

Enantioselektive Synthese  
pharmazeutisch relevanter Bausteine  
unter Einsatz von En-Reduktasen

zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

vorgelegt der Fakultät für Chemie

der Universität Bielefeld

von

**Tina Reß, M. Sc.**

aus Bad Neustadt / Saale

2015



Erstgutachter: Prof. Dr. Harald Gröger  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Norbert Sewald

Tag der Disputation: 30.04.2015

Ort: Bielefeld

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Organische Chemie 1 der Universität Bielefeld unter der Leitung von Prof. Dr. Harald Gröger und in der Abteilung Biokatalyse bei F. Hoffmann-La Roche unter der Leitung von Dr. Hans Iding (Januar bis März 2014) in der Zeit von Juni 2011 bis März 2015 durchgeführt.

Es wurden keine anderen als die in der Arbeit angegeben Hilfsmittel verwendet.

Die Dissertation wurde selbstständig verfasst und hat in der gegenwärtigen oder einer anderen Fassung noch nicht einer anderen Fakultät oder Hochschule vorgelegen.

Tina Reiß, Enantioselektive Synthese pharmazeutisch relevanter Bausteine unter Einsatz von En-Reduktasen, © März 2015



Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

## Publikationen

T. Reß, H. Iding, S. Hanlon, W. Hummel, H. Gröger, The organic-synthetic potential of recombinant ene reductases: Substrate scope evaluation and process optimization, *ChemCatChem* **2015**, im Druck, DOI: 10.1002/cctc.201402903.

W. Greschner, C. Lanzerath, T. Reß, K. Tenbrink, S. Borchert, A. Mix, W. Hummel, H. Gröger, Artificial cofactor regeneration with an iron(III)porphyrin as NADH-oxidase mimic in the enzymatic oxidation of L-glutamate to  $\alpha$ -ketoglutarate, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2014**, *103*, 10-15.

E. Burda, T. Reß, T. Winkler, C. Giese, X. Kostrov, T. Huber, W. Hummel, H. Gröger, Highly Enantioselective Reduction of  $\alpha$ -Methylated Nitroalkenes, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 9493-9496; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9323-9326.

## Patent

H. Gröger, W. Hummel, E. Burda, T. Reß, C. Giese, X. Kostrov, T. Winkler, Verfahren zur Herstellung enantiomerenangereicherter und enantiomerenreiner Nitroalkane und Amine, DE 102012022670A1.

## Posterpräsentationen

Biotrans, Manchester, Juli 2013, Highly enantioselective reduction of  $\alpha$ -methylated nitroalkenes

7<sup>th</sup> Cebitec Symposium, Bielefeld, Dezember 2012, Enoate reductase catalyzed synthesis of  $\alpha,\beta$ -disubstituted nitroalkanes under *in situ*-cofactor regeneration



# Danksagung

Ich danke allen voran meinem Doktorvater Prof. Dr. Harald Gröger, der mich bereits im Rahmen meiner Bachelor- und Masterarbeit unter seine Fittiche genommen und mir so erfolgreich den Spaß an der Biokatalyse vermittelt hat. Danke für die hervorragende Betreuung, das Bereitstellen des interessanten Themas dieser Arbeit sowie die vielen hilfreichen Diskussionen über den Stand der Forschung.

Ich danke Herrn. Prof. Dr. Norbert Sewald für die freundliche (und relativ kurzfristige) Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke Dr. Werner Hummel und seiner gesamten Arbeitsgruppe für die Bereitstellung vieler der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Enzyme. Vielen Dank für die stets freundliche und kommunikative Zusammenarbeit.

Außerdem geht mein Dank an Dr. Hans Iding, Dr. Beat Wirtz und Patrik Meier die mich im Rahmen meines Praktikums bei F. Hoffmann-La Roche sehr herzlich aufgenommen und mich stets tatkräftig unterstützt haben. Danke auch an Dr. Steven Hanlon, der die im Rahmen des Praktikums verwendeten Enzyme zur Verfügung gestellt hat, sowie Isabelle Duffour, die mich bei der chiralen Analytik unterstützt hat.

Herzlichen Dank an alle, die mich tagtäglich durch den allgemeinen Labor- und Büro-Wahnsinn begleitet haben und ohne die das Ganze nur halb so viel Spaß gemacht hätte: Dr. Richard Metzner, Ramona Bringmann, Wilko Greschner, Jonna Gröger, Dr. Anke Hummel, Daniel Bakonyi, Isabell Kemker, Hendrik Gruß, Severin Wedde, Philipp Rommelmann, Florian Uthoff, Tobias Betke und Matthias Pieper. Mein besonderer Dank geht an Marc Biermann, der mir sowohl als Labornachbar, als auch als Freund sehr ans Herz gewachsen ist. Danke für die schöne Zeit! Das gleiche gilt für Anna Reimer, die mich auch abseits der Büroarbeit stets unterstützt und wenn nötig von der Realität abgelenkt hat.

Ich danke den Ehemaligen des AK Mattay, die mich sehr herzlich in Bielefeld willkommen heißen haben. Danke für das Einführen in die hohe Kunst des Boßelns und des Kickerns! Danke für die tolle Laboratmosphäre und Eure fachliche Unterstützung.

Ein ganz herzlicher Dank geht an die gute Seele des Labors: Danke Thomas Geisler, dass Du immer mit Rat und Tat und gut gelaunt zur Seite stehst und einfach für alle Probleme eine Lösung hast.

Vielen Dank Arja Gaestel, die sich um alle außerlaboratorischen Belange gekümmert und uns so den Rücken freigehalten hat.

Ich danke der F. Hoffmann-La Roche und der DBU für die zeitweise finanzielle Unterstützung.

Danke Herrn Peter Mester, Heinz-Werner Patruck, Sandra Heitkamp und Dr. Jens Sproß für die Durchführung der NMR- und MS-Messungen. Vielen Dank auch an Hanna März, Vanessa Vollmer, Robin Warner und Alena Schnitker, die im Rahmen ihrer Ausbildung die ein oder andere Synthese für mich durchgeführt haben. Dank geht an dieser Stelle auch an Marc Biermann und David Schröder, die mich im Rahmen Ihres Forschungspraktikums unterstützt haben.

Ich danke den drei Fragezeichen und Bibi Blocksberg, die mir vor allem in stressigen Phasen beigestanden haben.

Ich danke Udo Mundloch, der immer für mich da war.

Ich entschuldige mich bei meiner Verwandtschaft, dass ich so gut wie nie an irgendeinen Geburtstag denke. Hiermit wünsche ich Euch allen nachträglich alles Gute! Danke, dass ihr mir das nie übel nehmt.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Familie. Ich danke meinen Eltern für ihre Unterstützung, die vielen guten Ratschläge, das Verständnis das sie mir entgegengebracht haben und die offenen Arme, mit denen sie mich jedes Mal wieder empfangen. Ich danke meiner Schwester Lea, die mich mit ihrem unermüdlichen Optimismus immer wieder zum Lachen bringt. Ich bin froh, dass ich Euch habe!

Logik wird Dich von A nach B bringen. Phantasie wohin Du willst.

Albert Einstein



# I. Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>II.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Motivation und Zielsetzung .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Screening, Charakterisierung und präparative Anwendung von En- Reduktasen .....</b>	<b>6</b>
3.1	Stand der Wissenschaft .....	6
3.2	Motivation und Zielsetzung.....	10
3.3	En-Reduktase-Screening .....	12
3.3.1	Allgemeiner Aufbau des En-Reduktase-Screenings .....	12
3.3.2	Screening von disubstituierten Nitroalkenen .....	13
3.3.3	Screening von aliphatischen Säuren und Estern .....	16
3.3.4	Screening von $\alpha$ -Cyanozimtsäurederivaten .....	18
3.3.5	Screening cyclischer Enone .....	19
3.4	Reaktionsparameter-Screening zur Charakterisierung von En-Reduktasen und Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	22
3.4.1	Allgemeiner Aufbau des Reaktionsparameter-Screenings .....	22
3.4.2	SDS-Gel der im Reaktionsparameter-Screening verwendeten Enzymformulierungen.....	23
3.4.3	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von <b>3b</b> mit XenB <sub>pQR1</sub> und der Einfluss von <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	24
3.4.4	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von ( <i>R</i> )- <b>3a</b> mit NCR <sub>pQR1</sub> .....	27
3.4.5	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von ( <i>S</i> )- <b>3a</b> mit Ene-111 .....	30
3.4.6	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von ( <i>R</i> )- <b>15b</b> mit Ene-114 .....	33
3.4.7	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von ( <i>R</i> )- <b>15a</b> mit GOx-ER.....	34
3.4.8	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von <b>17c</b> mit OPR1 <sub>pQR1</sub> .....	38
3.4.9	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von <b>17b</b> mit Ene-107 .....	40
3.4.10	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von <b>17b</b> mit Ene-114 .....	42
3.4.11	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von <b>21</b> mit NCR <sub>pQR1</sub> .....	44

3.5	Durchführung ausgewählter Versuche unter optimierten Reaktionsbedingungen im präparativen Labormaßstab.....	46
3.5.1	Biokatalytische Reduktion von <b>5a</b> mit NCR <sub>pQR1</sub> .....	46
3.5.2	Biokatalytische Reduktion von <b>5a</b> mit Ene-111 .....	48
3.5.3	Biokatalytische Reduktion von <b>14a</b> mit GOx-ER.....	49
3.5.4	Biokatalytische Reduktion von <b>16c</b> mit OPR1 <sub>pQR1</sub> .....	50
3.5.5	Biokatalytische Reduktion von <b>20</b> mit NCR <sub>pQR1</sub> .....	50
3.6	Weitere Untersuchungen zum Substratspektrum der En-Reduktase aus <i>G. oxydans</i> .....	52
3.6.1	Aza-Baylis-Hilman-Produkte .....	52
3.6.2	γ-Butyrolactone.....	53
<b>4</b>	<b>Biokatalytische Synthese α-Methyl-substituierter Nitroalkane .....</b>	<b>55</b>
4.1	Stand der Wissenschaft .....	55
4.2	Zielsetzung .....	66
4.3	Synthese α-Methyl-substituierter Nitroalkene ( <b>5</b> ) .....	67
4.4	Synthese racemischer Nitroalkane ( <i>rac-3</i> ) als Referenzverbindungen.....	67
4.5	Untersuchungen zur Substratstabilität .....	69
4.6	Reduktion α-Methyl-substituierter Nitroalkene im 100 mL-Maßstab mittels En-Reduktase aus <i>G. oxydans</i> .....	70
4.7	Untersuchungen zur Racemisierung chiraler Nitroalkane.....	72
4.7.1	Abhängigkeit der Racemisierung von En-Reduktase und Glucosedehydrogenase.....	72
4.7.2	Abhängigkeit der Racemisierung von der Temperatur und der Enzymkomponente .....	73
4.7.3	Abhängigkeit der Racemisierung von Temperatur und Nitroalkenkonzentration .....	74
4.7.4	Die Rückreaktion vom Nitroalkan zum Nitroalken .....	77
4.7.5	Untersuchung der Konkurrenzreaktion durch NemR .....	78
4.8	Untersuchungen zur En-Reduktase-Hintergrundaktivität der Enzymformulierung Bsp-GDH.....	79
4.9	Erhöhung der Substratkonzentration .....	80
4.9.1	Prozessoptimierung: Anpassen der Ultraschallbehandlung.....	80
4.9.2	Prozessoptimierung: Einsatz organischer Lösungsmittel.....	84

4.9.2.1	Spektrophotometrische Untersuchungen zum Einfluss organischer Lösungsmittel auf GOx-ER, Bsp-GDH und Bsu-GDH .....	84
4.9.2.2	Einsatz organischer Lösungsmittel im semi-präparativen Maßstab .....	87
4.9.3	Anpassen der Enzymkonzentration bei geeigneter Ultraschallbehandlung und organischem Lösungsmittel im semi-präparativen Maßstab .....	90
4.9.4	Biokatalytische Reduktion von <b>5b</b> mittels GOx-ER bei 100 mM Substratkonzentration.....	92
<b>5</b>	<b>Synthese von Tamsulosin unter Verwendung einer En-Reduktase aus <i>M. extorquens</i>.....</b>	<b>93</b>
5.1	Stand der Wissenschaft .....	93
5.2	Zielsetzung und Synthesekonzept .....	96
5.3	Synthese der Referenzverbindungen und Entwicklung von Analyse-Methoden .....	97
5.4	Biokatalytische Reduktion der C=C-Doppelbindung .....	98
5.4.1	Enzymscreening zur biokatalytischen Reduktion von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan ( <b>5g</b> ) .....	98
5.4.2	Stabilität der En-Reduktase aus <i>M. extorquens</i> gegenüber Methanol.....	99
5.4.2.1	Spektrophotometrische Untersuchungen zum Einfluss von Methanol auf ME-OYE und Bsu-GDH.....	99
5.4.2.2	Einsatz von Methanol im semi-präparativen Maßstab.....	101
5.4.3	Temperaturabhängigkeit der biokatalytischen Reduktion von <b>5g</b> mittels ME-OYE.....	102
5.4.4	Biokatalytische Reduktion von <b>5g</b> mittels ME-OYE im präparativen Maßstab....	103
5.5	Metallkatalytische Reduktion der Nitrogruppe.....	104
5.6	Kombination von Bio- und Metallkatalyse .....	105
5.7	Folgechemie zur Synthese von Tamsulosin .....	107
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>119</b>
8.1	Verwendete Chemikalien und Geräte .....	119
8.2	Verwendete Chemikalien und Geräte für Abschnitte 8.3.10 bis 8.3.19 .....	121
8.3	Synthesen und spektroskopische Daten: Screening, Charakterisierung und präparative Anwendung von En-Reduktasen.....	124
8.3.1	Synthese von 1-Nitro-2-phenylpropan ( <b>6</b> ) .....	124

8.3.2	Synthese von <i>rac</i> -1-Nitro-2-phenylpropan ( <i>rac</i> - <b>7</b> ).....	124
8.3.3	Synthese von <i>rac</i> -6,8-Difluor-3-nitrochroman ( <i>rac</i> - <b>9</b> ) .....	125
8.3.4	Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV1): Synthese von $\alpha$ - Cyanozimtsäurederivaten ( <b>16</b> ).....	125
8.3.4.1	Synthese von ( <i>E</i> )-2-Cyano-3-(4-hydroxyphenyl)acrylsäureethylester ( <b>16b</b> ).....	126
8.3.4.2	Synthese von ( <i>E</i> )-2-Cyano-3-phenylacrylsäureethylester ( <b>16c</b> ) .....	126
8.3.5	Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV2): Synthese cyclischer Enone ( <b>18</b> ).....	127
8.3.5.1	Synthese von 3-Methoxycyclohex-2-enon ( <b>18e</b> ) .....	127
8.3.5.2	Synthese von 2-Methoxycyclohex-2-enon ( <b>18f</b> ) .....	128
8.3.5.3	Synthese von 3-Methoxycyclopent-2-enon ( <b>18c</b> ).....	128
8.3.6	Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV3): Reduktion cyclischer Enone mittels Pd/C und H <sub>2</sub> .....	129
8.3.6.1	Synthese von 3-Methoxycyclohexanon ( <b>19e</b> ).....	129
8.3.6.2	Synthese von 2-Methoxycyclohexanon ( <b>19f</b> ) .....	129
8.3.7	Synthese von 2-Phenylacrylsäureethylester ( <b>14b</b> ).....	130
8.3.8	Synthese von <i>rac</i> -2-Phenylpropionsäureethylester ( <i>rac</i> - <b>15b</b> ).....	130
8.3.9	Synthese von 2-Phenylacrylsäure ( <b>14a</b> ).....	131
8.3.10	Erstellung von En-Reduktase-Screeningplatten .....	131
8.3.11	Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AAV4): En-Reduktase-Screening .....	131
8.3.11.1	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropan ( <b>3a</b> ).....	133
8.3.11.2	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropan ( <b>3b</b> ).....	134
8.3.11.3	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropan ( <b>3c</b> ) .....	135
8.3.11.4	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 1-Nitro-2-phenylpropan ( <b>7</b> ).....	136
8.3.11.5	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 6,8-Difluor-3-nitrochroman ( <b>9</b> ).....	137
8.3.11.6	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 3-Phenylpropansäure ( <b>11a</b> ) ausgehend von <i>trans</i> -Zimtsäure (( <i>E</i> )- <b>10a</b> ) .....	138
8.3.11.7	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 3-Phenylpropansäure ( <b>11a</b> ) ausgehend von <i>cis</i> -Zimtsäure (( <i>Z</i> )- <b>10a</b> ).....	139
8.3.11.8	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 3-Phenylpropansäureethylester ( <b>11b</b> ).....	140

8.3.11.9	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 2-Benzylmalonsäurediethylester ( <b>11c</b> ) .....	141
8.3.11.10	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 2-Phenylpropansäureethylester ( <b>15b</b> ) .....	142
8.3.11.11	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 2-Phenylpropansäure ( <b>15a</b> ) .....	143
8.3.11.12	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 2-Cyano-3-(4- hydroxyphenyl)propansäure ( <b>17a</b> ) .....	144
8.3.11.13	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 2-Cyano-3-(4-hydroxyphenyl)- propansäureethylester ( <b>17b</b> ) .....	145
8.3.11.14	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 2-Cyano-3- phenylpropansäureethylester ( <b>17c</b> ) .....	146
8.3.11.15	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 3-Methoxycyclohexanon ( <b>19e</b> ) .....	147
8.3.11.16	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 2-Methoxycyclohexanon ( <b>19f</b> ) .....	148
8.3.11.17	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 3-Methylcyclopentanon ( <b>19a</b> ) .....	149
8.3.11.18	En-Reduktase-Screening zur Synthese von <i>iso</i> -Butylboronsäure ( <b>13</b> ) .....	150
8.3.11.19	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 3-Methoxycyclopentanon ( <b>19c</b> ) .....	151
8.3.11.20	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 3-Chlorcyclohexanon ( <b>19d</b> ) .....	152
8.3.11.21	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 1-Cyclohexylethanon ( <b>21</b> ) .....	153
8.3.11.22	En-Reduktase-Screening zur Synthese von 3-Bromcyclopentanon ( <b>19b</b> ) .....	154
8.3.12	Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 (AAV5): Reaktionsparameter-Screening .....	155
8.3.12.1	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von <b>3b</b> mit XenB <sub>pQR1</sub> .....	157
8.3.12.2	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von <b>3b</b> mit <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	158
8.3.12.3	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von ( <i>R</i> )- <b>3a</b> mit NCR <sub>pQR1</sub> .....	160
8.3.12.4	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von ( <i>S</i> )- <b>3a</b> mit Ene-111 .....	162
8.3.12.5	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von ( <i>R</i> )- <b>15b</b> mit Ene-114 .....	164
8.3.12.6	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von ( <i>R</i> )- <b>15a</b> mit GOx-ER .....	165
8.3.12.7	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von <b>17c</b> mit OPR1 <sub>pQR1</sub> .....	166
8.3.12.8	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von <b>17b</b> mit Ene-107 .....	167
8.3.12.9	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von <b>17b</b> mit Ene-114 .....	168
8.3.12.10	Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von <b>21</b> mit NCR <sub>pQR1</sub> .....	169
8.3.13	SDS-Gelelektrophorese der im Reaktionsparameter-Screening verwendeten Enzymformulierungen .....	170

8.3.14	Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 (AAV6): Photometrische Aktivitätsbestimmung für En-Reduktasen.....	171
8.3.15	Hydrolyse von <b>15b</b> zum Bestimmen der Selektivität von Ene-114.....	172
8.3.16	Allgemeine Arbeitsvorschrift 7 (AAV7): Enzymatische Synthese von <b>3a</b> .....	173
8.3.16.1	Synthese von ( <i>R</i> )- <b>3a</b> mit NCR <sub>pQR1</sub> bei 0.1% Substratkonzentration .....	173
8.3.16.2	Synthese von ( <i>R</i> )- <b>3a</b> mit NCR <sub>pQR1</sub> bei 1% Substratkonzentration .....	174
8.3.16.3	Synthese von ( <i>S</i> )- <b>3a</b> mit Ene-111 bei 0.1% Substratkonzentration .....	175
8.3.16.4	Synthese von ( <i>S</i> )- <b>3a</b> mit Ene-111 bei 0.5% Substratkonzentration .....	175
8.3.17	Synthese von ( <i>R</i> )- <b>15a</b> mit GOx-ER.....	176
8.3.18	Synthese von <b>17c</b> mit OPR <sub>1pQR1</sub> .....	176
8.3.19	Allgemeine Arbeitsvorschrift 8 (AAV8): Synthese von <b>21</b> mit NCR <sub>pQR1</sub> .....	177
8.3.19.1	Synthese von <b>21</b> bei 5% Substratkonzentration .....	178
8.3.19.2	Synthese von <b>21</b> bei 10% Substratkonzentration .....	178
8.3.20	Biokatalytische Reduktion von Aza-Bailys-Hillman-Produkten mittels En-Reduktase aus <i>G. oxydans</i> .....	179
8.3.21	Allgemeine Arbeitsvorschrift 9 (AAV9): Biokatalytische Reduktion von $\gamma$ -Butyrolactonen mittels En-Reduktase aus <i>G. oxydans</i> .....	179
8.3.21.1	Synthese von ( <i>R</i> )-5-Benzylidihydrofuran-2(3H)-on (( <i>R</i> )- <b>26a</b> ) .....	180
8.3.21.2	Synthese von ( <i>S</i> )-5-Ethylidihydrofuran-2(3H)-on (( <i>S</i> )- <b>26b</b> ).....	180
8.3.21.3	Synthese von ( <i>S</i> )-5-Hexylidihydrofuran-2(3H)-on (( <i>S</i> )- <b>26c</b> ).....	180
8.4	Synthesen und spektroskopische Daten: Biokatalytische Synthese $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkane .....	182
8.4.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift 10 (AAV10): Synthese $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkene ( <b>5</b> ) .....	182
8.4.1.1	Synthese von 1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropen ( <b>5a</b> ).....	182
8.4.1.2	Synthese von 1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropen ( <b>5b</b> ).....	183
8.4.1.3	Synthese von 1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropen ( <b>5c</b> ).....	183
8.4.1.4	Synthese von 1-Phenyl-2-Nitropropen ( <b>5d</b> ).....	183
8.4.1.5	Synthese von 1-(3-Iodphenyl)-2-nitropropen ( <b>5e</b> ).....	184
8.4.1.6	Synthese von 1-(3-Methoxyphenyl)-2-nitropropen ( <b>5f</b> ) .....	184
8.4.1.7	Synthese von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen ( <b>5g</b> ).....	184

8.4.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift 11 (AAV11): Synthese racemischer Nitroalkane ( <i>rac</i> - <b>3</b> ) mit Natriumborhydrid.....	185
8.4.2.1	Synthese von <i>rac</i> -1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropan ( <i>rac</i> - <b>3a</b> ).....	185
8.4.2.2	Synthese von <i>rac</i> -1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropan ( <i>rac</i> - <b>3b</b> ).....	185
8.4.2.3	Synthese von <i>rac</i> -1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropan ( <i>rac</i> - <b>3c</b> ).....	186
8.4.2.4	Synthese von <i>rac</i> -1-Phenyl-2-nitropropan ( <i>rac</i> - <b>3d</b> ).....	186
8.4.2.5	Synthese von <i>rac</i> -1-(3-Iodphenyl)-2-nitropropan ( <i>rac</i> - <b>3e</b> ).....	187
8.4.2.6	Synthese von <i>rac</i> -1-(3-Methoxyphenyl)-2-nitropropan ( <i>rac</i> - <b>3f</b> ).....	187
8.4.2.7	Synthese von <i>rac</i> -1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan ( <i>rac</i> - <b>3g</b> ).....	188
8.4.3	Allgemeine Arbeitsvorschrift 12 (AAV12): Biokatalytische Reduktion $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkene im 100 mL-Maßstab mittels En-Reduktase aus <i>G. oxydans</i> .....	188
8.4.3.1	Biokatalytische Synthese von ( <i>R</i> )-1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropan (( <i>R</i> )- <b>3a</b> ).....	189
8.4.3.2	Biokatalytische Synthese von ( <i>R</i> )-1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropan (( <i>R</i> )- <b>3b</b> ).....	189
8.4.3.3	Biokatalytische Synthese von ( <i>R</i> )-1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropan (( <i>R</i> )- <b>3c</b> ).....	190
8.4.3.4	Biokatalytische Synthese von ( <i>R</i> )-1-Phenyl-2-nitropropan (( <i>R</i> )- <b>3d</b> ).....	190
8.4.3.5	Biokatalytische Synthese von ( <i>R</i> )-1-(3-Iodphenyl)-2-nitropropan (( <i>R</i> )- <b>3e</b> ).....	191
8.4.3.6	Biokatalytische Synthese von ( <i>R</i> )-1-(3-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (( <i>R</i> )- <b>3f</b> )....	191
8.4.3.7	Biokatalytische Synthese von ( <i>R</i> )-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (( <i>R</i> )- <b>3g</b> )....	192
8.4.4	Untersuchungen zur Racemisierung $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkane in Abhängigkeit von En-Reduktase, Glucosedehydrogenase und Temperatur.....	192
8.4.5	Untersuchungen zur Racemisierung $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkane ( <b>3</b> ) in Abhängigkeit von Temperatur und Nitroalkenkonzentration.....	193
8.4.6	Untersuchungen zur Substratstabilität $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkene ( <b>5</b> ).....	194
8.4.7	Versuch zur Rückreaktion von ( <i>R</i> )- <b>3b</b> zu <b>5b</b> mithilfe eines Fe(III)TSPP Cofaktorregenerierungssystems.....	195
8.4.8	Biokatalytische Reduktion von 1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropan ( <b>5b</b> ) mit NemR.....	195
8.4.9	Photometrische Bestimmung der Bsp-GDH-Hintergrundaktivität.....	196
8.4.10	Bestimmung der Bsp-GDH-Hintergrundaktivität im präparativen Maßstab.....	196
8.4.11	Prozessoptimierung zur Ultraschallbehandlung.....	196

8.4.12	Allgemeine Arbeitsvorschrift 13 (AAV13): BRADFORD-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Enzymlösungen oder Lyophilisaten.....	198
8.4.13	Photometrische Aktivitäts- und Stabilitätsbestimmung von GOx-ER in Gegenwart von Methanol .....	198
8.4.14	Allgemeine Arbeitsvorschrift 14 (AAV14): Photometrische Aktivitätsbestimmung für Glucosedehydrogenasen.....	199
8.4.14.1	Photometrische Aktivitäts- und Stabilitätsbestimmung von Bsp-GDH in Gegenwart von Methanol .....	200
8.4.14.2	Photometrische Aktivitäts- und Stabilitätsbestimmung von Bsu-GDH in Gegenwart von Methanol und gegenüber Ultraschall .....	201
8.4.15	Bestätigung der Photometerergebnisse zur biokatalytischen Reduktion von <b>5b</b> mittels GOx-ER in Gegenwart von 2-Methyl-THF und Methanol.....	202
8.4.16	Allgemeine Arbeitsvorschrift 15 (AAV15): Biokatalytische Reduktion von <b>5b</b> mittels GOx-ER in Gegenwart von 30% Methanol bei variablen Substratkonzentrationen bis 100 mM .....	203
8.4.17	Biokatalytische Synthese von ( <i>R</i> )- <b>3b</b> mittels GOx-ER bei einer Substratkonzentration von 100 mM.....	204
8.5	Synthesen und spektroskopische Daten: Synthese von Tamsulosin unter Verwendung einer En-Reduktase aus <i>M. extorquens</i> .....	205
8.5.1	Synthese von <i>rac</i> -1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanamin ( <i>rac</i> - <b>51b</b> ).....	205
8.5.2	Synthese von <i>rac</i> -2-Brom-N-(2-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-ethyl)-acetamid ( <i>rac</i> - <b>70</b> ).....	205
8.5.3	Enzymscreening zur biokatalytischen Reduktion von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen ( <b>5g</b> ) .....	206
8.5.4	Zellaufschluss zur Herstellung des zellfreien Rohextrakts der En-Reduktase aus <i>M. extorquens</i> (ME-OYE) .....	207
8.5.5	Photometrische Bestimmung der Enzymaktivität und Stabilität von ME-OYE in Gegenwart von Methanol und gegenüber Ultraschall .....	207
8.5.6	Photometrische Bestimmung der Enzymaktivität und Stabilität der Bsu-GDH in Gegenwart von Methanol und gegenüber Ultraschall .....	208
8.5.7	Bestätigung der Photometerergebnisse zum Einsatz von Methanol im semi-präparativen Maßstab .....	209
8.5.8	Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit und des Einflusses von Methanol auf die En-Reduktase aus <i>M. extorquens</i> .....	210

8.5.9	Untersuchungen zum Erhalt der Stereoinformation im Rahmen der Reduktion von <b>3g</b> mittels Pd/C und H <sub>2</sub> .....	211
8.5.10	Untersuchungen zum Erhalt der Stereoinformation im Rahmen der Reduktion von <b>3g</b> mittels Pd/C und Ammoniumformiat .....	212
8.5.11	Biokatalytische Synthese von ( <i>R</i> )- <b>3g</b> mittels En-Reduktase aus <i>M. extorquens</i> im präparativen Maßstab .....	212
8.5.12	Synthese von ( <i>R</i> )-1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanamin (( <i>R</i> )- <b>51b</b> ) mittels Pd/C und H <sub>2</sub> .....	213
8.5.13	Chemoenzymatische Synthese von ( <i>R</i> )-1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanamin (( <i>R</i> )- <b>51b</b> ) im sequentiellen Eintopf-Prozess .....	213
8.5.14	Synthese von 2-Brom-N-(2-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-ethyl)-acetamid (( <i>R</i> )- <b>70</b> ) .....	214
<b>9</b>	<b>Anhang: Biokatalytische Oxidation von Glutamat zu <math>\alpha</math>-Ketoglutarat.....</b>	<b>216</b>
9.1	Motivation und Zielsetzung.....	216
9.2	Ergebnisse .....	217
9.2.1	Bestimmung des Umsatzes und der Produktbildung mittels <sup>1</sup> H-NMR .....	217
9.2.2	pH-Abhängigkeit der biokatalytischen Oxidation von L-Glutamat unter Verwendung isolierter Enzyme.....	218
9.2.3	Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration .....	219
9.2.4	Einfluss des zellulären Abbaus von L-Glutamat und $\alpha$ -Ketoglutarat .....	220
9.2.5	Übertragbarkeit des Systems auf weitere Glutamatdehydrogenasen .....	220
9.2.6	Erhöhung der Enzym- und Zellkonzentration .....	221
9.3	Experimenteller Teil.....	222
9.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift 16 (AAV16): Photometrische Aktivitätsbestimmung von Glutamatdehydrogenasen .....	222
9.3.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift 17 (AAV17): Photometrische Aktivitätsbestimmung von NADH-Oxidasen.....	223
9.3.3	Validierung der Aufarbeitung über 10 kDa-MWCO-Filter.....	224
9.3.4	Einfluss des zellulären Abbaus von Mononatriumglutamat und $\alpha$ -Ketoglutarat .....	224
9.3.5	Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der NO <sub>x</sub> in der biokatalytischen Oxidation von Mononatriumglutamat mit isolierten Enzymen .....	225

9.3.6	Untersuchungen zur Abhängigkeit der biokatalytischen Oxidation von Mononatriumglutamat mithilfe eines NADH-Oxidase-Ganzzellkatalysators von der Sauerstoffkonzentration .....	226
9.3.7	Kombination des NADH-Oxidase-Ganzzellkatalysators mit weiteren Glutamatdehydrogenasen .....	226
9.3.8	Umsetzung von Mononatriumglutamat zu $\alpha$ -Ketoglutarat bei erhöhter Enzym- und Zellkonzentration .....	227
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>228</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
API	pharmazeutischer Wirkstoff (engl. <i>active pharmaceutical ingredient</i> )
Äq.	Äquivalent(e)
Asn	Asparagin
BINAP	(2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
CPME	Cyclopentylmethylether
CrS	En-Reduktase aus <i>Thermus scotoductus</i> (Chromatreduktase)
$\delta$	chemische Verschiebung in [ppm]
d	Küvettdicke in [cm]
d	Dublett
DBU	Deutsche Bundesstiftung Umwelt
DBVPG	En-Reduktase aus <i>Kazachstania lodderae</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	dupliziertes Dublett
de	Diastereomerenüberschuss (engl. <i>diastereomeric excess</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient für NAD(P)H in [ $\text{mL} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]
E1, E2	Enantiomer 1, Enantiomer 2
EBP1	En-Reduktase aus <i>Candida albicans</i> (engl. <i>Estrogen binding protein</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ee	Enantiomerenüberschuss (engl. <i>enantiomeric excess</i> )
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EPA	amerikanische Umweltschutzbehörde (engl. <i>Environmental Protection Agency</i> )
ER	En-Reduktase
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i> )
EWG	Elektronenziehende Gruppe (engl. <i>electron withdrawing group</i> )
f	Probenverdünnungsfaktor
FMN	Flavinmononukleotid
GC	Gaschromatographie
GDH	Glucosedehydrogenase
ges.	gesättigt
GO <sub>x</sub> -ER	En-Reduktase aus <i>Gluconobacter oxydans</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )

IPC	Prozesskontrolle (engl. <i>in process control</i> )
<i>J</i>	skalare Kopplungskonstante in [Hz]
kDa	Kilodalton
KYE1	En-Reduktase aus <i>Kluyveromyces lactis</i> (engl. <i>Kluyveromyces yellow enzyme</i> )
m	Multipllett
ME-OYE	En-Reduktase aus <i>Methylobacterium extorquens</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MR	En-Reduktase aus <i>Pseudomonas putida</i> (Morphin Reduktase)
MS	Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
NADH, NAD <sup>+</sup>	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH, NADP <sup>+</sup>	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
nb	nicht bestimmt
NCR	En-Reduktase aus <i>Zymomonas mobilis</i> (engl. <i>Nicotinamide-dependent cyclohexenone reductase</i> )
NemR	En-Reduktase aus <i>Escherichia coli</i> (engl. <i>N-ethylmaleimide reductase</i> )
NMR	Kernmagnetische Resonanz (engl. <i>Nuclear magnetic resonance</i> )
OPR1, OPR3	En-Reduktasen aus <i>Lycopersicon esculentum</i> (engl. <i>12-oxophytodienoate reductase</i> )
OYE1	En-Reduktase aus <i>Saccharomyces pastorianus</i> (engl. <i>Old Yellow Enzyme</i> )
OYE2, OYE 3	En-Reduktasen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (engl. <i>Old Yellow Enzyme</i> )
OYE2.6	En-Reduktase aus <i>Pichia stipites</i> (engl. <i>Old Yellow Enzyme</i> )
PEG	Polyethylenglycol
PETNR	En-Reduktase aus <i>Enterobacter cloacae</i> (engl. <i>pentaerythitol tetranitrate reductase</i> )
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(ethansulfonsäure)
ppm	Teile pro Million (engl. <i>parts per million</i> )
q	Quartett
<i>rac</i>	racemisch
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SDS	Natriumdodecylsulfat
S:E	Massenverhältnis Substrat zu Enzym
T	Temperatur in [°C]
t	Triplett
t	Zeit
T3P	2,4,6-Tripropyl-1,3,5,2,4,6-trioxatriphosphorinan-2,4,6-trioxid
TA	Transaminase
t <sub>r</sub>	Retentionszeit

---

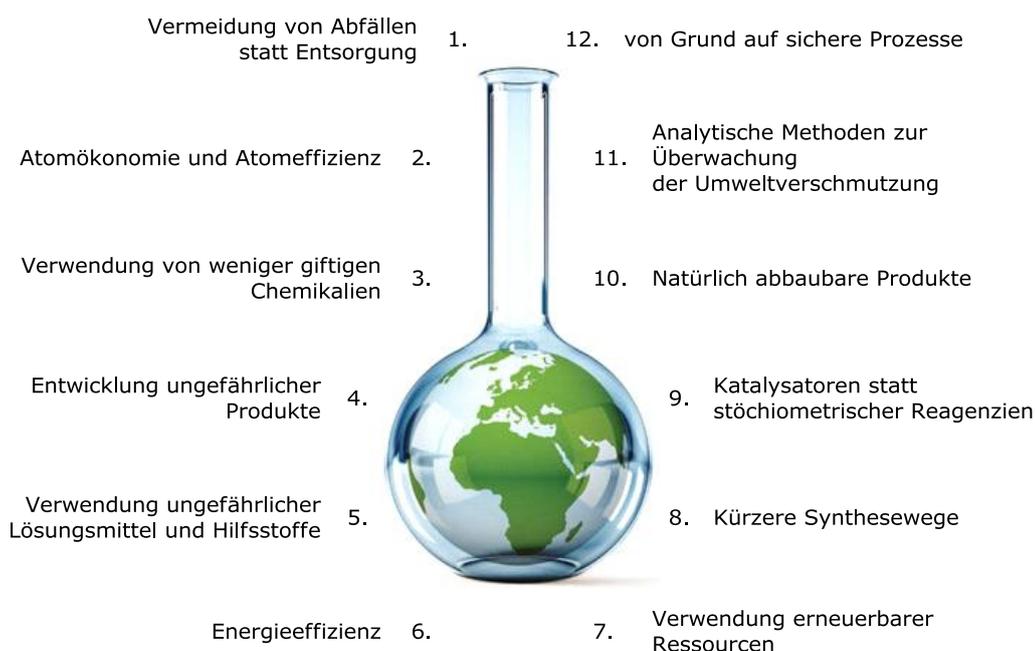
TBME	<i>tert</i> -Butylmethylether
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
TOYE	En-Reduktase aus <i>Thermoanaerobacter pseudoethanolicus</i> (engl. <i>Thermostable Old Yellow enzyme</i> )
Ts	Tosyl
TSPP	<i>meso</i> -Tetrakis( <i>p</i> -sulfonatophenyl)porphyrin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-methanamin
U	Units [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ ]
UV/Vis	Ultraviolett/sichtbar (engl. <i>ultraviolet/visible</i> )
XenA, XenB	En-Reduktasen aus <i>Pseudomonas putida</i> (engl. <i>Xenobiotic reductase</i> )
Yers-ER	En-Reduktase aus <i>Yersinia bercovieri</i>
YqjM	En-Reduktase aus <i>Bacillus subtilis</i>



# 1 Einleitung

Der Begriff der „Grünen Chemie“ wurde 1991 von Dr. Paul ANASTAS geprägt, der zu dieser Zeit für die amerikanische Umweltschutzbehörde EPA (United States Environmental Protection Agency) tätig war. ANASTAS fasste die wesentlichen Herausforderungen, die an eine grüne Synthese gestellt werden müssen, in 12 Thesen zusammen, die heute als „die 12 Prinzipien der Grünen Chemie“ bekannt sind (Abbildung 1).<sup>[1-4]</sup>

Viele der geforderten Bedingungen können durch den Einsatz von Biokatalysatoren abgedeckt werden. Die Verwendung eines Katalysators anstelle von Chemikalien in stöchiometrischen Mengen führt zu einer verringerten Abfallproduktion und durch die Möglichkeit in wässrigen Reaktionsmedien zu arbeiten, wird die Verwendung gefährlicher Chemikalien und Lösungsmittel verringert. Enzyme gehen meist mit milden Reaktionsbedingungen wie physiologischen pH-Werten, moderaten Temperaturen und Normaldruck einher und stellen umweltverträgliche Katalysatoren dar. Viele Biokatalysatoren besitzen hohe Aktivitäten und weisen eine hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität in Molekülen mit mehreren verschiedenen funktionellen Gruppen auf. Dies hat unter anderem zur Folge, dass der Einsatz von Schutzgruppen unnötig wird, wodurch kürzere Synthesen entwickelt werden können und somit auch in einer geringeren Abfallproduktion resultieren. Diese Eigenschaften machen Biokatalysatoren zu umweltfreundlichen und ökonomisch attraktiveren Katalysatoren verglichen mit klassisch chemischen Synthesewegen.<sup>[2,5]</sup>



**Abbildung 1.** Die zwölf Prinzipien der Grünen Chemie<sup>[1,3]</sup>

Die EPA verleiht jährlich den „Green Chemistry Challenge Award“, mit dem hervorragende Leistungen für die Entwicklung sauberer, günstiger und intelligenter chemischer Synthesestrategien prämiert werden (Abbildung 2). Im Jahr 2012 wurden Codexis und Prof. Yi TANG (UCLA) für die Entwicklung einer „Grünen Synthese“ zur Herstellung des Cholesterinsenkers Simvastatin (**1**) prämiert.<sup>[6,7]</sup> Die Forschergruppe um TANG identifizierte einen Biokatalysator zur regioselektiven Acylierung einer Simvastatin-Vorstufe, die anschließende Optimierung des Enzyms LovD wurde von Codexis durchgeführt. So wurde ein neuer Herstellungsprozess für Simvastatin entwickelt, der im Vergleich zur ursprünglichen Herstellung kosteneffizienter verläuft, und in dem durch den Einsatz des Biokatalysators auf gefährliche Chemikalien wie *tert*-Butylchloridimethylsilan, Methyljodid und *n*-Butyllithium verzichtet werden kann.<sup>[6]</sup>

Zuvor wurde im Jahr 2010 der Award an Merck und Codexis für die Optimierung der Sitagliptin-Synthese verliehen.<sup>[8,9]</sup> Bei Sitagliptin (**2**) handelt es sich um ein Typ-2 Diabetes Medikament, dessen ursprüngliche Synthese aufgrund geringer Selektivitäten auf einen Kristallisationsschritt zur Reinigung angewiesen war. Zudem zeigte der Prozess durch eine Hochdruck-Hydrierung bei 250 psi mit einem Rhodium-Katalysator und die hierzu nötige spezielle Produktionsanlage deutliche Nachteile.<sup>[8]</sup> Durch die Zusammenarbeit von Merck und Codexis konnte die Synthese mithilfe einer optimierten, (*R*)-selektiven Transaminase als Biokatalysator ohne die Verwendung von Metallen (Rhodium und Eisen) durchgeführt werden. Eine Hochdruckhydrierung wurde dadurch überflüssig, die anfallende Abfallmenge wurde um 19% reduziert während die Produktivität des Prozesses um insgesamt 56% erhöht wurde.<sup>[8]</sup>



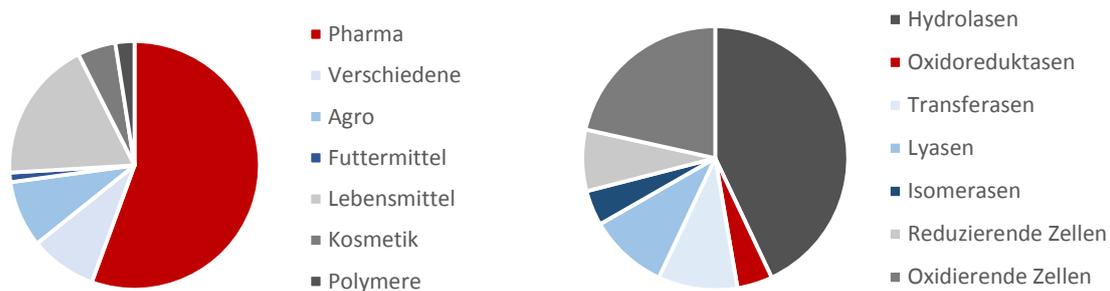
**Abbildung 2.** Simvastatin und Sitagliptin<sup>[10]</sup>

Diese Beispiele zeigen eindrucksvoll, dass die Biokatalyse längst kein akademisches Nischengebiet mehr ist, sondern den Sprung in die Industrie erfolgreich gemeistert hat.<sup>[5]</sup> Biokatalytische Systeme tragen heute wesentlich zur Entwicklung neuer, grüner Synthesewege bei und bilden somit die Grundlage für einen kompetitiven Forschungszweig, dessen Potential noch lange nicht ausgeschöpft wurde.

## 2 Motivation und Zielsetzung

Die Synthese enantiomerenreiner Bausteine mithilfe von Biokatalysatoren stellt aufgrund ihrer Vorteile wie der hohen Regio-, Chemo- und Stereoselektivitäten sowie milden Reaktionsbedingungen eine attraktive Alternative zu klassisch chemischen Syntheserouten für die Pharmaindustrie dar.<sup>[11]</sup> Das resultiert darin, dass über 50% aller industriellen Biotransformationen im Pharmabereich durchgeführt werden (Abbildung 3, links).<sup>[5]</sup>

Die am häufigsten eingesetzte Enzymklasse im industriellen Maßstab ist die der Hydrolasen, die durch Racematspaltung enantiomerenreine Synthesebausteine aus racemischen Vorstufen erzeugen (Abbildung 3, rechts).<sup>[5,12]</sup> Die Verwendung von Oxidoreduktasen zur asymmetrischen Synthese stellt ebenfalls einen wichtigen, wenn auch deutlich geringeren Anteil der industriellen Biotransformationen dar.



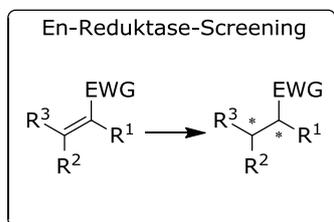
**Abbildung 3.** Übersicht über die Verwendung der Produkte industrieller Biotransformationen (links) sowie verwendete Enzymklassen in industriellen Biotransformationen (rechts)<sup>[5]</sup>

Aus der Enzymklasse der Oxidoreduktasen sind vor allem Alkoholdehydrogenasen in industriellen Synthesen etabliert,<sup>[5,12]</sup> während Reduktionsreaktionen mithilfe von En-Reduktasen bisher weniger prominent sind. Dies mag zum einen an den bisher geringen spezifischen Aktivitäten dieser Enzyme liegen, und kann zum anderen sicher auch darauf zurückgeführt werden, dass die Kenntnisse zur breiten Anwendbarkeit dieser Enzymklasse bisher nur mäßig vorhanden sind. Zwar beschäftigen sich viele Gruppen mit der Erforschung dieser Enzymklasse, diese Bemühungen beschränken sich jedoch oft auf wenige Modellsubstrate, sodass der Nutzen für eine industrielle Anwendung nur schwer abzuleiten ist. Die En-Reduktase-katalysierten Synthesen pharmazeutisch relevanter Bausteine beschränken sich bisher auf wenige Beispiele.<sup>[13,14,15,16]</sup>

Das Wissen über die Anwendungsbereiche von En-Reduktasen sowohl in ihrer synthetischen Breite als auch in Bezug auf spezielle, pharmazeutisch relevante Vorstufen, soll deshalb im Rahmen dieser Arbeit deutlich erweitert werden. Neue, umfassende Erkenntnisse über diese Enzymklasse im Hinblick auf Substratspektren, Selektivitäten, Toleranzen gegenüber Lösungsmitteln und erhöhte Substratkonzentrationen sollen dazu führen, dass diese Enzyme verstärkt in industriellen Synthesen eingesetzt werden können.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung En-Reduktase-katalysierter Prozesse und deren Eingliederung in eine Gesamtsynthese zur Herstellung pharmazeutisch relevanter enantiomerenreiner Bausteine. Ein Enzymscreening soll zu Beginn Aufschluss über das Verhalten verschiedener literaturbekannter sowie kommerziell erhältlicher En-Reduktasen bringen, sowohl im Hinblick auf die Aktivität und Selektivität der getesteten Enzyme, als auch auf das Substratspektrum dieser Enzyme. Im Anschluss soll an ausgewählten Enzym-Substrat-Paaren ein Reaktionsparameter-Screening durchgeführt werden, um die Limitierungen sowie Möglichkeiten dieser Reaktionen besser kennenzulernen. Nach der Optimierung der Reaktionsbedingungen sollen die vielversprechendsten Reaktionen im präparativen Maßstab durchgeführt und die Produkte isoliert werden (Abbildung 4, links).

**Einsatz von En-Reduktasen zur Herstellung pharmazeutisch relevanter enantiomerenreiner Bausteine**



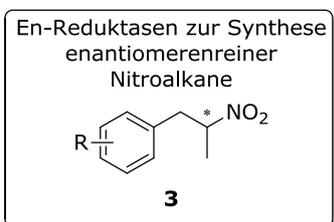
- Kapitel 3 -

Erweitern des  
En-Reduktase-Spektrums

Erweitern des  
Substratspektrums

Reaktionsparameter-  
Screening

Upscale ausgewählter  
Synthesen



- Kapitel 4 -

Erweitern des  
Substratspektrums

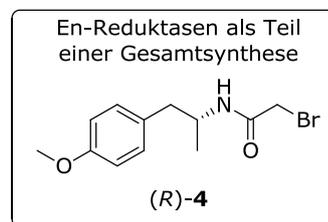
Untersuchungen zur  
Stabilität der Edukte  
und Produkte

Untersuchungen zur  
Produktracemisierung

Erhöhung der  
Substratkonzentration

Einsatz organischer  
Lösungsmittel

Einsatz von Ultraschall



- Kapitel 5 -

Biokatalytische Synthese  
eines enantiomerenreinen  
Nitroalkans

Metallkatalytische Synthese  
des analogen Amins

Kombination von Bio- und  
Metallkatalyse

**Abbildung 4.** Zielsetzung und Gliederung der vorliegenden Arbeit

Aufbauend auf früheren Ergebnissen der Gruppe um GRÖGER<sup>[17–21]</sup> soll die biokatalytische Synthese von  $\alpha$ -Methyl-substituierten Nitroalkanen vom Typ **3** mittels einer von HUMMEL zugänglich gemachten En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans*<sup>[22]</sup> im Hinblick auf das Substratspektrum sowie die Substratkonzentration optimiert werden. Vorab sollen hierzu unterschiedlich substituierte Nitroalkene und die korrespondierenden Referenzverbindungen synthetisiert werden, und eine Umsatzbestimmung mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie sowie eine ee-Wert Analytik mittels chiraler HPLC etabliert werden. Anschließend soll das Substratspektrum der En-Reduktase aus *G. oxydans* auf am Aromaten unterschiedlich substituierte Nitroalkene ausgeweitet, sowie der Einfluss der Position und der Art des Substituenten evaluiert werden. Zur Prozessoptimierung muss die Stabilität der Substrate und potentiellen Produkte im Reaktionsmedium ermittelt werden, in diesem Rahmen soll vor allem das Verhalten chiraler Nitroalkane bezüglich Racemisierung untersucht werden. Die Abhängigkeit der optischen Reinheit der synthetisierten Nitroalkane von den Reaktionsbedingungen und der enzymatischen Komponenten soll evaluiert und in einer präparativen Synthese berücksichtigt werden. Anschließend soll ein Prozess zur biokatalytischen Synthese von Nitroalkanen vom Typ **3** entwickelt werden, in dem die Substratkonzentration von 10 mM auf 100 mM erhöht wird. Da die Substratlöslichkeit in wässrigen Systemen ein limitierender Faktor dieser Synthese zu sein scheint, soll untersucht werden, ob die Löslichkeit durch den Einsatz organischer Lösungsmittel oder einer Ultraschallbehandlung erhöht werden kann (Abbildung 4, mitte).

Die Synthese eines pharmazeutisch relevanten Bausteins mithilfe einer En-Reduktase soll die Eignung dieser Enzyme für die praktische Anwendung verdeutlichen. Die Entwicklung eines Eintopf-Prozesses, in dem Bio- und Metallkatalyse zur enantiomerenreinen Aminsynthese verknüpft werden, soll als „proof of concept“ entwickelt werden und mit der Folgechemie zur Synthese eines pharmazeutisch relevanten Bausteins ((*R*)-**4**) verbunden werden. (Abbildung 4, rechts).

## 3 Screening, Charakterisierung und präparative Anwendung von En-Reduktasen

### 3.1 Stand der Wissenschaft

Die erste En-Reduktase wurde 1932 von CHRISTIAN und WARBURG aus dem Hefepilz *Saccharomyces pastorianus* (früher *Saccharomyces carlsbergensis*) isoliert.<sup>[23,24]</sup> Das Enzym wurde auf Grund seiner Farbe als „Gelbes Ferment“ bzw. „yellow enzyme“ beschrieben, wobei die Herkunft der gelben Färbung auf das nicht kovalent gebundene Flavinmononukleotid (FMN) zurückzuführen ist.<sup>[25]</sup> Nachdem 1983 HAAS ein weiteres Homolog des „yellow enzyme“ aus *Saccharomyces cerevisiae* isolierte,<sup>[26]</sup> wurde das von CHRISTIAN und WARBURG entdeckte Enzym zum „Old Yellow Enzyme“ (OYE) umbenannt. Diese Bezeichnung trägt es bis heute und wurde damit Namensgeber für eine gesamte Enzymfamilie. Die flavinabhängigen En-Reduktasen unterteilen sich in zwei Gruppen, zum einen die OYE-ähnlichen und zum anderen die Thermophil-artigen En-Reduktasen. Sequentielle und strukturelle Merkmale des Old Yellow Enzyme sind bspw. über die En-Reduktasen PETNR, OPR1 und MR konserviert, welche somit zu den OYE-ähnlichen Enzymen zählen.<sup>[27]</sup> Mit der Isolierung von YqjM aus dem bakteriellen Organismus *Bacillus subtilis* wurde eine En-Reduktase mit deutlich unterschiedlichen Strukturmerkmalen im aktiven Zentrum identifiziert.<sup>[28,29]</sup> Als diese sequentiellen und strukturellen Unterschiede über weitere, vorwiegend aus thermophilen Organismen isolierte En-Reduktasen konserviert waren, wurde neben den OYE-ähnlichen Enzymen die Klasse der Thermophil-artigen En-Reduktasen eingeführt. Zu den bekannten Vertretern dieser Gruppe zählen neben YqjM auch die Enzyme CrS und TOYE.<sup>[27]</sup> Kürzlich wurden zudem En-Reduktasen entdeckt, welche nicht auf FMN als Cofaktor angewiesen sind. Diese Enzyme bilden eine dritte Klasse En-Reduktasen, die aufgrund des im Vergleich zu OYE-Proteinen fehlenden Flavinmononukleotids auch „non-OYE“ En-Reduktasen genannt werden.<sup>[30,31,32]</sup>

Die Nomenklatur richtete sich anfangs nach der Reihenfolge der Entdeckung der En-Reduktasen aus Hefen (OYE1-3), anschließend folgte die Benennung der Enzyme teils nach dem Stamm, der Enzymfunktion oder auch dem physiologischen Substrat. Eine Übersicht über die gängigsten Enzyme, deren Abkürzungen sowie die Stämme, aus denen sie isoliert wurden, bietet Tabelle 1.

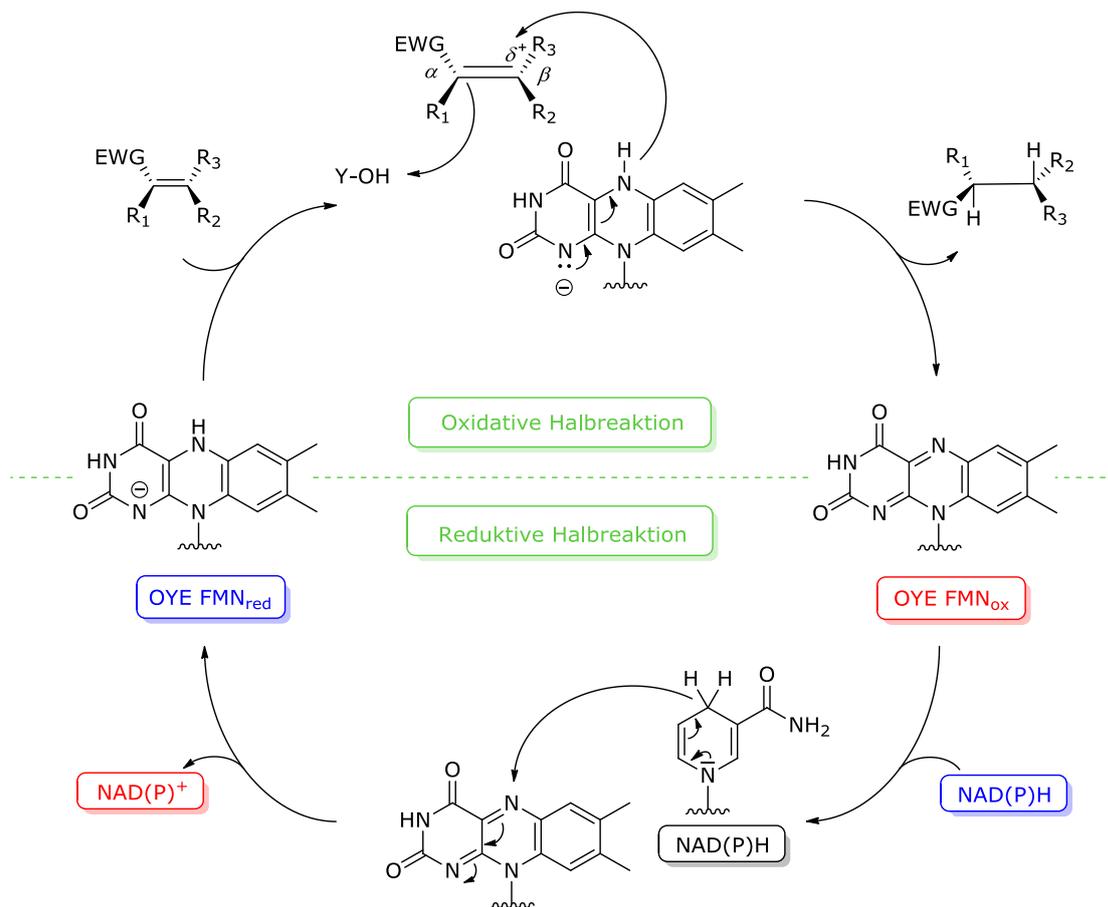
**Tabelle 1.** Übersicht über die gängigsten En-Reduktasen

Abkürzung	Namensgebung	Stamm	Quelle
OYE1	„Old Yellow Enzyme“	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	[24,33]
OYE2, OYE3	„Old Yellow Enzyme“	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[23,26,34]
TOYE	Thermostabiles „Old Yellow Enzyme“	<i>Thermoanaerobacter pseudoethanolicus</i>	[35]
CrS	Chromatreduktase	<i>Thermus scotoductus</i>	[36,37]
PETNR	Pentaerythritoltetranitrat-Reduktase	<i>Enterobacter cloacae</i>	[38,39]
MR	Morphin-Reduktase	<i>Pseudomonas putida</i>	[40–42]
YqjM		<i>Bacillus subtilis</i>	[28,29]
OPR1, OPR3	12-Oxophytodienoat-Reduktase	<i>Lycopersicon esculentum</i>	[43–45]
EBP1	Estrogenbindendes Protein	<i>Candida albicans</i>	[46]
XenA, XenB	Xenobiotika-Reduktase	<i>Pseudomonas putida</i>	[47–50]
NCR	Nicotinamid-abhängige Cyclohexenon-Reduktase	<i>Zymomonas mobilis</i>	[51]
NemR	N-Ethylmaleimid-Reduktase	<i>Escherichia coli</i>	[52,53]
KYE1	Kluyveromyces „Yellow Enzyme“	<i>Kluyveromyces lactis</i>	[33,54]
Yers-ER		<i>Yersinia bercovieri</i>	[54]
GOx-ER		<i>Gluconobacter oxydans</i>	[22,55,56]

En-Reduktasen katalysieren die Reduktion aktivierter C=C-Doppelbindungen. Dabei ist die Polarisierung (bzw. Aktivierung) der Doppelbindung durch einen elektronenziehenden Substituenten Voraussetzung für die Reaktion. Der Katalysezyklus verläuft über einen bi-bi Ping-Pong-Mechanismus, in dem beide Substrate in derselben aktiven Tasche gebunden werden.<sup>[33,44]</sup> Es wird dabei zwischen reduktiver und oxidativer Halbreaktion unterschieden (Abbildung 5). Während das physiologische Substrat für die reduktive Halbreaktion NAD(P)H als erwiesen angesehen wird, ist das physiologische Substrat für die oxidative Halbreaktion bisher nicht eindeutig bestimmt. En-Reduktasen finden sich sowohl in Hefen, als auch Pflanzen und Bakterien wieder, wobei die Aufgaben in den unterschiedlichen Organismen ebenso weit gefächert wie bisher nicht eindeutig identifiziert sind. Die Hypothesen reichen vom Abbau von oxidativem Stress über Detoxifizierung elektrophiler Verbindungen bis hin zu spezifischen Zellmetabolismen und -biosynthesen.<sup>[27,29,40,44,57,58]</sup>

Die Reduktion der C=C-Doppelbindung (oxidative Halbreaktion)<sup>[57–59]</sup> beginnt mit einem Hydrid-Transfer von der prosthetischen Gruppe FMN auf das positiv polarisierte C $\beta$ -Atom des zu reduzierenden Substrats. Die Aktivierung der Doppelbindung durch eine elektronenziehende Gruppe in unmittelbarer Nähe der Doppelbindung ist essentiell, um den oben genannten Hydrid-Transfer einzuleiten. Die anschließende Protonierung durch die Tyrosin-Seitenkette im aktiven Zentrum von OYE1 erfolgt von der gegenüberliegenden Seite, weshalb bei der biokatalytischen Reduktion von C=C-Doppelbindungen fast ausschließlich *trans*-Addition stattfindet. Der Hydrid-Transfer sowie die anschließende Protonierung verlaufen je nach

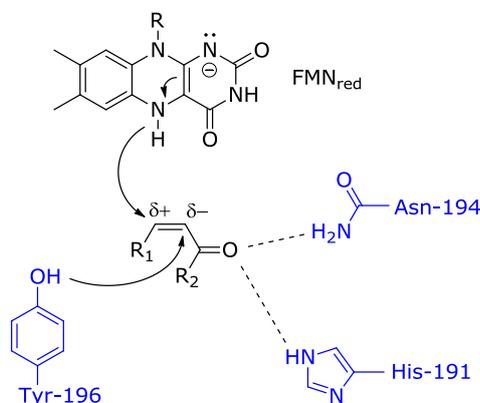
Substrat stufenweise (bei stabilen Intermediaten wie bspw. Nitrocyclohexen) oder konzertiert (Cyclohexen).<sup>[59]</sup> Zur Reduktion des nun oxidierten FMN wird als Cofaktor NAD(P)H in Rahmen der reduktiven Halbreaktion oxidiert. Die Regenerierung des Cofaktors NAD(P)<sup>+</sup> erfolgt – in der organischen Synthese – durch ein Cofaktorregenerierungssystem oder – innerhalb eines Organismus – durch weitere verknüpfte Oxidations- und Reduktionsprozesse.



**Abbildung 5.** Katalysemechanismus der En-Reduktasen. EWG = electron withdrawing group, Protonendonator Y = Tyrosin oder Lösungsmittel

Die strukturelle Aufklärung des OYE1 1995 führte zu einem Einblick in das aktive Zentrum des Enzyms sowie die katalytische Funktion des Proteins.<sup>[33]</sup> Die wichtigsten im aktiven Zentrum konservierten Aminosäuren sind die saure Aminosäure Tyrosin Tyr-196, die in OYE1 als Protonendonator identifiziert wurde, sowie His-191 und Asn-194 in OYE1<sup>[33,60]</sup> zur Koordination des Substrates (Abbildung 6). Diese Strukturmerkmale sind über weite Teile der Enzymfamilie konserviert, allerdings finden sich auch einzelne Ausnahmen, in denen eine der Aminosäuren durch eine andere ersetzt wird. Der Tyrosinrest ist bspw. in PETNR (Tyr-186)<sup>[61]</sup>, CrS (Tyr-177),<sup>[37]</sup> XenA (Tyr-183)<sup>[49]</sup> und NCR (Tyr-177)<sup>[51]</sup> konserviert, hingegen in MR durch Cystein (Cys-191) ersetzt.<sup>[41]</sup> Das His/Asn-Paar ist bspw. in KYE1 und MR (His-186, Asn-189)<sup>[41]</sup> konserviert, die Funktion der Substratkoordination übernimmt ein His/His-Paar in PETNR

(His-181, His-194),<sup>[39]</sup> CrS (His-172, His-175),<sup>[37]</sup> XenA (His-178, His-181)<sup>[49]</sup> und YqjM (His-164, His-167).<sup>[28]</sup>



**Abbildung 6.** Koordination des Substrates im aktiven Zentrum von OYE1 und Reduktion der Doppelbindung

Das im aktiven Zentrum der OYE1 befindliche Tyr-196 spielt bei der katalytischen Aktivität eine große Rolle. KOHLI und MASSEY verdeutlichten durch einen Austausch von Tyr-196 zu Phenylalanin die Bedeutung der sauren Aminosäure im aktiven Zentrum.<sup>[59]</sup> Während die Substratbindung sowie die reduktive Halbreaktion von dieser Mutation nahezu unbeeinflusst bleibt, verringert sich die Aktivität der oxidativen Halbreaktion gegenüber Cyclohexanon um sechs Größenordnungen.<sup>[59]</sup> Allerdings zeigen analoge Mutageneseversuche mit dem Austausch von Tyrosin durch Phenylalanin an den Enzymen PETNR<sup>[61]</sup> und CrS,<sup>[37]</sup> bzw. durch Alanin an NCR<sup>[51]</sup>, dass Tyr-196 nicht bei allen OYE-Vertretern essentiell für die katalytische Aktivität ist. In den hier genannten Mutagenesestudien wurde die katalytische Aktivität zwar verringert, allerdings wurde die oxidative Halbreaktion nicht vollständig unterdrückt. In diesen Fällen wird eine Protonierung durch das entsprechende Lösungsmittel als wahrscheinlich angesehen.<sup>[62]</sup>

In der präparativen organischen Synthese gewinnen En-Reduktasen immer mehr an Bedeutung.<sup>[27,63–65]</sup> Die typischen Vorteile der Biokatalyse wie milde Reaktionsbedingungen sowie hohe Selektivitäten finden sich auch beim Einsatz von En-Reduktasen wieder.<sup>[11]</sup> Die Reduktion von C=C-Doppelbindungen bietet die Möglichkeit bis zu zwei neue Stereozentren in ein Molekül einzuführen. Der Anwendungsbereich von En-Reduktasen ist vielfältig, und erstreckt sich über ein breites Spektrum von  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Alkenen. Die Aktivierung der Doppelbindung kann dabei durch diverse elektronenziehende Gruppen, wie beispielsweise Carbonsäuren, deren Ester, Ketone, Aldehyde, Amide, Nitrile oder eine Nitrogruppe, erfolgen (Abbildung 7).<sup>[27,58,63–65]</sup>

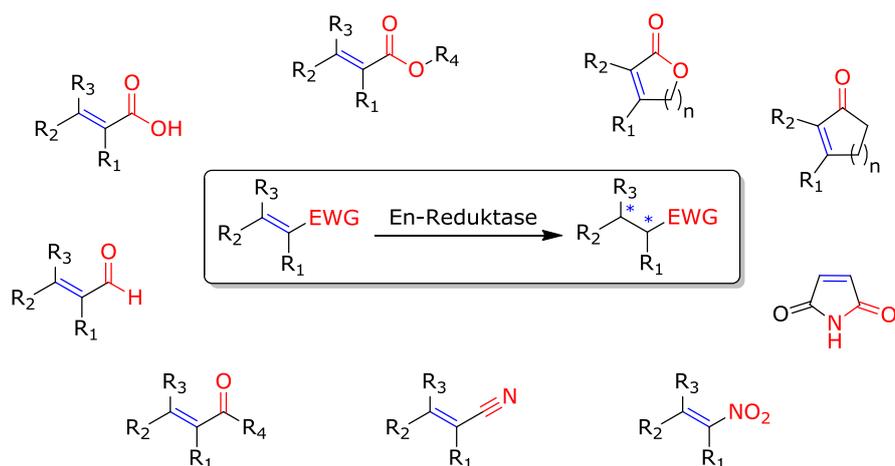


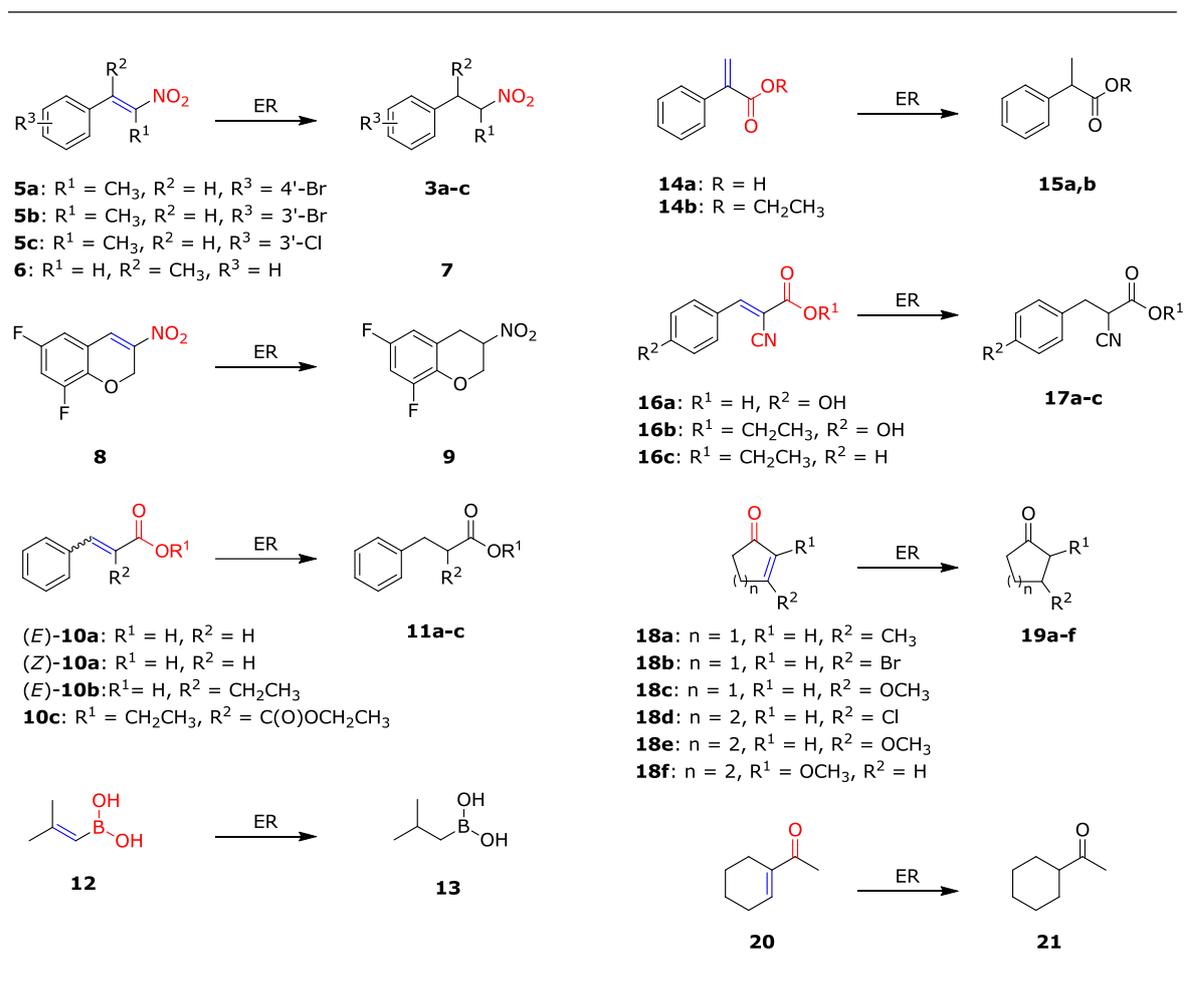
Abbildung 7. Substratspektrum von En-Reduktasen

### 3.2 Motivation und Zielsetzung

Klassische Studien über die Anwendbarkeit von En-Reduktasen in der organischen Synthese beziehen sich häufig auf einige wenige Modellsubstrate und eine kleine Auswahl an zu testenden Enzymen. Da mittlerweile sehr viele En-Reduktasen in der Natur gefunden, analysiert und zum großen Teil rekombinant verfügbar gemacht wurden, ergibt sich nun eine neue Fragestellung auf dem Gebiet der En-Reduktasen. Es gilt, die Substratbreite der Enzyme zu testen, zu identifizieren und diese Erkenntnisse mit einem möglichst breiten Enzymspektrum zu verknüpfen. Solch umfassende Studien, die einen Vergleich verschiedener En-Reduktasen untereinander möglich machen, sind in der Literatur bisher nur selten beschrieben, die Gruppe um FABER führte En-Reduktase-Screening-Studien mit einer Auswahl an Aldehyden, Ketonen, aliphatischen Säuren und Estern sowie Nitroalkenen für insgesamt sechs En-Reduktasen (darunter OPR1 und OPR3) durch,<sup>[30,43]</sup> BOMMARIUS *et al.* untersuchten ein breites Substratspektrum von zwei En-Reduktasen (YersER und KYE1)<sup>[66]</sup> und die Gruppen um BORNSCHEUER und MIHOVILOVIC untersuchten das Substratspektrum von NemR, XenA und XenB im Hinblick auf Ketone, Aldehyde und Säuren.<sup>[50]</sup> Zur Erweiterung dieses Kenntnisstandes wird im folgenden Kapitel der Anwendungsbereich von 23 En-Reduktasen auf ein Spektrum von 22 unterschiedlichen Substraten untersucht. Diese Studie wurde in Kooperation mit der Biokatalyse-Abteilung von F. Hoffmann-La Roche Ltd. in Basel durchgeführt.

Zum Verifizieren des Substratspektrums der verwendeten En-Reduktasen werden α,β-disubstituierte Nitroalkene, aliphatische Säuren und Ester mit Phenylsubstituenten, eine Borsäure, α-Cyanozimtsäurederivate und cyclische Enone untersucht. Innerhalb dieser

Gruppen werden die Derivate dahingehend gewählt, dass Aussagen über sterische oder elektronische Substituenteneffekte getroffen werden können (Abbildung 8).



**Abbildung 8.** Substratspektrum für das einleitende En-Reduktase-Screening

Durch ein einleitendes Screening aller vorhandenen Enzyme in 2.0 mL Deepwell-Platten (DW-Platten) wird die Auswahl für weitere Untersuchungen eingeschränkt. Dabei werden literaturbekannte Enzyme (GO<sub>x</sub>-ER,<sup>[22,55,56]</sup> OPR1,<sup>[44,67]</sup> OYE2.6,<sup>[68]</sup> XENB,<sup>[69]</sup> NCR,<sup>[15]</sup> DBVPG,<sup>[70]</sup> OYE3<sup>[133]</sup>) sowie die kommerziell erhältlichen Enzyme Ene-101 bis Ene-116 von Codexis<sup>[71]</sup> verwendet. Es handelt sich bei allen Enzymen um lyophilisierte Zellrohextrakte, wobei einige Enzyme in zwei Rohextrakt-Formulierungen vorhanden sind. Zum einen wurde das entsprechende Enzym in einem pET28-Plasmid,<sup>[72]</sup> zum anderen in einem pQR1-Plasmid<sup>[73]</sup> in *E. coli* überexprimiert. Die *E. coli*-eigene En-Reduktase NemR zeigte in früheren Arbeiten eine Aktivität gegenüber Nitroalkenen.<sup>[17,19]</sup> Diese Hintergrundreaktion darf nicht vernachlässigt werden, deshalb wird zusätzlich die Aktivität des *E. coli*-Expressionsstammes (BL21(DE3)) mit untersucht. Auch in Bezug auf die Reduktion von Enonen ist die Hintergrundaktivität des Leervektors von Interesse, da im Rohextrakt enthaltene Alkoholdehydrogenasen zu Konkurrenzreaktionen und somit Nebenprodukten führen können. Anschließend wird für ausgewählte Substrat/Enzym-Paare der Einfluss von 41 Parametern,

bestehend aus unterschiedlichen chaotropen und kosmotropen Salzen, Polyolen, Puffern und Lösungsmittelanteilen, auf Aktivität und Selektivität untersucht (Core-Screening). Nach der Optimierung der Reaktionsbedingungen soll ein Upscale ausgewählter Reaktionen durchgeführt werden.

### 3.3 En-Reduktase-Screening

#### 3.3.1 Allgemeiner Aufbau des En-Reduktase-Screenings

Das En-Reduktase-Screening wird in 2.0 mL DW-Platten durchgeführt. Die Screeningplatten enthalten je 1.0 mg der Enzyme, die von F. Hoffmann-La Roche hergestellt wurden, 1.0 mg der En-Reduktase aus dem Arbeitskreis HUMMEL (GOx-ER) sowie 0.5 mg der von Codexis kommerziell erhältlichen Enzyme. Das Screening wird mit 0.5 mg des zu testenden Substrates in einem Gesamtvolumen von 0.5 mL durchgeführt. Die von Roche präparierten Enzyme sind auf unterschiedlichen Plasmiden in *E. coli* überexprimiert, welche in Tabelle 2 zusammengefasst sind. Die von Codexis bezogenen Enzyme wurden in *E. coli* überexprimiert, über die Enzyme sowie die Ursprungsstämme ist nichts bekannt.

**Tabelle 2.** Übersicht über die im Rahmen dieser Studie untersuchten Enzyme

Enzym	Stamm	Plasmid	Kürzel
OPR1 <sup>[67]</sup>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	pET28 <sup>[72]</sup>	OPR1 <sub>pET28</sub>
OPR1 <sup>[67]</sup>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	pQR1 <sup>[73]</sup>	OPR1 <sub>pQR1</sub>
OYE2.6 <sup>[68]</sup>	<i>Pichia stipites</i>	pET28 <sup>[72]</sup>	OYE2.6 <sub>pET28</sub>
OYE2.6 <sup>[68]</sup>	<i>Pichia stipites</i>	pQR1 <sup>[73]</sup>	OYE2.6 <sub>pQR1</sub>
XenB <sup>[69]</sup>	<i>Pseudomonas putida</i>	pET28 <sup>[72]</sup>	XenB <sub>pET28</sub>
XenB <sup>[69]</sup>	<i>Pseudomonas putida</i>	pQR1 <sup>[73]</sup>	XenB <sub>pQR1</sub>
NCR <sup>[15]</sup>	<i>Zymomonas mobilis</i>	pET28 <sup>[72]</sup>	NCR <sub>pET28</sub>
NCR <sup>[15]</sup>	<i>Zymomonas mobilis</i>	pQR1 <sup>[73]</sup>	NCR <sub>pQR1</sub>
DBVPG <sup>[70]</sup>	<i>Kazachstania lodderae</i>	pET28 <sup>[72]</sup>	DBVPG <sub>pET28</sub>
DBVPG <sup>[70]</sup>	<i>Kazachstania lodderae</i>	pQR1 <sup>[73]</sup>	DBVPG <sub>pQR1</sub>
OYE3 <sup>[13]</sup>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pET28 <sup>[72]</sup>	OYE3 <sub>pET28</sub>
OYE3 <sup>[13]</sup>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pQR1 <sup>[73]</sup>	OYE3 <sub>pQR1</sub>
GOx-ER <sup>[22]</sup>	<i>Gluconobacter oxydans</i>	pET21a <sup>[74]</sup>	GOx-ER
Ene-101 bis Ene-116 <sup>[71]</sup>	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Ene-101 bis Ene-116

Die Umsätze wurden mittels HPLC oder GC bestimmt. Die Umsatzbestimmungen wurden, soweit Referenzverbindungen zugänglich waren, unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Absorptionsverhaltens des Eduktes und des Produktes durchgeführt. Da bei einigen Reaktionen

Nebenprodukte auftraten, die nicht charakterisiert wurden, konnte deren Absorptionsverhalten nicht berücksichtigt werden. Es wurden zwei Umsatz-Bestimmungen durchgeführt: Zum einen wurde das Flächenintegral des Produktes ins Verhältnis gesetzt zu der Summe der Flächenintegrale des Edukts und des Produkts, zum anderen wurde das Flächenintegral des Produkts ins Verhältnis gesetzt zu der Summe der Flächenintegrale des Edukts, Produkts und aller Nebenprodukte. Letzteres wird im Folgenden apparenter Umsatz genannt (Für die Durchführung der Umsatzbestimmung siehe auch Abschnitt 8.3.11).

### 3.3.2 Screening von disubstituierten Nitroalkenen

Die Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings der Nitroalken-Verbindungen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Reduktion von in  $\alpha$ -Position Methyl-substituierten Nitroalkenen ist in bisher publizierten Studien nur mit geringen Enantioselektivitäten beschrieben. Die En-Reduktase-katalysierte Synthese von Nitroalkanen vom Typ **3** verläuft bei einem Großteil der durchgeführten Studien racemisch<sup>[32,66,75–78]</sup> bzw. mit relativ geringen Enantioselektivitäten von bis zu 52% ee.<sup>[77,79–81]</sup> Einige Gruppen erhielten das Nitroalkan mit Enantioselektivitäten von bis zu 70% ee,<sup>[82,83]</sup> allerdings blieb die hoch enantioselektive Reduktion dieser Verbindungsklasse bisher aus. CLASSEN *et al.* berichteten erstmals von einer vergleichsweise hohen Enantioselektivität von 84% ee für die biokatalytische Reduktion von 1-Phenyl-2-nitropropen (**5d**) zu 1-Phenyl-2-nitropropan (**3d**) mit 84% ee,<sup>[84]</sup> höhere Werte wurden bisher jedoch nicht erreicht. Gegenüber 1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropen (**5a**) zeigen alle hier getesteten Enzyme Aktivität, die höchsten apparenten Umsätze werden mit den Enzymen OPR1<sub>pET28</sub> bzw. OPR1<sub>pQR1</sub>, XenB<sub>pET28</sub> bzw. XenB<sub>pQR1</sub>, NCR<sub>pET28</sub> bzw. NCR<sub>pQR1</sub>, DBVPG<sub>pET28</sub>, OYE3<sub>pQR1</sub>, Ene-104 und Ene-111 erreicht. Allerdings sind lediglich bei den Enzymen NCR<sub>pET28</sub> bzw. NCR<sub>pQR1</sub> und Ene-102 sowie Ene-111 hohe Enantioselektivitäten für **5a** zu beobachten. Vielversprechend ist die Tatsache, dass durch diese Auswahl an Enzymen beide Enantiomere von 1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropan (**3a**) zugänglich sind. Dieses Substrat kann bisher nur mit 81% ee mittels En-Reduktasen reduziert werden (siehe auch Abschnitt 4.5),<sup>[85]</sup> dies wird bereits im Rahmen des einleitenden Screenings von Ene-111 mit 84% ee übertroffen. Eine weitere Optimierung der Reaktionsparameter für die Reduktion von **5a** mittels Ene-111 ist vielversprechend, zur Synthese des entgegengesetzten Enantiomers soll zudem auch die Reduktion von **5a** mittels NCR<sub>pQR1</sub> optimiert werden.

Die Substrate 1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropen (**5b**) und 1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropen (**5c**) werden von allen getesteten Enzymen als Substrat akzeptiert, die Aktivitäten entsprechen denen für **5a**, mit der Ausnahme von XenB<sub>pQR1</sub>, hier ist die Aktivität geringer. NCR<sub>pET28</sub> bzw. NCR<sub>pQR1</sub> zeigt auch für die Substrate **5b** und **5c** hohe Enantioselektivitäten von bis zu 73% ee, welche dieses Enzym zu einem vielversprechenden Kandidaten für am Aromaten unterschiedlich substituierte  $\alpha$ -Methyl-substituierte Nitroalkene vom Typ **5** macht. Auffällig ist

der Wechsel der Selektivität im Fall von OPR1<sub>pET28</sub> bzw. OPR1<sub>pQR1</sub> und OYE2.6<sub>pET28</sub> bzw. OYE2.6<sub>pQR1</sub>, sowie der Codexis En-Reduktasen Ene-104, Ene-113, Ene-115 und Ene-116 mit dem Wechsel des *m*-Br-Substituenten (**5b**, positives Vorzeichen) zum *m*-Cl-Substituenten (**5c**, negatives Vorzeichen). Da die ee-Werte jedoch relativ gering sind, wird dieser Effekt nicht weiter untersucht.

**Tabelle 3.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings der Nitroalken-Verbindungen. Eingetragen sind die apparenten Umsätze (Farbschema von rot (0%) zu grün (100%)), sowie die ee-Werte (die Richtung entspricht der Elutionsreihenfolge der Enantiomere auf der HPLC)

Enzym	5a		5b		5c		6		8	
	Ums. [%]	ee [%]								
OPR1 <sub>pET28</sub>	96	6	100	2	97	-7	4		19	-16
OPR1 <sub>pQR1</sub>	94	1	95	-1	98	-8	41		92	0
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	14		17		7		0		3	
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	35	9	22	10	22	-14	1		5	
XenB <sub>pET28</sub>	96	-29	93	-34	98	-37	6		32	-6
XenB <sub>pQR1</sub>	97	-4	49	1	43	-11	1		5	
NCR <sub>pET28</sub>	97	-65	91	-70	99	-73	99	-100	20	-11
NCR <sub>pQR1</sub>	96	-71	94	-58	98	-60	100	-100	35	-1
DBVPG <sub>pET28</sub>	97	30	100	-1	99	-9	17		13	
DBVPG <sub>pQR1</sub>	11		8		5		1		3	
OYE3 <sub>pET28</sub>	6		6		3		0		3	
OYE3 <sub>pQR1</sub>	97	11	93	0	98	-9	16		13	
Ene-101	73		81		80		12		77	0
Ene-102	86	74	72		68		95	98	79	0
Ene-103	35		35		35		95	95	79	0
Ene-104	94	36	85	3	89	-5	37		30	-13
Ene-105	59		64		68		95	95	73	0
Ene-106	67		69		75		99	97	79	0
Ene-107	68		70		72		97	94	79	0
Ene-108	42		65		70		22		79	0
Ene-109	57		60		51		83	60	79	0
Ene-110	64		70		62		70	40	76	0
Ene-111	91	84	81		77		100	99	81	0
Ene-112	39		61		62		100	81	77	0
Ene-113	86	11	94	3	96	-6	10		19	-13
Ene-114	51		55		52		95	95	86	0
Ene-115	84	12	52	7	58	-5	3		12	
Ene-116	43		53	7	60	-5	4		6	
BL21(DE3)	12		21	14	13		1		3	
GOx-ER	90	-56	94	-43	96	-58	99	-100	42	0

Während die von F. Hoffmann-La Roche hergestellten Enzyme gute Aktivitäten gegenüber den  $\alpha,\beta$ -disubstituierten Nitroalkenen **5a**, **5b** und **5c** zeigen, zeigen nur noch NCR<sub>pET28</sub> bzw.

NCR<sub>pQR1</sub> hohe Aktivität gegenüber dem  $\beta$ , $\beta$ -disubstituierten Nitroalken 1-Nitro-2-phenylpropen (**6**). Dafür sind die Aktivitäten der Codexis-Enzyme für dieses Substrat im Allgemeinen höher im Vergleich zu den Substraten **5a**, **5b**, **5c**. Die Enantiomerenüberschüsse für das  $\beta$ , $\beta$ -disubstituierte Nitroalken **6** sind sehr hoch, das Problem der potentiellen Racemisierung an der C-H-aciden  $\alpha$ -Position ist bei **7** nicht gegeben. Diese Ergebnisse entsprechen den bisherigen Kenntnissen über die biokatalytische Reduktion von **6**, die in der Literatur beschriebenen Reduktionen dieses Substrates verlaufen in der Regel mit hervorragenden ee-Werten (beispielsweise die En-Reduktasen aus KYE1 (95% ee)<sup>[66]</sup> und YersER (>99% ee),<sup>[66]</sup> PETNR-Mutante (H181N, 98% ee),<sup>[77]</sup> En-Reduktase aus *Nicotiana tabacum* (>99% ee),<sup>[32]</sup> *Clostridium sporogenes*-Rohextrakt (>99% ee),<sup>[82]</sup> NCR (>99% ee),<sup>[84,86]</sup> OPR1 (98% ee)<sup>[43]</sup>). Für Substrat **8** wird ein deutlicher Abfall an Aktivität der literaturbekannten Enzyme beobachtet. Lediglich OPR1<sub>pQR1</sub> erreicht einen hohen apparenten Umsatz von 92%. Die von Codexis erhaltenen Enzyme zeigen hier gute Aktivitäten von bis zu 86% app. Umsatz (Ene-114). Die ee-Werte für dieses Substrat sind jedoch in den meisten Fällen sehr gering, der höchste ee-Wert von -16% wird mit OPR1<sub>pET28</sub> erreicht. Die geringe optische Reinheit kann vermutlich auf die hohe Racemisierungsfähigkeit der Produktverbindung zurückgeführt werden, wird im Rahmen dieser Arbeit aber nicht weiter untersucht.

Die Ergebnisse des Screenings zeigen außerdem, dass die Aktivität des *E. coli*-Expressionstammes ebenfalls berücksichtigt werden muss. Beim Screening mit *E. coli* (BL21(DE3)) wird deutlich, dass die *E. coli* eigene En-Reduktase NemR<sup>[52,53]</sup> eine Aktivität gegenüber den getesteten Nitroalkenen zeigt. Die höchste Aktivität wird bei **5b** beobachtet, die Selektivität ist entgegengesetzt zu NCR<sub>pET28</sub> bzw. NCR<sub>pQR1</sub>. Dies stellt vermutlich zusätzlich zur potentiellen Racemisierung  $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkane ein Problem dar, hohe Enantioselektivitäten zu erreichen. Beim Einsatz von Rohextrakten spielt somit der Expressionsgrad eine wichtige Rolle. Um diese Hintergrundreaktion zu vermeiden, müssen entweder gereinigte Enzyme verwendet, oder ein NemR-Deletionsstamm zur Überexpression herangezogen werden.<sup>[87]</sup>

### 3.3.3 Screening von aliphatischen Säuren und Estern

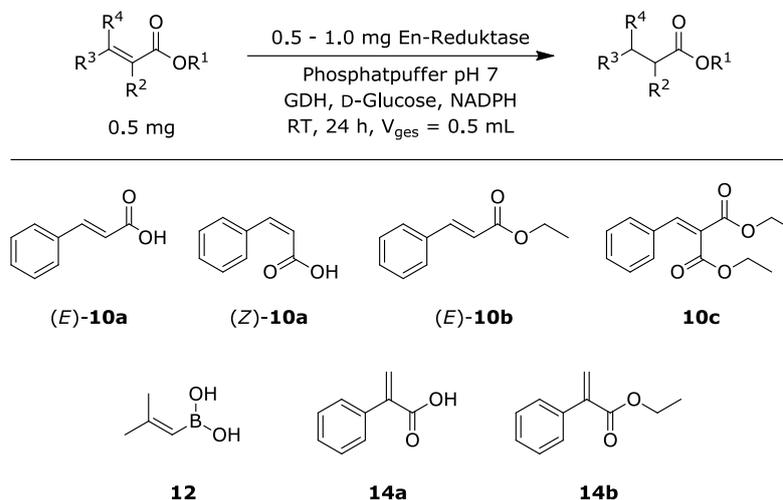
Die Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings verschiedener Zimtsäure-Derivate, Acrylsäure-Derivate sowie einer Borsäure, sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Zimtsäure wird sowohl in der *trans*- ((*E*)-**10a**) als auch in der *cis*-Form ((*Z*)-**10a**) von keinem der getesteten Enzyme als Substrat akzeptiert. Beim *trans*-Zimtsäureethylester ((*E*)-**10b**) wurden ebenfalls keine Aktivitäten gemessen. Die Gruppe um BORNSCHEUER zeigte kürzlich, dass *para*-Hydroxy-substituierte Zimtsäure von den Enzymen XenA, XenB und NemR nicht akzeptiert wird.<sup>[50]</sup> Diese Ergebnisse decken sich mit den hier erzielten Ergebnissen für die unsubstituierte Zimtsäure und bestätigen, dass Carbonsäuren als aktivierende Gruppe allgemein ein Problem bei der En-Reduktase-katalysierten C=C-Reduktion darstellen. Ungesättigte Carbonsäuren und -Ester werden deshalb als „borderline“-Substrate bezeichnet.<sup>[64]</sup> Für die Reduktion einfacher Mono-Carbonsäuren oder deren Ester eignen sich En-Reduktasen in der Regel nur bedingt, sie können aber mithilfe von Enoat-Reduktasen aus anaeroben Organismen (welche einen zusätzlichen, sauerstoffempfindlichen Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>-Cofaktor benötigen) umgesetzt werden.<sup>[65,88]</sup> Die Aktivierung der C=C-Bindung in Carbonsäurederivaten kann beispielsweise durch das Einführen einer zusätzlichen elektronenziehenden Funktionalität wie Nitrile, Halogen-Substituenten oder eine zweite Säure- oder Estergruppe erhöht werden.<sup>[13,64,67]</sup> BRENNAN *et al.* beschrieben beispielsweise die Reduktion  $\alpha,\beta$ -ungesättigter  $\alpha$ -Brom-substituierter Methylester mithilfe von Bäckerhefe bzw. der Enzyme OYE1-3.<sup>[13]</sup> Konsequenterweise wurde in diesem Screening erwartet, dass das Einführen einer zweiten Estergruppe (von **10b** zu **10c**) zu einer erhöhten Aktivierung der Doppelbindung führt. Zwei Enzymformulierungen zeigen zwar Aktivität gegenüber dem Malonsäurederivat **10c** (OPR1<sub>pET28</sub> und DBVPG<sub>pQR1</sub>), diese Aktivitäten sind jedoch so gering (3-4%), dass dieses Substrat nicht weiter untersucht wird. Für das Borsäure-Derivat **12** wird ebenfalls kein Enzym identifiziert, welches dieses Substrat akzeptiert.

Die biokatalytische Reduktion der Phenylacrylsäure (**14a**) und des Phenylacrylsäureethylesters (**14b**) stellt einen potentiellen Syntheseweg für Profenderivate dar, was diese Substrate zu sehr interessanten Ausgangsverbindungen macht. Überraschenderweise wird die Phenylacrylsäure **14a** von einigen hier getesteten En-Reduktasen als Substrat akzeptiert, obwohl lediglich eine Säurefunktionalität vorhanden ist. **14a** wird mit dem höchsten Umsatz von 52% von GOx-ER mit hervorragender Selektivität von 100% ee umgesetzt. Der Acrylsäureethylester **14b** wird dagegen vom gleichen Enzym nicht als Substrat akzeptiert.

Die En-Reduktase-katalysierte Reduktion des analogen Methylesters wurde bereits mit YqjM<sup>[84,89]</sup> und NCR<sup>[84]</sup> in der Literatur beschrieben und verläuft dabei mit beiden Enzymen mit hervorragender Enantioselektivität von >99% ee.<sup>[84,89]</sup> Allgemein wird der Ethylester **14b** im Screening von nur wenigen Enzymen akzeptiert. Die Reproduktion der Umsetzung von **14b** mit OPR1<sub>pET28a</sub>, DBVPG<sub>pQR1</sub> und Ene-108 (welche im Screening geringe Umsätze zeigen (Tabelle 4))

war erfolglos, die Reduktion des Ethylesters **14b** mit Ene-114 hat sich in Folgeversuchen jedoch bestätigt. Ene-114 erweist sich somit als geeignetes Enzym für die Reduktion von **14b** mit einem hervorragenden Enantiomerenüberschuss von 100% ee.

**Tabelle 4.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings der aliphatischen Säuren und Estern. Eingetragen sind die apparenten Umsätze (Farbschema von rot (0%) zu grün (100%)), sowie die ee-Werte (die Richtung entspricht der Elutionsreihenfolge der Enantiomere auf der HPLC bzw. GC)



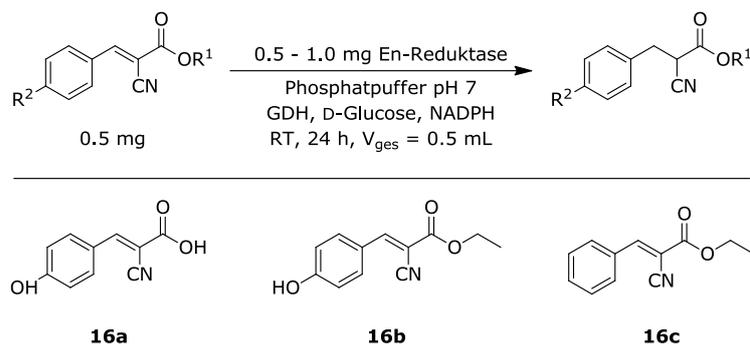
Enzym	(E)-10a	(Z)-10a	(E)-10b	10c	12	14a	14b		
	Ums. [%]	ee [%]	ee [%]						
OPR1 <sub>pET28</sub>	0	0	0	4	0	15		10	-3
OPR1 <sub>pQR1</sub>	0	0	0	0	0	6		2	
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	0	0	0	1	0	0		0	
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	0	0	0	0	0	0		0	
XenB <sub>pET28</sub>	0	0	0	0	0	0		0	
XenB <sub>pQR1</sub>	0	0	0	0	0	0		0	
NCR <sub>pET28</sub>	0	1	0	0	0	3		0	
NCR <sub>pQR1</sub>	0	1	0	0	0	7		0	
DBVPG <sub>pET28</sub>	0	0	0	0	0	0		0	
DBVPG <sub>pQR1</sub>	0	0	0	3	0	13		11	-4
OYE3 <sub>pET28</sub>	0	0	0	1	0	4		3	
OYE3 <sub>pQR1</sub>	0	0	0	0	0	0		0	
Ene-101	0	0	0	0	0	0		0	
Ene-102	0	0	0	0	0	0		0	
Ene-103	0	0	0	0	0	0		0	
Ene-104	0	0	0	0	0	0		0	
Ene-105	0	0	0	0	0	0		0	
Ene-106	0	0	0	0	0	0		0	
Ene-107	0	0	0	0	0	0		0	
Ene-108	0	0	0	0	0	10		11	-1
Ene-109	0	0	0	0	0	3		3	
Ene-110	0	0	0	0	0	2		2	
Ene-111	0	0	0	0	0	0		0	
Ene-112	0	1	0	0	0	0		0	
Ene-113	0	0	0	0	0	0		0	
Ene-114	0	0	0	0	0	0		9	100
Ene-115	0	0	0	0	0	0		0	
Ene-116	0	0	0	0	0	0		0	
BL21(DE3)	0	0	0	0	0	0		0	
GOx-ER	0	1	0	0	0	52	100	0	

In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass **14b** nicht von NCR<sub>pET28</sub> bzw. NCR<sub>pQR1</sub> umgesetzt wird, da die Umsetzung des entsprechenden Methylesters mit NCR in der Literatur bekannt ist.<sup>[84]</sup> Die Größe des Esterrests scheint demnach eine signifikante Rolle für die Umsetzung mittels NCR zu spielen. Allgemein kann bei dem hier gezeigten Screening eine Konkurrenzreaktion durch *E. coli*-eigene En-Reduktasen vernachlässigt werden, da keines der getesteten Substrate eine Aktivität des Expressionsstamms BL21(DE3) hervorruft.

