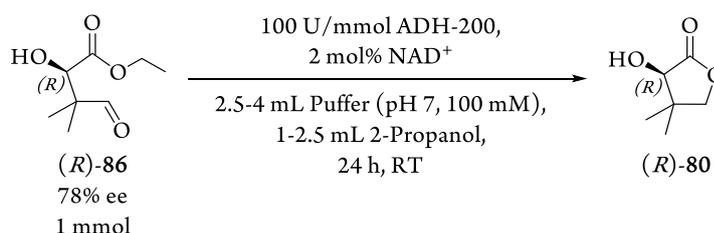
Es wird wie in AAUV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-80) wird aus den Reifractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

Die exakten Versuchsbedingungen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Eintrag	Cofactor [mol%]	Umsatz [%] ^{a)}	Stoffmengenverlust [%]	ee ((<i>R</i>)-80) [%] ^{b)}
1	2	49	44	93
2	5	71	22	93

a) Produktbezogener Umsatz, ermittelt per GC-Kalibriergeraden; b) nach säulenchromatographischer Aufreinigung.

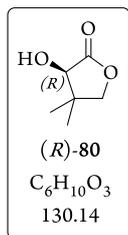
6.3.2.2.4 AAV 25: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-80) unter Verwendung verschiedener Lösungsmittelzusammensetzungen



Zu einer Emulsion aus Aldehyd (*R*)-86 in Puffer (pH 7, 100 mM)/2-Propanol 4/1 bis 1/1 (V/V) werden 2 mol% NAD⁺ sowie 100 U/mmol evo-1.1.200 ADH gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 450 rpm gerührt.

Es wird wie in AAUV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-80) wird aus den Reifractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

6.3.2.2.4.1 Darstellung von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-80) unter Verwendung verschiedener Lösungsmittelzusammensetzungen



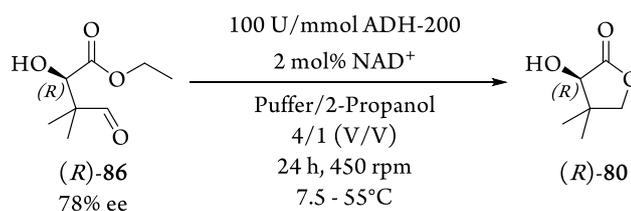
Zu einer Emulsion aus 175 mg (1 mmol) Aldehyd (*R*)-86 in 5 mL Puffer (pH 7, 100 mM)/2-Propanol 4/1 bis 1/1 (V/V) werden 13 mg (2 mol%) NAD⁺ sowie 14 mg (7 U/mg, 100 U, 100 U/mmol) evo-1.1.200 ADH gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 450 rpm gerührt. Es wird wie in AAUV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-80) wird aus den Reinfractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

Die exakten Versuchsbedingungen können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Eintrag	2-Propanol/Puffer [V/V]	Umsatz [%] ^{a)}	Stoffmengenverlust [%]	ee ((<i>R</i>)-80) [%] ^{b)}
1	20/80	49	44	93
2	25/75	69	20	95
3	50/50	54	29	96

a) produktbezogener Umsatz, per GC-Kalibriergeraden bestimmt; b) nach säulenchromatographischer Aufreinigung.

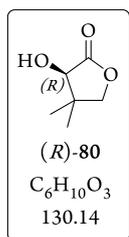
6.3.2.2.5 AAV 26: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-80) bei unterschiedlichen Temperaturen



Aldehyd (*R*)-86 wird in Puffer (pH 7, 100 mM)/2-Propanol 4/1 (V/V) vorgelegt und mit 2 mol% Cofaktor sowie 100 U/mmol evo-1.1.200 ADH versetzt. Die blassgelbe Emulsion wird 24 h bei 7.5 bis 55°C und 450 rpm gerührt.

Es wird wie in AAUV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-80) wird aus den Reinfractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

6.3.2.2.5.1 Darstellung von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-80) bei unterschiedlichen Temperaturen



Zu einer Emulsion aus 175 mg (1 mmol) Aldehyd (*R*)-86 in 5 mL Puffer (pH 7, 100 mM)/2-Propanol 4/1 (V/V) werden 13 mg (2 mol%) NAD⁺ sowie 14 mg (7 U/mg, 100 U, 100 U/mmol) evo-1.1.200 ADH gegeben. Die blassgelbe Emulsion wird 24 h bei 7.5 bis 55°C und 450 rpm gerührt.

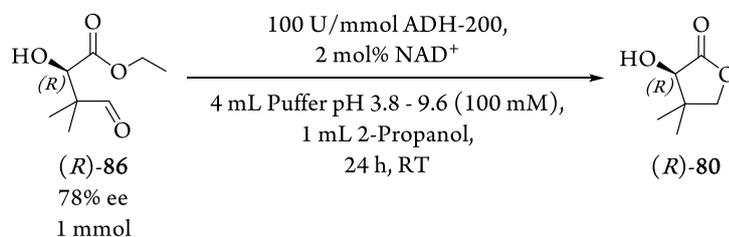
Es wird wie in AAUV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-80) wird aus den Reifractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

Die exakten Versuchsbedingungen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Eintrag	T [°C]	Umsatz [%] ^{a)}	Stoffmengenverlust [%]	ee ((<i>R</i>)-80) [%] ^{b)}
1	7.5	40	44	98
2	12.5	44	45	96
3	RT	69	20	95
4	35	72	23	89
5	45	77	20	88
6	55	54	42	n. b.

a) Produktbezogener Umsatz, ermittelt per GC-Kalibriergeraden; b) nach säulenchromatographischer Aufreinigung; n. b. = nicht bestimmt.

6.3.2.2.6 AAV 27 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-80) bei Variation des pH-Wertes

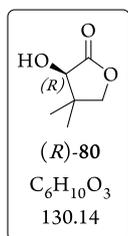


Aldehyd (*R*)-86 wird in Puffer (pH 3.8 bis 9.6, 100 mM)/2-Propanol 4/1 (V/V) vorgelegt und 2 mol% Cofaktor sowie 100 U/mmol evo-1.1.200 ADH zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 450 rpm gerührt.

Es wird wie in AAUV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am

Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-**80**) wird aus den Reinfractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

6.3.2.2.6.1 Darstellung von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) bei Variation des pH-Wertes



In einem 10 mL Kolben werden 175 mg (1 mmol) Aldehyd (*R*)-**86** in 4 mL Puffer (pH 3.8 bis 9.6, 100 mM) und 1 mL 2-Propanol vorgelegt. Es werden nacheinander 13 mg (2 mol%) NAD⁺ und 14 mg (7 U/mg, 100 U, 100 U/mmol Substrat) evo-1.1.200 ADH hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 450 rpm gerührt.

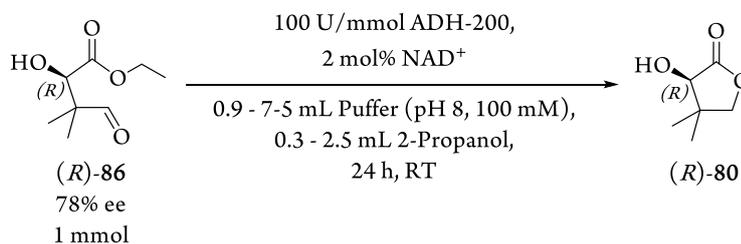
Es wird wie in AAuV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-**80**) wird aus den Reinfractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

Die exakten Versuchsbedingungen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Eintrag	Puffer pH	Umsatz [%] ^{a)}	Stoffmengenverlust [%]	ee ((<i>R</i>)- 80) [%] ^{b)}
1	3.8	11	24	n.b.
2	4.6	30	37	96
3	6.3	54	36	93
4	7.0	49	44	93
5	7.6	65	27	93
6	8.1	67	27	95
7	8.5	67	21	95
8	9.0	63	31	96
9	9.6	58	35	n.b.

a) Produktbezogener Umsatz, ermittelt per GC-Kalibriergeraden; b) nach säulenchromatographischer Aufreinigung; n. b. = nicht bestimmt.

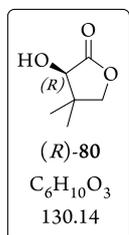
6.3.2.2.7 AAV 28: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-80) bei verschiedenen Substratkonzentrationen



Zu einer Emulsion aus Aldehyd (*R*)-86 in Puffer (pH 8, 100 mM)/2-Propanol 4/1 und 3/1 (V/V) werden 2 mol% NAD⁺ sowie 100 U/mmol evo-1.1.200 ADH gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 450 rpm gerührt.

Es wird wie in AAV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-80) wird aus den Reifractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

6.3.2.2.7.1 Darstellung von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-80) bei verschiedenen Substratkonzentrationen



In einem 10 mL Kolben werden 175 mg (1 mmol) Aldehyd (*R*)-86 in 0.9 bis 7.5 mL Puffer (pH 8.1, 100 mM) und 0.3 bis 2.5 mL 2-Propanol vorgelegt. Es werden nacheinander 13 mg (2 mol%) Cofaktor und 14 mg (7 U/mg, 100 U, 100 U/mmol) evo-1.1.200 ADH hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 450 rpm gerührt.

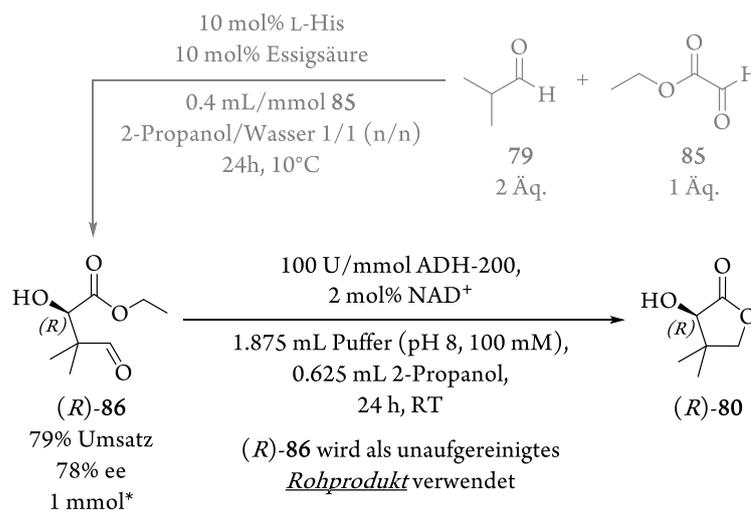
Es wird wie in AAV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-80) wird aus den Reifractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

Die exakten Versuchsbedingungen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Eintrag	V (Puffer) [mL]	V (2-Propanol) [mL]	c ((<i>R</i>)- 86) [mM]	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((<i>R</i>)- 80) [%] ^{b)}
1	7.500	2.500	100	55	94
2	4.000	1.000	200	67	95
3	3.000	1.000	250	69	95
4	1.875	0.625	400	69	95
5	0.938	0.313	800	71	96

a) produktbezogener Umsatz, per GC-Kalibriergeraden bestimmt; b) nach säulenchromatographischer Aufreinigung.

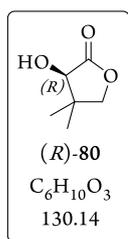
6.3.2.2.8 AAV 29: Allgemeine Arbeitsvorschrift zu Voruntersuchungen der chemoenzymatischen Synthese von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**): Einsatz von (*R*)-**86** als unaufgereinigtes Rohprodukt



Zu einer Emulsion aus Aldehyd (*R*)-**86**, entweder aufgereinigt oder als Rohprodukt, in Kaliumphosphatpuffer (pH 8, 100 mM) und 2-Propanol 3/1 (V/V) werden nacheinander 2 mol% NAD⁺ und 100 U/mmol evo-1.1.200 ADH hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 450 rpm gerührt.

Es wird wie in AAuV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-**80**) wird aus den Reinfractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

6.3.2.2.8.1 Einsatz von (*R*)-**86** als unaufgereinigtes Rohprodukt



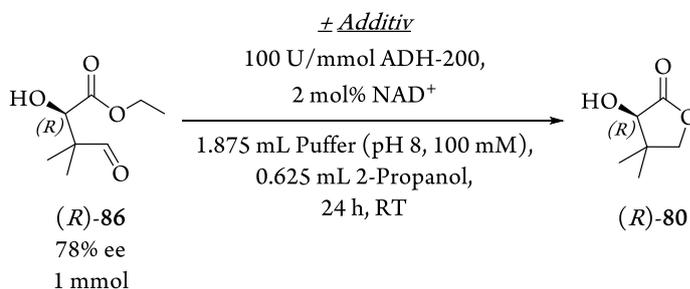
In einem 10 mL Kolben werden 175 mg (1 mmol) Aldehyd (*R*)-**86**, entweder aufgereinigt oder als Rohprodukt, in 1.875 mL Puffer (pH 8.1, 100 mM) und 0.625 mL 2-Propanol vorgelegt. Es werden nacheinander 13 mg (2 mol%) NAD⁺ und 14 mg (7 U/mg, 100 U, 100 U/mmol) evo-1.1.200 ADH hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 450 rpm gerührt.

Es wird wie in AAUV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-**80**) wird aus den Reifractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt. Die exakten Versuchsbedingungen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Eintrag	Versuchsbedingungen	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((<i>R</i>)- 80) [%] ^{b)}
1	Referenzversuch mit aufgereinigtem Aldolprodukt	69	95
2	unaufgereinigte Reaktionslösung der Aldolreaktion	33	n.b.
3	Extraktion, dann Abdestillieren der flüchtigen Bestandteile	64	96
4	Abdestillieren aller flüchtigen Bestandteile der Reaktionslösung	66	96

a) Produktbezogener Umsatz, ermittelt per GC-Kalibriergeraden; b) nach säulenchromatographischer Aufreinigung; n. b. = nicht bestimmt.

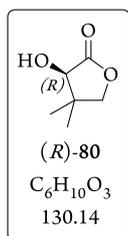
6.3.2.2.9 AAV 30: Allgemeine Arbeitsvorschrift zu Voruntersuchungen der chemoenzymatischen Synthese von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**): Zusatz von Additiven



Zu einer Emulsion aus Aldehyd (*R*)-**86** in Puffer (pH 8, 100 mM)/2-Propanol 3/1 (V/V) werden 2 mol% NAD⁺, 100 U/mmol evo-1.1.200 ADH und ein entsprechendes Additiv versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 450 rpm gerührt. Es wird wie in AAUV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am

Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-**80**) wird aus den Reinfractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

6.3.2.2.9.1 Synthese von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**): Einfluss von Additiven



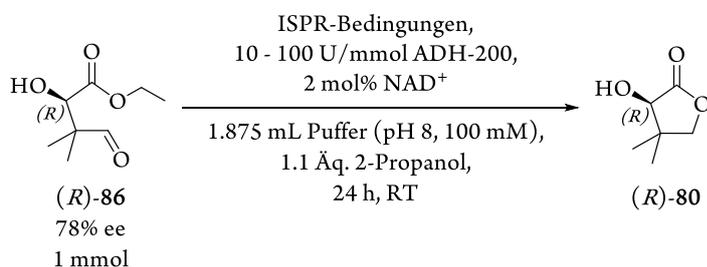
In einem 10 mL Kolben werden 175 mg (1 mmol) Aldehyd (*R*)-**86** in 1.875 mL Puffer (pH 8.1, 100 mM) und 0.625 mL 2-Propanol vorgelegt. Es werden nacheinander 13 mg (2 mol%) Cofaktor, das entsprechende Additiv und 14 mg (7 U/mg, 100 U, 100 U/mmol) evo-1.1.200 ADH hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 450 rpm gerührt.

Es wird wie in AAuV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-**80**) wird aus den Reinfractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt. Die exakten Versuchsbedingungen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Eintrag	Additiv	Umsatz [%] ^{a)}	ee ((<i>R</i>)- 80) [%] ^{b)}
1	--	69	95
2	10 bis 20 % (V/V) Toluol	63	95
3	10 mol% Essigsäure	67	95
4	10 mol% L-His	71	94
5	1 Äq. Isobutyraldehyd (79)	42	96
6	1 Äq. Aceton	48	97

a) Produktbezogener Umsatz, ermittelt per GC-Kalibriergeraden; b) nach säulenchromatographischer Aufreinigung.

6.3.2.2.10 AAV 31: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Anwendung des Stripping-Verfahrens für die biokatalytische Darstellung von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-80)



Zu einer Emulsion aus Aldehyd (*R*)-86 in Kaliumphosphatpuffer (pH 8, 100 mM) werden nacheinander 1.1 Äquivalente 2-Propanol, 2 mol% NAD⁺ und 100 U/mmol evo-1.1.200 ADH hinzugegeben. Ungereinigte Druckluft wird zuerst durch eine Waschflasche, gefüllt mit 5 %iger 2-Propanol Lösung in Wasser, und dann durch das Reaktionsgemisch geführt, um so das entstehende Aceton aus dem Gemisch zu entfernen (siehe Abbildung 6.1). Es wird 24 h bei RT und 450 rpm gerührt.

