

Biokatalytische Synthesen von ϵ -Caprolacton und chiralen Aminen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

von

Anna Reimer

aus Pretorija / Russland

Bielefeld, August 2015

In memoriam
JAKOB REIMER

Als Dissertation vorgelegt der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld.

Erstberichterstatter: Prof. Dr. Harald Gröger
Zweitberichterstatter: Prof. Dr. Norbert Sewald

Die vorliegende Arbeit wurde in der Organischen Chemie der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld unter der Leitung von Prof. Dr. Harald Gröger im Zeitraum vom April 2011 bis August 2015 erstellt.

Anna Reimer, Biokatalytische Synthesen von ϵ -Caprolacton und chiralen Aminen

© August 2015

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht:

Posterpräsentation:

Anna Reimer, Svenja Staudt, Uwe Bornscheuer, Ulf Menyes, Harald Gröger, "Establishing of GC analytics for enzymically catalysed Baeyer-Villiger reaction", 7. CeBiTec Symposium, Zentrum für Interdisziplinäre Forschung (ZiF), Universität Bielefeld, 17. – 19. Dezember **2012**.

Publikationen:

Anna Reimer, Severin Wedde, Svenja Staudt, Sandy Schmidt, Daniela Höffer, Werner Hummel, Udo Kragl, Uwe Bornscheuer, Harald Gröger, Process Development Through Solvent Engineering in the Biocatalytic Synthesis of the Heterocyclic Bulk Chemical ϵ -Caprolactone, *J. Heterocyc. Chem.* **2015**, eingereicht.

Florian Uthoff, Anna Reimer, Andreas Liese, Harald Gröger, Enantioselective Synthesis of Chiral Amines Through Enzymatic Resolution under Solvent-free Conditions, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, eingereicht.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Harald Gröger für die Betreuung meiner Dissertation. Insbesondere danke ich für die Bereitstellung der interessanten Themen und die Hilfsbereitschaft, die kontinuierliche Förderung und die fachlichen Gespräche.

Ich danke Prof. Dr. Norbert Sewald für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Der Deutschen Bundestiftung Umwelt (DBU) danke ich für die finanzielle Förderung des Projektes „Nachhaltige, biokatalytische Oxidationsprozesse“. Der Firma Enzymicals AG und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Werner Hummel gilt mein Dank für die zur Verfügung gestellten Monooxygenasen bzw. der Alkohol-Dehydrogenase.

Ein großer Dank gehört den beiden guten Seelen der Arbeitsgruppe: Thomas Geisler und Arja Gaestel. Beide haben mit Ihrer unendlich freundlichen Art eine schöne Atmosphäre gezaubert. Niemand kann einen morgens fröhlicher begrüßen, mit einem Schmunzeln besser die Ruhe bewahren und eine leckerere Feuerzangenbowle basteln als Thomas. Arja danke ich für die zahlreichen Pläuschchen und Urlaubsimpressionen immer mal wieder zwischendurch.

Des Weiteren danke ich der MS-Abteilung: Dr. Jens Spross, Sandra Heitkamp (Danke für die ESI-Messungen) und Heinz-Werner Patruck, der bei Hilfe-Rufen in Computerfragen sofort zur Stelle war. Herrn Peter Mester danke ich für die superschnellen NMR-Messungen, die teilweise schon auf den Server hochgeladen waren, bevor man den Weg zurück ins Labor geschafft hatte. Frau Brigitte Michel danke ich für die Durchführung der Elementaranalysen.

Ich danke dem ehemaligen AK Mattay für die freundliche Aufnahme in die wunderbare Welt der OC I. Mein Dank gilt den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe: Dr. Kai Altenhöner * Daniel Bakonyi – isch weiß, wo ding Grill steht, ming Jung, un isch fühle mich eingeladen! * Tobias Betke * Dr. Sebastian Bringmann – danke für deine humorvolle Art * Dr. Jens Eberhard – ein wandelndes Lehrbuch, sprudelnd vor Ideen * Wilko Greschner – ein Virtuose an der Kaffeemaschine * Dr. Anke Hummel – danke für das Korrekturlesen! * Dr. Florian May * Dr. Richard Metzner – danke für das Korrekturlesen und noch vieles mehr (Fünnünününü!) * Dr. Michael Peter * Matthias Pieper * Philipp Rommelmann * Katharina Tenbrink * Dr. Oliver Tomic * Florian Uthoff – den ich um seine Gelassenheit beneide * Severin Wedde * Dr. Sebastian Wiegmann – er könnte die Welt mit Stativstangen und Alufolie retten * sowie sämtlichen Kollegen des AK in Erlangen. Danke für die nette Atmosphäre im Labor, die vielen schönen ausufernden Diskussionen in den Pausen sowie die Mario-Kart-Abende, die professionellen Brauerei-Besichtigungen und Boßel-Hochleistungssport-Ausflüge, PubQuiz-Abende, Glühweinmarkt-Besuchen und noch vieles mehr. Es war eine schöne Zeit!

Dr. Svenja Staudt danke ich für die freundliche Hilfestellungen und Tipps und Tricks für den Einstieg in die Thematik. Ich danke Mathilde Brax und Jan-Philipp Broschinski für die synthetischen Arbeiten

während ihrer Forschungspraktika und sämtlichen Azubis (Dank an Evelyn Schulde für die helfende Hand am Kolben) und HiWis. Den Doktoranden der OC II und OC III danke ich für den gemeinsamen Zeitvertreib während der Praktikumsbetreuung im Saal.

Meiner Büro-Familie, Ramona Bringmann, Dr. Tina Reiß und Marc Biermann, danke ich für die fruchtbaren Diskussionen über Chemie, MS Word sowie die Welt und das Leben. „Wenn aus Kollegen Freunde werden“ oder einfach: ihr seid mir in diesen Jahren sehr ans Herz gewachsen. In besonderem Maße möchte ich mich bei Tina für ihre Freundschaft bedanken. Es gibt noch viele schlechte Filme zu schauen, viel Wein zu trinken und unendlich viel zu bereden – ich freue mich darauf!

Meinen Freunden und Lieben außerhalb der Uni danke ich für ihr Verständnis. Ich konnte mich immer auf ihr offenes Ohr und ihre Unterstützung verlassen, auch wenn ihnen nicht immer so klar war, was genau ich da in der Uni eigentlich so mache.

Zum Schluss danke ich den für mich kostbarsten Menschen: ich danke meinem Freund Robert für seine geduldige moralische Unterstützung und seine Liebe. Mein Bruder Viktor danke ich für seine Ermutigungen und dafür, dass er der beste Bruder ist. Meiner Mutter Erna, die mir diese Chancen ermöglicht hat, danke ich aus tiefstem Herzen für das in mich gesetzte Vertrauen. Ohne euch hätte ich diesen langen Weg nicht gehen können. DANKE!

I. Inhalt

I.	Inhalt	I
II.	Abkürzungsverzeichnis	IX
1	Einleitung	1
2	Motivation und Zielsetzung	3
2.1	Enzymkatalysierte Oxidation von Cyclohexanol (1).....	3
2.2	Enantioselektive Racematspaltung von Aminen.....	5
3	Enzymatische Oxidation mittels Monooxygenasen	9
3.1	Chemische BAEYER-VILLIGER-Oxidation	9
3.1.1	Klassische BAEYER-VILLIGER-Oxidation	9
3.1.2	Stand der Wissenschaft: klassische BAEYER-VILLIGER-Oxidation	12
3.1.3	Stereoselektive BAEYER-VILLIGER-Oxidation.....	14
3.2	Enzymkatalysierte Synthesen	15
3.2.1	Enzymatische BAEYER-VILLIGER-Oxidation.....	15
3.2.2	BAEYER-VILLIGER-Monooxygenasen.....	16
3.2.2.1	Allgemeines.....	16
3.2.2.2	Struktur und Mechanismus	18
3.2.3	Alkohol-Dehydrogenasen.....	23
3.2.4	Cofaktor-Regeneration	26
3.3	Eigene Ergebnisse und Diskussion.....	29
3.3.1	Standardreaktion: Doppeloxidation von Cyclohexanol (1) zu ϵ -Caprolacton (3).....	29
3.3.2	Etablierung analytischer Methoden.....	30
3.3.2.1	Umsatzbestimmung mittels NMR-Analytik.....	30
3.3.2.2	Umsatzbestimmung mittels Gaschromatographie.....	32
3.3.2.3	Ermittlung der Rückgewinnungsrate.....	33
3.3.2.4	Vergleich der Analytik-Methoden anhand der Standard-Reaktion	36
3.3.2.5	Aktivitätsbestimmung mittels UV/Vis-Spektroskopie und BRADFORD-Test.....	37
3.3.2.6	Optimierung der Standardreaktion	39
3.3.3	Untersuchungen mittels Titrations-Apparatur.....	43
3.3.4	Verwendung von Adsorberharzen	46

3.3.5	Variation der Substrate	48
4	Enantioselektive Racematspaltung von Aminen	53
4.1	Lipasen.....	53
4.1.1	Allgemeines	53
4.1.2	Struktur und Mechanismus	54
4.1.3	Enantioselektivität von Lipasen	57
4.2	Stand der Wissenschaft: Aminsynthesen	58
4.2.1	Klassisch chemische und chemokatalytische Synthesen	58
4.2.2	Enzymkatalysierte Synthesen	64
4.3	Eigene Ergebnisse und Diskussion.....	73
4.3.1	Referenzen und Analytik	73
4.3.1.1	Synthese der Referenzverbindungen.....	73
4.3.1.2	Analytik	75
4.3.2	Vorversuche mit substituierten Benzylaminen als Substrate.....	79
4.3.2.1	Synthese des Benzylamids 133	79
4.3.3	Enzymatische Acylierung substituierter Benzylamine	80
4.3.4	Enzymatische Racematspaltung von 1-Phenylethylamin (<i>rac-4</i>).....	85
4.3.4.1	Prozessoptimierung.....	86
4.3.4.1.1	Einfluss der Temperatur und Reaktionszeit.....	86
4.3.4.1.2	Vergleich mit bestehenden industriellen Prozessen.....	88
4.3.5	Enzymrecycling.....	89
4.3.6	Verwendung von alternativen Lipasen	90
4.3.6.1	Lipasen-Screening	90
4.3.6.2	Verwendung der Lipasen von C-LECTA als Biokatalysatoren.....	93
4.3.7	Variation der Acyldonoren	96
4.3.7.1	Vergleich der Acyldonoren unter Standard-Reaktionsbedingungen.....	97
4.3.7.2	Vergleich der Acyldonoren bei verringerter Temperatur	99
4.3.7.3	Parallel ablaufende chemische Acylierung von 1-Phenylethylamin (<i>rac-4</i>).....	100
4.3.8	Reaktionskinetiken der Racematspaltung von 1-Phenylethylamin (<i>rac-4</i>) mit unterschiedlichen Acyldonoren	102
4.3.9	Substratbreite.....	107
4.3.9.1	1-Aminoindan (<i>rac-130</i>)	107