### 3.3.4 Screening von $\alpha$ -Cyanozimtsäurederivaten

Die Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings der  $\alpha$ -Cyanozimtsäure-Derivate sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Durch das Einführen einer Nitrilgruppe soll, wie bereits in Abschnitt 3.3.3 erwähnt, die durch die Säure- bzw. Esterfunktion nur gering aktivierte C=C-Bindung weiter polarisiert werden. (*E*)-2-Cyano-3-(4-hydroxyphenyl)acrylsäure (**16a**) wird lediglich von NCR<sub>pET28</sub> bzw. NCR<sub>pQR1</sub> und GOx-ER umgesetzt. Durch Einführen der Ester-Gruppe in **16b** zeigen deutlich mehr Enzyme Aktivität. Die höchsten Umsätze für **16b** werden mit Ene-107 (84%) und Ene-114 (88%) erreicht. Wird die Hydroxy-Gruppe am Aromaten entfernt (**16c**), wird in einigen Fällen eine weitere Aktivitätssteigerung beobachtet (z.B. OPR1<sub>pQR1</sub> von 23% (**16b**) auf 60% (**16c**), XenB<sub>pET28</sub> von 14% (**16b**) auf 36% (**16c**), Ene-108 von 25% (**16b**) auf 70% (**16c**)). Dieser Effekt wird jedoch nicht bei allen Enzymen beobachtet, der gegenläufige Effekt zeigt sich z.B. bei den Enzymen Ene-101 (von 28% (**16b**) auf 17% (**16c**)) und Ene-116 (von 20% (**16b**) auf 4% (**16c**)). Die elektronischen und sterischen Einflüsse wirken sich auf die verschiedenen Enzyme unterschiedlich aus, es ist keine Verallgemeinerung möglich. Allerdings werden in allen Versuchen nahezu racemische Produkte erhalten, was vermutlich auf die hohe Racemisierungsanfälligkeit der Produkte zurückzuführen ist. Eine Reihe ungesättigter Nitrile wurde bereits von KOSJEK *et al.* mit den kommerziell erhältlichen En-Reduktasen umgesetzt.<sup>[71]</sup> Zwar war in den getesteten Verbindungen ausschließlich die Nitrilgruppe und keine zusätzliche Säure-oder Esterfunktionalität vorhanden, die Ergebnisse bestätigten jedoch, dass mit dieser Gruppe Enzyme Katalysatoren zur Verfügung stehen, die durch eine Nitrilfunktion aktivierte C=C-Bindungen reduzieren können.

**Tabelle 5.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings der  $\alpha$ -Cyanozimtsäure-Derivate. Eingetragen sind die apparenten Umsätze (Farbschema von rot (0%) zu grün (100%)), sowie die ee-Werte (die Richtung entspricht der Elutionsreihenfolge der Enantiomere auf der HPLC bzw. GC)



Enzym	16a		16b		16c	
	Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Ums. [%]	ee [%]	
OPR1 <sub>pET28</sub>	0	3		37	9	
OPR1 <sub>pQR1</sub>	0	23		60	1	
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	0	6		3		
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	0	3		3		
XenB <sub>pET28</sub>	0	14		36	0	
XenB <sub>pQR1</sub>	0	4		6	-1	
NCR <sub>pET28</sub>	11	4		3		
NCR <sub>pQR1</sub>	26	8		5		
DBVPG <sub>pET28</sub>	0	4		14	4	
DBVPG <sub>pQR1</sub>	0	0		2		
OYE3 <sub>pET28</sub>	0	0		2		
OYE3 <sub>pQR1</sub>	0	2		13		
Ene-101	0	28		17	4	
Ene-102	4	10		5		
Ene-103	0	7		15		
Ene-104	0	4		11		
Ene-105	6	6		12		
Ene-106	0	3		5		
Ene-107	0	84	0	84	2	
Ene-108	0	25		70	1	
Ene-109	0	29		48	0	
Ene-110	0	34		41	1	
Ene-111	3	21		32	1	
Ene-112	0	11		17		
Ene-113	0	10		19	-1	
Ene-114	0	88	0	89	0	
Ene-115	0	46		5		
Ene-116	0	20		4		
BL21(DE3)	0	8		2		
GOx-ER	19	33	1	40	0	

### 3.3.5 Screening cyclischer Enone

Im Screening der cyclischen Enone zeigen die getesteten Enzyme keine Aktivität gegenüber der in  $\beta$ -Position mit elektronenziehenden Gruppen substituierten cyclischen Enone **18b**, **18c**, **18d** und **18e**. Der einleitende Hydridtransfer bei der Reduktion mittels En-Reduktasen erfolgt auf das partial positiv geladene Kohlenstoffatom in  $\beta$ -Position (Abschnitt 3.1). Durch elektronenziehende Substituenten in dieser Position, wie die hier gewählten Cl- (**18d**), Methoxy-

(**18c**, **18e**) und Br-Substituenten (**18b**) ist scheinbar eine ausreichende Polarisierung der Doppelbindung durch die Carbonylgruppe nicht mehr gegeben, wodurch der Hydrid-Transfer und somit die Reduktion der Doppelbindung nicht stattfinden kann. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von YANTO *et al.* gemacht, die keine enzymkatalysierte Reduktion der Doppelbindung in **18c** und **18e** durch Yers-ER und KYE1 feststellen konnten.<sup>[66]</sup>

Das gewählte Substrat **18a** mit einer Methylgruppe in  $\beta$ -Position hingegen wird von mehreren En-Reduktasen mit sehr guter Selektivität reduziert (Tabelle 6). Diese Ergebnisse zeigen deutlich den elektronischen Einfluss des Substituenten in  $\beta$ -Position. Die höchste Aktivität für **18a** wird bei Ene-105 mit einer sehr guten Enantioselektivität von 95% ee detektiert, bei geringeren Umsätzen mit den Enzymen Ene-109, Ene-111 und Ene-112 werden hervorragende Selektivitäten von 100% ee erreicht. Während NCR **18a** im Rahmen dieses Screenings mit 95% ee reduziert, berichten HALL *et al.* sogar von >99% ee für dieses Enzym,<sup>[86]</sup> was die Eignung dieser En-Reduktase für die enantioselektive Reduktion von **18a** bestätigt. Zusätzlich beobachten HALL *et al.* auch eine Aktivität von OYE3 gegenüber **18a** sowie eine sehr hohe Enantioselektivität von >99% ee. Dieses Ergebnis konnte mit OYE3 in diesem Screening nicht bestätigt werden. Die von PETERS *et al.* berichtete Aktivität und Enantioselektivität (>99% ee)<sup>[50]</sup> von XenB gegenüber **18a** konnte ebenfalls nicht bestätigt werden. Allerdings wird die Anzahl der hoehenantioselektiven Enzyme für Substrat **18a**, welche bisher die in der Literatur erwähnten Enzyme PETNR (>99% ee),<sup>[90,91]</sup> NemR (>99% ee),<sup>[50,91]</sup> OYE1-3 (je >99% ee),<sup>[86]</sup> EBP1 (>99% ee),<sup>[91]</sup> Yers-ER und KYE1 (je 99% ee)<sup>[66]</sup> enthält, um die kommerziellen En-Reduktasen Ene-105, Ene-109, Ene-110, Ene-111, Ene-112 sowie GOx-ER erweitert.

Bei weiteren in der Literatur durchgeführten Studien mit dem analogen in  $\alpha$ -Position Methylsubstituierten Substrat 2-Methylcyclopent-2-enon (**18g**, in diesem Screening nicht verwendet), zeigte sich erneut deutlich der Einfluss der Position des Substituenten auf die Selektivität der Reaktion. Während **18a** mit durchgehend hohen ee-Werten reduziert wurde, zeigten die Reduktionen von **18g** racemische Produkte (OYE1),<sup>[86]</sup> bzw. geringe ee-Werte für die En-Reduktasen OYE2 (16% ee),<sup>[86]</sup> OYE3 (34% ee),<sup>[86]</sup> NCR (48% ee)<sup>[86]</sup> und PETNR (64% ee)<sup>[91]</sup> - 70% ee<sup>[90]</sup>. Die von YANTO *et al.* untersuchten Enzyme KYE1 und YersER reduzieren dieses Substrat aber erfreulicherweise mit >99% ee.<sup>[66]</sup>

Beim Vergleich der Cyclohexenon-Derivate **18e** und **18f** fällt auf, dass die Methoxy-Gruppe in  $\beta$ -Position von keinem der getesteten Enzyme akzeptiert wird, sich eine Methoxy-Substitution in  $\alpha$ -Position hingegen positiv auf die Aktivierung der Doppelbindung auswirkt. **18f** wird mit teilweise hohen Aktivitäten und sehr guten Enantioselektivitäten reduziert. Die Polarisierung der Doppelbindung wird durch einen elektronenziehenden Substituenten in  $\alpha$ -Stellung nicht beeinträchtigt. Trotzdem sind starke Unterschiede zwischen den literaturbekannten und den Codexis-Enzymen zu erkennen, die Codexis-Enzyme zeigen eine deutlich höhere Aktivität gegenüber **18f**. Die in der Literatur beschriebenen Umsetzungen liegen mit 71% ee (KYE1)<sup>[66]</sup> und 32% ee (Yers-ER)<sup>[66]</sup> deutlich unter den hier verwendeten Enzymen, Die höchste

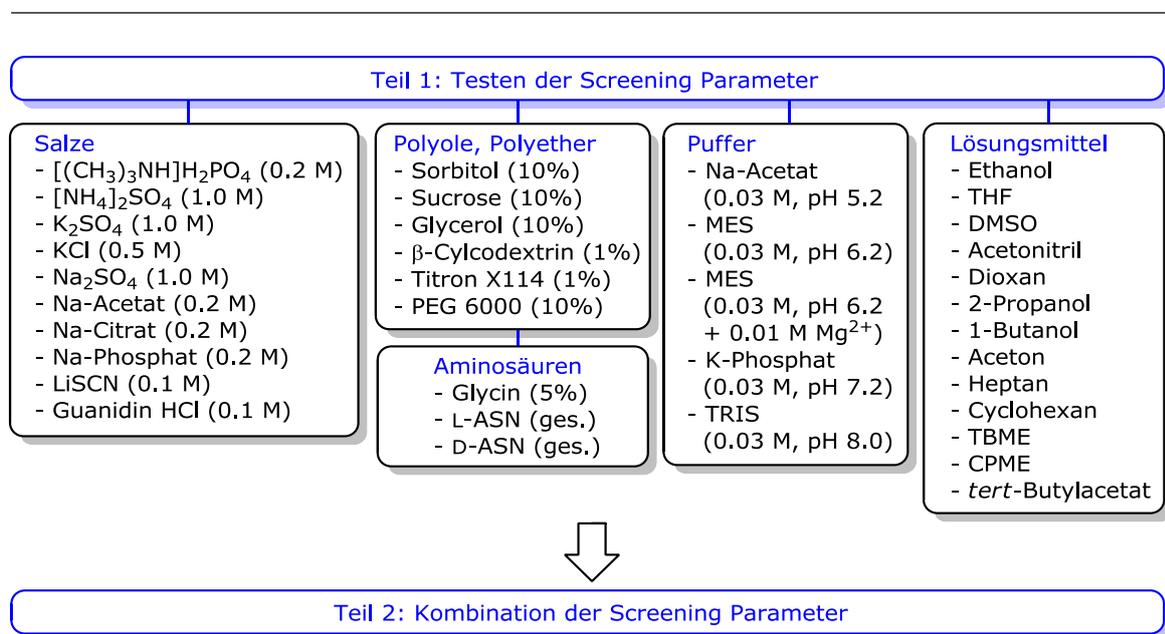


detektiert. Dieses Substrat wurde von IQBAL *et al.* im Rahmen einer Studie als Modellsubstrat genutzt und von einer En-Reduktase aus *Shewanella* sp. (SYE-4) reduziert.<sup>[92]</sup>

### 3.4 Reaktionsparameter-Screening zur Charakterisierung von En-Reduktasen und Optimierung der Reaktionsbedingungen

#### 3.4.1 Allgemeiner Aufbau des Reaktionsparameter-Screenings

Im Reaktionsparameter-Screening werden die Einflüsse verschiedener chaotroper und kosmotroper Salze, Polyole, Aminosäuren, Puffer und Lösungsmittel auf die Aktivität und Selektivität von Enzymen untersucht. Die getesteten Parameter sind in Abbildung 9 dargestellt. Das Substrat-zu-Enzym Verhältnis (S:E) wird so gewählt, dass sowohl Verbesserungen als auch Verschlechterungen an Umsatz und Selektivität der Reaktion erfasst werden können. Die Enzyme werden als lyophilisierte Rohextrakte eingesetzt, das Substrat-zu-Enzym-Verhältnis beschreibt das Verhältnis der eingesetzten Massen (mg Enzym: mg Substrat) zueinander. Nach dem Test der verschiedenen Parameter werden Kombinationen der besten Parameter getestet, um die optimalen Reaktionsbedingungen für die entsprechende Reaktion zu identifizieren. Unter den so optimierten Bedingungen sollen im Anschluss Versuche im präparativen Maßstab durchgeführt werden.



**Abbildung 9.** Aufbau eines Reaktionsparameter-Screenings

Im Reaktionsparameter-Screening ist es zusammenfassend möglich, Aussagen über die entsprechende Enzymformulierung hinsichtlich deren Aktivität und Toleranz gegenüber der

getesteten Parameter zu treffen, allerdings können aufgrund fehlender Informationen über Proteingehalte der Enzymformulierungen bzw. spezifische Aktivitäten keine Aussagen über die katalytische Effizienz des jeweiligen Enzyms getroffen werden. Dennoch können die hier gesammelten Ergebnisse interessante Einblicke in die Enzyme vermitteln und in eine Synthesepanung im präparativen Maßstab miteinbezogen werden.

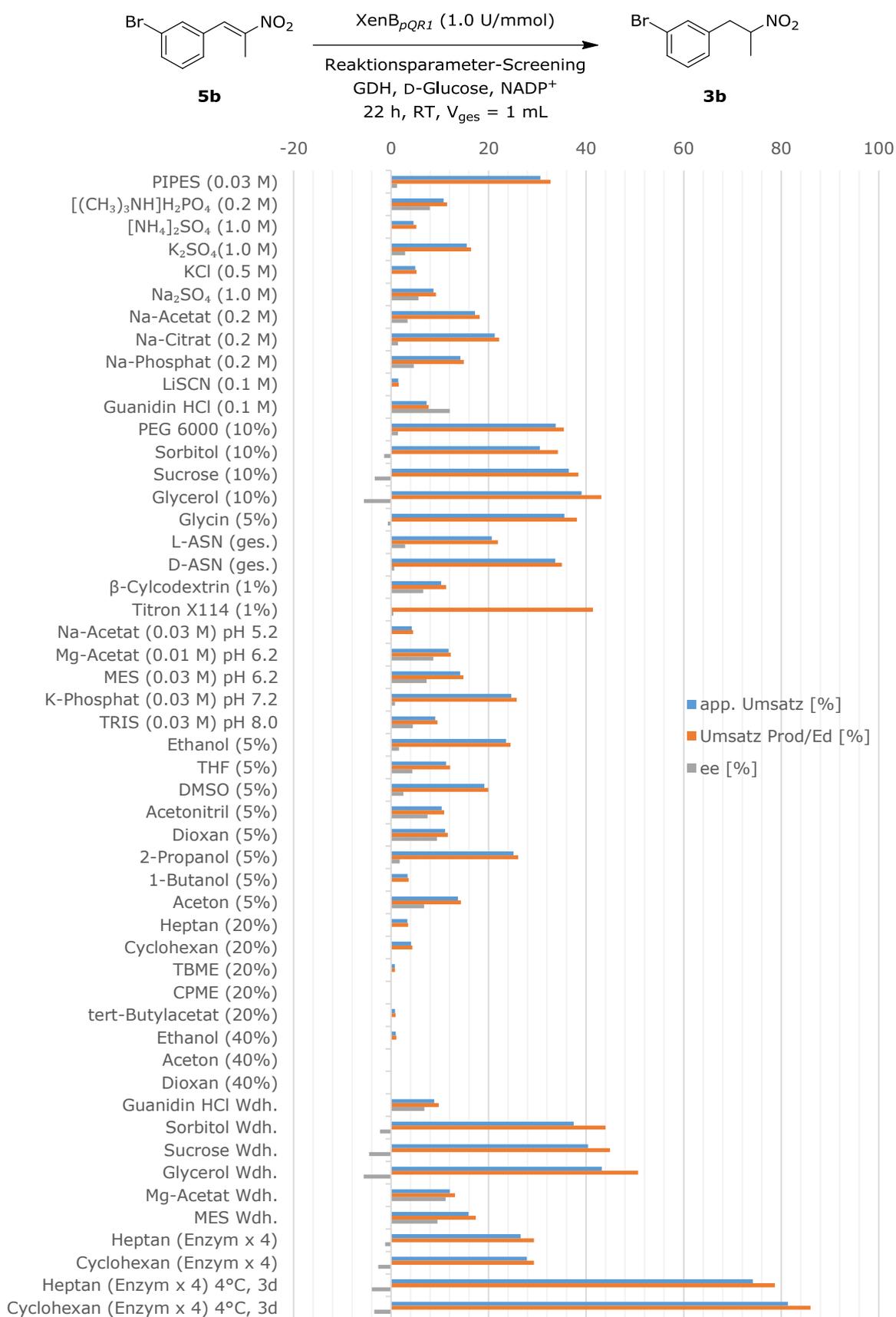
Die Umsatzbestimmung erfolgt wie bereits im Enzymscreening beschrieben (Abschnitt 3.3.1), mittels HPLC bzw. GC unter ggf. Berücksichtigung der unterschiedlichen Absorptionsverhalten von Edukt und Produkt. Da die auftretenden Nebenprodukte nicht charakterisiert wurden, wurde deren Absorptionsverhalten nicht berücksichtigt. In den Ergebnissen wird zum einen das Flächenverhältnis des Produktsignals zu der Summe der Edukt- und Produktflächen angegeben (Umsatz Prod/Ed) sowie das Verhältnis des Produktsignals zu den Signalen von Edukt, Produkt und weiteren Verunreinigungen oder Nebenprodukten (app Umsatz).

### 3.4.2 SDS-Gel der im Reaktionsparameter-Screening verwendeten Enzymformulierungen

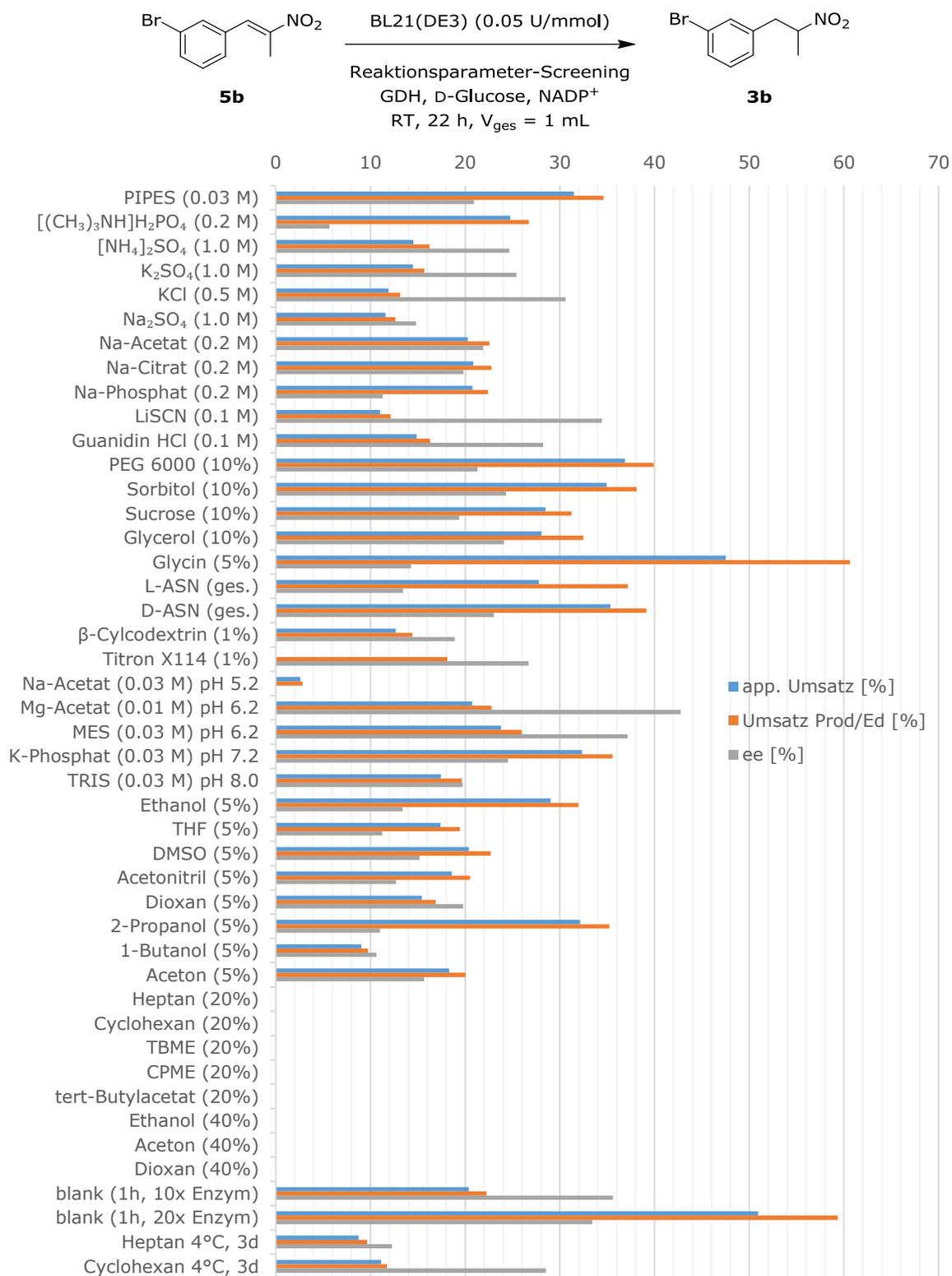
Es wird ein SDS-Gel der Enzymformulierungen angefertigt, welche im Reaktionsparameter-Screening verwendet werden. Das SDS-Gel (Abbildung 95, Seite 171) zeigt, dass es sich bei allen Enzympräparationen um Rohextrakte handelt, keines der Enzyme liegt in isolierter Form vor. XenB<sub>pQR1</sub> zeigt eine sehr schwache Überexpression, alle anderen Enzyme sind gut überexprimiert. XenB<sub>pET28</sub> wurde hier nicht auf die Expression hin untersucht, auch wenn es sich um das gleiche Enzym auf einem anderen Plasmid handelt, da im einleitenden Screening der Nitroalkene XenB<sub>pQR1</sub> die höheren Aktivitäten zeigte (Abschnitt 3.3.2). Über die spezifischen Aktivitäten der verwendeten En-Reduktasen ist nur sehr wenig bekannt. Einzig für die En-Reduktase aus *Pseudomonas putida* (XenB) sowie die En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* (GOx-ER) sind entsprechende Daten verfügbar. Die spezifische Aktivität von XenB gegenüber 2,4,6-Trinitrotoluol beträgt 1.88 U/mg,<sup>[48]</sup> die spezifische Aktivität von GOx-ER gegenüber *trans*-2-Hexenal beträgt 1.86 U/mg.<sup>[85,93]</sup>

### 3.4.3 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von **3b** mit XenB<sub>pQR1</sub> und der Einfluss von *E. coli* BL21(DE3)

Die Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings von XenB<sub>pQR1</sub> mit **5b** sind in Abbildung 10 zusammengefasst. Für das Screening wurde ein Substrat-zu-Enzym-Verhältnis (S:E) von 1 gewählt. Die deutlichste Steigerung des Umsatzes war mit Glycerol zu beobachten. Es ist auffällig, dass sich die Enantiopräferenz in Anwesenheit von Sorbitol, Sucrose, Glycerol und Glycin umkehrt. Dieser Effekt wird durch Wiederholen der Versuche bestätigt. Zur Untersuchung der Hintergrundreaktion wird ein Reaktionsparameter-Screening mit **5b** und BL21(DE3) durchgeführt. Hier wird eine höhere Enzymmenge benötigt, um einen vergleichbaren Umsatz zu erreichen (S:E = 0.25). Betrachtet man die Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings des leeren Expressionsstammes *E. coli* BL21(DE3) mit **5b** (Abbildung 11) fällt auf, dass BL21(DE3) das gleiche Enantiomer (positives Vorzeichen) bildet, welches beim Screening mit XenB<sub>pQR1</sub> entstanden ist. Da XenB<sub>pQR1</sub> kaum überexprimiert vorliegt (siehe Abschnitte 3.4.2 und 8.3.13), wird vermutet, dass im Screening XenB<sub>pQR1</sub> mit **5b** hauptsächlich der *E. coli*-Hintergrund gemessen wurde. Möglicherweise zeigt XenB<sub>pQR1</sub> auf die Additive Sorbitol, Sucrose, Glycerol und Glycin eine hohe Aktivität, sodass in diesen Fällen die Hintergrundaktivität überlagert wird. Es wird deshalb vermutet, dass XenB<sub>pQR1</sub> das zu BL21(DE3) entgegengesetzte Enantiomer von **3b** bildet.



**Abbildung 10.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings zur Synthese von **3b** mit XenB<sub>pQR1</sub> (S:E = 1). Alle Versuche (mit Ausnahme der Puffervariationen) in PIPES-Puffer, Wdh.: Wiederholungsversuch.

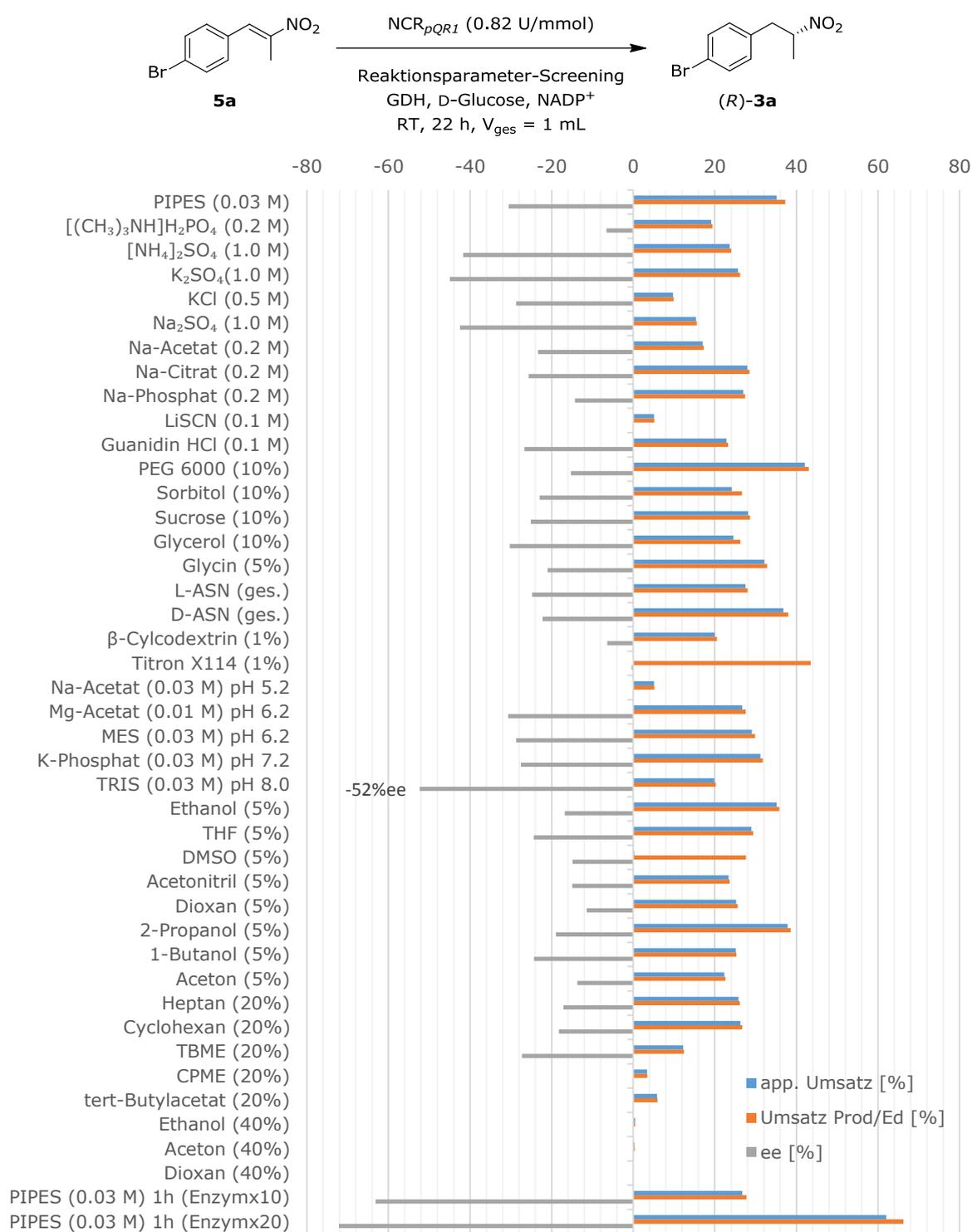


**Abbildung 11.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings zur Synthese von **3b** mit *E. coli* BL21(DE3) (S:E = 0.25). Alle Versuche (mit Ausnahme der Puffervariationen) in PIPES-Puffer.

### 3.4.4 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von (*R*)-**3a** mit $\text{NCR}_{pQR1}$

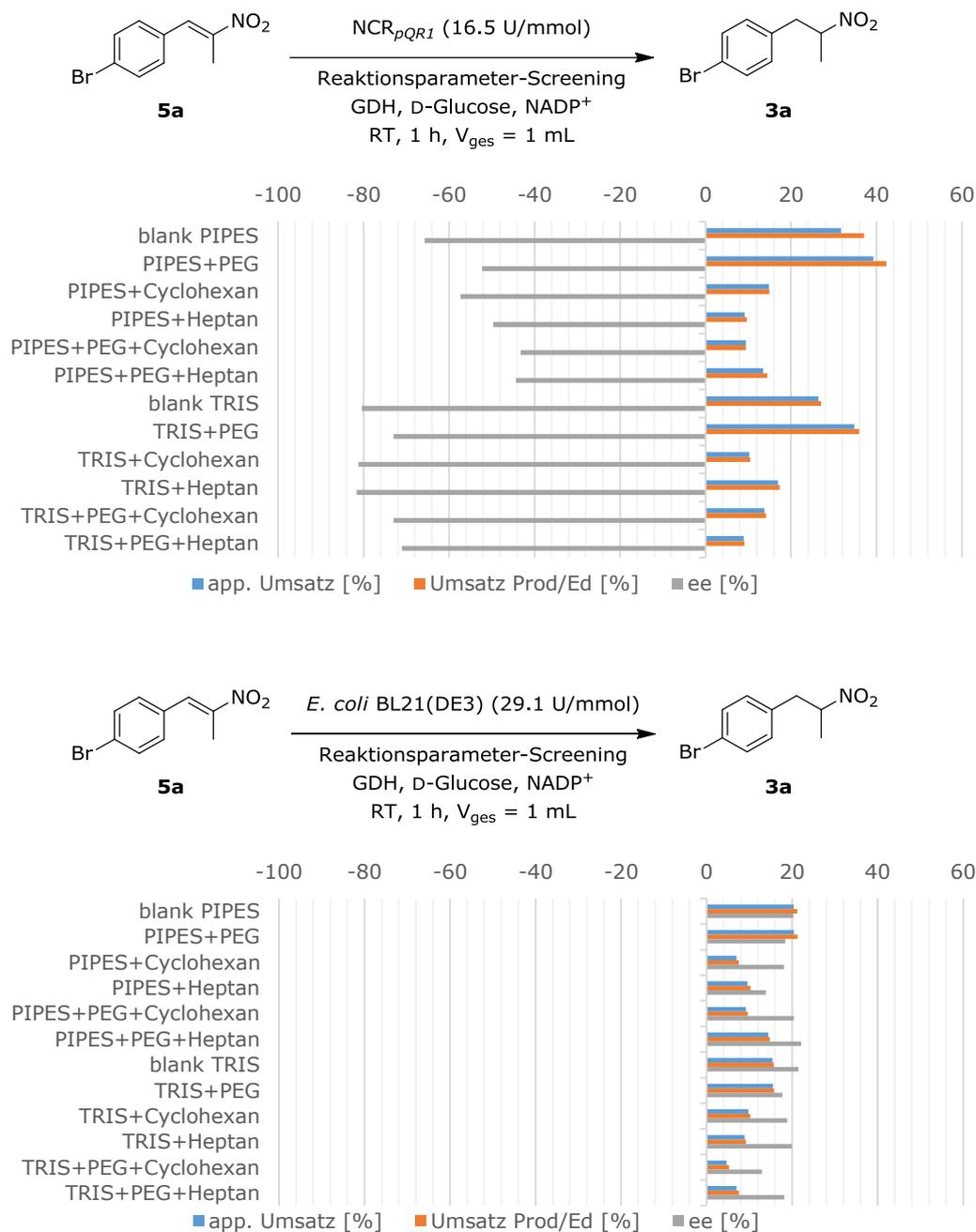
Die Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings von  $\text{NCR}_{pQR1}$  mit Substrat **5a** bei einem S:E Verhältnis von 50 sind in Abbildung 12 dargestellt. Es wird ein positiver Effekt auf den Umsatz in Anwesenheit von PEG festgestellt. Die ee-Werte des Reaktionsparameter-Screenings liegen weit unter dem im En-Reduktase-Screening erreichten ee-Wert von 71% (Tabelle 3). Trotzdem zeigt die Verwendung von TRIS-Puffer (pH 8.0) einen positiven Einfluss auf die Enantioselektivität (52% ee). Grund für die im Vergleich zum En-Reduktase-Screening geringen ee-Werte ist scheinbar die geringere Enzymmenge. Wird die Enzymmenge erhöht (und die Reaktionszeit auf 1 h verringert, Abbildung 12), werden ähnlich gute ee-Werte von bis zu 72% ee erreicht. Diese Beobachtung wird vor allem auf die Enzymmenge zurückgeführt, da die Reaktionszeit in Bezug auf die Racemisierung nur eine untergeordnete Rolle spielt (siehe Abschnitt 3.4.5). Ein Einfluss der Enzymmenge auf die Enantioselektivität ist in der Literatur bis dato nicht beschrieben. Zwar gehen die Bestrebungen in der Entwicklung biokatalytischer Prozesse dahin, möglichst geringe Katalysatormengen einzusetzen,<sup>[5,12]</sup> allerdings kann ein positiver Effekt hoher Katalysatorkonzentrationen auf die Selektivität eventuell ein Umdenken erfordern.

Die Parameter mit den besten Ergebnissen wurden im Anschluss kombiniert. Die Ergebnisse dieser Kombinationsversuche (PIPES, PEG, Cyclohexan, Heptan) sind in Abbildung 13 dargestellt. Die Kombinationsversuche wurden bei einer verkürzten Reaktionszeit von 1 h und dafür erhöhter Enzymmenge ( $\text{NCR}_{pQR1}$ : S:E = 2.5; BL21(DE3): S:E = 0.025) durchgeführt. Es ist zu beachten, dass bei den Versuchen mit BL21(DE3) die 100 fache Enzymmenge eingesetzt wurde. Der *E. coli*-Hintergrund bildet das zu  $\text{NCR}_{pQR1}$  entgegengesetzte Enantiomer von **3a**. Die benötigte Enzymmenge zeigt jedoch, dass diese Hintergrundreaktion nicht die Hauptursache für geringe Enantioselektivitäten sein kann. Die Hintergrundreaktion kann durch die gewählten Parameter nicht unterdrückt werden, *E. coli* zeigt für alle gewählten Parameter Aktivität. Für das Upscale dieser Reaktion (Abschnitt 3.5.1) wird TRIS-Puffer gewählt. Der Umsatz liegt bei der Verwendung von TRIS-Puffer zwar unterhalb dessen bei der Verwendung von PIPES, allerdings überwiegt hier der Vorteil der hohen Enantioselektivität von 80% ee.



**Abbildung 12.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings zur Synthese von (R)-**3a** mit NCR<sub>pQR1</sub> (S:E = 50). Alle Versuche (mit Ausnahme der Puffervariationen) in PIPES-Puffer.

In der Literatur ist beschrieben, dass die En-Reduktase aus *Zymomonas mobilis* (NCR)  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Aldehyde, Ketone, Maleimide und Diester mit hervorragenden Enantioselektivitäten von bis zu >99% ee reduziert.<sup>[86]</sup> Die Reduktion  $\beta,\beta$ -disubstituierter Nitroalkene verläuft ebenfalls mit hervorragenden Enantioselektivitäten von >99% ee,<sup>[84,86]</sup> die Reduktion  $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkene vom Typ **5** verläuft in den in der Literatur beschriebenen Studien mittels NCR aus *Zymomonas mobilis* allerdings nur mit 69% ee (bzw. 84% ee mit einer NCR aus *Photorhabdus luminescens*).<sup>[84]</sup>



**Abbildung 13.** Ergebnisse der Kombinationsversuche im Rahmen des Reaktionsparameter-Screenings zur Synthese von **3a** mit NCR<sub>pQR1</sub>(oben, S:E = 2.5) bzw. *E. coli* BL21(DE3) (unten, S:E = 0.025)

Über den Einfluss von Salz-, Lösungsmittel-, und sonstigen Additiven auf diese En-Reduktase wurde in der Literatur bis dato nur wenig berichtet. MÜLLER *et al.* führten eine Studie mit ganzen Zellen von *Zymomonas mobilis* durch und untersuchten die Bildung von Citronellal aus Citral in Abhängigkeit unterschiedlicher organischer Solventien. Ein deutlich Positiver Effekt auf den Umsatz wurde dabei bei der Verwendung von je 20% Isoamylalkohol, TBME, Diethylether und Toluol detektiert.<sup>[16]</sup> Der positive Einfluss von TBME konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden, allerdings handelt es sich auch um deutlich andere Reaktionsbedingungen (unterschiedliche Substrate, unterschiedliche Enzymformulierung).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sich ein ausführliches Reaktionsparameter-Screening positiv auf das Wissen über die Reaktion auswirkt, und diese Kenntnisse genutzt werden können, um bisher geringe Enantioselektivitäten des Enzyms (69% ee, CLASSEN *et al.*)<sup>[84]</sup> durch Optimierung der Parameter zu erhöhen (80% ee, Abbildung 13).

### 3.4.5 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von (*S*)-**3a** mit Ene-111

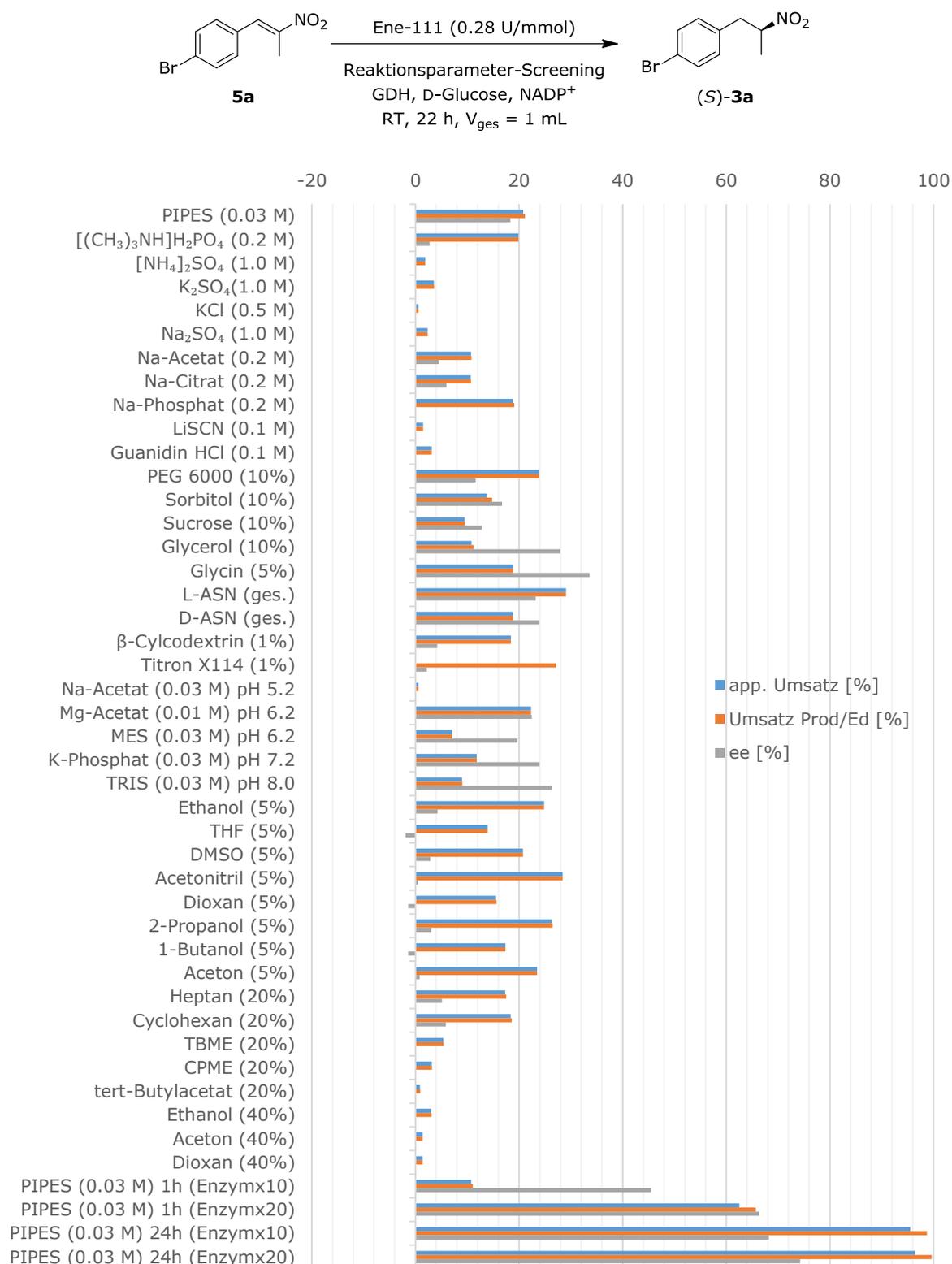
Die Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings von Ene-111 mit Substrat **5a** sind in Abbildung 14 dargestellt. Ein S:E-Verhältnis von 250 zeigt die hohe Aktivität dieses Enzyms gegenüber **5a**. Es zeigt sich ein deutlich positiver Effekt auf den Umsatz in Anwesenheit von L-ASN sowie Acetonitril und 2-Propanol. Beim Vergleich der Puffer fällt auf, dass die Aktivität bei saurem pH (5.2) sehr gering ist, und dass die Anwesenheit von Magnesiumacetat den Umsatz deutlich erhöht. Die positive Wirkung von Magnesiumionen auf Enzymreaktionen wurde bereits 1977 ausführlich beschrieben.<sup>[94]</sup> Dieser Befund gilt nicht generell für alle Enzyme, im Fall von Ene-111 kann dieser Effekt jedoch bestätigt werden.

Die Verwendung von Ene-111 ist in der Literatur nur von KOSJEK *et al.* beschrieben, die mithilfe dieses Enzyms ungesättigte Nitrile und Ketone umsetzen.<sup>[71]</sup> Als Reaktionsmedium wurde Phosphatpuffer pH 7.0 gewählt, sowie ein Zusatz von 5% DMSO. Das vorliegende Reaktionsparameter-Screening bestätigt die Eignung eines neutralen pH-Wertes, während KOSJEK *et al.* jedoch hohe Enantioselektivitäten in Anwesenheit von DMSO erzielten (89-98% ee für die Reduktion ungesättigter Nitrile, 91-98% für die Reduktion ungesättigter Ketone) kann die Verwendung dieses Additives nach den vorliegenden Ergebnissen für die Reduktion des Nitroalkens **5a** nicht empfohlen werden. Bei Anwesenheit aller organischen Lösungsmittel sinkt die Enantioselektivität deutlich, in Gegenwart von DMSO geht sie von 18% auf 3% ee zurück. Der Einsatz von Additiven und gewählten Reaktionsparametern ist zusammenfassend immer sowohl auf das Enzym als auch das Substrat anzupassen.

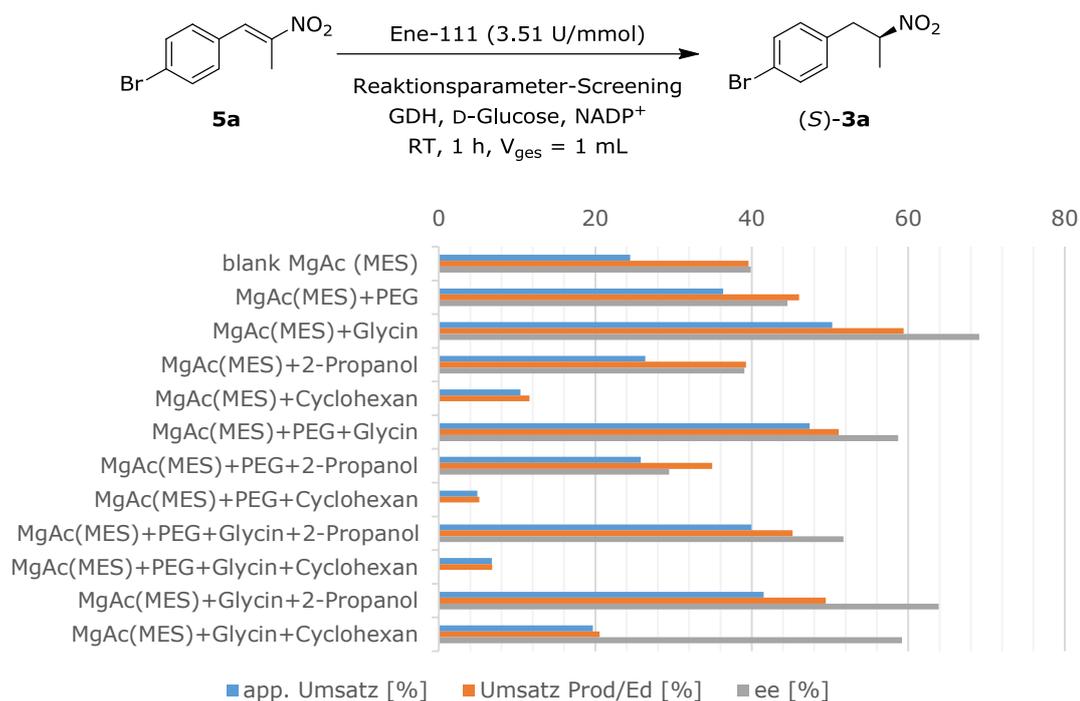
Ein positiver Effekt auf den ee-Wert wurde bei Zusatz von Glycin detektiert, sowie bei der Verwendung erhöhter Enzymmengen. Dies stimmt mit der Beobachtung beim

Reaktionsparameter-Screening von  $\text{NCR}_{pQR1}$  mit **5a** überein, wonach sich eine hohe Enzymmenge positiv auf die Enantioselektivität der Reaktion auswirkt (Abschnitt 3.4.4). Zusätzlich konnte hier gezeigt werden, dass auch über eine Reaktionszeit von 24 h bei erhöhter Enzymmenge hohe Enantioselektivitäten (74% ee) erhalten werden. Damit wurde gezeigt, dass sich der positive Effekt auf die erhöhte Enzymmenge, und nicht auf die geringe Reaktionszeit zurückführen lässt. Dieser Effekt ist in der Literatur bis dato nicht beschrieben, bildet jedoch einen interessanten Ausgangspunkt für zukünftige Arbeiten.

Die Kombinationsversuche mit den Parametern PEG, Glycin, 2-Propanol und Cyclohexan (Abbildung 15) werden bei verkürzter Reaktionszeit von 1 h und erhöhter Enzymmenge (S:E = 20) in MES-Puffer in Anwesenheit von Magnesiumacetat durchgeführt. Es bestätigt sich, dass in Anwesenheit von Glycin vergleichsweise hohe ee-Werte erreicht werden. Als Parameter für ein Upscale der Reaktion werden daher MES-Puffer, Magnesiumacetat und Glycin gewählt (Abschnitt 3.5.2).



**Abbildung 14.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings zur Synthese von (S)-**3a** mit Ene-111 (S:E = 250). Alle Versuche (mit Ausnahme der Puffervariationen) in PIPES-Puffer



**Abbildung 15.** Ergebnisse der Kombinationsversuche im Rahmen des Reaktionsparameter-Screenings zur Synthese von (S)-**5a** mit Ene-111 (S:E = 20)

### 3.4.6 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von (R)-**15b** mit Ene-114

Die Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings von Ene-114 mit dem Phenylacrylsäureester **14b** sind in Abbildung 16 dargestellt. Mit einem Substrat-zu-Enzym-Verhältnis von 1 musste verhältnismäßig viel der Enzymformulierung eingesetzt werden. Es werden deutlich positive Auswirkungen auf den Umsatz in Anwesenheit von Natriumsulfat, Glycin, Magnesiumacetat und MES beobachtet, allerdings entstehen nicht definierte Nebenprodukte (die Menge der Nebenprodukte entspricht der Differenz zwischen apparentem Umsatz und dem Produkt/Edukt-Verhältnis). Die Enantioselektivität ist in allen Fällen hervorragend, das Enzym Ene-114 reduziert **14b** mit 100% ee.

Die Verwendung von Ene-114 ist in der Literatur bis dato nur von KOSJEK *et al.* beschrieben, die mithilfe dieses Enzyms ungesättigte Nitrile und Ketone umsetzen.<sup>[71]</sup> Als Reaktionsmedium wurde Phosphatpuffer pH 7.0 gewählt, sowie ein Zusatz von 5% DMSO. Das vorliegende Reaktionsparameter-Screening zeigt, dass sich ein leicht saurer Puffer mit einem pH-Wert von 6.2 positiv auf den Umsatz auswirkt. Die Verwendung von DMSO verringert den Umsatz im vorliegenden Screening zwar, zeigt jedoch keinen negativen Einfluss auf die Enantioselektivität dieser Reaktion. Mit dem Phenylacrylsäureester **14b** wurde somit das Substratspektrum dieses

Enzyms, das bisher ungesättigte Nitrile und Ketone mit guten ee-Werten (87-93% ee für Nitrile, 93-98% ee für Ketone)<sup>[71]</sup> umsetzt, um eine ungesättigte Ester-Verbindung erweitert.

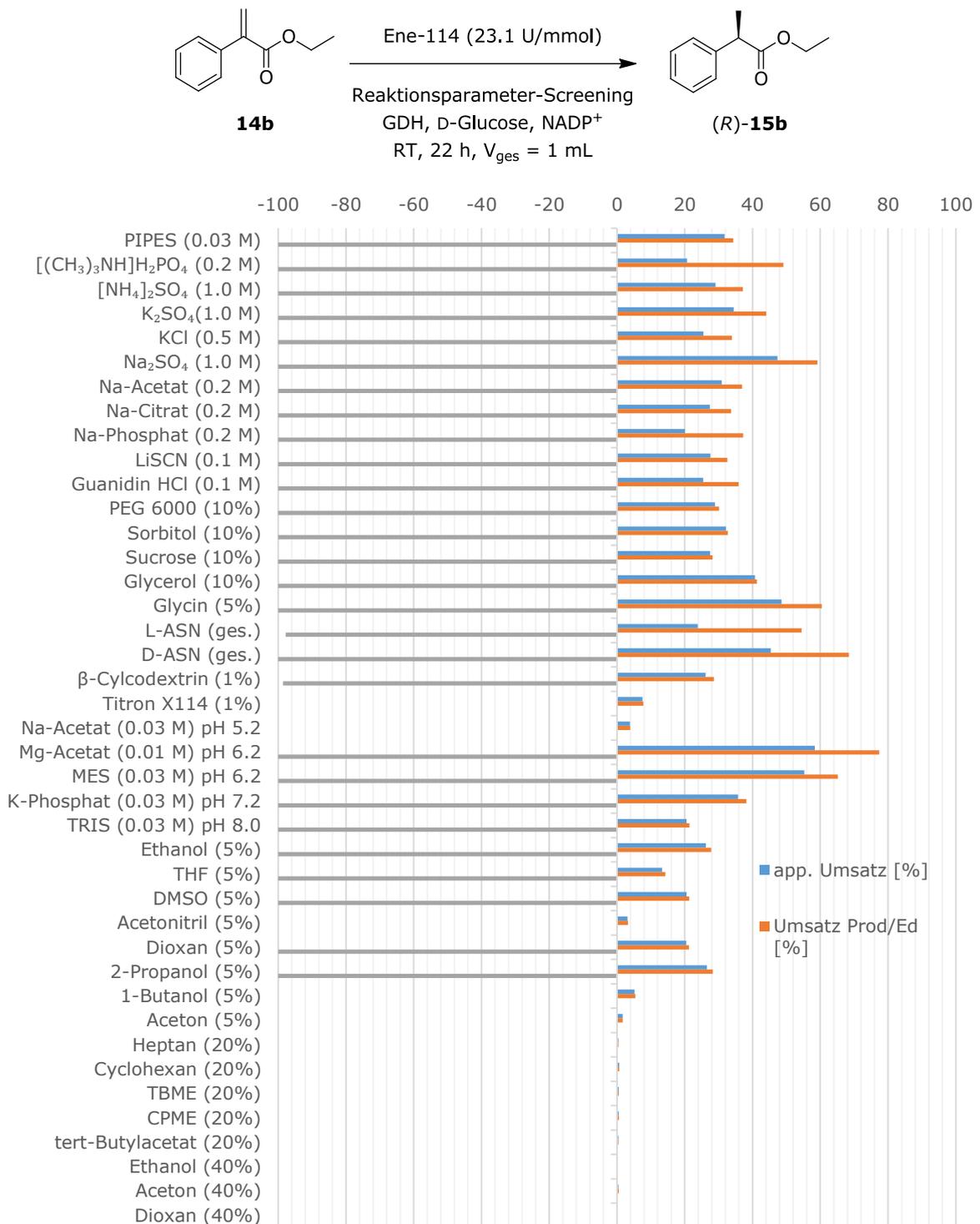
Da es sich bei (*R*)-**15b** um ein Profen-Derivat handelt, ist dessen biokatalytische Synthese mit diesen hervorragenden Enantioselektivitäten vor allem aus pharmazeutischer Sicht sehr interessant. Ene-114 stellt sich somit als vielversprechender Katalysator für die Synthese pharmazeutisch relevanter Bausteine vom Typ **15b** heraus. Die Bestimmung der (*R*)-Selektivität dieses Enzyms für das Substrat **14b** konnte durch Vergleich mit der En-Reduktase aus *G. oxydans* ermittelt werden und ist im folgenden Abschnitt beschrieben (Abschnitt 3.4.7).

### 3.4.7 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von (*R*)-**15a** mit GOx-ER

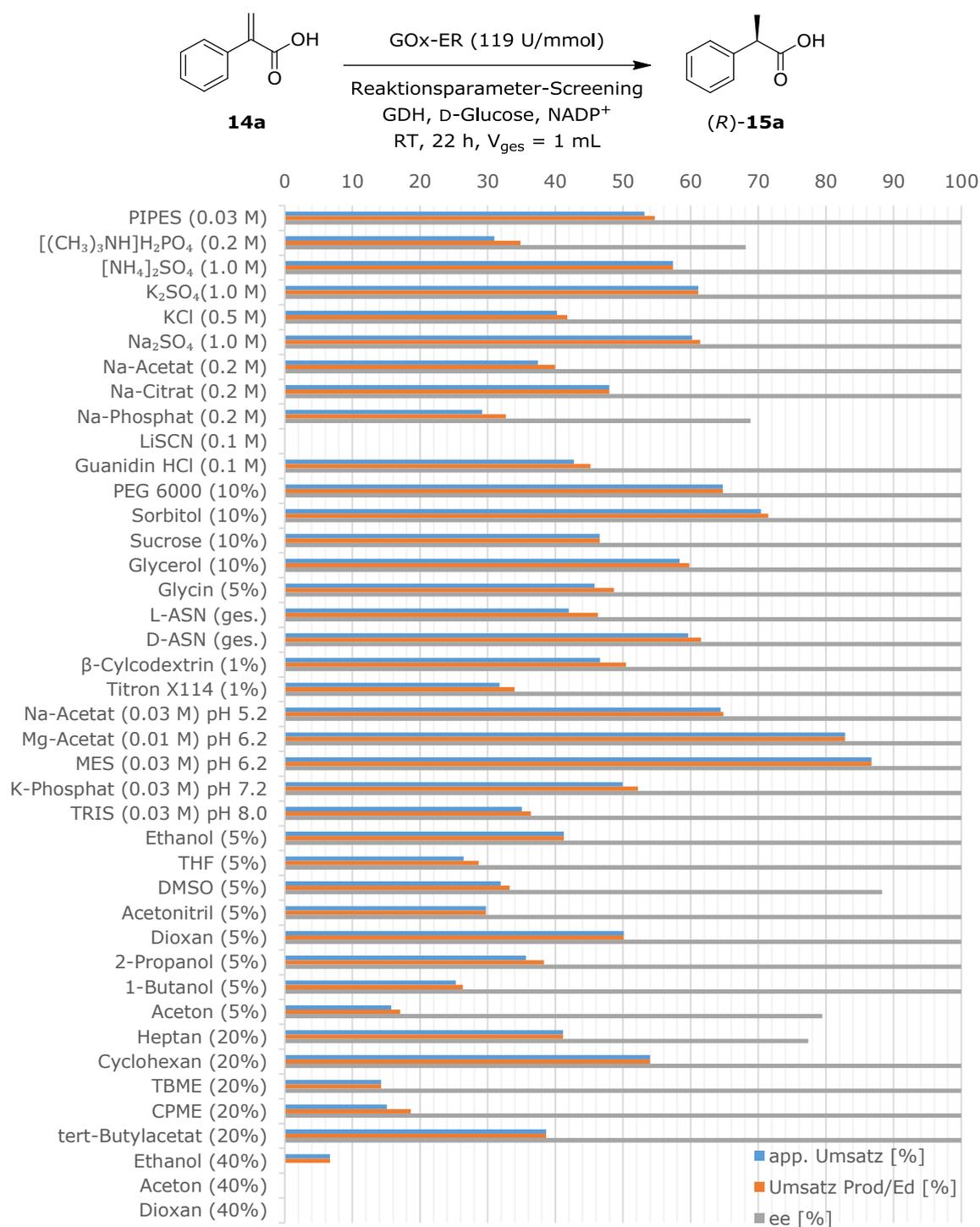
Die Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings von GOx-ER mit Phenylacrylsäure (**14a**) sind in Abbildung 17 dargestellt. Das S:E-Verhältnis des Screenings liegt bei 0.5. Es wird ein deutlich positiver Effekt auf den Umsatz in der Anwesenheit von PEG, Sorbitol, Magnesiumacetat und MES beobachtet. Dabei wird der erhöhte Umsatz vor allem dem erniedrigten pH-Wert von 6.2 (MES) zugeordnet.<sup>[22]</sup> Die ee-Werte liegen in fast allen Experimenten bei 100% ee, die Detektion geringerer ee-Werte wird allerdings nicht eindeutig durch das jeweilige Additiv hervorgerufen. Die Methode zur Bestimmung des ee-Werts ist sehr empfindlich, es wird vermutet, dass in den Fällen mit geringeren ee-Werten Nebenprodukte auftreten, die die Analytik verfälschen. Im Bereich der Lösungsmittelzusätze fällt auf, dass die Präsenz von Dioxan (5%) und Cyclohexan (20%) zu annähernd gleich guten Umsätzen wie unter Standard-Bedingungen (PIPES) führen.

Die Ergebnisse zu den Kombinationsversuchen der besten Parameter (MES, PEG, Dioxan, Cyclohexan) sind in Abbildung 18 dargestellt, die Enzymmenge wurde in diesen Versuchen halbiert (S:E = 1). Während in Anwesenheit von Dioxan nur sehr geringe Umsätze erzielt werden, zeigt die Kombination des MES-Puffers mit PEG und Cyclohexan eine deutliche Umsatzsteigerung bei gleichbleibender hervorragender Enantioselektivität. Diese Parameter werden für einen Versuch im präparativen Labormaßstab verwendet (Abschnitt 3.5.3).

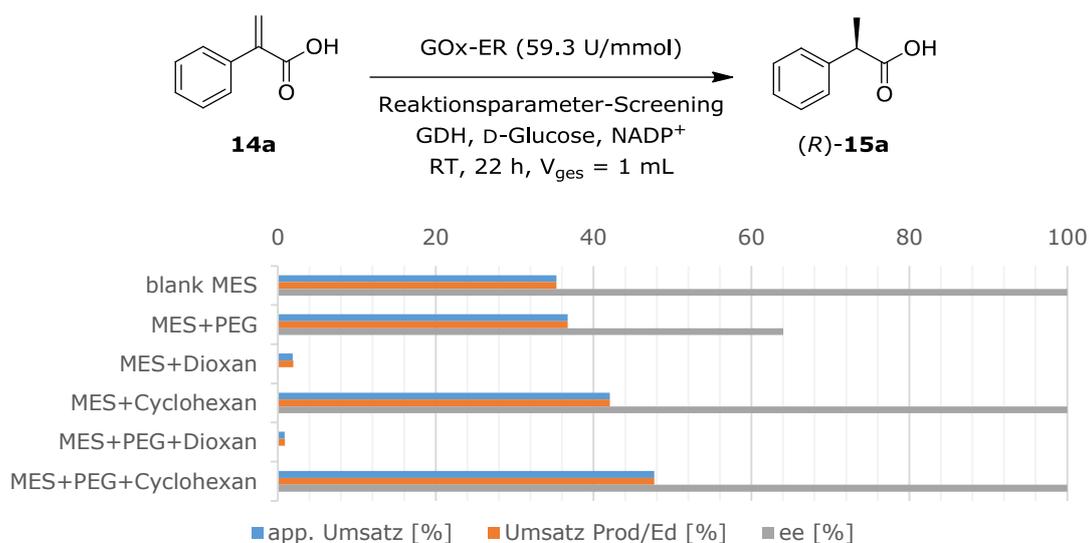
Um die Selektivität der Enzyme Ene-114 und GOx-ER zu vergleichen, werden die Produkte dieses Screenings vereinigt und der Ester **15b** zur Säure **15a** hydrolysiert. Die Bestimmung des ee-Werts des Hydrolyseproduktes zeigt, dass durch die Verseifung des Esters **15b** das gleiche Enantiomer entsteht, welches bei der Reduktion von **14a** zu **15a** mittels GOx-ER gebildet wird. Die Enzyme Ene-114 und GOx-ER weisen demnach die gleiche Selektivität auf, welche durch Vergleich mit Literaturdaten<sup>[95]</sup> als (*R*)-Selektivität ermittelt wird.



**Abbildung 16.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings zur Synthese von (R)-**15b** mit Ene-114 (S:E = 1). Alle Versuche (mit Ausnahme der Puffervariationen) in PIPES-Puffer.



**Abbildung 17.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings zur Synthese von (*R*)-**15a** mit GOx-ER (S:E = 0.5). Alle Versuche (mit Ausnahme der Puffervariationen) in PIPES-Puffer.



**Abbildung 18.** Ergebnisse der Kombinationsversuche im Rahmen des Reaktionsparameter-Screenings zur Synthese von (R)-15a mit GOx-ER (S:E = 1)

Bei (R)-15a handelt es sich um eine interessante Vorstufe zur Synthese von Profenderivaten. Die biokatalytische Synthese analoger Vorstufen beschränkt sich bisher auf wenige in der Literatur beschriebene Beispiele. Die En-Reduktase-katalysierte Reduktion des analogen Methylesters wurde mit den En-Reduktasen YqjM<sup>[84,89]</sup> und NCR<sup>[84]</sup> von der Gruppe um PIETRUSZKA beschrieben und verläuft dabei mit beiden Enzymen mit hervorragender Enantioselektivität von >99% ee.<sup>[84,89]</sup> Zudem konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von DMSO und DMF zur Bildung von Nebenprodukten bei der Umsetzung des Methylesters mit YqjM führt, und dass sich die Anwesenheit von 2-Methyl-THF positiv auf dem Umsatz auswirkt, ohne zu einer Bildung von Nebenprodukten zu führen und ohne die Enantioselektivität zu beeinflussen.<sup>[89]</sup>

Die Umsetzung der freien Säure 14a wurde auf biokatalytischem Weg bisher jedoch nicht beschrieben. Die Fähigkeit dieser En-Reduktase, eine freie Säuregruppe als Substituenten an der C=C-Bindung zu akzeptieren ist bis dato nicht beschrieben und macht dieses Enzym zu einem interessanten Vertreter dieser Enzymklasse, da die Akzeptanz freier Säuregruppen oft nur mäßig vorhanden ist.<sup>[64]</sup> Die Gruppen um GRÖGER und HUMMEL beschreiben bisher lediglich die Umsetzung von  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Aldehyden, Ketonen und Ester mittels En-Reduktase aus *G. oxydans*.<sup>[22,96]</sup> Mit GOx-ER steht somit ein Enzym zur Verfügung, welches mit hohen Enantioselektivitäten pharmazeutisch relevante Bausteine wie (R)-15a ausgehend von 14a zur Synthese von Profen-Derivaten darstellen kann.

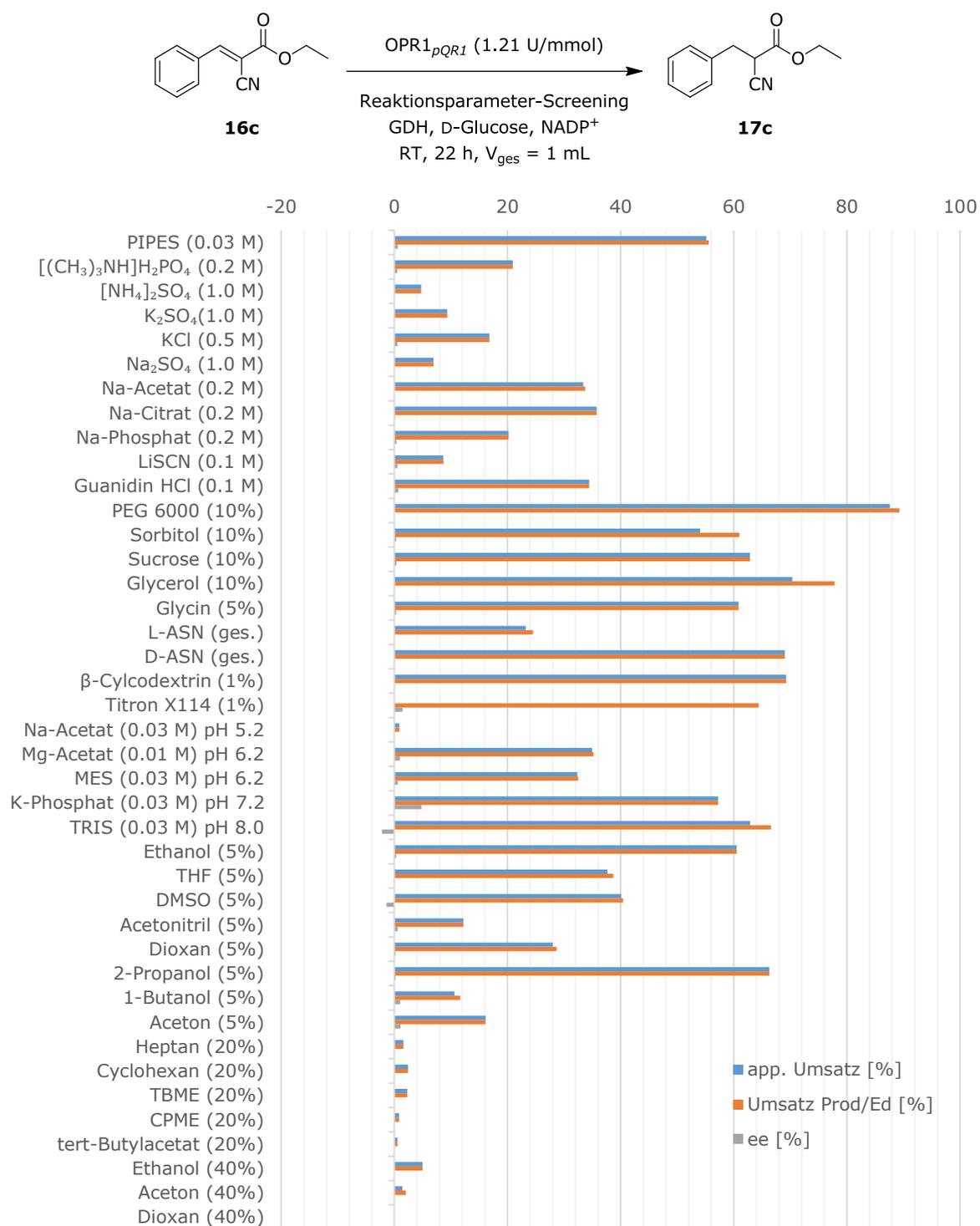
### 3.4.8 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von **17c** mit OPR1<sub>pQR1</sub>

Die Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings von OPR1<sub>pQR1</sub> mit dem Cyanozimtsäurederivat **16c** bei einem S:E-Verhältnis von 10 sind in Abbildung 19 dargestellt. Es wird ein deutlich positiver Einfluss von PEG, Glycerol, D-ASN,  $\beta$ -Cyclodextrin, 2-Propanol auf den Umsatz festgestellt. Wird Phosphatpuffer verwendet, verringert sich die Menge der Nebenprodukte. Mit Ausnahme von 5% Ethanol und 5% 2-Propanol wirken sich alle organischen Lösungsmittel negativ auf den Umsatz aus.

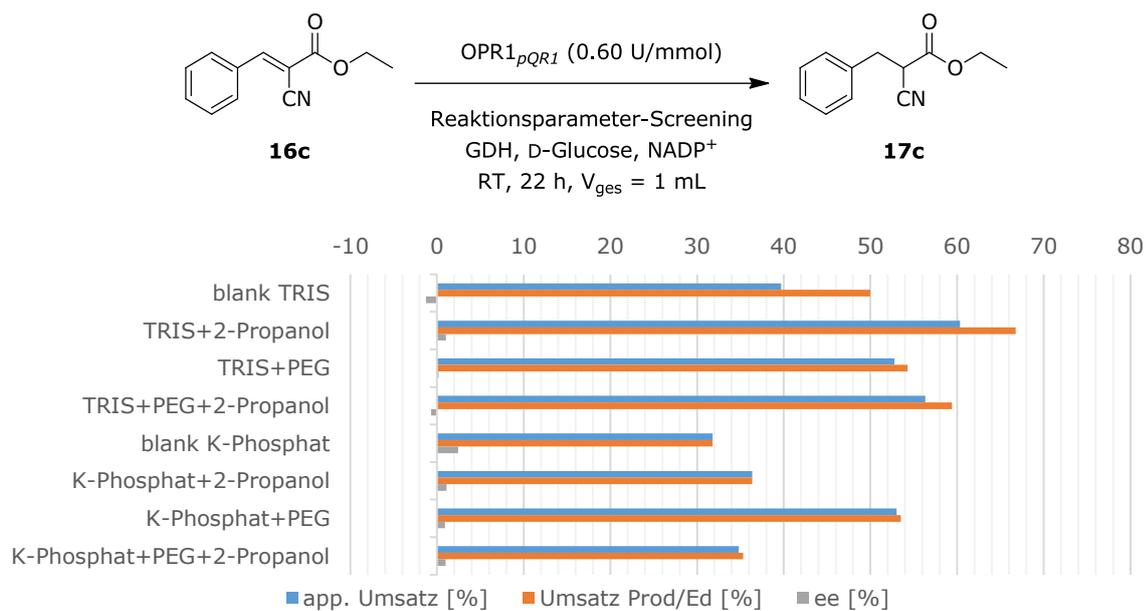
Es fällt auf, dass sich die chirale Umgebung deutlich auf die Aktivität auswirkt. Während bei D-ASN 69% Umsatz erreicht werden, liegt der Umsatz in Gegenwart von L-ASN bei nur noch 25% (bzw. 23% app. Umsatz). Dieser Effekt findet sich auch in den Reaktionsparameter-Screenings Ene-107 mit **16b** (Abschnitt 3.4.9) und Ene-114 mit **16b** (Abschnitt 3.4.10) wieder.

Die Ergebnisse zu den Kombinationsversuchen der besten Parameter (TRIS-Puffer, Phosphat-Puffer, PEG, 2-Propanol) sind in Abbildung 20 zusammengefasst, die Enzymmenge wurde in diesen Versuchen halbiert (S:E = 20). Der Umsatz ist in TRIS-Puffer mit 2-Propanol-Zusatz am höchsten, allerdings verläuft diese Reaktion unter der Bildung von Nebenprodukten bzw. Verunreinigungen. Die geringsten Verunreinigungen bei höchstem Umsatz werden in Phosphatpuffer bei 10% PEG erhalten. Diese Bedingungen werden für einen Versuch im präparativen Labormaßstab gewählt (Abschnitt 3.5.4).

Die Verwendung der En-Reduktase OPR1 aus *Lycopersicon esculentum* wurde ausführlich von der FABER-Gruppe untersucht.<sup>[43,67]</sup> Neben dem physiologischen Substrat 12-Oxophytodienoat<sup>[44,97]</sup> wurde OPR1 zur Reduktion aktivierter C=C-Bindungen in  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Aldehyden, Ketonen, Disäuren, Diestern, Maleimiden und Nitroalkenen eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Enzym um eine hoch enantioselektive En-Reduktase handelt, die einen großen Teil der Substrate mit hervorragenden Enantioselektivitäten von 99% ee umsetzt. Über die Umsetzung eines ungesättigten Nitrils mit diesem Enzym ist dagegen bisher nichts bekannt. Allerdings wurde ein analoges Substrat (die freie Säure von **16c**,  $\alpha$ -Cyanozimtsäure, **16d**) von LIU *et al.* mit Hilfe eines *Achromobacter* sp.-Stammes umgesetzt, wobei das Produkt als Racemat erhalten wurde.<sup>[76]</sup> LIU *et al.* führten diesen Befund auf die hohe Racemisierungsanfälligkeit aufgrund der C-H-aciden Position am  $\alpha$ -C-Atom zurück. Dieser Erklärungsansatz scheint auch auf die im vorliegenden Screening beobachteten geringen Enantioselektivitäten zuzutreffen. Weitere Untersuchungen wurden dazu nicht durchgeführt, zusammenfassend konnte das Substratspektrum dieses Enzyms jedoch auf die Reduktion  $\alpha,\beta$ -ungesättigte  $\alpha$ -Cyanozimtsäure-Derivate erweitert werden.



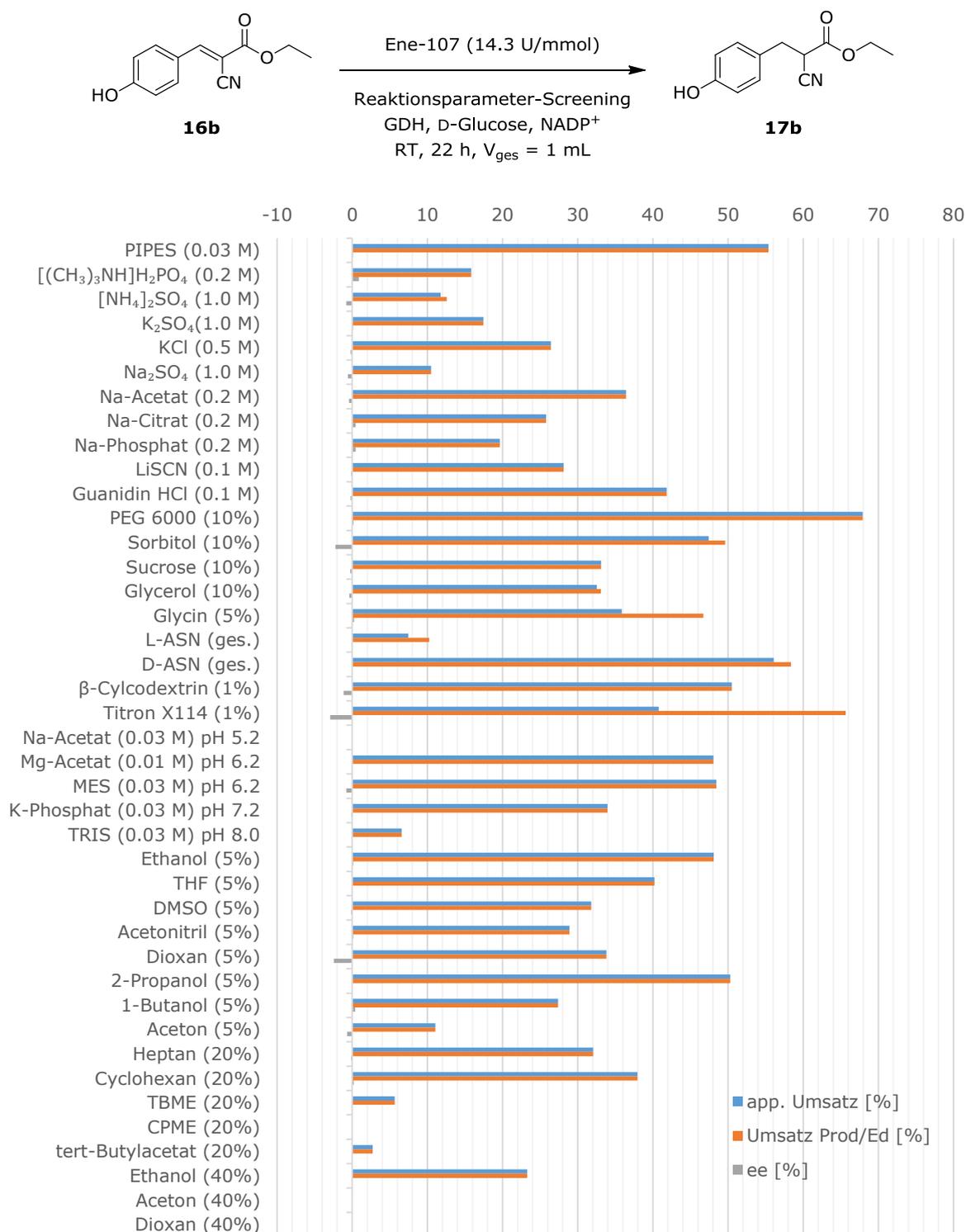
**Abbildung 19.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings zur Synthese von **17c** mit OPR1<sub>pQR1</sub> (S:E = 10). Alle Versuche (mit Ausnahme der Puffervariationen) in PIPES-Puffer.



**Abbildung 20.** Ergebnisse der Kombinationsversuche im Rahmen des Reaktionsparameter-Screenings zur Synthese von **17c** mit OPR1<sub>pQR1</sub> (S:E = 20)

### 3.4.9 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von **17b** mit Ene-107

Die Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings von Ene-107 mit Substrat **16b** (S:E = 5) sind in Abbildung 21 dargestellt. Es werden deutlich positive Auswirkungen auf den Umsatz in der Anwesenheit von PEG detektiert. Die Anwesenheit organischer Lösungsmittel führt zu keiner Erhöhung des Umsatzes, die geringsten Einbußen werden hier allerdings mit Ethanol (5%) und 2-Propanol (5%) erzielt. Es fällt auf, dass die Aktivität deutlich von der chiralen Umgebung in der Reaktionsmischung abhängt. Wie im Reaktionsparameter-Screening OPR1<sub>pQR1</sub> mit **16c** (Abschnitt 3.4.8) und Ene-114 mit **16b** (Abschnitt 3.4.10) wird auch hier in Anwesenheit von D-ASN ein deutlich höherer Umsatz (56%) erzielt als in der Anwesenheit von L-ASN (7%). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist die Einlagerung der Aminosäure Asparagin im aktiven Zentrum des Enzyms, wobei durch L-Asparagin die Bindung des Substrates in der aktiven Tasche erschwert wird, während D-Asparagin die Bindungseigenschaften des Substrates nicht beeinflusst. Dabei ist es sowohl möglich, dass D-ASN anders in die aktive Tasche eingebunden wird, und deshalb nicht stört, oder dass es gar nicht eingebunden wird. Diese Theorie kann vorerst weder bestätigt noch widerlegt werden, bildet jedoch einen interessanten Ausgangspunkt für zukünftige Arbeiten.



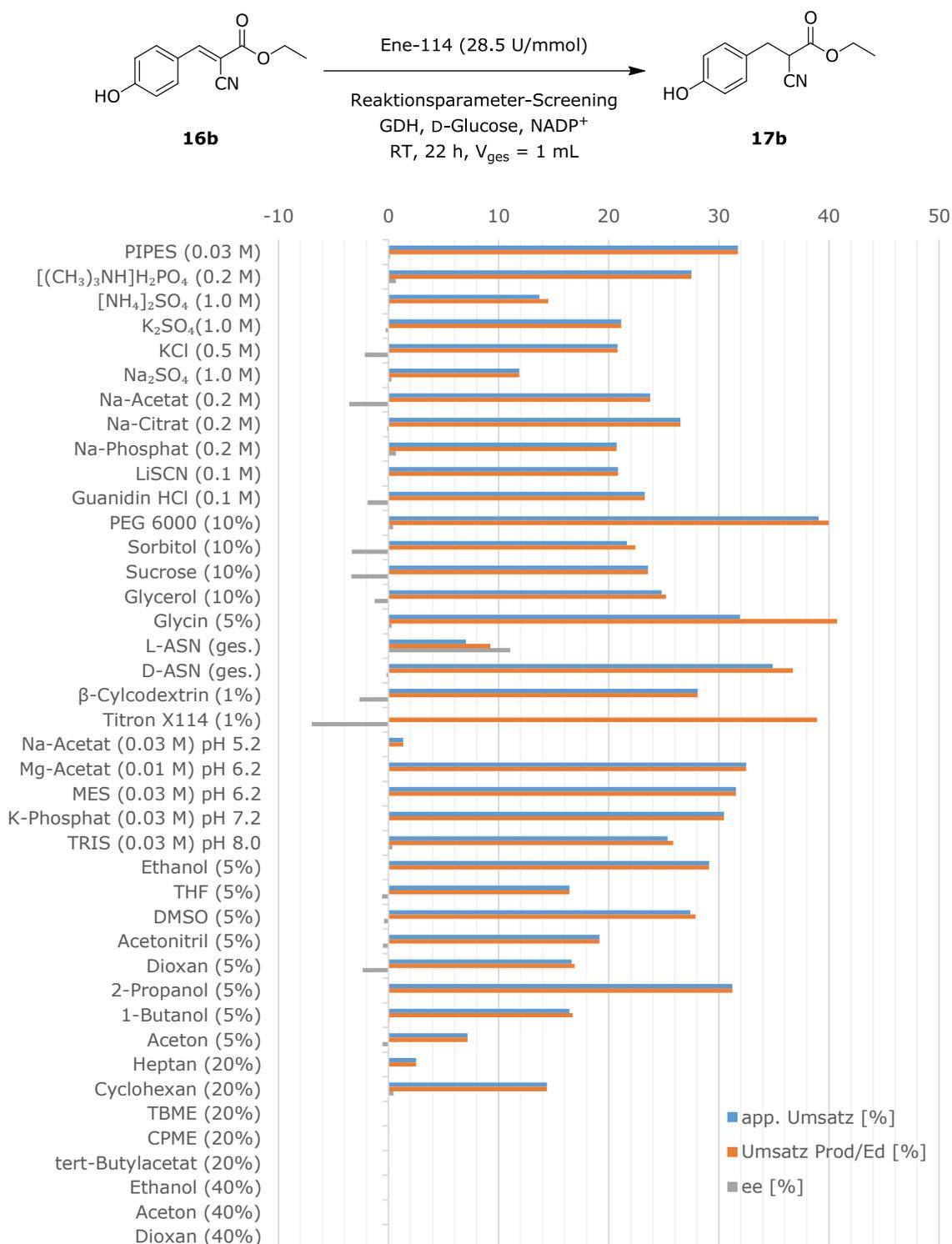
**Abbildung 21.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings zur Synthese von **17b** mit Ene-107 (S:E = 5). Alle Versuche (mit Ausnahme der Puffervariationen) in PIPES-Puffer.

### 3.4.10 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von **17b** mit Ene-114

Die Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings von Ene-114 mit dem Cyanozimtsäurederivat **16b** (S:E = 10) sind in Abbildung 22 dargestellt. Es zeigt sich ein deutlich positiver Effekt auf den Umsatz in Anwesenheit von PEG und D-ASN. Aus der Reihe der Lösungsmittel ist 2-Propanol am geeignetsten, es findet kein Aktivitätsverlust in der Anwesenheit von 5% 2-Propanol statt. Alle anderen organischen Lösungsmittel führen zu einer Verringerung der Aktivität. Es fällt außerdem auf, dass die chirale Umgebung einen Einfluss auf die Aktivität hat: es wird ein deutlicher Unterschied zwischen D-ASN (35%) und L-ASN (7%) detektiert. Diese Ergebnisse stehen in Analogie zum Reaktionsparameter-Screening OPR1<sub>pQR1</sub> mit **16c** (Abschnitt 3.4.8) und Ene-107 mit **16b** (Abschnitt 3.4.9), bei denen ebenfalls eine große Diskrepanz zwischen den Enantiomeren detektiert wurde. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre, wie bereits in Abschnitt 3.4.9 erwähnt, die Einlagerung der Aminosäure Asparagin im aktiven Zentrum des Enzyms, wobei durch L-ASN die Bindung des Substrates in der aktiven Tasche erschwert wird, während D-ASN entweder in anderer Orientierung oder gar nicht im aktiven Zentrum bindet, und somit die Bindungseigenschaften des Substrates nicht beeinflusst. Im vorliegenden Fall spricht die Tatsache, dass dieser Effekt beim Screening des gleichen Enzyms (Ene-114) mit einem anderen Substrat (**14b**, Abschnitt 3.4.6) nur in geringerem Maße auftritt, gegen eine Argumentation die sich ausschließlich auf das Enzym bezieht. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz wäre eine Interaktion des Substrates mit der Aminosäure, wobei das entstehende Substrat-Aminosäure-Paar anschließend unterschiedlich gut in der aktiven Tasche gebunden wird.

Dieser Vergleich macht deutlich, dass der beobachtete Effekt eine Kombination aus Enzym- und Substrat-Einflüssen darstellt.

Es werden, analog zu den anderen  $\alpha$ -Cyanozimtsäure-Screenings (Abschnitte 3.4.9, 3.4.8), größtenteils racemische Produkte erhalten. Da es sich bei Ene-114 prinzipiell um ein hoch enantioselektives Enzym handelt (Abschnitt 3.4.6), muss dieser Effekt auf die Racemisierung des Produktes<sup>[76]</sup> oder einer Kombination aus der Racemisierung und geringen Substratspezifität des Enzyms für Cyanozimtsäurederivate beruhen.



**Abbildung 22.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings zur Synthese von **17b** mit Ene-114 (S:E = 10). Alle Versuche (mit Ausnahme der Puffervariationen) in PIPES-Puffer.

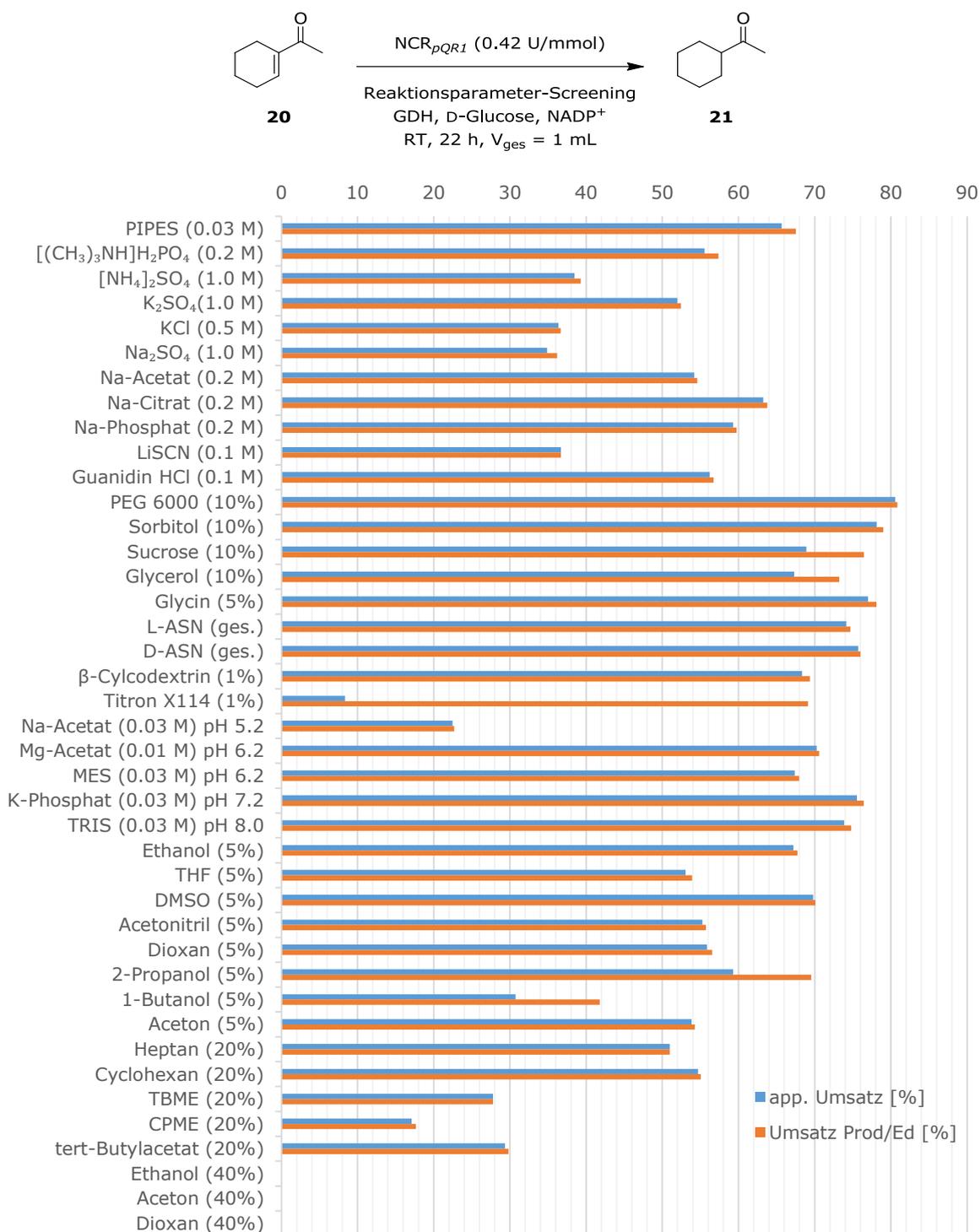
### 3.4.11 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von **21** mit $\text{NCR}_{pQR1}$

Die Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings von  $\text{NCR}_{pQR1}$  mit Substrat **20** (S:E = 5) sind in Abbildung 23 dargestellt. Es ist ein deutlich positiver Effekt auf den Umsatz in Anwesenheit von PEG, Sorbitol, Glycin, L-ASN und D-ASN zu beobachten. TRIS- und Phosphatpuffer erhöhen den Umsatz im Vergleich zu PIPES-Puffer, da Phosphat und PIPES den gleichen pH-Wert besitzen, ist dieser Effekt auf die entsprechenden Salze zurückzuführen. Im Bereich der Lösungsmittel liefern Ethanol (5%) und DMSO die höchsten Umsätze, Aceton, Heptan und Cyclohexan zeigen noch eine gute Restaktivität.

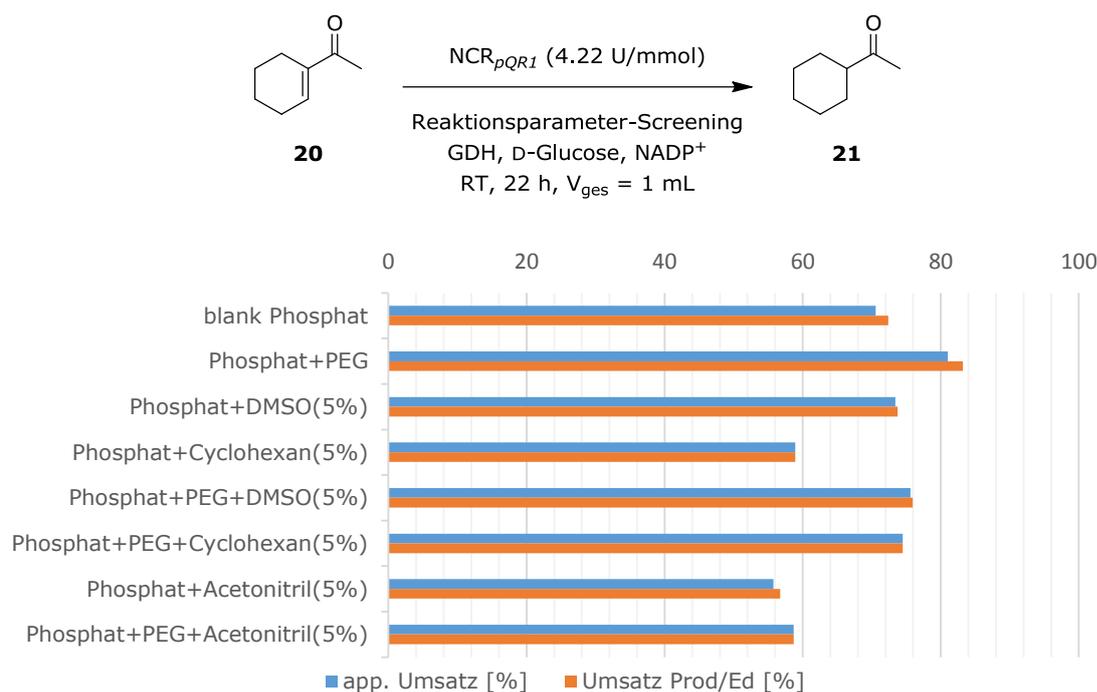
Die Parameter Phosphatpuffer, PEG, DMSO, Cyclohexan und Acetonitril wurden anschließend in Kombinationen bei gleichbleibender Enzymmenge (S:E = 5) getestet (Abbildung 24). Dabei zeigt sich, dass mit einer Kombination aus Phosphatpuffer und PEG die höchsten Umsätze erzielt werden, die Anwesenheit der Lösungsmittel DMSO bzw. Cyclohexan verringert den Umsatz allerdings nur minimal. Die Bildung von Nebenprodukten ist in allen Fällen sehr gering (< 2%). Da die Reaktion in Anwesenheit organischer Lösungsmittel, besonders biphasischer Systeme, sehr interessant ist, werden für die Durchführung der Reaktion im präparativen Labormaßstab der Reaktion Phosphatpuffer, PEG und Cyclohexan als Parameter gewählt (Abschnitt 3.5.5).

Während in der Literatur bereits ausführlich über das Substratspektrum der En-Reduktase aus *Zymomonas mobilis* berichtet wurde,<sup>[15,16,67,84,86,98]</sup> wurde das Enon **20** bisher nicht mit diesem Enzym reduziert. Die biokatalytische Reduktion der C=C-Bindung in **20** wurde bis dato lediglich von IQBAL *et al.* publiziert, die für die Reaktion eine En-Reduktase aus *Shewanella* sp. (SYE-4) einsetzten.<sup>[92]</sup>

Wie bereits in Abschnitt 3.4.4 erwähnt, ist über die Beeinflussung des Enzymes durch Salz-, Lösungsmittel-, und sonstige Additive nur wenig bekannt. Die von MÜLLER *et al.* berichtete positive Auswirkung von 20% TBME auf die En-Reduktase  $\text{NCR}^{[16]}$  konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Dies kann allerdings an dem unterschiedlich verwendeten Substrat liegen oder an der Enzymformulierung: MÜLLER *et al.* reduzierten Citral mithilfe ganzer Zellen, während in der vorliegenden Studie **20** mithilfe eines Rohextraktes reduziert wurde.



**Abbildung 23.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings zur Synthese von **21** mit NCR<sub>pQR1</sub> (S:E = 5). Alle Versuche (mit Ausnahme der Puffervariationen) in PIPES-Puffer.



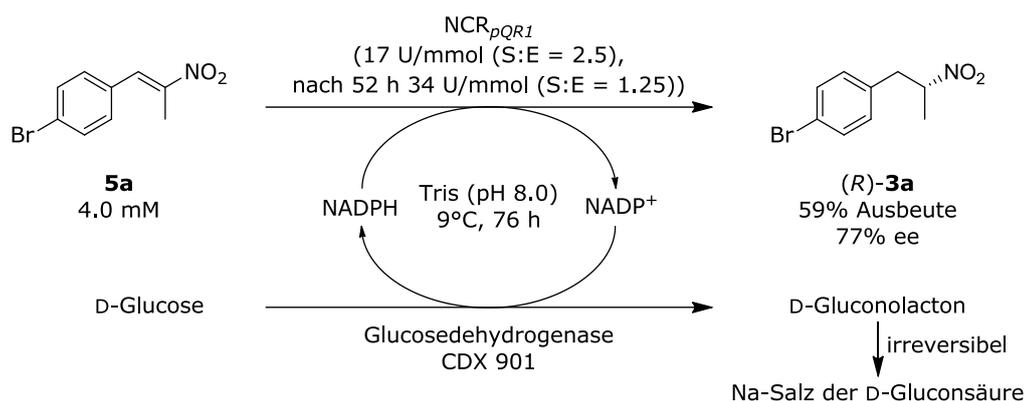
**Abbildung 24.** Ergebnisse der Kombinationsversuche im Rahmen des Reaktionsparameter-Screenings zur Synthese von **21** mit  $NCR_{pQR1}$  (S:E = 5)

### 3.5 Durchführung ausgewählter Versuche unter optimierten Reaktionsbedingungen im präparativen Labormaßstab

Nachdem im Reaktionsparameter-Screening Parameter identifiziert wurden, welche sich positiv auf den Umsatz und ggf. auf die Enantioselektivität der Reaktion auswirken, werden exemplarisch fünf der Reaktionen in einem präparativen Maßstab durchgeführt. Für alle Versuche wird ein D-Glucosedehydrogenase/Glucose-Cofaktorregenerierungssystem eingesetzt, wobei der pH-Wert durch kontinuierliche Titration mit Natronlauge konstant gehalten wird. Der Reaktionsverlauf kann so durch den Verbrauch an Natronlauge verfolgt werden.

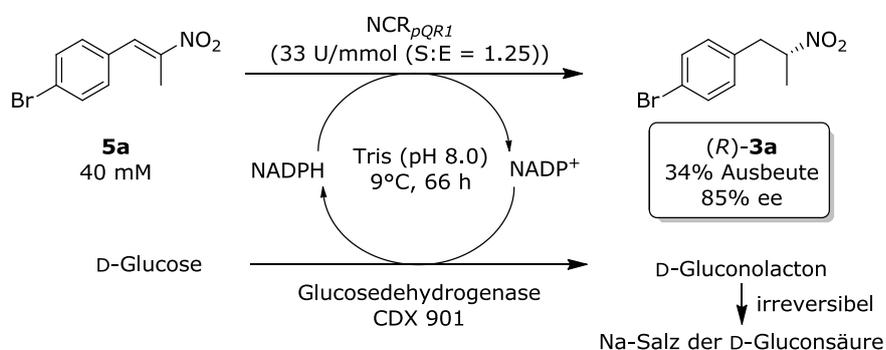
#### 3.5.1 Biokatalytische Reduktion von **5a** mit $NCR_{pQR1}$

Die Reduktion des Nitroalkens **5a** zu (*R*)-**3a** mit  $NCR_{pQR1}$  wird zuerst bei einer Substratkonzentration von 0.1% (4.0 mM) durchgeführt. Das S:E-Verhältnis beträgt anfangs 2.5 und wird im Reaktionsverlauf durch erneute Enzymzugabe auf 1.25 verringert. Da aus früheren Arbeiten bekannt ist, dass sich die optische Reinheit durch Verringern der Temperatur erhöht,<sup>[17,19,85]</sup> wird die Reaktion bei 9°C durchgeführt (Abbildung 25).