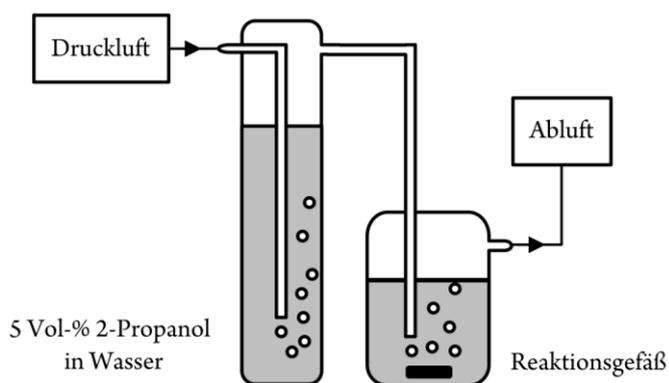
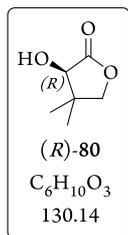


Abbildung 6.1. Schematische Darstellung einer Reaktion unter ISPR (*in situ* Produktentfernung)-Bedingungen.

Es wird wie in AAUV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-80) wird aus den Reinfractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

6.3.2.2.10.1 Anwendung des Stripping-Verfahrens für die biokatalytische Darstellung von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-80)



In einem 10 mL Kolben werden 175 mg (1 mmol) Aldehyd (*R*)-86 in 1.875 mL Puffer (pH 8.1, 100 mM) und 0.85 mL (1.1 Äquivalente) 2-Propanol vorgelegt. Es werden nacheinander 13 mg (2 mol%) NAD⁺ und 1 bis 10 mg (10 U/mg, 10 bis 100 U, 10 bis 100 U/mmol) evo-1.1.200 ADH hinzugegeben. Ungereinigte Druckluft wird zuerst durch eine Waschflasche, gefüllt mit 5 %iger 2-Propanol Lösung in Wasser, und dann durch das Reaktionsgemisch geführt, um so das entstehende Aceton aus dem Gemisch zu entfernen (siehe Abb. 16). Es wird 24 h bei RT und 450 rpm gerührt.

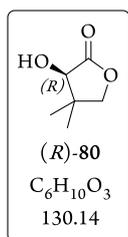
Es wird wie in AAUV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-80) wird aus den Reifractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

Die exakten Versuchsbedingungen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Eintrag	ADH-200 [U/mmol]	Umsatz [%] ^{a)}	ee (<i>R</i>)-80 [%] ^{b)}
1 ^{c)}	100	69	95
2 ^{c)}	50	52	n. b.
3	100	85	81
4	50	83	81
5	25	84	80
6	10	85	80

a) Produktbezogener Umsatz, ermittelt per GC-Kalibriergeraden; b) nach säulenchromatographischer Aufreinigung; n. b. = nicht bestimmt.

6.3.2.2.10.2 Anwendung des Stripping-Verfahrens für die biokatalytische Darstellung von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-80): Verkürzen der Reaktionszeit



In einem 10 mL Kolben werden 175 mg (1 mmol) Aldehyd (*R*)-86 in 1.875 mL Puffer (pH 8.1, 100 mM) und 0.85 mL (1.1 Äquivalente) 2-Propanol vorgelegt. Es werden nacheinander 2 mol% Cofaktor und 1 mg (10 U/mg, 10 U, 10 U/mmol) evo-1.1.200 ADH hinzugegeben. Ungereinigte Druckluft wird zuerst durch eine Waschflasche, gefüllt mit 5 %iger 2-Propanol Lösung in Wasser, und dann durch das Reaktionsgemisch geführt, um so das entstehende Aceton aus dem Gemisch zu entfernen. Es wird 0.5 bis 24 h bei RT und 450 rpm gerührt.

Es wird wie in AAUV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am

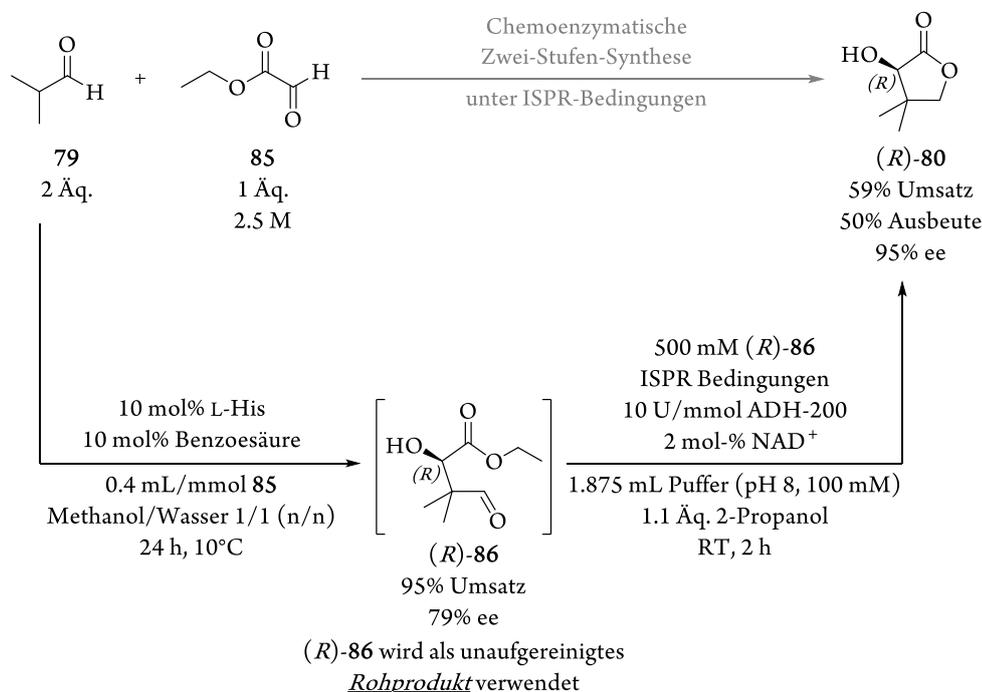
Essigsäure (jeweils 10 mol% bezogen auf den Akzeptor) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 850 rpm gerührt.

Alle flüchtigen Bestandteile des gelben Reaktionsgemisches werden am Rotationsverdampfer entfernt. Zu dem tiefgelben, flüssigen Rückstand hoher Viskosität werden nacheinander 85 μL (1.1 Äq.) 2-Propanol und 1.875 mL Kaliumphosphatpuffer (pH 8, 100 mM) gegeben. Es werden 11 mg (0.9 U/mg, 10 U, 10 U/mmol) ADH-200 zusammen mit 14 mg (2 mol%) NAD^+ als Feststoffe zugegeben und das Reaktionsgemisch unter ISPR-Bedingungen zwei Stunden bei RT und 450 rpm gerührt.

Es wird wie in AAUV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl_3 /Aceton 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-**80**) wird aus den Reinfractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

Bei einem Umsatz von 79% wird (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) mit einem Enantiomerenüberschuss von 95% erhalten. Die Ausbeute nach säulenchromatographischer Aufreinigung liegt bei 70%.

6.3.2.2.12 Chemoenzymatische Darstellung von (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) aus dem unaufgereinigten Rohprodukt (*R*)-**86** bei Einsatz von Benzoesäure als Kokatalysator und Methanol als Cosolvens der AAR



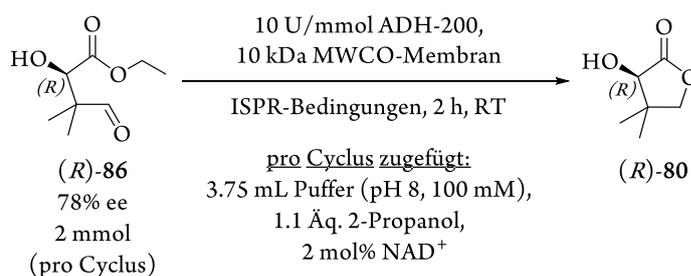
In einem 10 mL Kolben werden 219 mg (1.06 mmol) Ethylglyoxylatlösung in Toluol (50 Gew.-%) und 153 mg (2.12 mmol, 2 Äq.) Isobutyraldehyd (**79**) in 200 μL Methanol gelöst und 103 μL einer 1.25 M K L-Histidin-Lösung in Wasser sowie 13 mg Benzoesäure (jeweils 10 mol% bezogen auf den Akzeptor) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 24 h bei RT und 850 rpm gerührt.

Alle flüchtigen Bestandteile des gelben Reaktionsgemisches werden am Rotationsverdampfer entfernt. Zu dem tiefgelben, flüssigen Rückstand hoher Viskosität werden nacheinander 85 μL (1.1 Äq.) 2-Propanol und 1.875 mL Kaliumphosphatpuffer (pH 8, 100 mM) gegeben. Es werden 11 mg (0.9 U/mg, 10 U, 10 U/mmol) ADH-200 zusammen mit 14 mg (2 mol%) NAD^+ als Feststoffe zugegeben und das Reaktionsgemisch unter ISPR-Bedingungen zwei Stunden bei RT und 450 rpm gerührt.

Es wird wie in AAuV3 beschrieben aufgearbeitet. Der Umsatz wird mit Hilfe einer GC-Kalibriergeraden aus der Stammlösung ermittelt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL $\text{CHCl}_3/\text{Aceton}$ 9/1, 15 mL Fraktionsvolumen). Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-**80**) wird aus den Reifractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

Bei einem Umsatz von 59% wird (*R*)-Pantolacton ((*R*)-**80**) mit einem Enantiomerenüberschuss von 95% erhalten. Die Ausbeute nach säulenchromatographischer Aufreinigung liegt bei 75%.

6.3.2.2.13 Recycling des Biokatalysators



Zur Konditionierung der verwendeten 10 kDa Größenausschlussmembran (Ultracel®, Millipore, Amicon) wird eine 10 mL Rührzelle (Typ 8010, Millipore, Amicon) mit 8 mL Puffer (100 mM Kaliumphosphat, pH 8) gespült, anschließend 23 mg (0.9 U/mg, 20 U, 10 U/mmol) evo 1.1.200 gelöst in 4.7 mL desselben Puffers eingefüllt und durch die Membran filtriert.

Der Rückstand wird erneut in Puffer aufgenommen und zur Abtrennung von Zellreste erneut filtriert. Der Rückstand wird in 4.7 mL Puffer aufgenommen, pro Cyclus mit 350 mg (2 mmol) des Aldolproduktes (*R*)-**86** befüllt und mit 0.21 mL (1.4 Äq.) 2-Propanol und 13 mg (2 mol%) NAD^+ versetzt. Nach jedem Cyclus wird die Zelle durch Anlegen eines Argondrucks von 2.5 bar abgepumpt, wobei geringe Mengen des Reaktionsgemisches (entsprechend des Totvolumens des Ablaufschlauches) in der Zelle verbleiben. Nach Beendigung des fünften Cyclus wird der dem Totvolumen entsprechende Reaktionsmischungsrückstand im Ablaufschlauch abgepumpt und dieser wiederholt mit Puffer nachgespült. Das Filtrat jedes Cyclus und die abschließende Waschfraktion werden mit verdünnter Salzsäure auf $\text{pH} < 1$ gebracht, insgesamt drei Mal mit je 30 mL Essigester extrahiert und die Phasen mittels Zentrifugation (5 min, 10000 rpm, 15 °C).

Die in der Waschfraktion erhaltene Stoffmenge wird Cyclus 1 zugerechnet. Die Rückstände jedes einzelnen Cyclus' sowie die Waschfraktion werden individuell säulenchromatographisch (Säulendurchmesser 3.5 cm, 100 mL Kieselgel, 400 mL CHCl₃/Aceton 93/7, 15 mL Fraktionsvolumen) gereinigt. Der ee-Wert des (*R*)-Pantolactons ((*R*)-**80**) wird aus den Reinfractionen durch chirale Gaschromatographie bestimmt.

Die Ergebnisse der Einzelcyclen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Anmerkung: Die Berechnung der (*R*)-bezogenen Umsätze (Spalte 4, max. (*R*)-bezogener Umsatz in Spalte 5) ergibt sich aus dem ee-Wert des Eduktes (*R*)-**86**. Eingesetzt wird ein Enantiomerenverhältnis ((*R*)-**86**) von 89:11 ((*R*):(*S*)), entsprechend würde eine (*R*)-spezifische ADH zu einem maximalen Umsatz von 89% bei einem ee-Wert ((*R*)-**80**) von >99% führen. Korreliert wird im Folgenden der (*R*)-Enantiomerenabsolutwert des Lactons (*R*)-**80** mit dem Umsatz ((*R*)-**80** / 100 * Umsatz, Spalte 4) und dem bei Spezifität vorliegenden Maximalumsatz von 89% (Spalte 5).

Cyclus	Umsatz [%] ^[a]	ee (<i>R</i>)-74 [%]	Umsatz (<i>R</i>)- 80 [%]	Umsatz (<i>R</i>)- 80 / max. Umsatz (<i>R</i>) [%]
1 ^[b]	80	95	78	88
2	77	95.5	76	85
3 ^[c]	75	95	73	82
4	77	94.5	75	84
5	78	95	76	85

a) produktbezogener Umsatz, ermittelt per GC-Kalibriergeraden, b) Cyclus 1 plus Spülcyclus, c) Verlust von einem Tropfen der Reaktionsmischung

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1. Einsatzgebiete technischer Enzyme nach Industriezweigen. ^[10]	2
Abbildung 1.2. Beispiele für Produkte, die auf Enzymbasis wirken (1. Reihe links: Oropon, Beizmittel mit Proteasen; 1. Reihe mittig: Burnus, das erste Waschmittel mit Proteasen; 2. Reihe mittig: Diabetes Blutmessgerät mit Glucoseoxidaseteststreifen; 3. Reihe links: Chymosin enthaltende Labmischung für die Käseherstellung) bzw. bei deren Herstellung biokatalytische Schlüsselschritte implementiert sind (1. Reihe rechts: Penicillin; 2. Reihe links: Bier; 2. Reihe rechts: HFCS-haltiges Erfrischungsgetränk; 3. Reihe rechts: lactosefreie Milch). ^[15]	3
Abbildung 2.1. Beispiele für Makrolidantibiotika mit 1,3-Diolteilstrukturen (grün markiert).....	9
Abbildung 2.2. Beispiele für pharmakologische Wirkstoffe mit 1,3-Diolmotiv.	10
Abbildung 2.3. Schematischer Aufbau eines kontinuierlichen Durchflussreaktorkonzeptes zur chemoenzymatischen Darstellung von 1,3-Diolen.	12
Abbildung 2.4. Einige Beispiele für Prolin-basierte Organokatalysatoren, die in wässrigen Medien eingesetzt werden können.....	23
Abbildung 2.5. Stereochemisches Modell der Hydridübertragung von NAD(P)H auf ein Keton. L steht hierbei für einen großen, S für einen kleinen Rest. ADPR = Adenosindiphosphatribosyl.	26
Abbildung 2.6. Mechanismen der enzymatischen Reduktion (links: Zimtalkoholdehydrogenase AtCAD5 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , rechts: Hydroxyglutaratdehydrogenase aus <i>Acidaminococcus fermentans</i>).....	27
Abbildung 2.7. Beispiele für biokatalytische Reduktionsprodukte im Konzentrationsbereich um 100 g/L.....	28
Abbildung 2.8. Ausgewählte Immobilisierungsmethoden (links: Kovalente Verbrückung durch Ausbilden von Amidbindungen; mitte: nicht-kovalente Anbindung des Enzyms durch ionische Wechselwirkungen mit dem Trägermaterial; rechts: Einkapselung des Enzyms in einer Matrix). Das Enzym ist hierbei in grün, das Trägermaterial in blau dargestellt.....	33
Abbildung 2.9. Schematische Darstellung der Anbindung eines Enzyms (in grün dargestellt) über ionische Wechselwirkungen an DEAE-Sephadex.	35
Abbildung 2.10. Oben: Reaktionsgleichung zur enzymatischen Darstellung von (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-10 aus (<i>R</i>)-12. Unten: ¹ H-NMR-Spektrum des entsprechenden Rohproduktgemisches bestehend aus (<i>R</i>)-12 (95% ee, blau) und dem Diol (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-10 (>99% ee, grün) bei 46% Umsatz.	40
Abbildung 2.11. Referenzverbindungen für die Etablierung der Analytik.	40
Abbildung 2.12. HPLC-Chromatogramm der Mischung aus <i>rac-syn</i> -10 und <i>rac-anti</i> -10. Messbedingungen: Chiralpak® OJ-H Säule, temperiert auf 30°C; Laufmittel CO ₂ :Isopropanol 97:3 (V:V), flow 1.0 mL/min. Als Retentionszeiten werden erhalten: t _r = 43.0 min ((<i>S,S</i>)-10), 44.8 min ((<i>S,R</i>)-10), 51.2 min ((<i>R,R</i>)-10) und 55.2 min ((<i>R,S</i>)-10).	41
Abbildung 2.13. HPLC-Chromatogramm einer 1:1 Mischung aus (1 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-10 und (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-10. Messbedingungen: Chiralpak® OJ-H Säule, temperiert auf 30°C; Laufmittel CO ₂ :Isopropanol 97:3 (V:V), flow 1.0 mL/min. Als Retentionszeiten	