4.3.9.2	Sekundäre Amine	112
4.3.10	ϵ -Caprolacton (3) als Acyldonor	116
4.3.10.1	Chemische Acylierung mit ϵ -Caprolacton (3)	116
4.3.10.2	Enzymatische Acylierung von Benzylamin (134) mit ϵ -Caprolacton (3)	118
4.3.10.3	Enzymatische Acylierung von 1-Phenylethylamin (<i>rac</i> - 4) mit ϵ -Caprolacton (3)	119
4.3.10.4	Enzymatische Acylierung von sekundären Aminen mit ϵ -Caprolacton (3)	123
5	Zusammenfassung	125
5.1	Enzymatische Oxidation von Cyclohexanol (1) mittels CHMO	125
5.2	Enzymatische Racematspaltung chiraler Amine	127
6	Summary	132
6.1	Enzymatic oxidation of cyclohexanol (1) by means of CHMO	132
6.2	Enzymatic resolution of chiral amines	134
7	Experimenteller Teil	139
7.1	Verwendete Chemikalien und Geräte	139
7.2	Synthesen, Methoden und spektroskopische Daten	142
7.2.1	Enzymatische Oxidation von Cyclohexanol (1) unter Einsatz von CHMO und LK-ADH	142
7.2.1.1	Standardreaktion: Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV 1): Enzymatische Oxidation von Cyclohexanol (1) zu ϵ -Caprolacton (3)	142
7.2.1.2	Analytik	143
7.2.1.2.1	Umsatzbestimmung mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie	143
7.2.1.2.2	Stabilität von Urotropin (51) als Standard	143
7.2.1.2.3	Bestimmung der Rückgewinnungsrate mittels NMR	143
7.2.1.3	Umsatzbestimmung mittels GC	144
7.2.1.3.1	Erstellen der Eichgerade	144
7.2.1.3.2	Bestimmung der Durchschnittsabweichungen	144
7.2.1.3.3	Bestimmung der Wiederfindungsrate mittels GC	145
7.2.1.3.4	Bestimmung der Wiederfindungsrate in Anwesenheit von Lk-ADH	146
7.2.1.3.5	Einfluss der Enzymellet-Bildung auf die Rückgewinnungsrate	146
7.2.1.3.6	Vergleich der Analytikmethoden: GC vs. NMR	147
7.2.1.4	Photometertests	148

7.2.1.4.1	Bestimmung der Enzymaktivität der Lk-ADH gegenüber 3,3,5-Trimethyl- cyclohexanol (53)	148
7.2.1.4.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV 2): Bestimmung der Enzymaktivität der CHMO.....	149
7.2.1.4.3	BVMO-Screening und BRADFORD-Test zur Oxidation von Cyclohexanol (2)	149
7.2.1.4.4	Aktivitätsbestimmung der CHMO gegenüber Isophoron (52)	150
7.2.1.5	Optimierung der Standard-Reaktion.....	150
7.2.1.5.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV 3): Doppeloxidation zu ϵ -Caprolacton (3) mit optimierter Aufarbeitung.....	150
7.2.1.5.2	Variation des Lösungsmittels	151
7.2.1.5.3	Variation der Reaktionsbedingungen.....	152
7.2.1.6	Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AAV 4): Untersuchung der Stabilität der Lk- ADH mittels Titrations-Apparatur	152
7.2.1.7	Variation des Substrates.....	153
7.2.1.7.1	3,5,5-Trimethylcyclohexanol (53) als Substrat.....	153
7.2.1.7.2	Isophoron (52) als Substrat.....	154
7.2.1.8	Verwendung von Adsorberharzen	155
7.2.1.8.1	Bestimmung der Rückgewinnungsrate in Anwesenheit von XAD-7 und XAD-1180	155
7.2.1.8.2	Doppeloxidation von Cyclohexanol (1) in Anwesenheit von XAD-7.....	155
7.2.2	Enantioselektive Racematspaltung von Aminen mittels Lipasen	157
7.2.2.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 (AAV 5): Synthese von Referenzverbindungen.....	157
7.2.2.1.1	Synthese des DL-Ethyl-3-oxo-3-(1-phenylethylamino)propanoats (<i>rac</i> - 10).....	157
7.2.2.1.2	Synthese des 2-Phenoxy- <i>N</i> -(1-phenylethyl)acetamids (<i>rac</i> - 121).....	158
7.2.2.1.3	Synthese des 2-Cyano- <i>N</i> -(1-phenylethyl)-acetamids (<i>rac</i> - 123).....	158
7.2.2.1.4	Synthese des <i>N</i> -(1-Phenylethyl)acetamids (<i>rac</i> - 7)	159
7.2.2.1.5	Synthese des 2-Phenyl- <i>N</i> -(1-phenylethyl)acetamids (<i>rac</i> - 126)	160
7.2.2.1.6	Synthese des 2-Methoxy- <i>N</i> -(1-phenylethyl)acetamids (<i>rac</i> - 8)	161
7.2.2.1.7	Synthese des Ethyl-3-((2,3-dihydro-1 <i>H</i> -inden-1-yl)amino)-3-oxo-propanoats (<i>rac</i> - 129)	161
7.2.2.2	Analytik	162
7.2.2.2.1	Validierung der Aufarbeitung von AAV 5 mittels NMR-Analytik.....	162

7.2.2.2.2	Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse durch chemische Acylierung des resultierenden Amins (<i>S</i>)- 4	163
7.2.2.3	Vorversuche zur enzymatischen Acylierung mit Benzylaminen als Substrate	164
7.2.2.3.1	Synthese von Ethyl-3-(benzylamino)-3-oxopropanoat (133).....	164
7.2.2.3.2	Analyse des Diamids <i>N,N'</i> -Dibenzylmalonamid (137).....	165
7.2.2.3.3	Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 (AAV 6): Enzymatische Acylierung substituierter Benzylamine	166
7.2.2.3.4	Enzymatische Synthese von Ethyl-3-(benzylamino)-3-oxopropanoat (133)	166
7.2.2.3.5	Enzymatische Synthese von <i>N</i> -(<i>m</i> -Hydroxybenzyl)- <i>N</i> -ethylmalonamid (141).....	166
7.2.2.3.6	Enzymatische Synthese von <i>N</i> -(<i>m</i> -Bromobenzyl)- <i>N</i> -ethylmalonamid (145)	167
7.2.2.3.7	Synthese von <i>N</i> -(<i>m</i> -Methoxybenzyl)- <i>N</i> -ethylmalonamid (143).....	168
7.2.2.3.8	Bestimmung des Verlusts von Benzylamin (134) und Malonsäurediethylester (9).....	168
7.2.2.3.9	Allgemeine Arbeitsvorschrift 7 (AAV 7): Kontrolle der chemischen Parallelreaktion der Acylierung verschiedener Benzylamine	169
7.2.2.3.10	Untersuchungen zur Diamidbildung ausgehend von 3-Methoxybenzylamin (139).....	170
7.2.2.3.11	Lösungsmittelleffekt der enzymatischen Acylierung substituierter Benzylamine.....	170
7.2.2.4	Enzymatischen Racematspaltung von 1-Phenylethylamin (<i>rac</i> - 4).....	171
7.2.2.4.1	Standardreaktion: Racematspaltung von 1-Phenylethylamin (<i>rac</i> - 4) mit Malonsäurediethylester (9).....	171
7.2.2.4.2	Prozessoptimierung der enzymatischen Racematspaltung von <i>rac</i> - 4	172
7.2.2.4.3	Untersuchung der Parallelreaktion der Acylierung von 1-Phenylethylamin (<i>rac</i> - 4)	173
7.2.2.4.4	Enzymatische Racematspaltung von 1-Phenylethylamin (<i>rac</i> - 4) bei geringerer Enzymbeladung	173
7.2.2.4.5	Enzymatische Racematspaltung von 1-Phenylethylamin (<i>rac</i> - 4) bei geringerer Enzymbeladung in Et ₂ O.....	174
7.2.2.5	Enzymrecycling.....	174
7.2.2.6	Lipasen-Screening durch Acylierung von Aminen	175
7.2.2.6.1	Lipasen-Screening durch Acylierung von Benzylamin (134)	175
7.2.2.6.2	Lipasen-Screening durch Acylierung von 3-Hydroxybenzylamin (138)	176
7.2.2.6.3	Lipasen-Screening durch Acylierung von 1-Phenylethylamin (<i>rac</i> - 4)	177

7.2.2.7	Enzymatische Racematspaltung von 1-Phenylethylamin (<i>rac-4</i>) mit alternativen Lipasen CAL-B von C-LECTA.....	178
7.2.2.7.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift 9 (AAV 9): Vergleich der Aktivität von Lipasen von C-LECTA mittels Titration mit NaOH.....	178
7.2.2.7.2	Bestimmung der Enzymaktivitäten der Lipasen von C-LECTA mittels enzymatischer Spaltung des Essigesters 5 bei 20 °C	178
7.2.2.7.3	Bestimmung der Enzymaktivitäten der Lipasen mittels enzymatischer Spaltung des Essigesters 5 bei 60 °C.....	179
7.2.2.7.4	Enzymatische Racematspaltung von <i>rac-4</i> mittels immobilisierter CAL-B von C-LECTA.....	180
7.2.2.7.5	Enzymatische Racematspaltung von <i>rac-4</i> mittels lyophilisierter CAL-B von C-LECTA.....	180
7.2.2.8	Variation der Acyldonoren	181
7.2.2.8.1	Enzymatische Racematspaltung von <i>rac-4</i> mit alternativen Acyldonoren.....	181
7.2.2.8.2	Parallel ablaufende chemische Acylierung von <i>rac-4</i> mit unterschiedlichen Acyldonoren	182
7.2.2.8.3	Kinetik der Racematspaltung von <i>rac-4</i> mit Malonsäurediethylester (9)	183
7.2.2.8.4	Kinetik der Racematspaltung von <i>rac-4</i> mit Phenoxyessigsäureethylester (122).....	184
7.2.2.8.5	Kinetik der Racematspaltung von <i>rac-4</i> mit Cyanessigsäureethylester (124).....	185
7.2.2.8.6	Kinetik der Racematspaltung von <i>rac-4</i> mit Methoxyessigsäureethylester (111).....	185
7.2.2.9	1-Aminoindan (<i>rac-130</i>) als Substrat	186
7.2.2.9.1	Analyse des Diamids <i>N</i> ¹ , <i>N</i> ³ -bis(2,3-dihydro-1H-inden-1-yl)malonamid (129)	186
7.2.2.9.2	Bestimmung des Verlusts von 1-Aminoindan (<i>rac-130</i>) während der Aufarbeitung	187
7.2.2.9.3	Temperatur- und Zeiteffekt der enzymatischen Racematspaltung von 1-Aminoindan (<i>rac-130</i>)	187
7.2.2.9.4	Parallel ablaufende chemische Acylierung von 1-Aminoindan (<i>rac-130</i>)	188
7.2.2.10	Sekundäre Amine als Substrate.....	189
7.2.2.10.1	Bestimmung des Verlusts der sekundären Amine 149 bzw. 150	189
7.2.2.10.2	Synthese von Ethyl-3-(2-methylpiperidin-1-yl)-3-oxopropanoat (<i>rac-151</i>)	189
7.2.2.10.3	Synthese von Ethyl-3-(3-methylpiperidin-1-yl)-3-oxopropanoat (<i>rac-152</i>)	190
7.2.2.10.4	Enzymatische Acylierung von 3-Methylpiperidin (<i>rac-150</i>)	190