**Abbildung 25.** Reduktion von **5a** mit  $NCR_{pQR1}$  bei einer Substratkonzentration von 0.1%

Über den Reaktionsverlauf kann keine Aussage getroffen werden, da während der Reaktion keine homogene Probenentnahme möglich war. Das Substrat lag in der Reaktionsmischung als Feststoff vor, der sich im Laufe der Reaktion zu Klumpen formte. Diese konnten durch weitere Enzymzugabe nicht aufgelöst werden und mussten vor der Aufarbeitung der Reaktionsmischung abdekantiert werden. Eine Analyse dieser Klumpen ergab eine **5a:3a**-Zusammensetzung von 75:25. Das Produkt **3a** wurde mit einer Ausbeute von 59% und 77% ee (*R*) nach dem Abdekantieren des Feststoffs und anschließender Extraktion der wässrigen Phase aus der Reaktionsmischung erhalten. Anschließend wurde die Substratkonzentration auf 1% erhöht (40 mM). Da aus dem Reaktionsparameter-Screening (Abschnitt 3.4.4) hervorging, dass sich eine erhöhte Enzymmenge positiv auf den ee-Wert auswirkt, wurde die Enzymmenge von Beginn an erhöht (S:E = 1.25), alle anderen Parameter wurden beibehalten. Es kam erneut zu Klumpenbildung, nach Abdekantieren des Feststoffes nach 66 h und extraktiver Aufarbeitung wurde (*R*)-**3a** mit 34% Ausbeute und 85% ee erhalten (Abbildung 26).

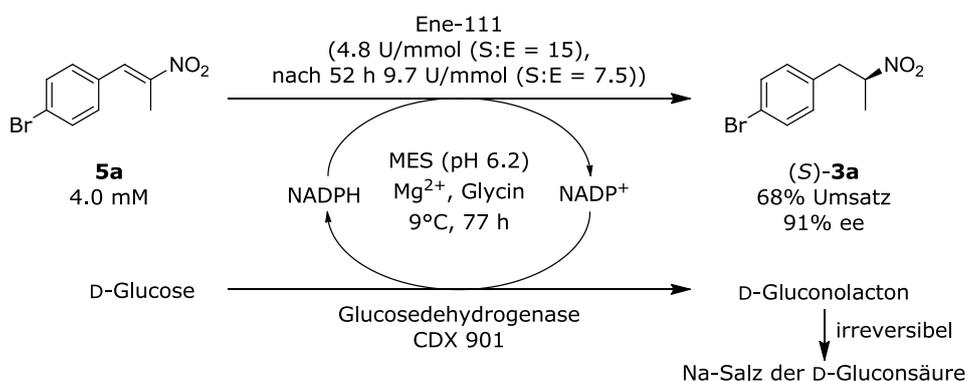


**Abbildung 26.** Reduktion von **5a** mit  $NCR_{pQR1}$  bei einer Substratkonzentration von 1%

Der erhöhte ee-Wert von 85% kann auf die von Beginn an erhöhte Enzymmenge zurückgeführt werden. Dies stimmt mit den Beobachtungen im Reaktionsparameter-Screening zur Erhöhung der Enantioselektivität mit der Enzymmenge (Abschnitt 3.4.4) überein.

### 3.5.2 Biokatalytische Reduktion von **5a** mit Ene-111

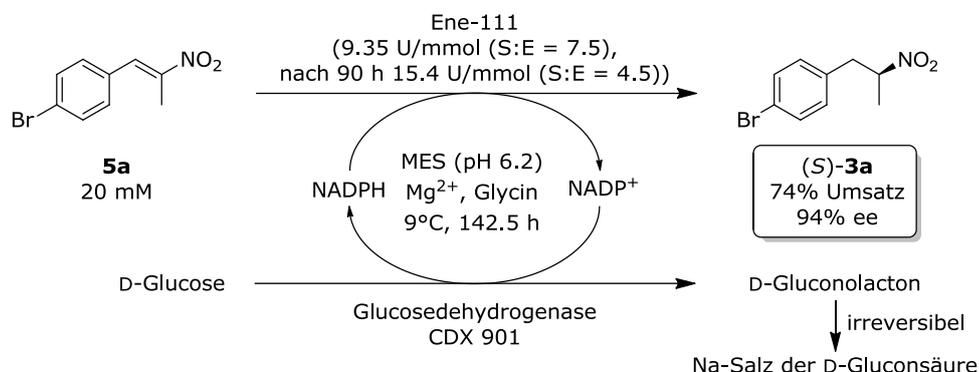
Die Reduktion von **5a** zu (*S*)-**3a** mit Ene-111 wird zuerst bei einer Substratkonzentration von 0.1% (4.0 mM) durchgeführt. Das S:E-Verhältnis beträgt zu Beginn 15 und wird im Reaktionsverlauf durch erneute Enzymzugabe auf 7.5 verringert. Da aus früheren Arbeiten bekannt ist, dass sich die optische Reinheit durch Verringern der Temperatur erhöht,<sup>[17,19]</sup> wird die Reaktion bei 9°C durchgeführt (Abbildung 27). Der pH-Wert wird durch Zutitrieren von NaOH konstant gehalten. Während der Reaktion war keine homogene Probenentnahme möglich, deshalb können keine Aussagen über den Reaktionsverlauf getroffen werden. Nach erneuter Enzymzugabe nach 52 h und einer Gesamtreaktionszeit von 77 h konnte kein vollständiger Umsatz erreicht werden. Die Reaktionsmischung lag in Form einer Suspension vor, im Gegensatz zur Reduktion mittels NCR (Abschnitt 3.5.1) konnte das Edukt hier nicht durch Dekantieren abgetrennt werden. Nach extraktiver Aufarbeitung wurde ein Umsatz von 68% ermittelt, der Enantiomerenüberschuss lag bei 91% ee.



**Abbildung 27.** Reaktionsverlauf der Reduktion von **5a** mit Ene-111 bei einer Substratkonzentration von 0.1%.

Da im Rahmen des Reaktionsparameter-Screenings (Abschnitt 3.4.5) gezeigt wurde, dass eine erhöhte Enzymmenge sowie eine verlängerte Reaktionszeit keine negativen Auswirkungen auf die Enantioselektivität der Reaktion haben, wurde die Substratkonzentration auf 0.5% erhöht (20 mM), die eingesetzte Enzymmenge lag bei S:E = 7.5 und wurde nach 90 h erneut erhöht (S:E = 4.5). Alle anderen Parameter wurden beibehalten (Abbildung 28). Nach extraktiver Aufarbeitung nach 142.5 h wurde kein vollständiger Umsatz erreicht. Der Umsatz liegt bei 74%,

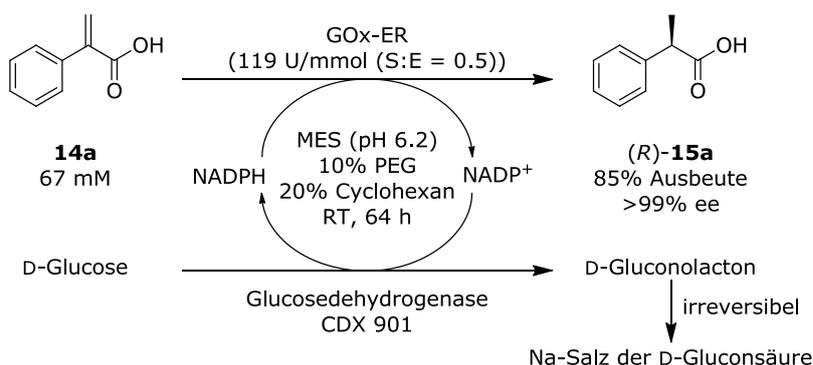
die Enantioselektivität ist jedoch hervorragend und liegt mit 94% ee bei den bisher höchsten erreichten ee-Werten für diese Verbindungsklasse<sup>[82-84]</sup> (siehe auch Abschnitt 3.3.2).



**Abbildung 28.** Reduktion von **5a** mit Ene-111 bei einer Substratkonzentration von 0.5%

### 3.5.3 Biokatalytische Reduktion von **14a** mit GOx-ER

Die biokatalytische Reduktion von **14a** wurde mit GOx-ER und einer Substratkonzentration von 1% (67 mM) und einem Substrat-zu-Enzym-Massenverhältnis (S:E) von 0.5 durchgeführt (Abbildung 29). Der Umsatz verlief dabei vollständig, nach extraktiver Aufarbeitung konnte eine Ausbeute von 85% erzielt werden. Der ee-Wert liegt bei >99%, die absolute Konfiguration konnte durch die Bestimmung des Drehwertes und den Vergleich mit Literaturdaten<sup>[95]</sup> ermittelt werden.



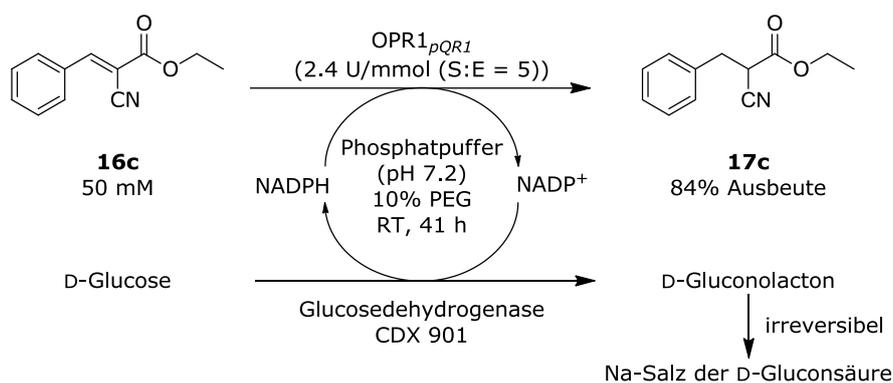
**Abbildung 29.** Reduktion von **14a** mit GOx-ER bei einer Substratkonzentration von 1%

Die biokatalytischen Reduktion des entsprechenden Methylesters durch die En-Reduktasen YQjM und NCR durch die Gruppe um PIETRUSZKA wurde bereits in Abschnitt 3.4.7 ausführlich beschrieben.<sup>[84,89]</sup> Die hier vorgestellte Synthese stellt die bis dato erste biokatalytische

Reduktion der Phenylacrylsäure **14a** dar. Dies ist vor allem aufgrund der Möglichkeit der Synthese von Profenderivaten vom Typ (*R*)-**15** interessant, gibt aber zusätzlich auch neue Einblicke in die En-Reduktase aus *G. oxydans*. RICHTER *et al* beschrieben die Umsetzung  $\alpha,\beta$ -ungesättigter Aldehyde und Ketone mittels En-Reduktase aus *G. oxydans*.<sup>[22]</sup> KRAUßER *et al.* erweiterten das Substratspektrum dieses Enzyms um einige Ketone und Esterverbindungen.<sup>[96]</sup> Mit dem vorliegenden Versuch wurde das Substratspektrum nun auf eine Phenylacrylsäure erweitert. Da Substrate mit einer Säurefunktionalität als einziger aktivierender Gruppe als „borderline“-Substrate bezeichnet werden, deren Reduktion stark Enzymabhängig ist,<sup>[64]</sup> macht die Reduktion von **14a** mit >99% ee mittels GOx-ER dieses Enzym zu einem sehr interessanten Vertreter seiner Klasse. Die ersten Informationen über die Toleranz der En-Reduktase aus *G. oxydans* gegenüber organischer Lösungsmittel und anderer Additive wurden in Abschnitt 3.4.7 untersucht, und die Anwendbarkeit im präparativen Maßstab bei einer Substratkonzentration von 1% sowie einem Cyclohexananteil von 20% wurde hier erfolgreich demonstriert.

### 3.5.4 Biokatalytische Reduktion von **16c** mit OPR1<sub>pQR1</sub>

Die biokatalytische Reduktion von **16c** wurde mit OPR1<sub>pQR1</sub> bei einer Substratkonzentration von 1% (50 mM) und einem S:E-Verhältnis von 5 durchgeführt (Abbildung 30). Die Reaktion verlief mit vollständigem Umsatz nach 41 h bei Raumtemperatur. Nach extraktiver Aufarbeitung wurde eine Ausbeute von 84% erreicht.



**Abbildung 30.** Reduktion von **16c** mit OPR1<sub>pQR1</sub> bei einer Substratkonzentration von 1%

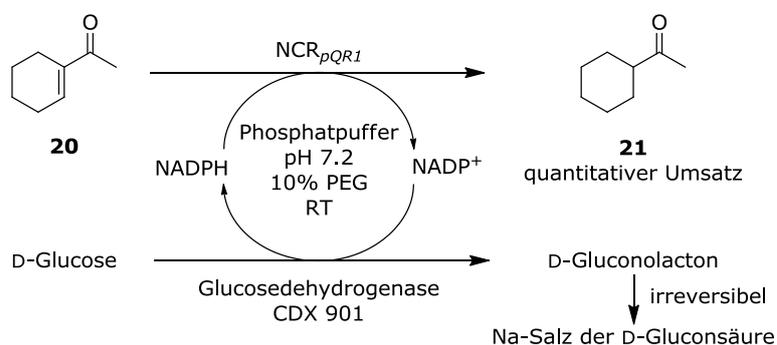
### 3.5.5 Biokatalytische Reduktion von **20** mit NCR<sub>pQR1</sub>

Die biokatalytische Reduktion von **20** wurde mit NCR<sub>pQR1</sub> durchgeführt. Die Reaktion verlief in allen in Tabelle 7 aufgelisteten Versuchen bis zu vollständigem Umsatz. Die Aufarbeitung erwies sich als schwierig: von einer Extraktion mit Ethylacetat muss abgesehen werden, da das

Produkt **21** am Rotationsverdampfer mit abdestilliert. Wird der Reaktionsmischung PEG beigelegt, kann nicht mit Dichlormethan extrahiert werden, da dies PEG ebenfalls extrahiert. Die Extraktion mit Diethylether erwies sich als beste Lösung, allerdings ist es auch in diesem Fall nicht möglich, das Lösungsmittel komplett abzudestillieren. Die Ausbeute wird daher aus den weitestgehend eingedampften Extraktionsphasen mittels  $^1\text{H-NMR}$  berechnet.

Der Vergleich der Versuche 1 und 2 (Tabelle 7) zeigt deutlich, dass durch die Zugabe von Cyclohexan die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich erhöht werden kann. Während ein vollständiger Umsatz in Phosphatpuffer und 10% PEG erst nach 111 h erreicht wird (Eintrag 1), ist in Gegenwart von 47% Cyclohexan bereits nach 38.5 h ein quantitativer Umsatz erreicht (Eintrag 2). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass das Enzym bei so hohen Lösungsmittelkonzentrationen Aktivität zeigt. Die Erhöhung der Substratkonzentration auf 5% hatte eine längere Reaktionszeit zur Folge (77 h, Eintrag 3), trotzdem wurde ein vollständiger Umsatz erreicht. Die Umsetzung bei weiterer Erhöhung der Substratkonzentration auf 10% (Eintrag 4) verlief quantitativ, allerdings musste hier nach 91 h erneut Enzym zugegeben werden. Das S:E-Verhältnis verschlechtert sich hiermit auf 3.3, dafür wurden ein quantitativer Umsatz und eine berechnete Ausbeute von 98% erreicht.

**Tabelle 7.** Ergebnisse der Upscale-Versuche zur biokatalytischen Reduktion von **20** mit  $\text{NCR}_{pQR1}$



Nr.	c( <b>20</b> ) [%]	c( <b>20</b> ) [mM]	S:E	Enzym [U/mmol]	Cyclohexan	t
1	1	80	5	4.21	0%	111 h
2	1	80	5	4.21	47%	38.5 h
3	5	403	5	4.21	20%	77 h <sup>b)</sup>
4	10	805	5 → 3.3 <sup>a)</sup>	4.21 → 6.32	20%	110 h <sup>c)</sup>

a) Enzymzugabe nach 91 h; b) berechnete Ausbeute: 90%; c) berechnete Ausbeute: 98%

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass  $\text{NCR}_{pQR1}$  stabil sowohl gegenüber hohen Cyclohexan-Konzentrationen bis zu 47% als auch Substratkonzentrationen bis 10% ist. Substrat **20** wurde in der Literatur bereits erfolgreich mit En-Reduktasen reduziert,<sup>[92]</sup> die Substratkonzentration für eine biokatalysierte Reduktion von **20** konnte hiermit jedoch von 0.5 mM<sup>[92]</sup> auf 805 mM

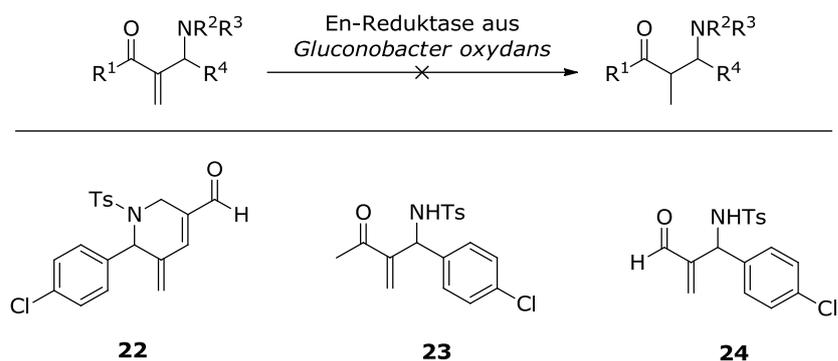
erhöht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Stabilität nicht weiter untersucht, die Ergebnisse bilden jedoch einen interessanten Startpunkt für weitere Versuche zur Validierung dieses Enzyms.

Der Einsatz hoher Substratkonzentrationen für En-Reduktase-katalysierte Prozesse ist in der Literatur kaum erwähnt. Die meisten Studien beschränken sich in der Regel bis dato noch auf Modellreaktionen bei geringen Substratkonzentrationen. Als Beispiel für eine hohe Substratkonzentration sei die von KATAOKA *et al.* veröffentlichte Reduktion von Ketoisophoron bei einer Substratkonzentration von 100 mg/mL (entspricht 658 mM) mithilfe eines Ganzzellkatalysators<sup>[99]</sup> erwähnt. Dieser, sowie der in dieser Arbeit entwickelte Prozess zeigen, dass durch geschickte Reaktionsführung und -optimierung auch hohe Substratkonzentrationen mittels En-Reduktasen umgesetzt werden können.

### 3.6 Weitere Untersuchungen zum Substratspektrum der En-Reduktase aus *G. oxydans*

#### 3.6.1 Aza-Baylis-Hilman-Produkte

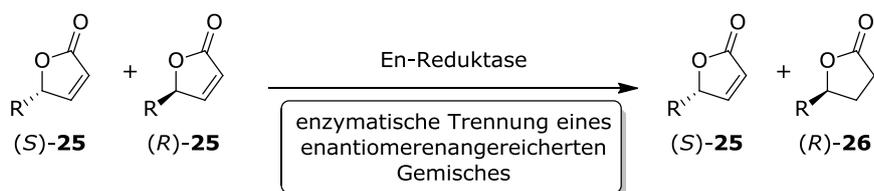
Chirale  $\beta$ -Amino-Carbonylverbindungen sind vor allem im Hinblick auf die Herstellung von  $\beta$ -Aminosäuren oder  $\beta$ -Aminoalkoholen sehr interessante Synthesebausteine. Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. SASAI standen die Aza-Baylis-Hillman-Produkte **22**, **23** und **24** (Abbildung 31) zur Verfügung, aus denen mittels einer En-Reduktase katalysierten Biotransformation solche Bausteine hergestellt werden sollten. Da sich in Abschnitt 3.3.3 die Anwendung der En-Reduktase aus *G. oxydans* als eines der wenigen getesteten Enzyme zur Reduktion von isolierten Doppelbindungen als geeignet bestätigte und auch cyclische Verbindungen (Abschnitt 3.3.5) als Substrat akzeptiert wurden, wurden die Aza-Baylis-Hillman-Produkte **22**, **23** und **24** als Substrate für die En-Reduktase aus *G. oxydans* getestet. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen (0.05 mmol Substrat, 5U GOx-ER Rohextrakt, 0.1 mmol Glucose, 40 U Bsp-GDH, 0.005 mmol NADP<sup>+</sup>,  $V_{\text{ges}} = 5$  mL, RT, 24 h, Titrino) war jedoch keine Umsetzung möglich.



**Abbildung 31.** Weitere Testsubstrate mit terminalen Doppelbindungen für die Umsetzung mittels En-Reduktase aus *G. oxydans*

### 3.6.2 $\gamma$ -Butyrolactone

Die Reduktion von Doppelbindungen in cyclischen Estern mittels En-Reduktasen ist in der Literatur bereits bekannt.<sup>[30,100,101]</sup> Meist werden Substitutionsmuster an der Doppelbindung als interessant angesehen, da sich hier im Fall einer Reduktion selbiger, ein neues Stereozentrum in  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Position ausbilden kann. Enantiomerenreine Lactone sind wertvolle Zwischenprodukte in der Naturstoffsynthese und der Polymersynthese. Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. SASAI wurden die  $\gamma$ -Butyrolactone **25** mittels En-Reduktase aus *G. oxydans* reduziert. Dabei waren die Substrate in  $\gamma$ -Position substituiert und lagen in enantiomerenangereicherter Form vor. Ziel dieses Projektes war die Anreicherung eines Enantiomers durch die gezielte Reduktion der Doppelbindung in nur einem der beiden Enantiomere (Abbildung 32).

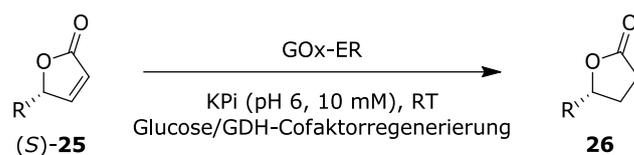


**Abbildung 32.** Enzymatische Trennung eines enantiomerenangereicherten Gemisches durch eine En-Reduktase

Die En-Reduktase aus *G. oxydans* akzeptierte jedes der Butyrolactone als Substrat und lieferte quantitativen Umsatz nach 24 h. Bei Reaktionszeiten von 24 Stunden ist die Anreicherung eines Enantiomers durch die selektive Umsetzung des anderen nicht möglich (Tabelle 8, Einträge 1-3): ein Umsatz von >99% zeigt, dass in dem gewählten Zeitraum keine Differenzierung der Enantiomere durch das Enzym GOx-ER stattfindet. Die Verringerung der Reaktionszeit auf

6 Stunden hat einen nicht vollständigen Umsatz zur Folge (Tabelle 8, Eintrag 4), allerdings bleibt der ee-Wert der Ausgangsmischung erhalten. Zusammenfassend war unter den gewählten Bedingungen für die vorliegenden Substrate **25** keine Differenzierung durch GOx-ER und damit keine Anreicherung eines Enantiomers möglich. Diese Ergebnisse entsprechen den Versuchen von FRONZA *et al.*, die zeigten, dass die Reduktion von 2- $\delta$ -Decenolid mittels Bäckerhefe unabhängig von der im Molekül bereits vorhandenen Stereoinformation verläuft.<sup>[100]</sup>

**Tabelle 8.** Biokatalytische Reduktion unterschiedlich substituierter  $\gamma$ -Butyrolactone mittels En-Reduktase aus *G. oxydans*



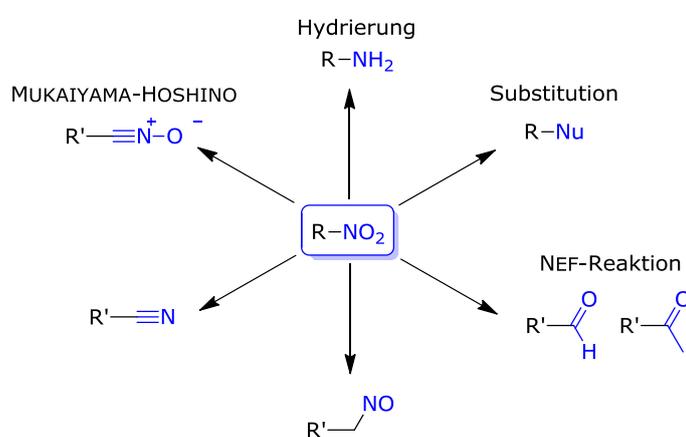
Eintrag	t [h]	R =	Substrat-konzentration	Ausgangs-ee [%]	Umsatz [%]	ee <sup>a)</sup> [%]
<b>1</b>	24	<i>Benzyl</i>	8 mM	48 (S)	>99	nb
<b>2</b>	24	<i>Hexyl</i>	10 mM	52 (S)	>99	nb
<b>3</b>	24	<i>Ethyl</i>	10 mM	54 (S)	>99	nb
<b>4</b>	6	<i>Hexyl</i>	10 mM	52 (S)	40	52 (S)
<b>5</b>	6	<i>Ethyl</i>	10 mM	54 (S)	96	nb

a) ee-Wert des verbleibenden Eduktes

## 4 Biokatalytische Synthese $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkane

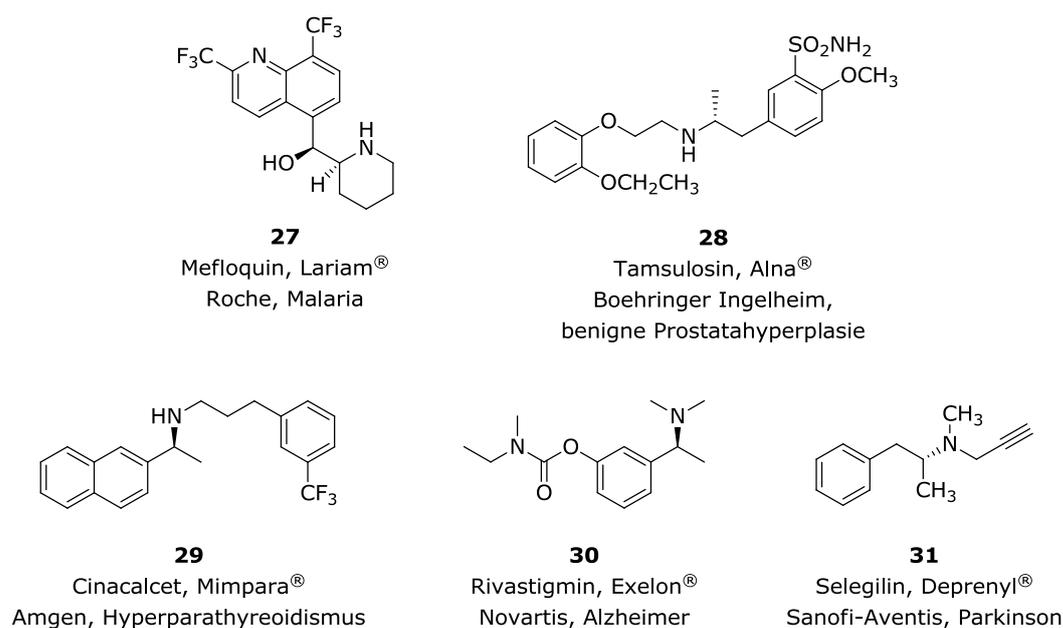
### 4.1 Stand der Wissenschaft

Chirale Nitroalkane stellen interessante Ausgangsverbindungen in der organischen Synthese dar. Die Nitrogruppe kann leicht in weitere funktionelle Gruppen wie die analogen Amine, Nitrile, Nitriloxide, Nitrosoverbindungen sowie die entsprechenden Carbonylverbindungen überführt werden (Abbildung 33), was sie zu einem vielseitig einsetzbaren Ausgangsmaterial macht.<sup>[102]</sup>

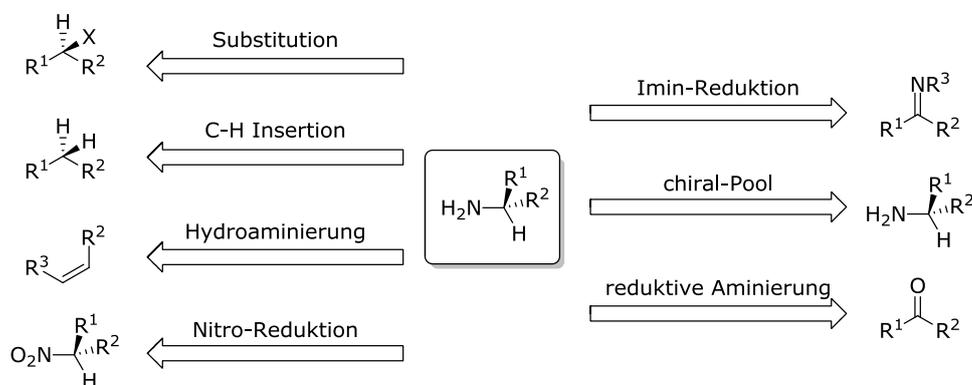


**Abbildung 33.** Umwandlung der aliphatischen Nitrogruppe in weitere wichtige funktionelle Gruppen

Aus diesem Pool an Folgeprodukten sind für die pharmazeutische Verwendung vor allem chirale Amine interessant, da viele Wirkstoffe („active pharmaceutical ingredient“, API) von Arzneimitteln auf einem Amin-Baustein basieren (Abbildung 34). Das stereogene Zentrum liegt in den gezeigten Beispielen immer am  $\alpha$ -C-Atom, weshalb man dabei auch von  $\alpha$ -chiralen Aminen spricht. Die Synthesestrategien zur Darstellung  $\alpha$ -chiraler Amine (Abbildung 35) sind vielfältig und seit Jahren ein intensiv untersuchtes Gebiet.<sup>[103]</sup> Dabei werden die Amine beispielsweise durch Substitutionsreaktionen ausgehend von Halogenalkanen synthetisiert. Außerdem werden sie ausgehend von Alkanen durch Insertion, Iminen durch Reduktion oder nucleophile Addition sowie ausgehend von Alkenen durch Hydroaminierung erhalten. Alternativ kann die Darstellung ausgehend von Ketonen durch reduktive Aminierung oder aus Nitroverbindungen durch Reduktion erfolgen (Abbildung 35).



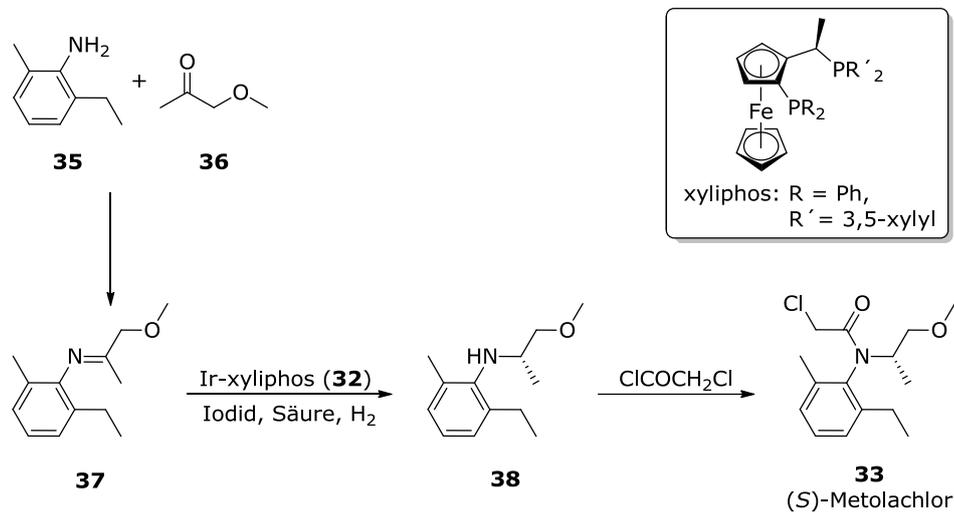
**Abbildung 34.** Ausgewählte Pharmazeutika mit chiralen Aminbausteinen (Name, Handelsname, Hersteller, Anwendungsgebiet)



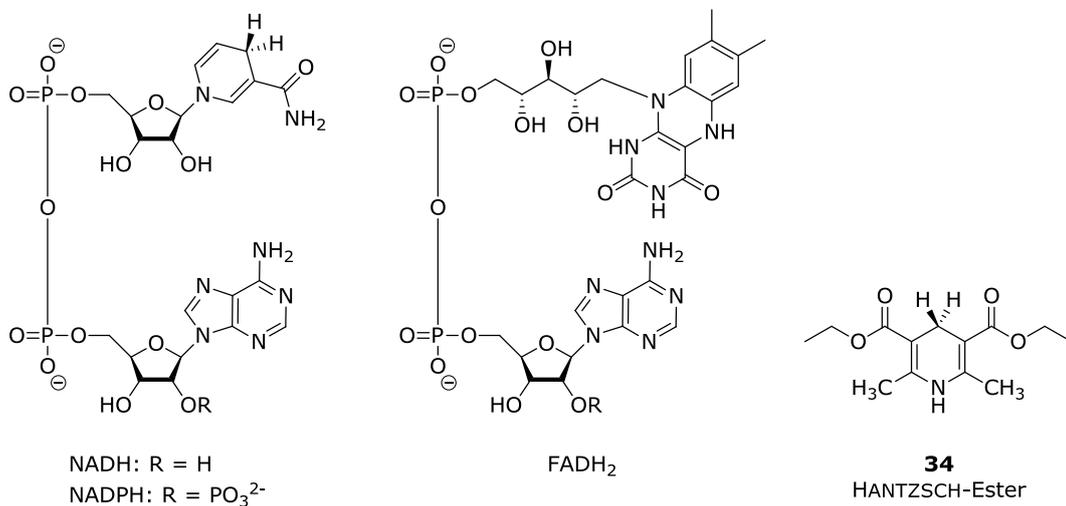
**Abbildung 35.** Synthesestrategien zur Darstellung chiraler Amine

Als eine der klassisch chemischen Methoden zur Synthese  $\alpha$ -chiraler Amine ist die reduktive Alkylierung von Aminen zu nennen. Die erste enantioselektive reduktive Alkylierung wurde 1999 von BLASER *et al.* unter Verwendung eines Iridium-Katalysators (**32**) und elementarem Wasserstoff als Reduktionsmittel zur Synthese des Herbizids Metolachlor (**33**) durchgeführt (Abbildung 36).<sup>[104]</sup> Im Fall von asymmetrischen Transfer-Hydrierungen, in denen der Wasserstoff nicht aus elementarem Wasserstoff sondern alternativen Reduktionsmitteln stammt, werden meist 2-Propanol und Ameisensäure verwendet.<sup>[105]</sup> In Anlehnung an die natürlich vorkommenden Reduktionsmittel NADH und NADPH kann auch das chemische

Analogon, der HANTZSCH-Ester (**34**), als Reduktionsmittel genutzt werden (Abbildung 37). In Kombination mit bspw. chiralen Phosphinkatalysatoren können mit dem HANTZSCH-Ester asymmetrische Transfer-Hydrierungen von Iminen durchgeführt und somit chirale Amine erhalten werden.<sup>[105,106]</sup>



**Abbildung 36.** Synthese von (S)-Metolachlor (**33**) durch enantioselektive reduktive Alkylierung

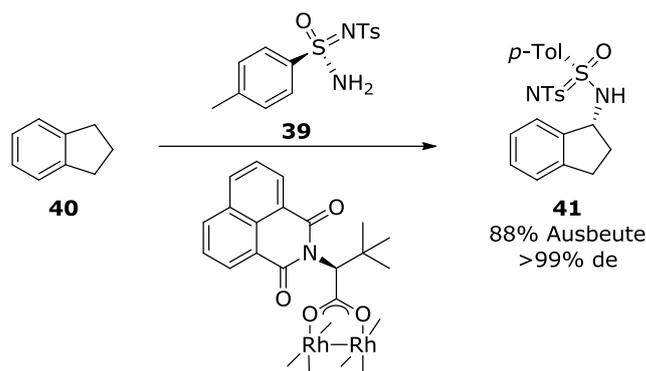


**Abbildung 37.** Natürlich vorkommende Reduktionsmittel (Cofaktoren) und HANTZSCH-Ester als Biomimetikum

Die Verwendung chiraler Auxiliare zur Iminreduktion ist eine weitere Möglichkeit, ein  $\alpha$ -chirales Amin darzustellen. Als chirales Auxiliar wird häufig Phenylethylamin eingesetzt, da beide Enantiomere leicht zugänglich sind und anschließend einfach mittels Pd/C und H<sub>2</sub> wieder abgespalten werden können.<sup>[107]</sup> Allerdings gehen die damit entstehenden Nebenprodukte

verloren, sodass die Gesamtsynthese eine verhältnismäßig schlechte Atomökonomie aufweist. Es besteht außerdem die Möglichkeit, mithilfe von Rhodium(II)- und Ruthenium(II)-Katalysatoren C-H-Bindungen zu aktivieren und anschließend eine neue C-N Bindung zu knüpfen (C-H-Insertion).<sup>[103,108]</sup> Diese Methode erlaubt die direkte Umwandlung einer C-H Bindung in eine C-N Bindung und ist nicht auf Funktionalitäten im Umfeld dieser Bindung angewiesen. Beim Einsatz von Sulfonimidamiden (wie **39**) als N-Quelle wurden durch LIANG *et al.*<sup>[109]</sup> sehr gute Ergebnisse erzielt (Abbildung 38). Neben benzylicchen Substraten (wie **40**) ist auch die C-H-Aminierung von allylischen Positionen oder Alkanen möglich.<sup>[110]</sup>

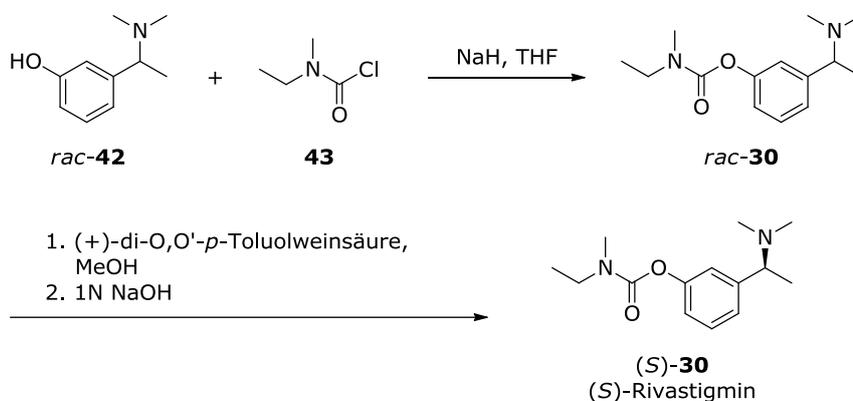
---



**Abbildung 38.** Beispiel für die Enantioselektive Aminsynthese durch C-H-Aminierung mit Rh-Katalysatoren

Racemische Amine können durch Kristallisationsverfahren voneinander getrennt werden.<sup>[107,111]</sup> Ein prominentes Beispiel hierfür stellt die Herstellung von Rivastigmin (**30**) dar. Als Ausgangsmaterial wird das racemische Amin *rac*-**42** eingesetzt, welches zum racemischen Rivastigmin (*rac*-**30**) umgesetzt wird. Die Enantiomerentrennung erfolgt im Anschluss durch die Bildung eines diastereomeren Salzes mit (+)-di-O,*O'*-*p*-Toluolweinsäure (Abbildung 39).<sup>[112]</sup>

---

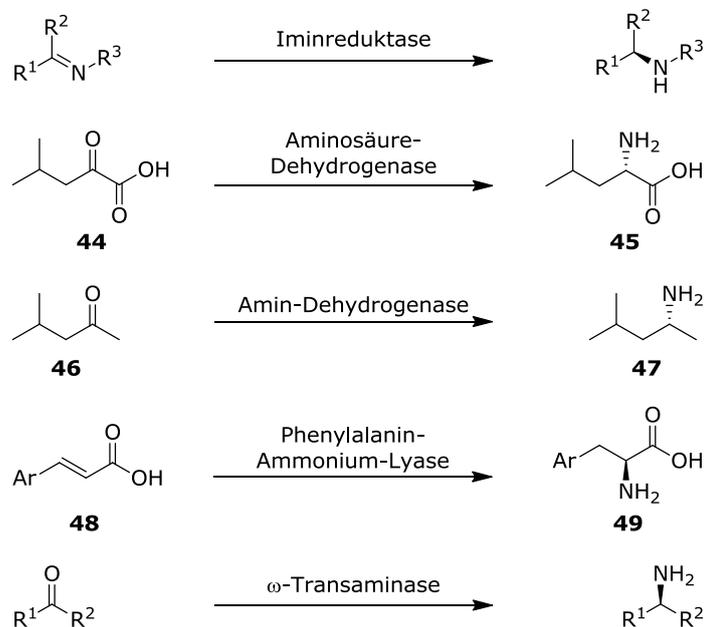


**Abbildung 39.** Enantiomerentrennung durch (+)-di-O,*O'*-*p*-Toluolweinsäure zur Rivastigmin-Synthese

Eine weitere Möglichkeit stellt die Hydroaminierung von Alkenen und Alkinen dar,<sup>[103,113]</sup> welche aus atomökonomischer Sicht eine hervorragende Bilanz aufweist. Die Knüpfung einer C-N-Bindung durch die Addition eines Amins an ein Alken hat im letzten Jahrzehnt starke Fortschritte gemacht, allerdings sind die Synthesen noch limitiert auf ein enges Substratspektrum.<sup>[114]</sup> Der Einsatz in einer komplexen Synthese ist bisher nicht möglich.<sup>[115]</sup>

Als weitere Alternative zur direkten Synthese chiraler Amine kann auf den „chiral pool“ zurückgegriffen werden, in dem ein natürlich vorkommendes chirales Amin zur Synthese des Zielmoleküls eingesetzt wird. Da natürliche Produkte meist in hoher optischer Reinheit vorliegen, müssen diese nicht weiter angereichert werden. Dieser Ansatz wird oft in den frühen Stadien der Wirkstoffentwicklung angewandt,<sup>[116]</sup> ist allerdings auf die strukturelle Ähnlichkeit des Zielproduktes mit diesem Baustein angewiesen.

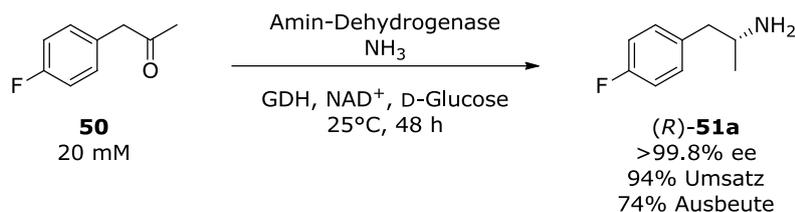
Die chemischen Synthesestrategien zu chiralen Aminen wurden in den letzten Jahren durch einige biokatalytische Methoden erweitert.<sup>[65]</sup> Dabei kann zwischen der asymmetrischen biokatalytischen Synthese chiraler Amine ausgehend von prochiralen Substraten und der Deracemisierung bzw. Racematspaltung unterschieden werden. Die asymmetrische Synthese chiraler Amine kann beispielsweise mittels Iminreduktasen<sup>[117]</sup> erfolgen (Abbildung 40), wobei hier die Stabilität der Imine in wässrigen Reaktionsmedien, welches in der Regel für enzymatische Synthesen genutzt wird, einen limitierenden Faktor darstellt.



**Abbildung 40.** Biokatalytische asymmetrische Synthese chiraler Amine

Aminosäuredehydrogenasen überführen  $\alpha$ -Ketosäuren (**44**) in die entsprechenden Aminosäuren (**45**), wobei hier, aufgrund der Tatsache, dass Proteine in biologischen Systemen aus L-Aminosäuren aufgebaut werden, bisher entsprechend nur L-Aminosäuren hergestellt werden

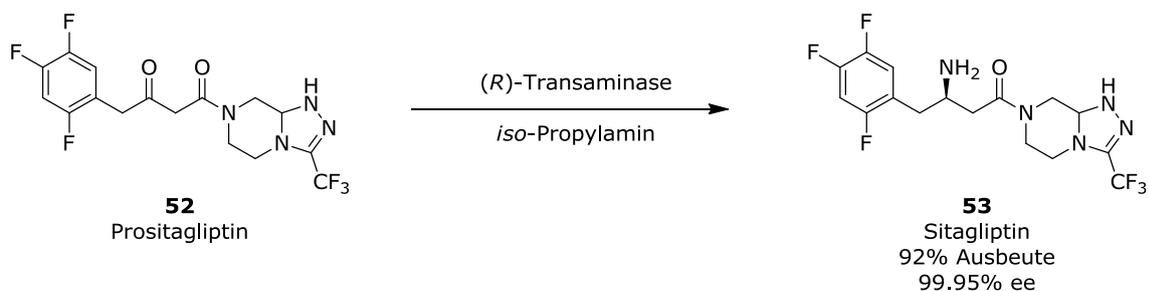
können. Die Limitierung dieser Enzymklasse auf Ketosäuren als Substrate veranlasste ABRAHAMSON *et al.* zur Modifizierung und Weiterentwicklung des Enzyms, um eine Amin-Dehydrogenase zu erzeugen, welche anstelle von Ketosäuren Ketone (wie **46**) in die analogen Amine (**47**) überführt.<sup>[118,119]</sup> Durch gerichtete Evolution gelang es, mithilfe einer solchen Amindehydrogenase 1-(4-Fluorphenyl)-2-propanon (**50**) in (*R*)-**51a** zu überführen. Dabei wurde eine hervorragende Enantioselektivität von > 99% erreicht.<sup>[119]</sup> Allerdings wurde die Anwendbarkeit auf ein breites Substratspektrum bisher nicht gezeigt (Abbildung 41).



**Abbildung 41.** Biokatalytische Synthese von (*R*)-**51a** mittels Amin-Dehydrogenase

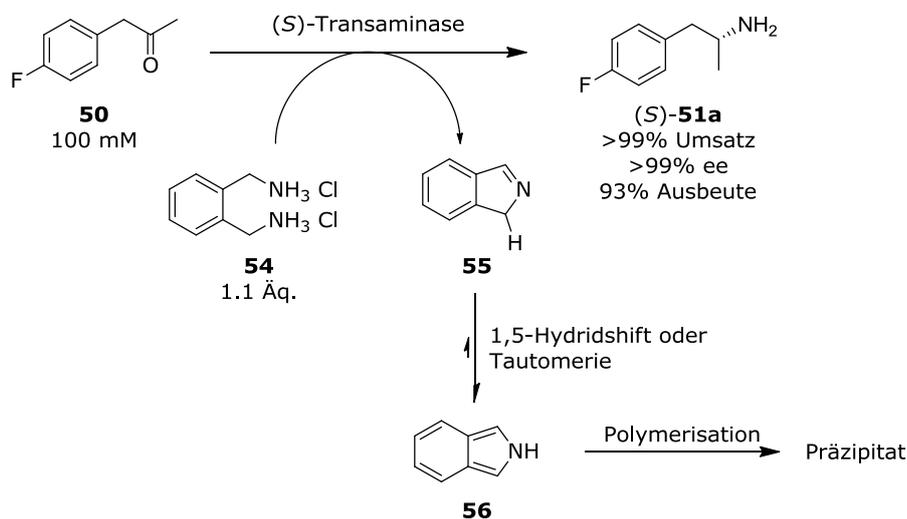
Kürzlich wurde zudem von der biokatalytischen Hydroaminierung von Doppelbindungen mittels einer Phenylalanin-Ammonium-Lyase in Kombination mit einem Ammoniumüberschuss berichtet. Das Substratspektrum beschränkt sich hierbei bisher auf Zimtsäurederivate (**48**), bzw. die Synthese von Phenylalanin-Derivaten (**49**).<sup>[120]</sup>

Eine weitere interessante Methode zur chiralen Aminsynthese stellen Transaminasen dar. Diese Enzymklasse wird zur Umwandlung eines Ketons in ein Amin eingesetzt, wobei die Aminfunktion von einem Aminondonor auf das Keton übertragen wird. Die meisten Transaminasen (TA) zeigen eine (*S*)-Präferenz, wohingegen nur wenige TAs zur Synthese von (*R*)-Aminen bekannt sind.<sup>[121]</sup> Ein herausragendes Beispiel zur industriellen Synthese eines Pharmawirkstoffes mittels Transaminasen stellt die von SAVILE *et al.*<sup>[9]</sup> (Codexis und Merck) beschriebene Transaminase-vermittelte reduktive Aminierung von Prositagliptin (**52**) zu Sitagliptin (**53**) dar (Abbildung 42).



**Abbildung 42.** Sitagliptin-Synthese mithilfe einer Transaminase

Die Verschiebung des Gleichgewichts bei Transaminase-Reaktionen stellt ein Problem dar, da beispielsweise bei der Verwendung von Alanin als Aminendonator Pyruvat entsteht, welches mit einer Lactatdehydrogenase entzogen werden muss. Diese benötigt NADH als Cofaktor, welcher erneut durch bspw. eine GDH regeneriert werden muss. Somit werden insgesamt drei Enzyme für die Transaminierung benötigt. Dieses stellt, zum einen aufgrund der erhöhten Kosten durch die Herstellung dreier Enzyme, zum anderen aufgrund des erhöhten Entwicklungsaufwandes, um für drei Enzyme kompatible Reaktionsparameter zu identifizieren, einen Nachteil dar. Andere Aminendonoren wie *iso*-Propylamin werden zum entsprechenden Keton (Aceton) umgewandelt, welches durch leichten Unterdruck aus dem Gemisch entfernt werden kann und somit die Gleichgewichtslage zugunsten des Produktes beeinflusst. Zwar kann so die Anzahl der nötigen Enzyme verringert werden, allerdings müssen diese Aminendonoren oft in hohem Überschuss eingesetzt werden.<sup>[122]</sup> Kürzlich berichteten GREEN *et al.* über die Verwendung eines neuen Amin-Donors, welcher in nur geringem Überschuss von 1.1 Äquivalenten eingesetzt werden kann (Abbildung 43).<sup>[123]</sup> Das Xylylendiamin **54** wird dabei zum zyklischen Imin-Nebenprodukt **55** umgewandelt, welches anschließend zum stabileren Isoindol **56** tautomerisiert. Dieses polymerisiert zu einem farbigen Präzipitat, welches dem Reaktionsgemisch so entzogen wird und das Gleichgewicht der Reaktion auf die Produktseite verschiebt. Das Amin (*S*)-**51a** wurde mit >99% ee bei einer Ausbeute von 93% erhalten. Bis dato ist die Anwendbarkeit auf ein breites Substratspektrum für diese Reaktion nicht gezeigt, sie stellt jedoch eine vielversprechende Methode dar.

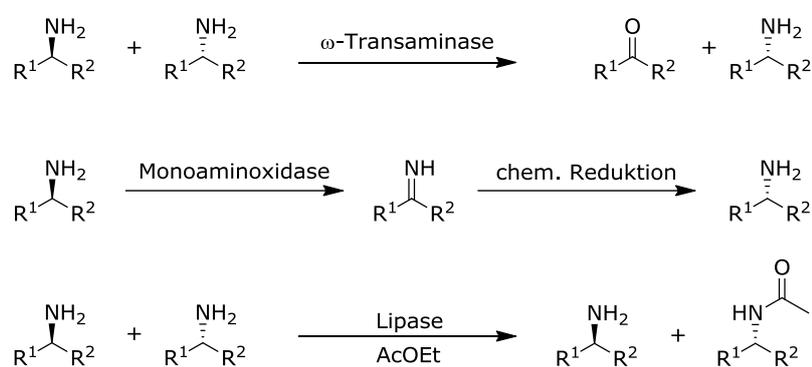


**Abbildung 43.** Biokatalytische Synthese von (*S*)-**51a** mittels Transaminase

Alternativ können Transaminasen zur Racematspaltung eingesetzt werden (Abbildung 44). Aus racemischen Amin-Gemischen kann selektiv eines der Enantiomere zum Keton umgewandelt werden, während das andere angereichert wird.<sup>[124]</sup> Durch die Kombination von asymmetrischer

Synthese und Racematspaltung bieten Transaminasen letztendlich Zugang zu beiden Enantiomeren.

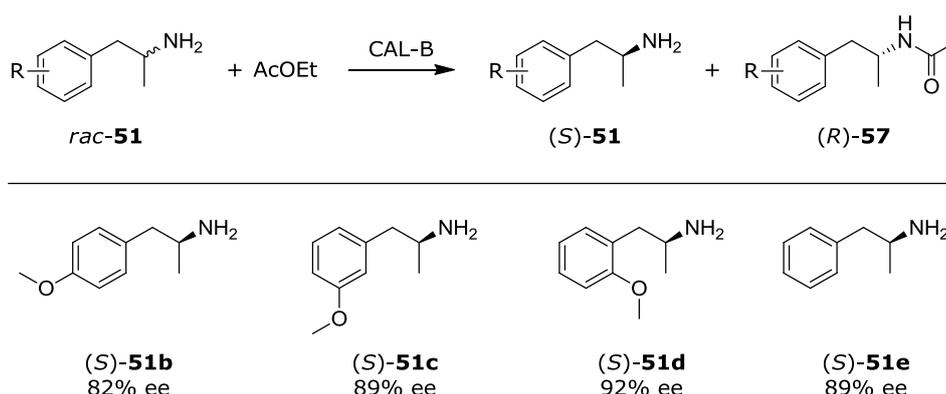
Ein weiterer Ansatz ausgehend von racemischen Aminen stellt die Deracemisierung dar. Eine chemoenzymatische Deracemisierung wurde in der Gruppe von TURNER mit Hilfe einer Monoaminoxidase erreicht, wobei das Amin selektiv zum Imin oxidiert und anschließend mittels chemischer Reduktionsmittel wieder zum Amin reduziert wird.<sup>[125]</sup> Als weiteres Beispiel können auch Lipasen zur Synthese chiraler Amine eingesetzt werden, wenn beispielsweise Ethylacetat als Acyldonor verwendet und eines der Enantiomere in das entsprechende Amid überführt wird, während das andere Enantiomer angereichert wird (Abbildung 44).<sup>[126–128]</sup>



**Abbildung 44.** Biokatalytische Synthese chiraler Amine mittels Deracemisierung oder Racematspaltung

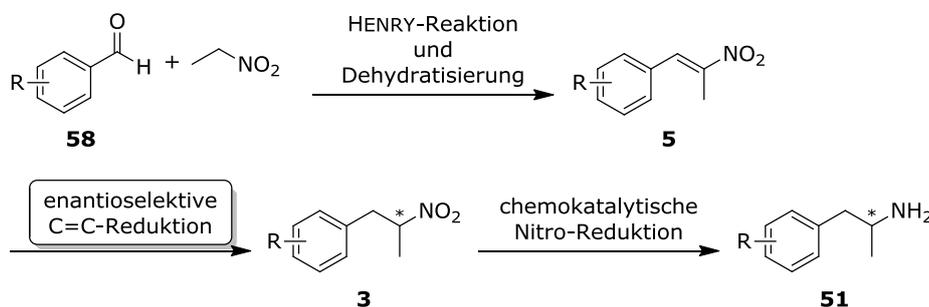
Mittels einer Lipase-katalysierten Racematspaltung gelang der es GONZÁLEZ-SABÍN *et al.* enantiomerenreine  $\alpha$ -Methyl-substituierte Amine vom Typ **51** darzustellen (Abbildung 45).<sup>[126]</sup> Ausgehend von den racemischen Gemischen der Amine wurde eines der Enantiomere selektiv mittels Lipase aus *Candida antarctica* (CAL-B) acyliert. Die freien Amine konnten dann mit ee-Werten von 82-92% ee isoliert werden. Durch Umkristallisation konnten diese Werte schließlich auf 98% - >99% ee erhöht werden.

Als Alternative zur direkten asymmetrischen Synthese eines Amins kann die Synthese über ein chirales Nitroalkan erfolgen, welches zum chiralen Amin reduziert wird. Die Synthese  $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkane gilt dabei als große Herausforderung. Eine mögliche Synthesestrategie zur Darstellung eines solchen  $\alpha$ -Methyl-substituierten Nitroalkans (**3**) ist in Abbildung 46 dargestellt. Die Synthese eines Nitroalkens erfolgt aus kostengünstigen Startmaterialien wie Benzaldehyd (**58**) und Nitroethan über eine Nitroaldol-Reaktion (HENRY-Reaktion) mit anschließender Dehydratisierung. Das Nitroalken vom Typ **5** wird im Anschluss durch die enantioselektive C=C-Reduktion zum Nitroalkan vom Typ **3** reduziert. Die nachfolgende Reduktion der Nitrogruppe führt zur Bildung des Amphetamin-Derivats vom Typ **51**. Dieses oder ähnliche Strukturelemente finden sich in APIs wieder, die enantiomerenreine Synthese dieser Bausteine ist daher von großem Interesse.



**Abbildung 45.** Lipase-katalysierte Racematspaltung zur Synthese enantiomerenreiner Amine vom Typ **51**<sup>[126]</sup>

Die enantioselektive Reduktion der Doppelbindung  $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkene vom Typ **5** verläuft auf übergangsmetallkatalysiertem Weg nur mit mäßiger Enantioselektivität. LI und IZUMI erreichten eine optische Reinheit von 58% mithilfe eines chiralen Ruthenium(II)-BINAP-Komplexes.<sup>[129]</sup>

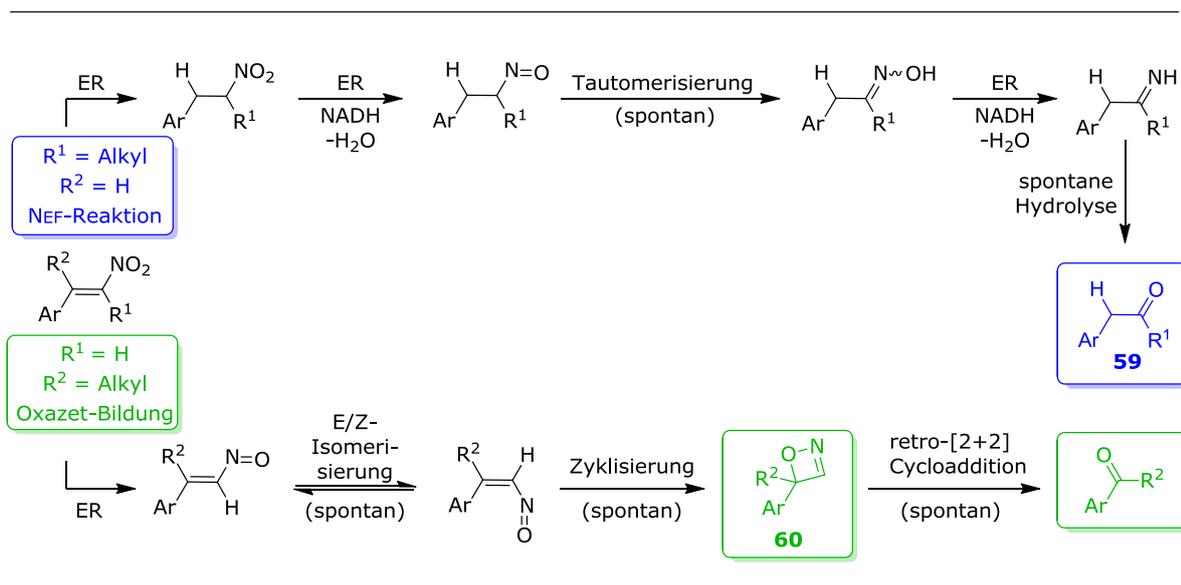


**Abbildung 46.** Synthese chiraler Amine über enantioselektive C=C-Reduktion und anschließender Reduktion der Nitrogruppe

Die biokatalytische Reduktion der C=C-Doppelbindung  $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkene mittels En-Reduktasen verläuft in einem Großteil der durchgeführten Studien racemisch<sup>[32,66,75–78]</sup> bzw. mit relativ geringen Enantioselektivitäten von bis zu 52% ee.<sup>[77,79–81]</sup> Einige Gruppen erhielten das Nitroalkan mit Enantioselektivitäten von bis zu 70% ee,<sup>[82,83]</sup> allerdings war die hoch enantioselektive Reduktion dieser Verbindungsklasse bisher nicht möglich. Im Jahr 2013 wurde von CLASSEN *et al.* erstmals eine Enantioselektivität von >80% ee für die biokatalytische Reduktion von 1-Phenyl-2-nitropropen (**5d**) zu 1-Phenyl-2-nitropropan (**3d**) mit 84% ee beschrieben.<sup>[84]</sup> Die verwendete En-Reduktase stammte dabei aus *Photorhabdus luminescens*.

Die Ursache für die geringen ee-Werte dieser Reduktion wurde anfangs in der hohen Racemisierungsanfälligkeit des Produktes aufgrund der hohen C-H-Acidität in  $\alpha$ -Stellung zur Nitrogruppe vermutet.<sup>[80]</sup> Allerdings wurde später berichtet, dass der Einfluss der Racemisierung vernachlässigbar und somit nur geringfügig verantwortlich für die geringen optischen Reinheiten ist.<sup>[79,82]</sup> Die geringen Enantioselektivitäten für diesen Substrattyp müssen demnach auf die enzymatische Reduktion zurückgeführt werden. Weitere Untersuchungen zu diesem Phänomen wurden bisher allerdings nicht unternommen.

Bei der biokatalytischen Reduktion mit En-Reduktasen besteht die Gefahr von konkurrierenden Nebenreaktionen. Oftmals werden die Enzyme in *E. coli* überexprimiert und anschließend als zellfreier Rohextrakt verwendet. Dabei besteht die Möglichkeit, dass, im Fall von Carbonylgruppen als aktivierender Gruppe, im Rohextrakt enthaltene Alkoholdehydrogenasen die Carbonylgruppe reduzieren und somit Nebenprodukte auftreten. *E. coli*-eigene En-Reduktasen können ebenfalls zu unerwünschten Konkurrenzreaktionen (die in geringeren Enantioselektivitäten der Enzymformulierung resultieren) führen.<sup>[53]</sup> Zusätzlich besteht bei der Reduktion von Nitroalkenen mittels En-Reduktasen die Möglichkeit, anstelle der C=C-Doppelbindung die Nitrogruppe zu reduzieren. Als Konkurrenzreaktion kommen somit eine parallel ablaufenden biokatalytischen NEF-Reaktion mit der Bildung des entsprechenden Ketons (**59**),<sup>[130]</sup> oder die Bildung von Oxazeten (**60**) in Frage (Abbildung 47).<sup>[131–133]</sup>



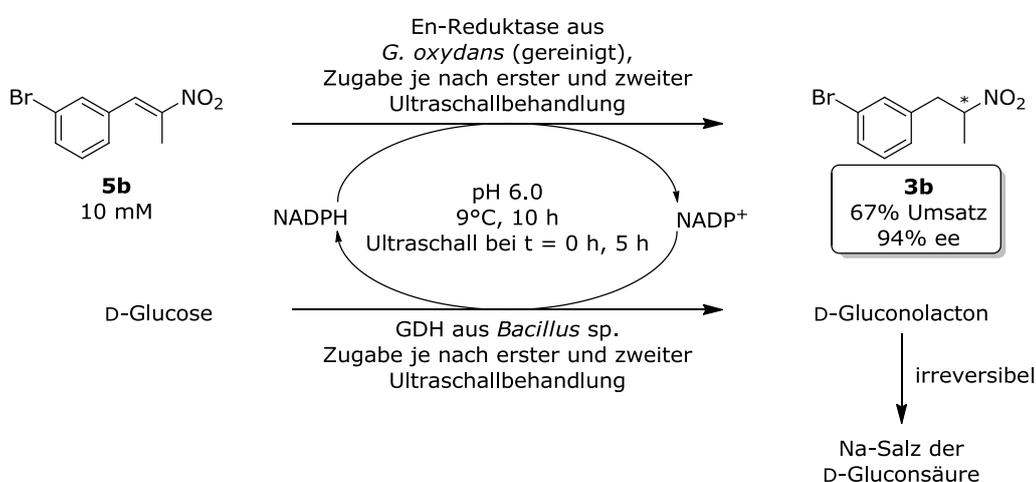
**Abbildung 47.** Bildung von Nebenprodukten bei der biokatalytischen C=C-Reduktion von Nitroalkenen

DURCHSCHEIN *et al.* zeigten in einer Studie über die Entstehung dieser Nebenprodukte, dass die Bildung dieser sowohl abhängig vom verwendeten Enzym, als auch von der Beschaffenheit des Substrates ist. Der Einsatz von XenA führte vermehrt zum Oxazet (**60**), während PETNR vermehrt das NEF-Produkt (**59**) bildete. Handelt es sich um ein  $\beta,\beta$ -disubstituiertes Nitroalken verläuft die Reaktion über den Oxazet-Abbauweg. Die Bildung des NEF-Produktes wird

verstärkt bei der Reduktion von  $\alpha,\beta$ -disubstituierten Nitroalkenen beobachtet.<sup>[131]</sup> DURCHSCHEIN *et al.* zeigten außerdem, dass es sich beim Oxazet-Abbauweg um keinen enzymatischen Weg, sondern um eine spontane Elektrozyklisierung des Nitrosoalkans handelt.<sup>[131]</sup>

OBERDORFER *et al.* postulierten zur Reduktion der Nitrogruppe anstelle der C=C-Bindung einen konkurrierenden Bindungsmodus des Substrates in der aktiven Tasche des Enzyms. Die Übertragung des Hydrids von FMN auf die Nitrogruppe wird vor allem in Enzymen detektiert, welche im aktiven Zentrum einen sog. „hydrophobic hot spot“ besitzen, welcher zu einer alternativen Orientierung des Nitroalkens in der Enzymtasche führt und die Hydridübertragung auf die Nitrogruppe begünstigt.<sup>[133]</sup> Die Nebenproduktbildung bleibt ein Problem, welches bei jeder Synthesestrategie zur biokatalytischen C=C-Reduktion berücksichtigt werden muss.

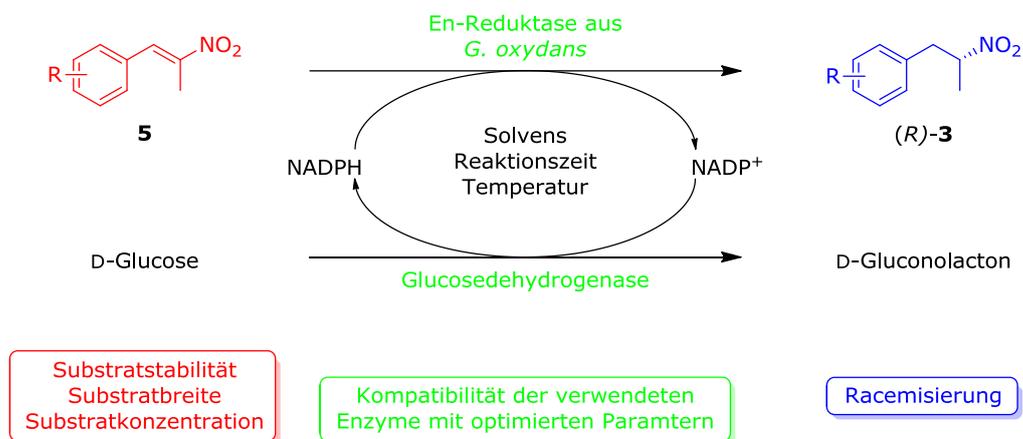
Die En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* (GOx-ER)<sup>[55,56]</sup> wurde von RICHTER *et al.*<sup>[22]</sup> charakterisiert und für diese Arbeit von der Arbeitsgruppe HUMMEL zur Verfügung gestellt. Im Rahmen früherer Arbeiten<sup>[17,19]</sup> wurde festgestellt, dass die Verwendung des Zellrohextrakts zu schlechteren Enantioselektivitäten führt im Vergleich zur Verwendung des Enzyms in gereinigter Form. Die Untersuchungen zur Nitroalkenreduktion mit diesem Enzym zeigten, dass die Enantioselektivität der Reaktion durch Verringern der Temperatur erhöht werden kann.<sup>[17,19]</sup> Außerdem hat sich der Einsatz von Ultraschall als geeignet erwiesen, um das Nitroalken **5b** besser im wässrigen Reaktionsmedium zu suspendieren. Die Ultraschallbehandlung kann während des Reaktionsverlaufes wiederholt angewandt werden, allerdings muss dann erneut Bsp-GDH zur Reaktionsmischung gegeben werden, da diese gegenüber der Ultraschallbehandlung nicht stabil ist.<sup>[17]</sup> Eine Verringerung der Reaktionszeit auf 10 h sollte ebenfalls zu erhöhter optischer Reinheit des Nitroalkans **3b** führen (Abbildung 48). Die absolute Konfiguration des bei der Reduktion mittels GOx-ER entstehenden Nitroalkans **3b** war bis dato nicht bekannt.



**Abbildung 48.** Benchmark-Experiment zur biokatalytischen Reduktion von Nitroalkenen mittels GOx-ER<sup>[17]</sup>

## 4.2 Zielsetzung

Die Umsetzung eines  $\alpha$ -Methyl-substituierten Nitroalkens mithilfe einer En-Reduktase bei einer Enantioselektivität von 94% ee wurde als „proof of concept“ im Rahmen der Masterarbeit durchgeführt.<sup>[17]</sup> Allerdings wurde die Anwendbarkeit auf ein Substratspektrum mit unterschiedlichen Substituenten am Aromaten bisher nicht gezeigt. Es ist bis dato nicht bekannt, ob sich die hohe Enantioselektivität der En-Reduktase aus *G. oxydans* nur auf Halogen-substituierte oder in *meta*-Position substituierte Nitrostyrene beschränkt, oder ob hier andere Substitutionsmuster ebenfalls akzeptiert werden. Deshalb sollen sowohl die Beschaffenheit des Substituenten als auch seine Position untersucht werden. Die vorliegende Arbeit soll einen tieferen Einblick in diesen biokatalytischen Prozess geben, wobei die Toleranzen sowie die Limitierungen der verwendeten Enzyme (En-Reduktase und Glucosedehydrogenase) untersucht werden sollen. Ebenso sollen neue Erkenntnisse über die verwendeten Substrate generiert werden, um durch ein Anpassen der Versuchsdurchführung einen effizienten Prozess zu entwickeln. Dabei spielen sowohl die Substratstabilität, die Substratkonzentration sowie die Substratbreite eine wichtige Rolle (Abbildung 49).

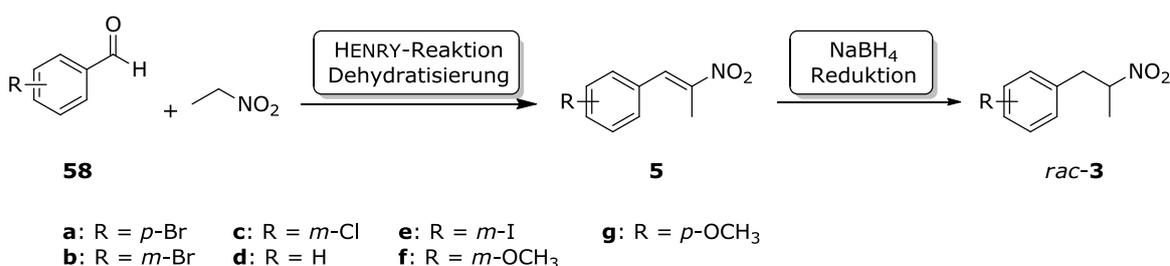


**Abbildung 49.** Übersicht über die Prozessoptimierung

Die bisher verwendete Substratkonzentration von 10 mM ist sehr gering und beruht auf der Tatsache, dass die zu reduzierenden Verbindungen in wässrigen Systemen eine sehr geringe Löslichkeit aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Substratkonzentration deutlich erhöht werden. Hierzu sollen zum einen der Einfluss der Ultraschallbehandlung untersucht und optimiert werden, und zum anderen der Einsatz organischer Lösungsmittel etabliert werden, um die Löslichkeit der Nitroalkene und damit einhergehend die Substratkonzentration zu erhöhen (Abbildung 49). In diesem Zusammenhang muss die Eignung aller beteiligten Enzyme auf die veränderten Parameter untersucht und in der Syntheseplanung berücksichtigt werden. Zusätzlich muss die Abhängigkeit der Racemisierung der Nitroalkane von den verwendeten

Reaktionsparametern untersucht werden. Es soll aufgeklärt werden, ob die Produkte generell racemisierungsanfällig sind und deshalb bis dato nur mit geringen ee-Werten isoliert werden können, bzw. in wie fern die Racemisierung beeinflussbar ist. Die Frage, ob die Racemisierung mit der biokatalytischen Reaktion zusammenhängt oder in der Natur der Nitroalkane liegt, muss verifiziert werden, um die Synthese dieser Verbindungen an die Begebenheiten anzupassen (Abbildung 49).

Im Vorfeld sollen hierzu die Nitroalkene sowie die zugehörigen racemischen Nitroalkane als Referenzverbindungen zur Entwicklung einer chiralen Analytikmethode zur ee-Wert Bestimmung synthetisiert werden. Die Nitroalkene sollen durch eine HENRY-Reaktion mit anschließender Dehydratisierung aus günstigen Startmaterialien wie Nitroethan und dem entsprechend substituierten Benzaldehyd-Derivat (**58**) synthetisiert werden. Die Synthese der Referenzverbindungen *rac-3* soll mittels Natriumborhydrid-Reduktion ausgehend vom  $\alpha$ -Methyl-substituierten Nitroalken vom Typ **5** (Abbildung 50) erfolgen.



**Abbildung 50.** Synthese der Nitroalkene sowie der racemischen Referenzverbindungen

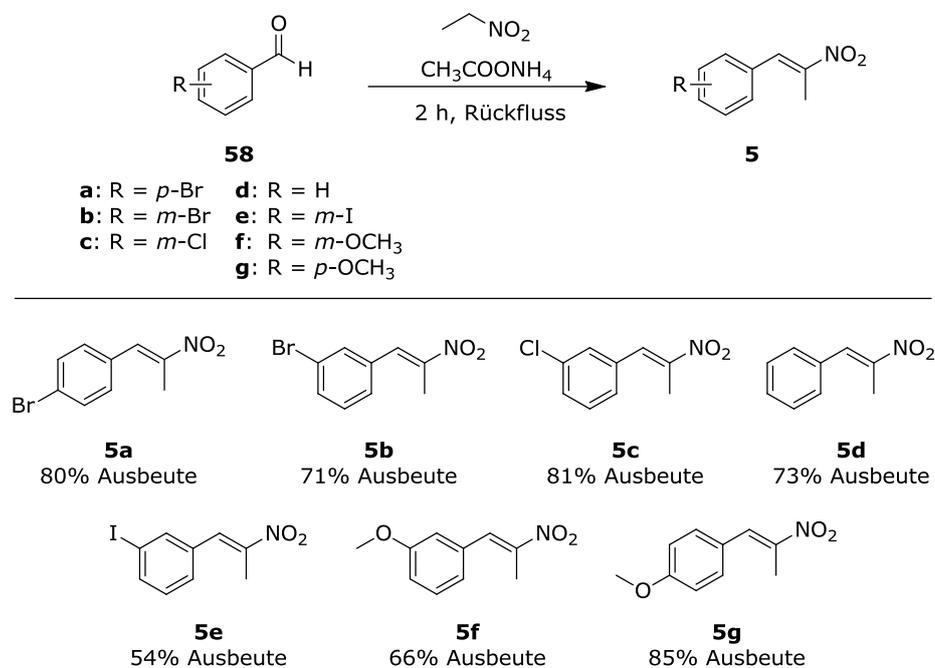
### 4.3 Synthese $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkene (**5**)

Die Synthese  $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkene (**5**) erfolgte über eine Nitro-Aldol-Reaktion (HENRY-Reaktion) mit anschließender Dehydratisierung nach dem Synthesekonzept von KAWAII *et al.*<sup>[79]</sup> Die von KAWAII *et al.* beschriebene Reaktionszeit wurde von „übernacht“ auf 2 h verkürzt. Die Nitroalkene wurden nach säulenchromatographischer Reinigung in Ausbeuten von 54% bis 81% erhalten (Abbildung 51).

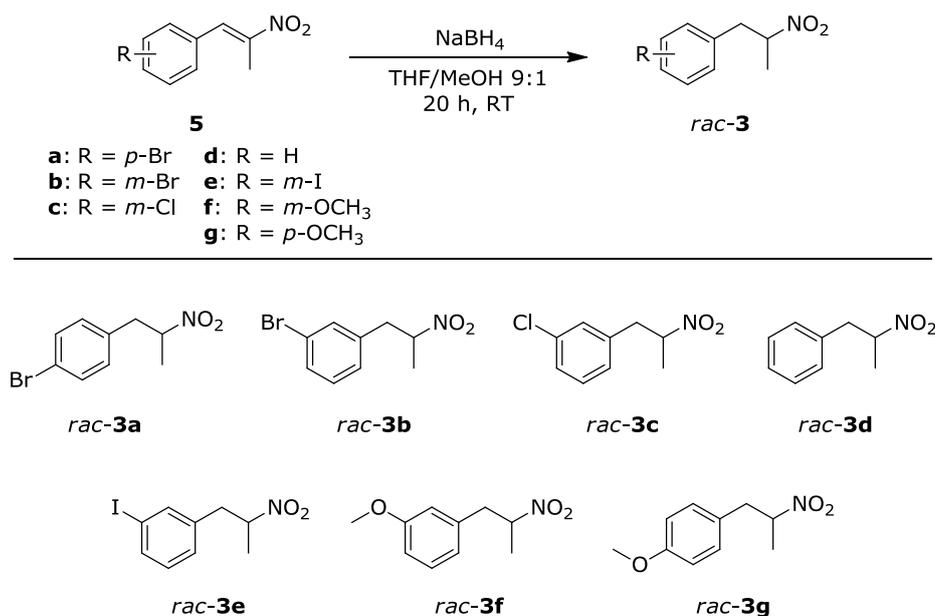
### 4.4 Synthese racemischer Nitroalkane (*rac-3*) als Referenzverbindungen

Die racemischen Nitroalkane vom Typ *rac-3* wurden durch die Reduktion der Doppelbindung des entsprechenden Nitroalkens (**5**) mit NaBH<sub>4</sub> erhalten (Abbildung 52). Die racemischen Nitroalkane wurden zur Validierung von Analytikmethoden mittels <sup>1</sup>H-NMR zur

Umsatzbestimmung, sowie chiraler HPLC zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses verwendet. Die Synthesen verliefen mit vollständigem Umsatz, die Nitroalkane konnten ohne weitere Reinigung zur Entwicklung einer Umsatz- und ee-Analytik verwendet werden. Für alle Nitroalkane in Abbildung 52 stehen chirale Analytik-Methoden mittels HPLC zur Verfügung.



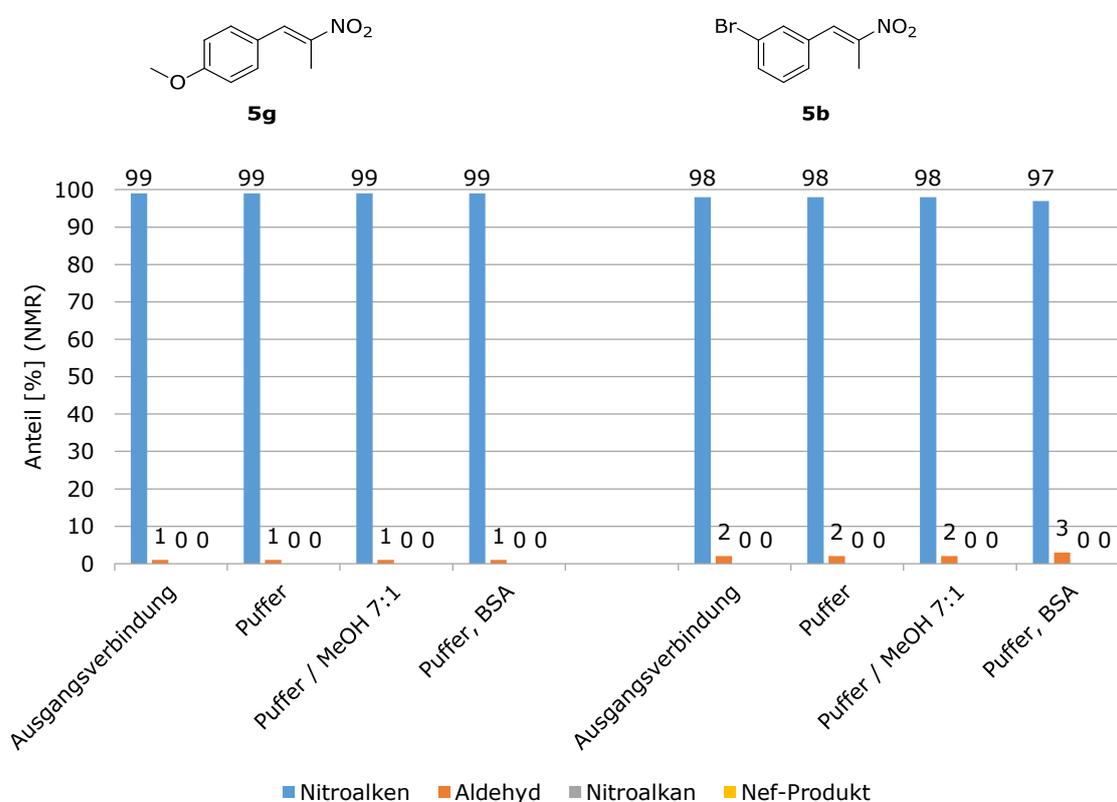
**Abbildung 51.** Synthese  $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkene



**Abbildung 52.** Synthese racemischer Nitroalkane als Referenzverbindungen

## 4.5 Untersuchungen zur Substratstabilität

Die Stabilität des Substrates im Reaktionsmedium ist eine wichtige Voraussetzung für dessen Umsetzung. Die Stabilität von Nitroalkenen wurde exemplarisch an **5b** und **5g** untersucht. Hierzu wurde das Nitroalken in Phosphatpuffer mittels Ultraschall emulgiert bzw. suspendiert und anschließend bei 9°C für 24 h unter Rühren inkubiert. Um die Stabilität gegenüber der Anwesenheit eines nichtkatalytischen Proteins zu testen, wurde die Stabilität zusätzlich in Anwesenheit von BSA getestet, außerdem wurde die Stabilität in der Gegenwart von 30% Methanol untersucht (Abbildung 53).



**Abbildung 53.** Untersuchungen zur Substratstabilität von **5g** und **5b**

Die Nitroalkene stellen sich als stabile Substrate heraus. Über einen Zeitraum von 24 h konnte kein Zerfall zum Ausgangsmaterial (Aldehyd) oder eine Reaktion zum Nitroalkan oder dem NEF-Produkt (**59b,g**) detektiert werden. Dies gilt auch für die Anwesenheit von BSA, was zeigt, dass unspezifische Proteine durch bspw. Seitenketten in der Proteinstruktur die Nitroalkene nicht beeinflussen. Im Hinblick auf die Biotransformationsreaktionen ist dies eine wichtige Information, da somit alle anfallenden Nebenprodukte und Konkurrenzreaktionen auf das entsprechende Enzym bzw. die gewählten Reaktionsbedingungen zurückgeführt werden können und eine Zersetzung ausgeschlossen werden kann.

## 4.6 Reduktion $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkene im 100 mL-Maßstab mittels En-Reduktase aus *G. oxydans*

Zur Erweiterung des Substratspektrums der En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* und zur Untersuchung des Einflusses des Substituenten auf die Selektivität der biokatalytischen Reduktion von Nitroalkenen vom Typ **5** wurden präparative Biotransformationen in Anlehnung an den „proof of concept“ (Abbildung 48, Seite 65)<sup>[17]</sup> durchgeführt. Die rekombinant verfügbare En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* wurde mit einem His-Tag versehen in *E. coli* überexprimiert und anschließend mittels Affinitätschromatographie gereinigt.<sup>[22]</sup> Das Enzym wurde als gereinigtes Lyophilisat für die Biotransformationen eingesetzt. Die Synthesen wurden in einem präparativen Maßstab von 100 mL Reaktionsvolumen, einer Substratkonzentration von 10 mM und einer Enzymbeladung von 40 U/mmol durchgeführt. Zur Regenerierung des Cofaktors NADP<sup>+</sup> wurde ein *in situ*-Cofaktorregenerierungssystem mittels D-Glucose und Glucosedehydrogenase eingesetzt.

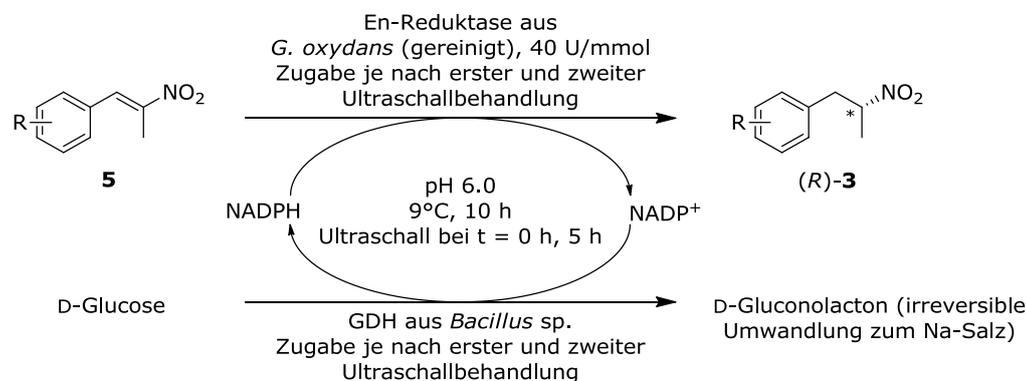
Dabei zeigte sich, dass in *meta*-Position Halogen-substituierte Nitroalkene vom Typ **5** mit hohen Enantioselektivitäten unter den gewählten Bedingungen umgesetzt werden (Tabelle 9, Einträge 1-3). Die erhaltenen ee-Werte von 93% (**3e**) bis 95% (**3b**) stellen die bisher höchsten Enantioselektivitäten für die biokatalytische Reduktion von  $\alpha$ -Methyl-substituierten Nitroalkenen dar. Die Reaktionen verliefen mit 96% (**5c**) bzw. quantitativem Umsatz (**5b,e**), wobei die Bildung des entsprechenden NEF-Produktes (**59b,e**) nur in sehr geringen Mengen auftrat (max. 1%).

Bei der Reduktion des in *meta*-Position mit einer Methoxygruppe substituierten Nitroalkens (**5f**) wurde ebenfalls eine hohe optische Reinheit von 93% ee erhalten (Tabelle 9, Eintrag 4). Auch hier wurden nach 10 h ein sehr guter Gesamtumsatz von 95% und ein produktbezogener Umsatz von 93% erreicht. Die Menge des anfallenden NEF-Produktes (**59f**) bleibt ebenfalls sehr gering (2%). Dies bestätigt, dass die enzymatische Reduktion von in *meta*-Position substituierten Nitroalkenen hoch enantioselektiv verläuft und diese Selektivität unabhängig von der Art des Substituenten in *meta*-Position ist.

Die in *para*-Position substituierten Nitroalkene **5g** (R = *para*-Methoxy) und **5a** (R = *para*-Brom) hingegen zeigten deutlich geringere optische Reinheiten von 81% ee für **3a** und 66% ee für **3g** (Tabelle 9, Einträge 6 und 7). Die Umsätze für diese beiden Substrate liegen deutlich unter denen für ein *meta*-Substitutionsmuster. Während bei **5a** die Bildung des NEF-Produktes (**59a**) noch relativ gering ausfiel (5%), wurde **5g** bei einem Gesamtumsatz von 53% zu 23% des NEF-Produktes (1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanon, **59g**) umgewandelt. Für dieses Substrat scheint, in Anlehnung an die Theorie von OBERDORFER *et al.*,<sup>[133]</sup> eine zweite Orientierung in der aktiven Tasche möglich zu sein, durch welche die Nitro-Reduktion und daraus folgend die Bildung des NEF-Produktes resultiert. Erfreulicherweise wurde das am Aromaten unsubstituierte Nitroalken **5d** mit 90% ee umgesetzt. Die Bildung des NEF-Produktes wurde für dieses Substrat

beobachtet, bleibt jedoch relativ gering (5% NEF-Produkt **5d** bei einem Gesamtumsatz von 76%).

**Tabelle 9.** Biokatalytische Reduktion von  $\alpha$ -Methyl-substituierten Nitroalkenen im 100 mL-Maßstab mittels En-Reduktase aus *G. oxydans*



Eintrag	Substrat	R =	Gesamtumsatz [%]	Umsatz zu <b>3</b> [%]	NEF-Produkt <b>55</b> [%]	ee [%]	$[\alpha]_D^{25}$
<b>1</b>	<b>5b</b>	<i>m</i> -Br <sup>a)</sup>	>99	>99	<1	95	-53
<b>2</b>	<b>5c</b>	<i>m</i> -Cl	96	95	1	94	-45
<b>3</b>	<b>5e</b>	<i>m</i> -I <sup>a)</sup>	99	99	<1	93	-15
<b>4</b>	<b>5f</b>	<i>m</i> -OCH <sub>3</sub>	95	93	2	93	-49
<b>5</b>	<b>5d</b>	H	76	71	5	90	-29
<b>6</b>	<b>5g</b>	<i>p</i> -OCH <sub>3</sub>	53	30	23	66	-25
<b>7</b>	<b>5a</b>	<i>p</i> -Br	31	27	4	81	-33

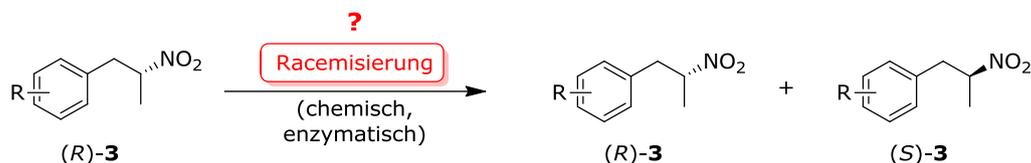
a) Ausbeute nach säulenchromatographischer Reinigung für (*R*)-**3b** und (*R*)-**3f** je 84%

Die Ergebnisse bestätigen die These von DURCHSCHEIN *et al.*,<sup>[131]</sup> dass als Nebenprodukt der hier verwendeten  $\alpha,\beta$ -disubstituierten Nitroalkene als Nebenprodukt das NEF-Produkt gebildet wird. Der Anteil des NEF-Produktes ist abhängig von der Beschaffenheit des Substrates. Im Fall der En-Reduktase aus *G. oxydans* wird das NEF-Produkt in sehr geringen Mengen bei *meta*- und unsubstituiertem Nitroalken gebildet. Bei *para*-substituierten Nitroalkenen ist die NEF-Produkt Bildung abhängig von der Art des Substituenten.

Die absolute Konfiguration des mittels GOx-ER synthetisierten Nitroalkans war bisher nicht bekannt.<sup>[17,19]</sup> Von den erhaltenen Nitroalkanen **3a-g** wurde jeweils der Drehwert bestimmt. Da alle Nitroalkane einen Drehwert mit negativem Vorzeichen besaßen, kann durch Vergleich mit Literatur<sup>[82]</sup> die absolute Konfiguration der Nitroalkane als (*R*)-Konfiguration ermittelt werden. Dieser Prozess stellt somit durch den Einsatz der rekombinanten, gereinigten En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* den ersten hoehenantioselektiven Zugang zu (*R*)-1-Phenyl-2-nitropropanderivaten mit >90% ee und bis zu 95% ee dar.

## 4.7 Untersuchungen zur Racemisierung chiraler Nitroalkane

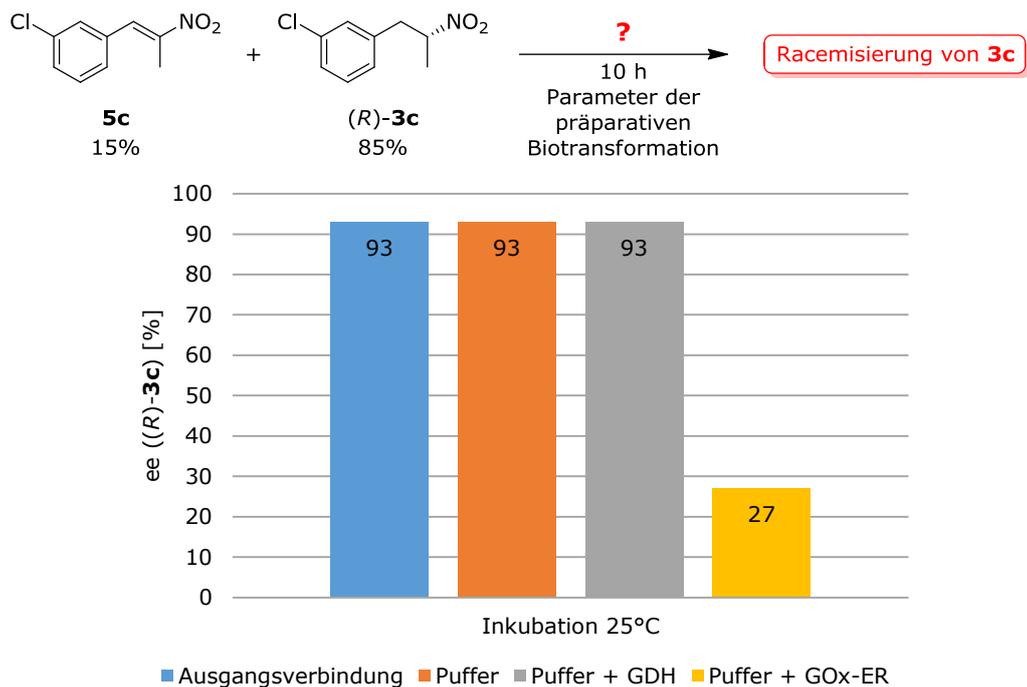
Die Racemisierungsanfälligkeit C-H-acider Verbindungen stellt ein potentiell Problem dar (Abbildung 54). Die in Abschnitt 4.5 durchgeführten Experimente werfen die Frage auf, ob die Bildung eines enantiomerenreinen Produktes mit >99% ee auf Grund einer Racemisierung des Nitroalkans oder einer geringen Enantioselektivität des Enzyms nicht erreicht werden kann. Eine Racemisierung kann dabei sowohl durch die chemische Umgebung des Nitroalkans, als auch durch das Enzym katalysiert stattfinden. Hierzu wurde im Folgenden die Racemisierung des Nitroalkans (*R*)-**3** in Gegenwart der in der Reaktionsmischung vorhandenen Komponenten Puffer, Glucosedehydrogenase und En-Reduktase untersucht (Abschnitt 4.7.1). Zusätzlich wurden der Effekt der Reaktionstemperatur sowie die Beeinflussung der Racemisierung durch das Nitroalken **5c** evaluiert (Abschnitte 4.7.2 und 4.7.3).



**Abbildung 54.** Racemisierung chiraler Nitroalkane vom Typ **3**

### 4.7.1 Abhängigkeit der Racemisierung von En-Reduktase und Glucosedehydrogenase

Zur Untersuchung der Racemisierung chiraler Nitroalkane wurde (*R*)-1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropan ((*R*)-**3c**) als Modellsubstrat verwendet. Eine Mischung aus **5c** und (*R*)-**3c** mit einem simulierten Umsatz von 85% wurde für 10 h (mit einer Ultraschallunterbrechung nach 5 h, entsprechend den Bedingungen der biokatalytischen Reduktion in Abschnitt 4.5) bei 25°C inkubiert (Abbildung 55). Der ee-Wert von (*R*)-**3c** lag zu Beginn bei 93%, die Inkubation in reinem Puffer und in Anwesenheit der Glucosedehydrogenase führte über den gewählten Zeitraum zu keiner Racemisierung. In Anwesenheit der En-Reduktase verringerte sich der ee-Wert jedoch deutlich von 93% auf 27%. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Nitroalkan unter den gewählten Reaktionsbedingungen bei pH 6 und 25°C keiner chemischen Racemisierung unterliegt, sondern der Prozess enzymkatalysiert verläuft. Dabei kann die enzymkatalysierte Racemisierung entweder direkt im aktiven Zentrum des Enzyms stattfinden, oder aber unspezifisch durch eine freie Aminosäure auf der Oberfläche des Enzyms. Dies wird im Folgenden (Abschnitt 4.7.2) weiter verifiziert.



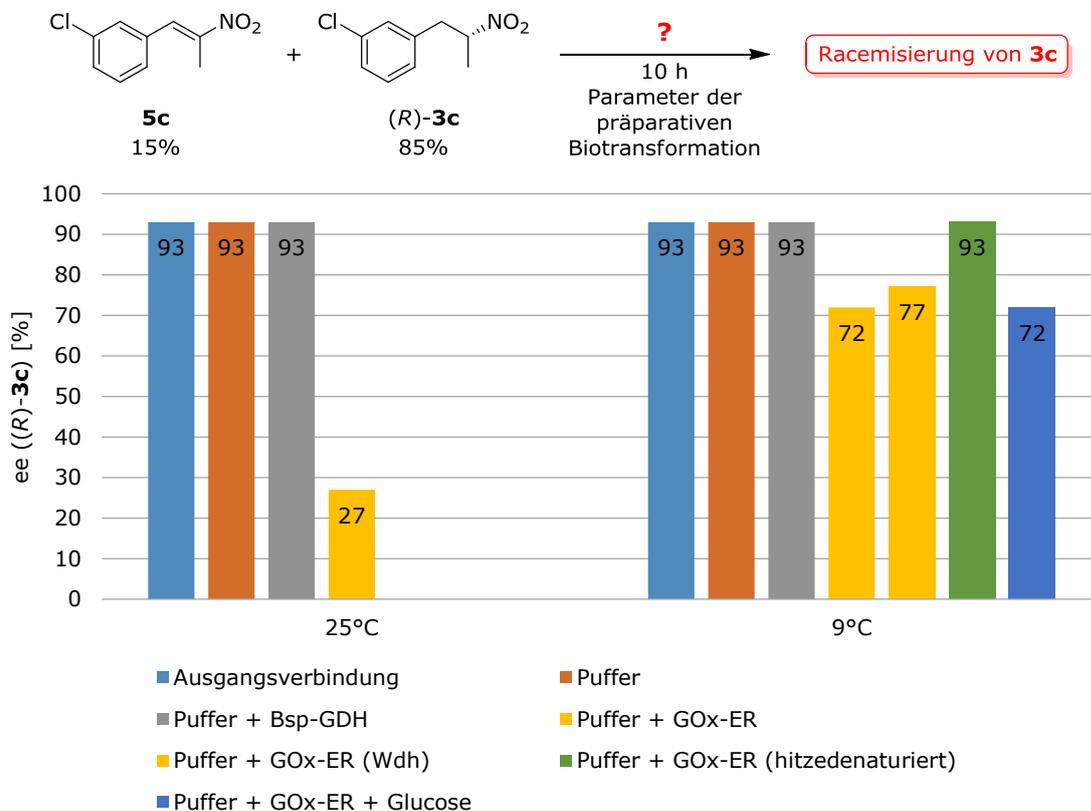
**Abbildung 55.** Racemisierung von **(R)-3c** in Abhängigkeit der an der Reaktion beteiligten Enzyme

#### 4.7.2 Abhängigkeit der Racemisierung von der Temperatur und der Enzymkomponente

Die Racemisierung des Nitroalkans **(R)-3c** wurde zusätzlich zu den in Abschnitt 4.7.1 untersuchten Bedingungen in Abhängigkeit der Temperatur untersucht. Die Inkubationstemperatur wurde auf 9°C verringert. Die Experimente zeigen, dass in Gegenwart von Puffer, bzw. Puffer und Glucosedehydrogenase keine Racemisierung stattfindet, in Gegenwart der En-Reduktase aus *G. oxydans* verringert sich der ee-Wert jedoch von 93% auf 72% (Abbildung 56). Beim Vergleich der Werte bei 25°C (27% ee) und 9°C (72% ee) fällt jedoch auf, dass die Racemisierung bei niedrigen Temperaturen deutlich langsamer verläuft. Zusätzlich wurde die Racemisierung in Gegenwart der hitzedenaturierten En-Reduktase untersucht. Dafür wurde das Enzym für 15 Minuten auf 80°C erhitzt und anschließend mit dem Nitroalken/Nitroalkan-Gemisch inkubiert. Durch die Denaturierung lag das Enzym als heterogene Komponente in dem Gemisch vor. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart denaturierter En-Reduktase keine Racemisierung auftritt. Dies bestätigt, dass die Racemisierung durch das aktive Enzym katalysiert wird, wobei die Struktur des Enzyms noch intakt sein muss. Die Anwesenheit von D-Glucose hingegen hat keine Auswirkung auf die enzymkatalysierte Racemisierung.