werden erhalten: $t_r = 41.8$ min ((<i>S,S</i>)-10), 43.5 min ((<i>S,R</i>)-10), 49.4 min ((<i>R,R</i>)-10) und 53.2 min ((<i>R,S</i>)-10).....	41
Abbildung 2.14. Recyclingversuche zur Synthese von (<i>1R,3S</i>)-10 mittels immobilisierter Rsp-ADH.	44
Abbildung 2.15. Schematische Darstellung eines Hydrogelimobilisates im wässrigen Medium (links) bzw. in einem organischen, mit Wasser nicht mischbaren Solvens (rechts). Im homogenen Solvenssystem (bezogen auf die eingeschlossene, wässrige Phase im Hydrogel und das umgebende Lösungsmittel) links ist der Rückhalt des Enzyms klein, der Übergang in den Lösungsmittelüberstand führt zum "leaching". Rechts bedingt die Phasentrennung zwischen Hydrogel und organischem Solvens den Rückhalt des Enzyms im wässrigen Kompartiment.	47
Abbildung 2.16. ¹ H-NMR-spektroskopische Untersuchungen der Synthese von (<i>1R,3S</i>)-10 mittels immobilisierter Rsp-ADH in organischen Lösungsmitteln.	48
Abbildung 2.17. Recyclingversuche zur Synthese von (<i>1R,3S</i>)-10 mittels immobilisierter Rsp-ADH im organischen Milieu (links: in Cyclohexan; rechts: in Isooktan). 50	
Abbildung 2.18. Ausschnitt des ¹ H-NMR Spektrums des Rohproduktgemisches der in Schema 2.33 gezeigten Benchmarkreaktion. Charakteristische, gut voneinander getrennte Signale liegen bei 5.12 ppm (dt) für (<i>R</i>)-12, 5.19 ppm (dd) für das Bis-Aldolprodukt 66 und 6.73 ppm (d) für das Kondensationsprodukt 65.	54
Abbildung 2.19. HPLC-Chromatogramm des racemischen Aldolproduktes <i>rac</i> -12 mit <0.5% ee. Messbedingungen: Chiralpak® AD-H Säule, temperiert auf 40°C; Laufmittel CO ₂ :Isopropanol 95:5 (V:V), flow 1.8 mL/min. Als Retentionszeiten werden $t_r = 23.1$ min (<i>R</i>)-12) und $t_r = 29.0$ min (<i>R</i>)-12) erhalten. 55	
Abbildung 2.20. ¹ H-NMR-Spektren der verschiedenen Substratchargen (vergleiche Tabelle 2.1).	59
Abbildung 2.21. Vergleich der Spektren frisch destillierten 3-Chlorbenzaldehyds (67, oben) und dem Rohproduktgemisch der AAR (unten). Der Übersichtlichkeit halber wird auf die Darstellung des gesamten Messbereichs verzichtet und ausschließlich Signale zwischen 5.0 und 10.1 ppm gezeigt.	65
Abbildung 2.22. Autoxidationskinetik von 3-Chlorbenzaldehyd (13) in gesättigter Natrium-chloridösung und Cyclohexan.	69
Abbildung 3.1. Übergangszustände der Histidin-katalysierten Aldolreaktion zwischen Isobutanal (79) und einem Akzeptoraldehyd. Oben: <i>Re</i> - und <i>Si</i> -Seitenangriffe niedrigster Energie unter Berücksichtigung einer Wasserstoffbrückenausbildung zwischen Enamin und Imidazoliumring (95a und 95b) bzw. der Carbonsäure (95c und 95d). Unten: Newman-Projektionen der Übergangszustände entlang der sich bildenden C-C-Bindungachse. Rot eingezeichnet: Abstoßende <i>gauche</i> -Wechselwirkungen.	88
Abbildung 3.2. Pioniere der Vitaminforschung. Von links nach rechts: Frederick G. Hopkins, Takaki Kanehiro, Christiaan Eijkman, Casimir Funk. ^[356]	91
Abbildung 3.3. Strukturen einiger Vitamine.	92
Abbildung 3.4. Von (<i>R</i>)-Pantolacton ((<i>R</i>)-80) abgeleitete, pharmakologisch aktive Wirkstoffe.	98
Abbildung 3.5. ¹ H-NMR-Spektren des Aldolproduktes <i>rac</i> -86 (oben) sowie von (<i>R</i>)-Pantolacton ((<i>R</i>)-80, unten). * = Solvenssignal.	104
Abbildung 3.6. GC-Kalibriergeraden für <i>rac</i> -86 (oben) und (<i>R</i>)-80 (unten).	104
Abbildung 3.7. Exemplarisches Gaschromatogramm einer Reaktionsmischung (achirale Rxi-5ms Säule von Restek®; isotherme Messung bei 140°C; t_r (80)= 1.7 min, t_r (86)= 2.4 min).	105

Abbildung 3.8.	Enantiomerentrennung racemischen Pantolactons (<i>rac</i> -80) mittels chiraler Gaschromatographie (links) und ee-Wert Simulation für (<i>R</i>)-80 (rechts). ber. = berechnet, gem. = gemessen. Die Messungen werden auf einer Rt- β DEXm Säule von Restek® bei folgendem Temperaturschema durchgeführt: 10 min bei 80°C, Heiz-rate: 10°C/min bis auf 120°C, 10 min bei 120°C halten. Als Retentionszeiten ergeben sich: $t_r = 17.9$ min ((<i>S</i>)-80), 18.2 min ((<i>R</i>)-80).	106
Abbildung 3.9.	HPLC-Chromatogramm racemischen Aldolproduktes <i>rac</i> -86. Messbedingungen: Chiralpak® OD-H Säule, temperiert auf 20°C; Laufmittel CO ₂ :Hexan:Isopropanol 90:9:1 (V:V), flow 1.0 mL/min; Detektion bei 212 nm. Als Retentionszeiten ergeben sich: $t_r = 8.9$ min ((<i>S</i>)-86), 9.7 min ((<i>R</i>)-86).	107
Abbildung 3.10.	Darstellung von (<i>R</i>)-86 unter veränderten Wassermengen. Auf der x-Achse sind dabei die Stoffmengenäquivalente (n) Wasser pro mol Ethylglyoxylat in n/1 angegeben. n=0 entspricht einer wasserfreien Reaktionsführung.	111
Abbildung 3.11.	Vergleich der Reaktionskinetik im wasserärmeren (links) und -reicheren (rechts) Lösungsmittelsystem.	112
Abbildung 3.12.	Darstellung von (<i>R</i>)-86 bei verschiedenen Reaktionstemperaturen.	115
Abbildung 3.13.	Darstellung des Aldehyds (<i>R</i>)-86 im gepufferten Reaktionsgemisch (n. g. = ungepuffert).	116
Abbildung 3.14.	Synthese von (<i>R</i>)-86 mit 2-Propanol als Additiv.	119
Abbildung 3.15.	Cosolvensscreening zur Darstellung des Aldehyds (<i>R</i>)-86. * = Reaktion bei 7°C.	122
Abbildung 3.16.	Darstellung von (<i>R</i>)-80 bei veränderten pH-Werten.	130
Abbildung 3.17.	Schematische Darstellung einer Reaktion unter ISPR (<i>in situ</i> Produktentfernung)-Bedingungen.	137
Abbildung 3.18.	Darstellung von (<i>R</i>)-80 unter ISPR-Bedingungen.	138
Abbildung 3.19.	Oben: Zeitliche Abhängigkeit des erzielten Enantiomerenüberschusses bei der Synthese von (<i>R</i>)-80, normiert auf das (<i>R</i>)-Enantiomer. Unten: Darstellung von (<i>R</i>)-80 bei unterschiedlicher Reaktionsdauer.	139
Abbildung 3.20.	Rückhaltung des Biokatalysators bei der Darstellung von (<i>R</i>)-80 unter ISPR-Bedingungen. V = (Absperr)Ventil, M = Größenausschlussmembran.	145
Abbildung 3.21.	Recyclierungsversuche zur Synthese von (<i>R</i>)-80 unter Rückhalt der ADH.	146
Abbildung 4.1.	Recyclierungsversuche zur Synthese von (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-10 mittels immobilisierter Rsp-ADH in Cyclohexan.	148
Abbildung 4.2.	Einfluss der Autoxidation auf die Synthese von (<i>R</i>)-12 im organischen Medium (* = optionale Zugabe; † = optional entgast).	150
Abbildung 4.3.	Links: Schematische Darstellung der Reaktion unter ISPR (<i>in situ</i> Produktentfernung)-Bedingungen. Rechts: Erzielte Umsätze und Enantiomerenüberschüsse der enzymatischen Reduktion von (<i>R</i>)-86 unter ISPR-Bedingungen und sukzessiver Verringerung der eingesetzten Enzymaktivität.	153
Abbildung 4.4.	Einfluss der Reaktionsdauer auf den erzielbaren Umsatz bzw. Enantiomerenüberschuss bei der Darstellung von (<i>R</i>)-80 unter ISPR-Bedingungen.	154
Abbildung 4.5.	Recyclierungsversuche zur Synthese von (<i>R</i>)-80 unter Rückhalt der ADH und ISPR-Bedingungen.	155
Abbildung 6.1.	Schematische Darstellung einer Reaktion unter ISPR (<i>in situ</i> Produktentfernung)-Bedingungen.	215

8 Schemataverzeichnis

Schema 1.1. Chemische (links, rot) und biokatalytische (rechts, grün) Synthese von Sitagliptin.	5
Schema 1.2. Chemische (rot) und enzymatische (grün) Darstellung von 6-Aminopenicillin-säure (3).....	5
Schema 1.3. Chemische (rot), chemoenzymatische (orange) und bienzymatische (grün) Darstellung von 7-Aminocephalosporinsäure (4). (<i>R</i>)-AAPE = (<i>R</i>)-2-Aminoadipinsäure-6-propylester.	7
Schema 2.1. Sequentieller Aufbau von 1,3-Diolen nach BAER <i>et al.</i>	11
Schema 2.2. Sequentieller Aufbau von 1,3-Diolen ohne Isolierung der Zwischenstufe.	11
Schema 2.3. Darstellung des Aldolproduktes (<i>R</i>)-12 mit dem von KRISTENSEN und HANSEN entwickelten Organokatalysator (<i>S,S</i>)-11 nach RULLI. ^[69] 12	12
Schema 2.4. Sequentieller Aufbau von (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-10 unter Verwendung immobilisierter Katalysatoren. Oben: Struktur des von KRISTENSEN <i>et al.</i> entwickelten Prolinamidimmobilisates (<i>S,S</i>)-11.	13
Schema 2.5. Anforderungen an das Biokatalysatorimmobilisat bei der Synthese von (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-10 aus (<i>R</i>)-12.	13
Schema 2.6. <i>Anti</i> -selektive Hydrierung nach NOYORI.....	15
Schema 2.7. Mikrobielle Reduktion verschiedener 1,3-Diketone (16a/17a: R = Me, R' = Me; 16b/17b: R = Me, R' = Et; 16c/17c: R = Et, R' = Et; 16d/17d: R = Et, R' = <i>n</i> -Pr). 15	15
Schema 2.8. Enzymatische Reduktion von 1,3-Diketoestern.	16
Schema 2.9. <i>Syn</i> -selektive Reduktion von β -Hydroxy-1,3-diphenylpropanon (20).....	16
Schema 2.10. <i>Anti</i> -selektive Reduktion zum Leucascandrolid A-Baustein 23.	17
Schema 2.11. Diastereoselektive Biotransformation von verschiedenen 1,3-Diketoestern in ihre <i>syn</i> - und <i>anti</i> -Diole.....	18
Schema 2.12. Chemoenzymatische, diastereoselektive Darstellung von <i>syn</i> - und <i>anti</i> -Diolen nach BAER <i>et al.</i>	18
Schema 2.13. Prolin-katalysierte, asymmetrische Aldolreaktion von Aceton mit substituierten Benzaldehyden (31a: R = H; 31b: R = <i>p</i> -Br, 31c: R = <i>p</i> -NO ₂ , 31d: R = <i>o</i> -Cl). 21	21
Schema 2.14. Katalysemechanismus der Prolin-katalysierten Aldolreaktion zwischen Aceton und Benzaldehyden. ^[107,108]	21
Schema 2.15. Decyl-Prolinamid-katalysierte AAR zwischen Cyclohexanon und <i>p</i> -Nitrobenz-aldehyd (32) in Wasser.	22
Schema 2.16. TBDPS-Prolylether-katalysierte AAR zwischen Cyclohexanon und <i>p</i> -Nitrobenz-aldehyd (32) in Wasser.	22
Schema 2.17. TBDPS-Prolylether-katalysierte AAR von Aceton mit <i>p</i> -Nitrobenzaldehyd (32) in Wasser.....	23
Schema 2.18. Prolinamid-katalysierte AAR zwischen Aceton und <i>p</i> -Nitrobenzaldehyd (32) nach SINGH.	24
Schema 2.19. Die Heterogenisierung des Prolinamidkatalysators ermöglicht eine Mehrcyclen-reaktionsführung.....	24
Schema 2.20. Allgemeines Schema zur enzymatischen Reduktion von Carbonylverbindungen mittels Ketoreduktasen.	25

Schema 2.21. Biokatalytische Darstellung des Montelukast-Precursors 44.	26
Schema 2.22. Enzymatische Reduktion Fluor-substituierter Acetophenone mit <i>Candida glabrata</i> KRED.	27
Schema 2.23. Biotransformation von 2-Octanon (53, links) bzw. Adamantylethanon (54, rechts) mittels der KRED aus <i>Candida magnoliae</i>	29
Schema 2.24. Asymmetrische Reduktion eines Biarylketons.	29
Schema 2.25. Asymmetrische Reduktion von Carvon (57).	29
Schema 2.26. Beispiele für chemoselektive Biotransformationen mit Ketoreduktasen.	30
Schema 2.27. Beispiele für regioselektive Biotransformationen mit Ketoreduktasen.	30
Schema 2.28. Enzym- (links) und substratgekoppelte (rechts) Cofaktorregenerierung. N. = stöchiometrisch auftretendes Nebenprodukt.	31
Schema 2.29. Kovalente Immobilisierung eines Enzyms (in grün dargestellt) an Eupergit C.	34
Schema 2.30. Racematspaltung acylierter Aminosäuren mittels immobilisierter Aminoacylase (TANABE Prozess).	36
Schema 2.31. Enzymatische Reduktion mittels superabsorbierter Alkoholdehydrogenase (64a: R ¹ = Ph, R ² = Me; 64b: R ¹ = 4-Pyridyl, R ² = Me; 64c: R ¹ = EtOOCCH ₂ , R ² = Me).	37
Schema 2.32. Sequentieller Aufbau von 1-(3-Chlorphenyl)butan-(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-diol ((1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-10) unter Verwendung immobilisierter Katalysatoren.	39
Schema 2.33. Benchmarksynthese zur Darstellung von (<i>R</i>)-12 im wässrigem Milieu (oben) und die bei der Synthese identifizierten Nebenprodukte (unten).	53
Schema 2.34. Darstellung des racemischen Aldolproduktes <i>rac</i> -12 im Basischen.	54
Schema 2.35. Erweiterter Mechanismus der Prolinamid-katalysierten AAR unter Einbezug eines Säureadditives.	61
Schema 2.36. Umsetzung von 4-Nitrobenzaldehyd 32 und Aceton in einer durch ein protoniertes, chirales Prolinamid katalysierten asymmetrischen Aldolreaktion. 62	
Schema 2.37. Dissoziationsgleichgewicht zwischen (<i>S</i>)-72-AH und (<i>S</i>)-72.	62
Schema 2.38. Mechanismus der Enaminbildung zwischen einem protonierten Prolinderivatkatalysator (<i>S</i>)-72-AH und Aceton.	63
Schema 2.39. Darstellung von (<i>R</i>)-12 in Cyclohexan unter Zugabe von 2 mol% der zur Ausgangsverbindung 13 korrespondierenden Benzoesäure 67.	65
Schema 2.40. Reaktionsschema der aerobischen Oxidation von Aldehyden. i) (freie) Radikal-kettenreaktion; ii) nucleophile Addition; iii) Umlagerung über a) Hydrid- oder b) Alkyl/Arylwanderung.	67
Schema 2.41. Oxidation von Benzaldehyd an Wasser.	67
Schema 2.42. Chemoenzymatische Darstellung von (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-10 in Cyclohexan unter Verwendung des freien Organokatalysators (<i>S,S</i>)-27.	77
Schema 2.43. Chemoenzymatische Darstellung von (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-10 in Cyclohexan unter Verwendung des heterogenisierten Organokatalysators (<i>S,S</i>)-11. 80	
Schema 3.1. Darstellung von Calciumpantothenat (78) durch Kondensation von (<i>R</i>)-Panto-lacton ((<i>R</i>)-80) und β-Alaninat (81).	82
Schema 3.2. Schematische Darstellung der Arbeitsschritte der großtechnischen Methode (links) bzw. der geplanten Syntheseroute (rechts) zur Herstellung von (<i>R</i>)-Pantolacton ((<i>R</i>)-80). Durchgezogene Linien und Pfeile zeigen den Prozessverlauf, gestrichelte Recyclingsschritte. Gezeichnete Strukturen bilden das/die Produkt/e des jeweiligen Schrittes ab. Energetisch intensive bzw. ökologisch/toxikologisch bedenkliche Schritte sind rot, unbedenkliche grün markiert.	83