7.2.2.10.5	Prozessoptimierung der enzymatischen Racematspaltung von 3-Methylpiperidin (<i>rac</i> - 150).....	191
7.2.2.10.6	Parallel ablaufende chemische Acylierung von <i>rac</i> - 150	191
7.2.2.11	Verwendung von ϵ -Caprolacton (3) als Acyldonor.....	192
7.2.2.11.1	Bestimmung der Stabilität von ϵ -Caprolacton (3) während der Reaktion und Aufarbeitung.....	192
7.2.2.11.2	Enzymatische Acylierung von Benzylamin (134) mit ϵ -Caprolacton (3).....	193
7.2.2.11.3	Variation der Reaktionsbedingungen der enzymatischen Acylierung von Benzylamin (134) mit ϵ -Caprolacton (3).....	193
7.2.2.11.4	Parallel ablaufende chemische Acylierung von Benzylamin (134) mit ϵ -Caprolacton (3).....	194
7.2.2.11.5	Synthese von 6-Hydroxy- <i>N</i> -(1-phenylethyl)hexanamid (157).....	195
7.2.2.11.6	Enzymatische Acylierung von 1-Phenylethylamin (<i>rac</i> - 4) mit ϵ -Caprolacton (3).....	195
7.2.2.11.7	Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Acylierung von 1-Phenylethylamin (<i>rac</i> - 4) mit ϵ -Caprolacton (3).....	196
7.2.2.11.8	Parallel ablaufende chemische Acylierung von <i>rac</i> - 4 mit ϵ -Caprolacton (3).....	197
7.2.2.11.9	Reaktionskinetik der Acylierung von 1-Phenylethylamin (<i>rac</i> - 4) mit ϵ -Caprolacton (3).....	197
7.2.2.11.10	Synthese von 6-Hydroxy-1-(3-methylpiperidin-1-yl)hexan-1-on (155).....	198
7.2.2.11.11	Enzymatische Acylierungen sekundärer Amine mit ϵ -Caprolacton (3).....	198
8	Literaturverzeichnis	201

II. Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
AD-H	HPLC-Säule, CHIRALPAK® Amolysetris-(3,5-dimethylphenylcarbamat)
Äq.	Äquivalent(e)
atm	Atmosphäre, Druckeinheit
BVMO	Baeyer-Villiger-Monooxygenase
br	breit
c	Umsatz (<i>conversion</i>)
CAL-A	Lipase A aus <i>Candida antarctica</i>
CAL-B	Lipase B aus <i>Candida antarctica</i> , Novozym 435
CH	Cyclohexan
CHMO	Cyclohexan-Monooxygenase
δ	chemische Verschiebung in [ppm]
d	Dublett
d	Küvettdicke in [cm]
DBU	Deutsche Bundesstiftung Umwelt
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	dupliziertes Dublett
dest.	destilliert
DKR	dynamisch-kinetische Racematspaltung
ε	Extinktionskoeffizient für NAD(P)H in [mL · μmol ⁻¹ · cm ⁻¹]
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EA	Elementaranalyse
EC	Einteilung der Enzyme in Klassen (<i>enzyme commission</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ee	Enantiomerenüberschuss (<i>enantiomeric excess</i>)
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EtOAc	Essigester
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i>)
Et ₂ O	Diethylether
f	Probenverdünnungsfaktor

FDA	US-Arztmittelbehörde (<i>US Food and Drug Administration</i>)
FMN	Flavinmononukleotid
GC	Gaschromatographie
GDH	Glucosedehydrogenase
ges.	gesättigt
h	Stunde(n)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
Hz	Hertz
<i>i</i> -PrOH	<i>iso</i> -Propanol
IR	Infrarot
i.Vak.	im Vakuum
<i>J</i>	skalare Kopplungskonstante in [Hz]
kDa	Kilodalton
K_M	MICHAELIS-Konstante in [mol/l]
KP_i	Kaliumphosphatpuffer
Lb-ADH	Alkohol-Dehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i>
Lk-ADH	Alkohol-Dehydrogenase aus <i>Lactobacillus kefir</i>
M	molar, Stoffmengenkonzentration in [mol/l]
m	Multipllett
<i>m</i> -CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure (<i>meta-chloroperoxybenzoic acid</i>)
Me	Methyl
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar, Stoffmengenkonzentration in [mmol/l]
mmol	Millimol
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Verhältnis Masse zu Ladung
μ L	Mikroliter
NADH, NAD ⁺	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH, NADP ⁺	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
n.b.	nicht bestimmt
NEt ₃	Triethylamin
nm	Nanometer
NMR	Kernmagnetische Resonanz (<i>Nuclear magnetic resonance</i>)
org.	organisch

PAMO	Phenylaceton-Monooxygenase
PBA	Peroxybenzoesäure (<i>peroxybenzoic acid</i>)
PCL	Poly- ϵ -caprolacton
PMP	<i>para</i> -Methoxyphenyl-Schutzgruppe
ppm	Teile pro Million (<i>parts per million</i>)
<i>prim</i>	primär
q	Quartett
qui	Quintett
R	Substituent
<i>rac</i>	Racemat
rel.	relativ
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Sdp.	Siedepunkt
<i>sec</i>	sekundär
Smp.	Schmelzpunkt
spez.	spezifisch
T	Temperatur in [°C]
t	Triplett
t	Zeit
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
td	Triplett eines Dubletts
<i>tert</i>	Tertiär
THF	Tetrahydrofuran
t_R	Retentionszeit
TMS	Tetramethylsilan
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminmethan
U	Units in [$\mu\text{mol min}^{-1}$]
U/mg	Aktivität
U/mL	volumetrische Aktivität
UV/Vis	Ultraviolett/sichtbar (<i>ultraviolet/visible</i>)
v	Volumen
v	Umrechnungsfaktor
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl in [cm^{-1}]
v_{max}	Maximalgeschwindigkeit
wässr.	wässrig

*„ Science, my lad, is made up of mistakes,
but they are mistakes which it is useful to make, because they lead little by little to the truth. ”*

JULES VERNE,
A Journey to the Center of the Earth

1 Einleitung

Die Biotechnologie hat sich zu einer der Schlüssel- und Zukunftstechnologien entwickelt. Die Bezeichnung „weiße Biotechnologie“ grenzt die industrielle Biotechnologie von der „grünen“ und der „roten“ Biotechnologie ab, die sich mit Pflanzen und Lebensmittel befassen, jedoch gibt es mit beiden Bereichen Überschneidungen.^[1] Die weiße Biotechnologie setzt dabei biotechnologische Methoden für industrielle Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen und chemischen Produkten wie Aminosäuren, Vitaminen, Antibiotika, Enzymen, Medikamenten und Polymeren ein. Bereits heute beträgt der Anteil von Produkten und Verfahren, die Biotechnologie nutzen, in der chemischen Industrie etwa 5%. Ein Anstieg auf 10 – 20% bis zum Jahr 2025 wird erwartet.^[2] Etwa 80% der Wirkstoffe in der Produktpipeline der Pharmafirmen sind chiral und ein weiterer Anstieg ist sicher. Seit 1992 wird durch Regularien der *US Food and Drug Administration* (FDA) und des *European Committee for Proprietary Medicinal Products* vorgeschrieben, dass die physiologische Wirkung jedes Enantiomers eines Pharmawirkstoffs einzeln untersucht werden muss.^[4]

Die hervorragenden katalytischen Fähigkeiten von Enzymen zeigen sich in ihrer Vielfalt und Komplexität. Ein Grund für das große Potential von Biokatalysatoren liegt auch darin, dass die unendliche Vielfalt der Natur erst ansatzweise entziffert ist. Mitte des Jahres 2015 sind 6759 verschiedene Enzyme identifiziert und beschrieben worden, wobei etwa 25000 unterschiedliche Enzyme in der Natur vermutet werden.^[5,6] Durch chemische Modifizierungen, zufällige Mutationen und *Protein Engineering* wird eine große Anzahl an modifizierten Enzymen auch für die industrielle Anwendung zur Verfügung stehen. Zu den etablierten Anwendungsfeldern von Enzymen im Bereich der weißen Biotechnologie zählen vor allem die Agro-, Lebensmittel-, Waschmittel- und Textilchemie sowie die chemische und pharmazeutische Industrie. Von den schon bekannten Enzymen werden derzeit gerade einmal etwa 130 industriell genutzt. Die Unterteilung von Enzymen erfolgt in sechs Klassen (EC, *enzyme commission*) in Abhängigkeit von ihren Katalyse-Eigenschaften in der Natur (Tabelle 1).^[7]

Tabelle 1. Unterteilung der Enzyme in EC-Klassen.^[7,8]

Enzymklasse	EC	Funktion in Mikroorganismen
Oxidoreduktasen	1	Reduktion bzw. Oxidation
Transferasen	2	Transfer von Aldehyd-, Keton-, Acyl-, Zucker-, Phosphoryl- oder Methylgruppen
Hydrolasen	3	Spaltung oder Bildung von Estern, Amiden, Lactonen, Lactamen, Epoxiden, Nitrilen, Anhydriden, Glycosiden
Lyasen	4	Addition/Eliminierung von kleinen Molekülen
Isomerasen	5	Isomerisierung, z.B. Racemisierung, Epimerisierung
Ligasen	6	Bildung von C-C-, C-O-, C-S-, C-N-Bindungen