Die Tatsache, dass das Nitroalkan in diesem Versuchsaufbau verhältnismäßig stark racemisiert, widerspricht den Erwartungen, da **(R)-3c** in präparativen Experimenten mit bis zu

94% ee synthetisiert wurde (Abschnitt 4.5). Eine derart hohe optische Reinheit dürfte nach diesen Ergebnissen nicht erreichbar sein. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund könnte sein, dass die Racemisierung generell immer auftritt, allerdings erst in quantitativem Maßstab wenn das Nitroalken vollständig umgesetzt und somit nur noch Nitroalkan in der Reaktionsmischung vorhanden ist. Über die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der En-Reduktase aus *G. oxydans* zu Nitroalkanen vom Typ **3** bzw. Nitroalkenen vom Typ **5** sind keine Daten vorhanden. Allerdings könnte eine höhere Bindungsaffinität des Enzyms zum Nitroalken als zum Nitroalkan diese Beobachtung erklären, da somit bevorzugt Nitroalken gebunden und umgesetzt wird, und erst bei Abwesenheit des Nitroalkens das Nitroalkan gebunden und damit racemisiert wird. Um diese These zu überprüfen, wird die Abhängigkeit der Racemisierung von der Alken-Konzentration in Abschnitt 4.7.3 untersucht.



**Abbildung 56.** Racemisierung von **(R)-3c** in Abhängigkeit von Temperatur und Enzymkomponente

#### 4.7.3 Abhängigkeit der Racemisierung von Temperatur und Nitroalkenkonzentration

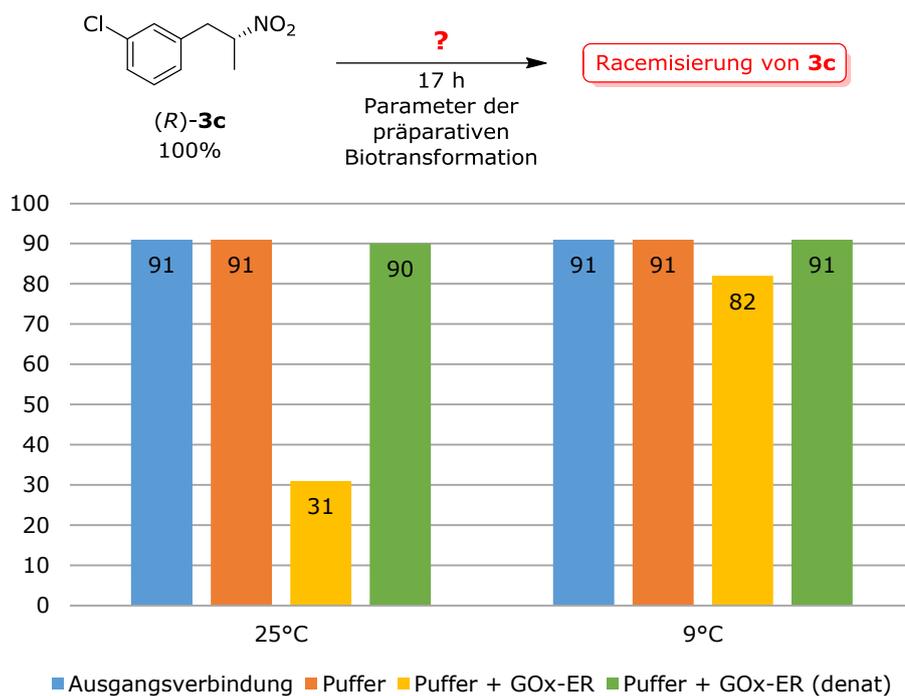
Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Racemisierung von der Nitroalken-Konzentration wurde zum einen das Verhalten des Nitroalkans **(R)-3c** als Reinsubstanz (Abbildung 57) und zum anderen in einer 1:1-Mischung mit dem Alken **5c** (Abbildung 58) untersucht. Die

Inkubation verlief bei 9°C und 25°C über 17 h. Die Racemisierung der Reinsubstanz findet analog zu den eingehenden Versuchen nur in Anwesenheit des intakten Enzyms statt, der ee-Wert bleibt bei der Inkubation in reinem Puffer oder in der Anwesenheit von denaturierter En-Reduktase erhalten. Die Racemisierung tritt bei höheren Temperaturen stärker auf, bei 25°C verringerte sich der ee-Wert von 91% auf 31%, während sich bei 9°C eine geringere Abnahme auf 82% ee zeigte (Abbildung 57). Die Substratkonzentration betrug in diesen Experimenten 10 mM.

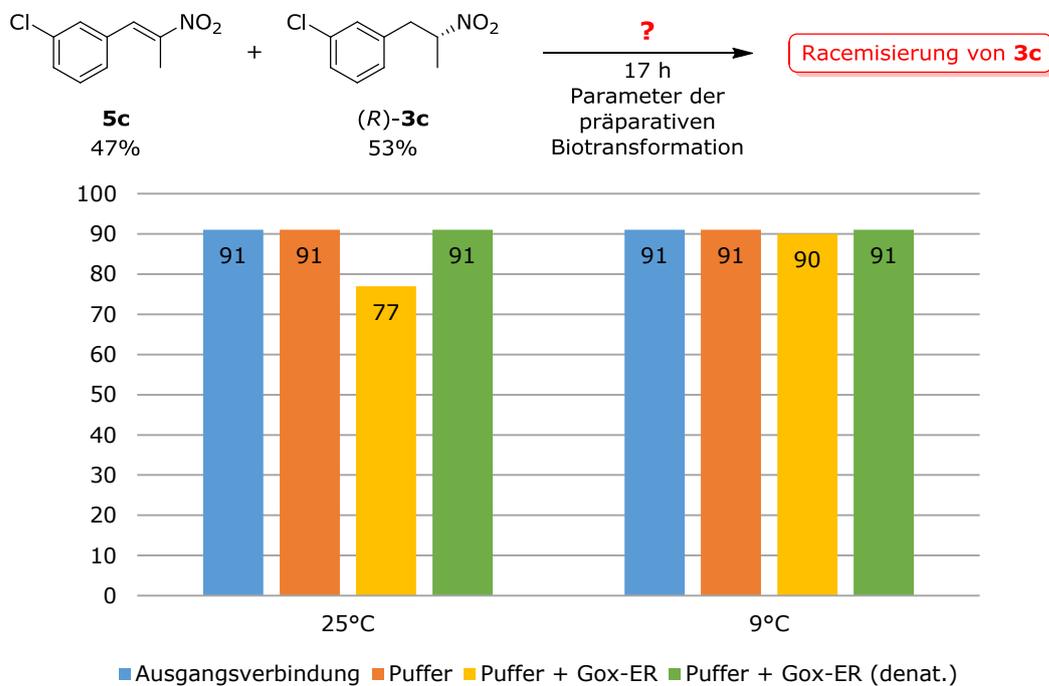
Zur Untersuchung des Einflusses des Nitroalkens wurde eine Mischung aus **5c** und (*R*)-**3c** mit je 10 mM hergestellt und unter identischen Bedingungen inkubiert. Die Racemisierung in Anwesenheit des Nitroalkens **5c** bleibt in reinem Puffer bzw. in Anwesenheit denaturierter En-Reduktase aus, was den einleitenden Ergebnissen entspricht. Die Racemisierung findet auch in diesem Fall nur in Anwesenheit intakter En-Reduktase statt, sie fällt allerdings im Vergleich zur Inkubation der Reinsubstanz geringer aus. Bei 25°C sinkt der ee-Wert von 91% auf 77%, bei 9°C konnte die Racemisierung nahezu vollständig unterdrückt werden (90% ee, Abbildung 58). Demnach ist die Racemisierung unter anderem abhängig von dem Verhältnis Alken zu Alkan, und kann weitestgehend durch die Temperatur verringert werden.

Eine mögliche Erklärung für diesen Befund wären unterschiedlich starke Bindeaffinitäten des Enzyms zum Nitroalken bzw. Nitroalkan. Die Tatsache, dass in Gegenwart des Nitroalkens eine geringere Racemisierung von **3a** beobachtet wird, betätigt diese These. In völliger Abwesenheit des Nitroalkens wird eine deutlich stärkere Racemisierung von **3a** beobachtet (vgl. Abbildung 57 und Abbildung 58). Unter Annahme unterschiedlich starker Affinitäten kann somit davon ausgegangen werden, dass die Racemisierung im Fall einer Biotransformation erst dann verstärkt auftritt, sobald die gesamte Alkenmenge umgesetzt und nur noch Nitroalkan in der Lösung vorhanden ist. Zusätzlich wird die Racemisierung bei einer geringen Temperatur unterdrückt, was auf eine verlangsamte Diffusionsrate zurückgeführt werden kann.

In den präparativen Biotransformationen in Abschnitt 4.5 wurden bei einer Temperatur von 9°C und einer Reaktionszeit von 10 h hohe Enantioselektivitäten von 90% - 95% ee erreicht. Einige Experimente bestätigen damit diese These, da für die Substrate **5c**, **5f** und **5d** keine vollständigen Umsätze beobachtet wurden und demnach genügend Nitroalken in der Lösung vorhanden war, das die Racemisierung unterdrücken konnte. Im Fall der Reduktion von **5b** jedoch wurde ein Umsatz von >99% erreicht, was für eine beginnende Racemisierung spräche. Es ist allerdings möglich, dass diese durch die geringe Temperatur weitgehend unterdrückt wurde, was, wie in den Abschnitten 4.7.2 und 4.7.3 gezeigt wurde, sehr gut möglich ist.



**Abbildung 57.** Racemisierung von (*R*)-**3c** als Reinsubstanz in Abhängigkeit von der Temperatur

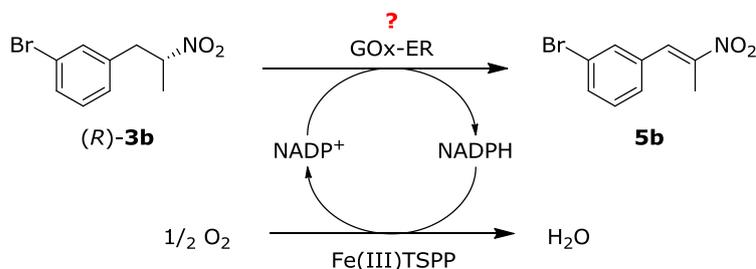


**Abbildung 58.** Racemisierung eines Gemisches aus **5c** (47%) und (*R*)-**3c** (53%) in Abhängigkeit von der Temperatur

Für keins der untersuchten Nitroalkene und Nitroalkane sind jedoch kinetische Daten verfügbar. Über die  $K_M$ -Werte für diese Verbindungen ist nichts bekannt, weshalb mögliche Erklärungsansätze bisher nicht bewiesen werden können. Da hier außerdem eine sehr spezielle Versuchsdurchführung gewählt wurde (es wurde nur ein einziges Alken/Alkan-Paar untersucht, die Racemisierung wurde isoliert betrachtet, der Einfluss des Cofaktorregenerierungssystems wurde bspw. außer Acht gelassen), stellen diese Ergebnisse nur einen Ausschnitt des komplexen biokatalytischen Systems dar. Allerdings liefern sie wichtige neue Informationen über die Racemisierung von Nitroalkanen in Gegenwart der En-Reduktase aus *G. oxydans* und zeigen, dass die Enantioselektivität durch geschickte Reaktionsführung beeinflusst werden kann.

#### 4.7.4 Die Rückreaktion vom Nitroalkan zum Nitroalken

Eine denkbare Ursache zur enzymkatalysierten Racemisierung der Nitroalkane könnte die entsprechende Rückreaktion darstellen. Durch eine Deprotonierung des Nitroalkans durch das Enzym wäre eine unspezifische Re-Protonierung, welche zur Racemisierung führt, denkbar. Um festzustellen, ob die Rückreaktion als solches generell stattfindet, wurde das Nitroalkan (*R*)-**3b** mit der En-Reduktase in Gegenwart eines Cofaktorregenerierungssystems bestehend aus einer biomimetischen NAD(P)H-Oxidase (Fe(III)TSPP)<sup>[134]</sup> und Sauerstoff aus der Umgebungsluft inkubiert (Abbildung 59).



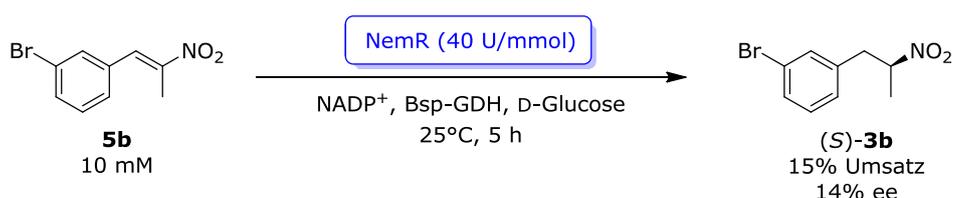
**Abbildung 59.** Untersuchung zur Rückreaktion von Nitroalken zu Nitroalkan mittels En-Reduktase in Anwesenheit einer biomimetischen NAD(P)H-Oxidase

Allerdings konnte im Rahmen dieser Untersuchung kein Alken (**5b**) mittels <sup>1</sup>H-NMR nachgewiesen werden. Eine Rückreaktion vom Alkan zum Alken kann somit ausgeschlossen werden. In der Literatur finden sich bis dato ebenfalls keine Hinweise auf eine Reversibilität En-Reduktase katalysierter Reduktionen. Allerdings bleibt die Möglichkeit bestehen, dass die Deprotonierung des C<sub>α</sub>-Atoms stattfindet, ohne dass die darauf folgende, zur Nitroalken-Bildung nötige Abspaltung des zweiten Protons durchgeführt wird. Somit könnte die Racemisierung durch eine unselektive Protonierung und Deprotonierung stattfinden. Diese

These konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht genauer verifiziert werden, stellt jedoch einen interessanten Ausgangspunkt für weitere Forschungen dar.

#### 4.7.5 Untersuchung der Konkurrenzreaktion durch NemR

Die durch *E. coli* eigene En-Reduktasen verursachte Verringerung der Enantioselektivität wurde bereits im Rahmen des En-Reduktase-Screenings in Abschnitt 3.3 erwähnt. Eine dieser En-Reduktase ist NemR, welche durch HUMMEL *et al.* zur Verfügung gestellt wurde. Diese Hintergrundreaktion darf bei der Nitroalken-Reduktion nicht vernachlässigt werden. Im Vergleich zur En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* reduziert NemR Nitroalkene zum entgegengesetzten (*S*)-Enantiomer. Die Umsetzung des Nitroalkens **5b** im präparativen Maßstab mit NemR zeigt, dass diese das Nitroalken bei einem Umsatz von 14% mit 15% ee ((*S*)-**3b**) reduziert. Auf den ersten Blick erscheint dies eine recht hohe Aktivität zu sein, allerdings muss berücksichtigt werden, dass hier 40 U/mmol eingesetzt wurden, was weit über den Mengen liegt, die im Fall eines eingesetzten Rohextrakts vorhanden wären. Somit kann hier die Vermutung aus dem Screening bestätigt werden, dass die Anwesenheit von NemR für geringere ee-Werte bei biokatalytischen Reduktionen von Nitroalkenen sorgen kann, dieser Effekt jedoch bei guter Überexpression des gewünschten Proteins nicht hauptauschlaggebend sein sollte. Zusammenfassend sind Enzymformulierungen mit hohem En-Reduktase-Anteil wichtig. Falls dieser durch die Expression nicht erreicht werden kann, sollte bei der Verwendung von En-Reduktasen das Enzym vor dem Einsatz von *E. coli*-eigenen En-Reduktasen abgetrennt werden.

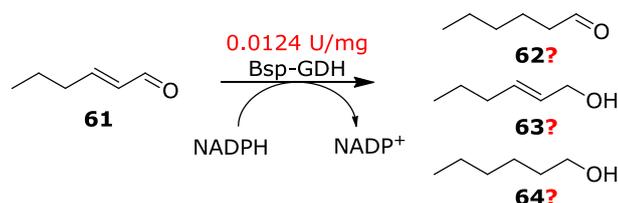


**Abbildung 60.** Biokatalytische Reduktion von **5b** mittels NemR

Bei biokatalytischen Reduktionsreaktionen mittels En-Reduktase aus *G. oxydans* wurde in der Gruppe um GRÖGER in früheren Arbeiten<sup>[17,19]</sup> eine konkurrierende Nebenreaktion bei Verwendung eines Enzymrohextraktes festgestellt. Deshalb wird die En-Reduktase GOx-ER als gereinigtes Enzym eingesetzt. Das rekombinante Enzym wurde mit einem His-Tag versehen und aus dem Zellrohextrakt mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert.<sup>[22]</sup> Bei den verwendeten GOx-ER-Enzymformulierungen handelt es sich um gereinigtes, lyophilisiertes Protein.

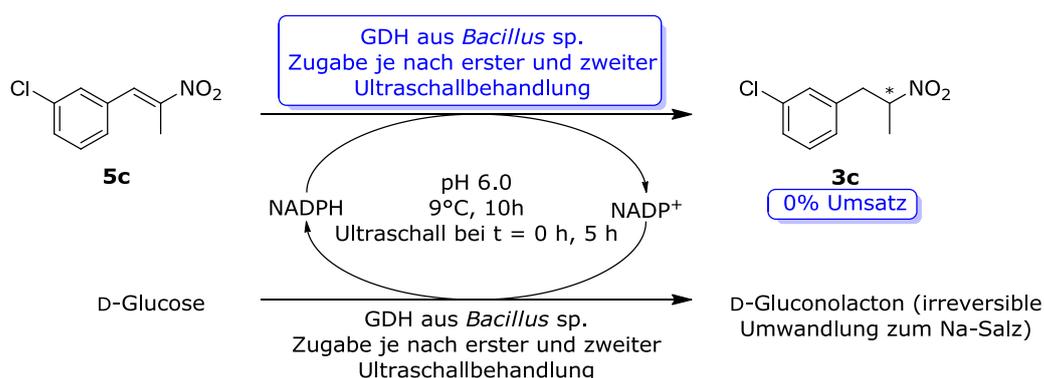
#### 4.8 Untersuchungen zur En-Reduktase-Hintergrundaktivität der Enzymformulierung Bsp-GDH

Die Aktivitätsbestimmung von NAD(P)H-abhängigen Enzymen erfolgt klassischerweise spektrophotometrisch, indem während der Reduktion/Oxidation eines Substrates die Abnahme/Zunahme des Cofaktors über die Zeit gemessen und daraus die Aktivität ermittelt wird. Die Glucosedehydrogenase aus *Bacillus* sp. (Bsp-GDH) wurde käuflich erworben und liegt als Lyophilisat vor. Um mögliche Konkurrenzreaktionen, katalysiert durch die eingesetzte Bsp-GDH (oder in der Formulierung enthaltene En-Reduktase oder Alkoholdehydrogenase), auszuschließen, wurde die Spezifität dieser Enzymformulierung untersucht. Als Cofaktor wurde NADPH eingesetzt, welcher auch im Rahmen der biokatalytischen Reduktion mittels GOx-ER eingesetzt wird. Einleitend wurde spektrophotometrisch untersucht, ob die Bsp-GDH-Enzymformulierung *trans*-2-Hexenal (**61**) zu Hexenal (**62**) reduziert, welches im Rahmen dieser Arbeit als Standardsubstrat für alle photometrischen En-Reduktase-Aktivitätstests herangezogen wird (Abbildung 61). Dabei wurde eine Aktivität von 0.0124 U/mg ermittelt, was einer sehr geringen Aktivität entspricht.



**Abbildung 61.** Photometrische Aktivitätsbestimmung der Glucosedehydrogenase aus *Bacillus* sp.

Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass bei diesem Test möglicherweise keine En-Reduktase-Aktivität gemessen wurde, sondern eine Alkoholdehydrogenase-Aktivität. Dies würde zur Bildung des Alkohols **63** führen. Eine Kombination der beiden Aktivitäten ist ebenfalls möglich und würde zu einer Bildung von Hexanol (**64**) führen. Da im Photometertest ausschließlich die Abnahme des Cofaktors gemessen wird, kann eine En-Reduktase-Aktivität somit nicht eindeutig nachgewiesen werden. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde eine präparative Biotransformation des Nitroalkens **5c** in Anwesenheit der Bsp-GDH aber Abwesenheit der En-Reduktase durchgeführt. Dabei wurde kein Umsatz zu **3c** beobachtet (Abbildung 62). Zusammenfassend kann eine Konkurrenzreaktion der Bsp-GDH mit **5c** und damit der Bsp-GDH-Enzymformulierung als Ursache für geringe Enantioselektivitäten, die durch eine Konkurrenzreaktion verursacht werden, ausgeschlossen werden. Die photometrisch bestimmte Aktivität der Bsp-GDH wird einer im Lyophilisat enthaltenen Alkoholdehydrogenase zugeordnet.



**Abbildung 62.** Test der Bsp-GDH-Hintergrundaktivität in präparativem Maßstab

## 4.9 Erhöhung der Substratkonzentration

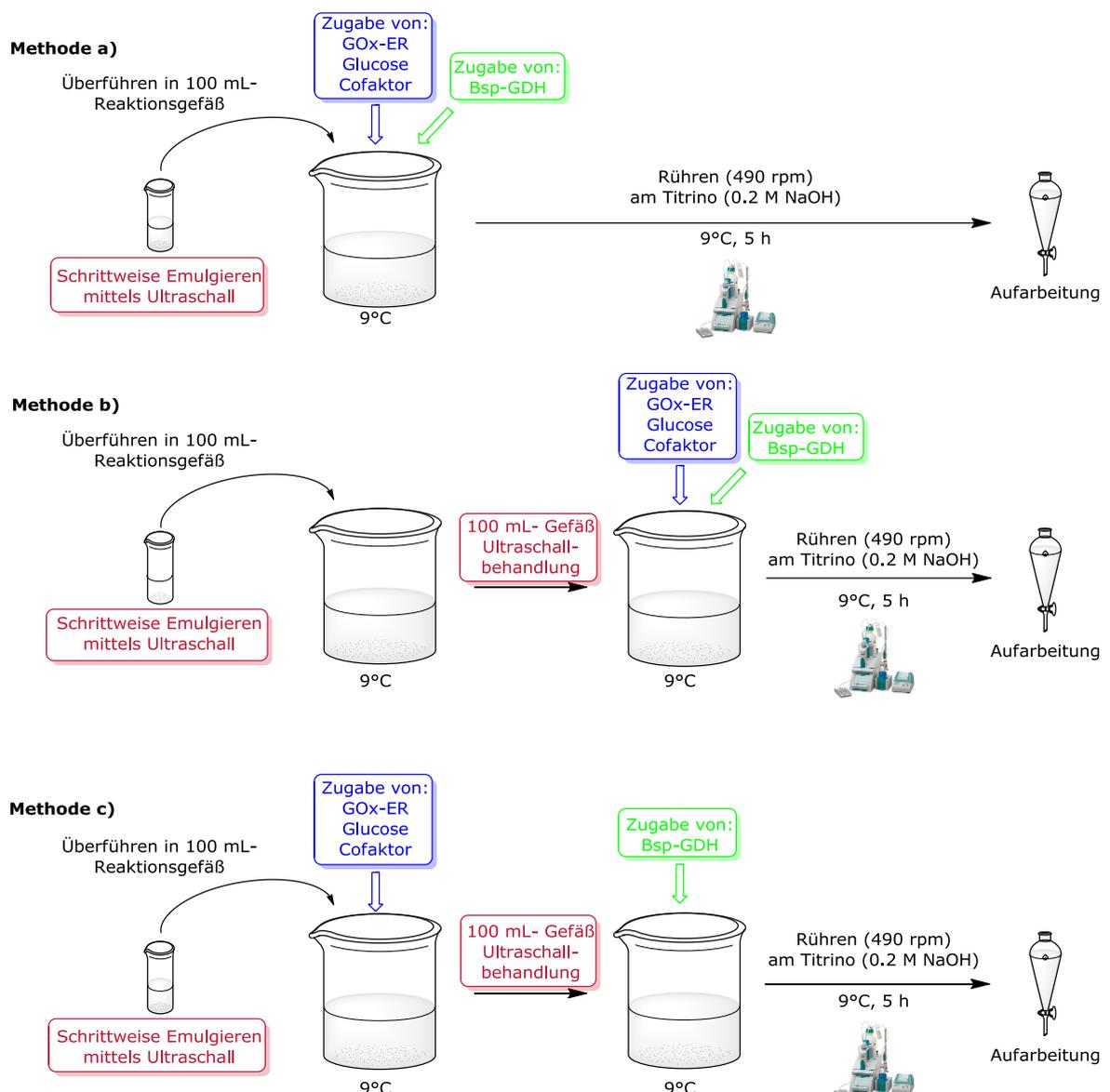
Die bisher eingesetzte Substratkonzentration für die Nitroalken-Reduktionen beträgt 10 mM, was je nach Substitutionsmuster der eingesetzten Verbindung (Abschnitt 4.5) 1.6 g/L (**5d**) bis 2.9 g/L (**5e**) entspricht. Für eine mögliche, industrielle Anwendung von biokatalytischen Systemen im großen Maßstab sollte die Substratkonzentration bei > 100 g/L liegen,<sup>[135]</sup> allerdings sind die Nitroalkene schlecht im wässrigen Reaktionsmedium löslich. Das Emulgieren bzw. Suspendieren des Nitroalkens in Puffer mittels Ultraschall stellt dabei eine Möglichkeit dar, das Substrat besser zu verteilen und somit dem Enzym besser zugänglich zu machen. Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz von Cosolventien, um die Löslichkeit des Nitroalkens zu erhöhen. In beiden Fällen muss darauf geachtet werden, dass die beteiligten Enzyme in ihrer Funktion und Selektivität nicht eingeschränkt werden.

### 4.9.1 Prozessoptimierung: Anpassen der Ultraschallbehandlung

Die Verwendung von Ultraschall zur Erhöhung der Löslichkeit der Nitroalkene wurde bereits im Rahmen früherer Arbeiten angewandt,<sup>[17]</sup> allerdings wurde diese Möglichkeit bisher nicht vollends ausgeschöpft. Bekannt ist, dass die En-Reduktase aus *G. oxydans* gegenüber einer Ultraschallbehandlung stabil ist und nicht an Aktivität verliert, und dass die Glucosedehydrogenase aus *Bacillus* sp. (Amano) deutlich an Aktivität verliert und deshalb nach einer Ultraschallbehandlung erneut zugegeben werden muss. Die Auswirkung auf die Enantioselektivität wurde bisher nicht berücksichtigt.<sup>[17]</sup>

Die bisherige Verwendung des Ultraschalls beschränkte sich auf den Einsatz zur verbesserten Suspension- bzw. Emulsionsbildung des Nitroalkenes in Puffer. Hierzu wurde das Nitroalken **5b** in einem kleinen Gefäß in Puffer mittels Ultraschall emulgiert, die Emulsion in ein großes

Gefäß überführt und die Reaktion durch Zugabe aller weiterer Komponenten (En-Reduktase, Glucose, Cofaktor und Bsp-GDH) gestartet. Die Aufarbeitung durch Extraktion erfolgte nach einer Reaktionszeit von 5 h bei 9°C (Abbildung 63 Methode a). Da das große Gefäß ebenfalls zum Temperieren verwendet wird, ist es möglich, dass die verringerte Temperatur die Löslichkeit des Nitroalkens wieder reduziert. Bis zur Zugabe aller weiteren Reaktionskomponenten ist somit ein Teil des Nitroalkens aus der Emulsion wieder abgeschieden. Wird zusätzlich eine Ultraschallbehandlung des großen Reaktionsgefäßes kurz vor Zugabe der weiteren Komponenten durchgeführt, wird die Dauer der Ultraschallbehandlung verlängert und somit die Durchmischung weiter erhöht (Abbildung 63 Methode b).



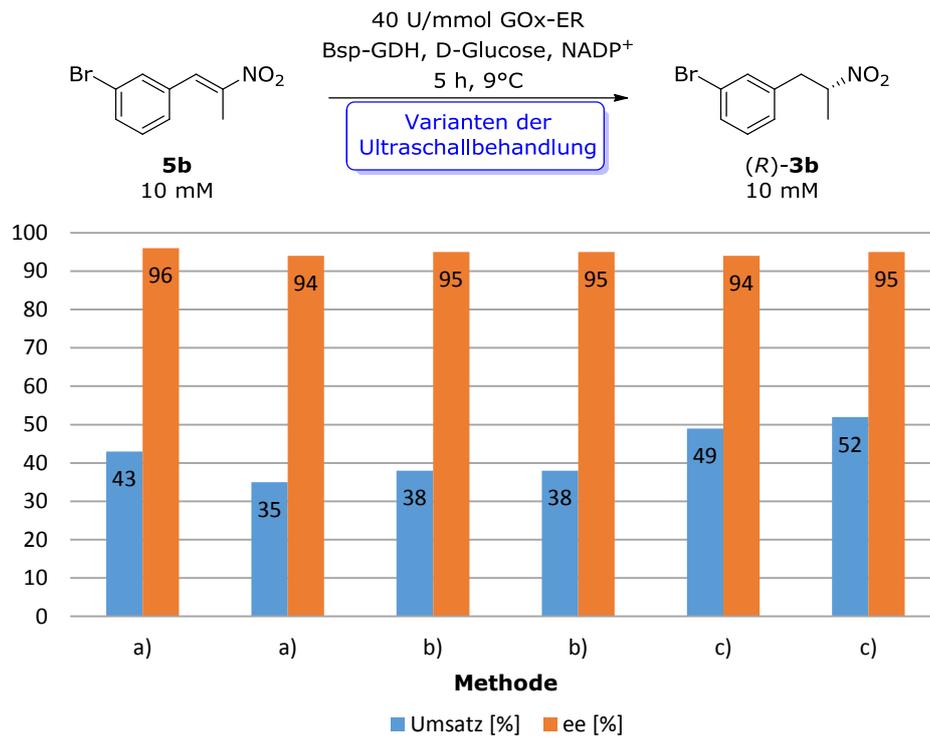
**Abbildung 63.** Prozessoptimierung durch Anpassen der Ultraschallbehandlung

Da die En-Reduktase aus *G. oxydans* durch die Ultraschallbehandlung nicht an Aktivität verliert,<sup>[17]</sup> kann diese bereits vor der zweiten Ultraschallbehandlung zur Reaktionsmischung gegeben werden. Dies hat den Vorteil, dass die Enzymformulierung als zusätzlicher Emulgator wirken kann und somit die Löslichkeit weiter erhöht wird. Die für das Cofaktorregenerierungssystem notwendige Glucose und der Cofaktor können ebenfalls vor der Ultraschallbehandlung des Reaktionsgefäßes zugegeben werden, lediglich Bsp-GDH muss erst im Anschluss an die Ultraschallbehandlung zugegeben werden, da diese durch Ultraschall deaktiviert wird<sup>[17]</sup> (Abbildung 63 Methode c).

Das Emulgieren des Nitroalkens **5b** in Puffer mittels Ultraschall resultiert in einer milchig-trüben Emulsion. Mit bloßem Auge ist nicht erkennbar, ob der Grad der Trübung bzw. Durchmischung durch den zusätzlichen Ultraschallschritt in Methode b zunimmt. Die Zugabe der En-Reduktase vor der Ultraschallbehandlung des Reaktionsgefäßes führt zu einer dunkleren Färbung des Gemisches, was zum einen auf die gelbe Farbe des Proteins und zum anderen auf einen erhöhten Emulsionsgrad zurückgeführt werden kann. Um die Effektivität der drei Methoden miteinander vergleichen zu können, werden die Umsätze sowie die erhaltenen ee-Werte nach 5 h Reaktionszeit miteinander verglichen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die zusätzliche Ultraschallbehandlung des großen Reaktionsgefäßes keine deutliche Steigerung des Umsatzes mit sich bringt (Abbildung 64). Die Umsätze schwanken für die Verwendung der Ultraschallmethode a) (Doppelbestimmung, Umsätze bei 35% und 43%), die Umsätze für Methode b) liegen mit 38% allerdings innerhalb dieses Bereiches. Eine Erhöhung des Suspensionsgrades durch eine verlängerte Ultraschallbehandlung, welcher sich in einem erhöhten Umsatz auswirken sollte, scheint somit nicht erreicht zu werden. Auf die Selektivität der Reaktion hat dieses Verfahren keinen Einfluss, es werden gleichbleibend hohe Enantioselektivitäten von 94-95% ee erhalten.

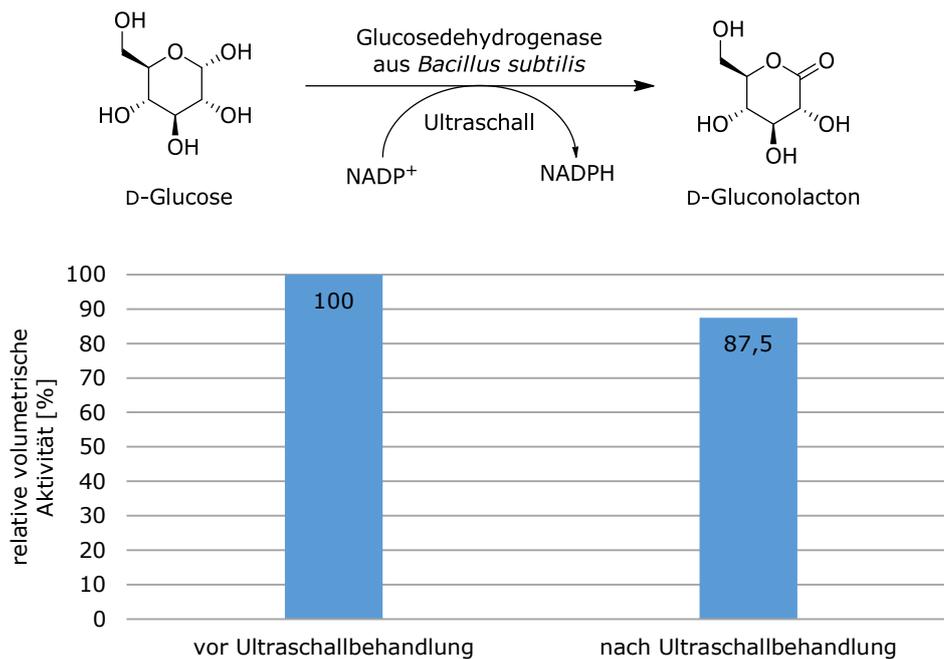
Die Zugabe der En-Reduktase vor der Ultraschallbehandlung des Reaktionsgefäßes (Methode c)) führt zu einer Erhöhung des Umsatzes auf 49-52%. Die Enantioselektivität des Enzyms bleibt davon unbeeinflusst, der ee-Wert liegt weiterhin bei 94-95%. Die emulgierende Wirkung des Enzyms führt somit zu einer weiteren Erhöhung des Umsatzes, wobei die Selektivität ebenfalls erhalten bleibt. Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass durch die Prozessoptimierung der Umsatz deutlich erhöht werden kann, und zum anderen, dass die En-Reduktase aus *G. oxydans* durch eine Ultraschallbehandlung weder Aktivität noch Selektivität verliert.



**Abbildung 64.** Ergebnisse zur Prozessoptimierung durch Anpassen der Ultraschallbehandlung gemäß Abbildung 63

Eine weitere im Rahmen dieser Arbeit verwendete Glucosedehydrogenase aus *B. subtilis* (Bsu-GDH, HUMMEL) wurde auf die Stabilität gegenüber einer Ultraschallbehandlung getestet (Abbildung 65). Hierzu wurde die von HUMMEL zur Verfügung gestellte Enzymformulierung auf die Glucosedehydrogenase-Aktivität gegenüber D-Glucose getestet, indem mittels Photometer die Zunahme der NADPH-Konzentration während der Oxidation von D-Glucose zu D-Gluconolacton ermittelt wurde. Aus der Anfangssteigung der Absorptionskurve wurde die Aktivität berechnet. Anschließend wurde die Enzymformulierung mittels Ultraschall behandelt und dann erneut auf die Aktivität hin untersucht. Nach der Ultraschallbehandlung wurde eine Restaktivität von 87.5% ermittelt.

Dies zeigt, dass Bsu-GDH nur einen leichten Aktivitätsverlust durch die Ultraschallbehandlung erfährt, und somit schon von Beginn an dem Reaktionsgemisch als Alternative zur Bsp-GDH zugesetzt werden kann.



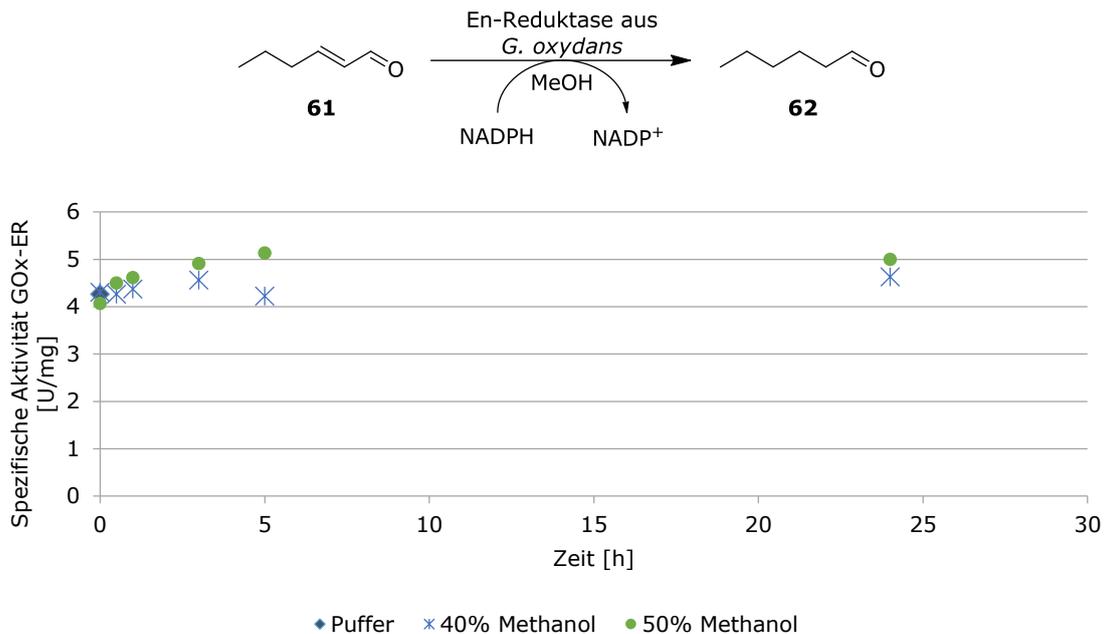
**Abbildung 65.** Untersuchung zur Stabilität der Glucosedehydrogenase aus *Bacillus subtilis* (Bsu-GDH)

#### 4.9.2 Prozessoptimierung: Einsatz organischer Lösungsmittel

##### 4.9.2.1 Spektrophotometrische Untersuchungen zum Einfluss organischer Lösungsmittel auf GOx-ER, Bsp-GDH und Bsu-GDH

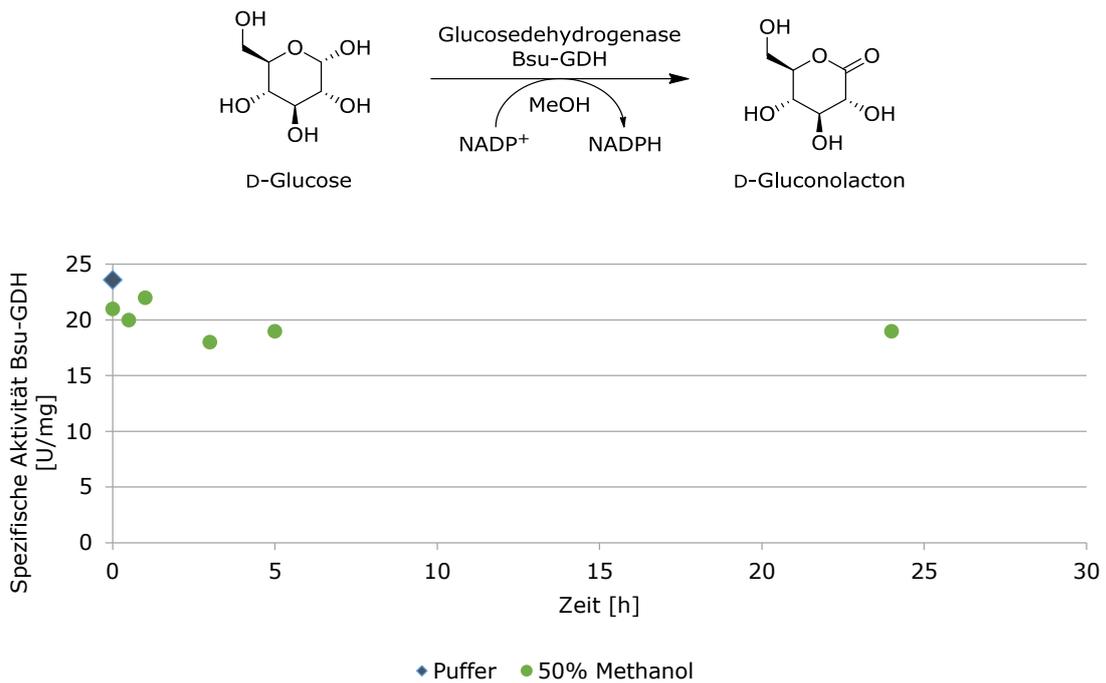
Um den möglichen Einsatz organischer Lösungsmittel bei der biokatalytischen Reduktion mittels GOx-ER zu verifizieren, wurde das Verhalten der En-Reduktase gegenüber Methanol im Rahmen einer Photometerstudie untersucht. Dabei ist von GRUB bekannt, dass GOx-ER stabil gegenüber Methanolkonzentrationen von bis zu 10% ist.<sup>[20]</sup> Aufbauend darauf wurde die Stabilität gegenüber höherer Konzentrationen getestet. Das Enzym (1 mg des gereinigten Enzyms) wurde für 24 h in einer MeOH/Puffer Mischung (1 mL) inkubiert, die Aktivität nach der Inkubationszeit wurde spektrophotometrisch durch die Abnahme des Cofaktors in Gegenwart von *trans*-2-Hexenal (**61**) bestimmt. Im Vorfeld wurde mittels BRADFORD-Assay der Proteingehalt der verwendeten Enzymprobe bestimmt, um die Entwicklung der spezifischen Aktivität über die Zeit zu verfolgen. Es ist zu beachten, dass die Messung der Aktivität jeweils in reinem Puffer stattfindet. Die vorliegenden Photometerstudien beschreiben demnach die Stabilität des Enzyms im entsprechenden Puffer/Methanol-Gemisch. Mögliche inhibitorische Effekte des Methanols auf die Enzymaktivität können mit der gewählten Methode nicht bestimmt werden, da diese, zum Zeitpunkt der Messung in reinem Puffer nicht erfasst werden

können. Es zeigt sich eine Stabilität der En-Reduktase gegenüber 50% Methanol über einen Zeitraum von 24 h. Die gemessene Aktivität zum Zeitpunkt 0 ist unabhängig davon, ob das Enzym in Phosphatpuffer oder einer Puffer/Methanol-Mischung gelöst ist (4.3 U/mg in Phosphatpuffer, 4.1 U/mg in 50% Methanol, Abbildung 66). Nach der Inkubation in 50% Methanol wird eine gleichbleibend hohe Aktivität für die En-Reduktase bestimmt (5 U/mg), was die Stabilität des Enzyms unter den gewählten Bedingungen beweist.

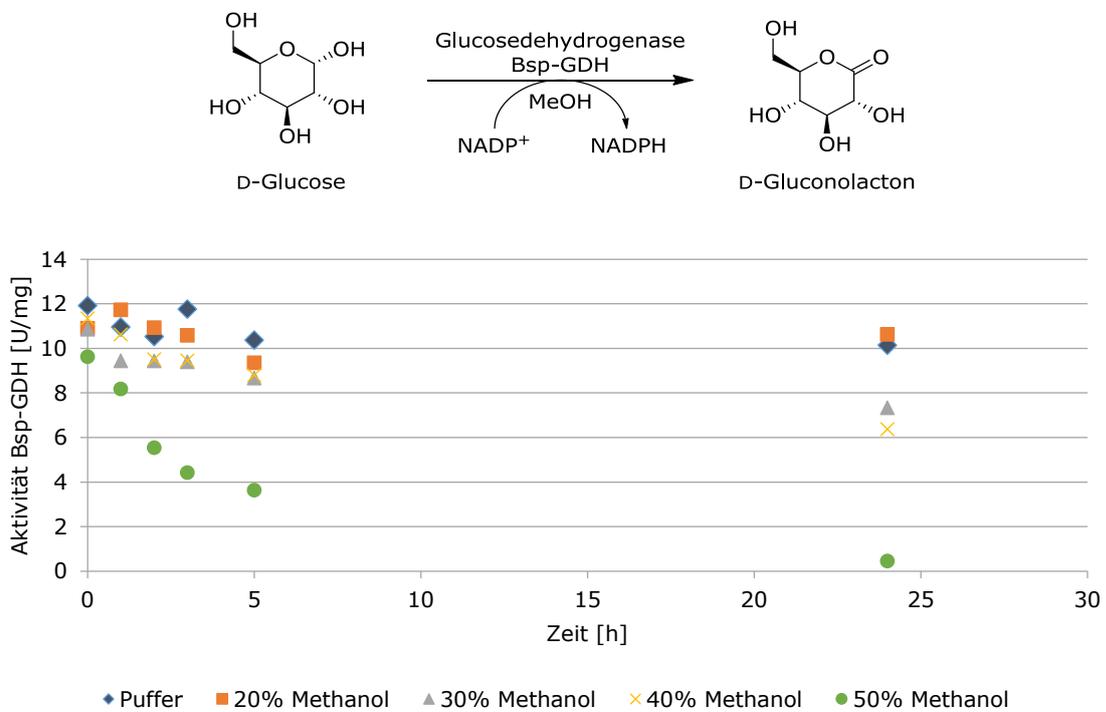


**Abbildung 66.** Stabilität der En-Reduktase aus *G. oxydans* gegenüber Methanol

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Glucosedehydrogenasen aus *Bacillus* sp. (Bsp-GDH, Amano) und aus *Bacillus subtilis* (Bsu-GDH, zur Verfügung gestellt von HUMMEL) verwendet. Die beiden GDHs wurden in analoger Vorgehensweise auf die Stabilität gegenüber Methanol untersucht. Dabei zeigte sich, dass Bsu-GDH eine Stabilität gegenüber 50% Methanol über einen Zeitraum von mindestens 24 h aufweist (Abbildung 67), weshalb diese bei Methanol-Konzentrationen in dieser Größenordnung zur Cofaktorregenerierung eingesetzt werden kann. Die Bsp-GDH zeigt in Gegenwart von 20% Methanol eine im Vergleich zur Inkubation in reinem Puffer gleichbleibend hohe Aktivität über einen Zeitraum von 24 h (Abbildung 68). Bei Methanol-Konzentrationen von 30% und 40% bleibt Bsp-GDH über einen Zeitraum von 24 h aktiv, jedoch sinkt die Aktivität um etwa 30%. Ab einer Methanolkonzentration von 50% sinkt die Aktivität bereits innerhalb der ersten 5 h um etwa 60%, nach 24 h ist nur noch eine minimale Restaktivität von etwa 5% nachweisbar.



**Abbildung 67.** Stabilität der Glucosedehydrogenase aus *B. subtilis* gegenüber Methanol



**Abbildung 68.** Stabilität der Glucosedehydrogenase aus *B. sp.* gegenüber Methanol

Die Ergebnisse dieser Stabilitätsversuche zeigen, dass Bsu-GDH eine erhöhte Stabilität gegenüber Methanol aufweist. Die En-Reduktase GOx-ER scheint Methanol-Konzentrationen von bis zu 50% zu tolerieren, eine Kombination von GOx-ER und Bsu-GDH scheint daher sinnvoll. Bsp-GDH zeigt bis zu einer Methanolkonzentration von 40% eine relativ hohe Stabilität, in Gegenwart von 50% Methanol sinkt die Stabilität jedoch innerhalb der ersten Stunden deutlich. Es muss bedacht werden, dass die hier durchgeführten Photometerstudien zwar einen Einblick in die Stabilität der Enzyme gewähren, über die Aktivität unter Reaktionsbedingungen jedoch keine Aussage zulassen. Die Inkubation der Enzyme erfolgt im Puffer/Methanol-Gemisch, die Aktivitätsmessungen erfolgen dann in reinem Puffer. Die Ergebnisse müssen in jedem Fall in präparativen Tests verifiziert werden um eine gültige Aussage treffen zu können (Abschnitt 4.9.2.2).

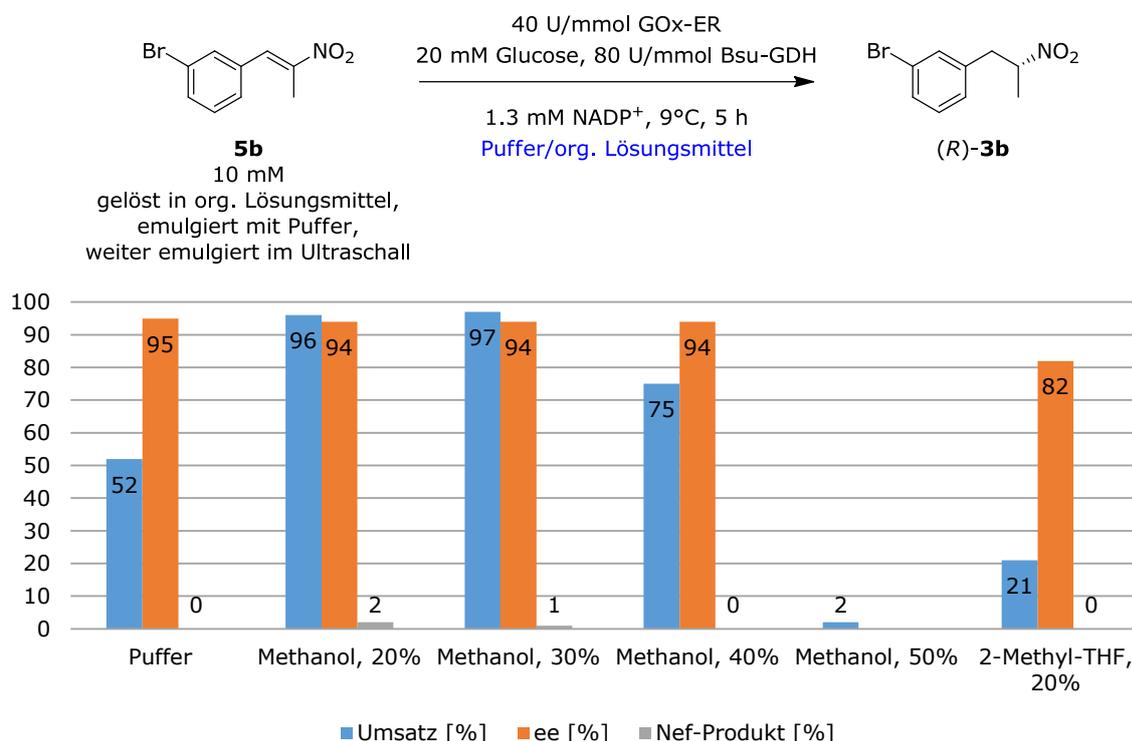
#### 4.9.2.2 Einsatz organischer Lösungsmittel im semi-präparativen Maßstab

Da der Photometertest nur Aussagen über die Stabilität gegenüber Methanol, aber nicht die Aktivität unter Reaktionsbedingungen sowie den Erhalt der Enantioselektivität zulässt, müssen die Ergebnisse im präparativen Maßstab verifiziert werden. Bei einem Reaktionsvolumen von 25 mL wurde das Nitroalken **5b** über einen Zeitraum von 5 h mittels GOx-ER und *in situ*-Cofaktroregenerierung mittels Bsu-GDH bei einer variablen Methanol-Konzentration von 20-50% umgesetzt. Da von GRUB<sup>[20]</sup> bekannt ist, dass sich für die Umsetzung des in *meta*-Position Iod-substituierten Nitroalkens (**5e**) 2-Methyl-THF als organisches Lösungsmittel eignet, wurde dieses ebenfalls im präparativen Maßstab getestet (Abbildung 69).

Das Emulgieren des Substrats **5b** mittels Ultraschall wurde nach der in Abschnitt 4.9.1 optimierten Ultraschallmethode (Methode c)) durchgeführt. Bereits ab der Anwesenheit von 20% Methanol lag eine milchig-trübe Emulsion bereits vor der Ultraschallbehandlung vor. Ein unterschiedlicher Grad der Trübung bei unterschiedlichen Methanolkonzentrationen konnte mit bloßem Auge nicht bestimmt werden, qualitativ konnte der Nutzen von Methanol für eine bessere Emulsionsbildung bestätigt werden. Eine Biotransformation in reinem Puffer unter optimierten Ultraschallbedingungen führt nach 5 h (und der Verwendung von Bsp-GDH) zu einem Umsatz von 52% und einem ee-Wert von 95%. Der Umsatz nach 5 h liegt bei Methanol-Konzentrationen von 20% und 30% bei > 95%, diese beiden Konzentrationen wirken sich deutlich positiv auf den Reaktionsverlauf aus. Bei 40% Methanolanteil ist bereits eine Verringerung des Umsatzes auf 75% zu beobachten, bei einem Methanolanteil von 50% kommt die Reaktion zum Erliegen, es wird keine Restaktivität mehr festgestellt. Die Bildung des NEF-Produktes (**59b**) als Konkurrenzreaktion ist in allen Fällen sehr gering und stellt somit kein Problem für die Anwendung dar. Im Fall von 20% 2-Methyl-THF wird ein deutlich geringerer Umsatz von 21% erreicht, die Enantioselektivität ist in diesem Fall ebenfalls deutlich geringer:

(*R*)-**3b** kann lediglich mit 82% ee erhalten werden. Die Verwendung von 2-Methyl-THF scheidet somit für dieses Substrat aus.

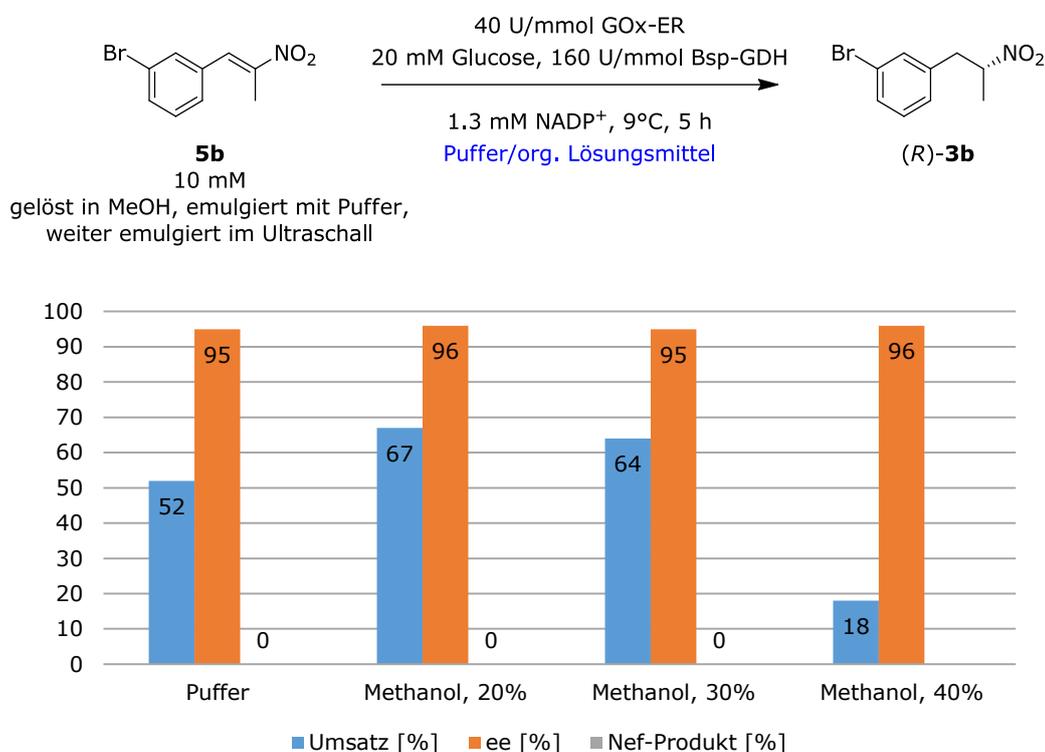
Zusätzlich zeigen diese Ergebnisse, dass von der gemessenen Stabilität der Enzyme gegenüber Methanol in der Photometerstudie nicht auf die Aktivität des Enzyms während des Reaktionsverlaufs geschlossen werden kann. Während die Enzyme bis zu 50% Methanol stabil bleiben (Abschnitt 4.9.2.1), sinkt die Aktivität deutlich ab einer Methanolkonzentration von 40%. Dies kann beispielsweise auf inhibitorische Effekte von Methanol zurückgeführt werden, welche zwar das Enzym nicht denaturieren, seine Aktivität jedoch deutlich einschränken.



**Abbildung 69.** Abhängigkeit der Enzymaktivität und -selektivität von GOx-ER und Bsu-GDH in Anwesenheit organischer Lösungsmittel (der Versuch „Puffer“ wurde mit Bsp-GDH durchgeführt)

Die Versuche wurden analog mit der Glucosedehydrogenase aus *Bacillus* sp. (Bsp-GDH) bei Methanolkonzentrationen von 20%, 30% und 40% durchgeführt (Abbildung 70). Die Umsätze nach 5 h bei Methanolkonzentrationen von 20% und 30% unterscheiden sich nur minimal voneinander (67% Umsatz bei 20% Methanol, 64% Umsatz bei 30% Methanol), liegen aber deutlich über dem Umsatz der bei einer Biotransformation in reinem Puffer erreicht wird (52%). Bei einer Methanolkonzentration von 40% ist bereits eine deutliche Abnahme des Umsatzes auf 18% nach 5 h zu beobachten. Die Enantioselektivitäten sind in allen Fällen sehr gut bei 95-96% ee, die Bildung des NEF-Produktes konnte in keinem der Versuche nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Verwendung der Bsu-GDH (Abbildung 69) fällt auf, dass die Umsätze bei

Einsatz der Bsp-GDH geringer sind. Da Bsp-GDH in Form eines Lyophilisats eingesetzt wird (in diesen Versuchen 1 mg / 25 mL) und Bsu-GDH als zellfreier Rohextrakt (in diesen Versuchen 1.25 mL / 25 mL), wird dies auf die zusätzlich emulgierende Wirkung durch das erhöhte Volumen der Enzymlösung Bsu-GDH zurückgeführt (vgl. Abschnitt 4.9.1).



**Abbildung 70.** Abhängigkeit der Enzymaktivität und -selektivität von GOx-ER und Bsp-GDH in Anwesenheit organischer Lösungsmittel

Die Ergebnisse der Photometerstudien, welche Aufschluss über die Stabilität der verwendeten Enzyme lieferten, wurden durch die präparativen Ansätze weiter verifiziert. Während die Enzymstabilitäten der Bsp-GDH und GOx-ER bis zu Methanolkonzentrationen von 40% gegeben ist, verringern sich die Enzymaktivitäten deutlich ab einer Methanolkonzentration von 40%. Ob dieser Effekt nur auf eines der beiden, oder beide Enzyme zutrifft, konnte im Rahmen dieser Versuche nicht bestimmt werden. Generell muss durch die vorliegenden Ergebnisse eine Enzyminhibierung durch das verwendete Lösungsmittel in Betracht gezogen werden. Da erst ab 40% Methanol ein negativer Effekt beobachtet wurde, ist für eine Umsetzung von **5b** im präparativen Maßstab eine Methanolkonzentration von 30% sehr vielversprechend.

Da sowohl für den Einsatz der Bsp-GDH als auch die Verwendung der Bsu-GDH eine optimale Methanolkonzentration von 30% festgestellt wurde, können die beiden Glucosedehydrogenasen für diesen Methanolanteil als äquivalent betrachtet werden.

### 4.9.3 Anpassen der Enzymkonzentration bei geeigneter Ultraschallbehandlung und organischem Lösungsmittel im semi-präparativen Maßstab

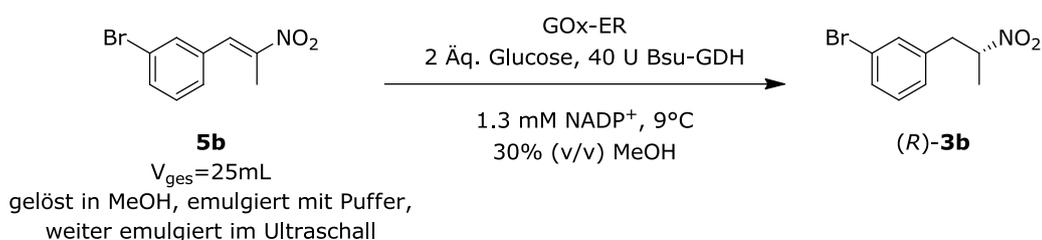
Mit der Anpassung der Ultraschallbehandlung (Abschnitt 4.9.1) sowie dem Einsatz von 30% Methanol (Abschnitt 4.9.2) zur biokatalytischen Reduktion von **5b** wurden zwei Möglichkeiten zur Optimierung der Reaktion aufgezeigt. Die Kombination dieser beiden Methoden soll die Löslichkeit des Nitroalkens und somit die Umsatzraten und möglichen Substratkonzentrationen weiter erhöhen. Gleichzeitig ist eine Verringerung der eingesetzten Enzymmenge ein Faktor, der die Ökonomie eines Prozesses erhöht, da durch Einsparen von Katalysatormengen Kosten minimiert werden können. Für industriell nutzbare biokatalytische Prozesse sollte das Verhältnis der Massen Substrat : Enzym (S:E) bei >50 liegen.<sup>[135]</sup>

Die Reduktion des Nitroalkens **5b** bei einer Substratkonzentration von 10 mM mittels GOx-ER verläuft in Puffer unter Verwendung der optimierten Ultraschallbehandlung mit 52% Umsatz und 95% ee bei einer Reaktionszeit von 5 h bei 9°C (Tabelle 10, Eintrag 1). Die Verwendung von 30% Methanol im Reaktionsgemisch verdoppelt den Umsatz bei analogen Reaktionsbedingungen auf 97%, bei gleichbleibender Enantioselektivität von 94% ee (Tabelle 10, Eintrag 2). Die Erhöhung der Substratkonzentration auf 50 mM bei gleichbleibender absoluter Enzymmenge reicht jedoch nicht aus, um ähnlich gute Ergebnisse zu erzielen, der Umsatz sinkt auf 25% (Tabelle 10, Eintrag 3). Die verringerte Enzymmenge kann jedoch durch Verlängern der Reaktionszeit ausgeglichen werden: Über einen Zeitraum von 24 h wurde der Umsatz von 25% auf 82% erhöht (Tabelle 10, vgl. Einträge 3 und 4). Außerdem wurde ein günstiges S:E-Verhältnis > 50 (hier S:E = 59, Eintrag 4) erreicht. Die Enantioselektivitäten bleiben hoch und liegen bei 94-95% ee, während die Reaktionen nicht mit vollständigem Umsatz ablaufen. Dies ist konsistent mit der Vermutung, dass in Gegenwart des Nitroalkens die Racemisierung unterdrückt und somit ein hoher ee-Wert erhalten wird (Abschnitt 4.7.3). Da in allen Fällen noch Nitroalken vorhanden ist, unterstützt dies die These. Überraschenderweise zeigte sich außerdem, dass eine lange Reaktionszeit nicht den in früheren Arbeiten vermuteten<sup>[17,19]</sup> negativen Effekt auf die Enantioselektivität hat. Bei einer Reaktionszeit von 24 h bleibt die optische Reinheit des Produktes hoch bei 94% ee. Unter der Annahme, dass die Racemisierung in Anwesenheit des Nitroalkens unterdrückt wird, hat die Reaktionszeit demnach keinen Einfluss auf die Enantioselektivität der Reaktion, solange die Konzentration des Alkens hoch genug ist um die Bindung des Enzyms an das Alkan zu unterdrücken.

Eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration auf 100 mM bei gleichbleibender absoluter Enzymmenge (bzw. entsprechend Halbierung der relativen Enzymmenge auf 4 U/mmol, Tabelle 10, Eintrag 5) verringert den Umsatz wieder auf 48%. In diesem Konzentrationsbereich des Substrates scheint auch eine weitere Erhöhung auf 8 U/mmol keinen positiven Einfluss auf den Umsatz zu haben (Tabelle 10, vgl. Einträge 5 und 6). Allerdings fällt auf, dass bei einer

Substratkonzentration von 100 mM das Nitroalken **5b** nicht vollständig emulgiert werden kann. Zusätzlich zur Emulsion bildet sich eine Nitroalken-Phase im Gemisch aus. Die Erhöhung der Substratkonzentration durch Methanolzugabe stößt bei den in Versuch 5 bzw. 6 verwendeten Enzymmengen an ihre Grenzen.

**Tabelle 10.** Anpassung der Enzymkonzentration bei geeigneter Ultraschallbehandlung und in Anwesenheit von Methanol



Eintrag	MeOH [%]	c ( <b>5b</b> ) [mM]	t [h]	GOx-ER [U/mmol]	Umsatz zu ( <b>R</b> )- <b>3b</b> [%]	Umsatz zu NEF-Produkt <b>59b</b> [%]	ee [%]
<b>1</b> <sup>a)</sup>	0	10	5	40 <sup>b)</sup>	52	0	95
<b>2</b>	30	10	5	40 <sup>b)</sup>	97	1	94
<b>3</b>	30	50	5	8 <sup>c)</sup>	25	1	95
<b>4</b>	30	50	24	8 <sup>c)</sup>	82	1	94
<b>5</b>	30	100	24	4 <sup>d)</sup>	48	1	93
<b>6</b>	30	100	24	8 <sup>c)</sup>	53	0	95

a) V<sub>ges</sub> = 100 mL, 160 U/mmol Bsp-GDH, Vergleichsversuch aus Abschnitt 4.9.1 mit den besten Ergebnissen der Ultraschalloptimierung b) S:E = 13, c) S:E = 59, d) S:E = 119

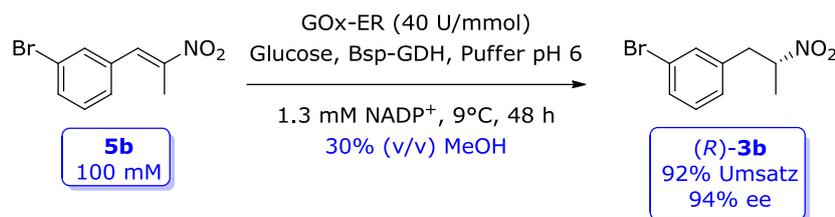
Bei erhöhten Substratkonzentrationen spielt zunehmend die Löslichkeit im Reaktionsmedium eine Rolle. Dabei kann eine erhöhte Substratkonzentration durchaus zu einer geringeren Löslichkeit des Produktes führen, was zu einem Ausfällen des Produktes führen würde. Ab welcher Nitroalkenkonzentration ein solcher Effekt stattfindet und ob er überhaupt stattfindet, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Er stellt jedoch eine mögliche Erklärung dafür dar, dass das Nitroalken dem Reaktionsgemisch und damit auch der Racemisierung durch das Enzym entzogen wird.

Es ist auch denkbar, dass eine Kombination dieser beiden Effekte, nämlich dem Ausfällen des Produktes sowie die Hemmung des Enzyms durch die hohe Substratkonzentration, für die geringe Racemisierung verantwortlich sind.

Zusammengefasst decken sich die in den präparativen Experimenten erzielten Ergebnisse mit den Voruntersuchungen. Es hat sich bestätigt, dass die enzymatischen Komponenten bis mindestens 24 h stabil sind, dass die Aktivität der Enzyme bei einem Anteil von 30% Methanol aktiv sind und dass die Racemisierung des Produktes bei Anwesenheit des Substrates gering bleibt.

#### 4.9.4 Biokatalytische Reduktion von **5b** mittels GOx-ER bei 100 mM Substratkonzentration

Mit den Vorkenntnissen aus Abschnitt 4.9.3 konnte eine präparative Biotransformation mit einer Substratkonzentration von 100 mM in 25 mL Reaktionsvolumen realisiert werden. Die Komponenten Zeit und Enzymmengen bilden wichtige Faktoren beim Entwickeln einer katalytischen Reaktion, allerdings zeigte sich, dass bei einer Substratkonzentration von 100 mM die Enzymmenge erhöht (S:E = 19) und die Reaktionszeit verlängert werden musste (48 h, Abbildung 71). Mit nun nicht mehr den Anforderungen eines industriellen Prozesses entsprechenden Parametern konnte trotzdem ein Umsatz von 92% innerhalb von 48 h erreicht werden. Die optische Reinheit von (*R*)-**3b** bleibt auch über diesen langen Zeitraum mit 94% ee erhalten. Die Substratkonzentration von 100 mM entspricht im Fall von **5b** 24.2 g/L, was einer für industrielle Prozesse erwünschten Konzentration von 100 g/L<sup>[135]</sup> deutlich näher kommt als die bisher publizierten Prozesse.



**Abbildung 71.** Präparative biokatalytische Synthese von (*R*)-**3b** bei einer Substratkonzentration von 100 mM

In Tabelle 10 zeigten die Einträge 5 und 6, dass eine Verdopplung der Enzymmenge (Versuch 5 mit 4 U/mmol und Versuch 6 mit 8 U/mmol) keine Umsatzsteigerung mit sich brachte. Im Vergleich zu Versuch 5 wurde die Enzymmenge hier jedoch auf 40 U/mmol verzehnfacht. Zusätzlich wurde die Reaktionszeit auf 48 h verlängert. Erfreulicherweise konnte gezeigt werden, dass die Reaktion bei 100 mM nicht generell bei einem Umsatz von 50% stoppt. Bei solch hohen Substratkonzentrationen sind jedoch deutlich höhere Enzymmengen nötig. Dies dient zusammenfassend als „proof of concept“, nach dem die biokatalytische Reduktion von Nitroalkenen auch bei einer vergleichsweise hohen Substratkonzentration von 100 mM, in Anwesenheit von 30% Methanol über 48 h bei sehr guter Enantioselektivität von 94% ee durchgeführt werden kann. Die En-Reduktase aus *G. oxydans* erzielt im Vergleich zum wässrigen Reaktionsmedium identisch hohe Enantioselektivitäten auch in Gegenwart von 30% organischem Lösungsmittel, was für zukünftige Arbeiten mit diesem Enzym eine sehr wichtige Fähigkeit im Hinblick auf in Wasser un- oder schwerlösliche Substrate darstellt.

## 5 Synthese von Tamsulosin unter Verwendung einer En-Reduktase aus *M. extorquens*

### 5.1 Stand der Wissenschaft

Bei Tamsulosin ((*R*)-**28**) handelt es sich um einen  $\alpha_1$ -adrenergen Antagonisten, der zur Behandlung benigner Prostatahyperplasie (BPH) eingesetzt wird.<sup>[136]</sup> Die Synthese des Tamsulosin-Racemats wurde 1981 von Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd. patentiert,<sup>[137]</sup> 1987 auf die enantiomerenreine Form ausgeweitet<sup>[138]</sup> und ist heute von Astellas Pharma (ehemals Yamanouchi Pharma, Omnic®) und Boehringer Ingelheim (Alna®) sowie als Generikum (Sandoz, Tamsulosin Sandoz®) gegen benigne Prostatahyperplasie im Handel. Die Synthese des chiralen Intermediates erfolgt unter Einsatz eines chiralen Hilfsauxiliars in stöchiometrischen Mengen über eine reduktive Aminierung von **65** mit (*R*)-Phenylethylamin und anschließender Abspaltung der Hilfsgruppe durch Hydrierung zum freien Amin (*R*)-**66** (Abbildung 72).<sup>[139]</sup> Dieser Schritt verläuft mit einer Diastereoselektivität von 92:8 (*syn:anti*), allerdings hat die Verwendung eines chiralen Auxiliars in stöchiometrischen Mengen, wie hier Phenylethylamin, eine schlechte Atomökonomie zur Folge, da das chirale Auxiliar in der Synthesesequenz wieder abgespalten wird und somit als nicht wiederverwendbares Nebenprodukt verloren geht.

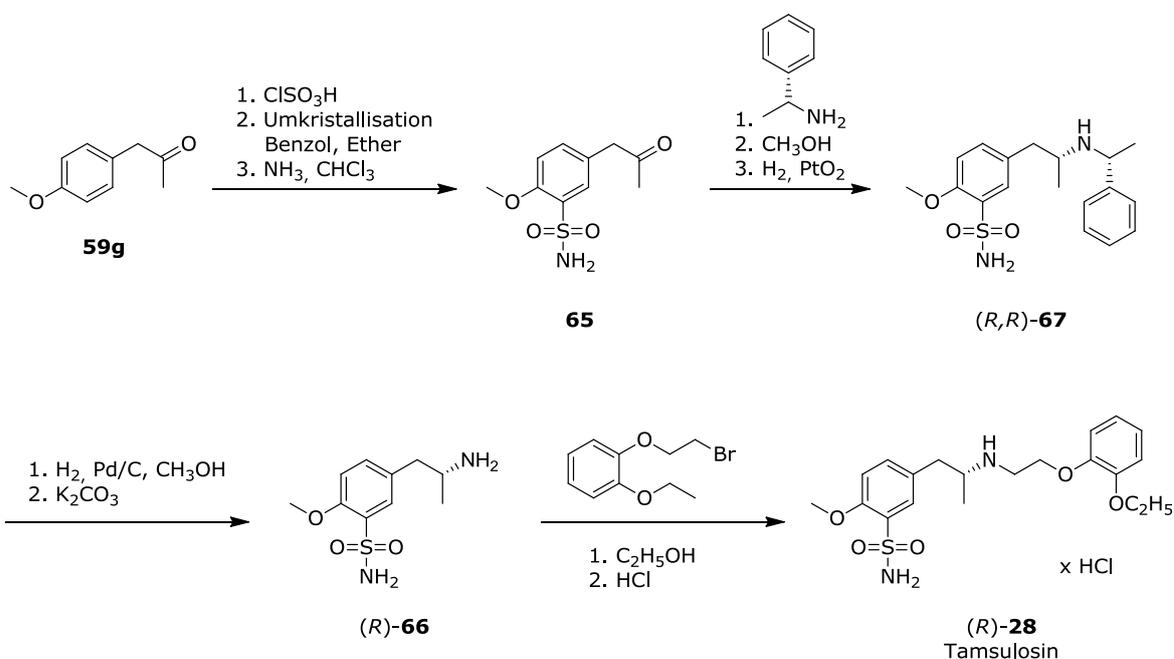
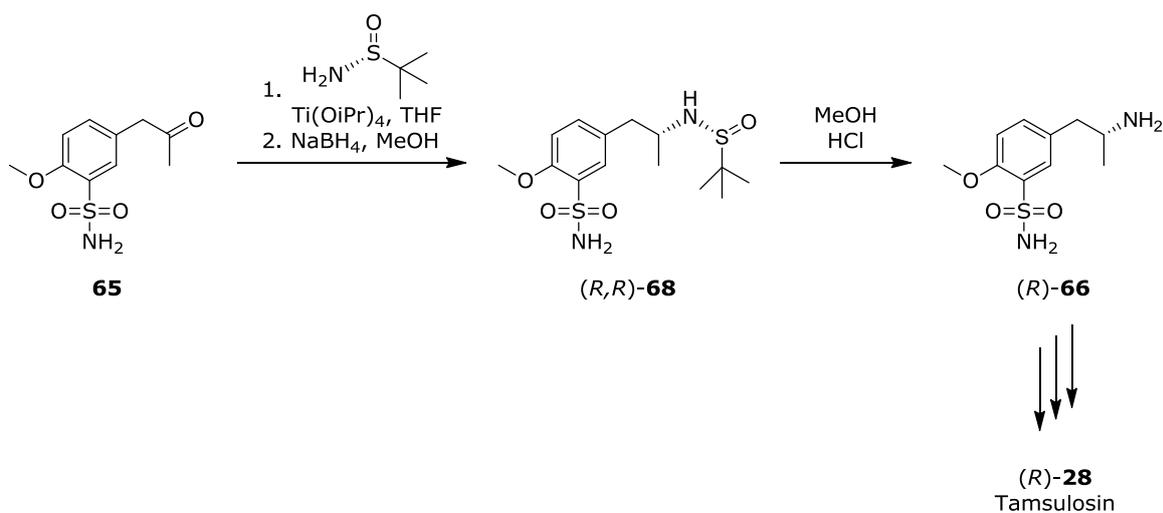


Abbildung 72. Industrielle Synthese von Tamsulosin (Yamanouchi Pharmaceutical, 1987)<sup>[138,139]</sup>

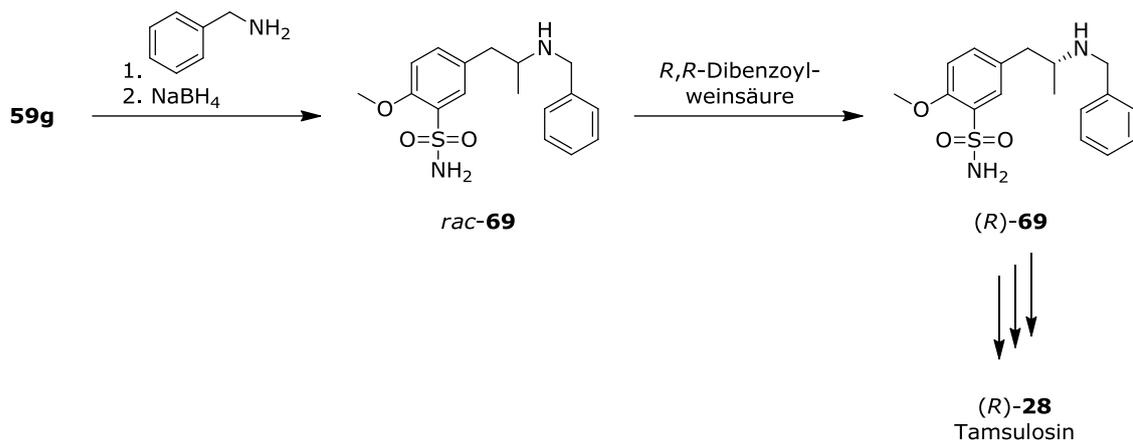
Das Wirkstoffpatent endete 2006 und die Entwicklung neuer Syntheserouten zu Tamsulosin ist Thema einiger Forschungsgruppen. Dabei ist insbesondere das Einführen des chiralen Zentrums interessant, wobei unterschiedliche Strategien zur Synthese chiraler Amine genutzt werden. REDDY *et al.* synthetisierten das Intermediat (*R*)-**66** mit (*R*)-*t*-Butylsulfonamid als Amindonor mit 85% ee, welches durch Umkristallisieren auf >99.5% ee angereichert werden konnte (Abbildung 73).<sup>[140]</sup> Diese Vorgehensweise entspricht der von Yamanouchi Pharmaceutical, da durch die Verwendung eines chiralen Auxiliars das stereogene Zentrum erzeugt wird. Die Nachteile der geringeren Atomökonomie bleiben hier jedoch bestehen.



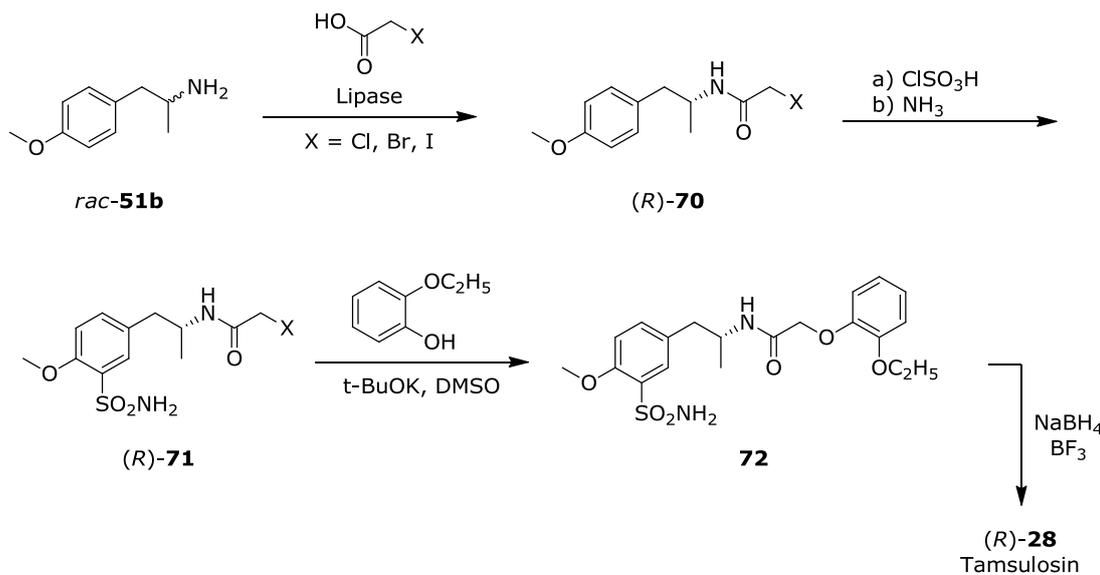
**Abbildung 73.** Synthese einer Tamsulosin-Vorstufe durch die Verwendung eines Sulfonamides (ELLMANN'S-Reagenz)<sup>[141]</sup> als chirales Auxiliar

GIZUR *et al.* berichten über die Synthese eines racemischen Intermediates (*rac*-**69**), welches durch die Versalzung mit einem Weinsäurederivat in das enantiomerenreine Intermediat ((*R*)-**69**) überführt werden konnte (Abbildung 74).<sup>[142]</sup> Die Ausbeute nach solch klassischen Racematspaltungen liegt bei maximal 50% (und bei 33% im genannten Beispiel für (*R*)-**69**),<sup>[142]</sup> was aus ökonomischer Sicht ebenfalls einen bedeutenden Nachteil darstellt.

Der Einsatz von Biokatalysatoren zur Tamsulosin-Synthese wurde beispielsweise von PRIETO und NICOLAU verwirklicht. Durch den Einsatz einer Lipase wurde racemisches 1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanamin (*rac*-**51b**) mit einer Halogenessigsäure zum enantiomerenreinen Intermediat (*R*)-**70** umgesetzt (Abbildung 75).<sup>[143]</sup> Die Ausbeute ist im Fall der enzymatischen Racematspaltung ebenfalls auf 50% begrenzt, allerdings kann im gezeigten Beispiel das acylierte Produkt (*R*)-**70** direkt zur Synthese von Tamsulosin herangezogen werden, ohne eine zusätzlich eingeführte Gruppe wieder abspalten zu müssen. Dies stellt einen Vorteil gegenüber der klassischen Racematspaltung mit Weinsäurederivaten dar. Das Intermediat (*R*)-**70** wird zuerst zum Sulfonamid (*R*)-**71** umgesetzt. Nach einer Substitutionsreaktion wird **72** erhalten welches anschließend durch Reduktion zu Tamsulosin umgesetzt wird.



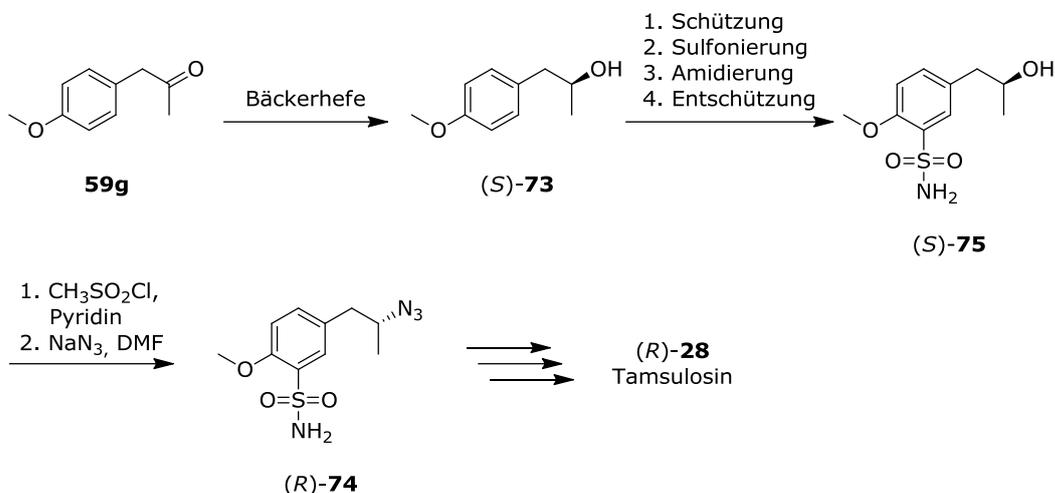
**Abbildung 74.** Synthese einer Tamsulosin-Vorstufe durch Enantiomerentrennung durch die Bildung von Weinsäure-Salzen<sup>[142]</sup>



**Abbildung 75.** Synthese einer Tamsulosin-Vorstufe durch Lipase-katalysierte Racematspaltung<sup>[143]</sup>

Eine weitere biokatalytische Methode wurde von ACETTI *et al.* demonstriert.<sup>[144]</sup> Dabei zeigte die Gruppe, dass die Einführung der chiralen Information nicht zwangsläufig auf der Stufe des Amins durchgeführt werden muss. Die biokatalytische Synthese eines chiralen Alkohols ((*S*)-**73**) mittels Bäckerhefe bildet den Schlüsselschritt zur Erzeugung des chiralen Zentrums, gefolgt von der Überführung in das analoge Azid (*R*)-**74** (Abbildung 76). Die Syntheseroute über den Alkohol birgt aus atomökonomischer Sicht allerdings den Nachteil, dass zum Einführen der Sulfonamidgruppe (*S*)-**75** der Alkohol (*S*)-**73** zuvor geschützt und anschließend wieder entschützt werden muss. Dies sind zwei zusätzliche Schritte, die die Synthese aufwändiger

machen und zusätzlichen Abfall produzieren. Im Vergleich zu den Racematspaltungen bildet diese Methode jedoch den Vorteil, dass die theoretische Ausbeute nicht auf 50% limitiert ist.

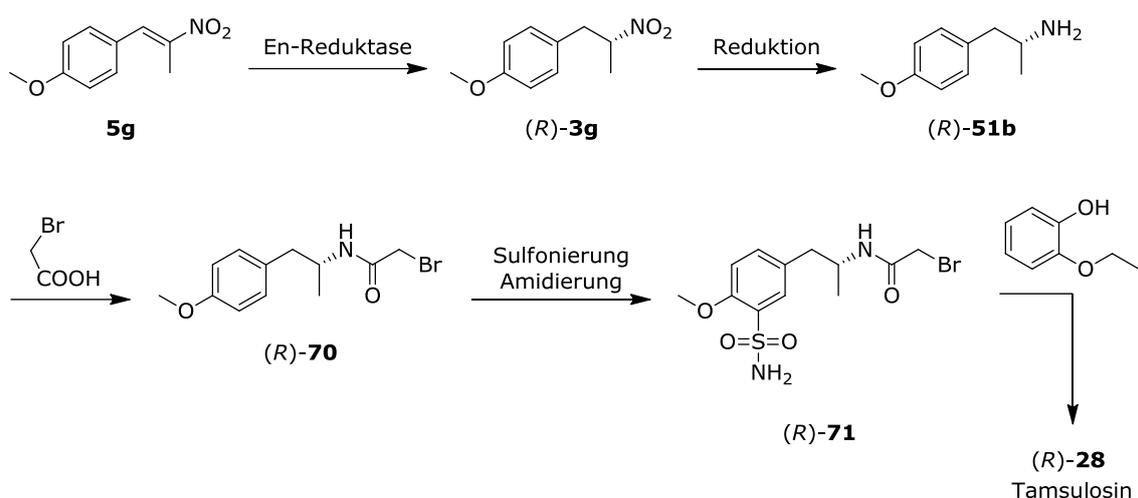


**Abbildung 76.** Synthese einer Tamsulosin-Vorstufe mittels Bäckerhefe <sup>[144]</sup>

Zusammenfassend bietet jede der gezeigten Methoden zur Tamsulosin-Synthese Vor- und Nachteile. Faktoren wie Atomökonomie, Anzahl der Schritte sowie die damit erreichte Enantioselektivität (sowohl durch die Selektivität des Katalysators als auch durch weitere Kristallisationsvorgänge) müssen immer berücksichtigt und gegeneinander aufgewogen werden. Biokatalysatoren bilden trotz potentieller Nachteile eine interessante Ergänzung zu den klassisch chemischen Verfahren.

## 5.2 Zielsetzung und Synthesekonzept

Eine Schwierigkeit in der Tamsulosinsynthese besteht in der Herstellung des Bausteines, der die chirale Information in sich trägt. Die Synthese eines solchen Bausteins kann neben den unter Abschnitt 5.1 beschriebenen Methoden auch durch die Kopplung einer En-Reduktase katalysierten, asymmetrischen Reduktion von **5g** mit einer metallkatalytischen Reduktion der Nitrogruppe zu (*R*)-**51b** erfolgen (Abbildung 77). Die Reaktion weist eine hervorragende Atomökonomie auf, da keinerlei Schutzgruppen, chirale Auxiliare oder ähnliche Hilfsmittel benötigt werden. Durch diese Vorgehensweise könnte das chirale Intermediat mit theoretisch 100% erhalten werden. Das Nitroalken als Startmolekül ist ebenfalls vorteilhaft, das es aus günstigen Ausgangsmaterialien wie Nitroethan und *para*-Methoxy-benzaldehyd synthetisiert werden kann.

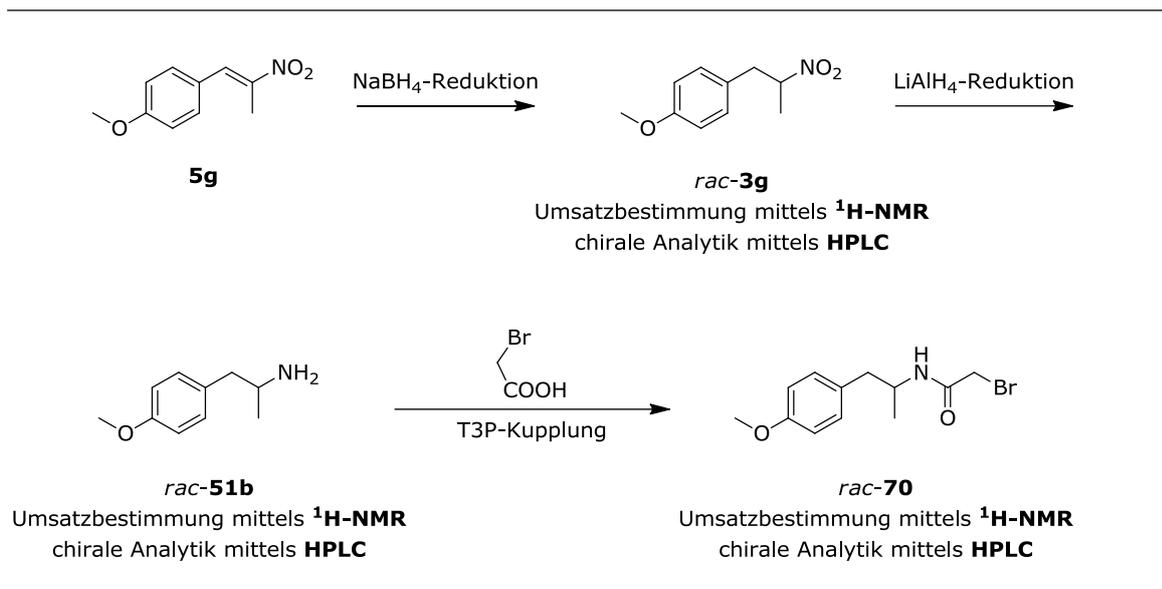


**Abbildung 77.** Synthesekonzept zur Synthese einer Tamsulosin-Vorstufe mittels En-Reduktase

Die anschließende Kopplung des enantiomerenreinen Amins **(R)-51b** mit Bromessigsäure, sowie die darauf folgende Einführung der Sulfonamid-Gruppe zu **(R)-71** und die Umsetzung zu Tamsulosin **(R)-28** ist in der Literatur für alle enantiomerenreinen Verbindungen beschrieben,<sup>[143,145]</sup> sodass sich die folgenden Abschnitte vorwiegend mit der Entwicklung der biokatalytischen Synthese von **(R)-3g** und der anschließenden Nitro-Reduktion zu **(R)-51b** beschäftigen. Die Kombination dieser beiden Syntheseschritte in einem Eintopf-Prozess stellt eine interessante Möglichkeit dar, um Aufarbeitungsschritte sowie anfallende Lösungsmittelabfälle durch Extraktionen oder Waschschriffe zu verringern und soll deshalb ebenfalls untersucht werden.

### 5.3 Synthese der Referenzverbindungen und Entwicklung von Analyse-Methoden

Zur Entwicklung chiraler Analytik-Methoden mittels chiraler HPLC wurden die racemischen Intermediate *rac-3g*, *rac-51b* und *rac-70* der vorgeschlagenen Syntheseroute (Abbildung 77) synthetisiert. Die Darstellung von *rac-3g* erfolgte mittels Natriumborhydrid, die Synthese von *rac-51b* erfolgte durch eine Reduktion von *rac-3g* mittels Lithiumaluminiumhydrid. Die Synthese des Amids *rac-70* erfolgte über die Kupplung von *rac-51b* mit Bromessigsäure mittels T3P als Kupplungsreagenz. Alle Umsetzungen können mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie zur Ermittlung des Umsatzes untersucht werden (Abbildung 78). Es wurden außerdem chirale HPLC-Analytik-Methoden für die Intermediate *rac-3g*, *rac-51b* und *rac-70* entwickelt, die im Folgenden zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses herangezogen werden.

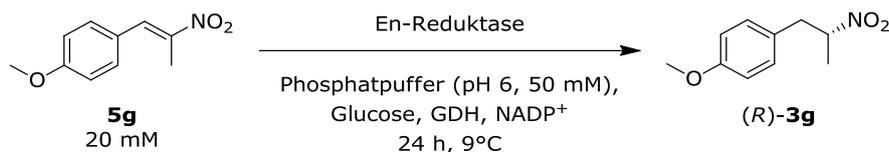


**Abbildung 78.** Synthese von Referenzverbindungen für Vorstufen zur Tamsulosin-Synthese analog zu Abbildung 77

## 5.4 Biokatalytische Reduktion der C=C-Doppelbindung

### 5.4.1 Enzymscreening zur biokatalytischen Reduktion von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**5g**)

Wie in Abschnitt 4.5 gezeigt, reduziert die En-Reduktase aus *G. oxydans* (GOx-ER) das Nitroalken **5g** mit geringer Selektivität (66% ee) verglichen mit *meta*-substituierten Nitroalkenen (bis zu 95% ee). Zudem entsteht bei der Reduktion mittels GOx-ER das NEF-Produkt **59g** zu einem hohen Anteil von 23%, welches dadurch für eine potentielle Folgereaktion verloren geht. Deshalb musste für die biokatalytische Synthese des Nitroalkans (*R*)-**3g** ein Enzymscreening durchgeführt werden, um ein für dieses Substrat hochselektives Enzym zu identifizieren. Die Enzyme für das Screening wurden von HUMMEL zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um eine En-Reduktase aus *Pseudomonas putida* (XenB) und eine aus *Methylobacterium extorquens* (ME-OYE). Beide Enzyme sind rekombinant verfügbar und mit His-Tag versehen, und wurden im Rahmen dieses Screenings in Form eines zellfreien Rohextrakts eingesetzt. Das Nitroalken **5g** wurde mit dem entsprechenden Enzym im 1-mL-Maßstab umgesetzt und nach einer Reaktionszeit von 24 h bei 9°C wurden Umsatz und ee-Wert bestimmt (Tabelle 11).

**Tabelle 11.** En-Reduktase-Screening zur Reduktion von **5g**

Eintrag	Enzym <sup>a)</sup>	Gesamtumsatz [%]	Umsatz zu <b>3g</b> [%]	Umsatz zu NEF-Produkt <b>59g</b> [%]	ee [%]
<b>1</b>	XenB	72	70	2	29
<b>2</b>	ME-OYE	69	68	1	86

a) XenB: En-Reduktase aus *Pseudomonas putida*, N-terminaler His-tag; ME-OYE: En-Reduktase aus *Methylobacterium extorquens*, N-terminaler His-tag

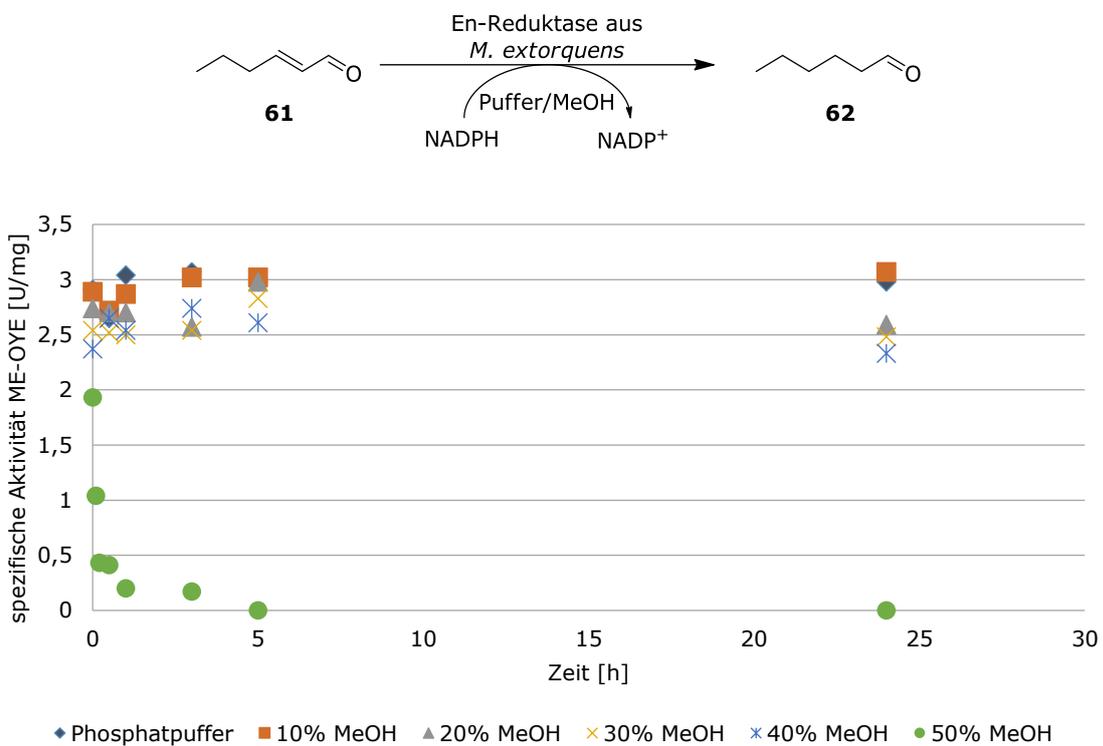
Während die En-Reduktase aus *Pseudomonas putida* **5g** nur mit geringer Enantioselektivität von 29% ee umsetzt, wird mit der En-Reduktase aus *Methylobacterium extorquens* eine optische Reinheit von 86% ee erreicht. Zusätzlich wird das NEF-Produkt nur zu einem sehr geringem Anteil von 1% gebildet, was dieses Enzym zu einem vielversprechenden Kandidaten für die biokatalytische Synthese von (*R*)-**3g** macht.