Schema 3.3. Zielsetzungsparameter der nachhaltigen Pantolactonsynthese.....	84
Schema 3.4. Histidin-katalysierte gekreuzte Aldolreaktion zwischen enolisierbaren Aldehyden.....	85
Schema 3.5. Histidin-katalysierte gekreuzte Aldolreaktion von Isobutanal (79) und verzweigten Aldehyden führt zu <i>syn</i> -Produkten 91.....	86
Schema 3.6. Histidin-katalysierte Homoaldoladdition von (<i>R</i>)-Isopropylidenglyceraldehyd.....	86
Schema 3.7. Aldoladdition von Isobutanal (79) und Ethylglyoxylat (85) unter Verwendung von L-Histidin (L-88) und seinen Derivaten 96b-e als Katalysatoren. 89	89
Schema 3.8. Biosynthese von Coenzym-A (CoA, (<i>R</i>)-101).....	93
Schema 3.9. Industrielle Synthese von Vitamin-B ₅ ((<i>R</i>)-77-H) bzw. seiner kommerziellen Form Calciumpantothenat (78).....	94
Schema 3.10. Großtechnische Synthese des racemischen Pantolactons (<i>rac</i> -80). Im gestrichelten Kasten: Nebenreaktionspfad über die Disproportionierung des Aldolproduktes 83 im basischen Milieu.....	95
Schema 3.11. Nebenreaktionspfade der Edukte bei der Pantolactonsynthese.....	96
Schema 3.12. Lactonase-katalysierte Racematspaltung von <i>rac</i> -80.....	97
Schema 3.13. Von Isobutanal (79) ausgehende Synthese von (<i>R</i>)-Pantolacton ((<i>R</i>)-80) mit Hilfe der SHARPLESS Dihydroxylierung. (DHQD) ₂ PHAL = 1,4-Bis(9-O-dihydrochinni-dinyl)phthalazin.....	99
Schema 3.14. Synthese von (<i>R</i>)-Pantolacton ((<i>R</i>)-80) mit Hilfe der SHARPLESS Epoxidierung. TBSCl = <i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid, DIBAL-H = Diisobutylaluminiumhydrid, (-)DIPT = (-)Diisopropyltartrat.....	99
Schema 3.15. Enzymatischer Zugang zu (<i>R</i>)-Pantolacton ((<i>R</i>)-80) unter Verwendung einer (<i>R</i>)-selektiven Oxynitrilase. 122a/(<i>R</i>)-123a: R = OH; 122b/(<i>R</i>)-123b: R = OMe; 122c/(<i>R</i>)-123c: R = OEt; 122d/(<i>R</i>)-123d: R = OCH ₂ CH=CH ₂ ; 122e/(<i>R</i>)-123e: R = OBz; 122f/(<i>R</i>)-123f: R = Cl; 122g/(<i>R</i>)-123g: R = Br; 122h/(<i>R</i>)-123h: R = OC(O)Me.....	100
Schema 3.16. Chemoenzymatische Pantolactonsynthese nach SHIMIZU <i>et al.</i>	101
Schema 3.17. Kurzschemata der geplanten (<i>R</i>)-Pantolactonsyntheseroute.....	103
Schema 3.18. Untersuchungen zur Retroaldolreaktion mit (<i>R</i>)-86 und racemischem Histidin bzw. <i>rac</i> -86 und L-Histidin.....	113
Schema 3.19. Optimierte Reaktionsbedingungen zur Darstellung des Aldehyds (<i>R</i>)-86.....	123
Schema 3.20. Chemoenzymatische Darstellung von (<i>R</i>)-80 ohne Isolierung der Zwischenstufe (<i>R</i>)-86.....	141
Schema 3.21. Chemoenzymatische Darstellung von (<i>R</i>)-80 bei Verwendung von Benzoesäure als Cokatalysator der AAR.....	142
Schema 4.1. Sequentieller Aufbau von (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-10 unter Verwendung immobilisierter Katalysatoren. In grau abgebildet: Aldolproduktzwischenstufe (<i>R</i>)-12. 147	147
Schema 4.2. Chemoenzymatische Darstellung von (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-10 in Cyclohexan unter Verwendung des immobilisierten Organokatalysators (<i>S,S</i>)-11.....	149
Schema 4.3. Zielsetzungsparameter der nachhaltigen Pantolactonsynthese.....	151
Schema 4.4. Optimierte Reaktionsbedingungen zur Darstellung des Aldehyds (<i>R</i>)-86.....	152
Schema 4.5. Enzymatische Reduktion des Aldolproduktes (<i>R</i>)-86 unter <i>in situ</i> Cofaktorregenerierung mit 2-Propanol.....	152
Schema 4.6. Chemoenzymatische Darstellung von (<i>R</i>)-80 ohne Isolierung der Zwischenstufe (<i>R</i>)-86.....	154

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1. Versuchsübersicht zur Synthese von (<i>R</i>)-12 im wässrigen und organischen Medium.	57
Tabelle 2.2. Versuchsübersicht zur Synthese von (<i>R</i>)-12 in Cyclohexan unter Zugabe von 3-Chlorbenzoesäure (67).....	60
Tabelle 2.3. Einfluss der Autoxidation auf die Synthese von (<i>R</i>)-12 im wässrigen Medium (* = optionale Zugabe; † = optional entgast).....	73
Tabelle 2.4. Einfluss der Autoxidation auf die Synthese von (<i>R</i>)-12 im organischen Medium (* = optionale Zugabe; † = optional entgast).....	75
Tabelle 2.5. Darstellung von (<i>R</i>)-12 unter Verwendung verschiedener Prolinamidkatalysatoren in Cyclohexan.....	79
Tabelle 3.1. Berechnete und empirisch gefundene ee-Werte für die Histidin-katalysierte, gekreuzte Aldolreaktion zwischen Isobutanal (79) und verschiedenen Aldehyden.	88
Tabelle 3.2. Validierungsmessungen zur Überprüfung der Kalibriergeraden.	105
Tabelle 3.3. Aminosäurescreening zur Darstellung des Aldehyds 86.	110
Tabelle 3.4. Veränderung der Eduktstöchiometrie bei der Synthese von (<i>R</i>)-86.	117
Tabelle 3.5. Cokatalysatorscreening zur Darstellung des Aldehyds (<i>R</i>)-80.....	120
Tabelle 3.6. Screening der Alkoholdehydrogenasen.....	126
Tabelle 3.7. Untersuchungen der Enzymselektivität bei Verwendung der ADH-200.....	126
Tabelle 3.8. Untersuchungen zur Substratstabilität.....	128
Tabelle 3.9. Darstellung von (<i>R</i>)-80 bei veränderter Isopropanolkonzentration.	129
Tabelle 3.10. Darstellung von (<i>R</i>)-80 bei unterschiedlichen Eduktkonzentrationen.....	130
Tabelle 3.11. Darstellung von (<i>R</i>)-80 bei unterschiedlichen Eduktkonzentrationen. * Die Ansatzgröße der AAR wird so gewählt, dass nach 24 Stunden eine Produktbildung von 1 mmol erreicht wird.....	131
Tabelle 3.12. Synthese von (<i>R</i>)-80 unter Zugabe einzelner, aus der Aldolreaktion stammender Verbindungen.	133
Tabelle 3.13. Darstellung von (<i>R</i>)-80 bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen.	136

10 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
(-)-DIPT	(-)-Diisopropyltartrat
(DHQD) ₂ PHAL	1,4-Bis(9- <i>O</i> -dihydrochinidinyI)phthalazin
(m/m)	Gewicht/Gewicht
(V/V)	Volumen/Volumen
°C	Grad Celsius
6-APA	6-Aminopenicillinsäure
7-ACA	7-Aminocephalosporinsäure
AAPE	2-Aminoadipinsäure-6-propylester
AAR	asymmetrische Aldolreaktion
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Aceton-d ₆	deuteriertes Aceton
ACP	Acyl-Carrier-Proteins
ADH	Alkoholdehydrogenase
AD-H	CHIRALPAK® Amolyse Tris-(3,5-dimethylphenylcarbamat)
ADH-4	Alkoholdehydrogenase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ADPR	Adenosindiphosphatribosyl
AMP	Adenosinmonophosphat
Äq bzw. eq	Äquivalente
AtCAD5	Zimtalkoholdehydrogenase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
a _w -Wert	Wasseraktivität
ber.	berechnet
bez.	bezogen
binap	(2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl)
Bio.	Billion
BOD	biochemischer Sauerstoffbedarf
br	breit
bzw.	beziehungsweise
c	Umsatz
c _{Aceton}	Umsatz der enzymatischen Reduktion bei Anwesenheit von Aceton
CAS	Chemical Abstracts Service
CD ₃ OD	deuteriertes Methanol
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
CLEAs	cross-linked enzyme aggregates
CLECs	cross-linked enzyme crystals

CMR-1-Stoff	Ein krebserzeugender, erbgutverändernder oder fortpflanzungsgefährdender Stoff, der in die Kategorie 1 eingestuft wurde
C _{normativ}	Umsatz der enzymatischen Reduktion bei Abwesenheit von Aceton
CoA	Coenzym-A
d	Tag
d	Dublett
d [cm]	Schichtdicke der Küvette
D ₂ O	Deuteriumoxid
DBN	1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-en
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dd	Dublettaufspaltung eines Dubletts oder Doppeldublett
DEAE-Sephadex	Diethylaminoethylcellulose
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DMF	2,5-Dimethylfuran
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPH	D-spezifische Pantolacton-Hydrolase
dr	Diastereomerenverhältnis
dt	Dublettaufspaltung eines Triplets
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E/Z	entgegengesetzt/zusammen
ee	Enantiomerenüberschuss
EE	Essigester bzw. Ethylacetat
ee (ber.)	Berechneter ee-Wert
ee (gef.)	Empirisch gefundener ee-Wert
ee _p	ee-Wert des Produktes
ee _s	ee-Wert des Substrates
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
Euro	Offizielle Währungseinheit in vielen Ländern der EU
evo-1.1.200 resp. ADH-200	Alkoholdehydrogenase der evocatal GmbH
E-Wert	Selektivitätswert
f	Verdünnungsfaktor der Enzymlösung
FAS	Fettsäuresynthase
Favor SXM 9155*	Superabsorbierendes Polymer; Superabsorber
FID	Flammenionisationsdetektor
F _{O2}	Faktor des anteiligen Sauerstoffvolumens an Luft
Forts.	Fortsetzung
GC	Gaschromatographie
gem.	gemessen
ges.	gesättigt
ges.	gesättigt
ges.	gesättigt
Gew.-%	Gewichtsprozent

Gew.-%	Gewichtsprozent
h	Stunde
HDO	Halbschweres Wasser
HFCS	high fructose corn sirup
HGDH	Hydroxyglutaratdehydrogenase
His	Histidin
HMG-CoA	β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-Coenzym-A
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
IPA bzw. 2-PrOH	Isopropanol
ISPR	<i>in situ</i> Produktentfernung
J	Skalare Kopplungskonstante
kcal	Kilokalorie
kDa	kilodalton
KI	Inhibierungskonstante für Aceton
KRED	Ketoreduktase
KRED CDX -026	} Kommerziell erhältliche Ketoreduktasen
KRED-1	
KRED-101	
KRED-119	
KRED-121	
KRED-Ali	
KRED-Alx	
LH	Lactonohydrolasen
Lk-ADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus kefir</i>
ln	natürlicher Logarithmus
Log P-Wert	dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten
LPH	L-spezifische Pantolactonhydrolasen
Lsg.	Lösung
m	<i>meta</i>
m	multiplet
MEG	Ethylenglycol
MHz	Megahertz
min	Minute
MN 616 WA	Phasentrennfilter
M _{O2}	Molekulargewicht von Sauerstoff
Mol-%	Molprozent
Mrd.	Milliarde
M _S	Molekulargewicht des Lösungsmittels
MWCO-Membran	Größenausschlussmembran
n	Stoffmenge in mol
n.b.	nicht bestimmt
n.g.	nicht gepuffert
NADH, NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte, oxidierte Form)
NADPH, NADP ⁺	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte, oxidierte Form)
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid

NMR	Kernmagnetische Resonanz
o	<i>ortho</i>
Ø	Durchmesser
OJ-H	CHIRALCEL® Cellulose Tris-(4-methylbenzoat)
org. Phase	organische Phase
p	<i>para</i>
P	Dampfdruck
p	Druck in bar oder kPa
P _{ges}	Gesamtdampfdruck
pK _a	negativer dekadischer <u>Logarithmus</u> der Säurekonstante
pK _b	negativer dekadischer <u>Logarithmus</u> der Basiskonstante
prc	Produktbezogener Umsatz
PVA	Polyvinylalkohol
q	Quartett
qd	Quartettaufspaltung eines Dubletts
<i>rac</i>	racemisch
ref. to	bezogen auf
R _f	Retentionsfaktor
<i>Rhodococcus sp.</i>	<i>Rhodococcus species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
Rsp-ADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Rhodococcus species</i>
RT bzw. rt	Raumtemperatur
Rt bzw. t _r	Retentionszeit
S	Stereoselektivitätsfaktor
s	Singulett
s. N.	stöchiometrisch auftretendes Nebenprodukt
sec	Sekunde
Ser134	Serin an der Position 134 der Aminosäuresequenz
SFC	superkritische Flüssigchromatographie
sp ²	sp ² -hybridisiert
t	Triplet
T bzw. temp.	Temperatur
TABH	Tetramethylammoniumtriacetoxyborhydrid
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilylether
TBSCl	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIC	total ion current
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr175	Tyrosin an der Position 175 der Aminosäuresequenz
U _{ges}	Gesamtumsatz
U _{Pr}	produktbezogenen Umsatz
U/mg	gravimetrische Enzymaktivität
U/mmol	volumetrische Enzymaktivität
USA	Vereinigte Staaten von Amerika

US-Dollar	Offizielle Währungseinheit der USA
UV/VIS	ultraviolett/visible
v. l.	von links
V	(Absperr-)Ventil
V	Volumen
V-% bzw. Vol-%	Volumenprozent
v. Chr.	vor Christus
V_g	Gesamtvolumen
V_L	molares Volumen von Luft
V_p	Probenvolumen
V_T^0	molares Volumen von Wasser bei der Temperatur T
V/V	Volumenverhältnis
Δ	delta
δ [ppm]	Chemische Verschiebung
$\Delta E_{340\text{nm}}/t$	Abnahme der Absorptionskurve
ΔG^\ddagger	Gibbs-Energie
$\epsilon_{\text{NAD(P)H}}$ [$\text{ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]	molarer Extinktionskoeffizient von NAD(P)H
v_{Aceton}	Reaktionsgeschwindigkeit bei Anwesenheit von Aceton
v_{normativ}	Reaktionsgeschwindigkeit bei Abwesenheit von Aceton
ρ_{O_2}	Dichte von Sauerstoff
ρ_s	Dichte des Lösungsmittels
χ_1	Molenbruch von Sauerstoff bei einem Partialdruck von 101.325 kPa
χ^n	Stoffmengenanteile
χ^n	Stoffmengenanteile