Enzyme lassen sich allerdings für weit mehr Reaktionen als Katalysator einsetzen als von der Natur vorgesehen ist. Beim Vergleich von chemischen mit enzymatischen Reaktionen sind viele Vorteile der Enzymkatalyse zu erkennen. Typischerweise verlaufen enzymkatalysierte Reaktionen um einen Faktor 10^8 bis 10^{12} mal schneller verglichen mit den nicht-katalysierten Reaktionen^[8,9] und bis zu 10^7 mal schneller als chemisch katalysierte Reaktionen unter physiologischen Bedingungen.^[10]

Enzymatische Umsetzungen können meist bei moderaten Bedingungen durchgeführt werden, während chemische Reaktionen häufig Erhitzen zum Rückfluss oder aber Herunterkühlen auf niedrige Temperaturen erfordern. Metallkatalysatoren, die beispielsweise Platin oder Palladium enthalten, sind oft teuer und aufwendig in der Herstellung. Im Gegensatz dazu sind viele Mikroorganismen im großen Maßstab kultivierbar und für zahlreiche Enzyme stehen etablierte Expressionssysteme zur Verfügung, sodass Biokatalysatoren leicht und relativ günstig in großem Umfang erhalten werden können. Ausgehend von einem prochiralen kann ein chirales Zentrum erzeugt werden. Auch kann durch die hohe Chemo- und Regioselektivität der meisten Enzyme auf aufwändiges Schützen und Entschützen von ähnlichen funktionellen Gruppen innerhalb eines Moleküls verzichtet werden.^[6,11]

Zu den Nachteilen der Enzyme zählen die oft mäßige Stereoselektivität, die limitierte Substratbreite und die relativ geringe Stabilität, da sie in ihrer Aktivität an sehr enge Milieubedingungen gebunden und schnell denaturierbar sind, z.B. durch extreme pH-Werte oder Temperaturen.^[12] Dabei gibt es in Hinblick auf die Stabilität auch Unterschiede innerhalb der Biokatalysatoren. So können manche Enzyme lyophilisiert oder in Glycerin-Lösungen ebenso wie immobilisiert auf Trägermaterialien durchaus lange Lagerzeiten ohne größeren Aktivitätsverlust überstehen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, das immobilisierte Enzym nach der Reaktion abzutrennen und es einer weiteren Umsetzung zuzuführen. Auch wird dadurch die Verwendung von organischen Lösungsmitteln als Reaktionsmedium ermöglicht.^[13]

Als ein limitierender Faktor galt lange die geringe Verfügbarkeit von Enzymen in benutzerfreundlicher Form. Durch heterogene Genexpression fremder Gene in nicht-pathogenen und gut charakterisierten Organismen wie *Escherichia coli* (*E. coli*) oder der Bäckerhefe (*Sachharomyces cerevisiae*) kann diese Limitierung überwunden werden. Die Hauptvorteile einer rekombinanten Expression gegenüber der Nutzung eines Wildtyp-Enzyms sind, dass ein höheres Expressionsniveau erreicht werden kann und die Wahrscheinlichkeit der katabolen Verstoffwechslung des gebildeten Produkts eher gering ist.

Biotransformationen lassen sich in isolierten Enzymen und in ganzen Zellen durchführen und beide Biokatalysator-Formen haben ihre Vor- und Nachteile. Bei der Verwendung von Ganzzell-Katalysatoren entfallen die Isolation der Enzyme sowie die Verwendung eines zusätzlichen Cofaktor-Regenerationsystems. Zu den Nachteilen zählen die niedrige Aktivität und der Umgang mit Pathogenen. Außerdem sind diese Zell-Systeme auf Substrate beschränkt, die zum einen die Zellmembran des Mikroorganismus passieren können, zum anderen sollten im Fall einer Fermentation weder Substrat noch Produkt toxisch für den Organismus sein oder von diesem auf anderem Wege umgesetzt werden.^[11,14] Andererseits treten bei isolierten Enzymen, im Gegensatz zu Ganzzell-Katalysatoren, keine Massentransfer-Limitierungen und keine mögliche Nebenproduktbildung durch Übermetabolisierung des Produktes auf.^[15,16] Weitere Vorteile sind die einfachere Aufarbeitung und es kann mit höheren Substratkonzentrationen gearbeitet werden.

2 Motivation und Zielsetzung

Lactone dienen in der Industrie als wichtige Precursor für die Herstellung von unterschiedlichen großtechnischen Produkten.^[17] Ausgehend von Cyclohexanol (**1**) soll in dieser Arbeit über die Zwischenstufe Cyclohexanon (**2**) die Synthese von ϵ -Caprolacton (**3**) mittels enzymkatalysierter Oxidation erfolgen. Für die Darstellung des Lactons **3** wird zum einen eine Alkoholdehydrogenase (ADH) und zum anderen eine Cyclohexanon-Monooxygenase (CHMO) als Biokatalysator in einem Eintopf-Prozess eingesetzt (Abbildung 1).

Die Synthese enantiomerenreiner Amine ist ein wichtiger Bestandteil bei der Entwicklung und Herstellung neuartiger Arzneimittel sowie bei der Optimierung der Synthesewege bekannter pharmazeutischer Wirkstoffe.^[18] Für die Darstellung von (*S*)-Aminen mit hohen Enantiomerenüberschüssen soll im Rahmen dieser Arbeit die kinetische Racematspaltung von racemischen Aminen mit Hilfe von Lipasen als Biokatalysatoren untersucht werden. In Abbildung 1 sind die untersuchten Enzymreaktionen aufgezeigt.

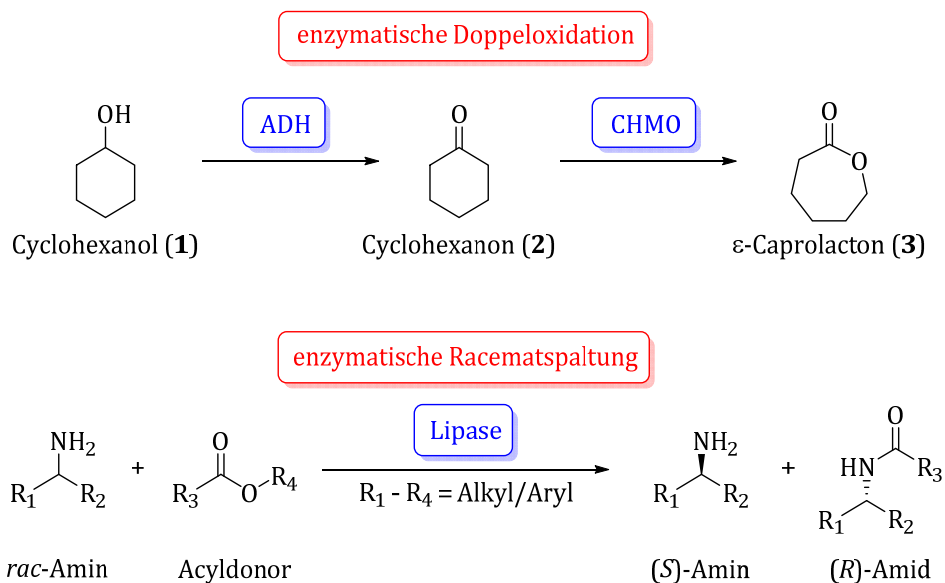


Abbildung 1. Biokatalytische Reaktionen: Doppeloxidation von Cyclohexanol (**1**) zu ϵ -Caprolacton (**3**) und Racematspaltung von Aminen.

2.1 Enzymkatalysierte Oxidation von Cyclohexanol (**1**)

Lactone sind cyclische Ester, von denen ϵ -Caprolacton (**3**) das bekannteste und das größte kommerziell erhältliche ist. Lactone mit kleinerer Ringgröße wie β -Propio-, γ -Butyro- und δ -Valerolacton dienen als Bausteine für Polyester für unterschiedliche Anwendungen.^[19] 2003 lag die weltweite Produktion von

ϵ -Caprolacton (**3**) bei 40.000 - 60.000 t/a.^[20] Etwa 50% des produzierten Lactons **3** wird durch Ringöffnungspolymerisation zu Polycaprolacton (PCL) verarbeitet, einem aliphatischen Polyester, der bioresorbierbar und nicht toxisch für Organismen ist.^[17] PCL ist unter physiologischen Bedingungen biologisch leicht abbaubar und findet große Verwendung als Biomaterial-Implantat oder als Matrix für Drug-Delivery-Systeme und in der Therapie für Knochenregeneration.^[17,21] Weitere Anwendung findet ϵ -Caprolacton **3** als Precursor für die Caprolactam-Synthese, welches für die Nylon-6-Produktion benötigt wird, sowie in der Synthese von Urethan-Beschichtungen, Elastomeren, Lösungsmittel-Verdünnern und Fasern.^[22]

Industriell wird Caprolacton (**3**) im sogenannten UCC-Prozess (*Union Carbide Corporation*) durch Oxidation von Cyclohexanon (**2**) mit Peressigsäure bei 50 °C und Atmosphärendruck hergestellt. Die üblichen Selektivitäten liegen bei 90% bezogen auf Cyclohexanon (**2**) und 85-90% bezüglich Peressigsäure.^[23] Die industrielle Synthese weist einige ökonomische und auch ökologische Nachteile auf. Durch die Vielzahl der benötigten Synthese- und Aufreinigungsschritte ist die Abfallproduktion bei den industriellen Prozessen enorm hoch. Zudem benötigt die Reaktionsführung hohe Temperaturen sowie Trägergase. Erst zu Beginn des Jahres 2014 hat BASF die Preise von Caprolactam und Adipinsäure aufgrund gestiegener Rohstoffpreise erhöht.^[24]

Ausgehend von den einleitenden Arbeiten von WILLETS und STAUDT ist das Hauptziel dieser Arbeit die Wegbereitung zur Vergrößerung des Reaktionsmaßstabes der Oxidation von Cyclohexanol (**1**) über die Zwischenstufe Cyclohexanon (**2**) zum Produkt ϵ -Caprolacton (**3**) mit elementarem Sauerstoff als alleiniges Oxidationsmittel in einem Eintopf-Prozess (Abbildung 2).^[25,26] Dabei soll das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf dem Solvenz-Engineering zur Vermeidung der Produktinhibierung liegen.