## 5.4.2 Stabilität der En-Reduktase aus *M. extorquens* gegenüber Methanol

### 5.4.2.1 Spektrophotometrische Untersuchungen zum Einfluss von Methanol auf ME-OYE und Bsu-GDH

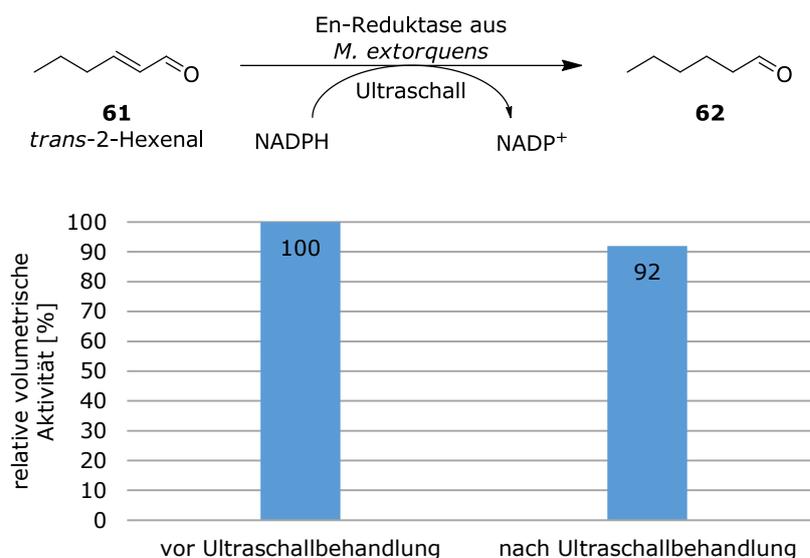
Da sich die Verwendung von Methanol positiv auf die Löslichkeit der Nitroalkene und damit auf die möglichen Substratkonzentrationen auswirkt (Abschnitt 4.9.2), wird für die En-Reduktase aus *M. extorquens* die Stabilität gegenüber Methanol in Abhängigkeit von der Zeit getestet. Hierzu wurde das Enzym für 24 h in einer MeOH/Puffer Mischung inkubiert, aus dieser Mischung wurden in zeitlichen Abständen Proben entnommen und die verbleibende Aktivität spektrophotometrisch durch die Abnahme des Cofaktors in Gegenwart von *trans*-2-Hexenal (**61**) bestimmt (Abbildung 79). Im Vorfeld wurde mittels BRADFORD-Assay der Proteingehalt der verwendeten Enzymprobe bestimmt, um die Entwicklung der spezifischen Aktivität über die Zeit zu verfolgen. Dabei zeigte sich, dass ME-OYE in Anwesenheit von 40% Methanol kaum Einbußen in der Stabilität aufweist. Ab einer Methanolkonzentration von 50% flockt das Protein aus und die gemessene Aktivität geht auf 0% zurück. Die Stabilitätsmessungen wurden analog mit der Glucosedehydrogenase aus *B. subtilis* (Bsu-GDH) in Abschnitt 4.9.2.1 durchgeführt wobei gezeigt wurde, dass das Enzym in Gegenwart von 50% Methanol über 24 h stabil bleibt (Abbildung 67, Seite 86). Der Einsatz von bis zu 40% Methanol

zur Erhöhung der Substratlöslichkeit sollte demnach bei Biotransformationen mit den Enzymen ME-OYE und Bsu-GDH keine Probleme bezüglich der Enzymstabilität darstellen. Dabei muss beachtet werden, dass aufgrund der Durchführung der Photometertests keine Aussage über das Verhalten der Enzymaktivität in Anwesenheit von Methanol getroffen werden kann: Die Inkubation des Enzyms erfolgt in einem Puffer/Methanol-Gemisch, während die Messung in reinem Puffer stattfindet. Mögliche inhibitorische Effekte des Methanols auf die Enzymaktivität werden bei der Messung also nicht berücksichtigt. Wie sich die Aktivität der Enzyme unter Reaktionsbedingungen verhält, muss deshalb in präparativen Tests verifiziert werden.



**Abbildung 79.** Stabilität der En-Reduktase aus *M. extorquens* gegenüber Methanol

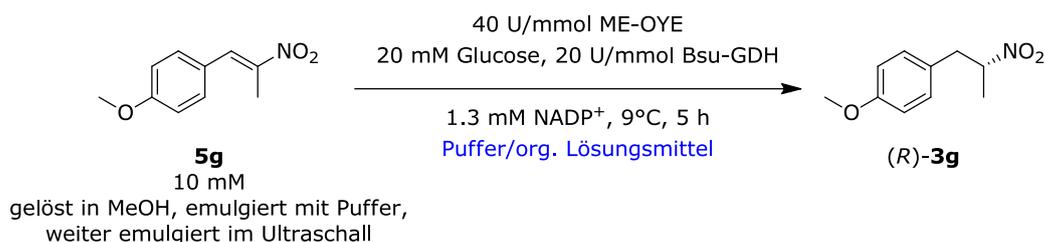
Zudem konnte gezeigt werden, dass Bsu-GDH (Abschnitt 4.9.1) und ME-OYE (Abbildung 80) stabil gegenüber einer Behandlung mittels Ultraschall sind, indem die Aktivität des jeweiligen Enzyms vor und nach einer Ultraschallbehandlung gemessen wurde. Dieser Befund ist vor allem im Hinblick auf die Verwendung von Ultraschall zur besseren Löslichkeit von Nitroalkenen von großer Bedeutung und stellt einen Vorteil dieser Enzyme dar.



**Abbildung 80.** Stabilität der En-Reduktase aus *M. extorquens* gegenüber Ultraschall

#### 5.4.2.2 Einsatz von Methanol im semi-präparativen Maßstab

Da der Photometertest nur Aussagen über die Stabilität, aber nicht die Aktivität in Gegenwart von Methanol sowie den Erhalt der Enantioselektivität zulässt, müssen die Ergebnisse im präparativen Maßstab bestätigt werden. Die Umsetzung von **5g** in Gegenwart von 0%, 30% und 40% Methanol über einen Zeitraum von 5 h bei 9°C zeigen, dass die Aktivität bei 30% Methanol der bei 0% Methanol entspricht (Tabelle 12, Einträge 1 und 2 mit jeweils 30% Umsatz), dies bestätigt die Ergebnisse der Photometerstudie. Allerdings sinkt der Umsatz in Gegenwart von 40% Methanol deutlich von 30% auf 10% (Tabelle 12, Einträge 2 und 3). Auffällig ist, dass im Vergleich zum Screening in Abschnitt 5.4.1 ein großer Anteil des NEF-Produktes **59g** gebildet wird. Außerdem entsteht in geringen Mengen der Aldehyd, welcher die ee-Werte verfälscht (bei der ee-Wert Bestimmung mittels chiraler HPLC eluieren Aldehyd **58g** und (*S*)-Enantiomer an gleicher Stelle). Tendenziell sind die ee-Werte demnach besser als in Tabelle 12 angegeben.

**Tabelle 12.** Abhängigkeit der Enzymaktivität und -selektivität der En-Reduktase aus *M. extorquens* gegenüber Methanol

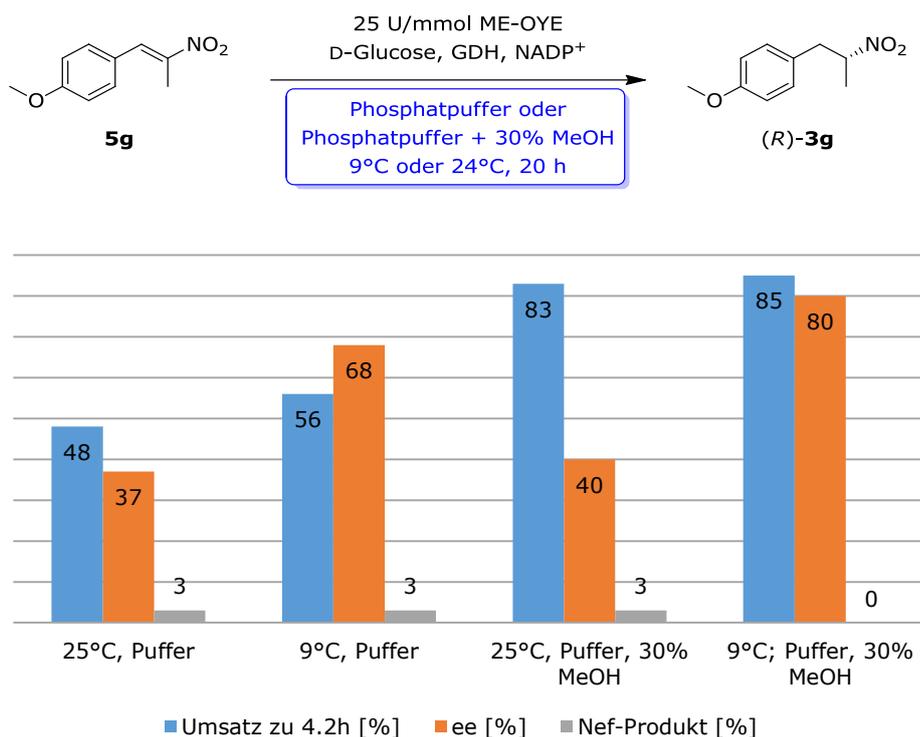
Eintrag	Anteil MeOH [%]	Umsatz zu 3g [%]	NEF-Produkt 59g [%]	Aldehyd 58g [%]	ee [%]
1	0	30	15	1	mind. 68 <sup>a)</sup>
2	30	30	19	4	mind. 51 <sup>a)</sup>
3	40	10	4	0	6

a) Die Verunreinigung durch entstandenen 4-Methoxybenzaldehyd verfälscht den ee-Wert. Die tatsächlichen ee-Werte konnten nicht bestimmt werden, liegen aber über den hier genannten ee-Werten.

Die Bildung der Nebenprodukte wurde hier auf die Enzymcharge und/oder die verwendete Bsu-GDH zurückgeführt, aus den Ergebnissen geht zusammenfassend trotzdem hervor, dass eine präparative Anwendung der En-Reduktase aus *M. extorquens* bei maximal 30% Methanol stattfinden sollte. Das Enzym sollte frisch verwendet werden.

### 5.4.3 Temperaturabhängigkeit der biokatalytischen Reduktion von **5g** mittels ME-OYE

Dass die Temperatur einen wesentlichen Einfluss auf die Enantioselektivität der Reaktion hat, wurde bereits bei der En-Reduktase aus *G. oxydans* gezeigt (Abschnitt 4.7.2). Dass dieser Effekt auf die En-Reduktase aus *M. extorquens* übertragbar ist, zeigt der Vergleich identischer Versuche bei unterschiedlichen Temperaturen (Abbildung 81). Während bei einer Reaktionstemperatur von 25°C eine Enantioselektivität von 37% ee erreicht wird, kann dieser Wert durch das Absenken der Temperatur auf 9°C auf 68% ee gesteigert werden. In Anwesenheit von 30% Methanol wird der gleiche Effekt beobachtet, die optische Reinheit des Produktes wird durch Verringern der Temperatur von 40% ee (25°C) auf 80% ee (9°C) erhöht. Gleichzeitig bringt der Einsatz von Methanol eine erhöhte Produktlöslichkeit und somit einen höheren Umsatz mit sich. Bei einem Reaktionsmedium aus reinem Puffer liegen die Umsätze zwischen 48 und 56%, während sie in Anwesenheit von 30% Methanol bei 83-85% liegen. Interessanterweise zeigen diese Experimente, dass die Aktivität der ME-OYE durch das Verringern der Temperatur nicht an Aktivität verliert. Dies lässt darauf schließen, dass das Enzym eine hohe Toleranz gegenüber niedrigen Reaktionstemperaturen hat. Die Bildung des NEF-Produktes bleibt in allen Versuchen gering.



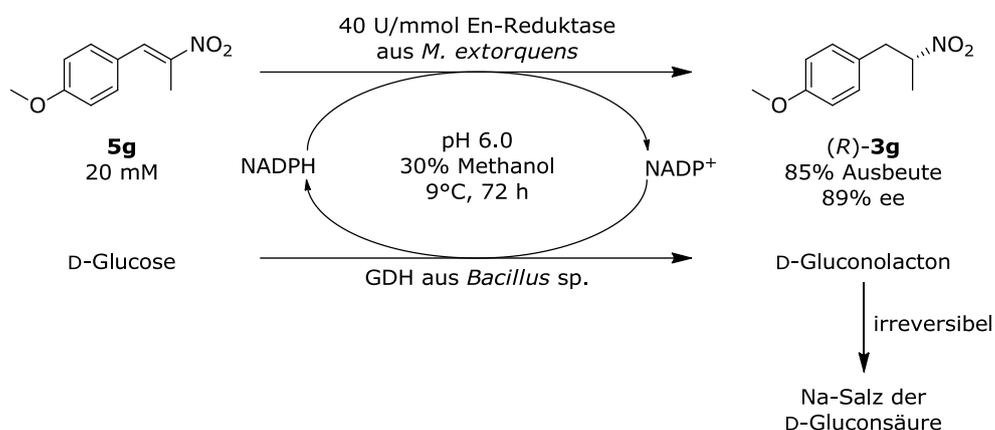
**Abbildung 81.** Temperaturabhängigkeit der En-Reduktase aus *M. extorquens* (ME-OYE) in Gegenwart von Puffer oder Puffer/Methanol

#### 5.4.4 Biokatalytische Reduktion von **5g** mittels ME-OYE im präparativen Maßstab

Die von HUMMEL *et al.* fermentierte und zur Verfügung gestellte ME-OYE-Zellmasse<sup>[93]</sup> wurde mittels Ultraschall aufgeschlossen, der frisch hergestellte zellfreie Rohextrakt wurde anschließend direkt für eine präparative Synthese von (*R*)-**3g** unter *in situ*-Cofaktorregenerierung mittels Bsp-GDH und Glucose eingesetzt (Abbildung 82). Da bisher keine Studien zur Lagerstabilität dieser En-Reduktase zur Verfügung stehen und die Bildung von Nebenprodukten bei der Verwendung des gelagerten Enzyms vermutlich ein Problem darstellen (Abschnitt 5.4.2.2), muss der Zellaufschluss direkt vor der Biotransformation durchgeführt werden. Da die Glucosedehydrogenasen Bsp-GDH und Bsu-GDH gegenüber 30% Methanol stabil sind, werden diese für die Biotransformationen als äquivalent angesehen. Mit dem frisch isolierten Enzym ME-OYE und Bsp-GDH wurden im 100-mL-Maßstab bei 20 mM Substratkonzentration eine Ausbeute von 85% und ein ee-Wert von 89% erreicht. Eine Bildung des NEF-Produktes wurde nicht beobachtet.

Die En-Reduktase aus *M. extorquens* wurde hiermit zu dem im Rahmen dieser Arbeit besten Enzymkandidaten für die Reduktion von **5g**. Zusätzlich zur En-Reduktase aus *G. oxydans*,

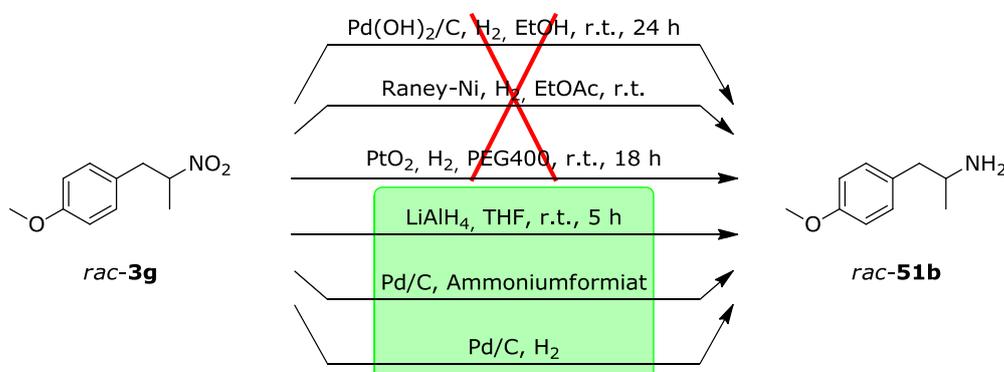
welche bevorzugt *meta*-substituierte Nitroalkene reduziert (Abschnitt 4.5), wurde mit der En-Reduktase aus *M. extorquens* ein Enzym gefunden, welches *para*-substituierte Nitroalkene mit hoher Enantioselektivität reduziert. Der Zugang zu Nitroalkanen vom Typ **3** mit hohen Enantioselektivitäten wurde hierdurch deutlich erweitert.



**Abbildung 82.** Biokatalytische Synthese von *(R)*-**3g** mittels En-Reduktase aus *M. extorquens* im präparativen Maßstab

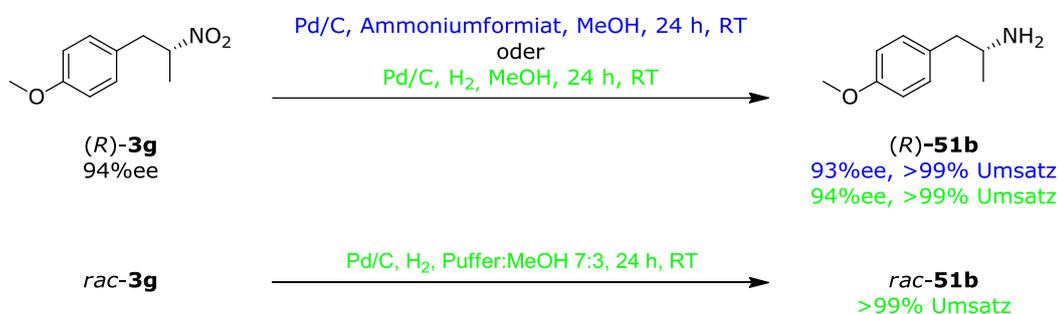
## 5.5 Metallkatalytische Reduktion der Nitrogruppe

Die Reduktion der Nitro- zur Amino-Gruppe wurde auf unterschiedlichen Wegen getestet. Dabei wurde bei den Hydrierkatalysatoren Pd(OH)<sub>2</sub>/C, Raney-Ni und PtO<sub>2</sub> kein Umsatz von *rac*-**3g** zu *rac*-**51b** beobachtet. Die Reduktion mittels Lithiumaluminiumhydrid verläuft mit quantitativem Umsatz, ebenso eignet sich Pd/C als Hydrierkatalysator für die Umsetzung (Abbildung 83).



**Abbildung 83.** Reduktion der Nitrogruppe

Das enantiomerenreine Nitroalkan (*R*)-**3g** wurde anschließend mit den zur Reduktion geeigneten Katalysatoren zur entsprechenden Aminoverbindung umgesetzt, wobei mittels chiraler HPLC getestet wurde, ob die optische Reinheit während der Hydrierung erhalten bleibt. Während die  $\text{LiAlH}_4$ -Reduktion zum racemischen Amin führt, konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Nitrogruppe mit Pd/C als Katalysator und sowohl Wasserstoff als auch Ammoniumformiat als Hydridquelle unter Erhalt der Konfiguration verläuft (Abbildung 84). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Reduktion mittels Pd/C und Wasserstoff auch in einer Puffer/Methanol-Mischung (7:3) durchgeführt werden kann. Unter diesen Bedingungen verläuft die Reaktion ebenfalls mit quantitativem Umsatz und ist somit im Hinblick auf die Kombination mit dem biokatalytischen Schritt der C=C-Reduktion (Abschnitt 5.4.4) ein geeignetes Katalysatorsystem.



**Abbildung 84.** Erhalt der Stereoinformation bei Reduktion der Nitrogruppe mittels Pd/C

Die Isolierung desamins im quantitativen Maßstab stellte sich jedoch als Problem heraus. Während zwar eine vollständige Abnahme des Nitroalkans **3g** detektiert wurde, konnte daraus kein produktbezogener Umsatz abgeleitet werden. Hierfür wurden im Folgenden eine Isolierung des Produktes sowie eine Charakterisierung des anfallenden Nebenproduktes durchgeführt.

## 5.6 Kombination von Bio- und Metallkatalyse

Die biokatalytische Reduktion des Nitroalkens **5g** mit ME-OYE verläuft mit vollständigem Umsatz bei einer Enantioselektivität von 89% ee und kann mit 85% Ausbeute isoliert werden (Abschnitt 5.4.4). Wird dieses anschließend mittels Pd/C und elementarem Wasserstoff im präparativen Maßstab zum Amin (*R*)-**51b** reduziert, verläuft die Hydrierung mit vollständigem Umsatz, einer Ausbeute von 35% und einer optischen Reinheit desamins von 82% ee. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 30% für die Reaktionssequenz ausgehend vom Nitroalken **5g** über das Nitroalkan (*R*)-**3g** zum Amin (*R*)-**51b** (Abbildung 85). Die Ursache für die relativ geringe Ausbeute im zweiten Schritt liegt daran, dass die Reduktion aliphatischer

Nitroverbindungen zum Amin unter der Bildung von Nebenprodukten wie der entsprechenden Nitrosoverbindung oder dem Hydroxylamin verlaufen kann (siehe Seite 107).

Da gezeigt wurde, dass die Einzelschritte prinzipiell miteinander kompatibel sind (Abschnitt 5.5), werden die beiden Reaktionsschritte zu einem sequentiellen Eintopf-Prozess kombiniert, in dem nach beendeter Biotransformation der Hydrierkatalysator Pd/C zum Reaktionsgemisch und die Hydrierung mit H<sub>2</sub> durchgeführt wird. Die Aufarbeitung des Nitroalkans (*R*)-**3g** und der dadurch entstehende Substanzverlust sowie die dabei anfallenden Lösungsmittelmengen, die für eine Extraktion nötig sind, entfallen. Durch dieses Verfahren steigert sich die Gesamtausbeute auf 46% bei einer optischen Reinheit von 86% ee (Abbildung 86).

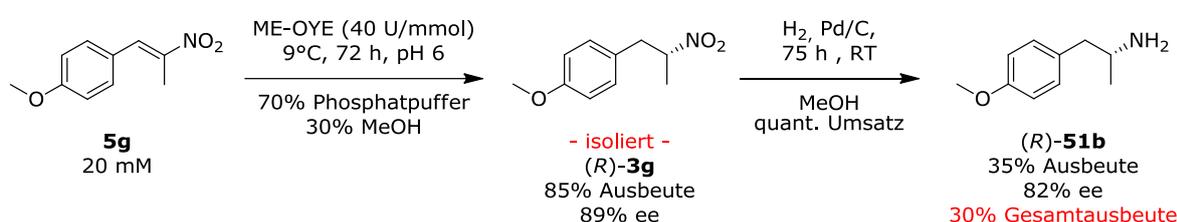


Abbildung 85. Synthese von (*R*)-**51b** aus **5g** in zwei isolierten Reaktionsschritten

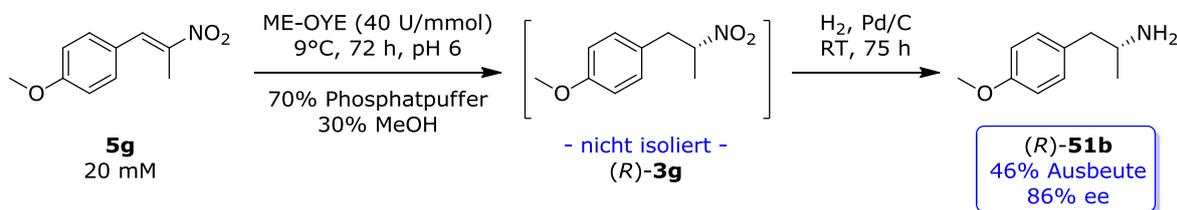
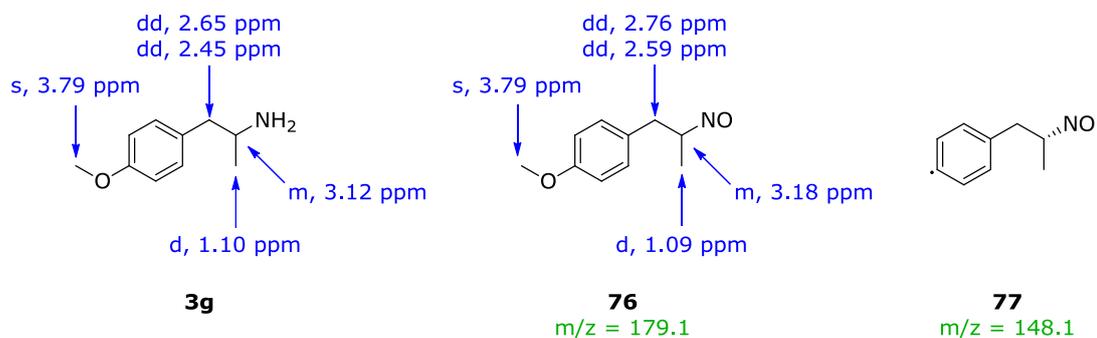


Abbildung 86. Synthese von (*R*)-**51b** im sequentiellen Eintopf-Prozess

Die Reaktionsführung mit zwei isolierten Schritten zeigt, dass der größte Stoffmengenverlust beim zweiten Schritt, der Hydrierung, stattfindet. Im Rahmen des Eintopf-Prozesses konnte ein Nebenprodukt isoliert werden, das zu großen Teilen (42 Gew.-% Auswaage, bzw. 13% isolierte Ausbeute nach Säulenchromatographie) während der Reaktion anfällt und somit die Ausbeute an (*R*)-**51b** verringert. Das Nebenprodukt wurde durch Extraktion vom Amin abgetrennt und anschließend mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie untersucht. Die für das Amin charakteristischen Signale für die Methyl- und Methoxygruppe sowie die diastereotopen Protonen in β-Position und das Proton in α-Position, werden im Nebenprodukt ebenfalls gefunden, lediglich bei leicht abweichender Verschiebung. Die massenspektrometrische Untersuchung (EI) zeigt Molekülpeaks bei 179.1 und 148.1. Aufgrund dieser Informationen wird das Nebenprodukt als Nitroso-Verbindung **76** identifiziert (Abbildung 87). Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass es

sich dabei um ein während der Hydrierung entstehendes Zwischenprodukt handelt. Dieses Nebenprodukt wird in 42 Gew.-% der Auswaage erhalten und so die geringe Ausbeute am Amin am Ende der Reaktionssequenz erklärt. Um die Effizienz des Eintopf-Prozesses weiter zu steigern, kann ein Screening weiterer Hydrierkatalysatoren einen Ausgangspunkt zukünftiger Arbeiten darstellen, welcher im Rahmen dieses Projekts jedoch nicht weiter verfolgt wurde.

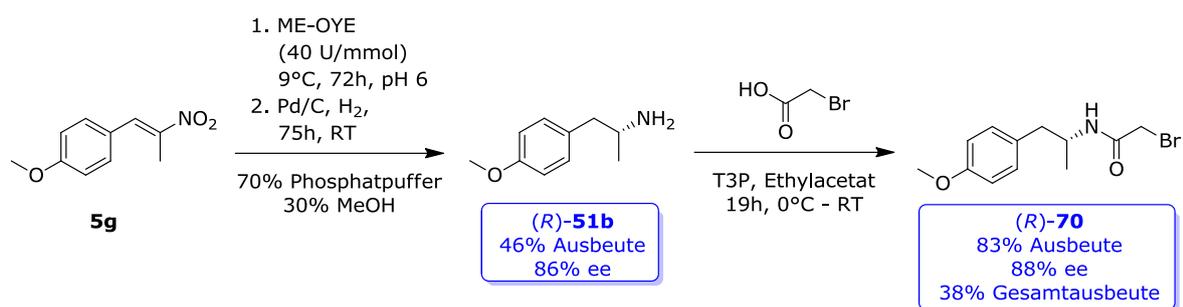


**Abbildung 87.** Identifizierung des Nebenproduktes **76** mittels <sup>1</sup>H-NMR (blau) und Massenspektrometrie (grün)

Zusammenfassend wurde die Kompatibilität der Bio- und Metallkatalyse zur enantioselektiven Synthese desamins (*R*)-**51b** gezeigt und der Prozess als „proof of concept“ ist gelungen. Die Herstellung von (*R*)-**51b** durch einen chemoenzymatischen sequentiellen Eintopf-Prozess mit hoher optischer Reinheit des Produktes von 86% ee stellt einen wichtigen Schritt auf dem Weg zu einer neuen, enzymkatalysierten Synthese von Tamsulosin dar.

## 5.7 Folgechemie zur Synthese von Tamsulosin

Die Amidierung mit Bromessigsäure kann neben den bekannten Kupplungsmethoden auch mit T3P durchgeführt werden. Bei T3P handelt es sich um ein Phosphonsäureanhydrid, welches eine geringe Tendenz zur Epimerisierung der Kupplungspartner aufweist, und durch die vergleichsweise einfach handhabbare Verwendung zur Synthese von (*R*)-**66** herangezogen wird. Die Umsetzung zu (*R*)-**70** verläuft quantitativ, die Stereoinformation bleibt dabei vollständig erhalten (Abbildung 88). Das Produkt (*R*)-**70** wurde durch Extraktion isoliert.

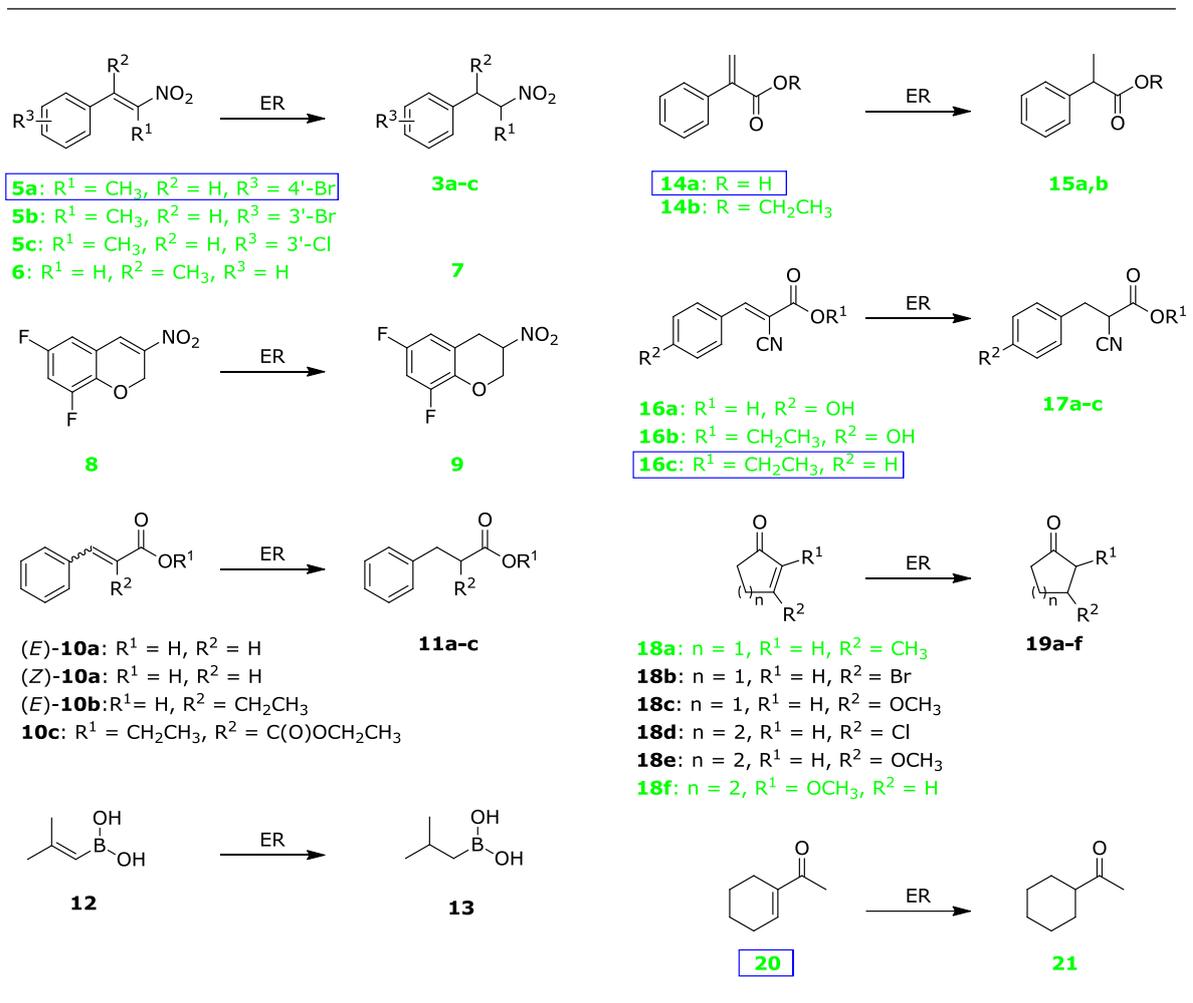


**Abbildung 88.** Synthese von (*R*)-**70** durch einen chemoenzymatischen sequentiellen Eintopfprozess und anschließender T3P-Kupplung

Somit ist die Synthese eines Tamsulosin-Intermediates mithilfe eines chemoenzymatischen sequenziellen Eintopfprozesses (Abschnitt 5.6) und einer darauf folgenden Amidkopplung mit T3P gelungen.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

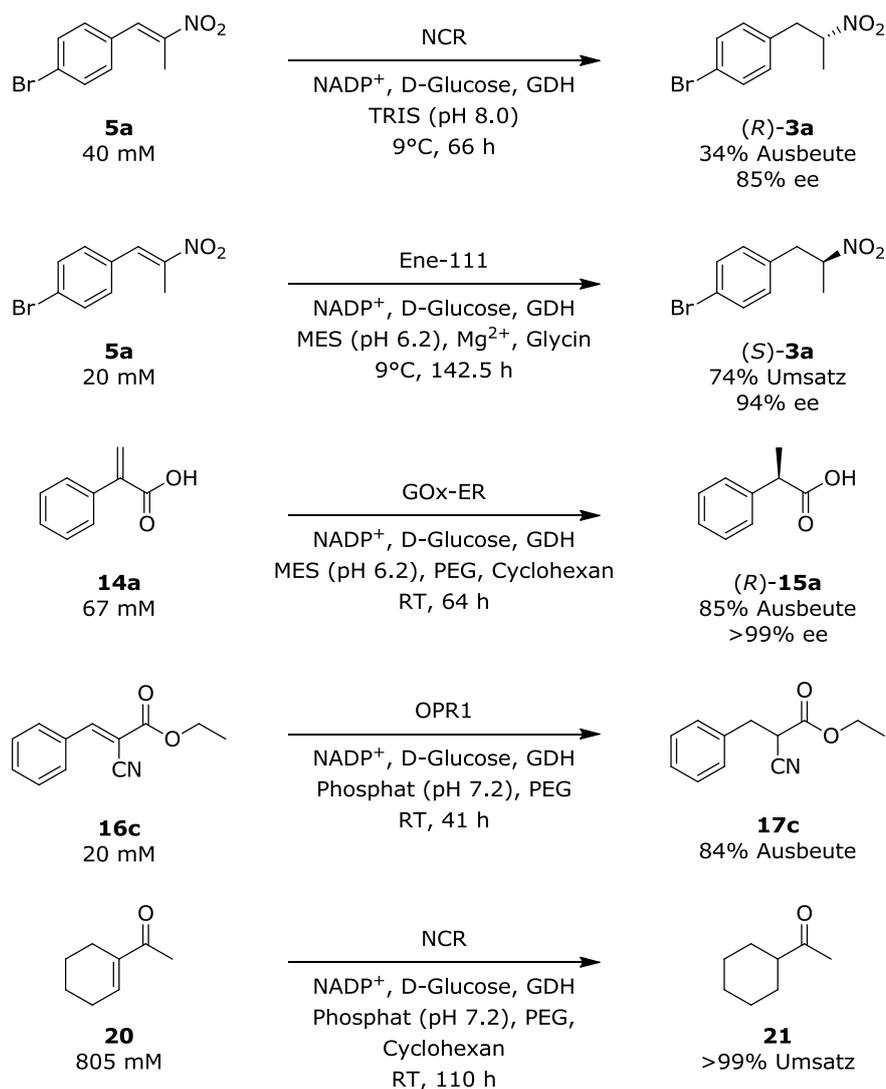
Diese Arbeit sollte neue Einblicke in die Enzymklasse der En-Reduktasen liefern, sowie deren Einsatz in der Synthese pharmazeutisch relevanter enantiomerenreiner Bausteine etablieren. Es ist gelungen, durch ein umfassendes Enzymscreening von 23 En-Reduktasen mit 22 Substraten den Kenntnisstand über diese Enzymklasse zu erweitern. Das Screening zeigte, dass für die getesteten Nitroalkene (**5a-c**, **8**), Acrylsäure (**14a**) und der analoge Ethylester (**14b**), Cyanozimtsäurederivate (**16a-c**) und auch cyclische Verbindungen wie **18a,f** und **20** aktive Enzyme zur Verfügung stehen, die die Doppelbindungen dieser Substrate reduzieren können (Abbildung 89).



**Abbildung 89.** En-Reduktase-Screening mit akzeptierten Substraten (grün) und Upscales (blau)

Für ausgewählte Enzym-Substrat-Paare wurde der Einfluss von 41 Parametern auf die Aktivität und Selektivität der Enzyme getestet. Unter Berücksichtigung dieser Daten ist es gelungen, fünf Reaktionen im präparativen Maßstab von 30 mL mit Substratkonzentrationen von 0.5 – 10 Gew.-% durchzuführen und die Produkte mit hohen Umsätzen und (Enantio-)

Selektivitäten zu erhalten (Abbildung 90). Hervorzuheben ist hier die Synthese beider Enantiomere von **3a** ausgehend von **5a** mit 85% ee ((*R*)-Enantiomer) bzw. 94% ee ((*S*)-Enantiomer). Dies sind die ersten in der Literatur beschriebenen hoch enantioselektiven Synthesen für *para*-substituierte Nitroalkene vom Typ **3**. Die En-Reduktasen NCR und Ene-111 sind somit vielversprechende Kandidaten für die hoch enantioselektive Umsetzung weiterer Nitroalkene vom Typ **5**.

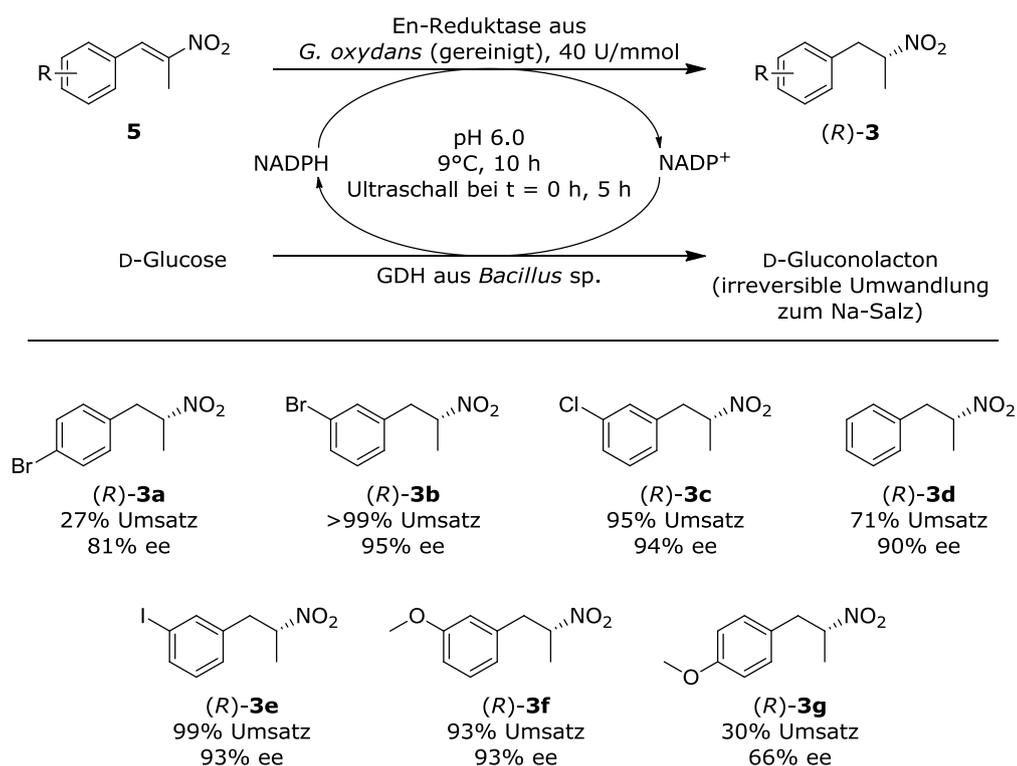


**Abbildung 90.** En-Reduktase katalysierte Biotransformationen im präparativen Maßstab

Die Synthese von (*R*)-**15a** verläuft mit vollständigem Umsatz, 85% Ausbeute und hervorragender Selektivität von >99% ee. Diese Substratklasse stellt einen interessanten und wichtigen Ausgangspunkt von pharmazeutisch relevanten Profen-Derivaten dar. Zudem wurde die Stabilität der En-Reduktase aus *G. oxydans* im Rahmen dieser Synthese gegenüber einem 20%-igen Cyclohexan-Anteil gezeigt, was für zukünftige Arbeiten mit diesem Enzym neue Möglichkeiten eröffnet. Die Synthese von **17c** konnte mithilfe von OPR1 ebenfalls erfolgreich

bei quantitativem Umsatz und einer Ausbeute von 84% durchgeführt werden. Die Reduktion der C=C-Doppelbindung in **20** wurde mit NCR durchgeführt, hier gelang es, zum einen eine hohe Cyclohexan-Konzentration von 20% einzusetzen, ohne die Aktivität oder Selektivität des Enzyms zu beeinträchtigen, und zum anderen eine hohe Substratkonzentration von 805 mM mit vollständigem Umsatz zu reduzieren. Dies verdeutlicht eindrucksvoll die Belastbarkeit dieser Enzymklasse und soll einen Ausgangspunkt für weitere Forschungen zum Einsatz von En-Reduktasen darstellen.

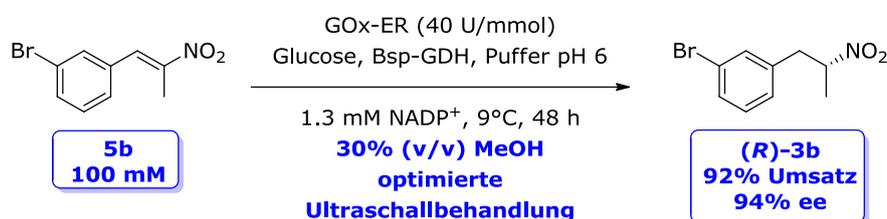
Der „proof of concept“ zur hoch enantioselektiven Reduktion  $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkene mittels En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* wurde auf ein breites Nitroalken-Substratspektrum ausgeweitet (Abbildung 91). Es ist gelungen,  $\alpha$ -Methyl-substituierte Nitroalkane vom Typ (*R*)-**3** mit hohen Enantioselektivitäten und Umsätzen zu synthetisieren. Das unsubstituierte Nitroalkan (*R*)-**3d** konnte mit 90% ee erhalten werden. In *meta*-Position substituierte Nitroalkene wurden mit sehr guten Umsätzen und hohen Enantioselektivitäten umgesetzt.



**Abbildung 91.** Hoch enantioselektive biokatalytische Synthese von  $\alpha$ -Methylsubstituierten Nitroalkanen ((*R*)-**3**) mittels En-Reduktase aus *G. oxydans*

Dabei hatte die Art des Substituenten in *meta*-Position keinen Einfluss auf die Selektivität, sowohl Halogen-Substituenten als auch ein Methoxy-Substituent lieferten einheitlich hohe ee-Werte von 93%-95%. Dies sind die bis dato höchsten ee-Werte für die Reduktion eines  $\alpha$ -Methyl-substituierten Nitroalkens vom Typ **5**, die in der Literatur beschrieben sind.

Die Weiterentwicklung dieses Prozesses zur Erhöhung der Substratkonzentration ist ebenfalls erfolgreich gelungen. Zu Beginn wurden Methoden untersucht, die die Löslichkeit des Nitroalkens im Reaktionsmedium und damit die Zugänglichkeit zum Enzym erhöhen sollten. Zum einen wurde der Einsatz von Ultraschall, und zum anderen die Verwendung organischer Lösungsmittel zur Verbesserung der Löslichkeit der Nitroalkene untersucht. Die eingesetzten Methoden mussten mit allen an der Reaktion beteiligten Enzymen kompatibel sein, der Prozess wurde dahingehend untersucht und angepasst. Der Einsatz von Ultraschall ist für die En-Reduktase aus *G. oxydans* unproblematisch, ebenso für die zur Cofaktorregenerierung eingesetzte GDH aus *B. subtilis*. Die GDH aus *Bacillus* sp. hingegen wird durch Ultraschall deaktiviert. Der Einsatz von Methanol zur Erhöhung der Löslichkeit ist bis zu einer Methanolkonzentration von 30% vorteilhaft. Alle beteiligten Enzyme sind unter diesen Bedingungen für mindestens 24h stabil. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine Reaktionszeit die Selektivität nicht beeinflusst, was die Möglichkeit ergab, Reaktionszeiten von 24h und länger anwenden zu können. Unter diesen Voraussetzungen wurde das Nitroalken **5b** bei einer Substratkonzentration von 100 mM mithilfe von 30% Methanol und optimierter Ultraschallbehandlung erfolgreich reduziert. Es wurde ein Umsatz von 92% erzielt, die optische Reinheit des Produktes (*R*)-**3b** war mit 94% ee sehr gut (Abbildung 92). Die Möglichkeit, Nitroalkene vom Typ **5** bei hohen Substratkonzentrationen bis 100 mM mit hohen Enantioselektivitäten umzusetzen, ist somit erfolgreich gelungen.



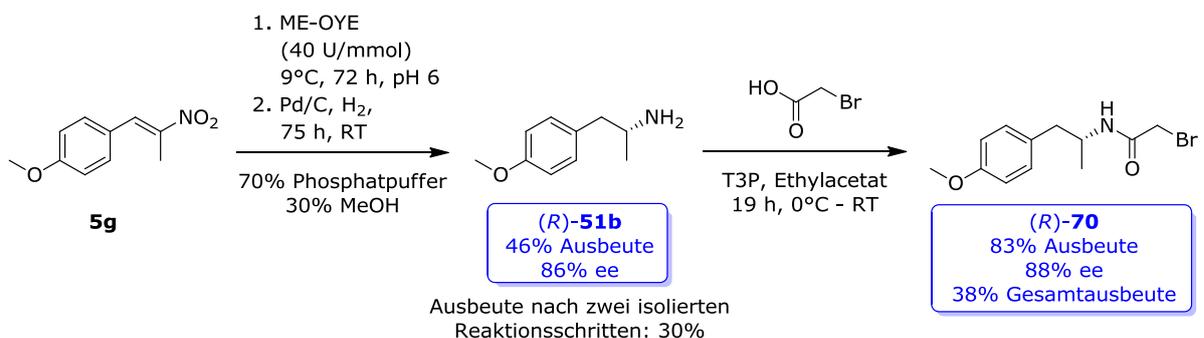
**Abbildung 92.** Biokatalytische Reduktion von **5b** mittels En-Reduktase aus *G. oxydans* bei einer Substratkonzentration von 100 mM in Gegenwart von 30% Methanol

Die Racemisierung chiraler Nitroalkane vom Typ **3** wurde eingehend untersucht (Abbildung 93). Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Glucosedehydrogenase und Glucose keinen Einfluss auf die Racemisierung hat. Das Nitroalkan racemisiert ebenfalls nicht spontan durch die Inkubation in Phosphatpuffer (pH 6). Es wurde gezeigt, dass die Racemisierung von der En-Reduktase aus *G. oxydans* katalysiert wird und die Temperatur dabei eine wesentliche Rolle spielt. Die Racemisierung kann durch ein Absenken der Temperatur von 25°C auf 9°C deutlich unterdrückt werden. Zudem stellte sich heraus, dass die Racemisierung von der Nitroalken-Konzentration abhängt. Im Rahmen der durchgeführten Experimente zeigte sich, dass die Racemisierung stärker bei geringer Nitroalken-Konzentration auftritt. In Anwesenheit erhöhter Nitroalken-Konzentrationen wurde eine verringerte Racemisierung beobachtet.



**Abbildung 93.** Einflussfaktoren auf die Racemisierung chiraler Nitroalkane

Da die En-Reduktase aus *G. oxydans* für *para*-substituierte Nitroalkene (**5a**, **5g**) nur mäßige Enantioselektivitäten erreichte, wurde im Rahmen eines Enzymscreenings eine En-Reduktase aus *M. extorquens* identifiziert, welche das *para*-Methoxy-substituierte Nitroalken **5g** mit guter Enantioselektivität von 86% ee reduziert. Mithilfe dieses Enzyms gelang es, eine sequentielle Eintopf-Synthese zu entwickeln, in welcher zuerst die biokatalytische Reduktion von **5g** zu (*R*)-**3g** und anschließend die Reduktion mittels Pd/C und H<sub>2</sub> zum Amin (*R*)-**51b** durchgeführt wurde. Bei zwei isolierten Reaktionsschritten beträgt die Ausbeute des Amins 30%. Durch die Kombination der Einzelschritte zum Eintopf-Prozess konnte die Ausbeute auf 46% erhöht werden. Die anschließende Amidierung zu (*R*)-**70** verläuft unter Erhalt der Stereoinformation mit 83% Ausbeute und 88% ee (Abbildung 94).

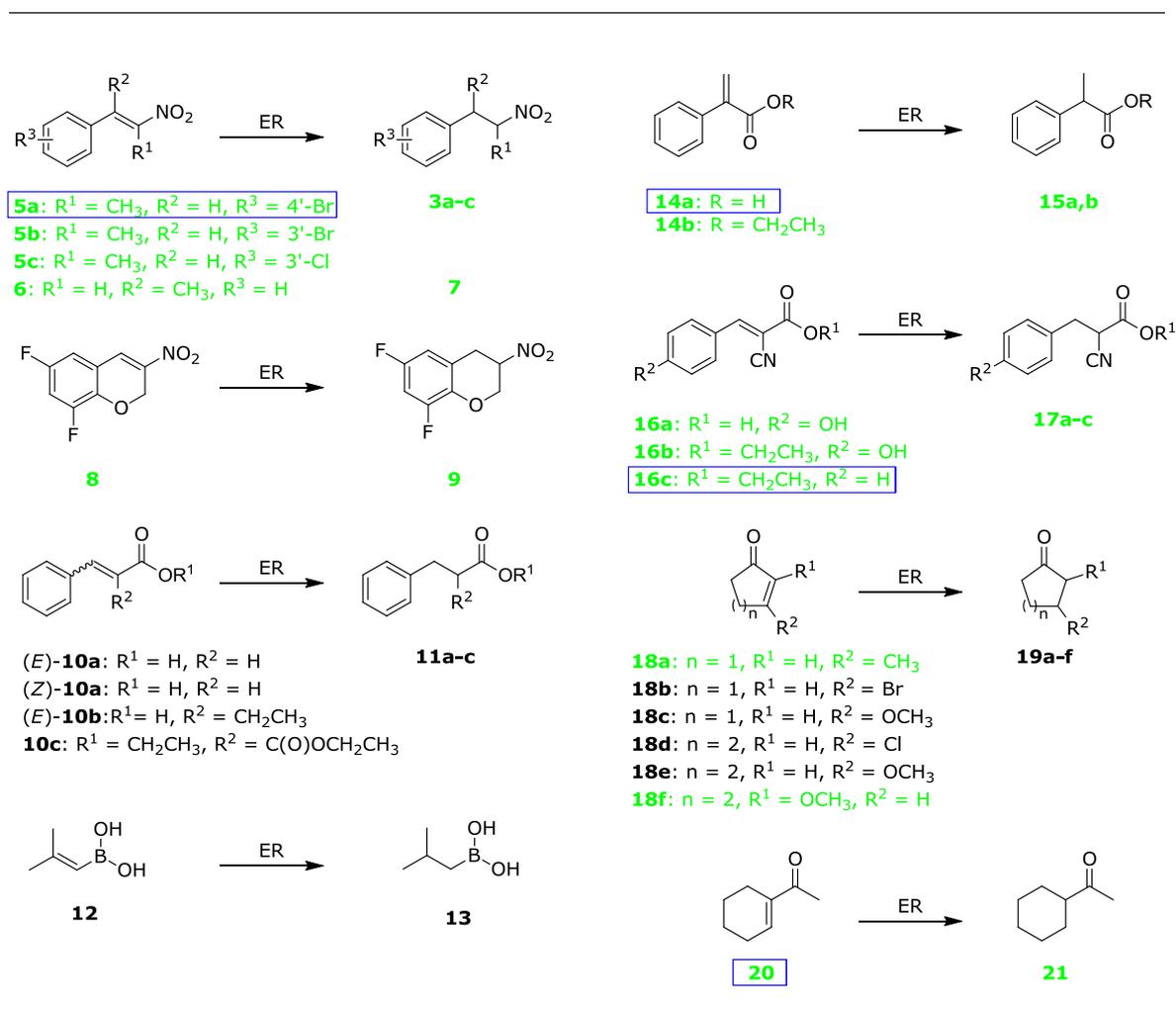


**Abbildung 94.** Chemoenzymatischer sequentieller Eintopf-Prozess und anschließende Amidierung zur Synthese eines Tamsulosin-Bausteins

Somit wurde gezeigt, dass die Synthese eines Intermediates zur Tamsulosin-Synthese auf biokatalytischem Weg mithilfe einer En-Reduktase möglich ist. Als „bottleneck“ der hier gezeigten Synthese ist die Reduktion der Nitrogruppe zu sehen, welche unabhängig von der Kombination mit der Biokatalyse oder als isolierter Prozess nur mit mäßigen Ausbeuten verläuft. Wird dieser Schritt in zukünftigen Arbeiten weiter optimiert, stellt dieser Prozess eine gute Alternative zu bestehenden Tamsulosin-Synthesen dar.

## 7 Abstract

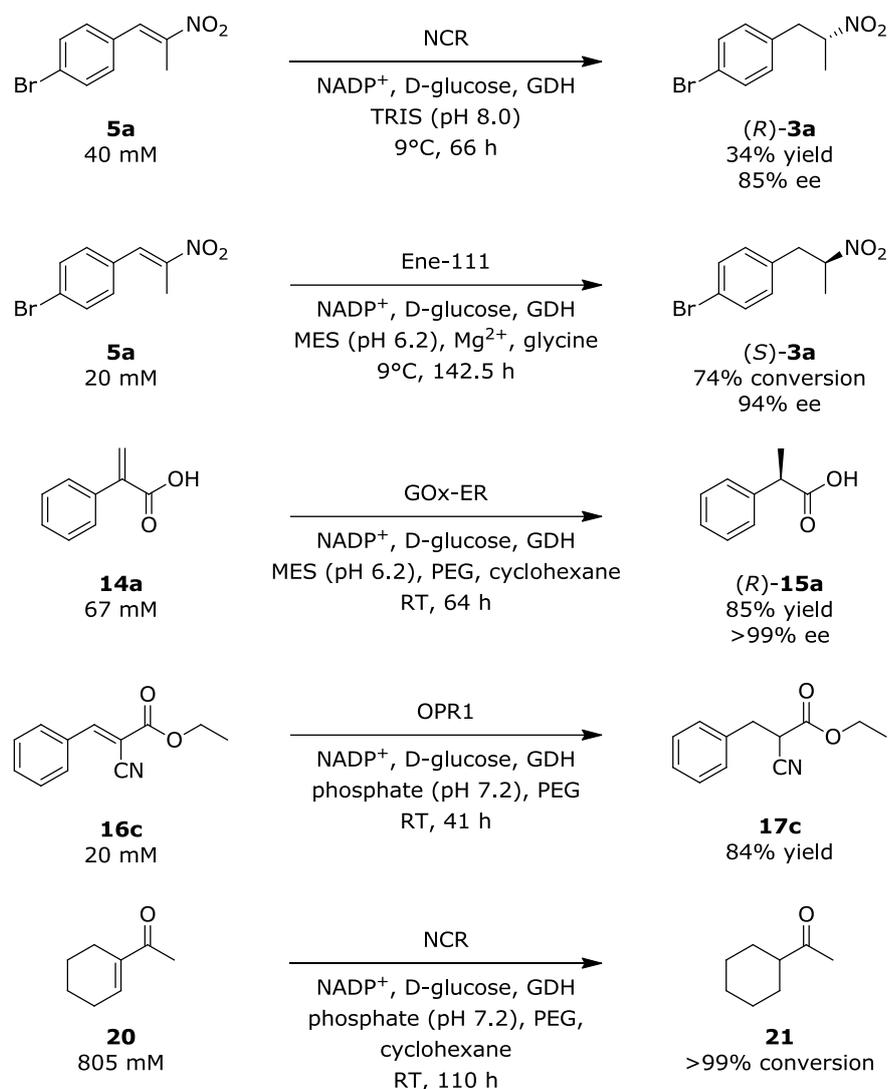
The aim of this work was to extend the knowledge about ene reductases and to implement these enzymes in the synthesis of enantiomerically pure, pharmaceutically relevant building blocks. Within a comprehensive enzyme screening including 23 ene reductases (ER) and 22 substrates, the state of knowledge about this enzyme class was successfully extended. The screening identified active enzymes for C=C-double bond reduction in tested nitroalkenes (**5a-c**, **8**), acrylic acid (**14a**) and its ethyl ester (**14b**), cyano cinnamic acid derivatives (**16a-c**) as well as cyclic compounds **18a,f** and **20** (Figure 1).



**Figure 1.** Ene reductase screening with accepted substrates (green) and subsequent upscale experiments (blue)

The influence of 41 parameters towards activity and selectivity was investigated for selected enzyme-substrate-pairs. Taking these data into account, five reactions were successfully performed in a preparative scale of 30 mL with substrate concentrations between 0.5 and 10 w-%. The products were obtained in high conversions and (enantio-) selectivities (Figure 2).

Most prominent is the synthesis of both enantiomers of **3a** starting from **5a** with 85% ee ((*R*)-enantiomer) and 94% ee ((*S*)-enantiomer), respectively. This are the first highly enantioselective syntheses for *para*-substituted nitroalkenes of type **3** reported so far. Ene reductases NCR and Ene-111 turned out to be promising candidates for the highly enantioselective biocatalytic reduction of further nitroalkenes of type **5**.

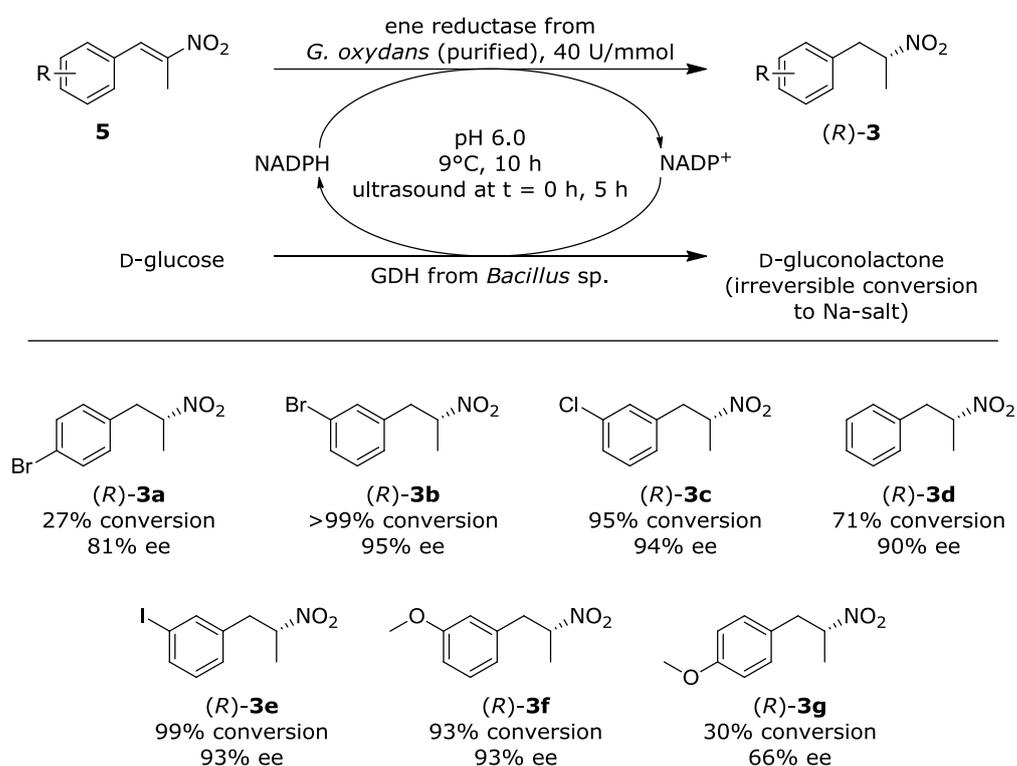


**Figure 2.** Ene reductase catalyzed biotransformations in preparative scale

The synthesis of (*R*)-**15** proceeds with complete conversion and an excellent selectivity of >99% ee. This represents an interesting starting point for the synthesis of pharmaceutically relevant Profen derivatives. Additionally, the stability of ene reductase from *G. oxydans* towards 20 vol-% cyclohexane was proven, giving new opportunities for future experiments with this enzyme.

The synthesis of **17c** with OPR1 also proceeded with quantitative conversion and with 84% yield. The biocatalytic reduction of the C=C-double bond in **20** was performed with NCR. The reaction worked with high cyclohexane amount of 20% without affecting the activity or selectivity of the enzyme. In addition, a high substrate concentration of 805 mM was reduced under quantitative conversion, which impressively illustrates the capacity of this enzyme class and can be a promising starting point for further ene reductase research.

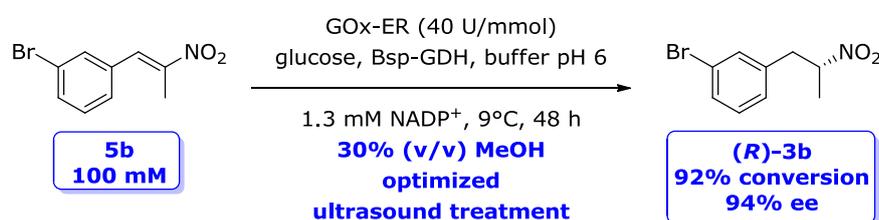
The „proof of concept“ for the highly enantioselective reduction of  $\alpha$ -methyl substituted nitroalkenes by means of an ene reductase from *Gluconobacter oxydans* has been extended to a broad nitroalkene substrate spectrum (Figure 3). Nitroalkanes of type (*R*)-**3** were successfully synthesized with high enantioselectivities and conversions. The unsubstituted nitroalkane (*R*)-**3d** was obtained with 90% ee. Nitroalkenes substituted in *meta*-position were converted with very good conversions and high enantioselectivities.



**Figure 3.** Highly enantioselective biocatalytic synthesis of  $\alpha$ -methyl substituted nitroalkanes ((*R*)-**3**) by means of an ene reductase from *G. oxydans*

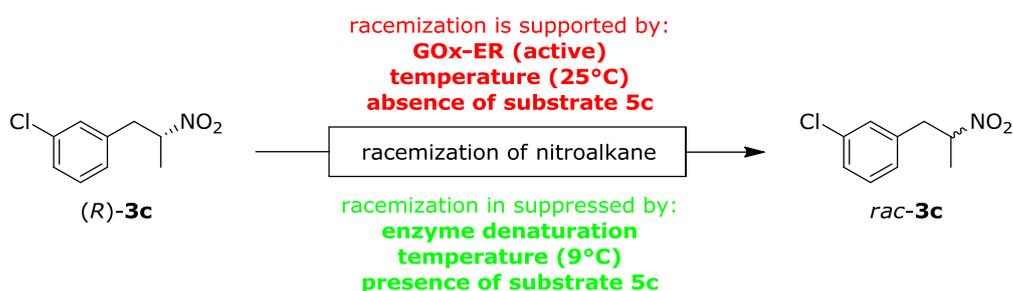
Thereby, the type of substituent in *meta*-position had no influence towards selectivity, halogen substituents as well as the methoxy substituent led to high ee-values of 93% to 95% ee. This are the highest ee-values for the reduction of  $\alpha$ -methyl substituted nitroalkenes to the analogous alkane reported so far.

The improvement of this process towards an enhancement of substrate concentration was successfully, too. In the beginning, methods to increase the solubility of nitroalkene and as a consequence thereof the increase of accessibility for the enzyme, was investigated. On the one hand, the use of ultrasound and on the other hand the use of organic solvents was tested to increase the solubility of nitroalkenes. Since the applied methods need to be compatible with all involved enzymes, the process was evaluated and adjusted to that effect. The application of ultrasound is unproblematic for ene reductase from *G. oxydans* as well as for the GDH from *B. subtilis* which was used for cofactor regeneration, whereas the GDH from *Bacillus* sp. is deactivated by ultrasound. The application of methanol to increase the solubility is beneficial until a methanol concentration of 30%: all involved enzymes are stable towards this condition at least for 24h. Additionally it was shown that the reaction time has no influence towards selectivity, giving the opportunity to apply reaction times of 24 hours and longer. Under these conditions, the nitroalkene **5b** was successfully reduced by a substrate concentration of 100 mM with the aid of 30% methanol and an optimized ultrasound treatment. The reaction proceeded with 92% conversion within 48 h and the optical purity of the product (*R*)-**3b** was very good with 94% ee (Figure 4). With this, the possibility to reduce nitroalkenes of type **5** with high substrate concentrations up to 100 mM and high enantioselectivity is shown.



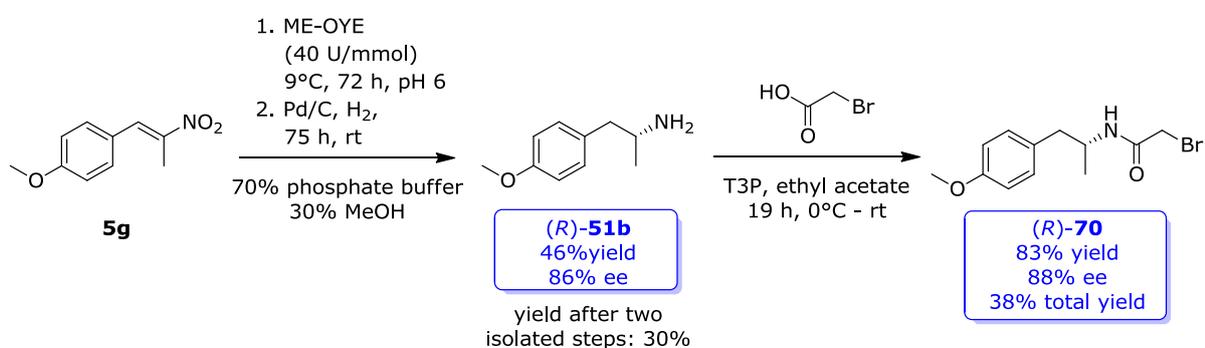
**Figure 4.** Biocatalytic reduction of **5b** by means of ene reductase from *G. oxydans* with a high substrate concentration of 100 mM in the presence of 30% methanol

The racemization of chiral nitroalkanes of type **3** was investigated extensively (Figure 5). It has been shown that the presence of glucose dehydrogenase as well as glucose has no influence on racemization. Furthermore, the nitroalkane does not spontaneously racemize by the incubation in phosphate buffer (pH 6). It was shown that the racemization is catalyzed by ene reductase from *G. oxydans*, and that the temperature plays an important role in this system. The racemization can be significantly suppressed by a decrease of temperature from 25°C to 9°C. Additionally, the racemization is dependent on nitroalkene concentration. Within the performed experiments it became obvious that the racemization was more significant with low nitroalkene concentrations. In the presence of high nitroalkene concentrations, a lesser degree of racemization was observed.



**Figure 5.** Influencing factors towards racemization of chiral nitroalkanes

Since ene reductase from *G. oxydans* achieved only moderate enantioselectivities for *para*-substituted nitroalkenes (**5a**, **5g**), an ene reductase from *M. extorquens* was identified within an enzyme screening, which reduced the *para*-methoxy substituted nitroalkene **5g** with good enantioselectivity of 86% ee. Using this enzyme, a sequential one-pot synthesis comprising the biocatalytic reduction of **5g** to (*R*)-**3g** and the subsequent reduction with Pd/C and H<sub>2</sub> to obtain amine (*R*)-**51b** was developed. By combining the single steps in a one-pot process, the yield of amine was increased from 30% to 46%. The subsequent amidation to (*R*)-**66** proceeds under retention of the stereoinformation with 83% yield and 88% ee (Figure 6).



**Figure 6.** Chemoenzymatic sequential one-pot process and subsequent amidation yielding a Tamsulosin building block

Thus it was shown, that the synthesis of a Tamsulosin building block can be performed by means of an ene reductase as biocatalyst. The “bottleneck” of the shown synthesis is the reduction of the nitro group, which proceeds with moderate yields, both in combination with biocatalysis and as isolated step. If this step is improved in future works, this reaction represents a good alternative to existing Tamsulosin syntheses.

## 8 Experimenteller Teil

### 8.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

#### Enzyme:

Die Enzymformulierungen Bsu-GDH, ME-OYE (mit N-terminalem His-Tag), NemR und XenB (mit N-terminalem His-Tag) wurden vom Arbeitskreis HUMMEL (Forschungszentrum Jülich) als zellfreie Rohextrakte zu Verfügung gestellt. GOx-ER (mit N-terminalem His-Tag)<sup>[22]</sup> wurde als zellfreier Rohextrakt, als gereinigtes Lyophilisat sowie als Zellpellet ebenfalls vom Arbeitskreis HUMMEL (Forschungszentrum Jülich) bereitgestellt und teilweise im Rahmen dieser Arbeit selbst gereinigt und lyophilisiert. Accession-Nr.: ME-OYE: YP\_002963109.1; NemR: YP\_002999411.1; XenB: NP\_743081.1.

Die Glucosedehydrogenase aus *Bacillus* sp. (Bsp-GDH) wurde von Amano erworben.

#### HPLC:

HPLC-Messungen wurden mit einer SFC-HPLC-Anlage von Jasco (Pumpen PU-2080Plus, automatischer Rückdruckregler BP-2080Plus, Säulenthermostat CO-2060Plus, Multiwellenlängen-Detektor MD-2010Plus und Autosampler AS-2059Plus) durchgeführt. Die Trennung der Proben erfolgte mit Säulen von Daicel Chiralpak®. Die Chromatogramme wurden mit der Galaxy Chromatography Data System Software ausgewertet.

#### Kryostat:

Zur Kühlung von Reaktionsgefäßen wurde ein Kryostat CF31 von Julabo verwendet.

#### Massenspektrometrie (EI):

EI Massenspektren wurden mit einem Autospec X magnetic sector Massenspektrometer mit EBE Geometrie (Vacuum Generators, Manchester, UK) mit einer Standard-EI Quelle aufgenommen. Die Proben wurden mit einer Schubstange im Aluminiumtiegel eingeführt. Die Ionen wurden mit 8 kV beschleunigt.

#### NMR-Spektroskopie:

Die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren wurden an einem Bruker DRX-500 oder Bruker Advance 500 NMR-Spektrometer bei Raumtemperatur aufgenommen. Die chemische Verschiebung  $\delta$  [ppm]

der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren werden, sofern nicht anders angegeben, in Relation zur normierten chemischen Verschiebung des verwendeten partiell undeuterten Lösungsmittels angegeben ( $\text{CDCl}_3$   $\delta = 7.26$  ppm bzw.  $\text{DMSO}-d_6$   $\delta = 2.50$  ppm). Die Spin-Multiplizitäten werden als s (Singulett), d (Dublett), dd (dupliziertes Dublett), t (Triplet), td (Triplet eines Dubletts), q (Quartett), qui (Quintett) und m (Multipllett) angegeben. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software MestReNova (Mestrelab Research, Version 8.1.0-11315) ausgewertet.

Polarimeter:

Drehwerte wurden mit einem Model 341 Polarimeter von PerkinElmer instruments gemessen.

Rotationsverdampfer:

Zum Abdestillieren der Lösungsmittel wurde ein Büchi-Rotationsverdampfer in Kombination mit einer PC500 Series Pumpe verwendet.

Thermomixer:

Zur Inkubation im Thermomixer wurden der Thermomixer comfort von Eppendorf und der Thermo-Shaker von Universal Labortechnik verwendet.

Titrimeter:

Zum konstant halten des pH-Wertes wurden folgende pH-Statens verwendet: 702SM Titrande von Metrohm in Kombination mit der Software Tiamo, TitroLine alpha plus von SI Analytics in Kombination mit der Software TitriSoft 2.73.

Ultraschallbad:

Es wurde ein Ultraschallbad Sonotrex TK52 von Bandelin verwendet.

UV/Vis-Spektrophotometer:

UV/Vis-spektroskopische Messungen wurden an einem V-630 von Jasco und an einem UV-2450 der Firma Shimadzu durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software Spectra Manager (Version 2.008.04) ausgewertet.

Zentrifugen:

Zentrifugationen von 1.5 mL und 2 mL Eppendorf-Tubes wurden mit einer Tischzentrifuge Biofuge plus von Heraeus durchgeführt. 15 mL- und 50 mL-Tubes wurden mit der Multifuge 3S-R von Heraeus zentrifugiert.

$\gamma$ -Butyrolactone:

Die verwendeten  $\gamma$ -Butyrolactone wurden von Prof. Dr. Hiroaki Sasai, Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, zur Verfügung gestellt.

## 8.2 Verwendete Chemikalien und Geräte für Abschnitte 8.3.10 bis 8.3.19

Dokumentation:

Die Dokumentation erfolgte mit dem elektronischen Laborjournal cELN, Laborjournalnummer ELN022635-001 bis ELN022635-057.

Enzyme:

Die Enzymformulierungen OPR1<sub>pET28</sub>, OPR1<sub>pQR1</sub>, OYE2.6<sub>pET28</sub>, OYE2.6<sub>pQR1</sub>, XenB<sub>pET28</sub>, XenB<sub>pQR1</sub>, NCR<sub>pET28</sub>, NCR<sub>pQR1</sub>, DBVPG<sub>pET28</sub>, DBVPG<sub>pQR1</sub>, OYE3<sub>pET28</sub>, OYE3<sub>pQR1</sub> sowie ein Leervektor BL21(DE3) wurden als lyophilisierter Zellrohextrakt von Dr. S. HANLON (F. Hoffmann-La Roche) zur Verfügung gestellt. Gene Accession Numbers: OPR1: AJ242551; OYE2.6: A3LT82; XenB: E4R5Q3; NCR: Q5NLA1; DBVPG: G5CCV5; OYE3: L29279.

Die Enzymformulierungen Ene-101 bis Ene-116 stammen von Codexis und liegen ebenfalls als lyophilisierter Zellrohextrakt vor.

Der Zellrohextrakt von GOx-ER (mit N-terminalem His-Tag)<sup>[22]</sup> wurde vom Arbeitskreis HUMMEL (Forschungszentrum Jülich) erhalten und im Rahmen des Praktikums lyophilisiert. Die eingesetzte D-Glucosedehydrogenase CDX901 wurde als Lyophilisat von Codexis erworben.

GC:

Die GC-Messungen wurden mit dem Gaschromatographen 6890N von Agilent Technologies durchgeführt. Der Probensammler PAL System, Combi PAL von CTC Analytics ist in das System integriert. Die verwendeten Säulen und Methoden sind im Experimentellen Teil bei den jeweiligen Experimenten angegeben. Chirale GC-Messungen wurden von I. Duffour durchgeführt.

#### HPLC:

Die Messungen mittels HPLC wurden mit dem HPLC-System 1290 Infinity von Agilent Technologies durchgeführt. Die verwendeten Säulen und Methoden sind im Experimentellen Teil bei den jeweiligen Experimenten angegeben. Chirale HPLC-Messungen wurden von I. Duffour durchgeführt.

#### Lyophilisator:

Zum Lyophilisieren des GOx-ER-Zellrohextrakts und der Screeningplatten wurde das Gefriertrocknungssystem Alpha 2-4 LD plus von Christ verwendet.

#### NMR-Spektroskopie:

Alle NMR-Spektren wurden mit einem Bruker 400 Ultra Shield TM aufgenommen, die Auswertung der Spektren erfolgte mit MestreNova.

#### Pipettier-Roboter:

Zum Erstellen der Screeningplatte aus einer Mutterplatte wurde Lissy von Zinsser Analytic verwendet.

#### Plattenschüttler:

Screeningplatten wurden auf dem Plattenschüttler Titramax 101 von Heidolph inkubiert.

#### Rotationsverdampfer:

Zum Abdestillieren der Lösungsmittel wurde ein Büchi-Rotationsverdampfer in Kombination mit einer vacuubrand cvc3000 Pumpe und dem Kühlsystem rotacool von Heidolph verwendet.

#### SDS-Gelelektrophorese:

Chemikalien sowie Gele für die SDS-Gelelektrophorese stammen von novex, life technologies. Die Aufnahme des SDS-Gels erfolgte mittels FluorChemSP von Alpha Innotech.

#### Thermomixer:

Eppendorf-Gefäße (2.0 mL) wurden im ThermoMixerC von Eppendorf inkubiert.

**Titrimo:**

Zum konstant halten des pH-Wertes wurden folgende pH-Statens verwendet: 842 Titrande von Metrohm, 718 STAT Titrimo von Metrohm, beide Geräte wurden mit der Software Tiamo 1.1 gesteuert.

**Überkopfschüttler:**

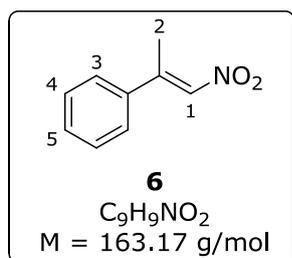
Fiolax-Röhrchen (2.0 mL) wurden im Überkopfschüttler Reax 2 von Heidolph inkubiert.

**Zentrifuge:**

Zum Zentrifugieren der Eppendorf-Tubes (2.0 mL) wurde die Tischzentrifuge minispin plus von Eppendorf verwendet. Für größere Tubes und Fiolax-Röhrchen wurde die Centrifuge 5810R von Eppendorf verwendet.

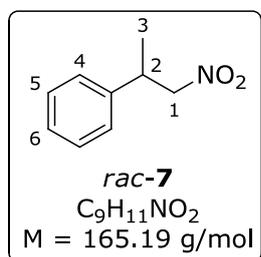
### 8.3 Synthesen und spektroskopische Daten: Screening, Charakterisierung und präparative Anwendung von En-Reduktasen

#### 8.3.1 Synthese von 1-Nitro-2-phenylpropen (**6**)



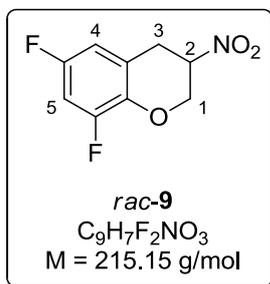
Die Synthese erfolgt nach FRYSZKOWSKA *et al.*<sup>[82]</sup> Cerammoniumnitrat (5.48 g, 0.01 mol) und NaNO<sub>2</sub> (6.89 g, 0.10 mol) werden in Chloroform (100 mL) suspendiert und mit  $\alpha$ -Methylstyren (1.29 mL, 0.01 mol) versetzt. Unter Rühren wird Essigsäure (6.87 mL, 0.12 mol) zugegeben. Das Reaktionsgefäß ist über einen Schlauchaufsatz mit einer mit wässr. NaOH- gefüllten Waschflasche verbunden. Die Mischung wird mit Ultraschall behandelt. Der Reaktionsfortschritt wird mittels DC überprüft. Nach Ende der Reaktion (2 h 45 min) wird die Mischung mit Chloroform (200 mL) verdünnt und mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan:Diethylether 95:5). 1-Nitro-2-phenylpropen wird als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 768 mg, 4.71 mmol, 47%; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.50 – 7.40 (5H, m, H-C-Ar), 7.31 (1H, d, <sup>3</sup>J = 1.5 Hz, H-C1), 2.65 (3H, d, <sup>3</sup>J = 1.5 Hz, H-C2). Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[82,146]</sup>

#### 8.3.2 Synthese von *rac*-1-Nitro-2-phenylpropan (*rac*-**7**)



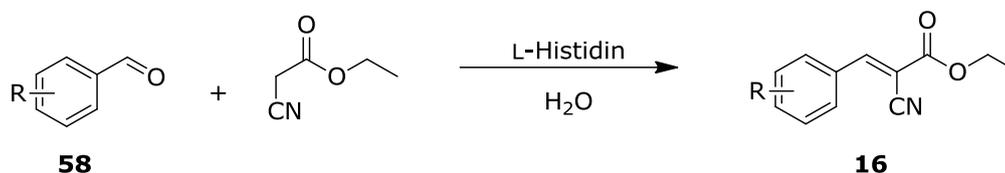
Die Synthese erfolgt analog zu AAV11 mit 1-Nitro-2-phenylpropen (**6**, 163 mg, 1 mmol), Natriumborhydrid (57 mg, 1.5 mmol) und einer THF:Methanol-Mischung (7 mL, 10:1). Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1). Ausbeute: 87 mg, 0.53 mmol, 53%; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.35 – 7.21 (2H, m, H-C-Ar), 4.61 – 4.45 (2H, m, H-C1), 3.64 (1H, dt, <sup>3</sup>J = 8.1, 6.9 Hz, H-C2), 1.39 (3H, d, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, H-C3). Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[82]</sup>

### 8.3.3 Synthese von *rac*-6,8-Difluor-3-nitrochroman (*rac*-**9**)



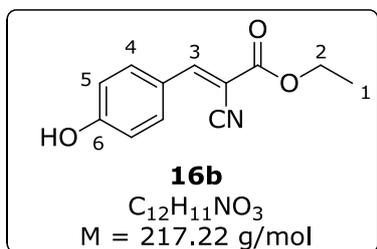
Die Synthese erfolgt analog zu METZNER.<sup>[147]</sup> 6,8-Difluor-3-nitro-2H-chromen (**8**, 52 mg, 0.25 mmol) wird in 2-Propanol (6.25 mL) gelöst und mit Phosphatpuffer (18.75 mL, pH 7, 50 mM) versetzt. Anschließend werden NADP<sup>+</sup> (25 mg), En-Reduktase aus *G. oxydans* (5.1 mg, Aktivität 1.96 U/mg, 10 U) und Alkoholdehydrogenase aus *L. kefir* (Rohextrakt, 50  $\mu$ L) zugegeben. Die Mischung rührt bei Raumtemperatur für 13 h. Der Fortgang der Reaktion kann photometrisch bei 400 nm beobachtet werden. Es wird mit Dichlormethan extrahiert, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan: Dichlormethan 1:1). 6,8-Difluor-3-nitrochroman wird als farbloser Feststoff erhalten. Ausbeute: 26 mg, 0.12 mmol, 48%; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 6.80 – 6.63 (2H, m, H-C4/5), 4.97 (1H, qd, <sup>3</sup>J = 4.9, 2.6 Hz, H-C2), 4.77 (1H, m, H-C1), 4.42 (1H, m, H-C1), 3.57 (1H, m, H-C3), 3.32 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 17.6, 5.9 Hz, H-C3). Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[147]</sup>

### 8.3.4 Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV1): Synthese von $\alpha$ -Cyanozimtsäurederivaten (**16**)



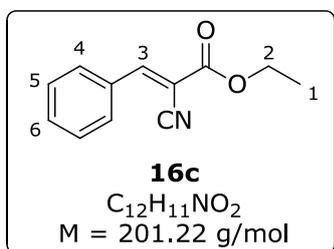
Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an RAHMATI *et al.*<sup>[148]</sup> In einen 25 mL-Rundkolben werden der entsprechend substituierte Benzaldehyd (**54**, 1 mmol, 1 eq) und 2-Cyanoethylacetat (1 mmol, 1 eq) in H<sub>2</sub>O (5 mL) vorgelegt. Nach Zugabe von L-Histidin (1 mmol, 1 eq) wird für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Cyanozimtsäurederivat wird mittels <sup>1</sup>H-NMR charakterisiert und ggf. durch Umkristallisation gereinigt.

### 8.3.4.1 Synthese von (*E*)-2-Cyano-3-(4-hydroxyphenyl)acrylsäureethylester (**16b**)



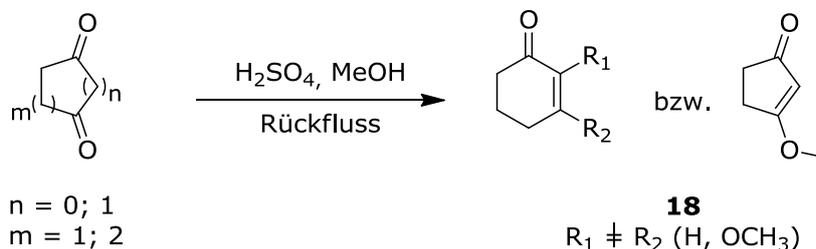
Die Synthese erfolgt analog zur AAV1 mit 4-Hydroxybenzaldehyd (**58h**, 122.3 mg, 1.0 mmol), 2-Cyanoethylacetat (107.0  $\mu$ L, 1.0 mmol) und L-Histidin (156.4 mg, 1.0 mmol). Das Lösungsmittelvolumen wird auf Grund von zunehmender Viskosität auf 10 mL erhöht. Das Rohprodukt wird aus Ethanol umkristallisiert. (*E*)-2-Cyano-3-(4-hydroxyphenyl)acrylsäureethylester wird in Form eines blass gelben kristallinen Feststoffs erhalten. Ausbeute: 144.2 mg, 0.66 mmol, 66%; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.24 (1H, s, H-C3), 8.00 (2H, d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, H-C4), 6.95 (2H, d, <sup>3</sup>J = 8.7 Hz, H-C5), 4.29 (2H, q, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, H-C2), 1.29 (3H, t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, H-C1). Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[149]</sup>

### 8.3.4.2 Synthese von (*E*)-2-Cyano-3-phenylacrylsäureethylester (**16c**)



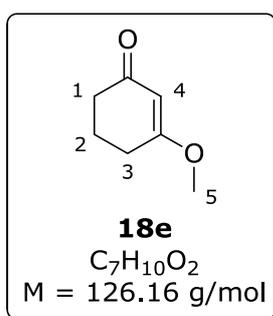
Die Synthese erfolgt analog zu AAV1 mit Benzaldehyd (**58d**, 112.0  $\mu$ L, 1.1 mmol), 2-Cyanoethylacetat (107.0  $\mu$ L, 1.0 mmol) und L-Histidin (154.9 mg, 1.0 mmol, 1eq). (*E*)-2-Cyano-3-phenylacrylsäureethylester wird als blass gelber kristalliner Feststoff erhalten. Ausbeute: 197 mg, 0.98 mmol, 98%; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.41 (1H, s, H-C3), 8.06 (2H, d, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz, H-C4), 7.65 (1H, m, H-C6), 7.60 (2H, m, H-C5), 4.32 (2H, q, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, H-C2), 1.31 (3H, t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, H-C1). Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[150]</sup>

### 8.3.5 Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV2): Synthese cyclischer Enone (**18**)

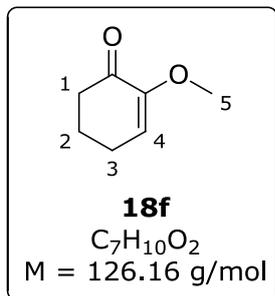


Die Synthesen erfolgen in Anlehnung an WINKLER *et al.*<sup>[69]</sup> Das entsprechende Cycloalkan-Dion wird in Methanol (30 mL) gelöst. Unter Rühren wird langsam konz.  $H_2SO_4$  zugegeben und für 18 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Reaktionsmischung mit wässriger NaOH neutralisiert, mit Ethylacetat verdünnt und mit ges.  $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase wird erneut mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wird ggf. säulenchromatographisch gereinigt.

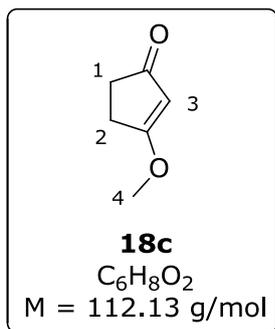
#### 8.3.5.1 Synthese von 3-Methoxycyclohex-2-enon (**18e**)



Die Synthese erfolgt analog zu AAV2. Cyclohexan-1,3-dion (1.75 g, 15.6 mmol) wird in Methanol (30 mL) gelöst und mit konzentrierter Schwefelsäure (0.4 mL) versetzt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch ( $SiO_2$ , Cyclohexan: Ethylacetat 1:1) gereinigt. 3-Methoxycyclohex-2-enon wird als gelber Feststoff erhalten. Ausbeute: 868 mg, 6.88 mmol, 44%;  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 5.41 – 5.37 (1H, s, H-C4), 3.74 – 3.69 (3H, s, H-C5), 2.46 – 2.39 (2H, t,  $^3J = 6.3$  Hz, H-C1), 2.39 – 2.33 (2H, dd,  $^3J = 7.2, 5.9$  Hz, H-C3), 2.03 – 1.95 (2H, p,  $^3J = 6.5$  Hz, H-C2). Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[69]</sup>

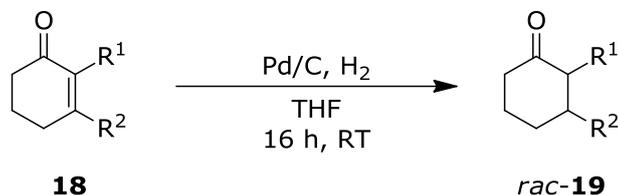
8.3.5.2 Synthese von 2-Methoxycyclohex-2-enon (**18f**)

Die Synthese erfolgt analog zur AAV2. Cyclohexan-1,2-dion (1.99 g, 17.8 mmol) wird in Methanol (30 mL) gelöst und mit konzentrierter Schwefelsäure (2.25 mL) versetzt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch ( $SiO_2$ , Cyclohexan: Ethylacetat 1:1  $\rightarrow$  2:1) gereinigt. 2-Methoxycyclohex-2-enon wird als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 361 mg, 2.86 mmol, 16%;  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 5.85 (1H, t,  $^3J = 4.6 \text{ Hz}$ , H-C4), 3.60 (3H, s, H-C5), 2.51 (2H, m, H-C1), 2.43 (2H, m, H-C3), 1.98 (2H, m, H-C2). Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[69]</sup>

8.3.5.3 Synthese von 3-Methoxycyclopent-2-enon (**18c**)

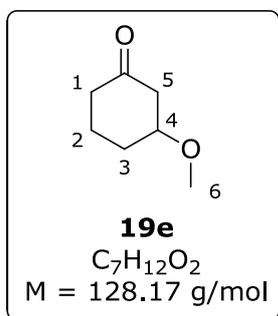
Die Synthese erfolgt analog zur AAV2. Cyclopentan-1,3-dion (1.96 g, 20 mmol) wird in Methanol (30 mL) gelöst und mit konzentrierter Schwefelsäure (5 mL) versetzt. Nachdem für 18 h zum Rückfluss erhitzt wurde, wird zur Aufarbeitung neutralisiert, mit Ethylacetat verdünnt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die Phasen werden getrennt, die gelbe organische Phase wird verworfen. Die wässrige Phase wird 11 mal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert. 3-Methoxycyclopent-2-enon wird in Form eines blassgelben kristallinen Feststoffs erhalten, welcher nicht weiter gereinigt wird. Ausbeute: 628 mg, 5.6 mmol, 28%;  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 5.35 (1H, s, H-C3), 3.85 (3H, s, H-C4), 2.66 – 2.60 (2H, m, H-C1), 2.51 – 2.45 (2H, m, H-C2). Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[69]</sup>

### 8.3.6 Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV3): Reduktion cyclischer Enone mittels Pd/C und H<sub>2</sub>



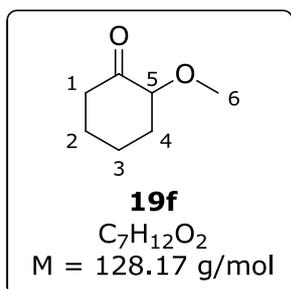
Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an WINKLER *et al.*<sup>[69]</sup> Das entsprechende Enon (0.4 mmol) wird in THF (3 mL) gelöst und mit 10%-Pd/C (2 mg) versetzt. Der Kolben wird evakuiert, mit Argon überschichtet und anschließend wird ein H<sub>2</sub>-Ballon aufgesetzt. Die Reaktionsmischung wird für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird über Celite filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingedunstet. Das Produkt wird mittels <sup>1</sup>H-NMR identifiziert.

#### 8.3.6.1 Synthese von 3-Methoxycyclohexanon (**19e**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV3. 3-Methoxycyclohex-2-enon (**18e**, 50 mg, 0.4 mmol) wird in THF (3 mL) gelöst und mit 10%-Pd/C (2 mg) für 16 h bei Raumtemperatur unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre gerührt. Nach Filtration über Celite wird 3-Methoxycyclohexanon als farbloses Öl erhalten. Das Rohprodukt wurde nicht weiter gereinigt. Auswaage: 15 mg; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 3.67 (m, 1H, H-C4), 3.33 (3H, s, H-C6), 2.66 – 2.55 (1H, m, H-C5), 2.52 – 2.41 (1H, m, H-C5), 2.38 – 2.26 (2H, m, H-C1), 2.10 – 1.90 (2H, m, H-C3), 1.88 – 1.77 (1H, m, H-C2), 1.74 – 1.64 (1H, m, H-C2).

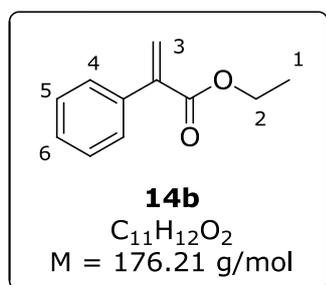
#### 8.3.6.2 Synthese von 2-Methoxycyclohexanon (**19f**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV3. 2-Methoxycyclohex-2-enon (**18f**, 50 mg, 0.4 mmol) wird in THF (3 mL) gelöst und mit 10%-Pd/C (2 mg) für 16 h bei Raumtemperatur unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre gerührt. Nach Filtration über Celite wird 2-Methoxycyclohexanon als farbloses Öl erhalten. Das Rohprodukt wurde nicht weiter gereinigt. Auswaage: 28 mg; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 3.71 (1H, m), 3.42 (3H, s), 2.56 – 2.48 (1H, m), 2.33 – 2.18 (2H, m),

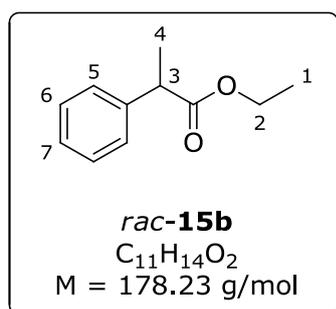
1.95 (2H, m), 1.78 – 1.59 (3H, m). Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[69,151]</sup>

### 8.3.7 Synthese von 2-Phenylacrylsäureethylester (**14b**)



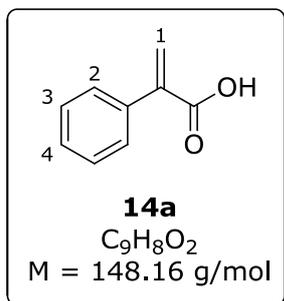
Die Synthese erfolgt nach DE3317356A1.<sup>[152]</sup> In einem 250 mL-Kolben wird Ethylphenylacetat (9.25 g, 56.3 mmol) in Toluol (35 mL) vorgelegt und mit Paraformaldehyd (2.649 g, 88.2 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (12.438 g, 90 mmol) und Tetrabutylammoniumiodid (415.5 mg, 1.125 mmol) versetzt. Die Suspension wird für 4 h bei 80°C mit einem Genscher-Rührer gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Suspension mit 25 mL H<sub>2</sub>O versetzt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird einmal mit Toluol extrahiert, die vereinigten organischen Phasen dreimal mit Brine gewaschen. Anschließend wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan: Ethylacetat 9:1). Ausbeute: 5.896 g, 33.5 mmol, 59%; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.46 – 7.29 (5H, m, H-C-Ar), 6.35 (1H, d, <sup>3</sup>J = 1.3 Hz, H-C3), 5.89 (1H, d, <sup>3</sup>J = 1.3 Hz, H-C3), 4.29 (2H, q, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, H-C2), 1.33 (3H, t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, H-C1). Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[153]</sup>

### 8.3.8 Synthese von *rac*-2-Phenylpropionsäureethylester (*rac*-**15b**)



Die Synthese erfolgt in Anlehnung an AAV11 (Seite 185). 2-Phenylacrylsäureethylester (**14b**, 176 mg, 1 mmol) wird in einer THF:Methanol-Mischung (10:1, 7.0 mL) gelöst und unter Rühren wird NaBH<sub>4</sub> (57 mg, 1.5 mmol) portionsweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach 20 h wird mit Dichlormethan extrahiert (3x20 mL) und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan:Dichlormethan 1:1). Ausbeute: 75 mg, 0.42 mmol, 42%; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.35 – 7.24 (5H, m, H-C-Ar), 4.19 – 4.05 (2H, m, H-C2), 3.70 (1H, q, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, H-C3), 1.50 (3H, d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, H-C4), 1.21 (3H, t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, H-C1).

### 8.3.9 Synthese von 2-Phenylacrylsäure (**14a**)



Die Synthese erfolgt in Anlehnung an HAN *et al.*<sup>[154]</sup> 2-Phenylacrylsäureethylester (**14b**, 0.875 g, 4.97 mmol) wird in wässr. NaOH-Lösung (20 mL, 1 M) zum Rückfluss erhitzt. Nach 2 h wird auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wird angesäuert, erneut mit Diethylether extrahiert und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird durch reverse Extraktion weiter gereinigt (Diethylether/ges. Natriumhydrogencarbonatlösung, dann Diethylether/wässr. HCl). Ausbeute: 568 mg, 3.96 mmol, 80%; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.51 – 7.31 (5H, m, H-C-Ar), 6.55 (1H, d, <sup>3</sup>J = 1.1 Hz, H-C1), 6.03 (1H, d, <sup>3</sup>J = 1.2 Hz, H-C1).

### 8.3.10 Erstellung von En-Reduktase-Screeningplatten

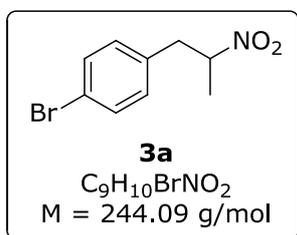
Alle Enzyme, die auf die Platte aufgetragen werden sollen, werden zuvor in dest. Wasser gelöst. Von allen von Roche zur Verfügung gestellten Enzymen (OPR1<sub>pET28a</sub>, OPR1<sub>pQR1</sub>, OYE2.6<sub>pET28a</sub>, OYE2.6<sub>pQR1</sub>, XenB<sub>pET28a</sub>, XenB<sub>pQR1</sub>, NCR<sub>pET28a</sub>, NCR<sub>pQR1</sub>, DBVPG<sub>pET28a</sub>, DBVPG<sub>pQR1</sub>, OYE3<sub>pET28a</sub>, OYE3<sub>pQR1</sub>) werden 30 mg in 3.6 mL Wasser gelöst, von allen Codexis-Enzymen (Ene-101 bis Ene-116) werden 15 mg in 3.60 mL gelöst. Diese Stammlösungen werden nach einem vorgelegten Pipettierschema in eine 96-DW-Platte gegeben und mithilfe eines Pipettierroboters werden daraus Screeningplatten hergestellt. Hierzu werden 120 µL der Enzymlösung und 280 µL dest. Wasser pro Well pipettiert. Die Screeningplatten werden eingefroren und anschließend über Nacht lyophilisiert. Auf jeder Screeningplatte befinden sich somit 1 mg der jeweiligen Roche-Enzyme und 0.5 mg der jeweiligen Codexis-Enzyme. Die lyophilisierten Platten werden bei 4°C gelagert. Das Screening mit der En-Reduktase aus *G. oxydans* wurde im Eppendorf-Tube durchgeführt (siehe Abschnitt 8.3.11).