11 Literaturverzeichnis

- [1] H. Dellweg, *Biotechnologie verständlich*, Springer, Heidelberg, 1994.
- [2] B. Osterath, N. Rao, S. Lütz, A. Liese, *Chem. unserer Zeit*, 2007, 41, 324-333.
- [3] F. Spier, *Big History and the Future of Humanity*, Wiley-Blackwell, Malden, 2010, 156-157.
- [4] A. Kumar, S. Grover, J. Sharma, V. K. Batish, *Crit. Rev. Biotechnol.* 2010, 30, 243-258.
- [5] J. Althoff, *Warm, kalt, flüssig und fest bei Aristoteles: Die Elementarqualitäten in den zoologischen Schriften*, Franz Steiner Verlag, Stuttgart, 1992, 204-205.
- [6] <http://www.chr-hansen.de/ueber-uns/meilensteine.html>
- [7] B. Hüsing, G. Jaeckel, F. Marscheider-Weidemann, *Potentiale und Entwicklungen im Bereich der Katalysatoren- und Enzymtechnik*, Fraunhofer Institut für Systemtechnik und Innovationsforschung, Karlsruhe, 1997, 42.
- [8] J. James, B. K. Simpson, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1996, 36, 437-463.
- [9] Z. S. Olempska-Beer, R. I. Merker, M. D. Ditto, M. J. DiNovi, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2006, 45, 144-158.
- [10] Bildquellen im Rahmen verschiedener Creative Commons Lizenzvereinbarungen verfügbar unter:
- a) http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/72/Knopflatz_Lederhose_ca._1940_cropped.jpg (Lederhose), Urheber und Lizenzbedingungen: Claude TRUONG-NGOC derivative work: Frédéric MICHEL (Knopflatz_Lederhose_ca._1940.jpg) [CC-BY-SA-3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)], via Wikimedia Commons;
- b) http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ad/Michael_Mandibergs_Old_news_at_postmasters_nyc.jpg (Zeitung), Urheber und Lizenzbedingungen: m_mandiberg (Own work) [CC-BY-SA-2.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0>)], via Wikimedia Commons;
- c) http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/42/Regular_strength_enteric_coated_aspirin_tablets.jpg (Feinchemikalien und Pharmawirkstoffe), Urheber und Lizenzbedingungen: Ragesoss (Own work) [GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>) oder CC-BY-SA-3.0-2.5-2.0-1.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)], via Wikimedia Commons;
- d) http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3d/3_Sorten_waschpulver.jpg (Wasch- und Reinigungsmittel), Urheber und Lizenzbedingungen: Bukk (Own work) [Public domain], via Wikimedia Commons;
- e) http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/01/Jeans_Jeans_Jeans.jpg (Textilien), Urheber und Lizenzbedingungen: Jcjeansandclothes (Own work) [CC-BY-SA-3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)], via Wikimedia Commons;

- f) http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4e/Schwappender_Wein.jpg (Lebensmittel und Getränke), Urheber und Lizenzbedingungen: Stefan Krause, Germany (Own work) [CC-BY-3.0-de (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/de/deed.en>) or FAL], via Wikimedia Commons.
- [11] Bundesministerium für Bildung und Forschung, *Weißer Biotechnologie: Chancen für eine bio-basierte Wirtschaft*, Druck Vogt GmbH, Berlin, 2012.
- [12] <http://geschichte.evonik.de/sites/geschichte/de/erfindungen/burnus/pages/default.aspx>
- [13] H. Walland, *Kenntnis der Wasch-, Bleich- und Appreturmittel*, Springer, Berlin Heidelberg, 1925, 175-176.
- [14] M. Breuer, R. Stürmer, *Chem. unserer Zeit*, 2006, 40, 104-111.
- [15] a) Freundlicherweise für die Veröffentlichung in dieser Dissertationsschrift zur Verfügung gestellt von: Evonik Industries AG, Konzernarchiv; Kontakt: Doris Eizenhoefer, Stellvertr. Leiterin Konzernarchiv.

Weitere Bildquellen im Rahmen verschiedener Creative Commons Lizenzvereinbarungen verfügbar unter:

b) http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2f/Coca-cola_50cl_can_-_Italia.jpg (Softdrink), Urheber und Lizenzbedingungen: M0tty (Own work) [CC-BY-SA-3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)], via Wikimedia Commons;

c) <http://cdn02.trixum.de/upload2/I/H/IHrwsUEXuzon140327708588P5918.jpg> (Burnus Waschmittel), Urheber und Lizenzbedingungen: Jerouschek+Reitmeier GdB, www.wuehlhaus.de, [CC-BY-SA-4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/legalcode>)];

d) <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/15/Cefotiam.jpg> (Penicillin), Urheber und Lizenzbedingungen: Jim (Own work) [CC-BY-SA-3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)], via Wikimedia Commons;

e) http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/ba/Export_hell_seidel_steiner.png (Bier), Urheber und Lizenzbedingungen: Hans Wastlhuber User:Cointel (Own work) [CC-BY-SA-2.5 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5>)], via Wikimedia Commons;

f) http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9e/Blutzucker_messung.JPG (Blutzucker-Messgerät), Urheber und Lizenzbedingungen: Helfmann at de.wikipedia [CC-BY-SA-3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)], CC-BY-SA-3.0-de (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/deed.en>) oder GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>)], via Wikimedia Commons;

g) http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d2/MinusL_Produkte.jpg (lactosefreie Milchprodukte), Urheber und Lizenzbedingungen: OMIRA Oberland-Milchverwertung GmbH, Ravensburg (OMIRA Oberland Milchverwertung GmbH, Ravensburg) [CC-BY-SA-3.0-de (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/deed.en>)], via Wikimedia Commons;

- h) http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c1/Pr%C3%A9surep%C3%A8ral_feda_presura.JPG (Renin), Urheber und Lizenzbedingungen: LAGRIC (personnel) [GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>) oder CC-BY-SA-3.0-2.5-2.0-1.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)], via Wikimedia Commons.
- [16] L. S. Conrad, W. R. Sponholz, O. Berker, Novo Nordisk, US 6152966, **2000**.
- [17] J. D. Newman, S. J. Setford, *Mol. Biotechnol.* **2006**, *32*, 249-268.
- [18] K. M. Rentsch, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2002**, *54*, 1-9.
- [19] B. G. Katzung, *Basic and clinical pharmacology*, Lange Medical Books/McGraw Hill, New York, **2004**, 3-5.
- [20] S. Houlton, *Manuf. Chemist* **2002**, *73*, 28-30.
- [21] J. Peisach, W. E. Blumberg, *Mol. Pharmacol.* **1969**, *5*, 200-209.
- [22] I. A. Jaffe, K. Altman, P. Merryman, *J. Clin. Invest.* **1964**, *43*, 1869-1873.
- [23] 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*, 305-308.
- [24] E. Palmer, *The top 10 best-selling diabetes drugs of 2013*, **2014**, verfügbar unter: <http://www.fiercepharma.com/special-reports/the-top-10-best-selling-diabetes-drugs-2013?page=full>; zuletzt geprüft am 15.7.14.
- [25] *Top 50 pharmaceutical products by global sales 2013*, verfügbar unter: http://www.pmlive.com/top_pharma_list/Top_50_pharmaceutical_products_by_global_sales; zuletzt geprüft am 15.7.14.
- [26] A. Tanaka, T. Tosa, T. Kobayashi, *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*, CRC Press, New York, **1992**, 67-88.
- [27] A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, **2006**, 21-23.
- [28] N. Ran, L. Zhao, Z. Chen, J. Tao, *Green Chem.* **2008**, *10*, 361-372.
- [29] A. A. Brakhage, *Molecular Biotechnology of Fungal Beta-Lactam Antibiotics and Related Peptide Synthetases*, Springer Science & Business Media, Berlin, Heidelberg, **2004**, 200-202.
- [30] C. Bastioli, V. Bellotti, A. Montino, G. D. Tredici, R. Lombi, R. Ponti, Novamont S.p.A., US 5412005A, **1992**.
- [31] S. M. A. de Wildeman, T. Sonke, H. E. Schoemaker, O. May, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1260-1266.
- [32] W. Treffenfeldt, R. Fischer, S. Heiden, T. Hirth, K.-H. Maurer, C. Patermann, T. Schäfer, A. Schmid, C. Sieden, D. Weuster-Botz, H. Zinke, *Empfehlungen zum Aufbau einer wettbewerbsfähigen und nachhaltigen Bioökonomie – Beitrag der Industriellen Biotechnologie zum wirtschaftlichen Wandel in Deutschland* **2010**, verfügbar unter <http://www.biooekonomierat.de/fileadmin/templates/publikationen/berichte/Berichte04-Biotechnologie.pdf>; zuletzt geprüft am 15.7.14.
- [33] *National Bioeconomy Blueprint* **2012**, verfügbar unter http://www.whitehouse.gov/sites/default/files/microsites/ostp/national_bioeconomy_blueprint_april_2012.pdf; zuletzt geprüft am 15.7.14.
- [34] Pharma-Daten **2013**, Bundesverband der pharmazeutischen Industrie e. V., verfügbar unter http://www.bpi.de/fileadmin/media/bpi/Downloads/Internet/Publikationen/Pharma-Daten/Pharmadaten_2013_DE.pdf, zuletzt geprüft am 5.5.14.

- [35] A. Kleemann, J. Engels, B. Kutscher, *Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications*, Thieme, Stuttgart, **2001**.
- [36] Y. Zhang, C. C. Arpin, A. J. Cullen, M. J. Mitton-Fry, T. Sammakia, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7641-7653.
- [37] J. Guo, K. J. Duffy, K. L. Stevens, P. I. Dalko, R. M. Roth, M. M. Hayward, Y. Kishi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 187-192.
- [38] M. M. Hayward, R. M. Roth, K. J. Duffy, P. I. Dalko, K. L. Stevens, J. Guo, Y. Kishi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 192-196.
- [39] M. Ball, M. J. Gaunt, D. F. Hook, A. S. Jessiman, S. Kawahara, P. Orsini, A. Scolaro, A. C. Talbot, H. R. Tanner, S. Yamanoi, S. V. Ley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5433-5438.
- [40] S. D. Dreher, J. L. Leighton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 341-342.
- [41] C. S. Poss, S. D. Rychnovsky, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3360-3361.
- [42] E. L. Hazen, R. F. Brown, Research Corporation, US 2797183, **1957**.
- [43] J. D. Dutcher, W. Gold, J. F. Pegano, J. Vandeputte, Olin Mathieson, US 2908611, **1959**.
- [44] Y. Kawato, M. Iwata, R. Yazaki, N. Kumagai, M. Shibasaki, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 6539-6546.
- [45] S. Srinath, J. Mathew, S. Ujire, M. Sridharan, G. Sambasivam, Biocon Ltd., US 6867306, **2005**.
- [46] M. Manzoni, M. Rollini, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58*, 555-564.
- [47] J. Kuhlmann, W. Muck, H. Bischoff, E. von Keutz, M. Llewellyn, *Cardiovasc. Drug Rev.* **1998**, *16*, 236-263.
- [48] N. Andrushko, V. Andrushko, G. König, A. Spannenberg, A. Börner, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *5*, 847-853.
- [49] Z. Časar, M. Steinbücher, J. Košmrlj, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 6681-6684.
- [50] M. Acemoglu, A. Brodbeck, A. Garcia, D. Grimler, M. Hassel, B. Riss, R. Schreiber, *Helv. Chim. Acta* **2007**, *90*, 1069-1081.
- [51] O. Repič, K. Prasad, G. T. Lee, *Org. Process Res. Dev.* **2001**, *5*, 519-527.
- [52] J. T. Zacharia, T. Tanaka, M. Hayashi, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7514-7518.
- [53] A. R. Daniewski, P. M. Wovkulich, M. R. Uskoković, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 7133-7139.
- [54] M. R. Uskokovic, T. A. Narwid, J. A. Iacobelli, E. Baggolini, Hoffmann-La Roche Inc., US 3993675, **1976**.
- [55] G. H. Posner, N. Johnson, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7855-7861.
- [56] G. Stork, D. Hutchinson, M. Okabe, D. Parker, C. Ra, F. Ribéreau, T. Suzuki, T. Zebovitz, *Pure Appl. Chem.* **1992**, *64*, 1809-1812.
- [57] B. M. Trost, J. Dumas, M. Villa, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9836-9845.
- [58] M. Liu, B. Yu, X. Wu, Y. Hui, K.-P. Fung, *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 745-754.
- [59] M. Liu, B. Yu, Y. Hui, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 415-418.
- [60] K. Baer, M. Krauß, E. Burda, W. Hummel, A. Berkessel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9355-9358; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9519-9522.
- [61] G. Rulli, N. Duangdee, K. Baer, W. Hummel, A. Berkessel, H. Gröger, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 8092-8095; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7944-7947.
- [62] M. Krauß, *Dissertation*, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, **2011**.

- [63] K. Baer, *Dissertation*, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, **2011**.
- [64] G. Rulli, *Diplomarbeit*, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, **2009**.
- [65] G. Rulli, *Dissertation*, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, **2014**.
- [66] T. E. Kristensen, K. Vestli, K. A. Fredriksen, F. K. Hansen, T. Hansen, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2968-2971.
- [67] T. E. Kristensen, K. Vestli, M. G. Jakobsen, F. K. Hansen, T. Hansen, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1620-1629.
- [68] T. E. Kristensen, T. Hansen, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *17*, 3179-3204.
- [69] G. Rulli, K. A. Fredriksen, N. Duangdee, T. Bonge-Hansen, A. Berkessel, H. Gröger, *Synthesis* **2013**, *45*, 2512-2519.
- [70] S. E. Bode, M. Wohlberg, M. Müller, *Synthesis* **2006**, *4*, 557-588.
- [71] M. Kitamura, T. Ohkuma, S. Inoue, N. Sayo, H. Kumobayashi, S. Akutagawa, T. Ohta, H. Takaya, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 629-631.
- [72] D. J. Ager, S. A. Laneman, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 3327-3355.
- [73] L. Shao, T. Seki, H. Kawano, M. Saburi, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7699-7702.
- [74] A. Fauve, H. Veschambre, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5215-5219.
- [75] G. Dauphin, A. Fauve, H. Veschambre, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2238-2242.
- [76] A. Fauve, H. Veschambre, *Biocatalysis* **1990**, *3*, 95-109.
- [77] R. N. Patel, A. Banerjee, C. G. McNamee, D. Brzozowski, R. L. Hanson, K. L. Szarka, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 1014-1021.
- [78] M. Müller, M. Wolberg, W. Hummel, C. Wandrey, Forschungszentrum Jülich GmbH, WO 0104336, **2001**.
- [79] K. Narasaka, F.-C. Pai, *Chem. Lett.* **1980**, 1415-1418.
- [80] K. Narasaka, F.-C. Pai, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 2233-2238.
- [81] T. A. Davis, P. R. Chopade, G. Hilmersson, R. A. Flowers, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 119-122.
- [82] K. M. Gillespie, I. J. Munslow, P. Scott, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 9371-9374.
- [83] D. A. Evans, K. T. Chapman, E. M. Carreira, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3560-3378.
- [84] D. A. Evans, K. T. Chapman, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5939-5942.
- [85] A. Fettes, E. M. Carreira, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9274-9283.
- [86] N. Kizaki, Y. Yamada, Y. Yasohara, A. Nishiyama, M. Miyazaki, M. Mitsuda, T. Kondo, N. Ueyama, K. Inoue, Kaneka Corp., EP A1024139, **2000**.
- [87] C. D. Reeve, Zeneca Ltd., WO A9700968, **1997**.
- [88] A. J. Blacker, R. A. Holt, C. D. Reeve, Avecia, WO 01085975, **2001**.
- [89] B. List, R. A. Lerner, C. F. Barbas, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2395-2396.
- [90] W. Notz, B. List, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7386-7387.
- [91] H. J. Martin, B. List, *Synlett* **2003**, *12*, 1901-1902.
- [92] K. Sakthivel, W. Notz, T. Bui, C. F. Barbas, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5260-5267.
- [93] A. Cordova, W. Notz, C. F. Barbas, *Chem. Commun.* **2002**, 3024-3025.
- [94] S. G. Zlotin, A. S. Kucherenko, I. P. Beletskaya, *Russ. Chem. Rev.* **2009**, *78*, 737-784.
- [95] H. Pellissier, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9267-9331.