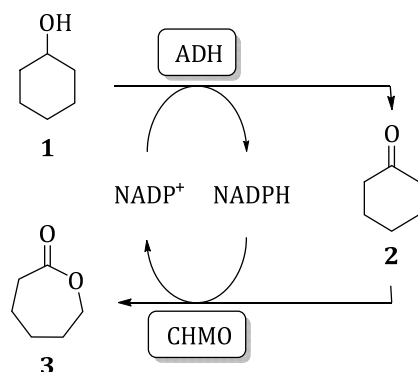


Abbildung 2. Enzymatische Doppeloxidation von Cyclohexanol (**1**) zu ϵ -Caprolacton (**3**) unter Einsatz von Lk-ADH und CHMO.^[26]

Die Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* (Lk-ADH) und die CHMO aus *Acinetobacter calcoaceticus* (ECS Mo-1) wurden in der Literatur als effektivste Biokatalysatoren beschrieben und dementsprechend in dieser Arbeit eingesetzt.^[25,26] Als einziges Abfallprodukt dieser Oxidationsreaktion wird Wasser erhalten.

An erster Stelle steht in dieser Arbeit die Etablierung einer stabilen Analytik mittels Gaschromatographie, um für die anschließenden enzymatischen Reaktionen die Umsätze mit möglichst geringer Schwankungsbreite zu bestimmen. Des Weiteren sollen die optimalen Bedingungen für die Biokatalyse

entwickelt werden. Ziel ist die Entwicklung eines effizienten Verfahrens durch Variation von Reaktionszeit, Temperatur und Wahl des Lösungsmittels. Auch die Verwendung von Adsorberharzen soll zur *in situ*-Produktentfernung untersucht werden. Die zu optimierenden Parameter der Standard-Reaktion des Cyclohexanols (**1**) zum Lacton **3** sind in Abbildung 3 dargestellt.

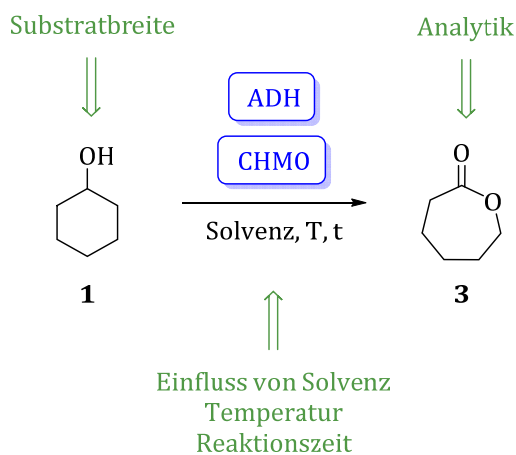


Abbildung 3. Untersuchung der enzymatischen Doppeloxidation.

2.2 Enantioselektive Racematspaltung von Aminen

Enantiomerenreine Amine sind wichtige Bausteine für eine große Anzahl an Arzneimittel, Agro- und anderen Spezialchemikalien. Untersuchungen zeigten, dass etwa 40 – 50% der pharmazeutischen Wirkstoffe chirale Amine enthalten.^[18] In der Literatur ist die kinetische Racematspaltung von racemischen aliphatischen und aromatischen Aminen mittels Lipasen in vielfältiger Ausführung beschrieben. Die Lipase B aus *Candida antarctica* (CAL-B) wurde dabei als effektivstes Enzym beschrieben und in dieser Arbeit verwendet.^[27–29] Das am häufigsten verwendete racemische Amin zur Racematspaltung ist das Modells substrat 1-Phenylethylamin (*rac*-**4**), welches mit Acyldonoren wie Essigsäureethylester (**5**) oder Methoxyessigsäurepropylester (**6**) in organischen Lösungsmitteln umgesetzt wurde (Abbildung 4).^[30,31] Zwar können die erhaltenen (*R*)-Amide, (*R*)-**7** und (*R*)-**8**, und das resultierende (*S*)-Amin (*S*)-**4** mit sehr hohen Enantiomerenüberschüssen erzielt werden, jedoch liegen die Reaktionszeiten bei bis zu 60 Stunden. Die Reaktionsgeschwindigkeit dieser Acylierungen kann erhöht werden, wenn Acyldonoren wie **6** eingesetzt werden, die in β -Position ein Heteroatom tragen. Dabei werden die besten Ergebnisse in Bezug auf Reaktionsgeschwindigkeit und Enantioselektivität mit Sauerstoff als Heteroatom erhalten.^[31]

Industriell findet die kinetische Racematspaltung von Aminen bereits Anwendung. Ein Verfahren zur Acylierung von Aminen wurde von BASF SE patentiert.^[32] Seit 2002 wird die enzymatische Racematspaltung von Aminen im Maßstab von >3500 t/a produziert.^[4]

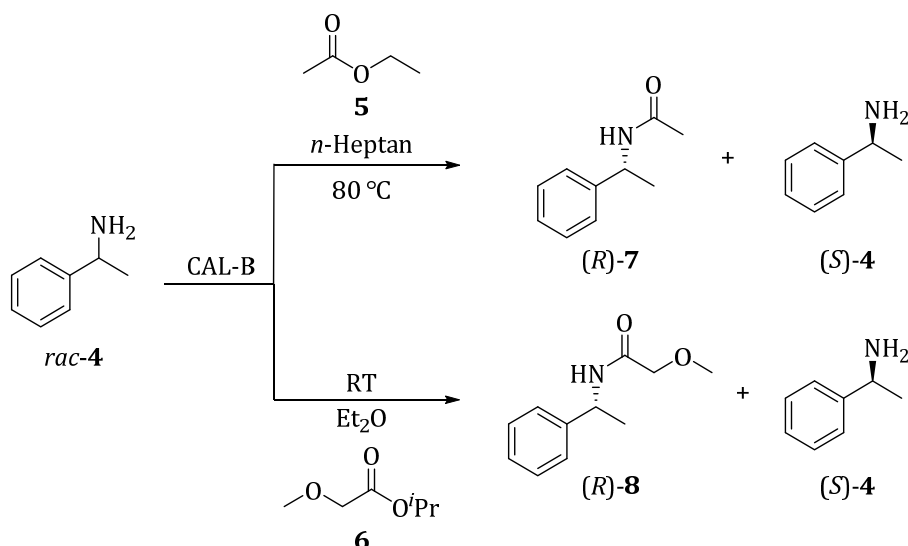


Abbildung 4. Enzymatische Racematspaltung von *rac*-4 mit bekannten Acyldonoren unter Einsatz von CAL-B.^[30,31]

In Vorarbeiten von SIMON hat sich das Malonsäurediethylester (**9**) als effizientester Acyldonor dargestellt.^[33,34] Dabei konnte das Amid (*R*)-**10** unter den gewählten Standard-Reaktionsbedingungen von 80 °C Reaktionstemperatur nach nur 4.5 Stunden mit vollständigem Umsatz nahezu enantiomerenrein erhalten werden (Abbildung 5).

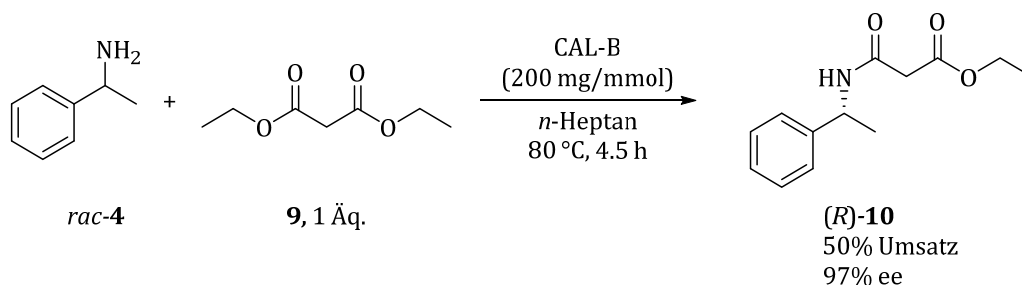


Abbildung 5. Benchmark-Experiment zur enzymatischen Racematspaltung von *rac*-4 mit Malonsäurediethylester (**9**).^[33,34]

Einleitende Versuche von UTHOFF zeigten, dass die Racematspaltung von *rac*-4 mit Malonsäurediethylester (**9**) auch unter lösungsmittelfreien Bedingungen sehr gute Umsätze und Enantiomerenüberschüsse bei niedrigeren Reaktionstemperaturen liefert.^[35] Im Rahmen dieser Arbeit soll die Racematspaltung mit Malonsäurediethylester (**9**) als Acyldonor unter lösungsmittelfreien Bedingungen weiter etabliert werden. Durch die Variation von wichtigen Parametern, unter anderem von Reaktionszeit, Temperatur, Enzymbeladung sowie Substratkonzentration, ist das Ziel dieser Arbeit die Optimierung der enzymkatalysierten kinetischen Racematspaltung hinsichtlich hoher Umsätze und Enantioselektivitäten. Da sich die CAL-B durch eine Akzeptanz eines breiten Substratspektrums auszeichnet^[4], werden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Amine getestet. Zusätzlich soll der Acyldonor variiert werden. Außerdem sollte der Prozess eine hohe Selektivität und Reaktionsgeschwindigkeit sowie möglichst quantitative Umsätze aufweisen. Die Verwendung eines lösungsmittelfreien Reaktionssystems ist ein großer Schritt hinsichtlich der „grünen“ Chemie, da das organische Lösungsmittel einen

großen Teil der Abfallmenge einer kinetischen enzymatischen Racematspaltung ausmacht.^[36] Die meisten organischen Medien haben verschiedene Nachteile, unter anderem die Toxizität für die Umwelt sowie potentielle Explosionsgefahr aufgrund ihrer Flüchtigkeit und Entflammbarkeit.^[37] In der Literatur wurde von einer verringerten Reaktionszeit der Racematspaltung in Abwesenheit von Lösungsmittel berichtet, was aus ökonomischer Hinsicht vorteilhaft ist.^[36] Die zu optimierenden Parameter der kinetischen Racematspaltung werden in Abbildung 6 am Beispiel der Racematspaltung des Amins *rac*-4 mit Malonester 9 als Standard-Acyldonor zum entsprechenden Amid (*R*)-10 dargestellt.