### 8.3.11 Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AAV4): En-Reduktase-Screening

Es wird eine unter 8.3.10 hergestellte Screeningplatte verwendet. In jedes Well werden zuerst 475 µL Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg Bsp-GDH CDX901/100 mL) pipettiert. Anschließend werden 0.5 mg des zu testenden Substrates (gelöst in 25 – 50 µL eines geeigneten Lösungsmittels) zupipettiert. Die Platte wird abgedeckt bei Raumtemperatur für 24 h auf dem Plattenschüttler (750 U/min) inkubiert. Nach der

Inkubationszeit werden die Platten kurz zentrifugiert um eine Kreuzkontamination zu verhindern. Das Enzym GOx-ER wird unter identischen Bedingungen in einem 2.0 mL-Eppendorf-Tube gescreent. Zum Beenden der Reaktion werden, abhängig von der Analysenmethode des zu testenden Substrates, 0.5 – 1.0 mL Acetonitril zugegeben, oder die Proben in Fiolax-Röhrchen überführt und mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert. Proben, die mit Acetonitril versetzt wurden, werden anschließend auf dem Schüttler inkubiert, die Platte wird zentrifugiert (4000 rpm, 5 min) und der Umsatz wird mittels HPLC direkt aus den Lösungen in der Platte bestimmt. Proben, die mit Ethylacetat behandelt wurden, werden im Fiolax-Röhrchen extrahiert, die organische Phase wird mittels GC analysiert. Zur Bestimmung der Umsätze bei Messungen mittels HPLC wird vorab eine 1:1-Mischung aus Edukt und Produkt vermessen. Aus den Flächenintegralen der beiden Substanzen wird ein Faktor bestimmt, welcher bei der Umsatz-Bestimmung berücksichtigt wird. Bei Messungen mittels GC wird dieser Wert gleich 1 gesetzt. Es wird ein Umsatz bestimmt (Verhältnis Produkt zu der Summe aus Edukt und Produkt) und ein apparenter Umsatz (Verhältnis Produkt zu der Summe aus Edukt, Produkt und allen Nebenprodukten, die Extinktionskoeffizienten der Nebenprodukte/Verunreinigungen sind nicht bekannt).

### 8.3.11.1 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropan (**3a**)



Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an AAV4 mit MES-Puffer (30 mM, pH 6.6, 2 mM  $MgCl_2$ , 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg 1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropan (**5a**) in 25  $\mu$ L 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird jedes Well mit 0.5 mL Acetonitril versetzt, der Umsatz wird mittels HPLC bestimmt. Zur Bestimmung des ee-Werts wird mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert, das Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in Ethanol aufgenommen.

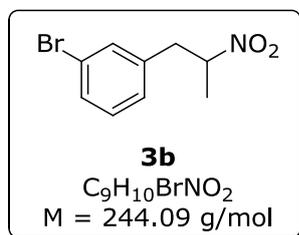
**IPC: HPLC** (X-Bridge C18, 2.5  $\mu$ m, 2.1 x 50 mm; 220 nm, 1 mL/min, 50°C, A:  $H_2O+0.1\%TFA$ , B:  $ACN+0.1\%TFA$ ; Gradient: 90%A -> 10%A 3min):  $t_r(\mathbf{5a}) = 2.02 \text{ min}$ ,  $t_r(\mathbf{3a}) = 1.92 \text{ min}$ ; **chirale HPLC** (Chiralcel OD-3, 150 x 4.6 mm, 3 $\mu$ m; 92% Heptan, 8% 2-Propanol, 1 mL/min, 220 nm, 25°C):  $t_r((S)\text{-}\mathbf{3a}) = 3.94 \text{ min}$ ,  $t_r((R)\text{-}\mathbf{3a}) = 4.40 \text{ min}$ .

**Tabelle 13.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **5a**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	96	97	6	OYE3 <sub>pET28</sub>	6	6	nb	Ene-109	57	91	nb
OPR1 <sub>pQR1</sub>	94	96	1	OYE3 <sub>pQR1</sub>	97	97	11	Ene-110	64	93	nb
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	14	14	nb	Ene-101	73	95	nb	Ene-111	91	95	84
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	35	35	9	Ene-102	86	93	74	Ene-112	39	92	nb
XenB <sub>pET28</sub>	96	98	-29	Ene-103	35	90	nb	Ene-113	86	90	11
XenB <sub>pQR1</sub>	97	97	-4	Ene-104	94	96	36	Ene-114	51	93	nb
NCR <sub>pET28</sub>	97	97	-65	Ene-105	59	95	nb	Ene-115	84	89	12
NCR <sub>pQR1</sub>	96	98	-71	Ene-106	67	95	nb	Ene-116	43	53	nb
DBVPG <sub>pET28</sub>	97	97	30	Ene-107	68	96	nb	BL21(DE3)	12	12	nb
DBVPG <sub>pQR1</sub>	11	11	nb	Ene-108	42	88	nb	GOx-ER	92	98	-56

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt; Die unterschiedlichen Absorptionsverhalten von Edukt und Produkt wurden bei der Umsatzbestimmung berücksichtigt.

### 8.3.11.2 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropan (**3b**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg 1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropan (**5b**) in 25  $\mu$ L 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird jedes Well mit 0.5 mL Acetonitril versetzt, der Umsatz wird mittels HPLC bestimmt. Zur Bestimmung des ee-Werts wird mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert, das Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in Ethanol aufgenommen.

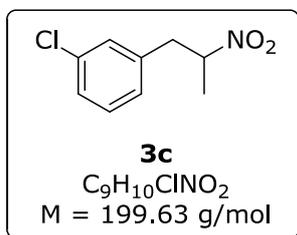
**IPC: HPLC** (X-Bridge C18, 2.5  $\mu$ m, 2.1 x 50 mm; 220 nm, 1 mL/min, 50°C, A: H<sub>2</sub>O+0.1%TFA, B: ACN+0.1%TFA; Gradient: 90%A -> 10%A 3min):  $t_r(\mathbf{5b}) = 2.02$  min,  $t_r(\mathbf{3b}) = 1.91$  min; **chirale HPLC** (Chiralcel AD-3, 150 x 4.6 mm, 3 $\mu$ m; 99.5% Heptan, 0.5% 2-Propanol, 1.5 mL/min, 210 nm, 20°C):  $t_r((S)\text{-}\mathbf{3b}) = 4.78$  min,  $t_r((R)\text{-}\mathbf{3b}) = 5.22$  min.

**Tabelle 14.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **5b**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	100	100	2	OYE3 <sub>pET28</sub>	6	7	nb	Ene-109	60	100	nb
OPR1 <sub>pQR1</sub>	95	100	-1	OYE3 <sub>pQR1</sub>	93	100	0	Ene-110	70	99	nb
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	17	19	3	Ene-101	81	97	nb	Ene-111	81	100	nb
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	22	24	10	Ene-102	72	100	nb	Ene-112	61	100	nb
XenB <sub>pET28</sub>	93	100	-34	Ene-103	35	100	nb	Ene-113	94	100	3
XenB <sub>pQR1</sub>	49	51	1	Ene-104	85	100	3	Ene-114	55	100	nb
NCR <sub>pET28</sub>	91	100	-70	Ene-105	64	100	nb	Ene-115	52	58	7
NCR <sub>pQR1</sub>	94	100	-58	Ene-106	69	100	nb	Ene-116	53	58	7
DBVPG <sub>pET28</sub>	100	100	-1	Ene-107	70	100	nb	BL21(DE3)	21	22	14
DBVPG <sub>pQR1</sub>	8	8	nb	Ene-108	65	100	nb	GOx-ER	90	100	-43

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt; Die unterschiedlichen Absorptionsverhalten von Edukt und Produkt wurden bei der Umsatzbestimmung berücksichtigt.

### 8.3.11.3 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropan (**3c**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg 1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropan (**5c**) in 25  $\mu$ L 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird jedes Well mit 0.5 mL Acetonitril versetzt, der Umsatz wird mittels HPLC bestimmt. Zur Bestimmung des ee-Werts wird mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert, das Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in Ethanol aufgenommen.

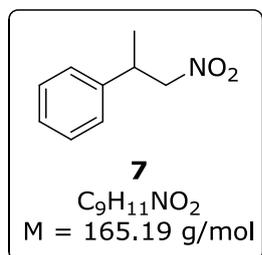
**IPC: HPLC** (X-Bridge C18, 2.5  $\mu$ m, 2.1 x 50 mm; 220 nm, 1 mL/min, 50°C, A: H<sub>2</sub>O+0.1%TFA, B: ACN+0.1%TFA; Gradient: 90%A -> 10%A 3 min):  $t_r(\mathbf{5c}) = 1.96$  min,  $t_r(\mathbf{3c}) = 1.86$  min; **chirale HPLC** (Chiralpak AD-3, 150 x 4.6 mm, 3 $\mu$ m; 98% Heptan, 2% 2-Propanol, 1.5 mL/min, 220 nm, 20°C):  $t_r((S)\text{-}\mathbf{3c}) = 2.92$  min,  $t_r((R)\text{-}\mathbf{3c}) = 3.01$  min.

**Tabelle 15.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **5c**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	97	100	-7	OYE3 <sub>pET28</sub>	3	4	nb	Ene-109	51	100	nb
OPR1 <sub>pQR1</sub>	98	100	-8	OYE3 <sub>pQR1</sub>	98	100	-9	Ene-110	62	100	nb
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	7	8	nb	Ene-101	80	100	nb	Ene-111	77	100	nb
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	22	22	-14	Ene-102	68	100	nb	Ene-112	62	100	nb
XenB <sub>pET28</sub>	98	100	-37	Ene-103	35	100	nb	Ene-113	96	100	-6
XenB <sub>pQR1</sub>	43	43	-11	Ene-104	89	100	-5	Ene-114	52	83	nb
NCR <sub>pET28</sub>	99	100	-73	Ene-105	68	100	nb	Ene-115	58	61	-5
NCR <sub>pQR1</sub>	98	100	-60	Ene-106	75	100	nb	Ene-116	60	64	-5
DBVPG <sub>pET28</sub>	99	100	-9	Ene-107	72	100	nb	BL21(DE3)	13	13	nb
DBVPG <sub>pQR1</sub>	5	5	nb	Ene-108	70	100	nb	GOx-ER	96	100	-58

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; b: nicht bestimmt; Die unterschiedlichen Absorptionsverhalten von Edukt und Produkt wurden bei der Umsatzbestimmung berücksichtigt.

### 8.3.11.4 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 1-Nitro-2-phenylpropan (**7**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg 1-Nitro-2-phenylpropen (**6**) in 25  $\mu$ L 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird jedes Well mit 0.5 mL Acetonitril versetzt, der Umsatz wird mittels HPLC bestimmt. Zur Bestimmung des ee-Werts wird mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert, das Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in Ethanol aufgenommen.

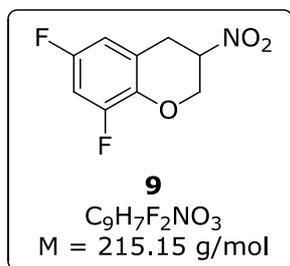
**IPC: HPLC** (Kintex 2.6 $\mu$  XB – C18 100A, 4.6 x 50 mm; 210 nm, 1 mL/min, 50°C, A: H<sub>2</sub>O+0.1%TFA, B: ACN+0.1%TFA; Gradient: 90%A -> 10%A 3 min):  $t_r(\mathbf{6}) = 2.61$  min,  $t_r(\mathbf{7}) = 2.55$  min; **chirale HPLC** (Chiralcel OD-3, 150 x 4.6 mm, 3 $\mu$ m; 90% Heptan, 10% 2-Propanol, 1.5 mL/min, 210 nm, 25°C):  $t_r(\mathbf{E1}) = 4.87$  min,  $t_r(\mathbf{E2}) = 6.42$  min.

**Tabelle 16.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **6**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]
OPR1 <sub>PET28</sub>	4	11	nb	OYE3 <sub>PET28</sub>	0	0	nb	Ene-109	83	98	60
OPR1 <sub>pQR1</sub>	41	74	nb	OYE3 <sub>pQR1</sub>	16	37	nb	Ene-110	70	96	40
OYE2.6 <sub>PET28</sub>	0	0	nb	Ene-101	12	34	nb	Ene-111	100	100	99
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	1	4	nb	Ene-102	95	100	98	Ene-112	100	100	81
XenB <sub>PET28</sub>	6	16	nb	Ene-103	95	100	95	Ene-113	10	30	nb
XenB <sub>pQR1</sub>	1	3	nb	Ene-104	37	70	nb	Ene-114	95	100	95
NCR <sub>PET28</sub>	99	100	-100	Ene-105	95	100	95	Ene-115	3	11	nb
NCR <sub>pQR1</sub>	100	100	-100	Ene-106	99	100	97	Ene-116	4	12	nb
DBVPG <sub>PET28</sub>	17	40	nb	Ene-107	97	100	94	BL21(DE3)	1	3	nb
DBVPG <sub>pQR1</sub>	1	2	nb	Ene-108	22	49	nb	GOx-ER	94	100	-100

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt; Die unterschiedlichen Absorptionsverhalten von Edukt und Produkt wurden bei der Umsatzbestimmung berücksichtigt.

### 8.3.11.5 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 6,8-Difluor-3-nitrochroman (**9**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg 6,8-Difluor-3-nitro-2H-chromen (**8**) in 50  $\mu$ L 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird jedes Well mit 0.5 mL Acetonitril versetzt, der Umsatz wird mittels HPLC bestimmt. Zur Bestimmung des ee-Werts wird mit 0.5 mL

Ethylacetat extrahiert, das Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in Ethanol aufgenommen.

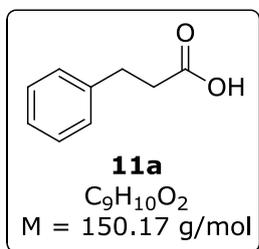
**IPC:** HPLC (X-Bridge C18, 2.5  $\mu$ m, 2.1 x 50 mm; 210 nm, 1 mL/min, 50°C, A: H<sub>2</sub>O+0.1%TFA, B: ACN+0.1%TFA; Gradient: 90%A -> 10%A 3min):  $t_r(\mathbf{8})$  = 1.66 min,  $t_r(\mathbf{9})$  = 1.47 min; **chirale HPLC** (Chiralcel OJ-3, 150 x 4.6 mm, 3 $\mu$ m; 95% Heptan, 5% 2-Propanol, 2.0 mL/min, 210 nm, 30°C):  $t_r(\mathbf{E1})$  = 13.60 min,  $t_r(\mathbf{E2})$  = 14.90 min.

**Tabelle 17.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **8**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	19	26	-16	OYE3 <sub>pET28</sub>	3	3	nb	Ene-109	79	100	0
OPR1 <sub>pQR1</sub>	92	96	0	OYE3 <sub>pQR1</sub>	13	17	nb	Ene-110	76	98	0
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	3	4	nb	Ene-101	77	94	0	Ene-111	81	97	0
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	5	6	nb	Ene-102	79	97	0	Ene-112	77	100	0
XenB <sub>pET28</sub>	32	45	-6	Ene-103	79	98	0	Ene-113	19	25	-13
XenB <sub>pQR1</sub>	5	6	nb	Ene-104	30	38	-13	Ene-114	86	98	0
NCR <sub>pET28</sub>	20	26	-11	Ene-105	73	94	0	Ene-115	12	16	nb
NCR <sub>pQR1</sub>	35	50	-1	Ene-106	79	96	0	Ene-116	6	8	nb
DBVPG <sub>pET28</sub>	13	17	nb	Ene-107	79	98	0	BL21(DE3)	3	3	nb
DBVPG <sub>pQR1</sub>	3	3	nb	Ene-108	79	97	0	GOx-ER	42	51	0

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt; Die unterschiedlichen Absorptionsverhalten von Edukt und Produkt wurden bei der Umsatzbestimmung berücksichtigt.

### 8.3.11.6 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 3-Phenylpropansäure (**11a**) ausgehend von *trans*-Zimtsäure ((*E*)-**10a**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg *trans*-Zimtsäure ((*E*)-**10a**) in 25  $\mu$ L 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird jedes Well mit 0.5 mL Acetonitril versetzt, der Umsatz wird mittels HPLC bestimmt.

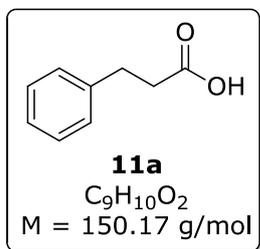
**IPC: HPLC** (X-Bridge C18, 2.5  $\mu$ m, 2.1 x 50 mm; 205 nm, 1 mL/min, 50°C, A: H<sub>2</sub>O+0.1%TFA, B: ACN+0.1%TFA; Gradient: 90%A -> 10%A 3 min):  $t_r$ ((*E*)-**10a**) = 1.25 min,  $t_r$ (**11a**) = 1.20 min.

**Tabelle 18.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat (*E*)-**10a**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	0	0	OYE3 <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-109	0	0
OPR1 <sub>pQR1</sub>	0	0	OYE3 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-110	0	0
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-101	0	0	Ene-111	0	0
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-102	0	0	Ene-112	0	0
XenB <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-103	0	0	Ene-113	0	0
XenB <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-104	0	0	Ene-114	0	0
NCR <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-105	0	0	Ene-115	0	0
NCR <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-106	0	0	Ene-116	0	0
DBVPG <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-107	0	0	BL21(DE3)	0	0
DBVPG <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-108	0	0	GOx-ER	0	0

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; Die unterschiedlichen Absorptionsverhalten von Edukt und Produkt wurden bei der Umsatzbestimmung berücksichtigt.

### 8.3.11.7 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 3-Phenylpropansäure (**11a**) ausgehend von *cis*-Zimtsäure ((*Z*)-**10a**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg *cis*-Zimtsäure ((*Z*)-**10a**) in 25 µL 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird jedes Well mit 0.5 mL Acetonitril versetzt, der Umsatz wird mittels HPLC bestimmt.

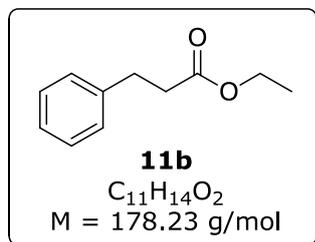
**IPC: HPLC** (X-Bridge C18, 2.5 µm, 2.1 x 50 mm; 205 nm, 1 mL/min, 50°C, A: H<sub>2</sub>O+0.1%TFA, B: ACN+0.1%TFA; Gradient: 90%A -> 10%A 4min); t<sub>r</sub>((*Z*)-**10a**) = 1.05 min, t<sub>r</sub>(**11a**) = 1.18 min.

**Tabelle 19.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat (*Z*)-**10a**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	0	0	OYE3 <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-109	0	0
OPR1 <sub>pQR1</sub>	0	0	OYE3 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-110	0	0
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-101	0	0	Ene-111	0	0
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-102	0	0	Ene-112	1	1
XenB <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-103	0	0	Ene-113	0	0
XenB <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-104	0	0	Ene-114	0	0
NCR <sub>pET28</sub>	1	1	Ene-105	0	0	Ene-115	0	0
NCR <sub>pQR1</sub>	1	1	Ene-106	0	0	Ene-116	0	0
DBVPG <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-107	0	0	BL21(DE3)	0	0
DBVPG <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-108	0	0	GOx-ER	1	1

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; Die unterschiedlichen Absorptionsverhalten von Edukt und Produkt wurden bei der Umsatzbestimmung berücksichtigt.

### 8.3.11.8 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 3-Phenylpropansäureethylester (**11b**)



Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an AAV4 mit MES-Puffer (30 mM, pH 6.6, 2 mM  $MgCl_2$ , 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg *trans*-Zimtsäureethylester (*E*-**10b**) in 25  $\mu$ L 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird jedes Well mit 0.5 mL Acetonitril versetzt, der Umsatz wird mittels HPLC bestimmt.

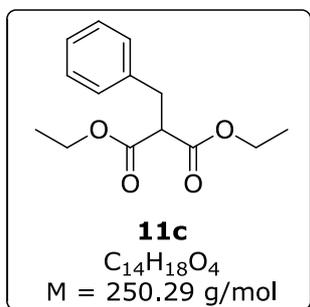
**IPC:** HPLC (Kintex 2.6 $\mu$  XB – C18 100A, 4.6 x 50 mm; 200 nm, 1 mL/min, 50°C, A:  $H_2O+0.1\%TFA$ , B:  $ACN+0.1\%TFA$ ; Gradient: 90%A -> 10%A 3 min):  $t_r((E)\text{-10b}) = 1.82 \text{ min}$ ,  $t_r(\text{11b}) = 1.78 \text{ min}$ .

**Tabelle 20.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat (*E*-**10b**)

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	0	0	OYE3 <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-109	0	0
OPR1 <sub>pQR1</sub>	0	0	OYE3 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-110	0	0
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-101	0	0	Ene-111	0	0
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-102	0	0	Ene-112	0	0
XenB <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-103	0	0	Ene-113	0	0
XenB <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-104	0	0	Ene-114	0	0
NCR <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-105	0	0	Ene-115	0	0
NCR <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-106	0	0	Ene-116	0	0
DBVPG <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-107	0	0	BL21(DE3)	0	0
DBVPG <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-108	0	0	GOx-ER	0	0

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; Die unterschiedlichen Absorptionsverhalten von Edukt und Produkt wurden bei der Umsatzbestimmung berücksichtigt.

### 8.3.11.9 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 2-Benzylmalonsäurediethylester (**11c**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg 2-Benzylidenmalonsäurediethylester (**10c**) in 25  $\mu$ L 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert, der Umsatz wird aus der organischen Phase mittels GC bestimmt.

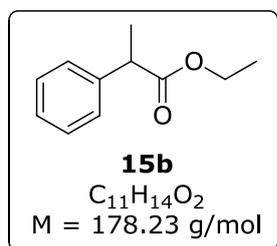
**IPC:** GC (19091J-413 HP-5. 30m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m, H<sub>2</sub>, 80°C, mit 40°C/min auf 250°C):  $t_r(\mathbf{10c}) = 2.49$  min,  $t_r(\mathbf{11c}) = 2.18$  min.

**Tabelle 21.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **10c**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	4	4	OYE3 <sub>pET28</sub>	1	1	Ene-109	0	0
OPR1 <sub>pQR1</sub>	0	0	OYE3 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-110	0	0
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	1	1	Ene-101	0	0	Ene-111	0	0
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-102	0	0	Ene-112	0	0
XenB <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-103	0	0	Ene-113	0	0
XenB <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-104	0	0	Ene-114	0	0
NCR <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-105	0	0	Ene-115	0	0
NCR <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-106	0	0	Ene-116	0	0
DBVPG <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-107	0	0	BL21(DE3)	0	0
DBVPG <sub>pQR1</sub>	3	3	Ene-108	0	0	GOx-ER	0	0

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral

### 8.3.11.10 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 2-Phenylpropansäureethylester (**15b**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg 2-Phenylacrylsäureethylester (**14b**) in 25  $\mu\text{L}$  2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert, Umsatz und ee-Wert werden aus der organischen Phase mittels GC bestimmt.

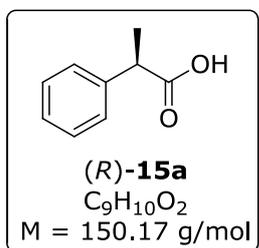
**IPC: GC** (19091J-413 HP-5, 30m x 0.32 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ,  $\text{H}_2$ , 80°C, mit 40°C/min auf 250°C):  $t_{\text{r}}(\mathbf{14b}) = 1.17 \text{ min}$ ,  $t_{\text{r}}(\mathbf{15b}) = 0.99 \text{ min}$ ; **chirale GC** (BGB 178, 30 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ,  $\text{H}_2$ , 90°C isotherm für 25 min, mit 50°C/min auf 180°C, 180°C isotherm für 3.2 min):  $t_{\text{r}}((S)\text{-}\mathbf{15b}) = 21.83 \text{ min}$ ,  $t_{\text{r}}((R)\text{-}\mathbf{15b}) = 22.14 \text{ min}$ .

**Tabelle 22.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **14b**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	10	11	-3	OYE3 <sub>pET28</sub>	3	3	nb	Ene-109	3	3	nb
OPR1 <sub>pQR1</sub>	2	2	nb	OYE3 <sub>pQR1</sub>	0	0	nb	Ene-110	2	3	nb
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	0	0	nb	Ene-101	0	0	nb	Ene-111	0	0	nb
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	0	0	nb	Ene-102	0	0	nb	Ene-112	0	0	nb
XenB <sub>pET28</sub>	0	0	nb	Ene-103	0	0	nb	Ene-113	0	0	nb
XenB <sub>pQR1</sub>	0	0	nb	Ene-104	0	0	nb	Ene-114	9	11	-100 <sup>a)</sup>
NCR <sub>pET28</sub>	0	0	nb	Ene-105	0	0	nb	Ene-115	0	0	nb
NCR <sub>pQR1</sub>	0	0	nb	Ene-106	0	0	nb	Ene-116	0	0	nb
DBVPG <sub>pET28</sub>	0	0	nb	Ene-107	0	0	nb	BL21(DE3)	0	0	nb
DBVPG <sub>pQR1</sub>	11	11	-4	Ene-108	11	12	-1	GOx-ER	0	0	nb

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt; a) Der ee-Wert resultiert aus einem analogen Versuch im 1.5 mL-Eppendorff-Gefäß

### 8.3.11.11 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 2-Phenylpropansäure (**15a**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg 2-Phenylacrylsäure (**14a**) in 25  $\mu$ L 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert, der Umsatz wird aus der organischen Phase mittels GC bestimmt. Der ee-Wert wird mittels HPLC aus der organischen Phase

bestimmt.

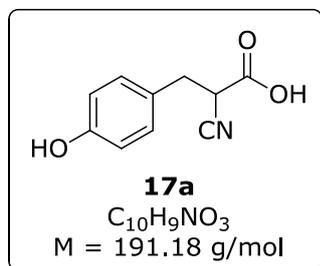
**IPC: GC** (19091J-413 HP-5. 30m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m, H<sub>2</sub>, 80°C, mit 40°C/min auf 250°C):  $t_r(\mathbf{14a}) = 1.23$  min,  $t_r(\mathbf{15a}) = 1.09$  min; **chirale HPLC** (Chiralpak IB-3, 150 x 4.6 mm, 3 $\mu$ m; 96% Heptan+0.1%TFA, 4% 2-Propanol, 1.0 mL/min, 210 nm, 20°C):  $t_r((S)\text{-}\mathbf{15a}) = 3.48$  min,  $t_r((R)\text{-}\mathbf{15a}) = 3.71$  min.

**Tabelle 23.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **14a**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	15	16	nb	OYE3 <sub>pET28</sub>	4	4	nb	Ene-109	3	3	nb
OPR1 <sub>pQR1</sub>	6	6	nb	OYE3 <sub>pQR1</sub>	0	0	nb	Ene-110	2	2	nb
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	0	0	nb	Ene-101	0	0	nb	Ene-111	0	0	nb
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	0	0	nb	Ene-102	0	0	nb	Ene-112	0	0	nb
XenB <sub>pET28</sub>	0	0	nb	Ene-103	0	0	nb	Ene-113	0	0	nb
XenB <sub>pQR1</sub>	0	0	nb	Ene-104	0	0	nb	Ene-114	0	0	nb
NCR <sub>pET28</sub>	3	3	nb	Ene-105	0	0	nb	Ene-115	0	0	nb
NCR <sub>pQR1</sub>	7	8	nb	Ene-106	0	0	nb	Ene-116	0	0	nb
DBVPG <sub>pET28</sub>	0	0	nb	Ene-107	0	0	nb	BL21(DE3)	0	0	nb
DBVPG <sub>pQR1</sub>	13	13	nb	Ene-108	10	10	nb	GOx-ER	50	52	100

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral;nb: nicht bestimmt

### 8.3.11.12 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 2-Cyano-3-(4-hydroxyphenyl)propansäure (**17a**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg (*E*)-2-Cyano-3-(4-hydroxyphenyl)acrylsäure (**16a**) in 25  $\mu$ L DMSO. Zum Beenden der Reaktion wird jedes Well mit 0.5 mL Acetonitril versetzt, der Umsatz wird mittels HPLC bestimmt.

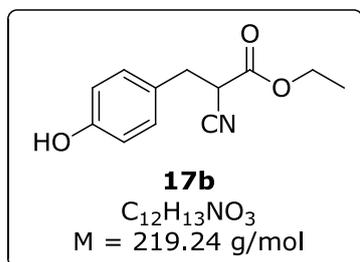
**IPC:** HPLC (X-Bridge C18, 2.5  $\mu$ m, 2.1 x 50 mm; 210 nm, 1 mL/min, 50°C, A: H<sub>2</sub>O+0.1%TFA, B: ACN+0.1%TFA; Gradient: 90%A -> 10%A 3min):  $t_r(\mathbf{16a}) = 0.72$  min,  $t_r(\mathbf{17a}) = 0.51$  min.

**Tabelle 24.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **16a**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	0	0	OYE3 <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-109	0	0
OPR1 <sub>pQR1</sub>	0	0	OYE3 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-110	0	0
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-101	0	0	Ene-111	3	3
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-102	4	4	Ene-112	0	0
XenB <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-103	0	0	Ene-113	0	0
XenB <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-104	0	0	Ene-114	0	0
NCR <sub>pET28</sub>	11	11	Ene-105	6	6	Ene-115	0	0
NCR <sub>pQR1</sub>	26	26	Ene-106	0	0	Ene-116	0	0
DBVPG <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-107	0	0	BL21(DE3)	0	0
DBVPG <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-108	0	0	GOx-ER	19	19

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt; Die unterschiedlichen Absorptionsverhalten von Edukt und Produkt wurden bei der Umsatzbestimmung berücksichtigt.

### 8.3.11.13 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 2-Cyano-3-(4-hydroxyphenyl)-propansäureethylester (**17b**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg (*E*)-2-Cyano-3-(4-hydroxyphenyl)acrylsäureethylester (**16b**) in 25 µL 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert, der Umsatz wird aus der organischen Phase mittels GC bestimmt. Zur Bestimmung des ee-Werts wird das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in Ethanol aufgenommen. EI-MS: m/z = 219 [**17b**].

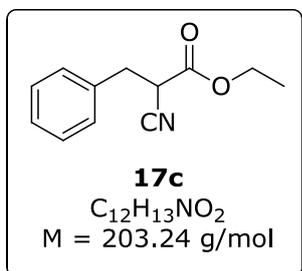
**IPC: GC-** (19091J-413 HP-5, 30m x 0.32 mm x 0.25 µm, H<sub>2</sub>, 80°C, mit 40°C/min auf 250°C, 250°C für 3 min): t<sub>r</sub>(**16b**) = 3.34 min, t<sub>r</sub>(**17b**) = 2.75 min; **chirale HPLC** (Chiralpak AY-3, 150 x 4.6 mm, 3µm; 95% Heptan, 5% Ethanol, 0,01% TFA, 2.0 mL/min, 228 nm, 40°C): t<sub>r</sub>(E1) = 6.18 min, t<sub>r</sub>(E2) = 8.45 min.

**Tabelle 25.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **16b**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	3	3	nb	OYE3 <sub>pET28</sub>	0	0	nb	Ene-109	29	41	nb
OPR1 <sub>pQR1</sub>	23	26	nb	OYE3 <sub>pQR1</sub>	2	2	nb	Ene-110	34	48	nb
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	6	7	nb	Ene-101	28	34	nb	Ene-111	21	30	nb
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	3	4	nb	Ene-102	10	16	nb	Ene-112	11	14	nb
XenB <sub>pET28</sub>	14	17	nb	Ene-103	7	22	nb	Ene-113	10	12	nb
XenB <sub>pQR1</sub>	4	5	nb	Ene-104	4	5	nb	Ene-114	88	93	0
NCR <sub>pET28</sub>	4	5	nb	Ene-105	6	11	nb	Ene-115	46	54	nb
NCR <sub>pQR1</sub>	8	9	nb	Ene-106	3	3	nb	Ene-116	20	24	nb
DBVPG <sub>pET28</sub>	4	5	nb	Ene-107	84	88	0	BL21(DE3)	8	9	nb
DBVPG <sub>pQR1</sub>	0	0	nb	Ene-108	25	30	nb	GOx-ER	32	33	1

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt

### 8.3.11.14 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 2-Cyano-3-phenylpropansäureethylester (**17c**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg (*E*)-2-Cyano-3-phenylacrylsäureethylester (**16c**) in 25  $\mu$ L 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird jedes Well mit 1.0 mL Acetonitril versetzt, der Umsatz wird mittels HPLC bestimmt. Zur Bestimmung des ee-Werts wird mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert, das Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in Ethanol aufgenommen.

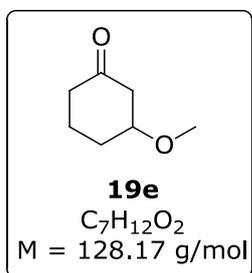
**IPC: HPLC** (X-Bridge C18, 2.5  $\mu$ m, 2.1 x 50 mm; 215 nm, 1 mL/min, 50°C, A: H<sub>2</sub>O+0.1%TFA, B: ACN+0.1%TFA; Gradient: 90%A -> 10%A 3min):  $t_r(\mathbf{16c}) = 1.75 \text{ min}$ ,  $t_r(\mathbf{17c}) = 1.59 \text{ min}$ ;  
**chirale HPLC** (Chiralpak AY-3, 150 x 4.6 mm, 3 $\mu$ m; 70% Heptan, 30% 2-Propanol, 1.0 mL/min, 210 nm, 40°C):  $t_r(\mathbf{E1}) = 3.51 \text{ min}$ ,  $t_r(\mathbf{E2}) = 3.87 \text{ min}$ .

**Tabelle 26.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **16c**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	37	68	9	OYE3 <sub>pET28</sub>	2	2	nb	Ene-109	48	97	0
OPR1 <sub>pQR1</sub>	60	98	1	OYE3 <sub>pQR1</sub>	13	16	nb	Ene-110	41	97	1
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	3	4	nb	Ene-101	17	35	4	Ene-111	32	95	1
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	3	4	nb	Ene-102	5	38	nb	Ene-112	17	85	nb
XenB <sub>pET28</sub>	36	48	0	Ene-103	15	90	nb	Ene-113	19	28	-1
XenB <sub>pQR1</sub>	6	8	-1	Ene-104	11	13	nb	Ene-114	89	98	0
NCR <sub>pET28</sub>	3	5	nb	Ene-105	12	69	nb	Ene-115	5	7	nb
NCR <sub>pQR1</sub>	5	100	nb	Ene-106	5	18	nb	Ene-116	4	6	nb
DBVPG <sub>pET28</sub>	14	19	4	Ene-107	84	100	2	BL21(DE3)	2	3	nb
DBVPG <sub>pQR1</sub>	2	2	nb	Ene-108	70	98	1	GOx-ER	40	61	0

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt; Die unterschiedlichen Absorptionsverhalten von Edukt und Produkt wurden bei der Umsatzbestimmung berücksichtigt.

### 8.3.11.15 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 3-Methoxycyclohexanon (**19e**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg 3-Methoxycyclohex-2-enon (**18e**) in 25  $\mu$ L 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert, der Umsatz wird aus der organischen Phase mittels GC bestimmt.

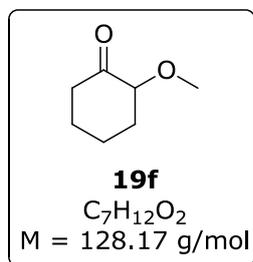
**IPC:** GC (19091J-413 HP-5. 30m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m, H<sub>2</sub>, 60°C, mit 40°C/min auf 250°C):  $t_r(\mathbf{18e}) = 1.21$  min,  $t_r(\mathbf{19e}) = 0.79$  min.

**Tabelle 27.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **18e**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	1	1	OYE3 <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-109	0	0
OPR1 <sub>pQR1</sub>	0	0	OYE3 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-110	0	0
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-101	0	0	Ene-111	0	0
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-102	0	0	Ene-112	0	0
XenB <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-103	0	0	Ene-113	0	0
XenB <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-104	0	0	Ene-114	0	0
NCR <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-105	0	0	Ene-115	0	0
NCR <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-106	0	0	Ene-116	0	0
DBVPG <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-107	0	0	BL21(DE3)	0	0
DBVPG <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-108	0	0	GOx-ER	0	0

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral

### 8.3.11.16 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 2-Methoxycyclohexanon (**19f**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg 2-Methoxycyclohex-2-enon (**18f**) in 25  $\mu$ L 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert, der Umsatz wird aus der organischen Phase mittels GC bestimmt.

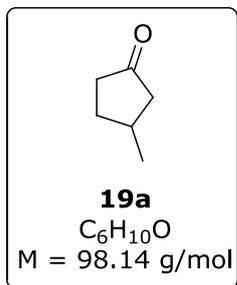
**IPC: GC** (19091J-413 HP-5. 30m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m, H<sub>2</sub>, 60°C, mit 40°C/min auf 250°C):  $t_r(\mathbf{18f}) = 1.11$  min,  $t_r(\mathbf{19f}) = 0.64$  min; **chirale GC** (Chiraldex B-TA, 40 m x 0.25 mm, 0.12  $\mu$ m, H<sub>2</sub>, 100°C isotherm für 1 min, mit 3°C/min auf 150°C, mit 20°C/min auf 180°C):  $t_r(\mathbf{E1}) = 5.35$  min,  $t_r(\mathbf{E2}) = 5.96$  min.

**Tabelle 28.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **18f**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	2	2	nb	OYE3 <sub>pET28</sub>	0	0	nb	Ene-109	84	94	97
OPR1 <sub>pQR1</sub>	14	16	-2	OYE3 <sub>pQR1</sub>	1	2	nb	Ene-110	89	98	98
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	27	30	98	Ene-101	1	1	nb	Ene-111	54	64	95
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	2	2	nb	Ene-102	26	28	91	Ene-112	88	98	97
XenB <sub>pET28</sub>	5	5	nb	Ene-103	12	14	86	Ene-113	8	9	nb
XenB <sub>pQR1</sub>	1	1	nb	Ene-104	2	2	nb	Ene-114	41	47	89
NCR <sub>pET28</sub>	13	15	78	Ene-105	85	95	87	Ene-115	2	2	nb
NCR <sub>pQR1</sub>	36	40	79	Ene-106	20	23	93	Ene-116	1	1	nb
DBVPG <sub>pET28</sub>	2	2	nb	Ene-107	84	97	89	BL21(DE3)	0	0	nb
DBVPG <sub>pQR1</sub>	1	1	nb	Ene-108	11	12	70	GOx-ER	9	10	45

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt

### 8.3.11.17 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 3-Methylcyclopentanon (**19a**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg 3-Methylcyclopent-2-enon (**18a**) in 25  $\mu$ L 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert, Umsatz und ee-Wert werden aus der organischen Phase mittels GC bestimmt.

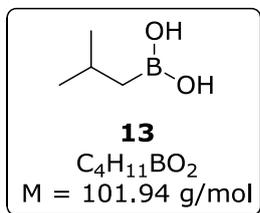
**IPC: GC** (19091J-413 HP-5, 30m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m, H<sub>2</sub>, 60°C, mit 40°C/min auf 250°C):  $t_r(\mathbf{18a}) = 0.79$  min,  $t_r(\mathbf{19a}) = 0.49$  min; **chirale GC** (Chiraldex B-TA, 40 m x 0.25 mm, 0.12  $\mu$ m, H<sub>2</sub>, 70°C isotherm für 15 min, mit 5°C/min auf 180°C, 180°C isotherm für 3 min):  $t_r(\mathbf{E1}) = 11.58$  min,  $t_r(\mathbf{E2}) = 11.95$  min.

**Tabelle 29.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **18a**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	0	0	nb	OYE3 <sub>pET28</sub>	1	1	nb	Ene-109	17	17	100
OPR1 <sub>pQR1</sub>	1	1	nb	OYE3 <sub>pQR1</sub>	1	5	nb	Ene-110	15	15	97
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	1	1	nb	Ene-101	1	1	nb	Ene-111	33	33	100
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	0	0	nb	Ene-102	9	9	nb	Ene-112	32	32	100
XenB <sub>pET28</sub>	0	0	nb	Ene-103	9	9	nb	Ene-113	2	2	nb
XenB <sub>pQR1</sub>	0	0	nb	Ene-104	1	1	nb	Ene-114	1	1	nb
NCR <sub>pET28</sub>	4	4	nb	Ene-105	49	49	95	Ene-115	1	1	nb
NCR <sub>pQR1</sub>	11	11	95	Ene-106	7	7	nb	Ene-116	2	2	nb
DBVPG <sub>pET28</sub>	1	1	nb	Ene-107	2	2	nb	BL21(DE3)	0	0	nb
DBVPG <sub>pQR1</sub>	1	1	nb	Ene-108	2	2	nb	GOx-ER	11	11	94

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt

### 8.3.11.18 En-Reduktase-Screening zur Synthese von *iso*-Butylboronsäure (**13**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg (2-Methylprop-1-en-1-yl)boronsäure (**12**) in 25  $\mu\text{L}$  2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert, der Extrakt wird mit 1.0 mL Methanol versetzt.

Der Umsatz wird aus der organischen Phase mittels GC bestimmt.

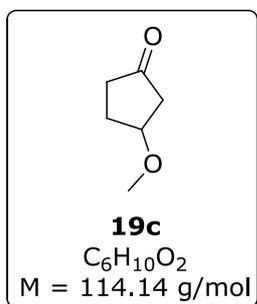
**IPC: GC** (19091J-413 HP-5. 30m x 0.32 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ,  $\text{H}_2$ , 40°C, mit 40°C/min auf 250°C):  $t_r(\mathbf{12}) = 0.51 \text{ min}$ ,  $t_r(\mathbf{13}) = 0.40 \text{ min}$ .

**Tabelle 30.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **12**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	0	0	OYE3 <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-109	0	0
OPR1 <sub>pQR1</sub>	0	0	OYE3 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-110	0	0
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-101	0	0	Ene-111	0	0
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-102	0	0	Ene-112	0	0
XenB <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-103	0	0	Ene-113	0	0
XenB <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-104	0	0	Ene-114	0	0
NCR <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-105	0	0	Ene-115	0	0
NCR <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-106	0	0	Ene-116	0	0
DBVPG <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-107	0	0	BL21(DE3)	0	0
DBVPG <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-108	0	0	GOx-ER	0	0

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral

### 8.3.11.19 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 3-Methoxycyclopentanon (**19c**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg 3-Methoxycyclopent-2-enon (**18c**) in 25 µL 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert, der Umsatz wird aus der organischen Phase mittels GC bestimmt.

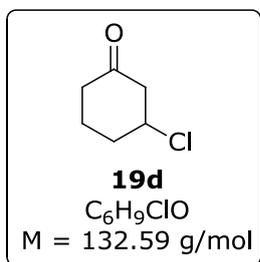
**IPC: GC** (19091J-413 HP-5, 30m x 0.32 mm x 0.25 µm, H<sub>2</sub>, 80°C, mit 40°C/min auf 250°C):  $t_r(\mathbf{18c}) = 0.65$  min,  $t_r(\mathbf{19c}) =$  nicht bekannt.

**Tabelle 31.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **18c**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	0	0	OYE3 <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-109	0	0
OPR1 <sub>pQR1</sub>	0	0	OYE3 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-110	0	0
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-101	0	0	Ene-111	0	0
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-102	0	0	Ene-112	0	0
XenB <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-103	0	0	Ene-113	0	0
XenB <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-104	0	0	Ene-114	0	0
NCR <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-105	0	0	Ene-115	0	0
NCR <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-106	0	0	Ene-116	0	0
DBVPG <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-107	0	0	BL21(DE3)	0	0
DBVPG <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-108	0	0	GOx-ER	0	0

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral

### 8.3.11.20 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 3-Chlorcyclohexanon (**19d**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg 3-Chlorcyclohex-2-enon (**18d**) in 25 µL 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird jedes Well mit 0.5 mL Acetonitril versetzt, der Umsatz wird mittels HPLC bestimmt.

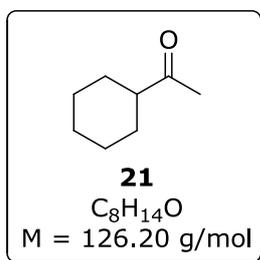
**IPC: HPLC** (X-Bridge C18, 2.5 µm, 2.1 x 50 mm; 240 nm, 1 mL/min, 50°C, A: H<sub>2</sub>O+0.1%TFA, B: ACN+0.1%TFA; Gradient: 90%A -> 10%A 3min): t<sub>r</sub>(**18d**) = 0.80 min, t<sub>r</sub>(**19d**) = nicht bekannt.

**Tabelle 32.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **18d**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	0	0	OYE3 <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-109	0	0
OPR1 <sub>pQR1</sub>	0	0	OYE3 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-110	0	0
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-101	0	0	Ene-111	0	0
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-102	0	0	Ene-112	0	0
XenB <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-103	0	0	Ene-113	0	0
XenB <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-104	0	0	Ene-114	0	0
NCR <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-105	0	0	Ene-115	0	0
NCR <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-106	0	0	Ene-116	0	0
DBVPG <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-107	0	0	BL21(DE3)	0	0
DBVPG <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-108	0	0	GOx-ER	0	0

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral

### 8.3.11.21 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 1-Cyclohexylethanon (**21**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg 1-(Cyclohex-1-en-1-yl)ethanon (**20**) in 25  $\mu$ L 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert, der Umsatz wird aus der organischen Phase mittels GC bestimmt.

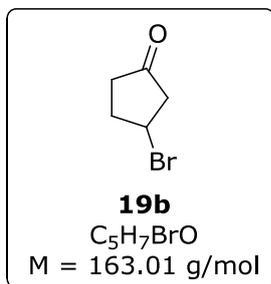
**IPC: GC** (19091J-413 HP-5, 30m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m, H<sub>2</sub>, 80°C, mit 40°C/min auf 250°C):  $t_r(\mathbf{20})$  = 0.60 min,  $t_r(\mathbf{21})$  = 0.46 min.

**Tabelle 33.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **20**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	4	5	OYE3 <sub>pET28</sub>	1	1	Ene-109	96	96
OPR1 <sub>pQR1</sub>	61	61	OYE3 <sub>pQR1</sub>	4	4	Ene-110	98	98
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	33	33	Ene-101	57	57	Ene-111	99	99
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	4	4	Ene-102	98	98	Ene-112	81	81
XenB <sub>pET28</sub>	62	62	Ene-103	98	98	Ene-113	17	17
XenB <sub>pQR1</sub>	6	6	Ene-104	10	10	Ene-114	86	86
NCR <sub>pET28</sub>	96	96	Ene-105	96	96	Ene-115	4	4
NCR <sub>pQR1</sub>	100	100	Ene-106	99	99	Ene-116	2	2
DBVPG <sub>pET28</sub>	7	7	Ene-107	99	99	BL21(DE3)	1	1
DBVPG <sub>pQR1</sub>	4	4	Ene-108	32	34	GOx-ER	98	100

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral

### 8.3.11.22 En-Reduktase-Screening zur Synthese von 3-Bromcyclopentanon (**19b**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV4 mit Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0, 0.25 M D-Glucose, 0.34 mM NADPH, 2.5 mg GDH CDX901/100 mL) und 0.5 mg 3-Bromcyclopent-2-enon (**18b**) in 50  $\mu$ L 2-Propanol. Zum Beenden der Reaktion wird jedes Well mit 0.5 mL Acetonitril versetzt, der Umsatz wird mittels HPLC bestimmt.

**IPC: HPLC** (X-Bridge C18, 2.5  $\mu$ m, 2.1 x 50 mm; 240 nm, 1 mL/min, 50°C, A: H<sub>2</sub>O+0.1%TFA, B: ACN+0.1%TFA; Gradient: 90%A -> 10%A 3min):  $t_r(\mathbf{18b}) = 0.23$  min,  $t_r(\mathbf{19b}) =$  nicht bekannt.

**Tabelle 34.** Ergebnisse des En-Reduktase-Screenings mit Substrat **18b**

Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]	Enzym	App. Ums. [%]	Ums. [%]
OPR1 <sub>pET28</sub>	0	0	OYE3 <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-109	0	0
OPR1 <sub>pQR1</sub>	0	0	OYE3 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-110	0	0
OYE2.6 <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-101	0	0	Ene-111	0	0
OYE2.6 <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-102	0	0	Ene-112	0	0
XenB <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-103	0	0	Ene-113	0	0
XenB <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-104	0	0	Ene-114	0	0
NCR <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-105	0	0	Ene-115	0	0
NCR <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-106	0	0	Ene-116	0	0
DBVPG <sub>pET28</sub>	0	0	Ene-107	0	0	BL21(DE3)	0	0
DBVPG <sub>pQR1</sub>	0	0	Ene-108	0	0	GOx-ER	0	0

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral

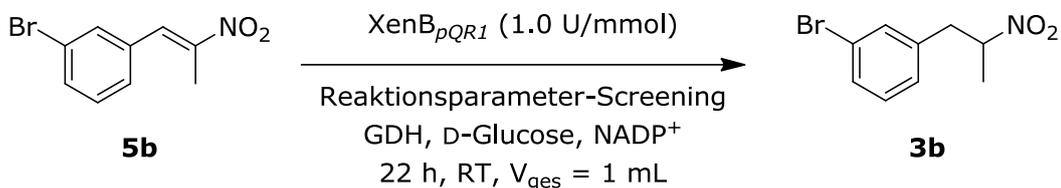
### 8.3.12 Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 (AAV5): Reaktionsparameter-Screening

In ein Fiolax-Röhrchen wird D-Glucose-Monohydrat (64.0 mg, 0.3 mmol) eingewogen und in der entsprechenden Reaktionsparameter-Screening-Lösung (1.41 mL) gelöst. Anschließend werden 10  $\mu\text{L}$  einer NADP<sup>+</sup>-Stammlösung (18.0 mg NADP<sup>+</sup> in 0.5 mL H<sub>2</sub>O, entspricht 0.5  $\mu\text{mol}$  NADP<sup>+</sup> pro Versuch) und 10  $\mu\text{L}$  einer GDH-Stammlösung (1.8 mg GDH in 0.5 mL H<sub>2</sub>O, entspricht 36  $\mu\text{g}$  GDH pro Versuch) zugegeben. Das zu testende Enzym wird in H<sub>2</sub>O gelöst und zur Reaktionsmischung gegeben. Das zu testende Substrat wird in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und zur Reaktionsmischung gegeben. Das Enzym-zu-Substrat-Verhältnis wird so gewählt, dass der Umsatz beim blank-Versuch zwischen 30% und 60% liegt. Das Gesamtvolumen beträgt 1.5 mL, die gewählten Substrat- und Enzymkonzentrationen sind in den nachfolgenden Versuchen beschrieben. Die Fiolax-Röhrchen werden für 22 h im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Proben mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird entnommen und je nach Substrat mittels GC untersucht, und/oder im Stickstoffstrom eingeengt und mittels HPLC analysiert. Zur Bestimmung der Umsätze bei Messungen mittels HPLC wird vorab eine 1:1-Mischung aus Edukt und Produkt vermessen. Aus den Flächenintegralen der beiden Substanzen wird ein Faktor bestimmt, welcher bei der Umsatz-Bestimmung berücksichtigt wird. Bei Messungen mittels GC wird dieser Wert gleich 1 gesetzt. Es wird ein Umsatz (Verhältnis Produkt zu Edukt) und ein apparenter Umsatz (Verhältnis Produkt zu Edukt und allen Nebenprodukten) bestimmt. Die Reaktionsparameter-Screening-Bedingungen sind in Tabelle 35 zusammengefasst. Abweichungen dieser Standard-Versuche sowie Kombinationen unterschiedlicher Parameter sind in den einzelnen Versuchen gekennzeichnet.

**Tabelle 35.** Reaktionsparameter-Screening Parameter

Nr.	Parameter	Konz.	Puffer	pH
<b>A1</b>	Blank (PIPES 0.03M)		PIPES 0.03M	7.2
<b>A2</b>	$[(\text{CH}_3)_3\text{NH}]\text{H}_2\text{PO}_4$	0.2M	PIPES 0.03M	7.2
<b>A3</b>	$[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$	1.0M	PIPES 0.03M	7.2
<b>A4</b>	$\text{K}_2\text{SO}_4$	1.0M	PIPES 0.03M	7.2
<b>A5</b>	KCl	0.5M	PIPES 0.03M	7.2
<b>A6</b>	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	1.0M	PIPES 0.03M	7.2
<b>A7</b>	Na Acetat	0.2M	PIPES 0.03M	7.2
<b>A8</b>	Na Citrat	0.2M	PIPES 0.03M	7.2
<b>A9</b>	Na-Phosphat	0.2M	PIPES 0.03M	7.2
<b>A10</b>	LiSCN	0.1M	PIPES 0.03M	7.2
<b>A11</b>	Guanidin HCl	0.1M	PIPES 0.03M	7.2

<b>A12</b>	PEG 6000	10%	PIPES 0.03M	7.2
<b>A13</b>	Sorbitol	10%	PIPES 0.03M	7.2
<b>A14</b>	Sucrose	10%	PIPES 0.03M	7.2
<b>A15</b>	Glycerol	10%	PIPES 0.03M	7.2
<b>A16</b>	Glycin	5%	PIPES 0.03M	7.2
<b>A17</b>	L-ASN	gesättigt	PIPES 0.03M	7.2
<b>A18</b>	D-ASN	gesättigt	PIPES 0.03M	7.2
<b>A19</b>	$\beta$ -Cylcodextrin	1%	PIPES 0.03M	7.2
<b>A20</b>	Titron X114	1%	PIPES 0.03M	7.2
<b>A21</b>	Na-Acetat	0.03M	Na-Acetat 0.03M	5.2
<b>A22</b>	Mg-Acetat	0.01M	MES 0.03M	6.2
<b>A23</b>	MES	0.03M	MES 0.03M	6.2
<b>A24</b>	Phosphat	0.03M	K-Phosphat 0.03M	7.2
<b>A25</b>	TRIS	0.03M	TRIS 0.03M	8.0
<b>A26</b>	Ethanol	5%	PIPES 0.10M	7.2
<b>A27</b>	THF	5%	PIPES 0.10M	7.2
<b>A28</b>	DMSO	5%	PIPES 0.10M	7.2
<b>A29</b>	Acetonitril	5%	PIPES 0.10M	7.2
<b>A30</b>	Dioxan	5%	PIPES 0.10M	7.2
<b>A31</b>	2-Propanol	5%	PIPES 0.10M	7.2
<b>A32</b>	1-Butanol	5%	PIPES 0.10M	7.2
<b>A33</b>	Aceton	5%	PIPES 0.10M	7.2
<b>A34</b>	Heptan	20%	PIPES 0.10M	7.2
<b>A35</b>	Cyclohexan	20%	PIPES 0.10M	7.2
<b>A36</b>	TBME	20%	PIPES 0.10M	7.2
<b>A37</b>	CPME	20%	PIPES 0.10M	7.2
<b>A38</b>	tert-Butylacetat	20%	PIPES 0.10M	7.2
<b>A39</b>	Ethanol	40%	PIPES 0.10M	7.2
<b>A40</b>	Aceton	40%	PIPES 0.10M	7.2
<b>A41</b>	Dioxan	40%	PIPES 0.10M	7.2

8.3.12.1 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von **3b** mitXenB<sub>pQR1</sub>

Die Durchführung erfolgt analog zu AAV5 mit allen in Tabelle 35 angegebenen Parametern. Das Substrat **5b** wird in 2-Propanol gelöst, das Enzym XenB<sub>pQR1</sub> wird in Wasser gelöst zugegeben. Das Verhältnis S:E beträgt 1.

Zusätzlich zu den Versuchen in Tabelle 35 (AAV5) werden die Versuche A11, A13, A14, A15, A22 und A23 wiederholt durchgeführt, die Versuche A34 und A35 wurden zusätzlich bei erhöhter Enzymmenge sowie bei 4°C über 3 Tage durchgeführt. Die zusätzlich zu Tabelle 35 durchgeführten Experimente sind in Tabelle 36 zusammengefasst.

**Tabelle 36.** Zusätzliche Experimente zum Reaktionsparameter-Screening XenB<sub>pQR1</sub>-**5b**

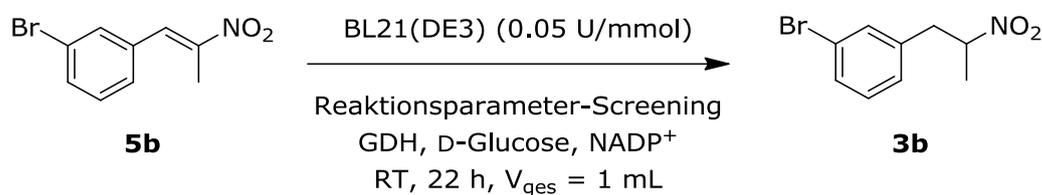
Nr.	Puffer	pH	S:E	Heptan	Cyclohexan	T [°C]	t
<b>B1</b>	PIPES 0.10M	7.2	0.25	20%		RT	22 h
<b>B2</b>	PIPES 0.10M	7.2	0.25		20%	RT	22 h
<b>B3</b>	PIPES 0.10M	7.2	0.25	20%		4°C	72 h
<b>B4</b>	PIPES 0.10M	7.2	0.25		20%	4°C	72 h

**Tabelle 37.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings XenB<sub>pQR1</sub>-**5b** unter den Parametern aus Tabelle 35 und Tabelle 36

Nr.	App.Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Nr.	App.Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Nr.	App.Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]
A1	31	33	1	A18	34	35	1	A35	4	4	nb
A2	11	11	8	A19	10	11	7	A36	1	1	nb
A3	5	5	nb	A20	nb	41	0	A37	0	0	nb
A4	16	16	3	A21	4	4	nb	A38	1	1	nb
A5	5	5	nb	A22	12	12	9	A39	1	1	nb
A6	9	9	6	A23	14	15	7	A40	0	0	nb
A7	17	18	3	A24	25	26	1	A41	0	0	nb
A8	21	22	1	A25	9	9	4	A11(Wdh)	9	10	7
A9	14	15	5	A26	24	24	2	A13(Wdh)	37	44	-2
A10	1	2	nb	A27	11	12	4	A14(Wdh)	40	45	-5
A11	7	8	12	A28	19	20	3	A15(Wdh)	43	51	-6
A12	34	35	1	A29	10	11	7	A22(Wdh)	12	13	11
A13	30	34	-1	A30	11	12	9	A23(Wdh)	16	17	10
A14	36	38	-3	A31	25	26	2	B1	27	29	-1
A15	39	43	-6	A32	3	4	nb	B2	28	29	-3
A16	36	38	-1	A33	14	14	7	B3	74	79	-4
A17	21	22	3	A34	3	3	nb	B4	81	86	-3

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt

### 8.3.12.2 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von **3b** mit *E. coli* BL21(DE3)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV5 mit allen in Tabelle 35 angegebenen Parametern. Das Substrat **5b** wird in 2-Propanol gelöst, der Zellrohextrakt von *E. coli* BL21(DE3) wird in Wasser gelöst zugegeben. Das Verhältnis S:E beträgt 0.25.

Zusätzlich zu den Versuchen in Tabelle 35 (AAV5) wurde Versuch A1 mit erhöhter Enzymmenge und verkürzter Reaktionszeit, sowie die Versuche A34 und A35 bei 4°C über 3 Tage

durchgeführt. Die zusätzlich zu Tabelle 35 durchgeführten Experimente sind in Tabelle 38 zusammengefasst.

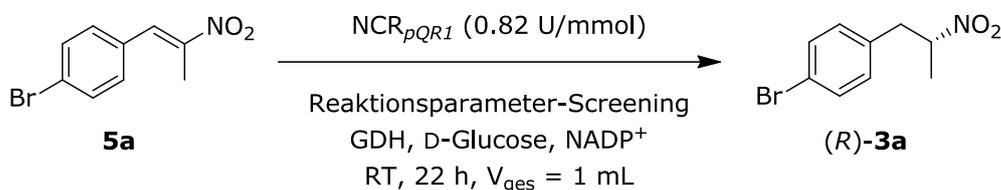
**Tabelle 38.** Zusätzliche Experimente zum Reaktionsparameter-Screening *E. coli* BL21(DE3)-**5b**

Nr.	Puffer	pH	S:E	Heptan	Cyclohexan	T [°C]	t
<b>C1</b>	PIPES 0.10M	7.2	0.025			RT	1 h
<b>C2</b>	PIPES 0.10M	7.2	0.0125			RT	1 h
<b>C3</b>	PIPES 0.10M	7.2	3.5	20%		4°C	72 h
<b>C4</b>	PIPES 0.10M	7.2	3.5		20%	4°C	72 h

**Tabelle 39.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings *E. coli* BL21(DE3)-**5b** unter den Parametern aus Tabelle 35 und Tabelle 38

Nr.	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Nr.	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Nr.	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]
A1	31	35	21	A16	48	61	14	A31	32	35	11
A2	25	27	6	A17	28	37	13	A32	9	10	11
A3	15	16	25	A18	35	39	23	A33	18	20	16
A4	14	16	25	A19	13	14	19	A34	0	0	nb
A5	12	13	31	A20	nb	18	27	A35	0	0	nb
A6	12	13	15	A21	3	3	nb	A36	0	0	nb
A7	20	23	22	A22	21	23	43	A37	0	0	nb
A8	21	23	20	A23	24	26	37	A38	0	0	nb
A9	21	22	11	A24	32	36	25	A39	0	0	nb
A10	11	12	34	A25	17	20	20	A40	0	0	nb
A11	15	16	28	A26	29	32	13	A41	0	0	nb
A12	37	40	21	A27	17	19	11	C1	20	22	36
A13	35	38	24	A28	20	23	15	C2	51	59	33
A14	28	31	19	A29	19	21	13	C3	9	10	12
A15	28	32	24	A30	15	17	20	C4	11	12	29

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt

8.3.12.3 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von (*R*)-**3a** mitNCR<sub>pQR1</sub>

Die Durchführung erfolgt analog zu AAV5 mit allen in Tabelle 35 angegebenen Parametern. Das Substrat **5a** wird in 2-Propanol gelöst, das Enzym NCR<sub>pQR1</sub> wird in Wasser gelöst zugegeben. Das Verhältnis S:E beträgt 50.

Zusätzlich zu den Versuchen in Tabelle 35 (AAV5) wird Versuch A1 mit erhöhter Enzymmenge und verkürzter Reaktionszeit, sowie Kombinationen der Parameter PIPES, TRIS, PEG, Cyclohexan und Heptan bei verkürzter Reaktionszeit (1 h) durchgeführt. Außerdem werden diese Versuche mit dem Leervektor BL21(DE3) und **5a** durchgeführt (Tabelle 40).

**Tabelle 40.** Zusätzliche Experimente zum Reaktionsparameter-Screening NCR<sub>pQR1</sub>-**5a**

Nr.	Enzym	Puffer	pH	S:E	PEG	Cyclohexan	Heptan
<b>D1</b>	NCR <sub>pQR1</sub>	PIPES 0.03M	7.2	5			
<b>D2</b>	NCR <sub>pQR1</sub>	PIPES 0.03M	7.2	2.5			
<b>D3</b>	NCR <sub>pQR1</sub>	PIPES 0.03M	7.2	2.5			
<b>D4</b>	NCR <sub>pQR1</sub>	PIPES 0.03M	7.2	2.5	10%		
<b>D5</b>	NCR <sub>pQR1</sub>	PIPES 0.03M	7.2	2.5		20%	
<b>D6</b>	NCR <sub>pQR1</sub>	PIPES 0.03M	7.2	2.5			20%
<b>D7</b>	NCR <sub>pQR1</sub>	PIPES 0.03M	7.2	2.5	10%	20%	
<b>D8</b>	NCR <sub>pQR1</sub>	PIPES 0.03M	7.2	2.5	10%		20%
<b>D9</b>	NCR <sub>pQR1</sub>	TRIS 0.03M	8.0	2.5			
<b>D10</b>	NCR <sub>pQR1</sub>	TRIS 0.03M	8.0	2.5	10%		
<b>D11</b>	NCR <sub>pQR1</sub>	TRIS 0.03M	8.0	2.5		20%	
<b>D12</b>	NCR <sub>pQR1</sub>	TRIS 0.03M	8.0	2.5			20%
<b>D13</b>	NCR <sub>pQR1</sub>	TRIS 0.03M	8.0	2.5	10%	20 %	
<b>D14</b>	NCR <sub>pQR1</sub>	TRIS 0.03M	8.0	2.5	10%		20%
<b>E1</b>	BL21(DE3)	PIPES 0.03M	7.2	0.025			
<b>E2</b>	BL21(DE3)	PIPES 0.03M	7.2	0.025	10%		
<b>E3</b>	BL21(DE3)	PIPES 0.03M	7.2	0.025		20%	
<b>E4</b>	BL21(DE3)	PIPES 0.03M	7.2	0.025			20%
<b>E5</b>	BL21(DE3)	PIPES 0.03M	7.2	0.025	10%	20%	

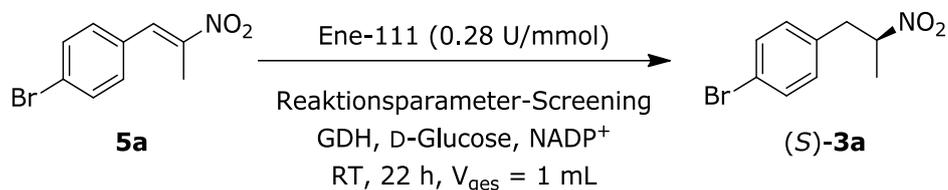
<b>E6</b>	BL21(DE3)	PIPES 0.03M	7.2	0.025	10%		20%
<b>E7</b>	BL21(DE3)	TRIS 0.03M	8.0	0.025			
<b>E8</b>	BL21(DE3)	TRIS 0.03M	8.0	0.025	10%		
<b>E9</b>	BL21(DE3)	TRIS 0.03M	8.0	0.025		20%	
<b>E10</b>	BL21(DE3)	TRIS 0.03M	8.0	0.025			20%
<b>E11</b>	BL21(DE3)	TRIS 0.03M	8.0	0.025	10%	20 %	
<b>E12</b>	BL21(DE3)	TRIS 0.03M	8.0	0.025	10%		20%

**Tabelle 41.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings NCR<sub>pQR1</sub>-**5a** unter den Parametern aus Tabelle 35 und Tabelle 40

Nr.	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Nr.	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Nr.	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]
A1	35	37	-31	A24	31	32	-28	D6	9	10	-50
A2	19	19	-7	A25	20	20	-52	D7	9	9	-43
A3	24	24	-42	A26	35	36	-17	D8	13	14	-44
A4	26	26	-45	A27	29	29	-24	D9	26	27	-80
A5	10	10	-29	A28	0	28	-15	D10	35	36	-73
A6	15	16	-42	A29	23	24	-15	D11	10	10	-81
A7	17	17	-23	A30	25	26	-11	D12	17	17	-82
A8	28	29	-26	A31	38	39	-19	D13	14	14	-73
A9	27	27	-14	A32	25	25	-24	D14	9	9	-71
A10	5	5	nb	A33	22	23	-14	E1	20	21	20
A11	23	23	-27	A34	26	26	-17	E2	20	21	18
A12	42	43	-15	A35	26	27	-18	E3	7	8	18
A13	24	27	-23	A36	12	12	-27	E4	10	10	14
A14	28	29	-25	A37	3	3	nb	E5	9	10	20
A15	25	26	-30	A38	6	6	nb	E6	14	15	22
A16	32	33	-21	A39	0	0	nb	E7	15	16	22
A17	28	28	-25	A40	0	0	nb	E8	15	16	18
A18	37	38	-22	A41	0	0	nb	E9	10	10	19
A19	20	20	-6	D1	27	28	-63	E10	9	9	20
A20	nb	43	0	D2	62	66	-72	E11	5	5	13
A21	5	5	nb	D3	32	37	-66	E12	7	8	18
A22	27	28	-31	D4	39	42	-52				
A23	29	30	-29	D5	15	15	-57				

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt

### 8.3.12.4 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von (*S*)-**3a** mit Ene-111



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV5 mit allen in Tabelle 35 angegebenen Parametern. Das Substrat **5a** wird in 2-Propanol gelöst, das Enzym Ene-111 wird in Wasser gelöst zugegeben. Das Verhältnis S:E beträgt 250.

Zusätzlich zu den Versuchen in Tabelle 35 (AAV5) wird Versuch A1 bei erhöhter Enzymmenge und variierender Reaktionszeit durchgeführt. Außerdem werden die Parameter Mg-Acetat (in MES), PEG, Glycin, 2-Propanol und Cyclohexan kombiniert. Alle zusätzlich zu Tabelle 35 durchgeführten Experimente sind in Tabelle 42 zusammengefasst.

**Tabelle 42.** Zusätzliche Experimente zum Reaktionsparameter-Screening Ene-111-**5a**

Nr	Puffer	pH	S:E	PEG	Glycin	2-Prop anol	Cyclo hexan	t [h]
<b>F1</b>	PIPES 0.03M	7.2	37.5					1
<b>F2</b>	PIPES 0.03M	7.2	18.75					1
<b>F3</b>	PIPES 0.03M	7.2	37.5					24
<b>F4</b>	PIPES 0.03M	7.2	18.75					24
<b>F5</b>	MES 0.03M (Mg 0.01M)	6.2	20					1
<b>F6</b>	MES 0.03M (Mg 0.01M)	6.2	20	10%				1
<b>F7</b>	MES 0.03M (Mg 0.01M)	6.2	20		5%			1
<b>F8</b>	MES 0.03M (Mg 0.01M)	6.2	20			20%		1
<b>F9</b>	MES 0.03M (Mg 0.01M)	6.2	20				20%	1
<b>F10</b>	MES 0.03M (Mg 0.01M)	6.2	20	10%	5%			1
<b>F11</b>	MES 0.03M (Mg 0.01M)	6.2	20	10%		20%		1
<b>F12</b>	MES 0.03M (Mg 0.01M)	6.2	20	10%			20%	1
<b>F13</b>	MES 0.03M (Mg 0.01M)	6.2	20	10%	5%	20%		1
<b>F14</b>	MES 0.03M (Mg 0.01M)	6.2	20	10%	5%		20%	1

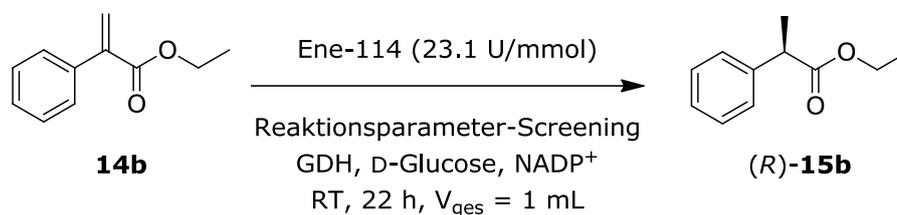
<b>F15</b>	MES 0.03M (Mg 0.01M)	6.2	20	5%	20%	1
<b>F16</b>	MES 0.03M (Mg 0.01M)	6.2	20	5%	20%	1

**Tabelle 43.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings Ene-111-5a unter den Parametern aus Tabelle 35 und Tabelle 42

Nr.	App. Ums [%]	Ums. [%]	ee [%]	Nr.	App. Ums [%]	Ums. [%]	ee [%]	Nr.	App. Ums [%]	Ums. [%]	ee [%]
A1	21	21	18	A20	nb	27	2	A39	3	3	nb
A2	20	20	3	A21	1	1	nb	A40	1	1	nb
A3	2	2	nb	A22	22	22	22	A41	1	1	nb
A4	4	4	nb	A23	7	7	20	F1	11	11	45
A5	1	1	nb	A24	12	12	24	F2	62	66	66
A6	2	2	nb	A25	9	9	26	F3	96	99	68
A7	11	11	5	A26	25	25	4	F4	96	100	74
A8	11	11	6	A27	14	14	-2	F5	24	40	40
A9	19	19	nb	A28	21	21	3	F6	36	46	45
A10	1	1	nb	A29	28	28	0	F7	50	59	69
A11	3	3	nb	A30	16	16	-1	F8	26	39	39
A12	24	24	12	A31	26	26	3	F9	10	12	nb
A13	14	15	17	A32	17	17	-1	F10	47	51	59
A14	10	10	13	A33	23	23	1	F11	26	35	29
A15	11	11	28	A34	17	18	5	F12	5	5	nb
A16	19	19	34	A35	18	19	6	F13	40	45	52
A17	29	29	23	A36	5	5	nb	F14	7	7	nb
A18	19	19	24	A37	3	3	nb	F15	42	49	64
A19	18	18	4	A38	1	1	nb	F16	20	21	59

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt

### 8.3.12.5 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von (*R*)-**15b** mit Ene-114



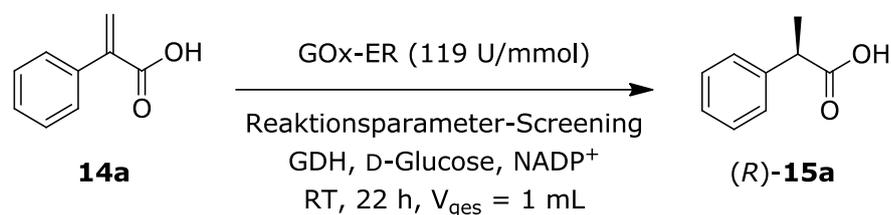
Die Durchführung erfolgt analog zu AAV5 mit allen in Tabelle 35 angegebenen Parametern. Das Substrat **14b** wird in 2-Propanol gelöst, das Enzym Ene-114 wird in Wasser gelöst zugegeben. Das Verhältnis S:E beträgt 1.

**Tabelle 44.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings Ene-114-**14b** unter den Parametern aus Tabelle 35

Nr.	App. Ums [%]	Ums. [%]	ee [%]	Nr.	App. Ums [%]	Ums. [%]	ee [%]	Nr.	App. Ums [%]	Ums. [%]	ee [%]
A1	32	34	-100	A15	41	41	-100	A29	3	3	nb
A2	21	49	-100	A16	49	60	-100	A30	20	21	-100
A3	29	37	-100	A17	24	55	-98	A31	27	28	-100
A4	34	44	-100	A18	45	68	-100	A32	5	5	nb
A5	26	34	-100	A19	26	29	-99	A33	2	2	nb
A6	47	59	-100	A20	8	8	nb	A34	0	0	nb
A7	31	37	-100	A21	4	4	nb	A35	1	1	nb
A8	27	34	-100	A22	58	77	-100	A36	0	0	nb
A9	20	37	-100	A23	55	65	-100	A37	1	1	nb
A10	28	33	-100	A24	36	38	-100	A38	0	0	nb
A11	25	36	-100	A25	21	21	-100	A39	0	0	nb
A12	29	30	-100	A26	26	28	-100	A40	0	1	nb
A13	32	33	-100	A27	13	14	-100	A41	0	0	nb
A14	27	28	-100	A28	21	21	-100				

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt

### 8.3.12.6 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von (*R*)-**15a** mit GOx-ER



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV5 mit allen in Tabelle 35 angegebenen Parametern. Das Substrat **14a** wird in 2-Propanol gelöst, das Enzym GOx-ER wird in Wasser gelöst zugegeben. Das Verhältnis S:E beträgt 0.5.

Zusätzlich zu den Versuchen in Tabelle 35 (AAV5) werden die Parameter MES-Puffer, PEG, Dioxan und Cyclohexan kombiniert. Alle zusätzlich zu Tabelle 35 durchgeführten Experimente sind in Tabelle 45 zusammengefasst.

**Tabelle 45.** Zusätzliche Experimente zum Reaktionsparameter-Screening GOx-ER-**14a**

Nr	Puffer	pH	S:E	PEG	Dioxan	Cyclohexan
<b>G1</b>	MES 0.03M	6.2	1			
<b>G2</b>	MES 0.03M	6.2	1	10%		
<b>G3</b>	MES 0.03M	6.2	1		5%	
<b>G4</b>	MES 0.03M	6.2	1			20%
<b>G5</b>	MES 0.03M	6.2	1	10%	5%	
<b>G6</b>	MES 0.03M	6.2	1	10%		20%

**Tabelle 46.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings GOx-ER-**14a** unter den Parametern aus Tabelle 35 und Tabelle 45

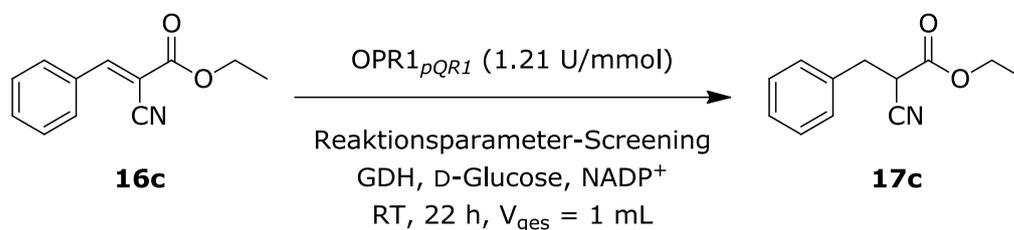
Nr.	App. Ums [%]	Ums. [%]	ee [%]	Nr.	App. Ums [%]	Ums. [%]	ee [%]	Nr.	App. Ums [%]	Ums. [%]	ee [%]
A1	53	55	100	A17	42	46	100	A33	16	17	79
A2	31	35	68	A18	60	62	100	A34	41	41	77
A3	57	57	100	A19	47	50	100	A35	54	54	100
A4	61	61	100	A20	32	34	100	A36	14	14	100
A5	40	42	100	A21	64	65	100	A37	15	19	100
A6	60	61	100	A22	83	83	100	A38	39	39	100
A7	37	40	100	A23	87	87	100	A39	7	7	nb
A8	48	48	100	A24	50	52	100	A40	0	0	nb
A9	29	33	69	A25	35	36	100	A41	nb	nb	nb
A10	0	0	nb	A26	41	41	100	G1	35	35	100

A11	43	45	100	A27	26	29	100	G2	37	37	64
A12	65	65	100	A28	32	33	88	G3	2	2	nb
A13	70	71	100	A29	30	30	100	G4	42	42	100
A14	47	47	100	A30	50	50	100	G5	1	1	nb
A15	58	60	100	A31	36	38	100	G6	48	48	100
A16	46	49	100	A32	25	26	100				

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt

### 8.3.12.7 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von **17c** mit

OPR1<sub>pQR1</sub>



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV5 mit allen in Tabelle 35 angegebenen Parametern. Das Substrat **16c** wird in 2-Propanol gelöst, das Enzym OPR1<sub>pQR1</sub> wird in Wasser gelöst zugegeben. Das Verhältnis S:E beträgt 10.

Zusätzlich zu den Versuchen in Tabelle 35 (AAV5) werden die Parameter TRIS-Puffer, Phosphat-Puffer, PEG und 2-Propanol kombiniert. Alle zusätzlich zu Tabelle 35 durchgeführten Experimente sind in Tabelle 47 zusammengefasst.

**Tabelle 47.** Zusätzliche Experimente zum Reaktionsparameter-Screening OPR1<sub>pQR1</sub>-**16c**

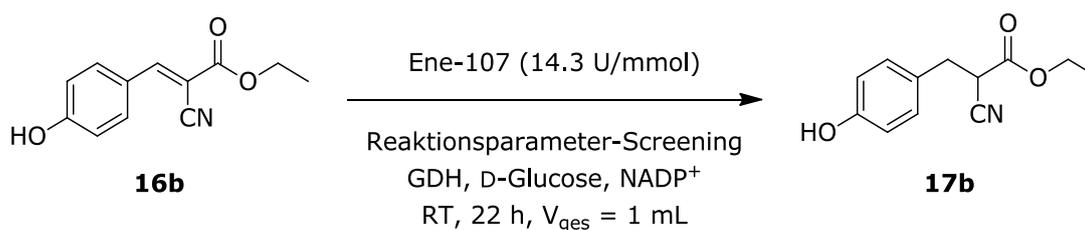
Nr.	Puffer	pH	S:E	PEG	2-Propanol
<b>H1</b>	TRIS 0.03M	8.0	20		
<b>H2</b>	TRIS 0.03M	8.0	20	10%	
<b>H3</b>	TRIS 0.03M	8.0	20		5%
<b>H4</b>	TRIS 0.03M	8.0	20	10%	5%
<b>H5</b>	Phosphat 0.03M	7.2	20		
<b>H6</b>	Phosphat 0.03M	7.2	20	10%	
<b>H7</b>	Phosphat 0.03M	7.2	20		5%
<b>H8</b>	Phosphat 0.03M	7.2	20	10%	5%

**Tabelle 48.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings OPR<sub>1pQR1</sub>-**16c** unter den Bedingungen aus **Tabelle 35** und **Tabelle 47**

Nr.	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Nr.	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Nr.	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]
A1	55	56	1	A18	69	69	0	A35	2	2	nb
A2	21	21	1	A19	69	69	0	A36	2	2	nb
A3	5	5	nb	A20	nb	64	1	A37	1	1	nb
A4	9	9	0	A21	1	1	nb	A38	1	1	nb
A5	17	17	1	A22	35	35	1	A39	5	5	nb
A6	7	7	nb	A23	32	32	1	A40	1	2	nb
A7	33	34	0	A24	57	57	5	A41	0	0	nb
A8	36	36	0	A25	63	67	-2	H1	40	50	-1
A9	20	20	0	A26	61	61	0	H2	53	54	0
A10	9	9	1	A27	38	39	0	H3	60	67	1
A11	34	34	1	A28	40	40	-1	H4	56	59	-1
A12	88	89	0	A29	12	12	1	H5	32	32	2
A13	54	61	0	A30	28	29	0	H6	53	54	1
A14	63	63	0	A31	66	66	0	H7	36	36	1
A15	70	78	0	A32	11	12	1	H8	35	35	1
A16	61	61	0	A33	16	16	1				
A17	23	25	0	A34	2	2	nb				

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt

### 8.3.12.8 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von **17b** mit Ene-107



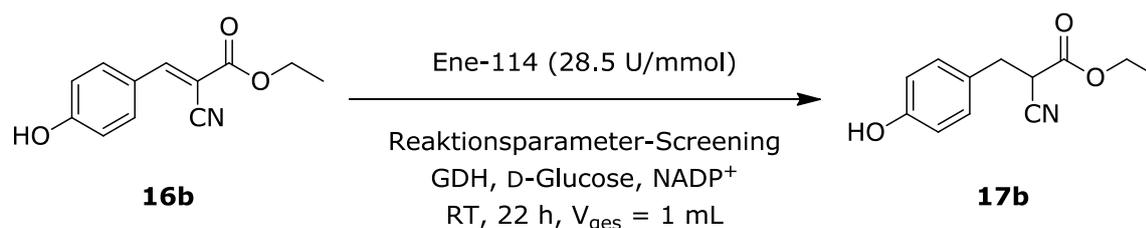
Die Durchführung erfolgt analog zu AAV5 mit allen in Tabelle 35 angegebenen Parametern. Das Substrat **16b** wird in 2-Propanol gelöst, das Enzym Ene-107 wird in Wasser gelöst zugegeben. Das Verhältnis S:E beträgt 5.

**Tabelle 49.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings Ene-107-**16b** unter den Parametern aus Tabelle 35

Nr.	App. Ums [%]	Ums. [%]	ee [%]	Nr.	App. Ums [%]	Ums. [%]	ee [%]	Nr.	App. Ums [%]	Ums. [%]	ee [%]
A1	55	55	0	A15	33	33	0	A29	29	29	0
A2	16	16	1	A16	36	47	0	A30	34	34	-2
A3	12	13	-1	A17	7	10	nb	A31	50	50	0
A4	17	17	0	A18	56	58	0	A32	27	27	0
A5	26	26	0	A19	51	51	-1	A33	11	11	-1
A6	11	11	-1	A20	41	66	-3	A34	32	32	0
A7	36	36	0	A21	0	0	nb	A35	38	38	0
A8	26	26	0	A22	48	48	0	A36	6	6	nb
A9	20	20	0	A23	48	48	-1	A37	0	0	nb
A10	28	28	0	A24	34	34	0	A38	3	3	nb
A11	42	42	0	A25	7	7	nb	A39	23	23	nb
A12	68	68	0	A26	48	48	0	A40	0	0	nb
A13	47	50	-2	A27	40	40	0	A41	0	0	nb
A14	33	33	0	A28	32	32	0				

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt

### 8.3.12.9 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von **17b** mit Ene-114



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV5 mit allen in Tabelle 35 angegebenen Parametern. Das Substrat **16b** wird in 2-Propanol gelöst, das Enzym Ene-114 wird in Wasser gelöst zugegeben. Das Verhältnis S:E beträgt 10.

**Tabelle 50.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings Ene-114-**16b** unter den Parametern aus Tabelle 35

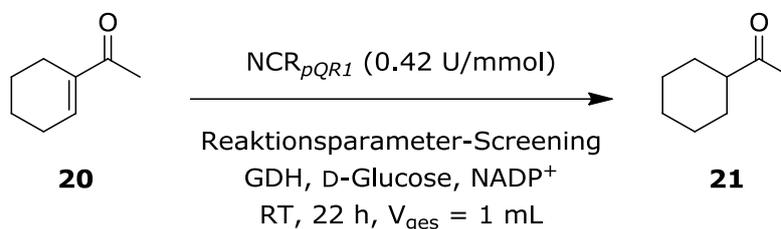
Nr.	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Nr.	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]	Nr.	App. Ums. [%]	Ums. [%]	ee [%]
A1	32	32	0	A15	25	25	-1	A29	19	19	-1

A2	28	28	1	A16	32	41	0	A30	17	17	-2
A3	14	15	0	A17	7	9	11	A31	31	31	0
A4	21	21	0	A18	35	37	0	A32	16	17	0
A5	21	21	-2	A19	28	28	-3	A33	7	7	-1
A6	12	12	0	A20	nb	39	-7	A34	3	3	nb
A7	24	24	-4	A21	1	1	nb	A35	14	14	0
A8	27	27	0	A22	32	32	0	A36	0	0	nb
A9	21	21	1	A23	32	32	0	A37	0	0	nb
A10	21	21	0	A24	30	30	0	A38	0	0	nb
A11	23	23	-2	A25	25	26	0	A39	0	0	nb
A12	39	40	0	A26	29	29	0	A40	0	0	nb
A13	22	22	-3	A27	16	16	-1	A41	0	0	nb
A14	24	24	-3	A28	27	28	0		19	19	-1

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt

### 8.3.12.10 Reaktionsparameter-Screening zur Synthese von **21** mit

$NCR_{pQR1}$



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV5 mit allen in Tabelle 35 angegebenen Parametern. Das Substrat **20** wird in 2-Propanol gelöst, das Enzym  $NCR_{pQR1}$  wird in Wasser gelöst zugegeben. Das Verhältnis S:E beträgt 5.

Zusätzlich zu den Versuchen in Tabelle 35 (AAV5) werden die Parameter Phosphat-Puffer, PEG, DMSO, Acetonitril und Cyclohexan kombiniert. Alle zusätzlich zu Tabelle 35 durchgeführten Experimente sind in Tabelle 51 zusammengefasst.

**Tabelle 51.** Zusätzliche Experimente zum Reaktionsparameter-Screening  $NCR_{pQR1}$ -**20**

Nr.	Puffer	pH	S:E	PEG	DMSO	Cyclohexan	Acetonitril
<b>J1</b>	Phosphat 0.03M	7.2	5				
<b>J2</b>	Phosphat 0.03M	7.2	5	10%			
<b>J3</b>	Phosphat 0.03M	7.2	5		5%		
<b>J4</b>	Phosphat 0.03M	7.2	5			5%	

<b>J5</b>	Phosphat 0.03M	7.2	5			5%
<b>J6</b>	Phosphat 0.03M	7.2	5	10%	5%	
<b>J7</b>	Phosphat 0.03M	7.2	5	10%		5%
<b>J8</b>	Phosphat 0.03M	7.2	5	10%		5%

**Tabelle 52.** Ergebnisse des Reaktionsparameter-Screenings  $NCR_{pQR1-20}$  unter den Parametern aus Tabelle 35 und Tabelle 51

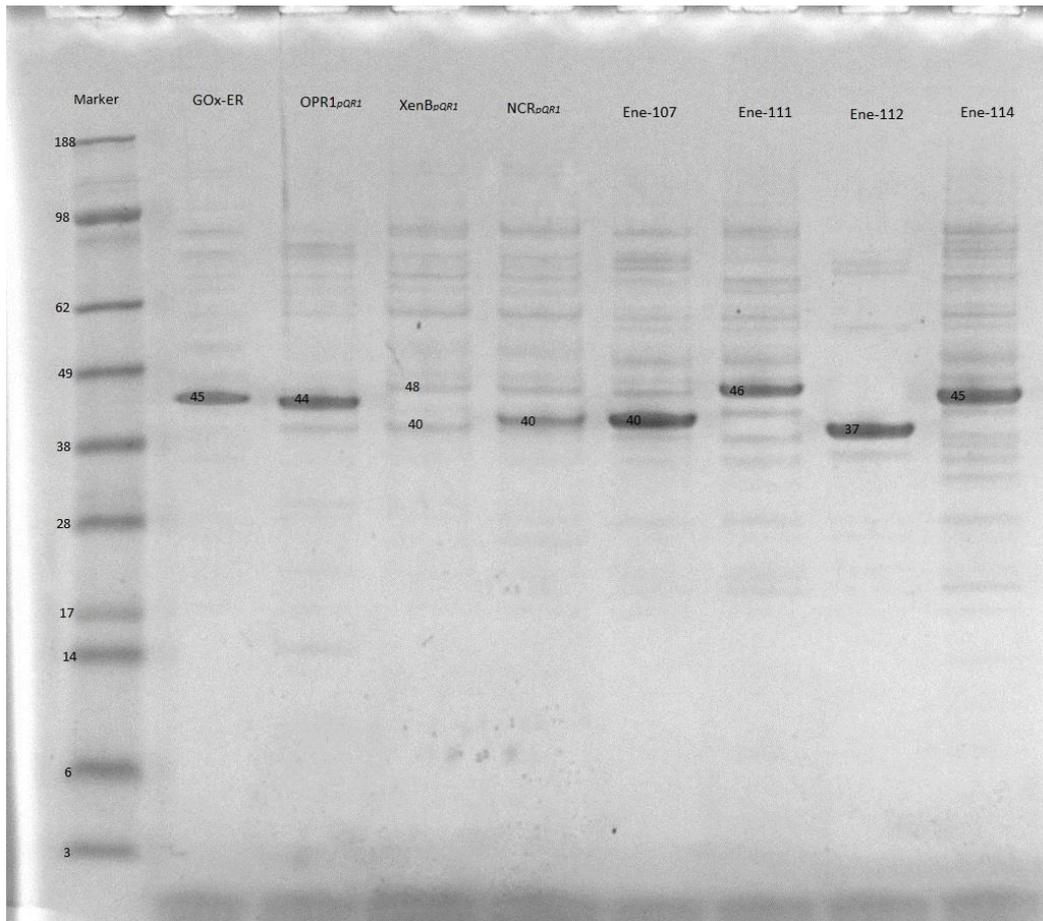
Nr.	App. Ums [%]	Ums. [%]	Nr.	App. Ums [%]	Ums. [%]	Nr.	App. Ums [%]	Ums. [%]	Nr.	App. Ums [%]	Ums. [%]
A1	66	68	A14	69	76	A27	53	54	A40	nb	nb
A2	56	57	A15	67	73	A28	70	70	A41	nb	nb
A3	38	39	A16	77	78	A29	55	56	J1	71	72
A4	52	52	A17	74	75	A30	56	57	J2	81	83
A5	36	37	A18	76	76	A31	59	70	J3	73	74
A6	35	36	A19	68	69	A32	31	42	J4	59	59
A7	54	55	A20	8	69	A33	54	54	J5	56	57
A8	63	64	A21	22	23	A34	51	51	J6	76	76
A9	59	60	A22	70	71	A35	55	55	J7	74	74
A10	37	37	A23	67	68	A36	28	28	J8	59	59
A11	56	57	A24	76	76	A37	17	18			
A12	81	81	A25	74	75	A38	29	30			
A13	78	79	A26	67	68	A39	nb	nb			

App. Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Gesamtfläche aller Integrale; Ums.: Anteil des Produkt-Flächenintegrals an der Summe aus Edukt- und Produkt-Flächenintegral; nb: nicht bestimmt

### 8.3.13 SDS-Gelelektrophorese der im Reaktionsparameter-Screening verwendeten Enzymformulierungen

Es wird ein SDS-Gel der Enzymchargen GOx-ER,  $OPR_{1pQR1}$ ,  $XenB_{pQR1}$ ,  $NCR_{pQR1}$ , Ene-107, Ene-111, Ene-112 und Ene-114 angefertigt.

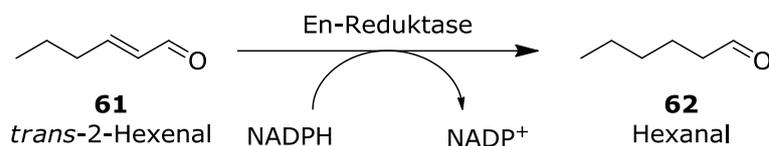
Es werden Lösungen der Proben in dest.  $H_2O$  hergestellt (1.0 mg/mL). Von diesen Proben werden 10  $\mu L$  mit 5  $\mu L$  Sampling reducing Agent, 12.5  $\mu L$  LDS Sample buffer und 22.5  $\mu L$   $H_2O$  versetzt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Diese Proben werden auf ein Gel aufgetragen. (Spur 1: SeeBlue Plus 2 Prestained Standard (3  $\mu L$ ), Spur 2: GOx-ER (10  $\mu L$ ), Spur 3:  $OPR_{1pQR1}$  (10  $\mu L$ ), Spur 4:  $XenB_{pQR1}$  (20  $\mu L$ ), Spur 5:  $NCR_{pQR1}$  (20  $\mu L$ ), Spur 6: Ene-107 (10  $\mu L$ ), Spur 7: Ene-111 (10  $\mu L$ ), Spur 8: Ene-112 (10  $\mu L$ ), Spur 9: Ene-114 (10  $\mu L$ ). Die Elektrophorese verläuft bei 200 V über 30 min mit MES SDS Runningbuffer. Im Anschluss wird das Gel 30 min mit Coomassie-Blue Färbelösung gefärbt, mit Wasser gewaschen und fotografiert.



**Abbildung 95.** SDS-Gel: Spur 1: Marker [kDa], Spur 2: GOx-ER, Spur 3: OPR1<sub>pQR1</sub>, Spur 4: XenB<sub>pQR1</sub>, Spur 5: NCR<sub>pQR1</sub>, Spur 6: Ene-107, Spur 7: Ene-111, Spur 8: Ene-112, Spur 9: Ene-114

Die ermittelten Proteingrößen entsprechen den Literaturdaten (GOx-ER: 44 kDa, [22] OPR1: 41 kDa, [97] XenB: 40 kDa, [50]).

### 8.3.14 Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 (AAV6): Photometrische Aktivitätsbestimmung für En-Reduktasen



Zur Aktivitätsbestimmung wird eine *trans*-2-Hexenallösung (**61**, 960  $\mu\text{L}$ , 10 mM in Phosphatpuffer (50 mM)) in einer Küvette vorgelegt und mit einer NADPH-Lösung (20  $\mu\text{L}$ , 12.5 mM in Phosphatpuffer (50 mM)) gemischt. Die Absorption dieser Lösung bei 340 nm darf 1 nicht übersteigen, andernfalls wird die Cofaktor-Lösung entsprechend verdünnt. Anschließend wird die zu testende Enzymlösung (20  $\mu\text{L}$ , beim Vorliegen eines Lyophilisats gelöst in Phosphatpuffer) zugegeben und die Abnahme der Cofaktorkonzentration bei 340 nm

vermessen. Aus der Anfangssteigung der aufgenommenen Reaktionskinetik wird mit folgender Gleichung die Enzymaktivität bestimmt.

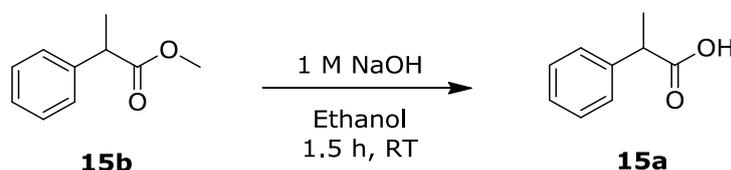
$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\Delta E_{340 \text{ nm}} * V_t * f}{\epsilon * V_s * t * d}$$

( $\Delta E_{340 \text{ nm}}/t$  = Anfangssteigung der Extinktionskurve,  $V_t$  = Gesamtvolumen,  $V_s$  = Probenvolumen (Volumen der Enzymlösung),  $f$  = Verdünnungsfaktor (der Enzymlösung),  $\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient von NADPH,  $d$  = Dicke der Küvette)

Jede Aktivitätsbestimmung wird in einer Dreifach-Bestimmung durchgeführt, wobei der so erhaltene Mittelwert als Aktivität bezeichnet wird. Die Ergebnisse der im Reaktionsparameter-Screening verwendeten Enzyme sind in folgender Tabelle zusammen gefasst.

Eintrag	Enzym	Aktivität [U/mg]
1	NCR <sub>pQR1</sub>	0.17
2	OPR1 <sub>pQR1</sub>	0.06
3	XenB <sub>pQR1</sub>	0.004
4	GOx-ER	0.40
5	BL21(DE3)	0.003
6	Ene-107	0.33
7	Ene-111	0.29
8	Ene-112	4.88
9	Ene-114	1.31

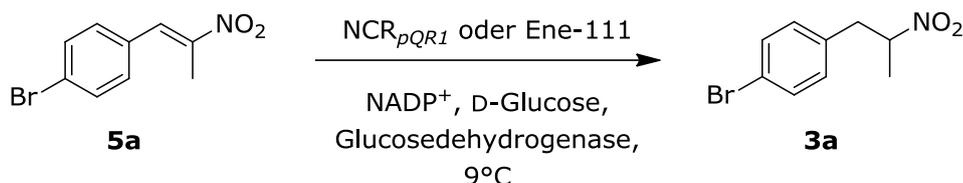
### 8.3.15 Hydrolyse von **15b** zum Bestimmen der Selektivität von Ene-114



Um die Selektivität der En-Reduktase Ene-114 zu bestimmen, werden die **15b**-enthaltenden Proben aus Abschnitt 8.3.11.10 vereinigt, am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und in Ethanol aufgenommen. Eine Lösung aus **15b** (0.75 mg, 4.21  $\mu\text{mol}$ ) in Ethanol (0.5 mL) wird mit 0.5 mL NaOH (1.0 M) versetzt und für 1.5 h bei Raumtemperatur auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wird mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt, mit HCl (2.0 M) angesäuert und mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert. Der Umsatz wird mittels GC bestimmt. Umsatz: >95%,

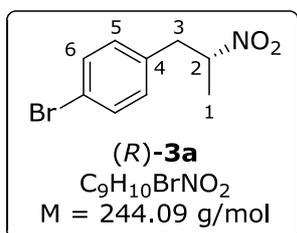
ee-Wert: 89% ((*R*)), **GC** (19091J-413 HP-5. 30m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m, 80°C, mit 40°C/min auf 250°C,  $t_r(\mathbf{15b}) = 0.99$  min,  $t_r(\mathbf{15a}) = 1.11$  min; **chirale HPLC** (Chiralpak IB-3, 150 x 4.6 mm, 3 $\mu$ m; 96% Heptan+0.1%TFA, 4% 2-Propanol, 1.0 mL/min, 210 nm, 20°C):  $t_r((R)\text{-}\mathbf{15a}) = 3.48$  min,  $t_r((S)\text{-}\mathbf{15a}) = 3.71$  min.