- [96] B. M. Trost, C. S. Brindle, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1600-1632.
- [97] V. Bisai, A. Bisai, V. K. Singh, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4541-4580.
- [98] J. Mlynarski, J. Paradowska, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1502-1511.
- [99] T. D. Machajewski, C.-H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1352-1374.
- [100] H. Gröger, J. Wilken, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 529-532.
- [101] A. Berkessel, H. Gröger, *Asymmetric Organocatalysis: From Biomimetic Concepts to Applications in Asymmetric Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [102] A. Heine, G. DeSantis, J. G. Luz, M. Mitchell, C.-H. Wong, I. A. Wilson, *Science* **2001**, *294*, 369-374.
- [103] P. I. Dalko, L. Moisan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5138-5175.
- [104] S. Saito, H. Yamamoto, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 570-579.
- [105] U. Kazmaier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2186-2188.
- [106] B. List, *Chem. Commun.* **2006**, *8*, 819-824.
- [107] S. Bahmanyar, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11273-11283.
- [108] S. Bahmanyar, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12911-12912.
- [109] T. Darbre, M. Machuqueiro, *Chem. Commun.* **2003**, *9*, 1090-1091.
- [110] Y.-Y. Peng, Q.-P. Ding, Z. Li, P. G. Wang, J.P. Cheng, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3871-3875.
- [111] Y.-S. Wu, W.-Y. Shao, C.-Q. Zheng, Z.-L. Huang, J. Cai, Q.-Y. Deng, *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 1377-1384.
- [112] Y.-S. Wu, Y. Chen, D.-S. Deng, J. Cai, *Synlett* **2005**, *10*, 1627-1629.
- [113] A. I. Nyberg, A. Usano, P. M. Pihko, *Synlett* **2004**, *11*, 1891-1896.
- [114] H. Torii, M. Nakadai, K. Ishihara, S. Saito, H. Yamamoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1983-1986.
- [115] S. S. Chimni, D. Mahajan, V. V. S. Babu, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5617-5619.
- [116] P. M. Pihko, K. M. Laurikainen, A. Usano, A. I. Nyberg, J. A. Kaavi, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 317-328.
- [117] M. Majewski, I. Niewczas, N. Palyam, *Synlett* **2006**, *15*, 2387-2390.
- [118] G. Guillena, M. del Carmen Hita, C. Nájera, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1493-1497.
- [119] C. Ji, Y. Peng, C. Huang, N. Wang, Y. Jiang, *Synlett* **2005**, *6*, 986-990.
- [120] N. Mase, Y. Nakai, N. Ohara, H. Yoda, K. Takabe, F. Tanaka, C. F. Barbas, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 734-735.
- [121] Y. Hayashi, S. Aratake, T. Okano, J. Takahashi, T. Sumiya, M. Shoji, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5527-5529.
- [122] Y. Hayashi, T. Sumiya, J. Takahashi, H. Gotoh, T. Urushima, M. Shoji, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 958-961.
- [123] J.-F. Zhao, L. He, J. Jiang, Z. Tang, L.-F. Cun, L.-Z. Gong, *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 3372-3375.
- [124] B. Wang, X.-W. Liu, L.-Y. Liu, W.-X. Chang, J. Li, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *31*, 5951-5954.
- [125] Y.-N. Jia, F.-C. Wua, X. Maa, G.-J. Zhu, C.-S. Da, *Tetrahedron Letters* **2009**, *50*, 3059-3062.
- [126] Y.-Q. Fu, Z.-C. Li, L.-N. Ding, J.-C. Tao, S.-H. Zhang, M.-S. Tang, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 3351-3357.
- [127] A. Psarra, C. G. Kokotos, P. Moutevelis-Minakakis, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 608-615.

- [128] M. R. Vishnumaya, S. K. Ginotra, V. K. Singh, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4097-4099.
- [129] M. R. Vishnumaya, V. K. Singh, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2593-2595.
- [130] K. Alfonsi, J. Colberg, P. J. Dunn, T. Fevig, S. Jennings, T. A. Johnson, H. P. Kleine, C. Knight, M. A. Nagy, D. A. Perry M. Stefaniak, *Green Chem.* **2008**, *10*, 31-36.
- [131] R. A. Sheldon, *Green Chem.* **2005**, *7*, 267-278.
- [132] J. C. Moore, D. J. Pollard, B. Kosjek, P. N. Devine, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1412-1419.
- [133] S. M. A. de Wildeman, T. Sonke, H. E. Schoemaker, O. May, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1260-1266.
- [134] Übersicht kommerzieller Enzyme, Syncozymes, verfügbar unter <http://www.syncorelabs.com/enzymes2.asp?xll=kred>, zuletzt geprüft am 10.6.14.
- [135] Übersicht kommerzieller Enzyme, Codexis, verfügbar unter http://www.codexis.com/documents/codexis_enzyme_platforms%20UPDA TED%20v1.pdf, zuletzt geprüft am 10.6.14.
- [136] D. J. Pollard, J. M. Woodley, *Tibtech* **2006**, *25*, 66-73.
- [137] K. Drauz, H. Gröger, O. May, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, 1037-1110.
- [138] V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales, *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, Wiley-VCH, **2008**, 216-220.
- [139] S. Buchholz, H. Gröger, *Enantioselective Biocatalytic Reduction of Ketones for the Synthesis of Optically Active Alcohols* in R. N. Patel, *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*, CRC Press, Boca Raton, **2006**, 757-790.
- [140] J. Liang, J. Lalonde, B. Borup, V. Mitchell, E. Mundorff, N. Trinh, D. A. Kochrekar, R. N. Cherat, G. G. Pai, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 193-198.
- [141] T. Scheper, *New Enzymes for Organic Synthesis: "Screening, Supply And Engineering"*, Springer, Heidelberg, **1999**, 157.
- [142] K. Nakamura, R. Yamanaka, T. Matsuda, T. Harada, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2659-2681.
- [143] V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119-130.
- [144] H. Jornwall, *Eur. J. Biochem.* **1977**, *72*, 425-442.
- [145] M. F. Dum, J.-F. Biellmann, G. Branlant, *Biochemistry* **1975**, *14*, 3176-3182.
- [146] J. P. Klinman, *Crit. Rev. Biochem.* **1981**, *10*, 39-78.
- [147] A. Vanni, E. Pessione, L. Anfossi, C. Baggiani, M. Cavaletto, M. Gulmini, C. Giunta, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *9*, 283-291.
- [148] J. Benach, S. Atrian, R. Gonzalez-Duarte, R. Ladenstein, *J. Mol. Biol.* **1999**, *289*, 335-355.
- [149] V. M. Williamson, C. E. Paquin *Mol. Gen. Genet.* **1987**, *209*, 374-381.
- [150] G. E. de Vries, N. Arfman, P. Terpstra, L. Dijkhuizen, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 5346-5353.
- [151] H. Jornwall, *Eur. J. Biochem.* **1970**, *16*, 25-40.
- [152] C. Lee, D. L. Bedgar, L. B. Davin, N. G. Lewis, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1127-1134.
- [153] P. Liang, B. Qin, M. Mu, X. Zhang, X. Jia, S. You, *Biotechnol. Lett.* **2013**, *35*, 1469-1473.

- [154] C. W. Bradshaw, H. Fu, G.-J. Shen, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1526-1532.
- [155] C. W. Bradshaw, W. Hummel, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1532-1536.
- [156] K. Nakamura, T. Shiraga, T. Miyai, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63*, 1735-1737.
- [157] H. Dutler, J.L. van der Baan, E. Hochuli, Z. Kis, K. E. Taylor, *Eur. J. Biochem.* **1977**, *75*, 423-432.
- [158] K. Velonia, I. Tsigos, V. Bouriotis, I. Smonou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 65-68.
- [159] J. B. Jones, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3351-3403.
- [160] H. Gröger, F. Chamouleau, N. Orologas, C. Rollmann, K. Drauz, W. Hummel, A. Weckbecker, O. May, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5677-5681.
- [161] D. Zhu, Y. Yang, L. Hua, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4202-4205.
- [162] M. D. Truppo, D. Pollard, P. Devine, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 335-338.
- [163] J. D. Carballeira, E. Álvarez, M. Campillo, L. Pardoc, J. V. Sinisterra, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 951-962.
- [164] B. T. Grau, P. N. Devine, L. N. di Michele, B. Kosjek, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4951-4954.
- [165] R. Hess, S. Diezi, T. Mallat, A. Baiker, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 251-257.
- [166] A. L. Botes, D. Harvig, M. S. van Dyk, I. Sarvary, T. Frejd, M. Katz, B. Hahn-Hägerdal, M. F. Gorwa-Grauslund, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2002**, *8*, 1111-1114.
- [167] S. Sasaki, T. Yamauchi, H. Kubo, M. Kanai, A. Ishii, K. Higashiyama, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1497-1500.
- [168] Chemikalienkatalog von Sigma Aldrich; online verfügbar unter: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/AdvancedSearchPage.do>.
- [169] H. Zhao, W. A. van der Donk, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 583-589.
- [170] R. Wichmann, D. Vasic-Racki, *Cofactor Regeneration at the Lab Scale in Technology Transfer in Biotechnology*, Springer, Heidelberg, **2005**, 225-260.
- [171] W. Liu, P. Wang, *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 369-384.
- [172] E. Brenna, S. Kara, J. H. Schrittwieser, F. Hollmann, *Strategies for Cofactor Regeneration in Biocatalyzed Reductions in Synthetic Methods for Biologically Active Molecules: Exploring the Potential of Bioreductions*, Wiley-VCH, Weinheim, **2014**, 209-238.
- [173] C. H. Wong, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4890-4899.
- [174] N. Kizaki, Y. Yasohara, J. Hasegawa, M. Wada, M. Kataoka, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *55*, 590-595.
- [175] W. Hummel, M. R. Kula, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *184*, 1-13.
- [176] V. I. Tishkov, V. O. Popov, *Biomol. Eng.* **2006**, *23*, 89-110.
- [177] K. Hoelsch, I. Sührer, M. Heusel, D. Weuster-Botz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *97*, 2473-2481.
- [178] T. M. Johannes, R. D. Woodyer, H. Zhao, *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *96*, 18-26.
- [179] R. Hirota, S. T. Yamane, T. Fujibuchi, K. Motomura, T. Ishida, T. Ikeda, A. Kuroda, *J. Biosci. Bioeng.* **2012**, *113*, 445-450.
- [180] R. Mertens, A. Liese, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 343-348.

- [181] R. Mertens, L. Greiner, E. C. D. van den Ban, H. B. C. M. Haaker, A. Liese, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *24*, 39-52.
- [182] M. Villela Filho, T. Stillger, M. Müller, A. Liese, C. Wandrey, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2993-2996.
- [183] K. Edegger, C. C. Gruber, T. M. Poessl, S. R. Wallner, I. Lavandera, K. Faber, F. Niehaus, J. Eck, R. Oehrlein, A. Hafner, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2006**, *22*, 2402-2404.
- [184] A. Gupta, A. Zimmer, M. Bobkova, WO 2005108593, **2005**.
- [185] A. Gupta, K. Breese, G. Bange, P. Neubauer, WO 2002086126, **2002**.
- [186] H. E. Schoemaker, D. Mink, M. G. Wubbolts, *Science* **2003**, *299*, 1694-1697.
- [187] R. N. Patel, *Enz. Microb. Technol.* **2002**, *31*, 804-826.
- [188] A. Schmid, F. Hollmann, J. B. Park, B. Bühler, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 359-366.
- [189] N. M. Shaw, K. T. Robins, A. Kiener, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 425-435.
- [190] A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258-268.
- [191] A. Liese, M. Villela Filho, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 595-603.
- [192] S. M. Thomas, R. DiCosimo, V. Nagarajan, *Tibtech* **2002**, *20*, 238-242.
- [193] G. W. Huisman, D. Gray, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 352-358.
- [194] A. J. J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 548-556.
- [195] D. Dai, L. Xia, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2006**, *134*, 39-49.
- [196] J. Kim, H. Jia, P. Wang, *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 296-308.
- [197] Z. G. Wang, L. S. Wan, Z. M. Liu, X. J. Huang, Z. K. Xu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *56*, 189-195.
- [198] H. Wen, V. Nallathambi, D. Chakraborty, S. C. Barton, *Microchim. Acta* **2001**, *175*, 283-289.
- [199] L. Cao, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 217-226.
- [200] U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3336-3337.
- [201] W. Tischer, V. Kascher, *Tibtech* **1999**, *17*, 326-335.
- [202] B. Krajewska, *Enz. Microb. Technol.* **2004**, *35*, 126-139.
- [203] T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata, *Enzymologia* **1966**, *31*, 214-224.
- [204] A. J. J. Straathof, A. Liese, C. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations (2nd ed.)*, VCH-Wiley, Weinheim, **2006**, 515-520.
- [205] U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 453-468.
- [206] F. A. Quijcho, F. M. Richards, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1964**, *52*, 833-839.
- [207] L. Cao, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1361-1364.
- [208] L. Cao, L. van Langeney, R. A. Sheldon, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *14*, 387-394.
- [209] R. A. Sheldon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92*, 467-477.
- [210] S. Datta, L. R. Christena, Y. R. S. Rajaram, *Biotech* **2013**, *3*, 1-9.
- [211] R. R. Antrim, A. L. Auterinen, *Stärke* **1986**, *38*, 132-137.
- [212] U. Edlund, T. Sauter, A.-C. Albertsson, *Polym. Adv. Technol.* **2011**, *22*, 166-171.
- [213] S. Park, J. Pai, E.-H. Han, C.-H. Jun, I. Shin, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1246-1253.
- [214] Y. Zhang, J.-L. Xu, D. Li, Z.-H. Yuan, *Biocatal. Biotransform.* **2010**, *28*, 313-319.

- [215] U. Saxena, M. Chakraborty, P. Goswami, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 3037-3043.
- [216] J. Křenkova, F. Foret, *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3550-3563.
- [217] T. Boller, C. Meier, S. Menzler, *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 509-519.
- [218] A. I. Kallenberg, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 905-926.
- [219] M. A. Wegman, M. H. A. Janssen, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 559-576.
- [220] E. Katchalski-Katzir, D. M. Kraemer, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *10*, 157-176.
- [221] R. C. C. Jordao, N. H. da Silva, L. B. Carvalho, *Biotechnol Tech.* **1996**, *10*, 59-62.
- [222] D. Murtinho, A. R. Lagoa, F. A. P. Garcia, M. H. Gil, *Cellulose* **1998**, *5*, 299-308.
- [223] C. Scotti, C. Hutchinson, *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *48*, 133-140.
- [224] D. Brady, J. Jordaan, *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1639-1650.
- [225] F. Vaillant, A. Millan, P. Millan, M. Dornier, M. Decloux, M. Reynees, *Process Biochem.* **2000**, *35*, 989-996.
- [226] M. Kapoor, R. C. Kuhad, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2007**, *142*, 125-138.
- [227] X. J. Huang, P. C. Chen, F. Huang, Y. Ou, M. R. Chen, Z. K. Xu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *70*, 95-100.
- [228] M. P. Klein, C. W. Scheeren, A. S. G. Lorenzoni, J. Dupont, J. Frazzon, P. F. Hertz, *Process Biochem.* **2011**, *46*, 1375-1379.
- [229] K. Labus, A. Turek, J. Liesiene, J. Bryjak, *Biochem. Eng. J.* **2011**, *56*, 232-240.
- [230] A. I. Raafat, E. Araby, S. Lotfy, *Carbohydr. Polym.* **2011**, *87*, 1369-1374.
- [231] L. Gómez, H. L. Ramírez, A. Neira-Carrillo, R. Villalonga, *Bioproc. Biosyst. Eng.* **2006**, *28*, 387-395.
- [232] S. Hosseinkhani, R. Szittner, M. Nemat-Gorgani, E. A. Meighen, *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *32*, 186-193.
- [233] A. Basso, B. A. Maltman, S. L. Flitsch, G. Margetts, I. Brazendale, C. Ebert, P. Linda, S. Verdellia and L. Gardossi, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 971-976.
- [234] S. S. Pai, F. Heinrich, A. L. Canady, T. M. Przybycien, R. D. Tilton, *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, *370*, 170-175.
- [235] S. Takaç, M. Bakka, *Process Biochem.* **2007**, *42*, 1021-1027.
- [236] A. Kumari, A. M. Kayastha, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *69*, 8-14.
- [237] A. A. Khan, S. Akhtar, Q. Husain, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 58-63.
- [238] M. Ferrer, F. J. Plou, G. Fuentes, M. Angeles Cruces, L. Andersen, O. Kirk, M. Christensen, A. Ballesteros, *Biocatal. Biotransform.* **2002**, *20*, 63-71.
- [239] M. Persson, E. Wehtje, P. Adlercreutz, *Biotechnol. Lett.* **2000**, *22*, 1571-1575.
- [240] F. Jia, B. Narasimhan, S. Mallapragada, *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111*, 209-222.
- [241] R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289-1307.
- [242] H. H. P. Yiu, P. A. Wright, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3690-3700.
- [243] M. T. Reetz, K.-E. Jaeger, *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *93*, 3-14.
- [244] A. C. Pierre, *Biocatal. Biotransformation* **2004**, *22*, 145-170.
- [245] D. M.-R. De Temiño, W. Hartmeier, M. B. Ansorge-Schumacher, *Enz. Microb. Technol.* **2005**, *36*, 3-9.
- [246] V. I. Lozinski, F. M. Plieva, *Enz. Microb. Technol.* **1998**, *23*, 227-242.