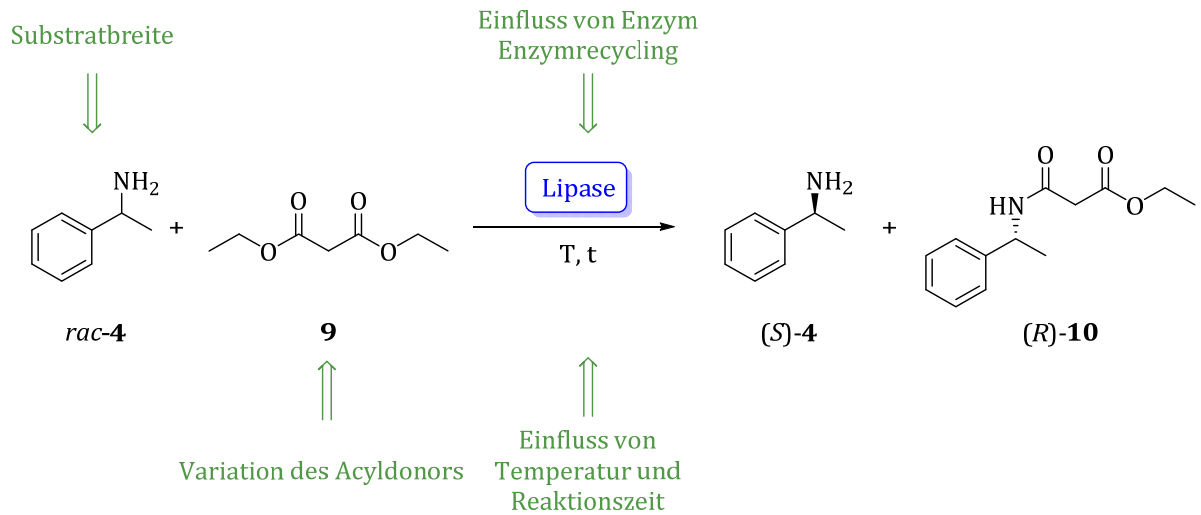


Abbildung 6. Untersuchung der enzymatischen Racematspaltung.

3 Enzymatische Oxidation mittels Monooxygenasen

3.1 Chemische BAEYER-VILLIGER-Oxidation

3.1.1 Klassische BAEYER-VILLIGER-Oxidation

VON BAEYER und VILLIGER berichteten im Jahre 1899 mit der Ringöffnung „von Ketonen in der Terpen-Gruppe“.^[38] Dabei wurden sie auf Beobachtungen von CARO aufmerksam, der ein Jahr zuvor die Oxidation von Anilin zu Nitrosoamin mit dem stärksten zu der Zeit bekannten Oxidationsmittel, H_2SO_5 , durchführte, welches er aus konzentrierter Schwefelsäure und Kalimpersulfat herstellte (Abbildung 7).^[39]

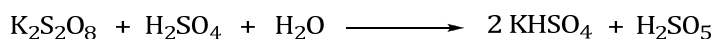


Abbildung 7. Synthese des CARO'schen Reagenz (H_2SO_5).^[39]

Dieses Oxidationsmittel wandten VON BAEYER und VILLIGER auf die Terpen-Derivate an und „fanden, dass das CARO'sche Reagenz ein ebenso spezifisch auf Ketone wirkendes Mittel ist, welches gestattet, eine Reihe von bisher unausführbaren Aufgaben spielend leicht zu lösen“.^[38] So konnten sie unter anderem Menthon, Tetrahydrocarvon und Campher in die entsprechenden ϵ -Caprolactone überführen (Abbildung 8).

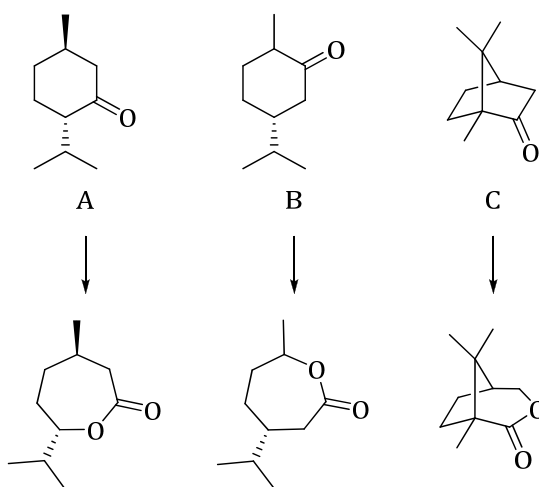


Abbildung 8. BAEYER-VILLIGER-Oxidation von Menthon (A), Tetrahydrocarvon (B) und Campher (C) mit dem CARO'schen Reagenz.^[38,40]

Sie schlussfolgerten, dass das hypothetisch gebildete Oxidationsprodukt „Syperoxid“, ähnlich einer BECKMANN-Umlagerung von Oximen, zu den Lactonen umgewandelt wird.^[38] In ihrer Studie zur Oxidation von 13- bis 17-gliedrigen ringförmigen Ketonen mit dem CARO'schen Reagenz untersuchten RUZICKA und STOLL im Jahre 1928 erstmals den Einfluss von Temperatur und Lösungsmittel.^[41] Die besten Ergebnisse erhielten sie bei Temperaturen von 50 – 65 °C in Eisessig. Die Bildung von Oligomeren als Nebenprodukte konnte bei niedrigen Temperaturen vermieden werden.

Die ersten Vorschläge zum Ablauf der Reaktion reichten von dem von VON BAEYER und VILLIGER vorgeschlagenen Dioxiran-Mechanismus^[38] über die Bildung eines Peroxid-Dimers als Nebenprodukt^[42] bis zum WITTIG-Mechanismus^[43] mit der formalen Übertragung eines OH⁺-Teilchens von einer Persäure **11** zum Carbonylsauerstoff des Ketons **12**. Einen weiteren Ansatz lieferte CRIEGEE 1948, als er einen nucleophilen Angriff der Persäure **11** auf die Keto-Funktion postulierte, wodurch das sogenannte CRIEGEE-Intermediat **13** gebildet wird.^[44] Im Jahre 1953 schließlich konnten DOERING und DORFMAN durch Isotopenmarkierungsexperimente die Theorie von CRIEGEE bestätigen, indem sie ¹⁸O-markiertes Benzophenon (**12**) einer Oxidation mit Persäure **11** aussetzten und dadurch die Position des markierten Sauerstoffatoms im Produkt **14** bestimmen konnten (Abbildung 9).^[45]

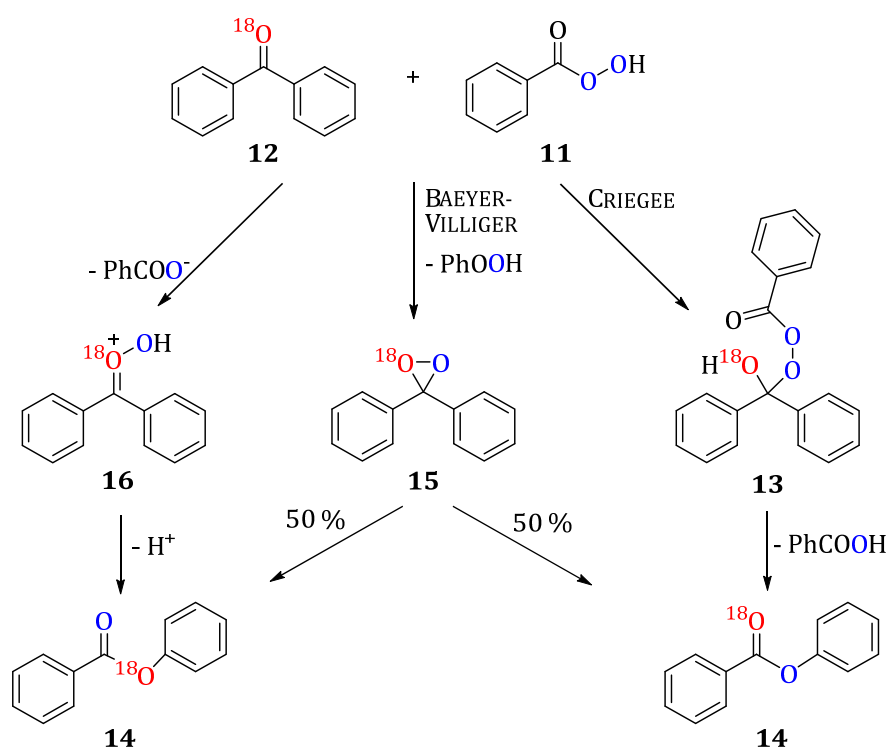


Abbildung 9. Isotopenmarkierungsexperimente zur Aufklärung des Mechanismus der BAEYER-VILLIGER-Oxidation.^[40] Dargestellt sind die nach den oben vorgeschlagenen Mechanismen zu erwartenden Reaktionsprodukte.

Im Fall der Dioxiran-Bildung (**15**) nach VON BAEYER und VILLIGER wurde eine statistische 50:50-Verteilung erwartet.^[40] Sollte die Reaktion über das CRIEGEE-Intermediat (**13**) laufen, so müsste das markierte Sauerstoffatom Teil der Keto-Funktion sein. Tatsächlich enthielt die Carbonylfunktion zu 93% ¹⁸O-Sauerstoff. Das Produkt der säurekatalysierten Addition einer Persäure an eine Carbonylfunktion wird allgemein als CRIEGEE-Intermediat bezeichnet. Diese Addition kann hierbei sowohl Säuren- als auch

Basen-katalysiert ablaufen. Die Säure-Einheit fungiert dabei nach dem nucleophilen Angriff als Abgangsgruppe, während die Carbonylfunktion wieder hergestellt wird und ein Rest (R_M) vom Carbonyl-Kohlenstoff zum positiv polarisierten Sauerstoff wandert, wodurch der Ester erhalten wird (Abbildung 10). Als klassische organische Persäuren dienen unter anderem *m*-Chlorbenzoesäure (*m*-CPBA), Trifluorperessigsäure sowie Peroxybenzoesäure (PBA).