### 8.3.16 Allgemeine Arbeitsvorschrift 7 (AAV7): Enzymatische Synthese von **3a**



1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropen (**5a**) wird in 2-Propanol (1.00 mL) für 5 min bei 9°C gerührt. Anschließend werden der entsprechende Puffer (27.0 mL) und D-Glucose-Monohydrat (3.00 g, 0.015 mol) zugegeben, die Mischung wird für 5 min bei 9°C gerührt. Zu der Mischung werden NADP<sup>+</sup>, Glucosedehydrogenase CDX901 und die entsprechende En-Reduktase gegeben, die Reaktionsmischung wird bei 9°C gerührt. Der pH-Wert wird konstant gehalten (0.1 M – 1.0 M NaOH). Während der Reaktion werden Proben von 200  $\mu$ L entnommen, mit Wasser verdünnt, mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert, im Stickstoffstrom eingengt, in Ethanol aufgenommen und auf Umsatz und ee-Wert untersucht. Zum Beenden der Reaktion werden Ethylacetat (30 mL) und Dicalite (5g) zugegeben und für 15 Min gerührt. Die Mischung wird über Dicalite filtriert, die Phasen getrennt, die wässrige Phase wird noch zwei mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Produkt wird mittels HPLC und NMR charakterisiert.

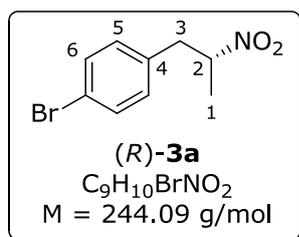
#### 8.3.16.1 Synthese von (*R*)-**3a** mit NCR<sub>pQR1</sub> bei 0.1% Substratkonzentration



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV7 mit 1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropen (**5a**, 30 mg, 0.12 mmol), TRIS-Puffer (0.03 M, pH 8.0), NADP<sup>+</sup> (2.0 mg, 2.7  $\mu$ mol), Glucosedehydrogenase CDX901 (2.0 mg) und NCR<sub>pQR1</sub> (12 mg). Nach einer Reaktionszeit von 52 h werden zusätzlich NADP<sup>+</sup> (3.0 mg, 4.0  $\mu$ mol), Glucosedehydrogenase CDX901 (3.0 mg) und NCR<sub>pQR1</sub> (12 mg) zugegeben. Nach einer

Gesamtreaktionszeit von 76 h wird der noch in der Mischung enthaltene gelbe Feststoff abdekantiert, die Lösung wird wie in AAV5 beschrieben aufgearbeitet. Der Feststoff wird in Ethanol gelöst und mittels HPLC analysiert. Ausbeute: 18 mg, 0.07 mmol, 59%; Reinheit (HPLC): 99%; ee-Wert: 77%; Zusammensetzung des abdekantierten Feststoffes: 25% **3a**, 75% **5a**; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.50 – 7.39 (m, 2H, H-C-Ar), 7.09 – 7.00 (2H, m, H-C-Ar), 4.75 (1H, m, H-C2), 3.27 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 14.2, 7.8 Hz, H-C3), 2.98 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 14.1, 6.4 Hz, H-C3), 1.55 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, H-C1); **HPLC** (X-Bridge C18, 2.5 μm, 2.1 x 50 mm; 220 nm, 1 mL/min, 50°C, A: H<sub>2</sub>O+0.1%TFA, B: ACN+0.1%TFA; Gradient: 90%A -> 10%A 3min): t<sub>r</sub>(**5a**) = 2.02 min, t<sub>r</sub>(**3a**) = 1.92 min; **chirale HPLC** (Chiralcel OD-3, 150 x 4.6 mm, 3μm; 92% Heptan, 8% 2-Propanol, 1 mL/min, 220 nm, 25°C): t<sub>r</sub>((S)-**3a**) = 3.94 min, t<sub>r</sub>((R)-**3a**) = 4.40 min.

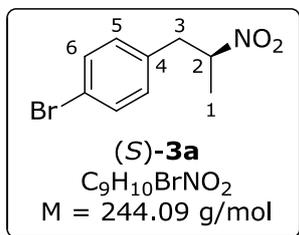
### 8.3.16.2 Synthese von (R)-**3a** mit NCR<sub>pQR1</sub> bei 1% Substratkonzentration



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV7 mit 1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropen (**5a**, 300 mg, 1.24 mmol), TRIS-Puffer (0.03M, pH 8.0), NADP<sup>+</sup> (6.0 mg, 8.1 μmol), Glukosedehydrogenase CDX901 (6.0 mg) und NCR<sub>pQR1</sub> (240 mg). Nach einer Gesamtreaktionszeit von 66 h wird der noch in der Mischung enthaltene gelbe Feststoff abdekantiert, die Lösung wird wie in AAV5 beschrieben aufgearbeitet. Der Feststoff wird in Ethanol gelöst und mittels HPLC analysiert. Ausbeute: 103 mg, 0.42 mmol, 34%; Reinheit (HPLC): 96%; ee-Wert: 85%; Zusammensetzung des abdekantierten Feststoffes: 19% **3a**, 81% **5a**; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.49 – 7.40 (2H, m, H-C-Ar), 7.11 – 7.00 (2H, m, H-C-Ar), 4.83 – 4.68 (1H, m, H-C2), 3.27 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 14.1, 7.8 Hz, H-C3), 2.98 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 14.1, 6.4 Hz, H-C3), 1.55 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, H-C1). **HPLC** (X-Bridge C18, 2.5 μm, 2.1 x 50 mm; 220 nm, 1 mL/min, 50°C, A: H<sub>2</sub>O+0.1%TFA, B: ACN+0.1%TFA; Gradient: 90%A -> 10%A 3 min): t<sub>r</sub>(**5a**) = 2.02 min, t<sub>r</sub>(**3a**) = 1.92 min; **chirale HPLC** (Chiralcel OD-3, 150 x 4.6 mm, 3μm; 92% Heptan, 8% 2-Propanol, 1 mL/min, 220 nm, 25°C): t<sub>r</sub>((S)-**3a**) = 3.94 min, t<sub>r</sub>((R)-**3a**) = 4.40 min.

8.3.16.3 Synthese von (*S*)-**3a** mit Ene-111 bei 0.1%

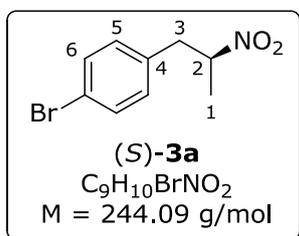
## Substratkonzentration



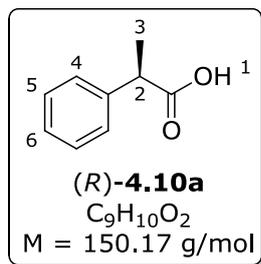
Die Durchführung erfolgt analog zu AAV7 mit 1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropen (**5a**, 30 mg, 0.12 mmol), MES-Puffer (0.03 M, pH 6.2, 0.01 M Mg-Acetat, 5% Glycin), NADP<sup>+</sup> (2.0 mg, 2.7  $\mu\text{mol}$ ), Glukosedehydrogenase CDX901 (2.0 mg) und Ene-111 (2.0 mg). Nach einer Reaktionszeit von 52 h werden zusätzlich NADP<sup>+</sup> (3.0 mg, 4.0  $\mu\text{mol}$ ), Glukosedehydrogenase CDX901 (3.0 mg) und Ene-111 (2.0 mg) zugegeben. Nach einer Gesamtreaktionszeit von 77 h wird die Lösung wie in AAV5 beschrieben aufgearbeitet. Umsatz: 68%; ee-Wert: 91%; **IPC: HPLC** (X-Bridge C18, 2.5  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 50 mm; 220 nm, 1 mL/min, 50°C, A: H<sub>2</sub>O+0.1%TFA, B: ACN+0.1%TFA; Gradient: 90%A -> 10%A 3min):  $t_r(\mathbf{5a}) = 2.02 \text{ min}$ ,  $t_r(\mathbf{3a}) = 1.92 \text{ min}$ ; **chirale HPLC** (Chiralcel OD-3, 150 x 4.6 mm, 3 $\mu\text{m}$ ; 92% Heptan, 8% 2-Propanol, 1 mL/min, 220 nm, 25°C):  $t_r((S)\text{-}\mathbf{3a}) = 3.94 \text{ min}$ ,  $t_r((R)\text{-}\mathbf{3a}) = 4.40 \text{ min}$ .

8.3.16.4 Synthese von (*S*)-**3a** mit Ene-111 bei 0.5%

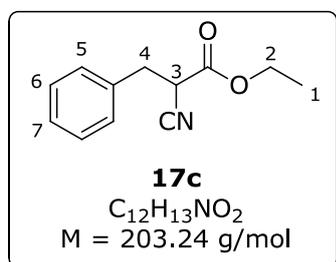
## Substratkonzentration



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV7 mit 1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropen (**5a**, 150 mg, 0.62 mmol), MES-Puffer (0.03 M, pH 6.2, 0.01 M Mg-Acetat, 5% Glycin), NADP<sup>+</sup> (6.0 mg, 8.1  $\mu\text{mol}$ ), Glukosedehydrogenase CDX901 (6.0 mg) und Ene-111 (20.0 mg). Nach einer Reaktionszeit von 90 h werden zusätzlich NADP<sup>+</sup> (6.0 mg, 8.1  $\mu\text{mol}$ ), Glukosedehydrogenase CDX901 (6.0 mg) und Ene-111 (13.0 mg) zugegeben. Nach einer Gesamtreaktionszeit von 142.5 h wird die Lösung wie in AAV5 beschrieben aufgearbeitet. Umsatz: 74%; ee-Wert:94%; **IPC: HPLC** (X-Bridge C18, 2.5  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 50 mm; 220 nm, 1 mL/min, 50°C, A: H<sub>2</sub>O+0.1%TFA, B: ACN+0.1%TFA; Gradient: 90%A -> 10%A 3min):  $t_r(\mathbf{5a}) = 2.02 \text{ min}$ ,  $t_r(\mathbf{3a}) = 1.92 \text{ min}$ ; **chirale HPLC** (Chiralcel OD-3, 150 x 4.6 mm, 3 $\mu\text{m}$ ; 92% Heptan, 8% 2-Propanol, 1 mL/min, 220 nm, 25°C):  $t_r((S)\text{-}\mathbf{3a}) = 3.94 \text{ min}$ ,  $t_r((R)\text{-}\mathbf{3a}) = 4.40 \text{ min}$ .

8.3.17 Synthese von (*R*)-**15a** mit GOx-ER

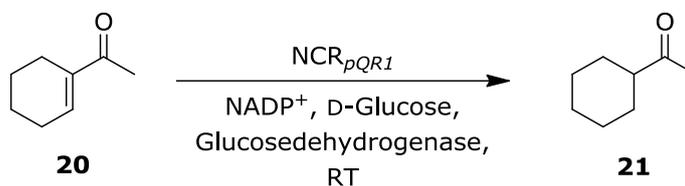
Es wird 2-Phenylacrylsäure (**14a**, 300 mg, 2.02 mmol) vorgelegt und in MES-Puffer (pH 6.2, 30 mM, 10%PEG, 21 mL) suspendiert. Unter Rühren werden nacheinander D-Glucose-Monohydrat (3.00 g, 0.015 mol), NADP<sup>+</sup> (6 mg, 8.1 μmol), Glucosedehydrogenase CDX901 (6 mg), GOx-ER (600 mg) und Cyclohexan (6 mL) zugegeben. Die Mischung rührt bei Raumtemperatur, der pH-Wert wird durch Zutitration von 1 M NaOH konstant gehalten (pH 6.2). Zur Umsatzbestimmung werden während der Reaktionszeit Proben von 10 μL entnommen, mit 1.0 mL H<sub>2</sub>O verdünnt und mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert. Der Extrakt wird mittels GC vermessen. Nach 64 h und Vorliegen einer homogenen Reaktionsmischung wird diese auf pH 1 angesäuert (2 M HCl) und mit Diethylether (30 mL) und Dicalite (5g) versetzt. Die Mischung wird über Dicalite filtriert, die Phasen werden getrennt, die wässrige Phase wird noch zwei mal mit Diethylether (30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Ausbeute: 257 mg, 1.71 mmol, 85%; Reinheit: 93%; ee-Wert: >99%;  $[\alpha]_D^{25} = -57^\circ$  (entspricht (*R*)-Enantiomer);<sup>[95]</sup> <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm] = 7.38 – 7.26 (5H, m, H-C-Ar), 3.75 (1H, q, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, H-C2), 1.52 (3H, d, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, H-C3); IPC: GC (19091J-413 HP-5. 30m x 0.32 mm x 0.25 μm, 80°C, mit 40°C/min auf 250°C):  $t_r(\mathbf{14a}) = 1.23 \text{ min}$ ,  $t_r(\mathbf{15a}) = 1.09 \text{ min}$ ; chirale HPLC (Chiralpak IB-3, 150 x 4.6 mm, 3 μm; 96% Heptan+0.1%TFA, 4% 2-Propanol, 1.0 mL/min, 210 nm, 20°C):  $t_r((R)\text{-}\mathbf{15a}) = 3.48 \text{ min}$ ,  $t_r((S)\text{-}\mathbf{15a}) = 3.71 \text{ min}$ . Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[155]</sup>

8.3.18 Synthese von **17c** mit OPR1<sub>pQR1</sub>

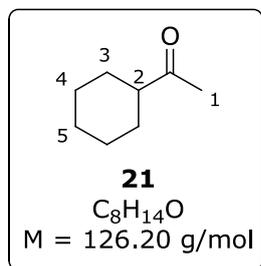
Es wird D-Glucose-Monohydrat (3.00 g, 0.015 mol) und (*E*)-2-Cyano-3-phenylacrylsäureethylester (**16c**, 300 mg, 1.5 mmol) in Phosphat-Puffer (pH 7.2, 30 mM, 10% PEG, 27.0 mL) gelöst. Unter Rühren werden 2-Propanol (500 μl), NADP<sup>+</sup> (6.00 mg, 8.1 μmol), D-Glucosedehydrogenase CDX901 (6.00 mg) und OPR1<sub>pQR1</sub> (60.0 mg) zugegeben. Der pH-Wert von 7.2 wird mit 1 M NaOH konstant gehalten. Die Reaktionslösung wird bei Raumtemperatur gerührt. Zur Umsatzbestimmung werden während der Reaktionszeit Proben von 10 μL entnommen, mit 1.0 mL H<sub>2</sub>O verdünnt und mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert. Der Extrakt wird im Stickstoffstrom eingedampft, der Rückstand in Ethanol aufgenommen und der Umsatz mittels HPLC bestimmt. Bei vollständigem Umsatz nach 41 h werden Ethylacetat (30 mL) und Dicalite (5 g) zur Mischung gegeben, anschließend wird über Dicalite filtriert. Die Phasen werden getrennt, die wässrige Phase wird noch zwei mal mit Ethylacetat (je 30 mL) extrahiert. Die

vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert. Ausbeute: 258 mg, 1.27 mmol, 84%; Reinheit: 99%;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.43 – 7.21 (5H, m, H-C-Ar), 4.24 (2H, q,  $^3J = 7.2$ , H-C2), 3.72 (1H, dd,  $^3J = 8.4$ , 5.8 Hz, H-C3), 3.28 (1H, dd,  $^3J = 13.8$ , 5.8 Hz, H-C4), 3.19 (1H, dd,  $^3J = 13.8$ , 8.4 Hz, H-C4), 1.27 (3H, t,  $^3J = 7.1$  Hz, H-C1); **IPC: HPLC** (X-Bridge C18, 2.5  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 50 mm; 215 nm, 1 mL/min, 50°C, A:  $\text{H}_2\text{O} + 0.1\% \text{TFA}$ , B:  $\text{ACN} + 0.1\% \text{TFA}$ ; Gradient: 90%A -> 10%A 3 min):  $t_r(\mathbf{16c}) = 1.75$  min,  $t_r(\mathbf{17c}) = 1.59$  min. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[156]</sup>

### 8.3.19 Allgemeine Arbeitsvorschrift 8 (AAV8): Synthese von **21** mit $\text{NCR}_{pQR1}$



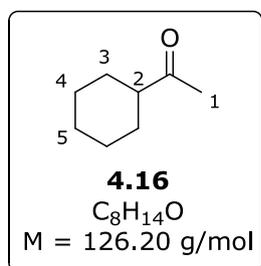
Es wird D-Glucose-Monohydrat (3.00 g, 0.015 mol) eingewogen und in Phosphatpuffer pH 7.2 (30 mM, 10% PEG6000, 21 mL) gelöst. Anschließend werden  $\text{NADP}^+$ , Glucosedehydrogenase CDX901 und  $\text{NCR}_{pQR1}$  zugegeben. 1-(Cyclohex-1-en-1-yl)ethanon (**20**) wird in Cyclohexan (6 mL) gelöst und zur Reaktionsmischung getropft. Der pH-Wert wird konstant bei pH 7.2 gehalten (1 M NaOH). Die Emulsion rührt bei Raumtemperatur. Zur Umsatzbestimmung werden während der Reaktionszeit Proben entnommen, mit 1.0 mL  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und mit 0.5 mL Ethylacetat extrahiert. Die Extrakte werden mittels GC vermessen. Bei vollständigem Umsatz werden Dicalite (5 g) und Diethylether (30 mL) zugegeben, die Mischung wird über Dicalite filtriert, die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase wird noch zwei mal extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer bei 900 bis 800 mbar entfernt. Die berechnete Ausbeute wird mittels  $^1\text{H-NMR}$  bestimmt.

8.3.19.1 Synthese von **21** bei 5% Substratkonzentration

Die Durchführung erfolgt analog zu AAV8 mit 1-(Cyclohex-1-en-1-yl)ethanon (**20**, 1.5 g, 12.1 mmol), D-Glucosedehydrogenase CDX901 (30.0 mg), NADP<sup>+</sup> (30.0 mg, 40 μmol) und NCR<sub>pQRI</sub> (300 mg). Nach 77 h wird die Reaktion beendet und wie in AAV6 beschrieben aufgearbeitet. Auswaage: 1.87g (65% **21**, 29% Cyclohexan, 6% Diethylether), entspricht 1.38g (**21**); Berechnete Ausbeute: 1.38 g, 10.9 mmol, 90%; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 2.38 – 2.27 (1H, m, H-C2), 2.13 (3H, s, H-C1), 1.93 – 1.62 (5H, m), 1.39 – 1.21 (5H, m); IPC: GC (19091J-413 HP-5, 30m x 0.32 mm x 0.25 μm, 80°C, mit 40°C/min auf 250°C): t<sub>r</sub>(**20**) = 0.60 min, t<sub>r</sub>(**21**) = 0.46 min.

**Tabelle 53.** Reaktionskontrolle mittels GC für die Synthese von **21** mittels NCR<sub>pQRI</sub>

t [h]	app. Umsatz [%]	Umsatz Prod/Ed [%]
53	91	93
76.5	95	99

8.3.19.2 Synthese von **21** bei 10% Substratkonzentration

Die Durchführung erfolgt analog zu AAV8 mit 1-(Cyclohex-1-en-1-yl)ethanon (**20**, 3.0 g, 24.2 mmol), D-Glucose-Monohydrat (6.00 g, 0.03 mol), D-Glucosedehydrogenase CDX901 (30.0 mg), NADP<sup>+</sup> (30.0 mg, 40 μmol) und NCR<sub>pQRI</sub> (600 mg). Nach 91 h werden zusätzlich D-Glucosedehydrogenase CDX901 (30.0 mg), NADP<sup>+</sup> (30.0 mg, 40 μmol) und NCR<sub>pQRI</sub> (300 mg) zugegeben. Nach 110 h wird die Reaktion beendet und wie in AAV6 beschrieben aufgearbeitet. Auswaage: 4.48g (55% **21**, 13% Cyclohexan, 32% Diethylether), entspricht 2.99g (**21**); Berechnete Ausbeute: 2.99 g, 23.7 mmol, 98%, <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm] = 2.38 – 2.26 (1H, m, H-C2), 2.13 (3H, s, H-C1), 1.92 – 1.62 (5H, m), 1.40 – 1.24 (5H, m); IPC: GC (19091J-413 HP-5, 30m x 0.32 mm x 0.25 μm, 80°C, mit 40°C/min auf 250°C): t<sub>r</sub>(**20**) = 0.60 min, t<sub>r</sub>(**21**) = 0.46 min. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[157]</sup>

**Tabelle 54.** Reaktionskontrolle mittels GC für die Synthese von **21** mittels NCR<sub>pQRI</sub>

t [h]	app. Umsatz [%]	Umsatz Prod/Ed [%]
64	67	68
85.5	73	74
110	98	100

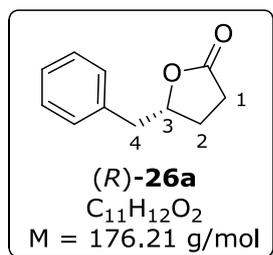
### 8.3.20 Biokatalytische Reduktion von Aza-Bailys-Hillman-Produkten mittels En-Reduktase aus *G. oxydans*

Das zu testende Substrat (**22-24**, 0.05 mmol) wird in Phosphatpuffer (pH 6, 10 mM) mit D-Glucose-Monohydrat (19.8 mg, 0.1 mmol), Glucosedehydrogenase (0.5 mg, 40.7 U), NADP<sup>+</sup> (5 mg, 5 μmol) und En-Reduktase aus *G. oxydans* (135 μL, Rohextrakt, volumetrische Aktivität 37 U/mL) bei Raumtemperatur gerührt. Der pH-Wert wird durch kontinuierliche Titration mit NaOH-Lösung (0.2 M) konstant gehalten. Nach 24 h wird mit Dichlormethan extrahiert (3 x 10 mL), über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wird mittels <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie analysiert. Bei allen getesteten Substraten (6-(4-Chlorphenyl)-5-methylene-1-tosyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-3-carbaldehyd (**22**); N-(1-(4-Chlorphenyl)-2-methylene-3-oxobutyl)-4-methylbenzolsulfonamid (**23**), N-(1-(4-Chlorphenyl)-2-formylallyl)-4-methylbenzolsulfonamid (**24**)) liegt der Umsatz unterhalb der NMR-Nachweisgrenze.

### 8.3.21 Allgemeine Arbeitsvorschrift 9 (AAV9): Biokatalytische Reduktion von $\gamma$ -Butyrolactonen mittels En-Reduktase aus *G. oxydans*

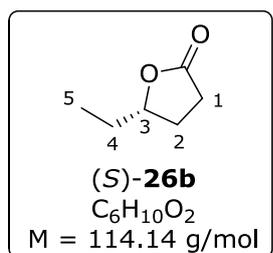


Das entsprechende Butyrolacton (**25**, 0.08-0.10 mmol) wird in Phosphatpuffer (pH 6, 10 mM) gelöst und mit Glucose-Monohydrat (0.2 mmol), Glucosedehydrogenase und NADP<sup>+</sup> (0.01 mmol) versetzt. Nach der Zugabe von En-Reduktase aus *G. oxydans* wird das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur gerührt. Zum konstant halten des pH-Werts wird kontinuierlich NaOH-Lösung (0.2 M) am Titrino zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 6 h bzw. 12 h wird mit Dichlormethan (4 x 10 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Produkt wird mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie analysiert.

8.3.21.1 Synthese von (*R*)-5-Benzylidihydrofuran-2(3H)-on ((*R*)-**26a**)

Die Durchführung erfolgt analog zu AAV9 mit (*S*)-5-Benzylfuran-2(5H)-on (**25a**, 48% ee, 14.7 mg, 0.08 mmol), D-Glucose-Monohydrat (39.6 mg, 0.2 mmol), Glucosedehydrogenase (1.0 mg, 81.3 U), NADP<sup>+</sup> (10 mg, 0.01 mmol) und GOx-ER (714  $\mu$ L, Rohextrakt, volumetrische Aktivität 14 U/mL). Nach 24 h bei Raumtemperatur erfolgt die Aufarbeitung wie in AAV7 beschrieben. Umsatz: >99%, Auswage:

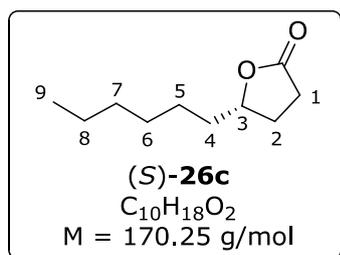
18 mg; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [ppm] = 7.32 – 7.18 (5H, m, H-C-Ar), 4.74 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 7.6, 6.4 Hz, H-C3), 3.08 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 14.0, 6.1 Hz, H-C4), 2.93 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 14.0, 6.3 Hz, H-C4), 2.53 – 2.33 (2H, m, H-C1), 2.29 – 2.22 (1H, m, H-C2), 2.00 – 1.92 (1H, m, H-C2).

8.3.21.2 Synthese von (*S*)-5-Ethylidihydrofuran-2(3H)-on ((*S*)-**26b**)

Die Durchführung erfolgt analog zu AAV9 mit (*S*)-5-Ethylfuran-2(5H)-on (**25b**, 54% ee, 11.2 mg, 0.1 mmol), D-Glucose-Monohydrat (39.6 mg, 0.2 mmol), Glucosedehydrogenase (1.0 mg, 81.3 U), NADP<sup>+</sup> (10 mg, 0.01 mmol) und GOx-ER (714  $\mu$ L, Rohextrakt, volumetrische Aktivität 14 U/mL). Anschließend erfolgt die Aufarbeitung wie in AAV7 beschrieben. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 4.49 – 4.38 (1H, m, H-C3), 2.59 – 2.48 (2H, m, H-C1), 2.39 – 1.60 (4H, m, H-C2/C4), 1.01 (3H, t, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, H-C5).

**Tabelle 55.** Ergebnisse zu Synthese von (*S*)-**26b** nach 6h und 24h

Nr	t [h]	Umsatz [%]
1	6	96
2	24	>99

8.3.21.3 Synthese von (*S*)-5-Hexylidihydrofuran-2(3H)-on ((*S*)-**26c**)

Die Durchführung erfolgt analog zu AAV9 mit (*S*)-5-Hexylfuran-2(5H)-on (**25c**, 52% ee, 16.8 mg, 0.1 mmol), D-Glucose-Monohydrat (39.6 mg, 0.2 mmol), Glucosedehydrogenase (1.0 mg, 81.3 U), NADP<sup>+</sup> (10 mg, 0.01 mmol) und GOx-ER (714  $\mu$ L, Rohextrakt, volumetrische Aktivität 14 U/mL). Anschließend erfolgt die Aufarbeitung wie in AAV7 beschrieben. <sup>1</sup>H-NMR (500

MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 4.55 – 4.44 (1H, m, H-C3), 2.60 – 2.46 (2H, m, H-C1), 2.32 (1H, m, H-

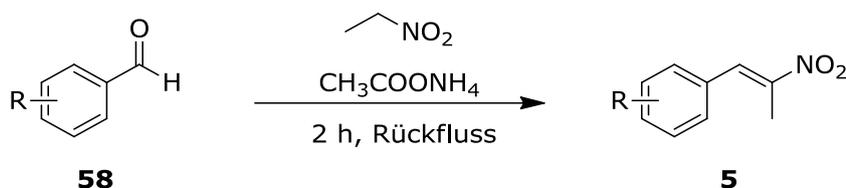
**C2**), 1.92 – 1.79 (1H, m, H-**C2**), 1.73– 1.18 (10H, m, H-**C4/C5/C6/C7/C8**), 0.88 (3H, t,  $^3J = 6.7$  Hz, H-**C9**).

**Tabelle 56.** Ergebnisse zu Synthese von (*S*)-**26c** nach 6h und 24h

Nr	t [h]	Umsatz [%]	ee ( <b>25c</b> ) [%]
<b>1</b>	6	40	52
<b>2</b>	24	>99	nb

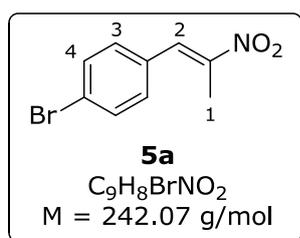
## 8.4 Synthesen und spektroskopische Daten: Biokatalytische Synthese $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkane

### 8.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift 10 (AAV10): Synthese $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkene (**5**)



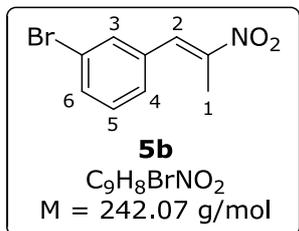
Die Durchführung erfolgt analog zu KAWAI *et al.*<sup>[79]</sup> In einem 50 mL-Rundkolben werden das substituierte Benzaldehyd-Derivat (**58**, 1 Äq) und Ammoniumacetat (1 Äq) in Nitroethan (30 Äq) für 2 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird Nitroethan im Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (20 mL) aufgenommen. Es wird mit Wasser (20 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (20 mL) gewaschen, die organische Phase über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt und mittels  $^1\text{H-NMR}$  charakterisiert.

#### 8.4.1.1 Synthese von 1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropen (**5a**)

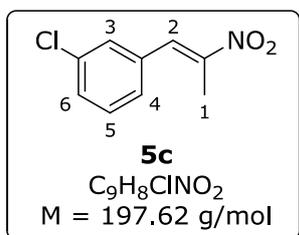


Die Durchführung erfolgt analog zu AAV10 mit 4-Brombenzaldehyd (**58a**, 1.85 g, 10 mmol), Ammoniumacetat (0.770 g, 10 mmol) und Nitroethan (20 mL) bei einer Reaktionszeit von 2 h. Nach säulenchromatographischer Reinigung ( $\text{SiO}_2$ , Cyclohexan: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:1) wird 1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropen als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 1.93 g, 7.97 mmol, 80%;  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$

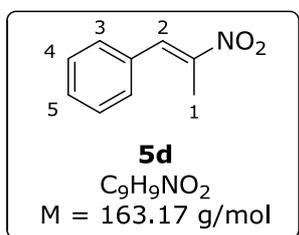
[ppm] = 8.01 (1H, s, H-C2), 7.59 – 7.60 (2H, m, H-C-Ar), 7.29 – 7.31 (2H, m, H-C-Ar), 2.43 (3H, s, H-C1). Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[158]</sup>

8.4.1.2 Synthese von 1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropen (**5b**)

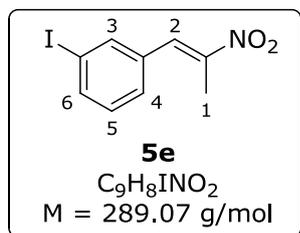
Die Durchführung erfolgt analog zu AAV10 mit 3-Brombenzaldehyd (**58b**, 2.34 mL, 20 mmol), Ammoniumacetat (1.54 g, 20 mmol) und Nitroethan (40 mL) bei einer Reaktionszeit von 2 h. Nach säulenchromatographischer Reinigung ( $SiO_2$ , Cyclohexan: $CH_2Cl_2$  1:1) wird 1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropen als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 3.42 g, 14.1 mmol, 71%;  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.00 (1H, s, H-C2), 7.33 – 7.56 (4H, m, H-C-Ar), 2.44 (3H, s, H-C1). Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17,85]</sup>

8.4.1.3 Synthese von 1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropen (**5c**)

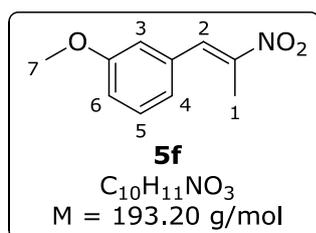
Die Durchführung erfolgt analog zu AAV10 mit 3-Chlorbenzaldehyd (**58c**, 1.13 g, 10 mmol), Ammoniumacetat (0.770 g, 10 mmol) und Nitroethan (20 mL) bei einer Reaktionszeit von 2 h. Nach säulenchromatographischer Reinigung ( $SiO_2$ , Cyclohexan: $CH_2Cl_2$  1:1) wird 1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropen als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 1.63 g, 8.24 mmol, 82 %,  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.03 (1H, s, H-C2), 7.42 – 7.44 (3H, m, H-C-Ar), 7.31 – 7.34 (1H, m, H-C-Ar), 2.46 (3H, s, H-C1). Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[79]</sup>

8.4.1.4 Synthese von 1-Phenyl-2-Nitropropen (**5d**)

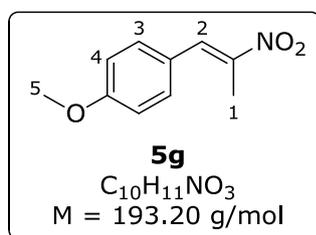
Die Durchführung erfolgt analog zu AAV10 mit frisch destilliertem Benzaldehyd (**58d**, 1.06 g, 10 mmol), Ammoniumacetat (0.770 g, 10 mmol) und Nitroethan (20 mL) bei einer Reaktionszeit von 2 h. Nach säulenchromatographischer Reinigung ( $SiO_2$ , Cyclohexan: $CH_2Cl_2$  1:1) wird 1-Phenyl-2-nitropropen als gelber Feststoff erhalten. Ausbeute: 1.19 g, 7.29 mmol, 73%;  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.10 (1H, s, H-C2), 7.48 – 7.41 (5H, m, H-C-Ar), 2.46 (3H, d,  $^3J = 1.1 \text{ Hz}$ , H-C1). Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[79]</sup>

8.4.1.5 Synthese von 1-(3-Iodphenyl)-2-nitropropen (**5e**)

Die Durchführung erfolgt analog zu AAV10 mit 3-Iodbenzaldehyd (**58e**, 2.32 g, 10 mmol), Ammoniumacetat (0.770 g, 10 mmol) und Nitroethan (20 mL) bei einer Reaktionszeit von 2 h. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1) wird 1-(3-Iodphenyl)-2-nitropropen als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 1.57 g, 5.43 mmol, 54%; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.97 (1H, s, H-C2), 7.76 (2H, m, H-C-Ar), 7.41 – 7.36 (1H, m, H-C-Ar), 7.19 (1H, m, H-C-Ar), 2.43 (3H, d, <sup>3</sup>J = 1.2 Hz, H-C1). Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[18]</sup>

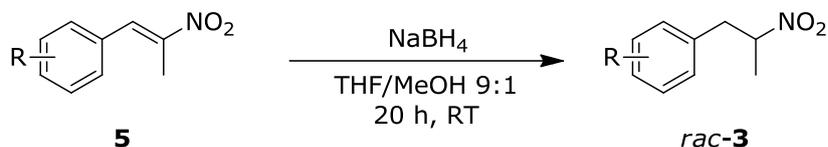
8.4.1.6 Synthese von 1-(3-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**5f**)

Die Durchführung erfolgt analog zu AAV10 mit 3-Methoxybenzaldehyd (**58f**, 1.36 mL, 10 mmol), Ammoniumacetat (0.770 g, 10 mmol) und Nitroethan (20 mL) bei einer Reaktionszeit von 2 h. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1) wird 1-(3-Methoxyphenyl)-2-nitropropen als gelber Feststoff erhalten. Ausbeute: 1.27 g, 6.58 mmol, 66%; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.06 (1H, s, H-C2), 7.36 – 7.39 (1H, m, H-C-Ar), 6.94 – 7.03 (3H, m, H-C-Ar), 3.84 (3H, s, H-C7), 2.45 (3H, s, H-C1). Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[79]</sup>

8.4.1.7 Synthese von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**5g**)

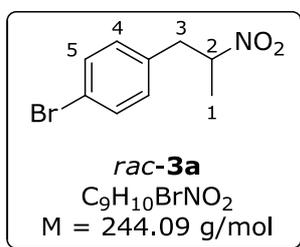
Die Synthese verläuft analog zu AAV10 mit 4-Methoxybenzaldehyd (**58g**, 1.36 mL, 10 mmol), Ammoniumacetat (0.770 g, 10 mmol) und Nitroethan (20 mL) bei einer Reaktionszeit von 2 h. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1) wird 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen als gelber Feststoff erhalten. Ausbeute: 1.64 g, 8.49 mmol, 85%; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.10 (1H, s, H-C2), 7.44 – 7.46 (2H, m, H-C-Ar), 6.99 – 7.02 (2H, m, H-C-Ar), 3.89 (3H, s, H-C5), 2.50 (3H, s, H-C1). Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[79]</sup>

## 8.4.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift 11 (AAV11): Synthese racemischer Nitroalkane (*rac-3*) mit Natriumborhydrid



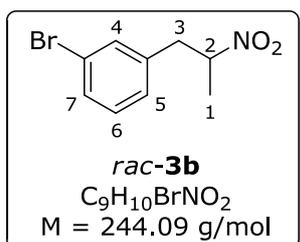
Das zu reduzierende Nitroalken (**5**, 1 Äq) wird in einem Gemisch aus THF und Methanol (5 mL, 9:1) gelöst und Natriumborhydrid (1.5 Äq) portionsweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wird für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit Wasser (30 mL) gequenchet und mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wird ggf. säulenchromatographisch gereinigt, mittels <sup>1</sup>H-NMR identifiziert und zur Etablierung einer HPLC-Analytikmethode verwendet.

### 8.4.2.1 Synthese von *rac*-1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropan (*rac-3a*)



Die Synthese erfolgt analog zu AAV11 mit 1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropan (**5a**, 121 mg, 0.5 mmol) und Natriumborhydrid (28 mg, 0.75 mmol). 1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropan wird als farblose Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 84.5 mg, 0.34 mmol, 68%; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.42 – 7.45 (2H, m, H-C-Ar), 7.02 – 7.05 (2H, m, H-C-Ar), 4.71 – 4.78 (1H, m, H-C2), 3.26 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz, <sup>2</sup>J = 14.2 Hz, H-C3), 2.97 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 6.4, 14.2 Hz, H-C3), 1.54 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, H-C1); **chirale HPLC** (OD-H, CO<sub>2</sub>:Hexan:2-Propanol 90:9:1, 0.8 mL/min, 30°C, 220 nm): t<sub>r</sub>((S)-**3a**) = 23.3 min, t<sub>r</sub>((R)-**3a**) = 25.0 min. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[159]</sup>

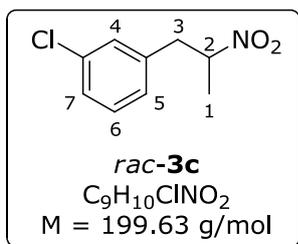
### 8.4.2.2 Synthese von *rac*-1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropan (*rac-3b*)



Die Synthese erfolgt analog zu AAV11 mit 1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropan (**5b**, 98.8 mg, 0.5 mmol) und Natriumborhydrid (28 mg, 0.75 mmol). 1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropan wird als blassgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 87.0 mg, 0.36 mmol, 71%; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.45 – 7.04 (4H, m, H-C-Ar), 4.76 (1H, m, H-C2), 3.30 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 14.1, 7.7 Hz, H-C3), 2.98 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 14.1, 6.5 Hz,

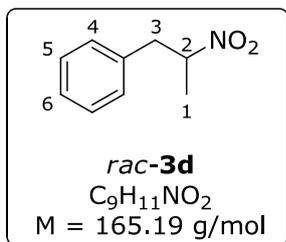
**H-C3**), 1.56 (3H, d,  $^3J = 6.7$  Hz, **H-C1**); **chirale HPLC** (OJ-H, Hexan:2-Propanol 90:10, 0.8 mL/min, 220 nm, 25°C):  $t_r((S)\text{-3b}) = 17.5$  min,  $t_r((R)\text{-3b}) = 18.1$  min. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17,85]</sup>

#### 8.4.2.3 Synthese von *rac*-1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropan (*rac*-**3c**)

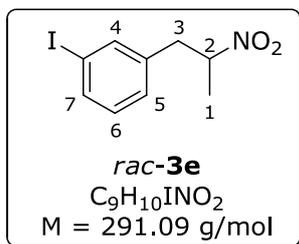


Die Synthese erfolgt analog zu AAV11 mit 1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropan (**5c**, 98.8 mg, 0.5 mmol) und Natriumborhydrid (28 mg, 0.75 mmol). 1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropan wird als farblose Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 69.5 mg, 0.35 mmol, 70%; **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.22 – 7.28 (2H, m, **H-C-Ar**), 7.17 – 7.18 (1H, m, **H-C-Ar**), 7.03 – 7.06 (1H, m, **H-C-Ar**), 4.71 – 4.82 (1H, m, **H-C2**), 3.30 (1H, dd,  $^3J = 7.7, 14.1$  Hz, **H-C3**), 2.99 (1H, dd,  $^3J = 6.5, 14.1$  Hz, **H-C3**), 1.56 (3H, d,  $^3J = 6.5$  Hz, **H-C1**); **chirale HPLC** (AD-H, CO<sub>2</sub>/Hexan/2-Propanol 90:9:1, 0.8 mL/min, 20 °C, 220 nm):  $t_r((S)\text{-3c}) = 16.1$  min,  $t_r((R)\text{-3c}) = 17.5$  min. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[79]</sup>

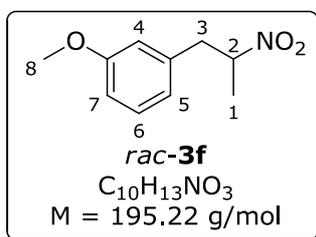
#### 8.4.2.4 Synthese von *rac*-1-Phenyl-2-nitropropan (*rac*-**3d**)



Die Synthese erfolgt analog zu AAV11 mit 1-Phenyl-2-nitropropan (**5d**, 163 mg, 1.0 mmol) und Natriumborhydrid (58 mg, 1.5 mmol). Das Rohprodukt wird über Kieselgel filtriert (Dichlormethan). 1-Phenyl-2-nitropropan wird als blassgelbes Öl erhalten. Umsatz: >99% (78% produktbezogener Umsatz zu *rac*-**3d**, 22% 1-Phenyl-2-propanon (**55d**)); **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.40 – 7.12 (5H, m, **H-C-Ar**), 4.78 (1H, m, **H-C2**), 3.33 (1H, dd,  $^3J = 14.0, 7.4$  Hz, **H-C3**), 3.01 (1H, dd,  $^3J = 14.0, 6.9$  Hz, **H-C3**), 1.56 (3H, d,  $^3J = 4.3$  Hz, **H-C1**); **chirale HPLC** (OJ-H, Hexan:2-Propanol 90:10, 0.8 mL/min, 25 °C, 230 nm):  $t_r((R)\text{-3d}) = 13.9$  min,  $t_r((S)\text{-3d}) = 15.2$  min. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[79]</sup>

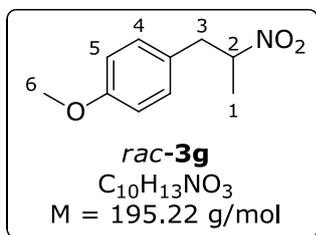
8.4.2.5 Synthese von *rac*-1-(3-Iodphenyl)-2-nitropropan (*rac*-**3e**)

Die Synthese erfolgt analog zu AAV11 mit 1-(3-Iodphenyl)-2-nitropropan (**5e**, 155 mg, 0.5 mmol) und Natriumborhydrid (28 mg, 0.75 mmol). Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan:Ethylacetat 4:1). 1-(3-Iodphenyl)-2-nitropropan wird als blassgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 45 mg, 0.15 mmol, 30%; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.64 (1H, m, H-C-Ar), 7.57 (1H, s, H-C-Ar), 7.19 – 7.12 (1H, m, H-C-Ar), 7.08 (1H, m, H-C-Ar), 4.78 (1H, m, H-C2), 3.29 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 14.1, 7.7 Hz, H-C3), 2.97 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 14.1, 6.5 Hz, H-C3), 1.58 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, H-C1); **chirale HPLC** (OJ-H, Hexan:2-Propanol 90:10, 0.8 mL/min, 25°C, 220 nm): t<sub>r</sub>((S)-**3e**) = 20.5 min, t<sub>r</sub>((R)-**3e**) = 21.6 min. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[18]</sup>

8.4.2.6 Synthese von *rac*-1-(3-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-**3f**)

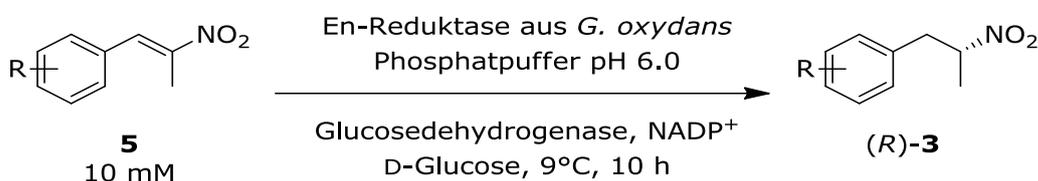
Die Synthese erfolgt analog zu AAV11 mit 1-(3-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (**5f**, 96.6 mg, 0.5 mmol) und Natriumborhydrid (28 mg, 0.75 mmol). 1-(3-Methoxyphenyl)-2-nitropropan wird als farblose Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 68.9 mg, 0.35 mmol, 70 %; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.22 – 7.25 (1H, m, H-C-Ar), 6.67 – 6.83 (3H, m, H-C-Ar), 4.78 (1H, m, H-C2), 3.79 (3H, s, H-C8), 3.31 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 13.9, 7.4 Hz, H-C3), 2.98 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 13.9, 6.9 Hz, H-C3), 1.55 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, H-C1); **chirale HPLC** (OJ-H+IB, CO<sub>2</sub>:Hexan:2-Propanol 90:9:1, 0.8 mL/min, 35°C, 220 nm): t<sub>r</sub>((S)-**3f**) = 39.4 min, t<sub>r</sub>((R)-**3f**) = 41.0 min. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[79]</sup>

### 8.4.2.7 Synthese von *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-**3g**)



Die Synthese erfolgt analog zu AAV11 mit 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (**5g**, 773 mg, 4.0 mmol) und Natriumborhydrid (231 mg, 6.1 mmol) in 20.0 mL einer THF/Methanol (10/1) Mischung. 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan wird als farbloses Öl erhalten. Ausbeute 688 mg, 3.52 mmol, 88%; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.11 – 7.04 (2H, m, H-C-Ar), 6.87 – 6.80 (2H, m, H-C-Ar), 4.73 (1H, m, H-C2), 3.79 (3H, s, H-C6), 3.25 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 14.1, 7.5 Hz, H-C3), 2.96 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 14.1, 6.7 Hz, H-C3), 1.53 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, H-C1); **chirale HPLC** (OD-H, CO<sub>2</sub>:Hexan:2-Propanol 90:9:1, 0.8 mL/min, 20°C, 220 nm): t<sub>r</sub>((*S*)-**3g**) = 23.3 min, t<sub>r</sub>((*R*)-**3g**) = 27.1 min. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[79]</sup>

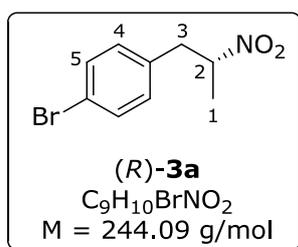
### 8.4.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift 12 (AAV12): Biokatalytische Reduktion α-Methyl-substituierter Nitroalkene im 100 mL-Maßstab mittels En-Reduktase aus *G. oxydans*



Die Reaktion wird in einem Gesamtvolumen von 100 mL durchgeführt. Das α,β-disubstituierte Nitroalken (**5**, 1.0 mmol.) wird schrittweise in Phosphatpuffer (pH 6, 10 mM) im Ultraschallbad suspendiert. Die Suspension wird unter Rühren auf 9°C gekühlt und mit D-Glucose (2.0 mmol), NADP<sup>+</sup> (0.1 mmol) und Glucosedehydrogenase aus *Bacillus* sp. (Bsp-GDH, 2 mg, spezifische Aktivität 80 U/mg) versetzt. Anschließend wird En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* (gereinigtes Lyophilisat, 40 U bezogen auf *trans*-2-Hexenal) zugegeben und die Reaktionsmischung wird bei 9°C für 5 h gerührt. Der pH-Wert wird durch kontinuierliche Titration mit NaOH (wässrige Lösung, 0.2 M) konstant gehalten. Das Reaktionsgefäß wird für 10 Minuten im Ultraschallbad beschallt, es wird erneut Bsp-GDH (2 mg, spezifische Aktivität 80 U/mg) zugegeben und für weitere 5 h bei 9°C gerührt. Der pH-Wert wird durch kontinuierliche Titration mit NaOH (wässrige Lösung, 0.2 M) konstant gehalten. Nach einer Gesamtreaktionszeit von 10 h wird mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert (3 x 100 mL), über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 30°C entfernt. Der blassgelbe Rückstand

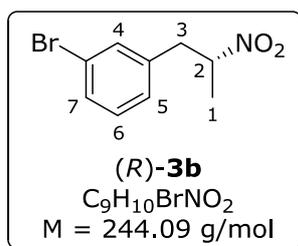
wird gegebenenfalls säulenchromatographisch gereinigt und mittels  $^1\text{H-NMR}$ , chiraler HPLC und Polarimeter charakterisiert.

#### 8.4.3.1 Biokatalytische Synthese von (*R*)-1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropan (**(*R*)-3a**)



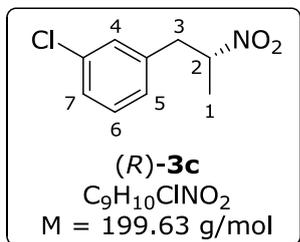
Die Durchführung erfolgt analog zu AAV12 mit 1-(4-Bromphenyl)-2-nitropropan (**5a**, 242 mg, 1.0 mmol) und gereinigter En-Reduktase aus *G. oxydans* (21.4 mg, 52% Proteingehalt, 40 U, 3.6 U/mg bezogen auf *trans*-2-Hexenal). Umsatz: 31% (27% **3a**, 4% 1-(4-Bromphenyl)-2-propanon (**59a**)); ee-Wert: 81%;  $[\alpha]_D^{25}$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 1.62 \text{ g/L}$ ) =  $-33^\circ$  (entspricht (*R*)-Enantiomer);  $^{82,160} \text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.55 (3H, d,  $^3J = 6.7 \text{ Hz}$ , H-C1), 2.98 (1H, dd,  $^3J = 14.2, 6.4 \text{ Hz}$ , H-C3), 3.27 (1H, dd,  $^3J = 14.2, 7.8 \text{ Hz}$ , H-C3), 4.75 (1H, m, H-C2), 7.03-7.45 (4H, m, H-C-Ar); **chirale HPLC** (OD-H,  $\text{CO}_2$ :Hexan:2-Propanol 90:9:1, 0.8 mL/min,  $30^\circ\text{C}$ , 220 nm):  $t_r((S)\text{-3a}) = 23.3 \text{ min}$ ,  $t_r((R)\text{-3a}) = 25.0 \text{ min}$ . Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[159]</sup>

#### 8.4.3.2 Biokatalytische Synthese von (*R*)-1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropan (**(*R*)-3b**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV12 mit 1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropan (**5b**, 242 mg, 1.0 mmol) und gereinigter En-Reduktase aus *G. oxydans* (111 mg, 40 U, 0.36 U/mg bezogen auf *trans*-2-Hexenal). Das Rohprodukt wird über Silica mit Cyclohexan: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1) filtriert. Umsatz: >99%; Ausbeute: 205 mg, 0.84 mmol, 84%; ee-Wert: 95%;  $[\alpha]_D^{25}$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 4.06 \text{ g/L}$ ) =  $-53^\circ$  (entspricht (*R*)-Enantiomer);  $^{82,160} \text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.09 – 7.42 (4H, m, H-C-Ar), 4.76 (1H, m, H-C2), 3.30 (1H, dd,  $^3J = 14.1, 7.7 \text{ Hz}$ , H-C3), 2.98 (1H, dd,  $^3J = 14.1, 6.5 \text{ Hz}$ , H-C3), 1.56 (3H, d,  $^3J = 6.7 \text{ Hz}$ , H-C1); **chirale HPLC** (OJ-H, Hexan:2-Propanol 90:10, 0.8 mL/min, 220 nm,  $25^\circ\text{C}$ ):  $t_r((S)\text{-3b}) = 17.5 \text{ min}$ ,  $t_r((R)\text{-3b}) = 18.1 \text{ min}$ . Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17]</sup>

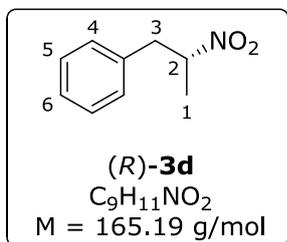
### 8.4.3.3 Biokatalytische Synthese von (*R*)-1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropan ((*R*)-**3c**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV12 mit 1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropan (**5c**, 197.6 mg, 1.0 mmol) und gereinigter En-Reduktase aus *G. oxydans* (21.4 mg, 52% Proteingehalt, 40 U, 1.87 U/mg bezogen auf *trans*-2-Hexenal). Auswaage: 162 mg, Umsatz: 96% (95% **3c**, 1% 1-(3-Chlorphenyl)-2-propanon (**59c**)); ee-Wert: 94%;  $[\alpha]_D^{25}$  ( $CHCl_3$ ,  $c = 2.77 \text{ g/L}$ ) =  $-45^\circ$  (entspricht (*R*)-Enantiomer);

<sup>[82,160]</sup> **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.04 – 7.26 (4H, m, H-C-Ar), 4.77 (1H, m, H-C2), 3.30 (1H, dd,  $^3J = 14.1, 7.7 \text{ Hz}$ , H-C3), 2.99 (1H, dd,  $^3J = 14.1, 6.5 \text{ Hz}$ , H-C3), 1.57 (3H, d,  $^3J = 6.5 \text{ Hz}$ , H-C1); **chirale HPLC** (AD-H,  $CO_2$ :Hexan:2-Propanol 90:9:1, 0.8 mL/min, 220 nm, 20°C):  $t_r((S)\text{-3c}) = 16.1 \text{ min}$ ,  $t_r((R)\text{-3c}) = 17.5 \text{ min}$ . Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[79]</sup>

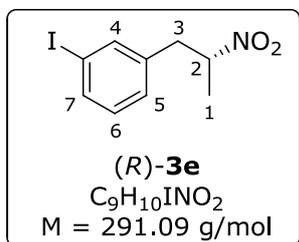
### 8.4.3.4 Biokatalytische Synthese von (*R*)-1-Phenyl-2-nitropropan ((*R*)-**3d**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV12 mit 1-Phenyl-2-nitropropan (**5d**, 163 mg, 1.0 mmol) und gereinigter En-Reduktase aus *G. oxydans* (21.4 mg, 52% Proteingehalt, 40 U, 3.6 U/mg bezogen auf *trans*-2-Hexenal). Umsatz: 76% (71% **3d**, 5% 1-Phenyl-2-propanon (**59d**)); ee-Wert: 90%;  $[\alpha]_D^{25}$  ( $CHCl_3$ ,  $c = 1.75 \text{ g/L}$ ) =  $-29^\circ$  (entspricht (*R*)-Enantiomer); <sup>[82,160]</sup> **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$

[ppm] = 7.16-7.34 (4H, m, H-C-Ar), 4.78 (1H, m, H-C2), 3.33 (1H, dd,  $^3J = 14.0, 7.4 \text{ Hz}$ , H-C3), 3.01 (1H, dd,  $^3J = 14.0, 6.9 \text{ Hz}$ , H-C3), 1.55 (3H, d,  $^3J = 6.6 \text{ Hz}$ , H-C1); **chirale HPLC** (OJ-H, Hexan:2-Propanol 90:10, 0.8 mL/min, 25°C, 230nm):  $t_r((R)\text{-3d}) = 13.9 \text{ min}$ ,  $t_r((S)\text{-3d}) = 15.2 \text{ min}$ . Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[79]</sup>

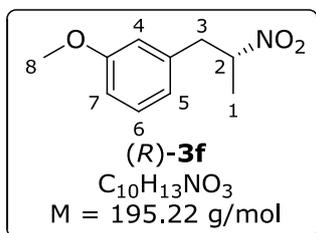
### 8.4.3.5 Biokatalytische Synthese von (*R*)-1-(3-Iodphenyl)-2-nitropropan ((*R*)-**3e**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV12 mit 1-(3-Iodphenyl)-2-nitropropan (**5e**, 288 mg, 1.0 mmol) und gereinigter En-Reduktase aus *G. oxydans* (111 mg, 40 U, 0.36 U/mg bezogen auf *trans*-2-Hexenal). Das Rohprodukt wurde über Silica mit  $CH_2Cl_2$  filtriert. Umsatz: 99%; Ausbeute: 227 mg, 0.84 mmol, 84%; ee-Wert: 93%;  $[\alpha]_D^{25}$  ( $CHCl_3$ ,  $c = 1.525 \text{ g/L}$ ) =  $-15^\circ$  (entspricht (*R*)-Enantiomer);<sup>[82,160]</sup>

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.04 – 7.62 (4H, m, H-C-Ar), 4.75 (1H, m, H-C2), 3.27 (1H, dd,  $^3J = 14.1, 7.7 \text{ Hz}$ , H-C3), 2.95 (1H, dd,  $^3J = 14.1, 6.6 \text{ Hz}$ , H-C3), 1.56 (3H, d,  $^3J = 6.8 \text{ Hz}$ , H-C1); **chirale HPLC** (OJ-H, Hexan:2-Propanol 90:10, 0.8 mL/min,  $25^\circ C$ , 220 nm):  $t_r((S)\text{-3e}) = 20.5 \text{ min}$ ,  $t_r((R)\text{-3e}) = 21.6 \text{ min}$ . Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[18]</sup>

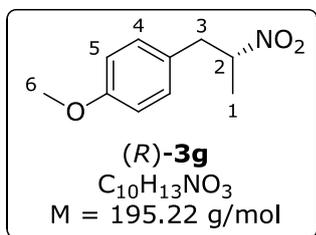
### 8.4.3.6 Biokatalytische Synthese von (*R*)-1-(3-Methoxyphenyl)-2-nitropropan ((*R*)-**3f**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV12 mit 1-(3-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (**5f**, 193 mg, 1.0 mmol) und gereinigter En-Reduktase aus *G. oxydans* (83 mg, 39% Proteingehalt, 40 U, 0.48 U/mg bezogen auf *trans*-2-Hexenal). Umsatz: 95% (93% **3f**, 2% 1-(3-Methoxyphenyl)-2-propanon (**59f**)); ee-Wert: 93%;  $[\alpha]_D^{25}$  ( $CHCl_3$ ,  $c = 1.42 \text{ g/L}$ ) =  $-49^\circ$  (entspricht (*R*)-

Enantiomer);<sup>[82,160]</sup>  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 6.70 – 7.25 (4H, m, H-C-Ar), 4.78 (1H, q,  $^3J = 6.9 \text{ Hz}$ , H-C2), 3.79 (3H, s, H-C8), 3.31 (1H, dd,  $^3J = 13.9, 7.4 \text{ Hz}$ , H-C3), 2.98 (1H, dd,  $^3J = 13.9, 6.9 \text{ Hz}$ , H-C3), 1.55 (3H, d,  $^3J = 6.7 \text{ Hz}$ , H-C1); **chirale HPLC** (OJ-H+IB,  $CO_2$ :Hexan:2-Propanol 90:9:1, 0.8 mL/min,  $35^\circ C$ , 220nm):  $t_r((S)\text{-3f}) = 39.4 \text{ min}$ ,  $t_r((R)\text{-3f}) = 41.0 \text{ min}$ . Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[79]</sup>

### 8.4.3.7 Biokatalytische Synthese von (*R*)-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan ((*R*)-**3g**)



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV12 mit 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (**5g**, 193 mg, 1.0 mmol) und gereinigter En-Reduktase aus *G. oxydans* (21.4 mg, 52% Proteingehalt, 40 U, 3.6 U/mg bezogen auf *trans*-2-Hexenal). Umsatz: 53% (30% **3g**, 23% 1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanon (**59g**)); ee-Wert: 66%;  $[\alpha]_D^{25}$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 1.16 g/L) = -25° (entspricht (*R*)-Enantiomer);<sup>[82,160]</sup> <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 6.83-7.09 (4H, m, H-C-Ar), 4.73 (1H, m, H-C2), 3.79 (3H, s, H-C6), 3.25 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 14.1 Hz, 7.5 Hz, H-C3), 2.96 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 14.1 Hz, 6.7 Hz, H-C3), 1.53 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, H-C1); **chirale HPLC** (OD-H, CO<sub>2</sub>:Hexan:2-Propanol 90:9:1, 0.8 mL/min, 20°C, 220nm): t<sub>r</sub>((*S*)-**3g**) = 23.3 min, t<sub>r</sub>((*R*)-**3g**) = 27.1 min. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[79]</sup>

### 8.4.4 Untersuchungen zur Racemisierung α-Methyl-substituierter Nitroalkane in Abhängigkeit von En-Reduktase, Glucosedehydrogenase und Temperatur

Es werden 60 mg einer Mischung aus 1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropan (**5c**) und (*R*)-1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropan ((*R*)-**3c**, 93% ee) mit einem Umsatz von 85% in Phosphatpuffer (25 mL, pH 6, 10 mM) im Ultraschallbad emulgiert und dann für 5 h bei 9°C bzw. 25°C am Titrino unter konstant halten des pH-Werts bei pH 6 durch kontinuierliche Titration mit NaOH (wässrige Lösung, 0.1 M) gerührt (490 rpm). Nach 5h wird die Mischung mit Ultraschall behandelt und erneut für 5 h bei 9°C bzw. 25°C am Titrino unter konstant halten des pH-Werts bei pH 6 durch kontinuierliche Titration mit NaOH (wässrige Lösung, 0.1 M) gerührt (490 rpm). Anschließend wird mit Dichlormethan extrahiert (3 x 20 mL), über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wird mittels <sup>1</sup>H-NMR und chiraler HPLC untersucht. Die spektroskopischen Daten und Analytik-Methoden entsprechen denen in Abschnitt 8.4.2.3. Diese Versuchsdurchführung wurde für die folgenden Bedingungen angewandt: a) Phosphatpuffer pH 6, 10 mM; b) Phosphatpuffer pH 6, 10 mM, En-Reduktase aus *G. oxydans* (7.4 mg, Aktivität von 1.35 U/mg, 10 U); c) Phosphatpuffer pH 6, 10 mM, Glucosedehydrogenase aus *Bacillus* sp. (2 x 0.5 mg, jeweils nach Ultraschallbehandlung), d) Phosphatpuffer pH 6, 10 mM, En-Reduktase aus *G. oxydans* (7.4 mg, Aktivität von 1.35 U/mg, 10 U, hitzedenaturiert (15 min, 80°C)), e) Phosphatpuffer pH 6, 10 mM, En-Reduktase aus *G. oxydans* (7.4 mg, Aktivität von 1.35 U/mg, 10 U), Glucose-Monohydrat (99 mg, 0.5 mmol).

**Tabelle 57.** Ergebnisse der Racemisierungsversuche in Abhängigkeit von En-Reduktase, Glucosedehydrogenase und Temperatur

Eintrag	T [°C]	Bedingung	ee [%]
<b>1</b>	9	a)	93
<b>2</b>	9	b)	72
<b>3</b>	9	b)	77
<b>3</b>	9	c)	93
<b>4</b>	9	d)	93
<b>5</b>	9	e)	72
<b>6</b>	25	a)	93
<b>7</b>	25	b)	27
<b>8</b>	25	c)	93

a) Phosphatpuffer pH 6, 10 mM; b) Phosphatpuffer pH 6, 10 mM, En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* (7.4 mg, Aktivität von 1.35 U/mg, 10 U); c) Phosphatpuffer pH 6, 10 mM, Glucosedehydrogenase aus *Bacillus* sp. (2 x 0.5 mg, jeweils nach Ultraschallbehandlung), d) Phosphatpuffer pH 6, 10 mM, En-Reduktase aus *G. oxydans* (7.4 mg, Aktivität von 1.35 U/mg, 10 U, hitzedenaturiert (15 min, 80°C)), e) Phosphatpuffer pH 6, 10 mM, En-Reduktase aus *G. oxydans* (7.4 mg, Aktivität von 1.35 U/mg, 10 U), Glucose-Monohydrat (99 mg, 0.5 mmol)

#### 8.4.5 Untersuchungen zur Racemisierung $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkane (**3**) in Abhängigkeit von Temperatur und Nitroalkenkonzentration

Es wird das Nitroalkan (*R*)-1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropan (*(R)*-**3c** (6 mg, 0.015 mmol, 91% ee) bzw. eine Mischung aus 1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropen (**5c**) und **3c** (12 mg, simulierter Umsatz 53%, 91% ee) in Phosphatpuffer (3.0 mL, pH 6, 50 mM) im Ultraschall emulgiert und anschließend bei 9°C oder 25°C unter den folgenden Bedingungen gerührt: a) 3.0 mL Phosphatpuffer pH 6, 50 mM; b) 3.0 mL Phosphatpuffer pH 6, 50 mM, En-Reduktase aus *G. oxydans* (1.125 mg, Aktivität 3.1 U/mg bezogen auf *trans*-2-Hexenal, 3.5 U); c) 3.0 mL Phosphatpuffer pH 6, 50 mM, En-Reduktase aus *G. oxydans* (1.125 mg, Aktivität 3.1 U/mg bezogen auf *trans*-2-Hexenal, 3.5 U, hitzedenaturiert (15 min, 80°C)). Nach 18 h wird mit Ethylacetat extrahiert, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mittels <sup>1</sup>H-NMR und chiraler HPLC untersucht. Die spektroskopischen Daten und Analytik-Methoden entsprechen denen in Abschnitt 8.4.2.3.

**Tabelle 58.** Ergebnisse der Racemisierungsversuche in Abhängigkeit von der Nitroalkenkonzentration

Eintrag	<b>3c</b> [mM]	<b>5c</b> [mM]	T[°C]	Bedingungen	ee [%]
<b>1</b>	10	0	25	a)	91
<b>2</b>	10	0	25	b)	31
<b>3</b>	10	0	25	c)	90

Eintrag	3c [mM]	5c [mM]	T[°C]	Bedingungen	ee [%]
<b>4</b>	10	0	9	a)	91
<b>5</b>	10	0	9	b)	82
<b>6</b>	10	0	9	c)	91
<b>7</b>	10	10	25	a)	91
<b>8</b>	10	10	25	b)	77
<b>9</b>	10	10	25	c)	91
<b>10</b>	10	10	9	a)	91
<b>11</b>	10	10	9	b)	90
<b>12</b>	10	10	9	c)	91

a) 3.0 mL Phosphatpuffer pH 6, 50 mM; b) 3.0 mL Phosphatpuffer pH 6, 50 mM, En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* (1.125 mg, Aktivität 3.1 U/mg bezogen auf *trans*-2-Hexenal, 3.5 U); c) 3.0 mL Phosphatpuffer pH 6, 50 mM, En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* (1.125 mg, Aktivität 3.1 U/mg bezogen auf *trans*-2-Hexenal, 3.5 U, hitzedenaturiert (15 min, 80°C))

#### 8.4.6 Untersuchungen zur Substratstabilität $\alpha$ -Methyl-substituierter Nitroalkene (**5**)

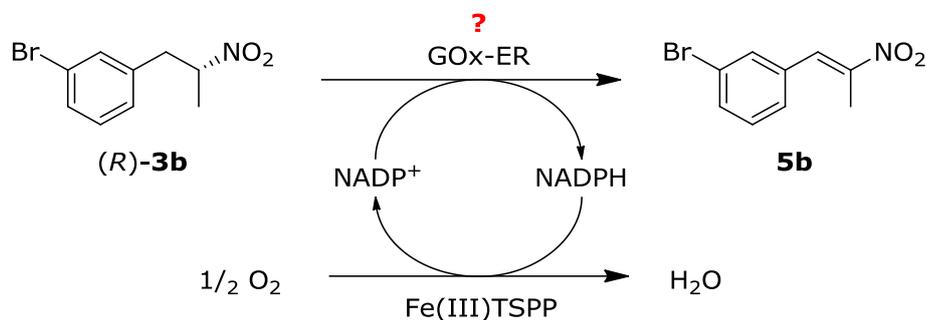
1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropen (**5b**, enthält 2% 3-Brombenzaldehyd (**58b**), 2.4 mg, 1.0  $\mu$ mol) bzw. 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**5g**, enthält 1% 4-Methoxybenzaldehyd (**58g**), 1.9 mg, 1.0  $\mu$ mol) wird in folgenden Lösungen mittels Ultraschall emulgiert: a) 1.0 mL Phosphatpuffer pH 6, 10 mM; b) 300  $\mu$ L Methanol, 700  $\mu$ L Phosphatpuffer pH 6, 10 mM; c) 1.0 mL Phosphatpuffer pH 6, 10 mM, 1 mg BSA. Anschließend werden die Lösungen im Schüttler bei 9°C inkubiert und nach 24 h mit Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wird eingengt und der Rückstand mittels  $^1\text{H-NMR}$  untersucht.

**Tabelle 59.** Ergebnisse zur Stabilitätsuntersuchung von Nitroalkenen

Eintrag	Nitroalken <b>5</b>	Bedingungen	Anteil <b>5</b> [%]	Anteil Aldehyd <b>58</b> [%]	Anteil Nitroalkan <b>3</b> [%]	Anteil NEF-Produkt <b>59</b> [%]
<b>1</b>	<b>5b</b>	a)	98	2	0	0
<b>2</b>	<b>5b</b>	b)	98	2	0	0
<b>3</b>	<b>5b</b>	c)	97	3	0	0
<b>4</b>	<b>5g</b>	a)	99	1	0	0
<b>5</b>	<b>5g</b>	b)	99	1	0	0
<b>6</b>	<b>5g</b>	c)	99	1	0	0

a) 1.0 mL Phosphatpuffer pH 6, 10 mM; b) 300  $\mu$ L Methanol, 700  $\mu$ L Phosphatpuffer pH 6, 10 mM; c) 1.0 mL Phosphatpuffer pH 6, 10 mM, 1 mg BSA

#### 8.4.7 Versuch zur Rückreaktion von (*R*)-**3b** zu **5b** mithilfe eines Fe(III)TSPP Cofaktorregenerierungssystems

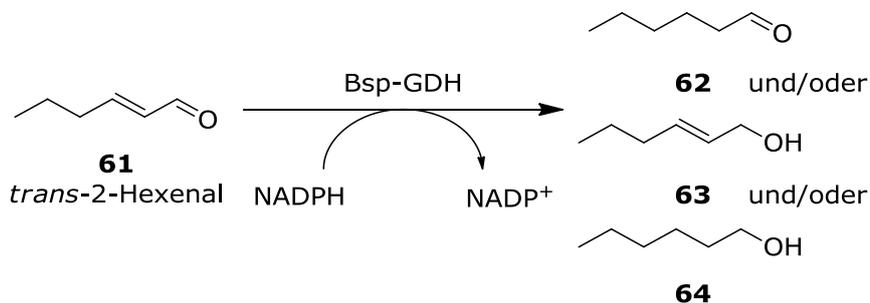


(*R*)-1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropan ((*R*)-**3b**, enthält 8% **5b**, 49 mg, 0.2 mmol) wird in Phosphatpuffer (10 mL, 50 mM, pH 6) mit NADP<sup>+</sup> (3 mg, 4 μmol), Fe(III)TSPP (4 mg, 4 μmol) und En-Reduktase aus *G. oxydans* (2.6 mg, Aktivität von 3.1 U/mg bezogen auf *trans*-2-Hexenal, 8U) bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 h wird mit Dichlormethan extrahiert (3 x 10 mL), über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird mittels <sup>1</sup>H-NMR untersucht. Zusammensetzung des Rückstandes: 8% **5b**, 92% **3b**. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in den Abschnitten 8.4.1.1 und 8.4.2.2 überein.

#### 8.4.8 Biokatalytische Reduktion von 1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropan (**5b**) mit NemR

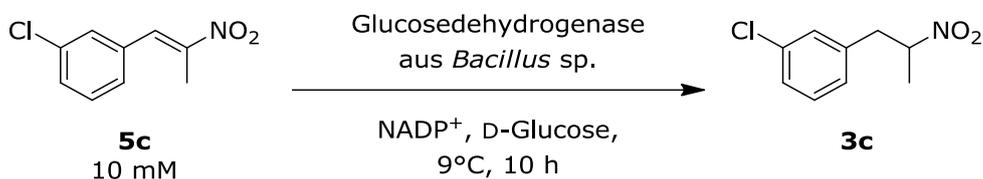
1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropan (**5b**, 242 mg, 1.0 mmol) wird in Phosphatpuffer (98 mL, pH 6, 10 mM) mit D-Glucose-Monohydrat (396 mg, 2.0 mmol), Glucosedehydrogenase aus *Bacillus* sp. (2 mg, 160 U), NADP<sup>+</sup> (100 mg, 0.13 mmol) und En-Reduktase aus *E. coli* (NemR, 1.835 mL, volumetrische Aktivität von 21.8 U/mL, 40 U) bei 25°C am Titrino unter Titration von NaOH (wässrige Lösung, 0.1 M) zum konstant halten des pH-Wertes gerührt. Nach 5 h wird mit Dichlormethan extrahiert (3 x 100 mL), über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wird mittels <sup>1</sup>H-NMR und chiraler HPLC untersucht. Umsatz: 15%, ee-Wert: 14% (*S*). Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Abschnitt 8.4.2.2 überein.

### 8.4.9 Photometrische Bestimmung der Bsp-GDH-Hintergrundaktivität



Die Bestimmung der Aktivität der Glucosedehydrogenase (Amano) gegenüber *trans*-2-Hexenal wird wie in AAV6 (Abschnitt 8.3.14) durchgeführt. Als Enzymlösung wird eine Lösung aus 0.61 mg Bsp-GDH in 0.5 mL Phosphatpuffer hergestellt und auf die Aktivität gegenüber *trans*-2-Hexenal (**61**) untersucht. Aktivität: 0.0124 U/mg

### 8.4.10 Bestimmung der Bsp-GDH-Hintergrundaktivität im präparativen Maßstab



Die Durchführung erfolgt analog zu AAV12 mit 1-(3-Chlorphenyl)-2-nitropropen (**5c**, 197.6 mg, 1.0 mmol) ohne einen Zusatz von En-Reduktase. Das Rohprodukt wird mittels  $^1\text{H-NMR}$  untersucht. Umsatz: 0%

### 8.4.11 Prozessoptimierung zur Ultraschallbehandlung

Die Benennung der Varianten zur Ultraschallbehandlung entspricht der in Abschnitt 4.9.1.

#### Ultraschallvariante a)

1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropen (**5b**, 242 mg, 1 mmol) wird schrittweise in Phosphatpuffer (100 mL, pH 6, 10 mM) emulgiert, in ein Reaktionsgefäß von mind. 100 mL überführt und auf 9°C gekühlt. D-Glucose-Monohydrat (396 mg, 2 mmol), NADP<sup>+</sup> (100 mg, 0.13 mmol), En-

Reduktase aus *G. oxydans* (27.8 mg, 40 U, Aktivität von 1.44 U/mg bezogen auf *trans*-2-Hexenal) und Glucosedehydrogenase aus *Bacillus* sp. (Amano, 2 mg, 160 U) werden zugegeben, die Mischung wird bei 9°C gerührt. Der pH-Wert wird durch kontinuierliche Titration mit NaOH (wässrige Lösung, 0.1 M) konstant gehalten. Nach 5 h wird mit Dichlormethan extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wird mittels <sup>1</sup>H-NMR und chiraler HPLC untersucht. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Abschnitt 8.4.2.2 überein.

**Tabelle 60.** Ergebnisse zur Ultraschallvariante a) im Rahmen der Ultraschalloptimierung

Eintrag	Umsatz [%]	ee [%]
<b>1</b>	43	96
<b>2</b>	35	94

#### Ultraschallvariante b)

1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropen (**5b**, 242 mg, 1 mmol) wird schrittweise in Phosphatpuffer (100 mL, pH 6, 10 mM) emulgiert, in ein Reaktionsgefäß von mind. 100 mL überführt und auf 9°C gekühlt. Das 100 mL-Reaktionsgefäß wird erneut mit Ultraschall behandelt. D-Glucose-Monohydrat (396 mg, 2 mmol), NADP<sup>+</sup> (100 mg, 0.13 mmol), En-Reduktase aus *G. oxydans* (27.8 mg, 40 U, Aktivität von 1.44 U/mg bezogen auf *trans*-2-Hexenal) und Glucosedehydrogenase aus *Bacillus* sp. (Amano, 2mg, 160 U) werden zugegeben, die Mischung wird bei 9°C gerührt. Der pH-Wert wird durch kontinuierliche Titration mit NaOH (wässrige Lösung, 0.1 M) konstant gehalten. Nach 5 h wird mit Dichlormethan extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wird mittels <sup>1</sup>H-NMR und chiraler HPLC untersucht. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Abschnitt 8.4.2.2 überein.

**Tabelle 61.** Ergebnisse zur Ultraschallvariante b) im Rahmen der Ultraschalloptimierung

Eintrag	Umsatz [%]	ee [%]
<b>1</b>	38	95
<b>2</b>	38	95

#### Ultraschallvariante c)

1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropen (**5b**, 242 mg, 1 mmol) wird schrittweise in Phosphatpuffer (100 mL, pH 6, 10 mM) emulgiert, in ein Reaktionsgefäß von mind. 100 mL überführt und auf 9°C gekühlt. D-Glucose-Monohydrat (396 mg, 2 mmol), NADP<sup>+</sup> (100 mg, 0.13 mmol) und En-Reduktase aus *G. oxydans* (27.8 mg, 40 U, Aktivität von 1.44 U/mg bezogen auf *trans*-2-Hexenal) werden zugegeben, das 100 mL-Reaktionsgefäß wird erneut mit Ultraschall behandelt.

Glucosedehydrogenase aus *Bacillus* sp. (Amano, 2mg, 160 U) wird zugegeben, die Mischung wird bei 9°C gerührt. Der pH-Wert wird durch kontinuierliche Titration mit NaOH (wässrige Lösung, 0.1 M) konstant gehalten. Nach 5 h wird mit Dichlormethan extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wird mittels <sup>1</sup>H-NMR und chiraler HPLC untersucht. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Abschnitt 8.4.2.2 überein.

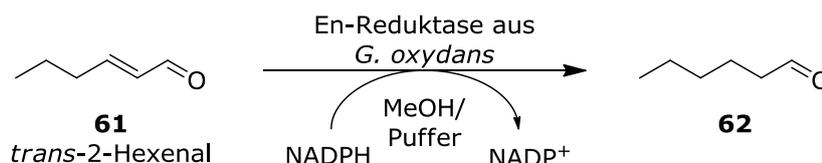
**Tabelle 62.** Ergebnisse zur Ultraschallvariante c) im Rahmen der Ultraschalloptimierung

Eintrag	Umsatz [%]	ee [%]
<b>1</b>	49	94
<b>2</b>	52	95

#### 8.4.12 Allgemeine Arbeitsvorschrift 13 (AAV13): BRADFORD-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Enzymlösungen oder Lyophilisaten

Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an BRADFORD. [161] Zur Erstellung einer Eichgerade werden fünf Lösungen aus BSA in Phosphatpuffer (pH 7.5, 100 mM) mit Konzentrationen zwischen 1.4 mg/mL und 0.08 mg/mL hergestellt. Es werden jeweils 50 µL der BSA-Standardlösung mit 1.5 mL Bradford-Reagenz versetzt und für 5-45min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 595 nm gemessen und aus den gemessenen Daten eine Eichgerade erstellt. Jeder Messwert wird dreifach bestimmt. Die Proben mit unbekannter Proteinkonzentration werden analog behandelt und mittels der Eichgerade wird der Proteingehalt aus der Absorption der unbekannt Probe ermittelt.

#### 8.4.13 Photometrische Aktivitäts- und Stabilitätsbestimmung von GOx-ER in Gegenwart von Methanol



Das Lyophilisat der En-Reduktase aus *Gluconobacter oxydans* (1 mg, Proteingehalt 46%) wird in folgenden Lösungen gelöst und für 24 h inkubiert: a) 1 mL Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM), b) 1 mL Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 6:4, c) 1 mL Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 1:1. Zum Zeitpunkt 0, sowie nach 0.5 h, 1 h, 3 h, 5 h

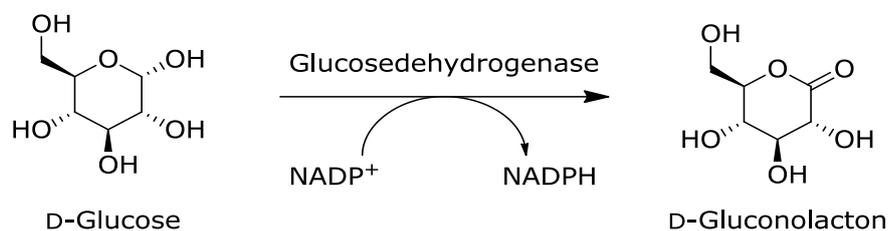
und 24 h wird eine Probe entnommen und mittels Photometer die Aktivität gegenüber *trans*-2-Hexenal analog zur AAV6 (Abschnitt 8.3.14) ermittelt. Die spezifische Aktivität wird mithilfe des zuvor bestimmten Proteingehalts analog zu AAV13 (Abschnitt 8.4.12) von 46% berechnet.

**Tabelle 63.** Ergebnisse der photometrischen Aktivitäts- und Stabilitätsbestimmung der En-Reduktase aus *G. oxydans* in Gegenwart von Methanol

Eintrag	Bedingungen	Spez. Aktivität t = 0 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 0.5 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 1 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 3 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 5 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 24 h [U/mg]
1	a)	4.26	nb <sup>d)</sup>	nb <sup>d)</sup>	nb <sup>d)</sup>	nb <sup>d)</sup>	nb <sup>d)</sup>
2	b)	4.30	4.26	4.37	4.56	4.22	4.63
3	c)	4.07	4.5	4.61	4.91	5.13	5.00

a) 1 mL Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM), b) 1 mL Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 6:4, c) 1 mL Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 1:1; d) nicht bestimmt, die Stabilität in Phosphatpuffer wurde von GRUB<sup>[20]</sup> beschrieben

#### 8.4.14 Allgemeine Arbeitsvorschrift 14 (AAV14): Photometrische Aktivitätsbestimmung für Glucosedehydrogenasen



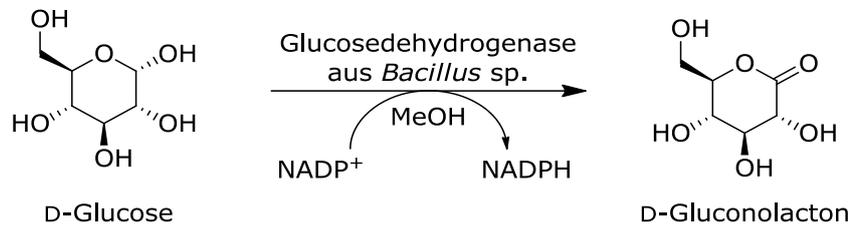
Zur Aktivitätsbestimmung wird eine D-Glucoselösung (960  $\mu\text{L}$ , 30 mM in Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM)) in einer Küvette vorgelegt und mit einer NADP<sup>+</sup>-Lösung (20  $\mu\text{L}$ , 12.5 mM in Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM)) gemischt. Anschließend wird die zu testende Enzymlösung (20  $\mu\text{L}$ , beim Vorliegen eines Lyophilisats gelöst in Phosphatpuffer) zugegeben und die Zunahme der Cofaktorkonzentration bei 340 nm vermessen. Aus der Anfangssteigung der aufgenommenen Reaktionskinetik wird mit folgender Gleichung die Enzymaktivität bestimmt.

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\Delta E_{340 \text{ nm}} * V_t * f}{\epsilon * V_s * t * d}$$

( $\Delta E_{340 \text{ nm}}/t$  = Anfangssteigung der Extinktionskurve,  $V_t$  = Gesamtvolumen,  $V_s$  = Probenvolumen (Volumen der Enzymlösung),  $f$  = Verdünnungsfaktor (der Enzymlösung),  $\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient von NADPH,  $d$  = Dicke der Küvette)

Jede Aktivitätsbestimmung wird in einer Dreifach-Bestimmung durchgeführt, wobei der so erhaltene Mittelwert als Aktivität bezeichnet wird.

### 8.4.14.1 Photometrische Aktivitäts- und Stabilitätsbestimmung von Bsp-GDH in Gegenwart von Methanol



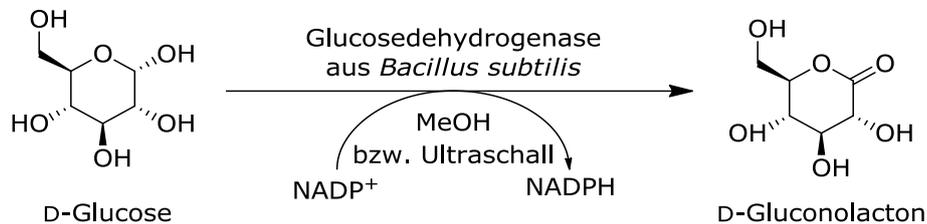
Das Lyophilisat der Glucosedehydrogenase aus *Bacillus* sp. (0.8 mg) wird in folgenden Lösungen gelöst und für 24 h inkubiert: a) 1 mL Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM), b) 1 mL Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 8:2, c) 1 mL Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 7:3, d) 1 mL Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 6:4, e) 1 mL Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 1:1. Zum Zeitpunkt 0, sowie nach 1 h, 2 h, 3 h, 5 h und 24 h wird eine Probe entnommen und mittels Photometer die Aktivität gegenüber D-Glucose analog zu AAV14 ermittelt.

**Tabelle 64.** Ergebnisse der Photometrischen Aktivitäts- und Stabilitätsbestimmung von Bsp-GDH in Gegenwart von Methanol

Eintrag	Bedin- gungen	Aktivität t = 0 h [U/mg]	Aktivität t = 1 h [U/mg]	Aktivität t = 2 h [U/mg]	Aktivität t = 3 h [U/mg]	Aktivität t = 5 h [U/mg]	Aktivität t = 24 h [U/mg]
1	a)	11.92	10.95	10.53	11.76	10.37	10.14
2	b)	10.90	11.73	10.93	10.59	9.35	10.62
3	c)	10.85	9.44	9.44	9.40	8.67	7.33
4	d)	11.34	10.63	9.51	9.45	8.79	6.37
5	e)	9.63	8.18	5.54	4.43	3.64	0.45

a) 1 mL Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM), b) 1 mL Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 8:2, c) 1 mL Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 7:3, d) 1 mL Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 6:4, e) 1 mL Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 1:1

#### 8.4.14.2 Photometrische Aktivitäts- und Stabilitätsbestimmung von Bsu-GDH in Gegenwart von Methanol und gegenüber Ultraschall



Der zellfreie Rohextrakt der En-Reduktase aus *B. subtilis* (Bsu-GDH) wird 1:20 in Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM) verdünnt und die Aktivität mittels Photometer analog zu AAV14 bestimmt. Zusätzlich wird eine Probe des Bsu-GDH Rohextrakts in einem Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 1:1 auf 1:20 verdünnt. Zum Zeitpunkt 0, sowie nach 0.5 h, 1 h, 3 h, 5 h und 24 h wird eine Probe entnommen und mittels Photometer die Aktivität gegenüber D-Glucose analog zur AAV14 ermittelt. Die spezifische Aktivität wird mithilfe des zuvor bestimmten Proteingehalts analog zu AAV13 (Abschnitt 8.4.12) von 2.2 mg/mL berechnet

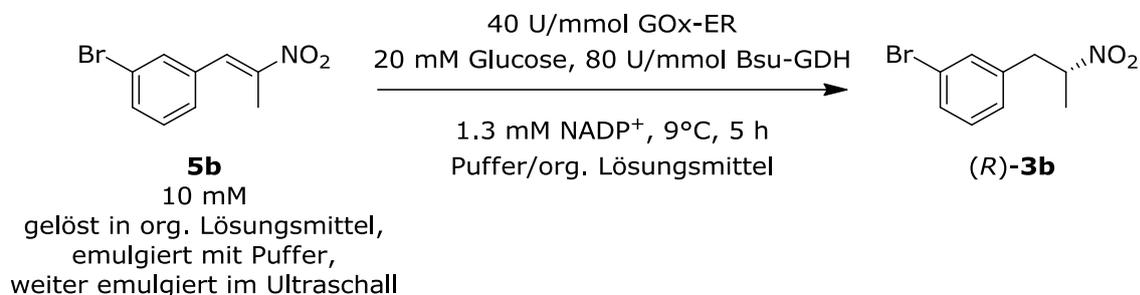
**Tabelle 65.** Ergebnisse der photometrischen Aktivitäts- und Stabilitätsbestimmung von Bsu-GDH in Gegenwart von Methanol

Eintrag	Bedingungen	Spez. Aktivität t = 0 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 0.5 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 1 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 3 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 5 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 24 h [U/mg]
1	a)	23.6	nb <sup>c)</sup>	nb <sup>c)</sup>	nb <sup>c)</sup>	nb <sup>c)</sup>	nb <sup>c)</sup>
2	b)	21	20	22	18	19	19

a) 1:20 Verdünnung in Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM), b) 1:20 Verdünnung in Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM) : Methanol 1:1 c) die Stabilität in Puffer wurde von GRUB<sup>[20]</sup> beschrieben

Es wird eine Aktivitätsbestimmung des Rohextrakts der Glucosedehydrogenase aus *B. subtilis* analog zu AAV14 durchgeführt. Anschließend wird die Enzymlösung für 7 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend wird die Aktivität der so behandelten Probe erneut analog zu AAV14 bestimmt. Volumetrische Aktivität vor Ultraschallbehandlung: 32 U/mL, volumetrische Aktivität nach Ultraschallbehandlung: 28 U/mL (entspricht einer Restaktivität von 87.5%).

### 8.4.15 Bestätigung der Photometerergebnisse zur biokatalytischen Reduktion von **5b** mittels GOx-ER in Gegenwart von 2-Methyl-THF und Methanol



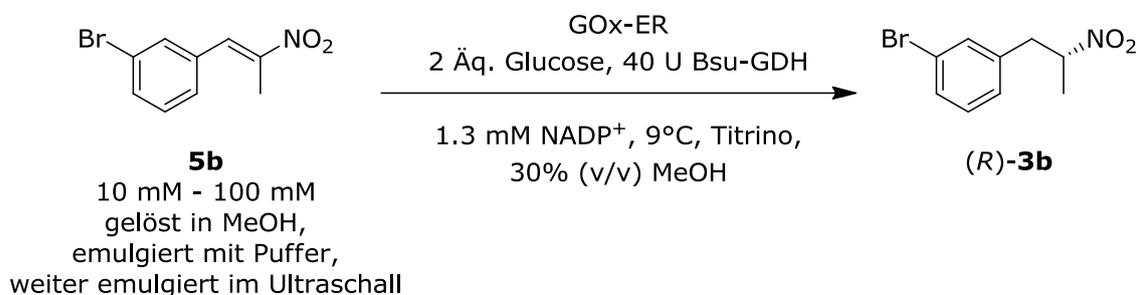
Die Reaktion wird in einem Gesamtvolumen von 25 mL durchgeführt. Die Volumina der organischen Lösungsmittel und des Puffers werden entsprechend den Endkonzentrationen von 20%-50% des organischen Lösungsmittels gewählt. 1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropen (**5b**, 60.5 mg, 0.25 mmol) wird in Methanol oder 2-Methyl-THF gelöst, mit Phosphatpuffer (pH 6, 10 mM) versetzt und mittels Ultraschall emulgiert. Anschließend werden En-Reduktase aus *G. oxydans* (4.5 mg, 10 U, Aktivität von 2.2 U/mg, Proteingehalt 54%, spezifische Aktivität von 1.2 U/mg, jeweils bezogen auf *trans*-2-Hexenal), D-Glucose-Monohydrat (99 mg, 0.5 mmol) und NADP<sup>+</sup> (25 mg, 0.03 mmol) zugegeben und erneut mittels Ultraschall emulgiert. Dann wird Glucosedehydrogenase aus *B. subtilis* (Bsu-GDH, 1.25 mL, volumetrische Aktivität von 32 U/mL bezogen auf D-Glucose) zugegeben und die Reaktionsmischung bei 9°C für 5 h gerührt. Der pH-Wert wird mittels automatischer Titration mit NaOH (wässrige Lösung, 0.1 M) konstant gehalten. Nach 5 h wird mit Dichlormethan extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird mittels <sup>1</sup>H-NMR und chiraler HPLC untersucht. Die spektroskopischen Daten und Methoden entsprechen denen in Abschnitt 8.4.2.2.

**Tabelle 66.** Ergebnisse der Reduktion von **5b** mittels En-Reduktase aus *G. oxydans* im semi-präparativen Maßstab

Eintrag	Lösungsmittel, Anteil [%]	Umsatz zu ( <i>R</i> )- <b>3b</b>	Umsatz zu NEF-Produkt <b>59b</b>	ee [%]
<b>1</b>	Methanol, 20	96	2	94
<b>2</b>	Methanol, 30	97	1	94
<b>3</b>	Methanol, 40	75	0	94
<b>4</b>	Methanol, 50	2	0	nb
<b>5</b>	2-Methyl-THF, 20	21	0	82

nb: nicht bestimmt

### 8.4.16 Allgemeine Arbeitsvorschrift 15 (AAV15): Biokatalytische Reduktion von **5b** mittels GOx-ER in Gegenwart von 30% Methanol bei variablen Substratkonzentrationen bis 100 mM



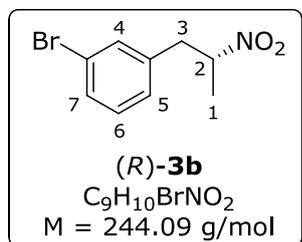
1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropen (**5b**, 60.5 mg - 605 mg, 0.25 mmol - 2.5 mmol) wird in Methanol (7.5 mL) gelöst, Phosphatpuffer (7.5 mL, pH 6, 10 mM) wird zugegeben und die Mischung im Ultraschallbad weiter emulgiert. D-Glucose-Monohydrat (99 mg - 990 mg, 0.5 - 5 mmol), NADP<sup>+</sup> (25 mg, 0.03 mmol), Glucosedehydrogenase aus *B. subtilis* (Bsu-GDH, 769 µL - 1.25 mL, je nach Enzymcharge, 40 U) und En-Reduktase aus *G. oxydans* (4.5 mg - 10.2 mg, je nach Enzymcharge, 10 - 100 U bezogen auf *trans*-2-Hexenal) werden zugegeben und die Mischung erneut mit Ultraschall behandelt. Dann wird bei 9°C für 5 - 24 h gerührt. Bei Reaktionszeiten von 24 h wird die Mischung nach 5 h beschallt und anschließend weiter gerührt. Der pH-Wert wird durch kontinuierliche Titration von NaOH (wässrige Lösung, 0.1 M) konstant gehalten. Anschließend wird mit Dichlormethan extrahiert (3 x 25 mL), über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird mittels <sup>1</sup>H-NMR und chiraler HPLC untersucht. Die spektroskopischen Daten entsprechen denen in Abschnitt 8.4.2.3.

**Tabelle 67.** Ergebnisse der biokatalytischen Reduktion von **5b** mittels GOx-ER in Gegenwart von 30% Methanol

Eintrag	Substrat-konzentration [mM]	t [h]	GOx-ER [U]	GOx-ER [U/mmol]	Umsatz zu (R)-3b	Umsatz zu NEF-Produkt 59b [%]	ee [%]
1 <sup>a)</sup>	10	5	10 <sup>b)</sup>	40 <sup>b)</sup>	97	1	94
2	50	5	10 <sup>c)</sup>	8 <sup>c)</sup>	25	1	95
3	50	24	10 <sup>c)</sup>	8 <sup>c)</sup>	82	1	94
4	100	24	10 <sup>c)</sup>	4 <sup>c)</sup>	48	1	93
5	100	24	20 <sup>d)</sup>	8 <sup>d)</sup>	53	0	95

a) Zugabe der Bsu-GDH nach der 2. Beschallung; b) 4.5 mg Lyophilisat mit einer Aktivität von 2.2 U/mg, Proteingehalt 54%, spezifischer Aktivität von 1.2 U/mg; c) 5.1 mg Lyophilisat mit einer Aktivität von 1.96 U/mg, Proteingehalt 46%, spezifische Aktivität 0.90 U/mg; d) 10.2 mg Lyophilisat mit einer Aktivität von 1.96 U/mg, Proteingehalt 46%, spezifische Aktivität 0.90 U/mg

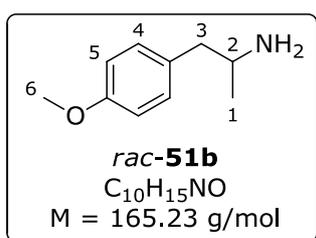
### 8.4.17 Biokatalytische Synthese von (*R*)-**3b** mittels GOx-ER bei einer Substratkonzentration von 100 mM



1-(3-Bromphenyl)-2-nitropropen (**5b**, 605 mg, 2.5 mmol) wird in Methanol (7.5 mL) gelöst, durch die Zugabe von Phosphatpuffer (17.5 mL, pH 6, 10 mM) emulgiert und mittels Ultraschallbad weiter emulgiert. Zur Emulsion werden En-Reduktase aus *G. oxydans* (32 mg, 100 U, Aktivität von 3.1 U/mg, Proteingehalt 44%, spezifische Aktivität von 1.4 U/mg, jeweils bezogen auf *trans*-2-Hexenal), D-Glucose-Monohydrat (990 mg, 5.0 mmol) und NADP<sup>+</sup> (25 mg, 0.03 mmol) zugegeben und die Mischung erneut mittels Ultraschall emulgiert. Durch die Zugabe von Bsp-GDH (1 mg, 80 U, Amano) wird die Reaktion gestartet und bei 9°C gerührt. Der pH-Wert wird durch kontinuierliche Titration mit NaOH (wässrige Lösung, 0.2 M) konstant gehalten. Nach 5 h wird die Mischung beschallt, anschließend wird Bsp-GDH (1 mg, 80 U, Amano) zugegeben und weiter bei 9°C gerührt. Nach 24 h wird die Mischung erneut beschallt, anschließend wird Bsp-GDH (1 mg, 80 U, Amano) zugegeben und weiter bei 9°C gerührt. Nach einer Gesamtreaktionszeit von 48 h wird mit Dichlormethan extrahiert (4 x 20 mL), über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird mittels <sup>1</sup>H-NMR und chiraler HPLC untersucht. Umsatz: 92% (92% **3b**, 8% **5b**); ee-Wert: 94%. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Abschnitt 8.4.2.2 überein.