- [247] T. Hischer, D. Gocke, M. Fernandez, P. Hoyos, A. R. Alcantara, J. V. Sinisterra, W. Hartmeier, M. B. Ansorge-Schumacher, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7378-7383.
- [248] J. Lalonde, A. Margolin, K. Drauz, H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, 163-184.
- [249] G. E. Jeromin, *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1717-1721.
- [250] G. E. Jeromin, DE102008038326B4, **2011**.
- [251] V. I. Lozinsky, I. Y. Galaev, F. M. Plieva, I. N. Savina, H. Jungvid, B. Mattiasson, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 445-451.
- [252] M. Jekel, A. Buhr, T. Willke, K.-D. Vorlop, *Chem. Eng. Technol.* **1998**, *21*, 275-278.
- [253] A. Durieux, X. Nicolay, J.-P. Simon, *Biotechnol. Lett.* **2000**, *22*, 175-182.
- [254] D. Kubac, A. Cejkova, J. Masak, V. Jirku, M. Lemaire, E. Gallienne, J. Bolte, R. Stloukal, L. Martinkova, J. *Mol. Catal. B: Enzymatic* **2006**, *39*, 59-61.
- [255] H. Gröger, E. Capine, A. Barthuber, K.-D. Vorlop, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1969-1972.
- [256] D. Metrangolo-Ruiz de Temino, W. Hartmeier, M. B. Ansorge-Schumacher, *Enz. Microb. Technol.* **2005**, *36*, 3-9.
- [257] G. De Gonzalo, I. Lavandera, K. Faber, W. Kroutil, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2163-2166.
- [258] A. Jakoblinnert, R. Mladenov, A. Paul, F. Sibilla, U. Schwaneberg, M. B. Ansorge-Schumacher, P. Dominguez de Maria, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12230-12232.
- [259] G. Bell, P. J. Halling, B. D. Moore, J. Patridge, D. G. Rees, *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 468-473.
- [260] M. J. Blandamer, J. B. F. N. Engberts, P. T. Gleeson, J. C. R. Reis, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 440.
- [261] G. Bell, A. E. M. Janssen, P. J. Halling, *Enzyme and Microbial Technology* **1997**, *20*, 471-477.
- [262] L. Kvittingen, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 8253-8274.
- [263] C. Laane, S. Boeren, K. Vos, C. Veeger, *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, 81-87.
- [264] B. List, P. Pojarliev, C. Castello, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 573-575.
- [265] D. Gryko, R. Lipiński, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *17*, 3864-3876.
- [266] T. Ishikawa, E. Uedo, S. Okada, S. Saito, *Synlett* **1999**, *4*, 450-452.
- [267] S. Bahmanyar, K. N. Houk, H. J. Martin, B. List, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2475-2479.
- [268] B. List, L. Hoang, H. J. Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 5839-5842.
- [269] C. Allemann, C., R. Gordillo, F. R. Clemente, P. H.-Y. Cheong, K. N. Houk, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 558-569.
- [270] Z. Tang, Z.-H. Yang, X.-H. Chen, L.-F. Cun, A.-Q. Mi, Y.-Z. Jiang, L.-Z. Gong, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9285-9289.
- [271] C. Marquez, J. O. Metzger, *Chem. Commun.* **2006**, *14*, 1539-1541.
- [272] D. Gryko, M. Zimnicka, R. Lipinski, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 964-970.
- [273] N. Mase, F. Tanaka, C. F. Barbas, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4369-4372.
- [274] M. R. Vishnumaya, V. K. Singh, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4289-4297.
- [275] S. S. Chimni, D. Mahajan, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2108-2119.
- [276] S. S. Chimni, S. Singh, D. Mahajan, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2276-2284.

- [277] S. Luo, H. Xu, J. Li, L. Zhang, X. Mi, X. Zheng, J.-P. Cheng, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11307-11314.
- [278] Y. Wu, Y. Zhang, M. Yu, G. Zhao, S. Wang, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4417-4420.
- [279] S. Guizzetti, M. Benaglia, L. Raimondi, G. Celentano, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1247-1250.
- [280] G Tang, X. Hub, H. J. Altenbach, *Tetrahedron Letters* **2011**, *52*, 7034-7037.
- [281] B. Wang, G.-H. Chen, L.-Y. Liu, W.-X. Chang, J. Li, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 2441-2448.
- [282] D. Gryko, W. J. Saletta, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2148-2153.
- [283] D. Font, C. Jimeno, M. A. Pericas, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4653-4655.
- [284] C. Wang, Y. Jiang, X.-X. Zhang, Y. Huang, B.-G. Li, G.-L. Zhang, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4281-4285.
- [285] G. L. Puleo, A. Iuliano, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2894-2900.
- [286] L. Hoang, S. Bahmanyar, K. N. Houk, B. List, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16-17.
- [287] F. Chen, S. Huang, H. Zhang, F. Liu, Y. Peng, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 9585-9591.
- [288] A. P. Brogan, T. J. Dickerson, K. D. Janda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 8100-8102.
- [289] B. J. Mayer, T. A. Spencer, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6349-6354.
- [290] C. Agami, J. Levisalles, C. J. Puchot, *Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, *4*, 441-442.
- [291] J.-R. Chen, H.-H. Lu, X.-Y. Li, L. Cheng, J. Wan, W.-J. Xiao, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4543-4545.
- [292] C. M. Mortimer, U. Müller, *Das Basiswissen der Chemie*, Thieme, Stuttgart, **2003**.
- [293] H. R. Christen, F. Vögtle, *Grundlagen der organischen Chemie*, Diesterweg, Braunschweig, **1998**.
- [294] J. D'Ans, E. Lax, *Taschenbuch für Chemiker und Physiker*, Springer, Berlin, **1996**.
- [295] L. F. Fieser, M. Fieser, *Organische Chemie*, VCL-Wiley, Weinheim, **1989**.
- [296] S. Fotaras, C. G. Kokotos, E. Tsandi, G. Kokotos, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 1310-1317.
- [297] P. Revelou, C. G. Kokotos, P. Moutevelis-Minakakis, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 8732-8738.
- [298] N. Shapiro, A. Vigalok, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2849-2852.
- [299] A. Leclerc, M. Alame, D. Schweich, P. Pouteau, C. Delattre, C. de Bellefon, *Lab Chip* **2008**, *8*, 814-817.
- [300] L. Vanoye, A. Aloui, M. Pablos, R. Philippe, A. Percheron, A. Favre-Réguillon, C. de Bellefon, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5978-5981.
- [301] L. Vanoye, A. Favre-Réguillon, A. Aloui, R. Philippe, C. de Bellefon, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 18931-18937.
- [302] P. T. Anastas, J. C. Warner, Green chemistry. *Theory and practice*, Oxford Univ. Press, Oxford, **2000**.
- [303] R. Battino, T. R. Rettich, T. J. Tominaga, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1983**, *12*, 163-178.
- [304] M. Quaranta, M. Murkovic, I. Klimant, *Analyst* **2013**, *138*, 6243-6245.
- [305] J. V. O'Fallon, R. W. Wright, R. E. Calza, *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 193-199.

- [306] J. L. R. Livingston, A. H. Richardson, *J. Phys. Chem.* **1930**, *34*, 1818-1821.
- [307] E. Douglas, *J. Phys. Chem.* **1964**, *68*, 169-174.
- [308] R. T. Ferrell, D. M. Himmelblau, *J. Chem. Eng. Data* **1967**, *12*, 111-115.
- [309] J. Tokunaga, *J. Chem. Eng. Data* **1975**, 41-46.
- [310] C. B. Kretschmer, J. Nowakowska, R. Wiebe, *Ind. Eng. Chem.* **1946**, *38*, 506-509.
- [311] National Institute of Standards and Technology, Wert für das molare Volumen eines idealen Gases unter Normbedingungen (273.15 Kelvin, 101.325 kPa); verfügbar unter <http://physics.nist.gov/cgi-bin/cuu/Value?mvolstd>, zuletzt geprüft am 28.03.14.
- [312] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, VCL-Wiley, Weinheim, **2001**.
- [313] ChemAxon's Marvin Sketch; verfügbar unter <https://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>, zuletzt geprüft am 31.03.14.
- [314] Infinity Research Ltd., *Global Vitamins Market 2014-2018*, **2014**, verfügbar unter: <https://www.reportbuyer.com/product/2009027/global-vitamins-market-2014-2018.html>.
- [315] Global Industry Analysts Inc., *Vitamins: A Global Strategic Business Report*, **2011**, verfügbar unter: http://www.strategyr.com/Vitamins_Market_Report.asp.
- [316] S. Shimizu, *Biotechnology Set*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2008**, 320-337.
- [317] E. Naruta, V. Buko, *Exp. Toxicol. Pathol.* **2001**, *53*, 393-398.
- [318] B. I. Weimann, D. Hermann, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **1999**, *69*, 113-119.
- [319] P. C. Schalock, F. J. Storrs, L. Morrison, *Contact Dermatitis* **2000**, *43*, 223-251.
- [320] S. J. Wakil, *Biochemistry* **1989**, *28*, 4523-4530.
- [321] S. Smith, *The FASEB Journal* **1994**, *8*, 1248-1259.
- [322] Legumex Impex Pvt Ltd., Analysis of Imports of CALPAN 98 FEED **2013**, verfügbar unter: <https://www.zauba.com/importanalysis-CALPAN+98+FEED/hs-code-23099010-report.html>, zuletzt geprüft am 21.7.14.
- [323] E. Glaser, *Monatsh. Chem.* **1904**, *25*, 46-54.
- [324] R. Kuhn, T. Wieland, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1942**, *75*, 121-123.
- [325] J. H. Ford, *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, *66*, 20-21.
- [326] W. Bonrath, T. Netscher, *Appl. Catal., A* **2005**, *280*, 55-73.
- [327] T. Reichstein, A. Grüssner, *Helv. Chim. Acta* **1940**, *23*, 650-656.
- [328] E. T. Stiller, S. A. Harris, J. Finkelstein, J. C. Keresztesy, K. Folkers, *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 1785-1795.
- [329] S. Shimizu, M. Kataoka, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1996**, *799*, 650-658.
- [330] S. Shimizu, M. Kataoka, *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*, Wiley VCH, **1999**, 1571-1577.
- [331] International Agency for Research on Cancer, *Pressemitteilung Nr. 153* (15. Juni **2004**), verfügbar unter: <http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2004/pr153.html>, zuletzt geprüft am 22.7.14.
- [332] European Chemicals Agency, *Candidate List of Substances of Very High Concern for Authorisation* (Stand 16. Juni **2014**), verfügbar unter: <http://echa.europa.eu/documents/10162/6bfa2760-846d-4d20-b630-ccb4f4c3f6f>, zuletzt geprüft am 22.7.14.
- [333] P. T. Anastas, N. Eghbalia, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301-312.

- [334] Y. Hayashi, S. Aratake, T. Itoh, T. Okano, T. Sumiya, M. Shoji, *Chem. Commun.* **2007**, *9*, 957-959.
- [335] A. B. Northrup, I. K. Mangion, F. Hettche, D. W. C. MacMillan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2152-2154.
- [336] U. Scheffler, R. Mahrwald, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 2310-2330.
- [337] Amedjkouh, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 390-395.
- [338] S. B. Tsogoeva, S. Wei, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 1947-1951.
- [339] Y. Y. Peng, S. J. Peng, Q. P. Ding, Q. Wang, J. P. Cheng, *Chin. J. Chem.* **2007**, *25*, 356-363.
- [340] Y. Hayashi, T. Itoh, N. Nagae, M. Ohkubo, H. Ishikawa, *Synlett* **2008**, *10*, 1565-1570.
- [341] X. Wu, Z. Ma, Z. Ye, S. Qian, G. Zhao, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 158-162
- [342] K. Inomata, M. Barrague, L. A. Paquette, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 533-539.
- [343] T. Nagamine, K. Inomata, Y. Endo, L. A. Paquette, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 123-131.
- [344] D. A. Bock, C. W. Lehmann, B. List, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 20636-20641.
- [345] M. B. Schmid, K. Zeitler, R. M. Gschwind, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4997-5003.
- [346] M. B. Schmid, K. Zeitler, R. M. Gschwind, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3005-3015.
- [347] A. Bassan, W. Zou, E. Reyes, F. Himo, A. Córdova, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7028-7032.
- [348] Z. Jiang, J. Yang, X. Han, J. Luo, M. W. Wong, Y. Lu, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1368-1377.
- [349] F. R. Clemente, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11294-11302.
- [350] H. E. Zimmerman, M. D. Traxler, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 1920-1923.
- [351] Y.-H. Lam, K. N. Houk, U. Scheffler, R. Mahrwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6286-6295.
- [352] D. Seebach, J. Goliński, *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 1413-1423.
- [353] M. Markert, U. Scheffler, R. Mahrwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16642-16643.
- [354] K. Folkers, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **1969**, *39*, 334-352.
- [355] F. G. Hopkins, *Analyst* **1906**, *31*, 385-404.
- [356] Bildquellen im Rahmen verschiedener Creative Commons Lizenzvereinbarungen verfügbar unter:
- http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c7/Frederick_Gowland_Hopkins.jpg (Frederick Gowland Hopkins), Urheber und Lizenzbedingungen: F.A. Swaine Ltd. [CC-BY-4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)], via Wikimedia Commons;
 - http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e9/Kanehiro_Takaki.JPG (Takaki Kanehiro), Urheber und Lizenzbedingungen: Bigslope (take a picture) [Public domain], via Wikimedia Commons;
 - <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/24/Eijkman.jpg> (Christiaan Eijkman), Urheber und Lizenzbedingungen: Unbekannter Fotograf [Public domain], via Wikimedia Commons
 - http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/35/Casimir_Funk_01.jpg (Casimir Funk), Urheber und Lizenzbedingungen: Unbekannter Fotograf [Public domain], via Wikimedia Commons.