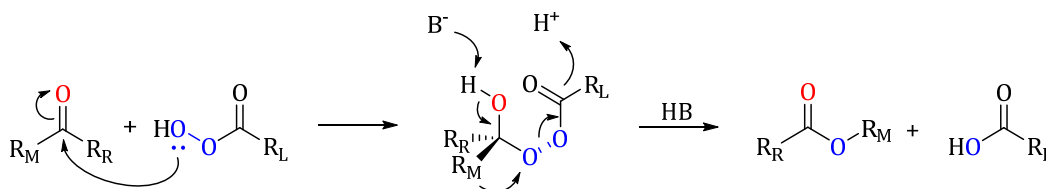


Abbildung 10. Reaktionsmechanismus der BAEYER-VILLIGER-Oxidation mit einer Persäure (R_M = wandernder Rest, R_R = verbleibender Rest, R_L = Abgangsgruppe).^[46]

Im Fall der Oxidation eines asymmetrischen Ketons wandert am wahrscheinlichsten diejenige Gruppe, die die partielle positive Ladung am besten stabilisieren kann.^[40] So kann die Wanderungstendenz im allgemeinen wie folgt definiert werden: *tert*-Alkyl > Cyclohexyl > *sec*-Alkyl > Benzyl > Phenyl > *prim*-Alkyl > Cyclopentyl, Cyclopropyl > Methyl.^[46] Sind die beiden Reste gleich oder ähnlich, dann wird ein Gemisch aus beiden möglichen Estern erhalten. Sterische Ansprüche der Reste sowie die Art der verwendeten Persäure spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle. Demnach muss im CRIEGEE-Intermediat ein nicht-bindendes freies Elektronenpaar des Sauerstoffatoms sowie die O-O-Bindung antiperiplanar zum wandernden Rest R_M stehen (Abbildung 11).^[47]

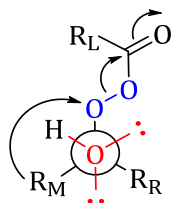


Abbildung 11. Antiperiplanare Anordnung des wandernden Restes im CRIEGEE-Intermediat (R_M = wandernder Rest, R_R = verbleibender Rest, R_L = Abgangsgruppe).^[47]

TURNER beobachtete bereits 1950 am Beispiel der Oxidation von sowohl *cis*- als auch *trans*-1-Acetyl-2-Methylcyclohexan (**17**), dass dabei nur das jeweilige *cis*- bzw. *trans*-Produkt (**18**) gebildet wird (Abbildung 12).^[48]

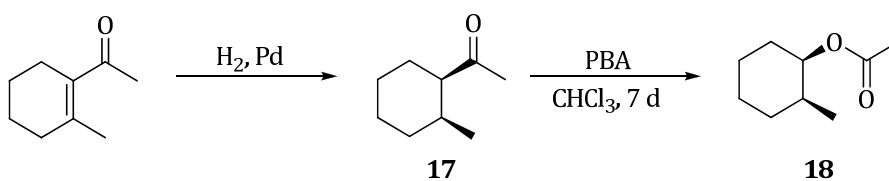


Abbildung 12. Erster Beweis der Erhaltung der Konfiguration des wandernden Restes während der BAEYER-VILLIGER-Oxidation.^[48]

BERSON und SUZUKI schlugen 1959 vor, dass die Wanderung des Restes und die Carboxylatabspaltung konzertiert ablaufen und nannten dieses als Grund für die Stereoselektivität der Reaktion.^[49] Die Beobachtungen zur Stereoselektivität der BAEYER-VILLIGER-Oxidation wurden von MISLOW und BRENNER bestätigt, indem sie das optisch aktive 3-Phenyl-2-butanon (**20**) oxidierten und dabei eine Retention von 98% erhielten (Abbildung 13).^[50] Die Retention der Stereoinformation macht die BAEYER-VILLIGER-Oxidation zu einem wichtigen Werkzeug für die asymmetrische organische Synthese.

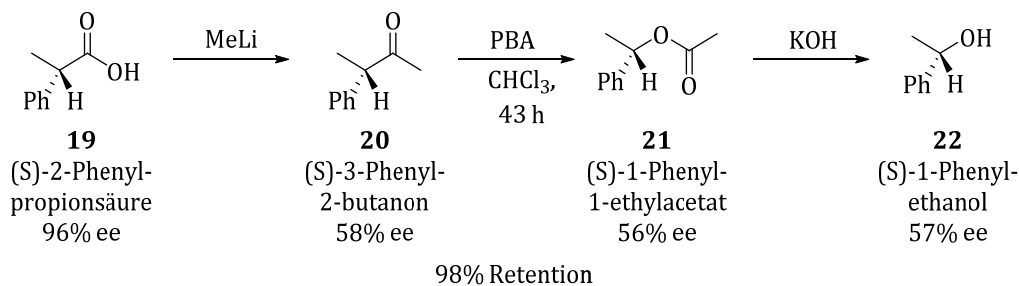


Abbildung 13. Reaktionssequenz zur Bestätigung des Erhalts der Retention des wandernden Kohlenstoffatoms des optisch aktiven Ketons **20**.^[50]

3.1.2 Stand der Wissenschaft: klassische BAEYER-VILLIGER-Oxidation

Obwohl mehr als ein Jahrhundert seit Entdeckung der BAEYER-VILLIGER-Oxidation vergangen ist, ist ein Ende der Entwicklung der Reaktion noch nicht abzusehen. In der Industrie findet die Synthese von ϵ -Caprolacton (**3**) großtechnische Anwendung. Dabei spielten in den letzten Jahrzehnten neben der Optimierung der Reaktionsbedingungen auch Umweltaspekte eine immer wichtigere Rolle.

Im Allgemeinen werden die bisher verwendeten Persäuren *in situ* aus den entsprechenden Säuren und Wasserstoffperoxid (H₂O₂, 90%) hergestellt, welches jedoch wegen der hohen Explosionsgefahr aus dem Handel genommen wurde.^[51,52] Das heute erhältliche 70%ige H₂O₂ liefert jedoch nur Persäuren mit geringerer Konzentration. Die Verwendung von Persäuren erfordert den Einsatz geeigneter Katalysatoren. Katalytische Verfahren haben gegenüber den bisher angewendeten stöchiometrischen Reaktionen mehrere Vorteile, wie die Vereinfachung der Reaktionsbedingungen und den Einsatz von kostengünstigeren Reagenzien sowie Verringerung der Abfallmenge. Allerdings fällt als Nebenprodukt Wasser an, was zur Hydrolyse der entstandenen Ester führen kann. Verwendete Katalysatoren enthalten unter anderem Komplexe der Übergangsmetalle Mo(VI)^[53], Re(V)^[54–56], Pt(II)^[57], Ni(II)^[51,52], Se^[58] sowie Ti-Silicate^[59,60]. Ein Beispiel für eine metallkatalysierte BAEYER-VILLIGER-Oxidation ist in Abbildung 14 dargestellt.

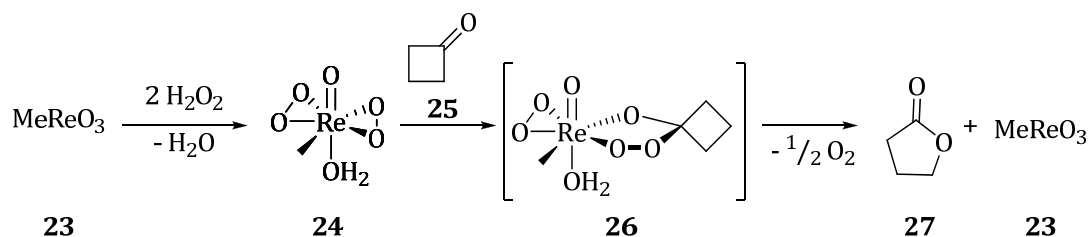


Abbildung 14. Vorgeschlagener Mechanismus der BAEYER-VILLIGER-Oxidation durch einen Re-Katalysator (**23**) am Beispiel von Cyclobutanon (**25**).^[56]

Anstelle von Wasserstoffperoxid wird seit 1991 auch elementarer Sauerstoff in Kombination mit Benzaldehyd als Oxidationsmittel eingesetzt, welches als MUKAIYAMA-System bezeichnet wird und das Keton selbst aktiviert.^[61] Die Oxidation kann bei Raumtemperatur durch die Übergangsmetalle Ni(II)^[62,63], Cu(II)^[63,64] oder Fe₂O₃^[65] katalysiert werden. Allerdings ist der Einsatz solcher Katalysatoren vorwiegend auf die Oxidation von cyclischen Ketonen beschränkt und liefern teilweise nur geringe bis mäßige Stoffumsätze, was zum Teil durch Inaktivierung des Katalysators durch den zur entsprechenden Säure hydrolysierten Ester zurückzuführen ist. 1993 wurde von BOLM und KANEDA gezeigt, dass die BAEYER-VILLIGER-Oxidation mit diesem System selbst in Abwesenheit eines Katalysators noch mit guten Umsätzen verläuft, wobei jedoch ein Überschuss an Aldehyd sowie die Verwendung von chlorierten Lösungsmitteln notwendig ist.^[63,66]

Alternative Ansätze wie beispielsweise der Einsatz von recycelbaren mesoporösen Materialien, z.B. Fe-MCM-48^[67], Fe-Porphyrin-Systemen^[68] sowie die Oxidation mit Zinn- oder Titan-haltigen β -Zeolithen^[60,69,70] und zahlreichen weiteren heterogenen Zinn(IV)-Spezies^[71], Hydrocalcite^[72], Heteropolyoxometalate^[73], organische Ionenaustauscherharze^[74] sowie organische Acridinium-Systeme^[75], konnten mit guten bis sehr guten Umsätzen durchgeführt werden. Um die Bildung von Wasser als Nebenprodukt und somit Hydrolyse des gebildeten Lactons zu vermeiden, wurden Bis(trimethylsilyl)monoperoxidsulfat^[76,77] sowie Peroxodisulfat-Salze (S₂O₈²⁻)^[78] als Oxidationsmittel anstelle von H₂O₂ verwendet, was sowohl die Ausbeute als auch die Reinheit des Produktes erhöhte. 2009 wurde dieses System in Kombination mit ionischen Flüssigkeiten noch weiter optimiert.^[77] Auch mit anderen Katalysatoren fanden ionische Flüssigkeiten bereits Anwendung.^[55,70] Um den Einsatz von halogenierten Lösungsmitteln zu vermeiden konnten erfolgreich auf Silica-immobilisierten Persäuren in überkritischen Kohlenstoffdioxid eingesetzt werden.^[79] Im Jahr 2011 fand auch Oxon, das Triple-Salz 2 KHSO₅·KHSO₄·K₂SO₄, erneut Anwendung in Kombination mit einem Phasentransfer-Katalysator, welches in einem Zweiphasensystem bereits nach 6 Stunden bei 40 °C gute Umsätze lieferte.^[80]

Es sind auch Vorschläge veröffentlicht worden, Lactone direkt aus den entsprechenden sekundären Alkoholen zu synthetisieren. 2013 verwendeten MENG *et al.* Perameisensäure als Oxidationsmittel und konnten beispielsweise ϵ -Caprolacton (**3**) nach 65 Minuten Reaktionszeit mit vollständigem Umsatz erhalten.^[81] Allerdings wird dabei das Substrat in einer Konzentration von 0.2 M und die Säure in einem etwa 20fachen Überschuss eingesetzt. Des Weiteren finden bei der Doppeloxidation von sekundären Alkoholen ionischen Flüssigkeiten und Mikrowellen^[82], Nafion-H®^[83] oder organische Katalysatoren^[84] Anwendung. Jedoch sind auch in diesen Fällen die Umsätze bei langen Reaktionszeiten nur mäßig und die Verwendung von Peroxo-Verbindungen ist vom ökologischen Standpunkt aus nachteilig im Ver-

gleich zur Enzymkatalyse, bei der eine Zugabe von weiteren Katalysatoren nicht notwendig ist. Des Weiteren dient elementarer Sauerstoff bei enzymkatalysierten Oxidationsreaktionen als Oxidationsmittel.