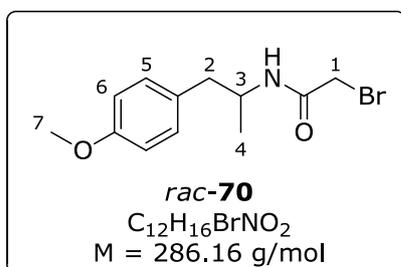
## 8.5 Synthesen und spektroskopische Daten: Synthese von Tamsulosin unter Verwendung einer En-Reduktase aus *M. extorquens*

### 8.5.1 Synthese von *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanamin (*rac*-**51b**)



Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an OHTA *et al.*<sup>[146]</sup> Lithiumaluminiumhydrid (400 mg, 10.5 mmol) wird unter Ar-Atmosphäre in THF (10 mL) vorgelegt und auf Eis gekühlt. Über ein Septum wird 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (*rac*-**3g**, 352 mg, 1.57 mmol) in THF gelöst zugetropft. Nach Abklingen der exothermen Reaktion wird auf Raumtemperatur erwärmt und für 5 h gerührt. Anschließend wird mit Wasser (0.8 mL) gequencht, mit NaOH (wässrige Lösung, 15%, 0.4 mL) und erneut Wasser (0.8 mL) versetzt. Die Suspension wird filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt ( $SiO_2$ ,  $CH_2Cl_2$ :MeOH 4:1, 1%  $Et_3N$ ). Ausbeute: 123 mg, 0.74 mmol, 47%; ee-Wert: 0%;  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.18 – 7.04 (2H, m, H-C-Ar), 6.90 – 6.79 (2H, m, H-C-Ar), 3.79 (3H, s, H-C6), 3.19 – 3.04 (1H, m, H-C2), 2.66 (1H, dd,  $^3J = 13.4, 5.3 \text{ Hz}$ , H-C3), 2.46 (1H, dd,  $^3J = 13.4, 8.1 \text{ Hz}$ , H-C3), 1.11 (3H, d,  $^3J = 6.3 \text{ Hz}$ , H-C1); **chirale HPLC** (OJH, Hexan:2-Propanol 94:6, 0.1% DEA, 0.8 mL/min, 25°C, 220 nm):  $t_r((S)\text{-51b}) = 12.6 \text{ min}$ ,  $t_r((R)\text{-51b}) = 13.4 \text{ min}$ . Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[128]</sup>

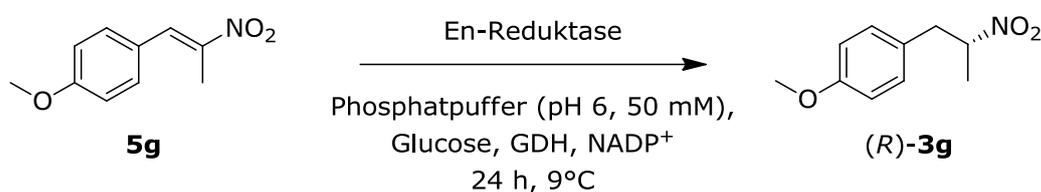
### 8.5.2 Synthese von *rac*-2-Brom-N-(2-(4-methoxyphenyl)-1-methylethyl)-acetamid (*rac*-**70**)



Bromessigsäure (61.1 mg, 0.44 mmol) wird in Ethylacetat (2 mL) vorgelegt und mit Triethylamin (153.4  $\mu\text{L}$ , 1.1 mmol) versetzt. Anschließend wird *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanamin (*rac*-**51b**, 73 mg, 0.44 mmol) in Ethylacetat (2 mL) gelöst und langsam zugetropft. Anschließend wird T3P (518.5  $\mu\text{L}$ , 1:1-Mischung in Ethylacetat, 0.88 mmol) langsam zugetropft. Die Mischung rührt bei Raumtemperatur. Nach 3 h wird mit 2 mL NaOH (wässrige Lösung, 1 M) gequencht, die Phasen werden getrennt und die organische Phase wird einmal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt ( $SiO_2$ , Cyclohexan:Ethylacetat 1:1).

Ausbeute: 65 mg, 0.23 mmol, 52%;  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.13 – 7.07 (2H, d,  $^3J$  = 8.6 Hz, H-C5), 6.88 – 6.82 (2H, d,  $^3J$  = 8.6 Hz, H-C6), 6.35 – 6.22 (1H, s, N-H), 4.24 – 4.14 (1H, m, H-C3), 3.85 – 3.81 (2H, d,  $^3J$  = 3.4 Hz, H-C1), 3.81 – 3.77 (3H, s, H-C7), 2.81 – 2.74 (1H, dd,  $^3J$  = 13.7, 5.9 Hz, H-C2), 2.74 – 2.67 (1H, dd,  $^3J$  = 13.7, 6.8 Hz, H-C2), 1.17 – 1.11 (3H, d,  $^3J$  = 6.6 Hz, H-C4); **chirale HPLC** (OD-H,  $\text{CO}_2$ :2-Propanol 90:10, 1.0 mL/min, 20°C, 230 nm):  $t_r((R)\text{-70})$  = 15.2 min,  $t_r((S)\text{-70})$  = 16.6 min.

### 8.5.3 Enzymscreening zur biokatalytischen Reduktion von 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**5g**)



Das Screening wird im 2-mL-Eppendorf-Gefäß bei einem Gesamtvolumen von 1 mL durchgeführt. 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**5g**, 4 mg, 0.02 mmol) wird in Ethanol (50  $\mu\text{L}$ ) vorgelegt und mit D-Glucose (4 mg, 0.02 mmol),  $\text{NADP}^+$  (1 mg, 1.3  $\mu\text{mol}$ ), Glucosedehydrogenase aus *B. subtilis* (270  $\mu\text{L}$ , 20 U, volumetrische Aktivität von 74 U/mL bezogen auf D-Glucose), Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM), und dem zu testenden Enzym versetzt. Zum Testen von XenB werden 65  $\mu\text{L}$  des Rohextrakts (0.5 U, volumetrische Aktivität von 7.6 U/mL bezogen auf *trans*-2-Hexenal) und 615  $\mu\text{L}$  des Phosphatpuffers zugegeben. Zum Testen von ME-OYE werden 19.3  $\mu\text{L}$  des Rohextrakts (0.5 U, volumetrische Aktivität 25.9 U/mL bezogen auf *trans*-2-Hexenal) und 661  $\mu\text{L}$  des Phosphatpuffers zugegeben. Die Mischungen werden im Schüttler bei 9°C inkubiert und nach 24 h mit Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand wird mittels  $^1\text{H-NMR}$  und chiraler HPLC untersucht. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Abschnitt 8.4.2.6 überein.

**Tabelle 68.** Ergebnisse des Enzymscreenings zur biokatalytischen Reduktion von **5g**

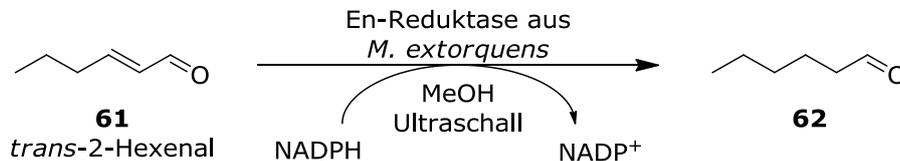
Eintrag	Enzym <sup>a)</sup>	Gesamtumsatz [%]	Umsatz zu <b>3g</b> [%]	Umsatz zu NEF-Produkt <b>59g</b> [%]	ee [%]
1	XenB	72	70	2	29
2	ME-OYE	69	68	1	86

a) XenB: En-Reduktase aus *Pseudomonas putida*, N-terminaler His-Tag; ME-OYE: En-Reduktase aus *Methylobacterium extorquens*, N-terminaler His-Tag

#### 8.5.4 Zellaufschluss zur Herstellung des zellfreien Rohextrakts der En-Reduktase aus *M. extorquens* (ME-OYE)

Die Zellmasse wurde von HUMMEL zur Verfügung gestellt. Die Zellen (32 g) werden in einem Puffer (pH 7) aus Citronensäure (22.6 mL, 0.1 M) und Natriumdihydrogenphosphat (105.4 mL, 0.2 M) suspendiert und über einen Hochdruckhomogenisator homogenisiert (4 x 1300 bar). Die Zellen werden abzentrifugiert (30000 rpm, 45 min) und der Überstand isoliert. Die Aktivität des so erhaltenen Rohextrakts wird mittels Photometer analog zu AAV6 (Abschnitt 8.3.14) bestimmt, der Proteingehalt wird mittels BRADFORD-Assay analog zu AAV13 (Abschnitt 8.4.12) ermittelt. Die spezifische Aktivität wird aus diesen Daten berechnet. Volumetrische Aktivität des Rohextrakts: 13.5 U/mL, Proteinkonzentration: 11.5 mg/mL, spezifische Aktivität: 1.17 U/mg

#### 8.5.5 Photometrische Bestimmung der Enzymaktivität und Stabilität von ME-OYE in Gegenwart von Methanol und gegenüber Ultraschall



Eine Probe des Rohextrakts der En-Reduktase aus *M. extorquens* (Proteingehalt 46%) wird in folgenden Lösungen gelöst und für 24 h inkubiert: a) 1:50 Verdünnung des Rohextrakts in 1 mL Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM), b) 1:30 Verdünnung des Rohextrakts in 1 mL Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 9:1, c) 1:30 Verdünnung des Rohextrakts in 1 mL Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 4:1, d) 1:30 Verdünnung des Rohextrakts in 1 mL Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 7:3, e) 1:31 Verdünnung des Rohextrakts in 1 mL Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 3:2, f) 1:30 Verdünnung des Rohextrakts in 1 mL Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 1:1. Zum Zeitpunkt 0, sowie nach 0.5 h, 1 h, 3 h, 5 h und 24 h wird eine Probe entnommen und mittels Photometer die Aktivität gegenüber *trans*-2-Hexenal analog zur AAV6 (Abschnitt 8.3.14) ermittelt. Die spezifische Aktivität wird mithilfe des zuvor bestimmten Proteingehalts analog zu AAV13 (Abschnitt 8.4.12) von 46 mg/mL berechnet.

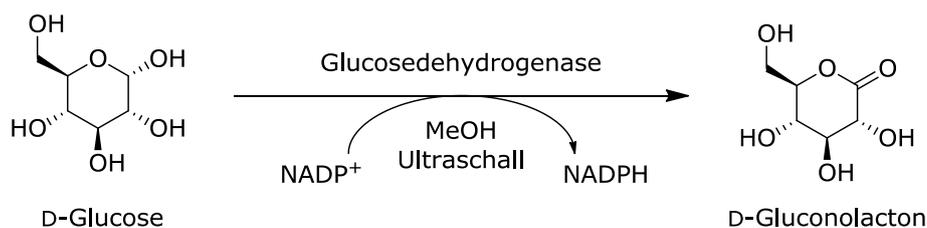
**Tabelle 69.** Ergebnisse zur photometrischen Bestimmung der Enzymaktivität und Stabilität von ME-OYE

Eintrag	Bedingungen	Spez. Aktivität t = 0 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 0.5 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 1 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 3 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 5 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 24 h [U/mg]
1	a)	2.91	2.65	3.04	3.07	2.98	2.98
2	b)	2.89	2.72	2.87	3.02	3.02	3.07
3	c)	2.74	2.70	2.70	2.57	2.98	2.59
4	d)	2.54	2.52	2.50	2.54	2.83	2.48
5	e)	2.37	2.65	2.54	2.74	2.61	2.33
26	f)	1.93 <sup>g)</sup>	0.41	0.20	0.17	0	0

a) 1:50 Verdünnung des Rohextrakts in 1 mL Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM), b) Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 9:1, c) Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 4:1, d) Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 7:3, e) Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 3:2, f) Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 1:1, g) Messwerte der Dreifachbestimmung zum Zeitpunkt t=0: 1.93 U/mg, 1.04 U/mg, 0.43 U/mg.

Zur Bestimmung der Stabilität gegenüber Ultraschall wird die Aktivität des Rohextrakts direkt photometrisch vermessen, anschließend 7 Minuten mit Ultraschall behandelt und erneut vermessen. Aktivität vor der Ultraschallbehandlung: 116 U/mL, Aktivität nach der Ultraschallbehandlung: 107 U/mL.

### 8.5.6 Photometrische Bestimmung der Enzymaktivität und Stabilität der Bsu-GDH in Gegenwart von Methanol und gegenüber Ultraschall



Eine Probe des Rohextrakts der Glucosedehydrogenase aus *Bacillus subtilis* wird in einer Verdünnung von 1:20 in einer Mischung aus Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 1:1 für 24 h inkubiert. Zum Zeitpunkt 0, sowie nach 0.5 h, 1 h, 3 h, 5 h und 24 h wird eine Probe entnommen und mittels Photometer die Aktivität gegenüber D-Glucose analog zur AAV14 (Abschnitt 8.4.14) ermittelt. Die spezifische Aktivität wird mithilfe des zuvor bestimmten Proteingehalts analog zu AAV13 (Abschnitt 8.4.12) von 2.2 mg/mL berechnet.

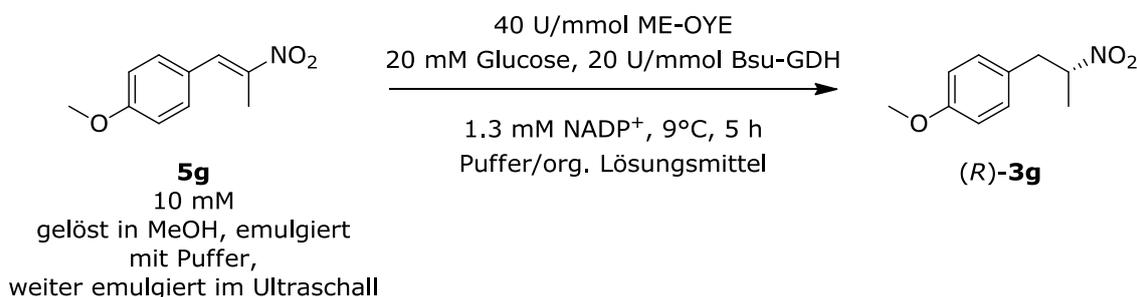
**Tabelle 70.** Ergebnisse zur photometrischen Bestimmung der Enzymaktivität und Stabilität von Bsu-GDH

Eintrag	Bedingungen	Spez. Aktivität t = 0 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 0.5 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 1 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 3 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 5 h [U/mg]	Spez. Aktivität t = 24 h [U/mg]
1	a)	23.6	nb <sup>c)</sup>	nb <sup>c)</sup>	nb <sup>c)</sup>	nb <sup>c)</sup>	nb <sup>c)</sup>
2	b)	21	20	22	18	19	19

a) 1: 20 Verdünnung des Rohextrakts in Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM), b) 1:20 Verdünnung des Rohextrakts in Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM): Methanol 1:1, c) Die Stabilität in Puffer wurde von GRUB beschrieben<sup>[20]</sup>

Zur Bestimmung der Stabilität gegenüber Ultraschall wird die Aktivität in Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM) direkt photometrisch vermessen, anschließend 7 Minuten mit Ultraschall behandelt und erneut vermessen. Aktivität vor der Ultraschallbehandlung: 32 U/mL, Aktivität nach der Ultraschallbehandlung: 28 U/mL.

### 8.5.7 Bestätigung der Photometerergebnisse zum Einsatz von Methanol im semi-präparativen Maßstab



Die Reaktion wird in einem Gesamtvolumen von 25 mL durchgeführt. Die Volumina von Methanol und des Puffers werden entsprechend den Endkonzentrationen von 0%-40% Methanol gewählt. 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**5g**, 48.3 mg, 0.25 mmol) wird in Methanol gelöst, mit Phosphatpuffer (pH 6, 10 mM) versetzt und mittels Ultraschall emulgiert. Anschließend werden En-Reduktase aus *M. extorquens* (86.2  $\mu$ L, 10 U, volumetrische Aktivität von 116 U/mL, Proteingehalt 46 mg/mL, spezifische Aktivität von 2.52 U/mg, jeweils bezogen auf *trans*-2-Hexenal), D-Glucose-Monohydrat (99 mg, 0.5 mmol), NADP<sup>+</sup> (25 mg, 0.03 mmol) und Glucosedehydrogenase aus *B. subtilis* (Bsu-GDH, 769  $\mu$ L, volumetrische Aktivität von 52 U/mL bezogen auf D-Glucose) zugegeben und erneut mittels Ultraschall emulgiert. Dann wird die Reaktionsmischung bei 9°C für 5 h gerührt. Der pH-Wert wird mittels automatischer Titration mit NaOH (wässrige Lösung, 0.1 M) konstant gehalten. Nach 5 h wird mit Dichlormethan extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer

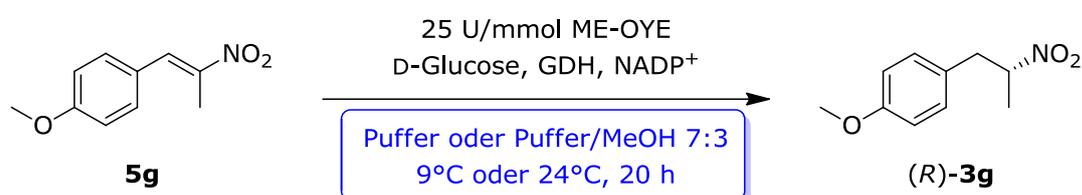
entfernt. Der Rückstand wird mittels  $^1\text{H-NMR}$  und chiraler HPLC untersucht. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Abschnitt 8.4.2.6 überein.

**Tabelle 71.** Ergebnisse zur biokatalytischen Reduktion von **5g** mittels ME-OYE

Eintrag	Anteil MeOH [vol.-%]	Umsatz zu <b>3g</b> [%]	Umsatz zu NEF-Produkt <b>59g</b> [%]	Anteil Aldehyd <b>58g</b> [%]	ee [%]
<b>1</b>	0 <sup>a)</sup>	30	15	1	68 <sup>d)</sup>
<b>2</b>	30 <sup>b)</sup>	30	19	4	51 <sup>d)</sup>
<b>3</b>	40 <sup>c)</sup>	10	4	0	6

a) 25 mL Phosphatpuffer (pH 6, 10 mM), b) 10 mL Methanol, 15 mL Phosphatpuffer (pH 6, 10 mM), c) 7.5 mL Methanol, 17.5 mL Phosphatpuffer (pH 6, 10 mM), d) Die Verunreinigung durch den entstandenen 4-Methoxybenzaldehyd verfälscht den ee-Wert. Die Tatsächlichen ee-Werte konnten nicht bestimmt werden, liegen aber über den hier genannten ee-Werten.

### 8.5.8 Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit und des Einflusses von Methanol auf die En-Reduktase aus *M. extorquens*



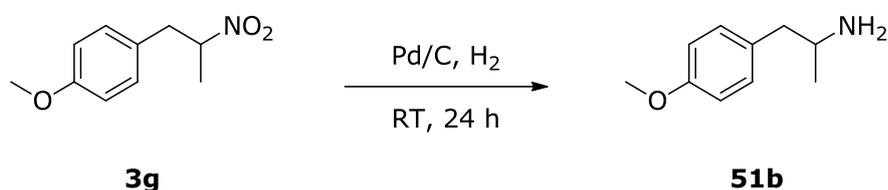
Die Reaktion wird in einem Gesamtvolumen von 1.0 mL durchgeführt. Die Volumina von Methanol und des Puffers werden entsprechend den Endkonzentrationen von 0% und 30% Methanol gewählt. 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropen (**5g**, 4.0 mg, 0.02 mmol) wird in Methanol gelöst, mit Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM) versetzt und mittels Ultraschall emulgiert. Anschließend werden En-Reduktase aus *M. extorquens* (49  $\mu\text{L}$ , 0.5 U, volumetrische Aktivität von 10.2 U/mL bezogen auf *trans*-2-Hexenal), D-Glucose-Monohydrat (3.9 mg, 0.02 mmol), NADP<sup>+</sup> (1 mg, 1.2  $\mu\text{mol}$ ) und Glucosedehydrogenase aus *B. sp.* (0.1 mg, 8 U) zugegeben. Dann wird die Reaktionsmischung bei 9°C bzw. 25°C für 5 h im Thermomixer geschüttelt. Nach 20 h wird mit Ethylacetat extrahiert (2 x 0.5 mL) und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird mittels  $^1\text{H-NMR}$  und chiraler HPLC untersucht. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Abschnitt 8.4.2.6 überein.

**Tabelle 72.** Ergebnisse zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit von ME-OYE

Eintrag	MeOH [vol-%]	T [°C]	Umsatz zu <b>3g</b> [%]	Umsatz zu NEF-Produkt <b>59g</b> [%]	ee [%]
<b>1</b>	0 <sup>a)</sup>	9	56	3	68
<b>2</b>	0 <sup>a)</sup>	25	48	3	37
<b>3</b>	30 <sup>b)</sup>	9	85	0	80
<b>4</b>	30 <sup>b)</sup>	25	83	3	40

a) 300 µL Methanol, 651 µL Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM), b) 951 µL Phosphatpuffer (pH 6, 50 mM)

### 8.5.9 Untersuchungen zum Erhalt der Stereoinformation im Rahmen der Reduktion von **3g** mittels Pd/C und H<sub>2</sub>



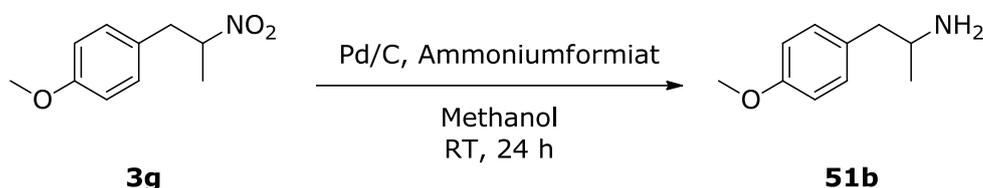
1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (**3g**, 0.25 - 0.5 mmol) wird in dem zur Reduktion verwendeten Lösungsmittel (50 mL) gelöst und in Anwesenheit von Pd/C (10%, 25 Gew.-%) bei einem H<sub>2</sub>-Druck von 2.4 – 2.6 bar bei Raumtemperatur an der Parr-Apparatur hydriert. Nach 24 h wird der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Wird die Reaktion in Anwesenheit von Wasser durchgeführt, wird die Mischung nach dem Abfiltrieren des Katalysators mit Dichlormethan extrahiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird mittels <sup>1</sup>H-NMR und chiraler HPLC untersucht. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Abschnitt 8.5.1 überein.

**Tabelle 73.** Ergebnisse der Reduktion von **3g** mittels Pd/C und H<sub>2</sub>

Eintrag	Edukt (ee-Wert [%])	Lösungsmittel	Einwaage	Umsatz [%]	Produkt <b>51b</b> (ee-Wert [%])
<b>1</b>	<i>rac</i> -3g	MeOH	98 mg (0.5 mmol) <sup>a)</sup>	>99	<i>rac</i>
<b>2</b>	<i>rac</i> -3g	MeOH: Phosphatpuffer (pH 6, 10 mM) 3:7	49 mg (0.25 mmol) <sup>b)</sup>	>99	<i>rac</i>
<b>3</b>	( <i>R</i> )-3g (94% ee)	MeOH	98 mg (0.5 mmol) <sup>c)</sup>	>99	94

a) Einwaage: 98 mg *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan, 25 mg Pd/C (10%), Auswaage: 77 mg; b) Einwaage: 49 mg *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan, 12.5 mg Pd/C (10%), Auswaage 40 mg; c) Einwaage: 98 mg (*R*)-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan, 25 mg Pd/C (10%), Auswaage: 48 mg

### 8.5.10 Untersuchungen zum Erhalt der Stereoinformation im Rahmen der Reduktion von **3g** mittels Pd/C und Ammoniumformiat



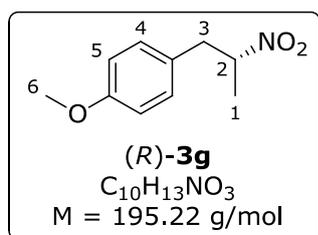
Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an KAWAI *et al.*<sup>[79]</sup> 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (**3g**, 0.5 - 1.0 mmol) wird in Methanol (2 mL) gelöst und unter Ar-Atmosphäre mit Ammoniumformiat (7 Äq.) und Pd/C (10%, 25 Gew.-%) bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 h wird der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen, einmal mit Wasser gewaschen und anschließend vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird mittels <sup>1</sup>H-NMR und chiraler HPLC untersucht. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Abschnitt 8.5.1 überein.

**Tabelle 74.** Ergebnisse der Reduktion von **3g** mittels Pd/C und Ammoniumformiat

Eintrag	Edukt (ee-Wert [%])	Lösungsmittel	Einwaage	Umsatz [%]	Produkt <b>51b</b> (ee-Wert [%])
<b>1</b>	<i>rac</i> - <b>3g</b>	MeOH	195 mg (1.0 mmol) <sup>a)</sup>	>99	<i>rac</i>
<b>3</b>	( <i>R</i> )- <b>3g</b> (94% ee)	MeOH	98 mg (0.5 mmol) <sup>b)</sup>	>99	93

a) Einwaage: 195 mg *rac*-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan, 50 mg Pd/C (10%), 441 mg Ammoniumformiat, Auswaage: 91 mg; b) Einwaage: 98 mg (*R*)-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan, 25 mg Pd/C (10%), 221 mg Ammoniumformiat, Auswaage: 47 mg

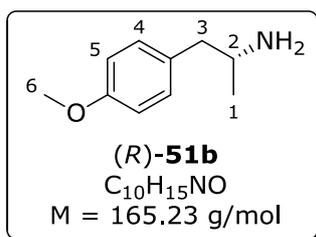
### 8.5.11 Biokatalytische Synthese von (*R*)-**3g** mittels En-Reduktase aus *M. extorquens* im präparativen Maßstab



1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan (**5g**, 781 mg, 4.0 mmol) wird in Methanol (60 mL) gelöst, mit Phosphatpuffer (128 mL, pH 6, 50 mM) suspendiert und mit Ultraschall behandelt. Die Mischung wird auf 9°C temperiert, D-Glucose (1.44 g, 8.0 mmol), NADP<sup>+</sup> (200 mg, 0.27 mmol), Glucosedehydrogenase aus *B. sp.* (2 mg, 160 U) und En-Reduktase aus *M. extorquens* (11.85 mL, 160 U, volumetrische Aktivität von 10.2 U/mL bezogen auf *trans*-2-Hexenal) werden zugegeben und die Mischung bei 9°C gerührt. Der pH-Wert wird durch kontinuierliche Titration von Natronlauge (wässrige Lösung, 1.0 M) konstant bei pH 6 gehalten. Nach 72 h wird mit Dichlormethan

extrahiert (3 x 150 mL), über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan wird als blassgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 671 mg, 3.4 mmol, 85%; ee-Wert: 89%. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus Abschnitt 8.4.2.6 überein.

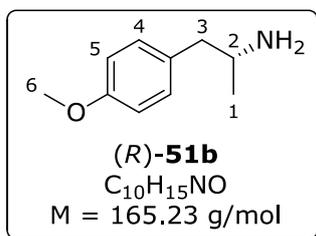
### 8.5.12 Synthese von (*R*)-1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanamin ((*R*)-**51b**) mittels Pd/C und H<sub>2</sub>



(*R*)-1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan ((*R*)-**3g**, 671 mg, 3.4 mmol, 89% ee) wird in Methanol (100 mL) gelöst und mit Pd/C (10%, 100 mg) in der Parr-Apparatur bei einem H<sub>2</sub>-Druck von 3.4 bar bei Raumtemperatur hydriert. Nach 75 h wird der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen, angesäuert

und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird verworfen, die wässrige Phase wird basisch gestellt und mit Dichlormethan extrahiert. Anschließend wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Ausbeute: 197 mg, 1.19 mmol, 35%; ee-Wert: 82%. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus Abschnitt 8.5.1 überein.

### 8.5.13 Chemoenzymatische Synthese von (*R*)-1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanamin ((*R*)-**51b**) im sequentiellen Eintopf-Prozess

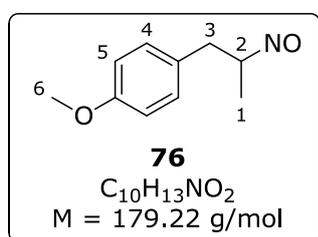


1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitropropan ((*R*)-**5g**, 781 mg, 4.0 mmol) wird in Methanol (60 mL) gelöst und durch Zugabe von Phosphatpuffer (128 mL, pH 6, 50 mM) suspendiert. Die Suspension wird für 5 Minuten mit Ultraschall behandelt und auf 9°C temperiert. Anschließend werden D-Glucose (1.44 g, 8.0 mmol), NADP<sup>+</sup> (200 mg, 0.27 mmol), Glucosedehydrogenase aus *Bacillus* sp. (2 mg,

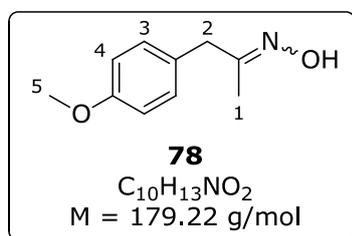
160 U) und En-Reduktase aus *M. extorquens* (11.85 mL, Rohextrakt, volumetrische Aktivität von 13.5 U/mL bezogen auf *trans*-2-Hexenal, 160 U) zugegeben. Die Mischung wird für 72 h bei 9°C gerührt. Der pH-Wert wird durch kontinuierliche Titration mit Natronlauge (wässrige Lösung, 1.0 M) konstant bei pH 6 gehalten. Die Mischung wird in einen Hydrierkolben überführt, mit Pd/C (10%, 100 mg) versetzt und bei 3.4 bar Wasserstoffdruck bei Raumtemperatur in der Parr-Apparatur hydriert. Nach 75 h wird der Katalysator abfiltriert, die Mischung mit Dichlormethan extrahiert. Die so erhaltene organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand (enthält das

Nebenprodukt 1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitrosopropan (**76**) wird mittels  $^1\text{H-NMR}$  und MS untersucht. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Nitrosoalkans ( $\text{SiO}_2$ , Cyclohexan:Ethylacetat 4:1) wird dieses in Form des analogen Oxims (**78**) als blassgelber Feststoff erhalten. Die verbleibende wässrige Phase wird basisch gestellt und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magniumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. 1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanamin ((*R*)-**51b**) wird als blassgelbes Öl erhalten und ohne weitere Reinigung zur Synthese von (*R*)-**70** eingesetzt. Ausbeute: 301 mg, 1.82 mmol, 46%; ee-Wert: 87%. Die spektroskopischen Daten des Amins stimmen mit denen in Abschnitt 8.5.1 überein.

#### Charakterisierung der Zwischen-/Nebenprodukte:



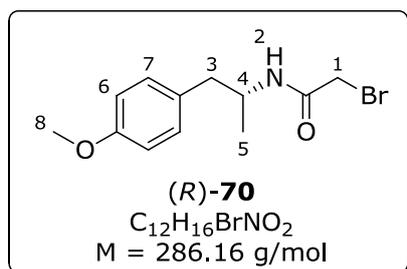
1-(4-Methoxyphenyl)-2-nitrosopropan (**76**): Auswaage: 220 mg;  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.18 – 7.08 (2H, m, H-C-Ar), 6.94 – 6.80 (2H, m, H-C-Ar) 3.79 (3H, s, H-C6), 3.18 (q,  $^3J = 6.5 \text{ Hz}$ , H-C2), 2.76 (1H, dd,  $^3J = 13.7, 7.0 \text{ Hz}$ , H-C3), 2.59 (1H, dd,  $^3J = 13.6, 6.3 \text{ Hz}$ , H-C3), 1.09 (3H, d,  $^3J = 6.4 \text{ Hz}$ , H-C1). **MS** (EI):  $m/z = 179.1$  ( $\text{M}^+$ ), 148.1 ( $\text{M}^+ - \text{OCH}_3$ ), 121.1 ( $\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_4\text{NO}$ ).



1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanoxim (**78**): Ausbeute: 95 mg, 0.53 mmol, 13%; Hauptisomer: Nebenisomer 1:0.34

Hauptisomer:  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.20 – 7.07 (2H, m, H-C-Ar), 6.92 – 6.77 (2H, m, H-C-Ar), 3.79 (3H, s, H-C5), 3.43 (2H, s, H-C2), 1.80 (3H, s, H-C1); Nebenisomer:  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.20 – 7.07 (2H, m, H-C-Ar), 6.92 – 6.77 (2H, m, H-C-Ar), 3.79 (3H, s, H-C5), 3.67 (2H, s, H-C2), 1.79 (3H, s, H-C1); **MS** (EI):  $m/z = 179.1$  ( $\text{M}^+$ ), 146.1 ( $\text{M}^+ - \text{OCH}_3, - 2\text{H}$ ), 121.1 ( $\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_4\text{NO}$ ).

#### 8.5.14 Synthese von 2-Brom-N-(2-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-ethyl)-acetamid ((*R*)-**70**)



(*R*)-1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanamin ((*R*)-**51b**, 87% ee, 301 mg, 1.82 mmol) wird in Ethylacetat (24 mL) vorgelegt, mit Bromessigsäure (253 mg, 1.82 mmol) versetzt und auf Eis gekühlt. Triethylamin (635  $\mu\text{L}$ , 4.55 mmol) wird unter Rühren zugegeben. Anschließend wird T3P (Lösung in Ethylacetat (50 vol-%), 2.14 mL, 3.64 mmol) langsam

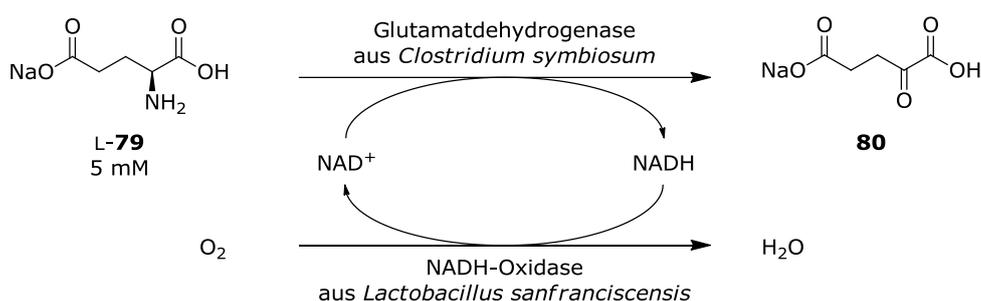
zugetropft. Die Mischung wird bei 0°C – Raumtemperatur gerührt. Nach 19 h wird mit Wasser gequenchet, die Phasen getrennt und die organische Phase einmal mit Wasser gewaschen. Es wird über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und (*R*)-**70** wird als blassgelber Feststoff erhalten. Ausbeute: 434 mg, 1.52 mmol, 83%; ee-Wert: 88%; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.10 (2H, d, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, H-C-Ar), 6.85 (2H, d, <sup>3</sup>J = 8.6 Hz, H-C-Ar), 6.31 (1H, d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, H-N), 4.25 – 4.15 (1H, m, H-C4), 3.84 (2H, d, <sup>3</sup>J = 3.1 Hz, H-C1), 3.80 (3H, s, H-C8), 2.77 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 13.7, 5.9 Hz, H-C3), 2.71 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 13.7, 6.8 Hz, H-C3), 1.15 (3H, d, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, H-C5). Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Abschnitt 8.5.2 überein.

## 9 Anhang: Biokatalytische Oxidation von Glutamat zu $\alpha$ -Ketoglutarat

### 9.1 Motivation und Zielsetzung

Im Rahmen eines Projektes der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe HUMMEL die biokatalytische Oxidation von L-Glutamat (**L-79**) zu  $\alpha$ -Ketoglutarat (**80**) untersucht. Die Arbeit baut auf die bisherigen Ergebnisse von K. TENBRINK (Arbeitsgruppe GRÖGER) und C. LANZERATH (Arbeitsgruppe HUMMEL) auf.

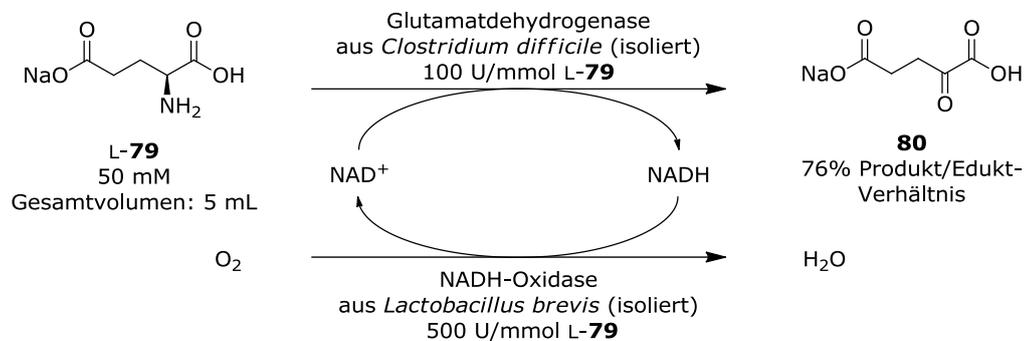
$\alpha$ -Ketoglutarat wird beispielsweise in der chemischen Industrie zur Synthese von Heterozyklen, zur Behandlung akuter und chronischer Niereninsuffizienz, als Nahrungsergänzungsmittel sowie als Bestandteil von Infusionslösungen eingesetzt.<sup>[162]</sup> Die Gruppe um BOMMARIUS zeigte 2004 die biokatalytische Synthese von  $\alpha$ -Ketoglutarat mithilfe einer Glutamatdehydrogenase aus *Clostridium symbiosum* in einer Desaminierung von L-Glutamat,<sup>[163]</sup> in Kombination mit einer NADH-Oxidase aus *Lactobacillus sanfranciscensis*<sup>[164]</sup> zur Cofaktorregenerierung (Abbildung 96). Die Ergebnisse dieser Arbeit dienen als „proof of concept“ dieses Prozesses, allerdings blieb die Substratkonzentration mit 5 mM sehr gering. Die Verwendung Wasserbildender NADH-Oxidasen<sup>[164]</sup> stellte hierbei einen bedeutenden Vorteil gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildender NADH-Oxidasen dar, da Wasser als Nebenprodukt völlig unproblematisch für die Biotransformation ist. Als Alternative wurde von der Evonik Degussa GmbH im Jahr 2009 ein Glutamatdehydrogenase-defizienter Stamm zur Synthese von  $\alpha$ -Ketoglutarat patentiert.<sup>[165]</sup>



**Abbildung 96.** „Proof of concept“ für die oxidative Desaminierung von Glutamat<sup>[163]</sup>

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war der „Benchmark“-Versuch von K. TENBRINK im Arbeitskreis GRÖGER. Hier wurde L-Glutamat (50 mM) bei pH 8 mittels Glutamatdehydrogenase aus *Clostridium difficile* (GluDH C.d.) zu  $\alpha$ -Ketoglutarat umgesetzt. Zur Cofaktorregenerierung wurde eine von HUMMEL zur Verfügung gestellte NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* (NOx) eingesetzt.<sup>[166]</sup> Die Cofaktorkonzentration betrug 2 mM, dabei

wurde GluDH C.d. in einer Konzentration von 5 U/mL Reaktionsvolumen (100 U/mmol L-**79**) und NOx in einer Konzentration von 25 U/mL Reaktionsvolumen (500 U/mmol L-**79**) eingesetzt. Dieses System lieferte nach 24 h einen mittels  $^1\text{H-NMR}$  bestimmten Umsatz von 76% (Abbildung 97).



**Abbildung 97.** Benchmark-Experiment zur biokatalytischen Oxidation von L-Glutamat mittels GluDH C.d. von K. TENBRINK <sup>[167]</sup>

Versuche von LANZERATH zeigten eine deutliche Inhibierung der Glutamatdehydrogenase bei niedrigen pH-Werten, welche bei Erhöhen des pH-Werts nahezu aufgehoben wurde.<sup>[168]</sup> Allerdings verliert die NADH-Oxidase bei hohen pH-Werten in isolierter Form deutlich an Aktivität.<sup>[166]</sup> Um die Reaktion trotzdem bei hohen pH-Werten durchführen zu können, sollte die NOx deshalb in Form eines Ganzzellkatalysators eingesetzt werden, um die Stabilität und Aktivität des Enzyms zu verbessern. Vorrangiges Ziel dieses Arbeitsabschnittes war die Ermöglichung dieser Reaktion bei hohen pH-Werten durch Einsatz der NADH-Oxidase in Form eines *E. coli*-Ganzzellkatalysators.

## 9.2 Ergebnisse

### 9.2.1 Bestimmung des Umsatzes und der Produktbildung mittels $^1\text{H-NMR}$

In den bisherigen Arbeiten von TENBRINK wurde der Umsatz der Reaktion mittels  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie ermittelt, indem die Signalintensitäten von **79** und **80** zueinander ins Verhältnis gesetzt wurden.<sup>[167]</sup> Diese Umsatzbestimmung gibt allerdings nur ein relatives Verhältnis der Substanzen zueinander an, ein möglicher Substanzverlust kann somit nicht ermittelt werden. Zusätzlich zum Umsatz wurde mithilfe einer von GRESCHNER entwickelten NMR-Analytik-Methode<sup>[169]</sup> auch eine Produktbildung bestimmt, die die tatsächlich gebildete Menge an  $\alpha$ -Ketoglutarat beschreibt. Die Ermittlung dieses Wertes erfolgte über die Verwendung von

Pivalinsäure als internem NMR-Standard. Da die Bestimmung des Umsatzes und der Produktbildung direkt aus der wässrigen Reaktionslösung bestimmt wurden, wurde das andernfalls störende Wassersignal im NMR unterdrückt. Die Aufarbeitung über MWCO 10 KDa-Filter wurde validiert, wonach ausgeschlossen werden kann, dass Substanz im Enzypellet verbleibt und auch, dass durch das Filtrieren Substanz verloren geht.

### 9.2.2 pH-Abhängigkeit der biokatalytischen Oxidation von L-Glutamat unter Verwendung isolierter Enzyme

Die Durchführung des Benchmark-Experimentes bei pH 7.6 und 9.4 zeigt, dass die Verwendung isolierter Enzyme bei erhöhten pH-Werten zu geringerer Produktbildung führt (Abbildung 98). Die Biotransformation bei pH 7.6 führt zu einer Produktbildung von 69% nach 24 h. Bei einem erhöhten pH-Wert von 9.4 wird nach 24 h lediglich eine Produktbildung von 27% erreicht. Dabei kommt die Reaktion bereits nach 1 h Reaktionszeit zum Erliegen, was auf die geringe Stabilität der NADH-Oxidase bei diesen pH-Werten zurückgeführt werden kann.<sup>[166]</sup>

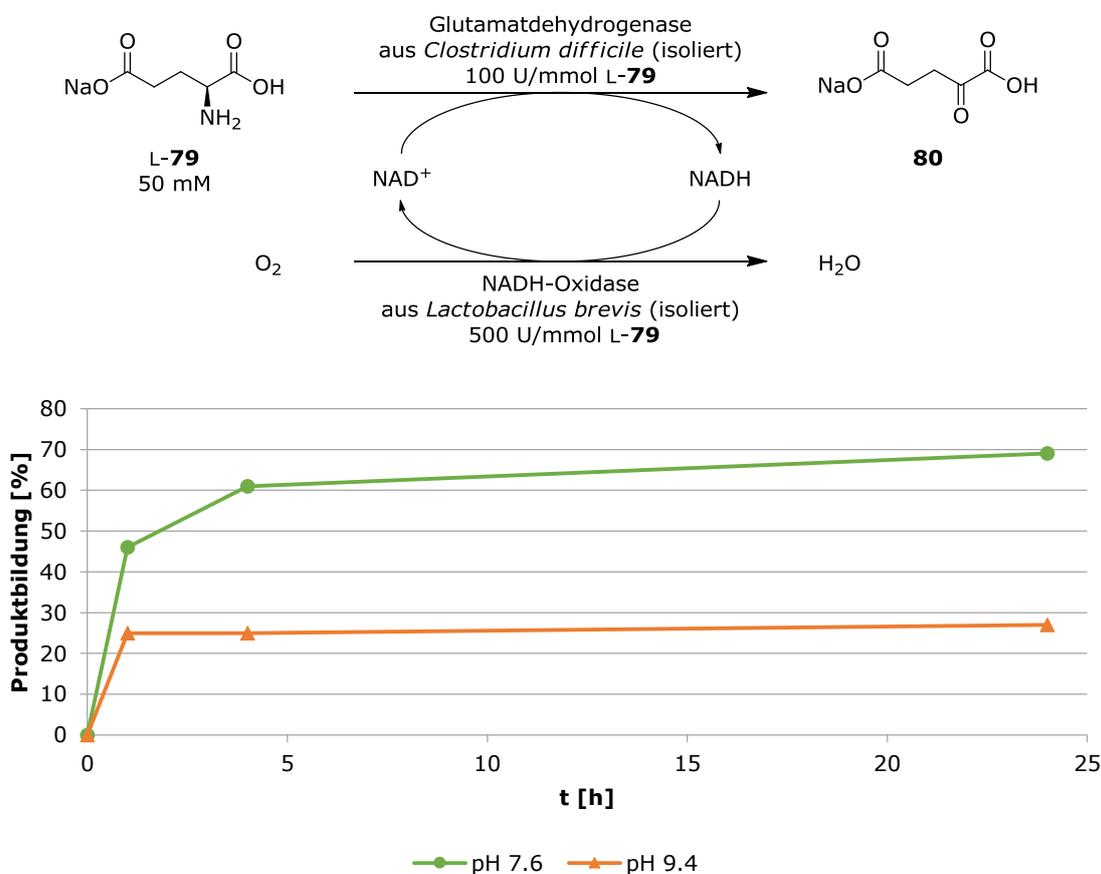
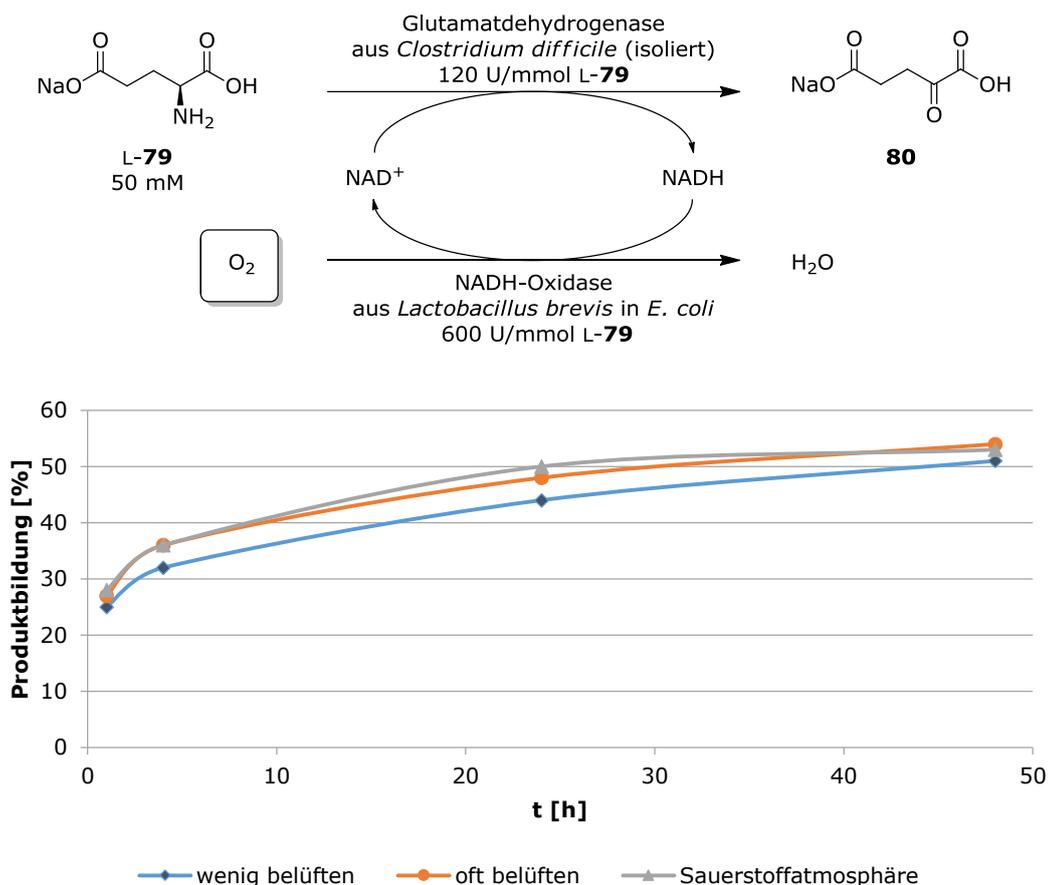


Abbildung 98. Biokatalytische Oxidation von Glutamat mit isolierten Enzymen in Abhängigkeit des pH-Werts

### 9.2.3 Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration

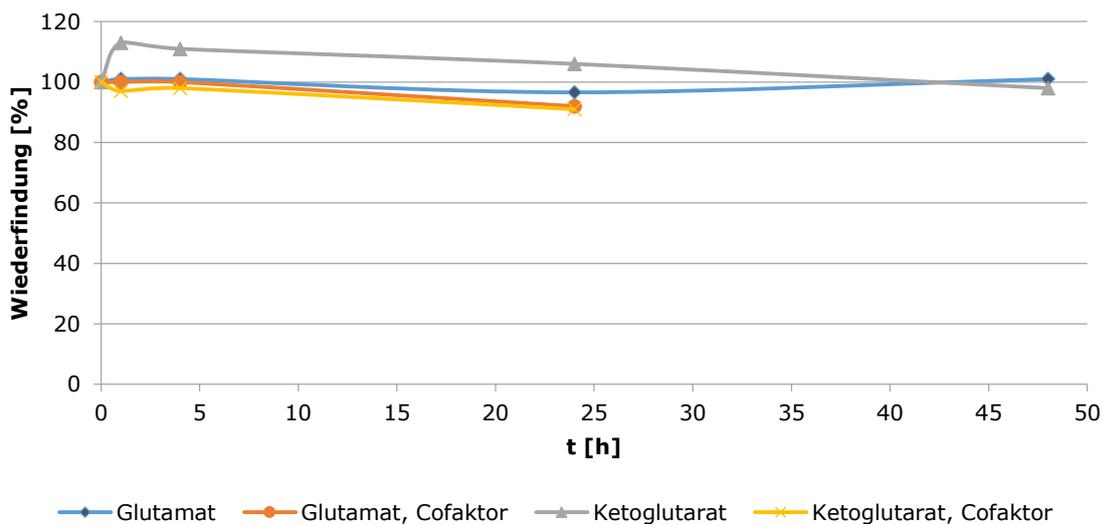
Da für die Regenerierung des Cofaktors Sauerstoff benötigt wird, wurde der Einfluss der Sauerstoffkonzentration im Reaktionsgefäß untersucht. Das Durchleiten von Luft bzw. Sauerstoff durch die Reaktionslösung war nicht möglich, da das Gemisch zu stark schäumte. Das Vergrößern der Oberfläche des Reaktionsmediums durch Reaktionsführung in einem geöffneten Färbeschälchen hat sich ebenfalls als nicht praktikabel erwiesen, da das Gemisch nach 4h nahezu vollständig ausgetrocknet war. Allgemein wird beim Arbeiten in kleinen Volumina bei geöffneten Gefäßen durch Verdunstung von Wasser das Ergebnis stark verfälscht. Zur Erhöhung der Sauerstoffkonzentration wurde das Reaktionsgefäß (geschlossener 15 mL-Falcon) zum einen öfter belüftet und zum anderen mit Sauerstoff geflutet. Es konnte keine Erhöhung der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Bildung erzielt werden, unabhängig davon, ob das Reaktionsgefäß mit Luft oder Sauerstoff gefüllt wurde (Abbildung 99).



**Abbildung 99.** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit

### 9.2.4 Einfluss des zellulären Abbaus von L-Glutamat und $\alpha$ -Ketoglutarat

In Voruntersuchen zeigte sich, dass die Verwendung frischer Zellen dazu führt, dass ein großer Substanzverlust während der Biotransformation auftrat (Daten hier nicht gezeigt). Aufgrund dessen wurden die Zellen mehreren Gefrier- und Tauzyklen unterzogen, bevor sie für die Biotransformationen eingesetzt wurden. Zur Untersuchung des Abbaus von Glutamat und Ketoglutarat durch den so vorbehandelten NADH-Oxidase-Ganzzellkatalysator wurde dieser jeweils mit Glutamat bzw.  $\alpha$ -Ketoglutarat inkubiert. Die Konzentrationen wurden mittels  $^1\text{H}$ -NMR und einem internen Standard vermessen. Es zeigte sich, dass der zelluläre Abbau von Glutamat und  $\alpha$ -Ketoglutarat bei den gewählten Enzym- und Zellmengen zu vernachlässigen war, eine geringere Wiederfindung an Substanzmenge wurde nicht festgestellt. Die An- bzw. Abwesenheit des Cofaktors hatte darauf ebenfalls keinen Einfluss (Abbildung 100).

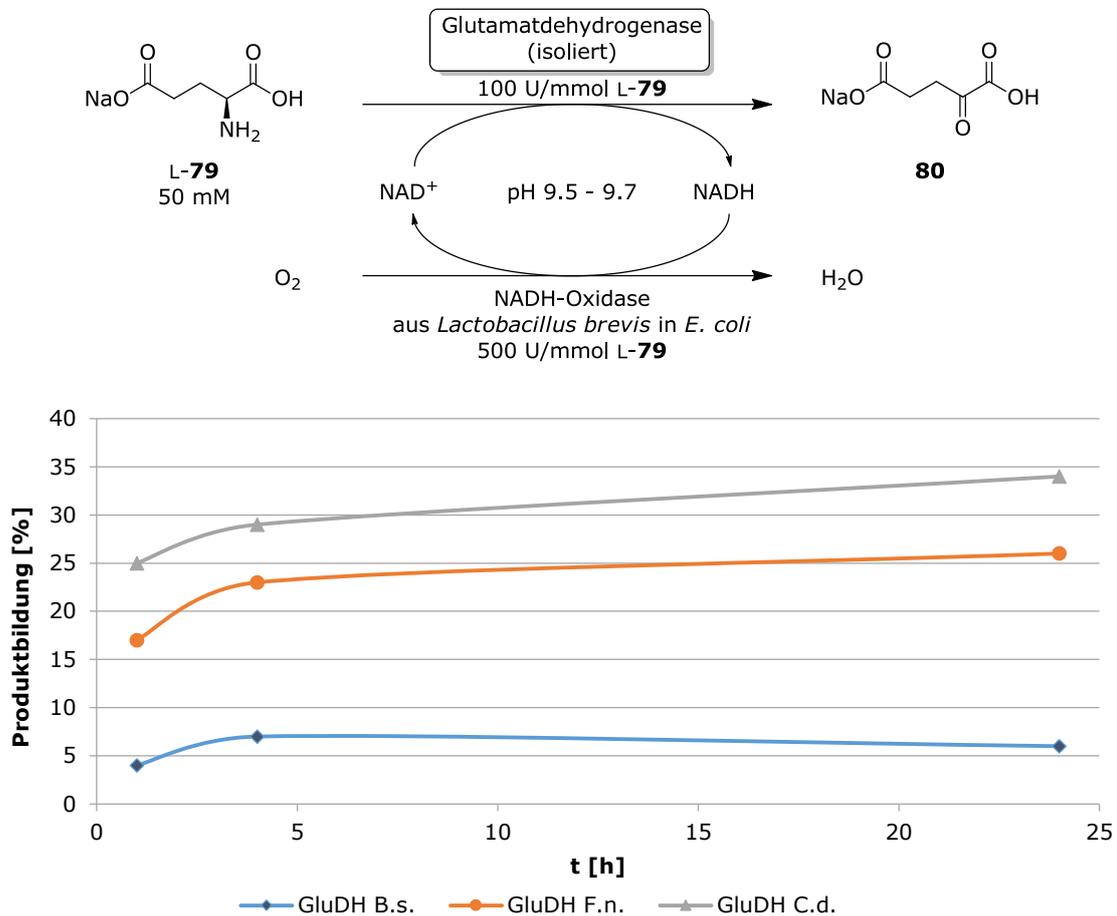


**Abbildung 100.** Zellulärer L-Glutamat- und  $\alpha$ -Ketoglutarat-Abbau durch den NADH-Oxidase-Ganzzellkatalysator

### 9.2.5 Übertragbarkeit des Systems auf weitere Glutamatdehydrogenasen

Das System wurde mit zwei weiteren Glutamatdehydrogenasen aus *Bacillus subtilis* (GluDH B.s.) und *Fusobacterium nucleatum* (GluDH F.n.) kombiniert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 101 dargestellt und zeigen, dass sich die Glutamatdehydrogenase aus *Fusobacterium nucleatum* zur Oxidation von L-Glutamat bei hohen pH-Werten in Kombination mit dem NADH-Oxidase-Ganzzellkatalysator (26% Produktbildung nach 24 h) ähnlich gut wie die

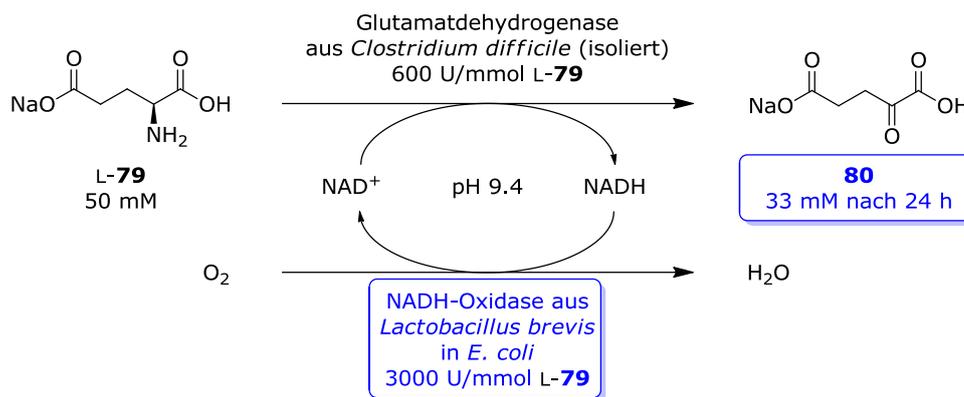
Glutamatdehydrogenase aus *Clostridium difficile* (34% Produktbildung nach 24 h) eignet, während die GluDH aus *Bacillus subtilis* zu geringer Produktbildung von nur 7% nach 24 h führt.



**Abbildung 101.** Verwendung des NADH-Oxidase-Ganzzellkatalysators in Kombination mit verschiedenen Glutamatdehydrogenasen

## 9.2.6 Erhöhung der Enzym- und Zellkonzentration

Zur Verbesserung der Produktivität dieses Systems wurde die eingesetzte Enzym- und Zellmenge erhöht. Dabei zeigte sich, dass die Menge des NADH-Oxidase-Ganzzellkatalysators einen limitierenden Faktor darstellt. Ab einer gewissen Zellmenge ist es nicht mehr möglich, diese im Reaktionsmedium vollständig zu suspendieren. Es ergab sich eine Höchstmenge von 83 mg Zellen pro 1 mL Reaktionsmedium. Diese Menge entsprach bei der eingesetzten Zellcharge einer NO<sub>x</sub>-Aktivität von 3000 U/mmol L-79. In Kombination mit 600 U/mmol L-79 GluDH aus *C. difficile* konnte bei einer Glutamatkonzentration von 50 mM eine Produktbildung von 66% (33 mM) nach 24 h erreicht werden (Abbildung 102).



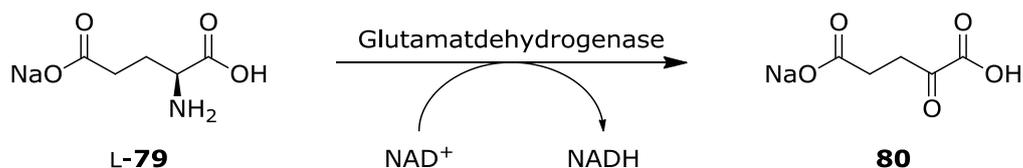
**Abbildung 102.** „Proof of concept“ für die biokatalytische Oxidation von L-Glutamat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat bei hohen pH-Werten durch die Verwendung eines NADH-Oxidase-Ganzzellkatalysators

Damit konnte gezeigt werden, dass die biokatalytische Oxidation von L-Glutamat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat auch bei hohen pH-Werten durchgeführt werden kann. Dieses Beispiel zeigt eindrucksvoll, dass durch den Einsatz der NADH-Oxidase in Form eines Ganzzellkatalysators die Synthese nun bei einem zuvor für dieses Enzym unvorteilhaften pH-Wert stattfinden kann.

Zusammenfassend sind die hier relativ hohen benötigten Enzymmengen von 600 U/mmol bzw. 3000 U/mmol von einem industriell anwendbaren Prozess leider noch sehr weit entfernt. Dieser „proof of concept“ stellt jedoch einen interessanten Startpunkt für die weitere Optimierung dieses Systems im Hinblick auf die Erhöhung der Substratkonzentration sowie die Verbesserung der Produktivität dar.

## 9.3 Experimenteller Teil

### 9.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift 16 (AAV16): Photometrische Aktivitätsbestimmung von Glutamatdehydrogenasen



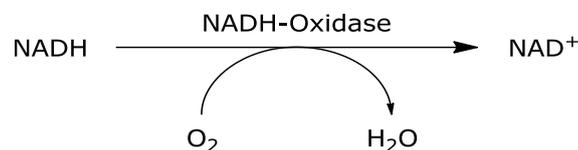
Zur Aktivitätsbestimmung wird eine Mononatriumglutamat-Lösung (79, 100  $\mu$ L, 1 M in Phosphatpuffer (100 mM, pH 8)) mit Phosphatpuffer (840  $\mu$ L, 100 mM, pH 8) in einer Küvette vorgelegt und mit einer NAD<sup>+</sup>-Lösung (50  $\mu$ L, 50 mM in Phosphatpuffer (100 mM, pH 8)) gemischt. Anschließend wird die zu testende Enzymlösung (10  $\mu$ L) zugegeben und die Zunahme

der Cofaktorkonzentration bei 340 nm vermessen. Aus der Anfangssteigung der aufgenommenen Reaktionskinetik wird mit folgender Gleichung die Enzymaktivität bestimmt.

$$\frac{U}{mL} = \frac{\Delta E_{340\text{ nm}} * V_t * f}{\epsilon * V_s * t * d}$$

( $\Delta E_{340\text{ nm}}/t$  = Anfangssteigung der Extinktionskurve,  $V_t$  = Gesamtvolumen,  $V_s$  = Probenvolumen (Volumen der Enzymlösung),  $f$  = Verdünnungsfaktor (der Enzymlösung),  $\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient von NADH,  $d$  = Dicke der Küvette)

### 9.3.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift 17 (AAV17): Photometrische Aktivitätsbestimmung von NADH-Oxidasen



Zur Aktivitätsbestimmung wird eine NADH-Lösung (10  $\mu\text{L}$ , 20 mM in Phosphatpuffer (100 mM, pH 8)) mit Phosphatpuffer (980  $\mu\text{L}$ , 100 mM, pH 8) in einer Küvette gemischt. Die Absorption dieser Lösung bei 340 nm darf den Wert 1 nicht übersteigen, andernfalls wird die Cofaktor-Lösung entsprechend verdünnt. Anschließend wird die zu testende Enzymlösung (10  $\mu\text{L}$ ) zugegeben und die Abnahme der Cofaktorkonzentration bei 340 nm vermessen. Aus der Anfangssteigung der aufgenommenen Reaktionskinetik wird mit folgender Gleichung die Enzymaktivität bestimmt.

$$\frac{U}{mL} = \frac{\Delta E_{340\text{ nm}} * V_t * f}{\epsilon * V_s * t * d}$$

( $\Delta E_{340\text{ nm}}/t$  = Anfangssteigung der Extinktionskurve,  $V_t$  = Gesamtvolumen,  $V_s$  = Probenvolumen (Volumen der Enzymlösung),  $f$  = Verdünnungsfaktor (der Enzymlösung),  $\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient von NADH,  $d$  = Dicke der Küvette)

Zur Bestimmung der NADH-Oxidase-Aktivität innerhalb des Ganzzellkatalysators wird ein Teil der Zellen in Phosphatpuffer resuspendiert (25 Gew.-% Zellmenge, 75 Gew.-% Phosphatpuffer pH 8, 200 mM), aufgeschlossen (mittels Ultraschall-Sonotrode unter Eiskühlung, 3 x 20 sec Beschallung), zentrifugiert und der Überstand wie oben beschrieben vermessen.

### 9.3.3 Validierung der Aufarbeitung über 10 kDa-MWCO-Filter

Zur Validierung der Aufarbeitung werden Mononatriumglutamat-Monohydrat (11.7 mg, 0.0625 mmol),  $\alpha$ -Ketoglutarat (10.5 mg, 0.0625 mmol), der NADH-Oxidase-Ganzzellkatalysator (NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis*, überexprimiert in *E. coli*, 143 mg, 396 U/g bezogen auf NADH; hitzedenaturiert durch Inkubation bei 99°C für 15 min) und die Glutamatdehydrogenase aus *Clostridium difficile* (84  $\mu$ L, Zellrohextrakt, Volumenaktivität 149 U/mL bezogen auf Mononatriumglutamat; hitzedenaturiert durch Inkubation bei 99°C für 15 min) in Carbonatpuffer (2.26 mL, pH 10.8, 100 mM) bei Raumtemperatur inkubiert. Zu Beginn der Inkubation sowie nach 1 h und 4 h werden Proben entnommen und folgendermaßen aufgearbeitet und analysiert:

Die Probe wird zentrifugiert (RT, 15 min, 13400 rpm) und der Überstand über einen 10 kDa-MWCO-Filter filtriert. Das Filtrat wird mittels  $^1\text{H-NMR}$  vermessen. Zur Konzentrationsbestimmung werden 100  $\mu$ L des Filtrats, 450  $\mu$ L  $\text{D}_2\text{O}$  und 50  $\mu$ L eines Pivalinsäurestandards bekannter Konzentration (in  $\text{D}_2\text{O}$ ) gemischt und im  $^1\text{H-NMR}$  unter Absättigung des Wasserpeaks vermessen.<sup>[169]</sup>

$^1\text{H-NMR}$ -Signale die zur Umsatzbestimmung verwendet werden: Mononatriumglutamat:  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.25 (2H, t,  $^3J = 7.9$  Hz), 2.04 – 1.79 (2H, m), die Signalintensitäten werden gemittelt; Ketoglutarat:  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.97 (2H, t,  $^3J = 6.9$  Hz), 2.40 (2H, t,  $^3J = 6.8$  Hz), die Signalintensitäten werden gemittelt; Pivalinsäure:  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.07 (9H, s).

**Tabelle 75.** Ergebnisse zur Validierung der Aufarbeitung

Eintrag	Parameter	Einwaage	Probe nach 1 h	Probe nach 4 h
1	c( $\alpha$ -Ketoglutarat)	24.6 mM	23.05 mM	22.93 mM
2	c(Glutamat)	22.5 mM	26.22 mM	25.97 mM
3	c(gesamt)	47.1 mM	49.27 mM	48.90 mM
4	Wiederfindung	100%	105%	104%

### 9.3.4 Einfluss des zellulären Abbaus von Mononatriumglutamat und $\alpha$ -Ketoglutarat

Der NADH-Oxidase-Ganzzellkatalysator (NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis*, überexprimiert in *E. coli*, 158 mg, 396 U/g bezogen auf NADH; entsprechend 62.5 U) wird mit L-Mononatriumglutamat-Monohydrat (23.4 mg, 0.125 mmol) in Carbonatpuffer (2.34 mL, pH 10.8, 100 mM) bei RT auf einem 3D-Rotator inkubiert (Gesamtvolumen 2.5 mL). Analog wird der Versuch mit  $\alpha$ -Ketoglutarat (21 mg, 0.125 mmol) durchgeführt. Zudem wird je einer weiteren

identischen Probe NADH (0.05 mmol) und NAD<sup>+</sup> (0.05 mmol) zugesetzt. Zu Beginn der Inkubation sowie nach 1 h, 4 h, 24 h und 48 h werden Proben entnommen, wie in Abschnitt 9.3.3 beschrieben aufgearbeitet und mittels <sup>1</sup>H-NMR analysiert.

**Tabelle 76.** Ergebnisse zum zellulären Abbau von L-Glutamat und  $\alpha$ -Ketoglutarat

Eintrag	Komponenten	Wiederfindung [%] t = 1 h	Wiederfindung [%] t = 4 h	Wiederfindung [%] t = 24 h	Wiederfindung [%] t = 48 h
1	L-Glutamat	101	101	97	101
2	L-Glutamat, NADH, NAD <sup>+</sup>	100	100	92	nb
3	$\alpha$ -Ketoglutarat	113	111	106	98
4	$\alpha$ -Ketoglutarat, NADH, NAD <sup>+</sup>	97	98	91	nb

Die angegebene Wiederfindung bezieht sich auf den zu Beginn der Inkubation (t = 0 h) gemessenen Wert, welcher als 100% festgesetzt wird. nb: nicht bestimmt

### 9.3.5 Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der NO<sub>x</sub> in der biokatalytischen Oxidation von Mononatriumglutamat mit isolierten Enzymen

Es werden L-Mononatriumglutamat-Monohydrat (23.5 mg, 0.125 mmol) und NAD<sup>+</sup> (3.3 mg, 5  $\mu$ mol) in Phosphatpuffer (1.984 mL, pH 8, 100 mM) gelöst und mit Glutamatdehydrogenase aus *Clostridium difficile* (31  $\mu$ L, Zellrohextrakt, volumetrische Aktivität 403 U/mL bezogen auf Mononatriumglutamat, 12.5 U) und NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* (521  $\mu$ L, Zellrohextrakt, volumetrische Aktivität 120 U/mL bezogen auf NADH, 62.5 U) versetzt und in einem geschlossenen 15 mL-Falcon auf einem 3D-Rotator bei Raumtemperatur inkubiert. Der pH-Wert dieser Mischung beträgt 7.6. Der Versuch wird unter identischen Bedingungen mit Carbonatpuffer (1.984 mL, pH 10.8, 100 mM) durchgeführt. Der pH-Wert dieser Mischung beträgt 9.4. Nach 1 h, 4 h und 24 h werden Proben entnommen und wie in Abschnitt 9.3.3 beschrieben aufgearbeitet und mittels <sup>1</sup>H-NMR ausgewertet.

**Tabelle 77.** Ergebnisse zur biokatalytischen Oxidation von L-Mononatriumglutamat mit isolierten Enzymen

Eintrag	pH-Wert	Produktbildung nach 1 h [%]	Produktbildung nach 4 h [%]	Produktbildung nach 24 h [%]
1	7.6	46	61	69
2	9.4	25	25	27

### 9.3.6 Untersuchungen zur Abhängigkeit der biokatalytischen Oxidation von Mononatriumglutamat mithilfe eines NADH-Oxidase-Ganzzellkatalysators von der Sauerstoffkonzentration

Es werden Mononatriumglutamat-Monohydrat (23.5 mg, 0.125 mmol) und NAD<sup>+</sup> (3.3 mg, 5  $\mu$ mol) in Carbonatpuffer (2.396 mL, pH 10.8, 100 mM) gelöst und mit Glutamatdehydrogenase aus *Clostridium difficile* (307  $\mu$ L, Zellrohextrakt, volumetrische Aktivität 122 U/mL bezogen auf Mononatriumglutamat, 37.5 U) und der NADH-Oxidase-Ganzzellkatalysator (NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis*, überexprimiert in *E. coli*, 103.5 mg, 1.8 U/mg bezogen auf NADH; entsprechend 187.5 U) versetzt und in einem geschlossenen 15 mL-Falcon auf einem 3D-Rotator bei Raumtemperatur inkubiert. Der pH-Wert dieser Mischung beträgt 9.7. Nach 1 h, 4 h, 24 h und 48 h werden Proben entnommen, wie in Abschnitt 9.3.3 beschrieben aufgearbeitet und mittels <sup>1</sup>H-NMR ausgewertet. Die Sauerstoffzufuhr zu diesem System unterscheidet sich folgendermaßen: a) nach 1 h, 4 h, 24 h und 48 h wird der Deckel des Falcons geöffnet; b) nach 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 24 h und 48 h wird der Deckel des Falcons geöffnet; c) Der Versuch wird unter einer Sauerstoffatmosphäre durchgeführt, die nach 1 h, 4 h und 24 h erneuert wird.

**Tabelle 78.** Ergebnisse zur Untersuchung der Abhängigkeit der biokatalytischen Oxidation von Mononatriumglutamat mithilfe eines NADH-Oxidase-Ganzzellkatalysators von der Sauerstoffkonzentration

Eintrag	Bedingung	Produktbildung nach 1 h [%]	Produktbildung nach 4 h [%]	Produktbildung nach 24 h [%]	Produktbildung nach 48 h [%]
1	a)	25	32	44	51
2	b)	27	36	48	54
3	c)	28	36	50	53

a) nach 1 h, 4 h, 24 h und 48 h wird der Deckel des Falcons geöffnet; b) nach 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 24 h und 48 h wird der Deckel des Falcons geöffnet; c) Der Versuch wird unter einer Sauerstoffatmosphäre durchgeführt, die nach 1 h, 4 h und 24 h erneuert wird.

### 9.3.7 Kombination des NADH-Oxidase-Ganzzellkatalysators mit weiteren Glutamatdehydrogenasen

Es werden Mononatriumglutamat-Monohydrat (23.5 mg, 0.125 mmol) und NAD<sup>+</sup> (3.3 mg, 5  $\mu$ mol) in Carbonatpuffer (pH 10.4, 100 mM) gelöst und mit Glutamatdehydrogenase aus *Clostridium difficile* (155  $\mu$ L, Zellrohextrakt, volumetrische Aktivität 80.6 U/mL bezogen auf Mononatriumglutamat, 12.5 U) oder Glutamatdehydrogenase aus *Bacillus* sp. (403  $\mu$ L, Zellrohextrakt, volumetrische Aktivität 31 U/mL bezogen auf Mononatriumglutamat, 12.5 U) oder Glutamatdehydrogenase aus *Fusobacterium nucleatum* (156  $\mu$ L, Zellrohextrakt, volumetrische Aktivität 80 U/mL bezogen auf Mononatriumglutamat, 12.5 U) versetzt. Das Volumen des Puffers wird so gewählt, dass ein Gesamtreaktionsvolumen von 2.5 mL erhalten

wird. Der NADH-Oxidase-Ganzzellkatalysator (NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis*, überexprimiert in *E. coli*, 34.5 mg, 1.8 U/mg bezogen auf NADH; entsprechend 62.5 U) wird zugesetzt und in einem geschlossenen 15 mL-Falcon auf einem 3D-Rotator bei Raumtemperatur inkubiert. Der pH-Wert dieser Mischung beträgt 9.7 (bzw. 9.5 bei GluDH aus *Bacillus* sp.). Nach 1 h, 4 h und 24 h werden Proben entnommen, wie in Abschnitt 9.3.3 beschrieben aufgearbeitet und mittels  $^1\text{H-NMR}$  ausgewertet.

**Tabelle 79.** Ergebnisse der Biotransformationen mit unterschiedlichen Glutamatdehydrogenasen in Kombination mit dem NADH-Oxidase-Ganzzellkatalysator

Eintrag	GluDH aus	pH	Produktbildung nach 1 h [%]	Produktbildung nach 4 h [%]	Produktbildung nach 24 h [%]
1	<i>Clostridium difficile</i>	9.7	25	29	34
2	<i>Bacillus subtilis</i>	9.5	4	7	6
3	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	9.7	17	23	26

### 9.3.8 Umsetzung von Mononatriumglutamat zu $\alpha$ -Ketoglutarat bei erhöhter Enzym- und Zellkonzentration

Es werden Mononatriumglutamat-Monohydrat (23.5 mg, 0.125 mmol) und  $\text{NAD}^+$  (3.3 mg, 5  $\mu\text{mol}$ ) in Carbonatpuffer (1.678 mL, pH 10.8, 100 mM) gelöst und mit Glutamatdehydrogenase aus *Clostridium difficile* (615  $\mu\text{L}$ , Zellrohextrakt, volumetrische Aktivität 122 U/mL bezogen auf Mononatriumglutamat, 75 U) und dem NADH-Oxidase-Ganzzellkatalysator (NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis*, überexprimiert in *E. coli*, 207 mg, 1.8 U/mg bezogen auf NADH; entsprechend 375 U) versetzt und in einem geschlossenen 15 mL-Falcon auf einem 3D-Rotator bei Raumtemperatur inkubiert. Der pH-Wert dieser Mischung beträgt 9.4. Nach 1 h, 4 h und 24 h werden Proben entnommen, wie in Abschnitt 9.3.3 beschrieben aufgearbeitet und mittels  $^1\text{H-NMR}$  ausgewertet.

**Tabelle 80.** Ergebnisse zur biokatalytischen Oxidation von Mononatriumglutamat mithilfe des NADH-Oxidase-Ganzzellkatalysators bei hoher Enzym- und Zellkonzentration

Eintrag	Produktbildung nach 1 h [%]	Produktbildung nach 4 h [%]	Produktbildung nach 24 h [%]
1	39	57	66

## 10 Literaturverzeichnis

- [1] P. Anastas, *C&EN* **2011**, *89*, 62–65.
- [2] R. A. Sheldon, I. Arends, U. Hanefeld (Eds.) *Green Chemistry and Catalysis*, WILEY-VCH, Weinheim, **2007**.
- [3] P. T. Anastas, M. M. Kirchhoff, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 686–694.
- [4] K. Sanderson, *Nature* **2011**, *469*, 18–20.
- [5] A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey (Eds.) *Industrial biotransformations*, WILEY-VCH, Weinheim, **2006**.
- [6] United States Environmental Protection Agency, "2012 Greener Synthetic Pathways Award", can be found under <http://www2.epa.gov/green-chemistry/2012-greener-synthetic-pathways-award>, **2014**.
- [7] X. Gao, X. Xie, I. Pashkov, M. R. Sawaya, J. Laidman, W. Zhang, R. Cacho, T. O. Yeates, Y. Tang, *Chemistry & biology* **2009**, *16*, 1064–1074.
- [8] United States Environmental Protection Agency, "2010 Greener Reaction Award", can be found under <http://www2.epa.gov/green-chemistry/2010-greener-reaction-conditions-award>, **2014**.
- [9] 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 et al., *Science* **2010**, *329*, 305–309.
- [10] can be found under <http://www2.epa.gov/green-chemistry>.
- [11] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, **2011**.
- [12] F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, D. Holtmann, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2285–2313.
- [13] E. Brenna, F. G. Gatti, A. Manfredi, D. Monti, F. Parmeggiani, *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 262–268.
- [14] a) E. Brenna, F. G. Gatti, L. Malpezzi, D. Monti, F. Parmeggiani, A. Sacchetti, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 4811–4822; b) S. Debarge, P. McDaid, P. O'Neill, J. Frahill, J. Wong, D. Carr, A. Burrell, S. Davies, M. Karmilowicz, J. Steflik, *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*, 109–121; c) H. G. W. Leuenberger, W. Boguth, E. Widmer, R. Zell, *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1832–1849.
- [15] A. Müller, B. Hauer, B. Rosche, *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *98*, 22–29.
- [16] A. Müller, B. Hauer, B. Rosche, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2006**, *38*, 126–130.
- [17] T. Reiß, *Masterarbeit*, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, **2011**.
- [18] C. Giese, *Masterarbeit*, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, **2011**.
- [19] E. Burda, *unveröffentlichte Ergebnisse*.

- [20] H. Gruß, *Bachelorarbeit*, Universität Bielefeld, Bielefeld, **2013**.
- [21] E. Burda, M. Krausser, G. Fischer, W. Hummel, F. Müller-Uri, W. Kreis, H. Gröger, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 2787–2790.
- [22] N. Richter, H. Gröger, W. Hummel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 79–89.
- [23] O. Warburg, W. Christian, *Naturwissenschaften* **1932**, *20*, 688.
- [24] O. Warburg, W. Christian, *Biochem. Z.* **1933**, *263*, 228–229.
- [25] H. Theorell, *Biochem. Z.* **1935**, *275*, 344–346.
- [26] E. Haas, *Biochem. Z.* **1938**, *298*, 378–390.
- [27] H. S. Toogood, J. M. Gardiner, N. S. Scrutton, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 892–914.
- [28] K. Kitzing, T. B. Fitzpatrick, C. Wilken, J. Sawa, G. P. Bourenkov, P. Macheroux, T. Clausen, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27904–27913.
- [29] T. B. Fitzpatrick, N. Amrhein, P. Macheroux, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19891–19897.
- [30] K. Durchschein, S. Wallner, P. Macheroux, W. Schwab, T. Winkler, W. Kreis, K. Faber, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 4963–4968.
- [31] a) J. Liu, J. Wu, Z. Li, *Chem. Commun.* **2014**, online published, DOI: 10.1039/c4cc04150j;  
b) H. S. Toogood, N. S. Scrutton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 107–115.
- [32] D. J. Mansell, H. S. Toogood, J. Waller, Hughes, John M. X., C. W. Levy, J. M. Gardiner, N. S. Scrutton, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 370–379.
- [33] P. A. Karplus, K. M. Fox, V. Massey, *FASEB Journal* **1995**, 1518–1526.
- [34] Y. S. Niino, S. Chakraborty, B. J. Brown, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 1983–1991.
- [35] a) R. U. Onyenwoke, V. V. Kevbrin, A. M. Lysenko, J. Wiegel, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2007**, *57*, 2191–2193; b) B. V. Adalbjörnsson, H. S. Toogood, A. Fryszkowska, C. R. Pudney, T. A. Jowitt, D. Leys, N. S. Scrutton, *ChemBioChem* **2010**, 197–207.
- [36] D. J. Opperman, L. A. Piater, E. van Heerden, *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 3076–3082.
- [37] D. J. Opperman, B. T. Sewell, D. Litthauer, M. N. Isupov, J. A. Littlechild, E. van Heerden, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *393*, 426–431.
- [38] P. R. Binks, C. E. French, S. Nicklin, N. C. Bruce, *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 1214–1219.
- [39] T. M. Barna, H. Khan, N. C. Bruce, I. Barsukov, N. S. Scrutton, P. C. Moody, *J. Mol. Biol.* **2001**, *310*, 433–447.
- [40] N. C. Bruce, C. J. Wilmot, K. N. Jordan, A. F. Trebilcock, L. D. Gray Stephens, C. R. Lowe, *Arch. Microbiol.* **1990**, *154*, 465–470.
- [41] T. Barna, H. L. Messiha, C. Petosa, N. C. Bruce, N. S. Scrutton, P. C. E. Moody, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 30976–30983.
- [42] C. E. French, N. C. Bruce, *Biochem. J.* **1995**, *312*, 671–678.
- [43] M. Hall, C. Stueckler, W. Kroutil, P. Macheroux, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3934–3937.
- [44] C. Breithaupt, J. Strassner, U. Breitingner, R. Huber, P. Macheroux, A. Schaller, T. Clausen, *Structure* **2001**, *9*, 419–429.

- [45] J. Straßner, A. Fürholz, P. Macheroux, N. Amrhein, A. Schaller, *J. Biol. Chem.* **1999**, 35067–35073.
- [46] J. Buckman, S. M. Miller, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14326–14336.
- [47] D. S. Blehert, B. G. Fox, G. H. Chambliss, *J. Bacteriol.* **1999**, 6254–6263.
- [48] P. van Dillewijn, R.-M. Wittich, A. Caballero, J.-L. Ramos, *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 6703–6708.
- [49] J. J. Griese, R. P. Jakob, S. Schwarzingler, H. Dobbek, *J. Mol. Biol.* **2006**, *361*, 140–152.
- [50] C. Peters, R. Kölzsch, M. Kadow, L. Skalden, F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 1021–1027.
- [51] S. Reich, H. W. Hoeffken, B. Rosche, B. M. Nestl, B. Hauer, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2400–2407.
- [52] M. Mizugaki, T. Unuma, H. Yamanaka, *Chem. Pharm. Bull.* **1979**, *27*, 2334–2337.
- [53] K. Miura, Y. Tomioka, H. Suzuki, M. Yonezawa, T. Hishinuma, M. Mizugaki, *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, 110–112.
- [54] J. F. Chaparro-Riggers, T. A. Rogers, E. Vazquez-Figueroa, K. M. Polizzi, A. S. Bommarium, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1521–1531.
- [55] P. Schweiger, H. Gross, S. Wesener, U. Deppenmeier, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *80*, 995–1006.
- [56] B. Yin, X. Yang, G. Wei, Y. Ma, D. Wei, *Mol. Biotechnol.* **2008**, *38*, 241–245.
- [57] D. H. Craig, P. C. E. Moody, N. C. Bruce, N. S. Scrutton, *Biochemistry* **1998**, *37*, 7598–7607.
- [58] R. E. Williams, N. C. Bruce, *Microbiology* **2002**, *148*, 1607–1614.
- [59] R. M. Kohli, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32763–32770.
- [60] B. J. Brown, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32753–32762.
- [61] H. Khan, T. Barna, N. C. Bruce, A. W. Munro, D. Leys, N. S. Scrutton, *FEBS J.* **2005**, *272*, 4660–4671.
- [62] H. L. Messiha, N. C. Bruce, B. M. Sattelle, M. J. Sutcliffe, A. W. Munro, N. S. Scrutton, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27103–27110.
- [63] R. Stuermer, B. Hauer, M. Hall, K. Faber, *Current Opinion in Chemical Biology* **2007**, *11*, 203–213.
- [64] C. K. Winkler, G. Tasnádi, D. Clay, M. Hall, K. Faber, *J. Biotechnol.* **2012**, *162*, 381–389.
- [65] K. Drauz, H. Gröger, O. May (Eds.) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, WILEY-VCH, Weinheim, **2012**.
- [66] Y. Yanto, C. K. Winkler, S. Lohr, M. Hall, K. Faber, A. S. Bommarium, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2540–2543.
- [67] C. Stueckler, C. K. Winkler, M. Hall, B. Hauer, M. Bonnekessel, K. Zangger, K. Faber, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 1169–1173.
- [68] A. Z. Walton, W. C. Conerly, Y. Pompeu, B. Sullivan, J. D. Stewart, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 989–993.

- [69] C. K. Winkler, C. Stueckler, N. J. Mueller, D. Pressnitz, K. Faber, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 6354–6358.
- [70] S. Raimondi, D. Romano, A. Amaretti, F. Molinari, M. Rossi, *J. Biotechnol.* **2011**, *156*, 279–285.
- [71] B. Kosjek, F. J. Fleitz, P. G. Dormer, J. T. Kuethe, P. N. Devine, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1403–1406.
- [72] "pET28 Plasmid", can be found under [http://www.snapgene.com/resources/plasmid\\_files/pet\\_and\\_duet\\_vectors\\_\(novagen\)/pET-28a\(+\)](http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pet_and_duet_vectors_(novagen)/pET-28a(+).).
- [73] "pQR1 Plasmid", can be found under <http://www.metallife.com/Genbank/56961681>.
- [74] "pET21a Plasmid", can be found under [http://www.snapgene.com/resources/plasmid\\_files/pet\\_and\\_duet\\_vectors\\_\(novagen\)/pET-21a\(+\)](http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pet_and_duet_vectors_(novagen)/pET-21a(+).).
- [75] H. Korbekandi, P. Mather, J. Gardiner, G. Stephens, *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, *42*, 308–314.
- [76] Y.-J. Liu, X.-Q. Pei, H. Lin, P. Gai, Y.-C. Liu, Z.-L. Wu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *95*, 635–645.
- [77] H. S. Toogood, A. Fryszkowska, M. Hulley, M. Sakuma, D. Mansell, G. M. Stephens, J. M. Gardiner, N. S. Scrutton, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 738–749.
- [78] H.-B. Wang, X.-Q. Pei, Z.-L. Wu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 705–715.
- [79] Y. Kawai, Y. Inaba, N. Tokitoh, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 309–318.
- [80] K. Sakai, A. Nakazawa, K. Kondo, H. Ohta, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, 2331–2335.
- [81] A. Mori, I. Ishiyama, H. Akita, K. Suzuki, T. Mitsuoka, T. Oishi, *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 3449–3451.
- [82] A. Fryszkowska, K. Fisher, J. M. Gardiner, G. M. Stephens, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4295–4298.
- [83] H. S. Toogood, A. Fryszkowska, V. Hare, K. Fisher, A. Roujeinikova, D. Leys, J. M. Gardiner, G. M. Stephens, N. S. Scrutton, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2789–2803.
- [84] T. Classen, J. Pietruszka, S. M. Schuback, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 711–713.
- [85] E. Burda, T. Reß, T. Winkler, C. Giese, X. Kostrov, T. Huber, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9323–9326.
- [86] M. Hall, C. Stueckler, B. Hauer, R. Stuermer, T. Friedrich, M. Breuer, W. Kroutil, K. Faber, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 1511–1516.
- [87] Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd, WO2009116566 (A1), **2014**.
- [88] a) W. Tischer, J. Bader, H. Simon, *Eur. J. Biochem.* **1979**, *97*, 103–112; b) P. Ferraboschi, P. Grisenti, R. Casati, A. Fiecchi, E. Santaniello, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1987**, 1743–1748.
- [89] J. Pietruszka, M. Schölzel, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 751–756.

- [90] A. Fryszkowska, H. Toogood, M. Sakuma, J. M. Gardiner, G. M. Stephens, N. S. Scrutton, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 2976–2990.
- [91] N. J. Mueller, C. Stueckler, B. Hauer, N. Baudendistel, H. Housden, N. C. Bruce, K. Faber, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 387–394.
- [92] N. Iqbal, F. Rudroff, A. Brigé, J. van Beeumen, M. D. Mihovilovic, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7619–7623.
- [93] T. Winkler, *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Jülich, bisher nicht veröffentlicht.
- [94] T. Günther, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1977**, *15*, 433–438.
- [95] S. Chavda, E. Coulbeck, M. Dingjan, J. Eames, A. Flinn, J. Northen, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1536–1548.
- [96] M. Krauß, T. Winkler, N. Richter, S. Dommer, A. Fingerhut, W. Hummel, H. Gröger, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 293–296.
- [97] F. Schaller, E. W. Weiler, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *245*, 294–299.
- [98] A. Müller, R. Stürmer, B. Hauer, B. Rosche, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2007**, *46*, 3316–3318.
- [99] M. Kataoka, A. Kotaka, R. Thiwthong, M. Wada, S. Nakamori, S. Shimizu, *J. Biotechnol.* **2004**, *114*, 1–9.
- [100] G. Fronza, C. Fuganti, P. Grasselli, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6375–6378.
- [101] a) K. Shimoda, N. Kubota, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3827–3829; b) K. Takabe, H. Hiyoshi, H. Sawada, M. Tanaka, A. Miyazaki, T. Yamada, T. Katagiri, H. Yoda, *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 1399–1400.
- [102] N. Ono, *The nitro group in organic Synthesis*, WILEY-VCH, New York, **2001**.
- [103] T. C. Nugent (Ed.) *Chiral Amine Synthesis. Methods, Developments and Applications*, WILEY-VCH, Weinheim, **2012**.
- [104] a) H.-U. Blaser, H.-P. Buser, H.-P. Jalett, B. Pugin, F. Spindler, *Synlett* **1999**, 867–868; b) H.-U. Blaser, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 17–31.
- [105] C. Zheng, S.-L. You, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2498–2518.
- [106] S. G. Ouellet, A. M. Walji, MacMillan, David W C, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1327–1339.
- [107] A. Johansson, *Contemp. Org. Synth.* **1995**, *2*, 393–407.
- [108] M.-L. Louillat, F. W. Patureau, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 901–910.
- [109] C. Liang, F. Robert-Peillard, C. Fruit, P. Müller, R. H. Dodd, P. Dauban, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4641–4644.
- [110] C. Liang, F. Collet, F. Robert-Peillard, P. Müller, R. H. Dodd, P. Dauban, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 343–350.
- [111] T. C. Nugent, M. El-Shazly, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 753–819.
- [112] Sandoz, DE 3805744A1, **1988**.
- [113] T. E. Müller, M. Beller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 675–703.

- [114] T. C. Nugent (Ed.) *Chiral Amine Synthesis*, WILEY-VCH, Weinheim, **2010**.
- [115] J. Hannedouche, E. Schulz, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4972–4985.
- [116] H. U. Blaser, F. Spindler, M. Studer, *Appl. Catal., A* **2001**, *221*, 119–143.
- [117] a) H. Li, P. Williams, J. Micklefield, J. M. Gardiner, G. Stephens, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 753–758; b) T. Vaijayanthi, A. Chadha, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 93–96; c) K. Mitsukura, M. Suzuki, K. Tada, T. Yoshida, T. Nagasawa, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4533–4535.
- [118] M. J. Abrahamson, E. Vázquez-Figueroa, N. B. Woodall, J. C. Moore, A. S. Bommarius, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3969–3972.
- [119] M. J. Abrahamson, J. W. Wong, A. S. Bommarius, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 1780–1786.
- [120] a) B. Hauer, N. Schneider, D. Drew, K. Ditrach, N. Turner, B. M. Nestl, WO 2011012632A2 I, **2013**; b) S. L. Lovelock, N. J. Turner, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5555–5557; c) S. L. Lovelock, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4652–4656.
- [121] a) I. Lavandera, D. Koszelewski, W. Kroutil, AT 507050A1 I, **2013**; b) D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 324–332; c) W. Kroutil, E.-M. Fischereder, C. S. Fuchs, H. Lechner, F. G. Mutti, D. Pressnitz, A. Rajagopalan, J. H. Sattler, R. C. Simon, E. Siirola, *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 751–759.
- [122] a) D. Zhu, L. Hua, *Biotechnol. J.* **2009**, *4*, 1420–1431; b) M. D. Truppo, J. D. Rozzell, J. C. Moore, N. J. Turner, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 395–398.
- [123] A. P. Green, N. J. Turner, E. O'Reilly, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10714–10717.
- [124] J.-S. Shin, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *60*, 534–540.
- [125] a) M. Alexeeva, A. Enright, M. J. Dawson, M. Mahmoudian, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3177–3180; b) R. Carr, M. Alexeeva, M. J. Dawson, V. Gotor-Fernández, C. E. Humphrey, N. J. Turner, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 637–639; c) C. J. Dunsmore, R. Carr, T. Fleming, N. J. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2224–2225; d) I. Rowles, K. J. Malone, L. L. Etchells, S. C. Willies, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2012**, *4*, 1259–1261.
- [126] J. González-Sabín, V. Gotor, F. Rebolledo, *Tetrahedron:Asymmetry* **2002**, *13*, 1315–1320.
- [127] L. Muñoz, A. M. Rodríguez, G. Rosell, M. P. Bosch, A. Guerrero, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8171.
- [128] F. Campos, M. P. Bosch, A. Guerrero, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2705–2717.
- [129] a) Y. Li, T. Izumi, *J. Chin. Chem. Soc.* **2002**, *49*, 505–508; b) Y. Li, T. Izumi, *J. Chem. Res. Synop.* **2003**, *3*, 128–129.
- [130] J. U. Nef, *Liebigs Ann. Chem.* **1894**, *280*, 263–291.
- [131] K. Durchschein, W. M. F. Fabian, P. Macheroux, K. Zangger, G. Trimmel, K. Faber, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3364–3369.

- [132] K. Durchschein, B. Ferreira-da Silva, S. Wallner, P. Macheroux, W. Kroutil, S. M. Glueck, K. Faber, *Green Chem.* **2010**, *12*, 616.
- [133] G. Oberdorfer, A. Binter, S. Wallner, K. Durchschein, M. Hall, K. Faber, P. Macheroux, K. Gruber, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 836–845.
- [134] H. Maid, P. Böhm, S. M. Huber, W. Bauer, W. Hummel, N. Jux, H. Gröger, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2445–2448.
- [135] G. W. Huisman, J. Liang, A. Krebber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 122–129.
- [136] a) P. Narayan, C. P. Evans, T. Moon, *J. Urol.* **2003**, *170*, 498–502; b) P. Narayan, A. Tewari, *J. Urol.* **1998**, *160*, 1701–1706; c) G. Sagratini, P. Angeli, M. Buccioni, U. Gulini, G. Marucci, C. Melchiorre, E. Poggesi, D. Giardinà, *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5800–5807.
- [137] Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd., EP 0034432A2, **1981**.
- [138] Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd., EP 0257787, **1987**.
- [139] A. Kleemann, J. Engel, B. Kutscher, D. Reichert, *Encyclopedia of pharmaceutical substances*, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2009**.
- [140] A. V. Reddy, S. U. Bhaskara Rao, G. L. Narasimha, P. K. Dubey, *Synth. Commun.* **2009**, *39*, 1451–1456.
- [141] L. Guangcheng, D. A. Cogan, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9913–9914.
- [142] T. Gizur, E. Fogassy, J. Bálint, G. Egri, J. Törley, A. Demeter, I. Greiner, *Chirality* **2008**, *20*, 790–795.
- [143] US 20060148046A1, **2006**.
- [144] D. Acetti, E. Brenna, C. Fuganti, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 488–492.
- [145] a) Hokuriku Pharmaceutical, JP 02306958A, **1990**; b) WO 2005056521A1, **2005**.
- [146] H. Ohta, N. Kobayashi, K. Ozaki, *J. Org. Chem.* **1989**, 1802–1804.
- [147] R. Metzner, *Dissertation*, Universität Bielefeld, Bielefeld, **2014**.
- [148] A. Rahmati, K. Vakili, *Amino Acids* **2010**, *39*, 911–916.
- [149] K. Mogilaiah, H. S. Babu, K. Vidya, K. S. Kumar, *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **2010**, 390–393.
- [150] S. D. Sharma, P. Gogoi, D. Konwar, *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **2007**, *46*, 1672–1678.
- [151] T. Rossi, C. Marchioro, A. Paio, R. J. Thomas, P. Zarantonello, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1653–1661.
- [152] DE 3317356A1.
- [153] B. M. K. Tong, S. Chiba, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2948–2951.
- [154] X. Han, Y. Wang, F. Zhong, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1726–1729.
- [155] J. E. Milne, T. Storz, J. T. Colyer, O. R. Thiel, M. D. Seran, R. D. Larsen, J. A. Murry, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 9519–9524.
- [156] D. B. Ramachary, M. Kishor, Y. V. Reddy, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 975–993.
- [157] D. T. Genna, G. H. Posner, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5358–5361.

- [158] S. Yan, Y. Gao, R. Xing, Y. Shen, Y. Liu, P. Wu, H. Wu, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 6294–6299.
- [159] N. M. Goudgaon, P. P. Wadgaonkar, G. W. Kabalka, *Synth. Commun.* **1989**, *19*, 805–811.
- [160] A. Mori, I. Ishiyama, H. Akita, K. Suzuki, T. Mitsuoka, T. Oishi, *Xenobiotica* **1990**, *20*, 629–634.
- [161] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- [162] a) C. Otto, V. Yovkova, G. Barth, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92*, 689–695; b) SGP & Sons AB, WO2007122190A1, **2007**; c) WO2004012706A1, **2004**; d) SGP & Sons AB, EP2020999B1, **2007**; e) P. Jambunathan, K. Zhang, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *29*, 1–7.
- [163] P. Ödman, W. B. Wellborn, A. S. Bommarius, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2933–2937.
- [164] B. R. Riebel, P. R. Gibbs, W. B. Wellborn, A. S. Bommarius, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, 1156–1168.
- [165] Evonik Degussa GmbH, WO2009053489A1, **2009**.
- [166] W. Hummel, B. Riebel, *Biotechnol. Lett.* **2003**, 51–54.
- [167] K. Tenbrink. unveröffentlichte Ergebnisse, **2010**, Universität Erlangen-Nürnberg.
- [168] C. Lanzerath. unveröffentlichte Ergebnisse, **2010**, Forschungszentrum Jülich.
- [169] W. Greschner. unveröffentlichte Ergebnisse, **2012**, Universität Bielefeld.