- [357] C. Eijkman, *Virchows Arch.* **1897**, *148*, 523-532.
- [358] R. Grewe, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1936**, *242*, 89-96.
- [359] R. Grewe, *Naturwissenschaften* **1936**, *24*, 657-662.
- [360] L. Rosenfeld, *Clin. Chem.* **1997**, *43*, 680-685.
- [361] C. Funk, *J. State Med.* **1913**, *20*, 341-368.
- [362] R. Schnabel, D. Haffner, *Monatsschr. Kinderheilkd.* **2005**, *153*, 77-90.
- [363] G. A. Goldsmith, H. P. Sarett, U. D. Register, J. Gibbens, *J. Clin. Invest.* **1952**, *31*, 533-542.
- [364] L. Delgado-Sanchez, D. Godkar, S. Niranjana, *Am. J. Ther.* **2008**, *15*, 173-175.
- [365] J. H. Crandon, C. C. Lund, D. B. Dill, *New Eng. J. Med.* **1940**, *223*, 353-369.
- [366] M. Levine, C. Conry-Cantilena, Y. Wang, R. W. Welch, P. W. Washko, K. R. Dhariwal, J. B. Park, A. Lazarev, J. F. Graumlich, J. King, L. R. Cantilena, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 3704-3709.
- [367] M. Eggersdorfer, D. Laudert, U. Létinois, T. McClymont, J. Medlock, T. Netscher, W. Bonrath, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12960-12990.
- [368] E. V. McCollum, C. Kennedy, *J. Biol. Chem.* **1916**, *24*, 491-502.
- [369] J. C. Drummond, *Biochem. J.* **1920**, *14*, 660-660.
- [370] R. J. Williams, *J. Biol. Chem.* **1919**, *38*, 465-486.
- [371] R. J. Williams, E. M. Bradway, *J. Am. Chem. Soc.* **1931**, *53*, 783-789.
- [372] R. J. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 2719-2723.
- [373] O. W. Richards, *J. Biol. Chem.* **1938**, *113*, 531-536.
- [374] T. H. Jukes, *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 975-976.
- [375] Y. Subbarow, C. H. Hitchings, *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 1615-1616.
- [376] H. P. Sarett, J. J. Barboriak, *Am. J. Clin. Nutr.* **1963**, *13*, 378-384.
- [377] S. Kimura, Y. Furukawa, J.-i. Wakasugi, Y. Ishihara, A. Nakayama, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1980**, *26*, 113-117.
- [378] W. L. Williams, E. Hoff-Jørgensen, E. E. Snell, *J. Biol. Chem.* **1949**, *177*, 933-940.
- [379] H. van den Berg, *Eur. J. Clin. Nutr. (Suppl.)* **1997**, *51*, 62-63.
- [380] A. C. Wiese, W. P. Lehrer, Jr., P. R. Moore, O. F. Pahnish, W. V. Hartwell, *J. Anim. Sci.* **1951**, *10*, 80-87.
- [381] A. J. Sheppard, B. C. Johnson, *J. Nutrition* **1957**, *61*, 195-205.
- [382] R. E. Hodges, M. A. Ohlson, W. B. Bean, *J. Clin. Invest.* **1958**, *37*, 1642-1657.
- [383] N. Plesofsky-Vig, *Modern Nutrition in Health and Disease*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **1999**, 423-432.
- [384] J. J. Otten, J. P. Hellwig, L. D. Meyers, *Dietary reference intakes: The essential guide to nutrient requirements*, The National Academies Press, Washington, DC, **2008**.
- [385] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level*, Wiley & Sons, Hoboken, NJ, **2006**.
- [386] C. M. Smith, W. O. Song, *J. Nutr. Biochem.* **1996**, *7*, 312-321.
- [387] Y. M. Kuo, S. J. Hayflick, J. Gitschier, *J. Inherit. Metab. Dis.* **2007**, *30*, 310-317.
- [388] D. C. Schmuck, H. Wennemers, M. Kessler, *Highlights in Bioorganic Chemistry*, WILEY-VCH, Weinheim, **2004**, 501-510.
- [389] W. B. Bean, R. E. Hodges, K. Daum, J. T. Bradbury, R. Gunning, J. Manresa, W. Murray, P. Oliver, J. I. Routh, H. P. Schedl, M. Townsend, I. C. Tung, *J. Clin. Invest.* **1955**, *34*, 1073-1084.
- [390] M. Glusman, *Am. J. Med.* **1947**, *3*, 211-223.

- [391] R. L. Golden, F. S. Mortati, G. A. Schroeter, *J. Am. Med. Assoc.* **1970**, *213*, 628-628.
- [392] R. Leonardi, Y. M. Zhang, C. O. Rock, S. Jackowski, *Prog. Lipid Res.* **2005**, *44*, 125-153.
- [393] D. Bartoldus, E. Broger, F. Hoffmann-La Roche & Co AG, DE 29 19 515 A1, **1979**.
- [394] D. Bartoldus, E. Broger, Hoffmann-La Roche Inc., US 42 58 210 A1, **1981**.
- [395] F. Eisele, R. Karge, R. Spruijtenburg, DSM IP Assets B.V., WO 2009/016025 A1, PCT/EP2008/059201, **2009**.
- [396] A. P. De Leenheer, W. Lambert, *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*, CRC Press, **2000**, 532-532.
- [397] T. Rowicki, L. Synoradzki, M. Włostowski, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, *45*, 1259-1265.
- [398] Feedinfo News Service, Global Data Systems **2009**, verfügbar unter <http://www.thefreelibrary.com/D+Calcium+Pantothenate%3a+Over+Capacity+Puts+Downward+Pressure+on...-a0213867662>, zuletzt geprüft am 4.7.14.
- [399] H. K. Biesalski, J. Köhrlé, K. Schümann, *Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe* **2002**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 111-116.
- [400] I. Elmadfa, C. Leitzmann, *Ernährung des Menschen* **2004**, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 374-380.
- [401] C. Leitzmann, C. Müller, P. Michel, U. Brehme, A. Hahn, H. Laube, *Ernährung in Prävention und Therapie* **2005**, Hippokrates Verlag, Stuttgart, 46-47.
- [402] S. Cannizzaro, *Liebigs Ann. Chem.* **1853**, *88*, 129-130.
- [403] J. Paust, S. Pechl, W. Reif, W. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1978**, *6*, 1024-1029.
- [404] S. S. Schaeren, F. Hoffmann-La Roche & Co, DE 1568755, **1970**.
- [405] W. J. Gottstein, L. C. Cheney, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2072-2073.
- [406] C. Fizet, *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 404-409.
- [407] F. Kagan, R. V. Heinzelman, D. I. Weisblat, W. Greiner, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3545-3549.
- [408] R. T. Major, J. Finkelstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 1368-1371.
- [409] K. Kaiser, B. de Potzolli, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley VCH, **1996**, 559-572.
- [410] L. Haughton, J. M. J. Williams, J. A. Zimmermann, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1697-1701
- [411] H. S. Bevinakatti, A. A. Banerji, R. V. Newadkar, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2453-2455.
- [412] B. I. Glänzer, K. Faber, H. Griengl, *Enzyme Microb. Technol.* **1988**, *10*, 689-690.
- [413] K. Miyazawa, N. Yoshida, Chisso Corporation, EP 0439779A2, **1991**.
- [414] M. Baumann, B. H. Hauer, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 4781-4790.
- [415] M. Kataoka, J.-i. Nomura, M. Shinohara, K. Nose, K. Sakamoto, S. Shimizu, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 1255-1262.
- [416] S. Shimizu, M. Kataoka, K. Honda, K. Sakamoto, *J. Biotechnol.* **2001**, *92*, 187-194.
- [417] M. Kessler, B. Hauer, T. Friedrich, R. Mattes, BASF Aktiengesellschaft, WO 01/32890A1, **2000**.

- [418] K. Sakamoto, K. Honda, K. Wada, S. Kita, K. Tsuzaki, H. Nose, M. Kataoka, S. Shimizu, *J. Biotech.* **2005**, *118*, 99-106.
- [419] K. Kataoka, K. Shimizu, K. Sakamoto, H. Yamada, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *44*, 333-338.
- [420] S. Shimizu, M. Kataoka, K. Shimizu, M. Hirakata, K. Sakamoto, H. Yamada, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *209*, 383-390.
- [421] K. Sakamoto, H. Yamada, S. Shimizu, Fuji Yakuhin Kogyo Kabushiki Kaisha, EP 436730B1, **1995**.
- [422] K. Sakamoto, H. Yamada, S. Shimizu, Fuji Yakuhin Kogyo Kabushiki Kaisha, EP 504421 B1, **1995**.
- [423] M. R. Penn, J. J. Pauer, J. R. Mihelcic, *Environ. Ecol. Chem.* **2009**, 278-299.
- [424] M. Kessler, T. Friedrich, H. W. Höffken, B. Hauer, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 1103-1110.
- [425] D. A. Evans, J. Wu, C. E. Masse, D. W. C. MacMillan, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3379-3382.
- [426] H. J. Bestmann, R. Schobert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, *24*, 790-791.
- [427] T. Poll, A. Sabczak, H. Hartmann, G. Helmchen, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 3095-3098.
- [428] J. Knol, J. F. G. A. Jansen, F. van Bolhuis, B. L. Feringa, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7465-7468.
- [429] C. Cativiela, J.-A. Mayoral, A. Avenoza, J. M. Peregrina, F. J. Lahoz, S. Gimeno, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4664-4669.
- [430] J. A. O'Meara, N. Gardee, M. Jung, R. N. Ben, T. J. Durst, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3117-3119.
- [431] H. M. L. Davies, G. Ahmed, R. L. Calvo, M. R. Churchill, D. G. Churchill, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2641-2645.
- [432] M. M. Hansen, C. F. Bertsch, A. R. Harkness, B. E. Huff, D. R. Hutchison, V. V. Khau, M. E. LeTourneau, M. J. Martinelli, J. W. Misner, B. C. Peterson, J. A. Rieck, K. A. Sullivan, I. G. Wright, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 775-785.
- [433] W. Drell, M. S. Dunn, *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 2057-2063.
- [434] W. Drell, M. S. Dunn, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 2804-2808.
- [435] S. Shimizu, Y. Tani, K. Ogata, K. *Agric Biol. Chem.* **1974**, *38*, 1989-1996.
- [436] V. M. Kopelevich, *Pharmaceutical Chemistry Journal* **1971**, *5*, 534-536.
- [437] N. Yoshito, K. Teisuke, T. Giichi, *J. Vitaminol.* **1968**, *4*, 331-344.
- [438] K. Teisuke, S. Masayoshi, A. Fuminori, U. Isamu, *J. Vitaminol.* **1967**, *13*, 298-304.
- [439] R. Winterbottom, J. W. Clapp, W. H. Miller, J. P. English, R. O. Roblin, *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 1393-1401.
- [440] R. O. Roblin, *Chem. Rev.* **1946**, *38*, 255-367.
- [441] K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K. S. Jeong, Z. M. Wang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768-2771.
- [442] T. Katsuki, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5974-5976.
- [443] H. C. Kolb, M. S. vanNieuwenhze, K. B. Sharpless, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2483-2547.
- [444] T. T. Upadhyaya, S. Gurunath, A. Sudalai, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 2899-2904.
- [445] A. V. R. Rao, S. M. Rao, G. V. M. Sharma, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5735-5738.

- [446] F. Effenberger, J. Eichhorn, J. Roos, Degussa AG, DE 19506728, **1995**.
- [447] E. L. Eliel, L. Clawson, D. E. J. Knox, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2707-2711.
- [448] E. J. Corey, G. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 399-402.
- [449] E. J. Corey, J. W. Suggs, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *31*, 2647-2650.
- [450] S. Shimizu, H. Yamada, H. Hata, T. Morishita, S. Akutsu, M. Kawamura, M. *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 289-290.
- [451] G. Guillena, C. Najera, D. J. Ramon, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2249-2293.
- [452] P. I. Dalko, L. Moisan, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5248-5286.
- [453] H. U. Blaser, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 935-952.
- [454] P. Dziejczak, W. Zou, J. Háfren, A. Córdova, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 38-40.
- [455] Z. Jiang, Z. Liang, X. Wua, Y. Lu, *Chem. Commun.* **2006**, *26*, 2801-2803.
- [456] M. Markert, M. Mulzer, B. Schetter, R. Mahrwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7258-7259.
- [457] P. H.-Y. Cheong, C. Y. Legault, J. M. Um, N. Çelebi-Ölçüm, K. N. Houk, K. N. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5042-5137.
- [458] A. Hartikka, P. I. Arvidsson, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1831-1834.
- [459] D. E. Ward, V. Jheengut, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 8347-8350.
- [460] Sigma Aldrich, Sicherheitsdatenblatt zu L-Prolin; verfügbar unter <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/p0380?lang=de®ion=DE>, zuletzt geprüft am 02.04.14.
- [461] Merck, Sicherheitsdatenblatt zu L-Prolin; verfügbar unter <http://assets.chemportals.merck.de/documents/sds/emd/deu/de/8160/816019.pdf>, zuletzt geprüft am 02.04.14.
- [462] Merck, Sicherheitsdatenblatt zu L-Histidin; verfügbar unter <http://assets.chemportals.merck.de/documents/sds/emd/deu/de/1043/104352.pdf>, zuletzt geprüft am 02.04.14.
- [463] GESTIS Stoffdatenbank, Sicherheitsdaten zu Isobutanal, verfügbar unter [http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll?f=id\\$t=default.htm\\$vid=gestisdeu:sdbdeu\\$id=017450](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll?f=id$t=default.htm$vid=gestisdeu:sdbdeu$id=017450), zuletzt geprüft am 02.04.14.
- [464] Berechnet mit US Environmental Protection Agency's EP/Suite™ WSKOW v1.41.
- [465] Berechnet mit Advanced Chemistry Development ACD/Labs Software v11.02.
- [466] P. M. Hardy, *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*, Chapman and Hall, **1985**.
- [467] H. Iwamura, D. H. Wells Jr., S. P. Mathew, M. Klussman, A. Armstrong, D. G. Blackmond, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *50*, 16312-16313.
- [468] S. P. Mathew, H. Iwamura, D. G. Blackmond, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 3317-3321.
- [469] H. Iwamura, S. P. Mathew, D. G. Blackmond, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *38*, 11770-11771.
- [470] N. Duangdee, W. Harnying, G. Rulli, J.-M. Neudörfl, H. Gröger, A. Berkessel, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11196-11205.
- [471] R. Ostwald, *Das Le Chatelier-Braunsche Prinzip oder Prinzip des kleinsten Zwangs*, Rat d. Bezirkes, Abt. Volksbildung, Büro f. Neuererbewegung, Halle, **1967**.

- [472] M. Z. Gao, J. Gao, S. Lane, R. A. Zingaro, *Chem. Lett.* **2003**, *32*, 524-525.
- [473] L.-X. Shi, Q. Sun, Z.-M. Ge, Y.-Q. Zhu, T.-M. Cheng, R.-T. Li, *Synlett* **2004**, *12*, 2215-2217.
- [474] M. Penhoat, D. Barbry, C. Rolando, *Tetrahedron Letters* **2011**, *52*, 159-162.
- [475] M. Nakadai, S. Saito, H. Yamamoto, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8167-8177.
- [476] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Heidelberg, **2011**.
- [477] C. J. Sih, S.-H. Wu, *Topics Stereochem.* **1989**, *19*, 63-125.
- [478] C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294-7299.
- [479] V. S. Martin, S. S. Woodard, T. Katsuki, Y. Yamada, M. Ikeda, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6237-6240.
- [480] G. Bredig, K. Fajans, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **1908**, *41*, 752-763.
- [481] H. B. Kagan, J. C. Fiaud, *Topics Stereochem.* **1988**, *18*, 249-330.
- [482] R. E. Gawley, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2411-2416.
- [483] K. Faber, *Enantiomer* **1997**, *2*, 411-414.
- [484] J. L. L. Rakels, A. J. J. Straathof, J. J. Heijnen, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 1051-1056.
- [485] C.-S. Chen, C. J. Sih, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 695-707.
- [486] M. Wolberg, M. V. Filho, S. Bode, P. Geilenkirchen, R. Feldmann, A. Liese, W. Hummel, M. Müller, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2008**, *31*, 183-191.
- [487] A. Weckbecker, W. Hummel, *Biocatal. Biotransform.* **2006**, *24*, 380-389.
- [488] E. Nürnberg, P. Surmann, *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, Springer, Heidelberg, **1991**, 400.
- [489] Alfa Aesar, Sicherheitsdatenblatt zu D-Pantolacton; verfügbar unter <http://www.alfa.com/en/gd120w.pgm?product=L15983&inpCaptcha=undefined>, zuletzt geprüft am 23.04.14.
- [490] Alfa Aesar, Sicherheitsdatenblatt zu Aceton; verfügbar unter <http://www.alfa.com/en/gd120w.pgm?product=022928&inpCaptcha=undefined>, zuletzt geprüft am 23.04.14.
- [491] I. M. Smallwood, *Handbook of Organic Solvent Properties*, Halsted Press, New York, **1996**, 75.
- [492] C. Antoine, *C.R. Acad. Sci.* **1888**, *107*, 681-684, 778-780, 836-837.
- [493] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**, 204-206.
- [494] T. Daußmann, T. C. Rosen, P. Dünkemann, *Eng. Life Sci.* **2006**, *6*, 125-129.
- [495] T. Stillger, M. Bönitz, M. V. Filho, A. Liese, *Chem. Ing. Tech.* **2002**, *74*, 1035-1039.
- [496] K. Goldberg, K. Edegger, W. Kroutil, A. Liese, *Biotech. Bioeng.* **2006**, *95*, 192-198.
- [497] T. Daußmann, P. Dünkemann, S. Lütz, *CHEManager Europe* **2006**, *3*, 8.
- [498] T. C. Rosen, T. Daußmann, J. Stohrer, *Speciality Chemicals Magazine* **2004**, 39-40.
- [499] D. Mangan, I. Miskelly, T. S. Moody, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2185-2190.
- [500] G. Jeromin, M. Bertau, *Bioorganikum: Praktikum der Biokatalyse*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, 1-12.
- [501] W. Hummel, *New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds*. in *New Enzymes for Organic Synthesis*, Springer, Berlin Heidelberg, **1997**, 145-184.

- [502] evocatal GmbH, eozymes Katalog, verfügbar unter:
<http://www.etracker.de/lkcnt.php?et=wsx1bx&url=http://www.evocatal.com/download.php?dl=eozymes-catalog>; zuletzt geprüft am 10.10.14.
- [503] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176-2179.