3.1.3 Stereoselektive BAEYER-VILLIGER-Oxidation

Katalysatoren sollten zusätzlich zu ihren Katalyseeigenschaften auch die Fähigkeit besitzen, enantioselective Oxidationsreaktionen zu katalysieren. So berichtete STRUKUL bereits 1994 von einer Oxidation mit chiralen Pt(II)-Komplexen, mit denen unterschiedliche 2-substituierte cyclische Ketone zu den entsprechenden Lactonen mit ee-Werten von bis zu 58% umgesetzt werden konnten (Abbildung 15).^[85]

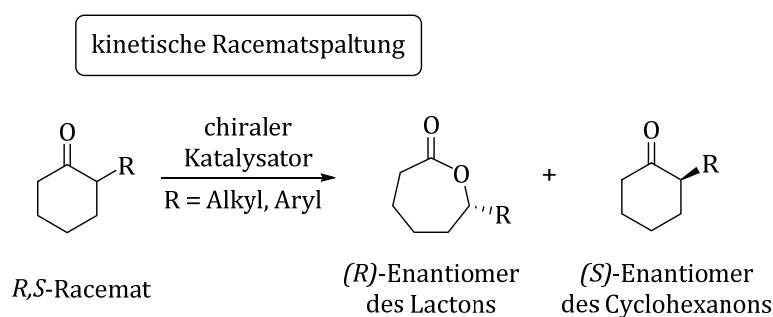


Abbildung 15. Enantioselective BAEYER-VILLIGER-Oxidation mit chiralem Katalysator.^[85]

Später konnte durch den Einsatz von Pt(II)- oder Co(Salen)-Komplexen und Tensiden in Wasser der Enantiomerenüberschuss auf 90% gesteigert werden.^[86,87] In der heutigen Zeit werden hohe Umsätze mit mäßigen bis guten ee-Werten durch Verwendung von chiralen enantiomerenreinen Organokatalysatoren^[88] oder chiralen Metallkomplexen der Übergangsmetalle Co^[87], Cu^[89], Pd^[90], Pt^[91], Zr^[92], Hf^[93] oder Mg^[94] und Al^[95] erhalten.

Aus präparativer Sicht scheint dennoch die Verwendung chiraler Übergangsmetallkatalysatoren für die enantioselective Synthese von Estern in mittlerer bis hoher optischer Reinheit die einzige aussichtsreiche Alternative zur Katalyse durch Enzyme zu sein.^[51,52] Der Nachteil der meisten der genannten Katalysator-Systeme ist jedoch die geringe Substratbreite, da nur cyclische Ketone umgesetzt werden können. Des Weiteren müssen sie aufwendig synthetisiert werden, liefern niedrige Umsätze und die Reaktionen müssen in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden.

3.2 Enzymkatalysierte Synthesen

3.2.1 Enzymatische BAEYER-VILLIGER-Oxidation

Der Einsatz von Enzymen bietet im Vergleich zu den oben genannten organischen Katalysatoren viele Vorteile in Hinblick auf die Regio-, Chemo- und Enantioselektivität.

1995 beschrieb ROBERTS eine durch die Lipase B der *Candida antarctica* (CAL-B) katalysierte BAEYER-VILLIGER-Oxidation von cyclischen Ketonen.^[96] Die CAL-B ist hierbei jedoch nicht direkt an der Oxidation des Ketons beteiligt, sondern katalysiert die Bildung einer Persäure, ausgehend von einer langkettigen Carbonsäure mit Wasserstoffperoxid. Die eingesetzten 2- und 3-substituierten Cyclopentanone und -hexanone wurden so zu racemischen Lactonen oxidiert. Die dabei erhaltenen Ausbeuten lagen bei 57 – 73% und waren nur geringfügig niedriger als die auf klassischem Weg erhaltenen. Eine Ausnahme stellte jedoch 2-Oxocyclohexanessigsäure (**28**) dar, bei der durch intramolekulare BAEYER-VILLIGER-Oxidation das entsprechende Lacton **29** bei einem Umsatz von 54% ein Enantiomerenüberschuss von 21% ee erhalten werden kann (Abbildung 16). Der Grund für die Enantioselektivität der Reaktion scheint die etwas schnellere Acylierung des Enzyms durch eins der beiden Enantiomere zu sein, sodass die Persäure im Anschluss daran die intramolekulare Reaktion durchläuft. Die langen Reaktionszeiten von etwa einer Woche und das aufwändige Entfernen der entstandenen Säure bedürfen weiterer Optimierung.

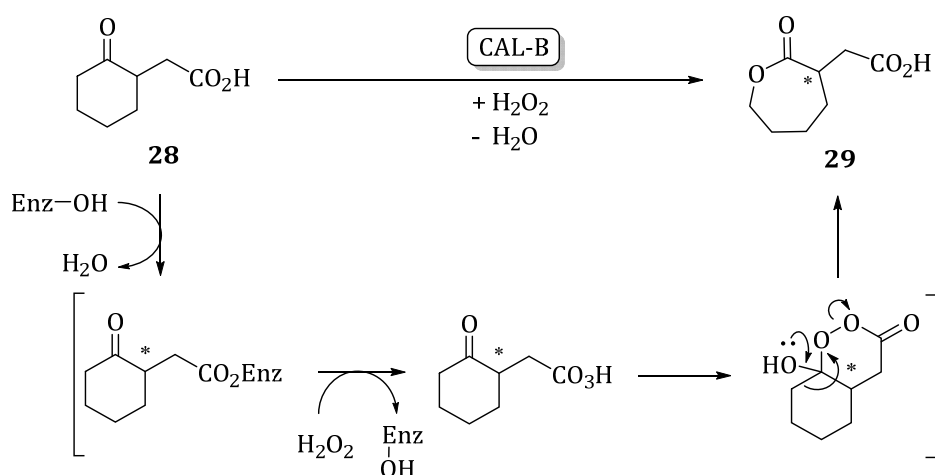


Abbildung 16. Enantioselektive BAEYER-VILLIGER-Oxidation von 2-Oxocyclohexanessigsäure (**28**) katalysiert durch Lipase B der *Candida Antartica* (CAL-B).^[96]

Ähnlich verläuft die 2007 von OLIVO beschriebene Oxidation, der zusätzlich den Komplex Ureahydrogenperoxid in Essigester **5** einsetzte.^[97] Der Vorteil hierbei war die Vermeidung der Hydrolyse des Lactons durch Abwesenheit von Wasser als Nebenprodukt. Es konnten so Lactone mit ee-Werten von 20 - 60% und Umsätze von 20 – 50% nach etwa zwei Tagen erhalten werden.

Einen alternativen Weg gingen GUIBÉ-JAMPEL *et al.*, aufbauend auf frühere Arbeiten von KIRK^[98], mit der autokatalytischen Oxidation von Ketonen (Abbildung 17).^[99] Dabei sollte Wasserstoffperoxid mithilfe

von Carboxyl-Seitengruppen des Enzyms die BAEYER-VILLIGER-Oxidation starten. Das gebildete Lacton **3** sollte eine CAL-B-katalysierte Perhydrolyse zur Peroxysäure **30** durchlaufen, die wiederum die Oxidation von weiterem Keton **2** katalysieren kann, wodurch ein autokatalytischer Prozess erhalten wird. Der niedrige Umsatz von 20% konnte durch Ersatz des klassischen $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ -System durch Ureaperoxid nach 48 Stunden Reaktionszeit 65% Umsatz gesteigert werden. Im Fall von substituiertem Cyclohexanon liegen die Enantiomerenüberschüsse der erhaltenen Lactone auch hierbei nur zwischen 10 und 70% ee.

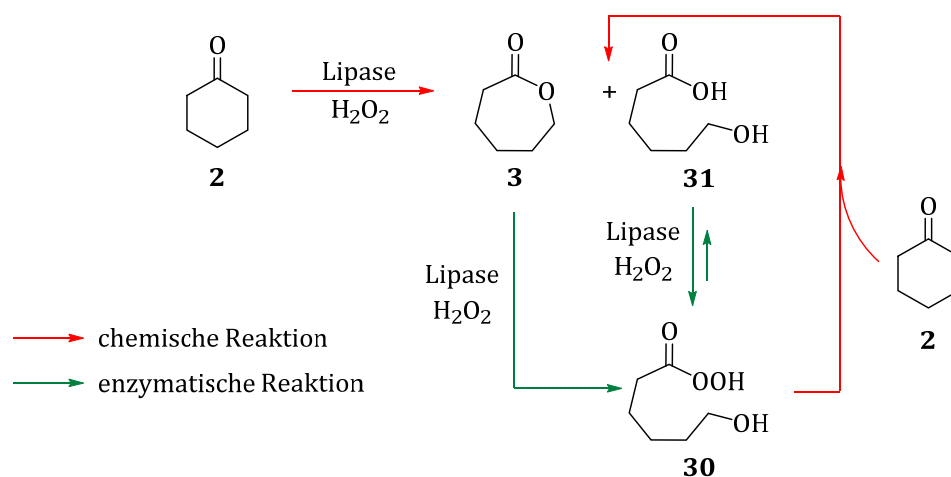


Abbildung 17. Lipasenkatalysierte Perhydrolyse mit anschließender chemischer BAEYER-VILLIGER-Oxidation mittels Autokatalyse am Beispiel von Cyclohexanon (**2**) nach GUIBÉ-JAMPEL.^[99]

3.2.2 BAEYER-VILLIGER-Monooxygenasen

3.2.2.1 Allgemeines

Höhere Ausbeuten und höhere Enantiomerenreinheit können durch den Einsatz von BAEYER-VILLIGER-Monooxygenasen (BVMOs, EC 1.13.14.x) erzielt werden.^[100] Dadurch lässt sich im Gegensatz zu chemischen oder Lipasen-katalysierten Reaktionen auch die Verwendung von Wasserstoffperoxid oder Persäuren als Oxidationsmittel und organische Lösungsmittel vermeiden, da die Monooxygenasen mit molekularem Sauerstoff in wässrigem Medium aktiv sind. Des Weiteren sind sie in der Lage, nicht nur cyclische, sondern auch aliphatische und aromatische Ketone in die entsprechenden Ester umzuwandeln. Die Epoxidierung von C=C-Doppelbindungen^[101] sowie unter anderem die Sulfoxidation^[102], Phosphoxidation^[103], Aminoxidation^[104], Boronsäureoxidation^[105] und Selenoxidation^[106] können ebenfalls durch BVMOs katalysiert werden.

Die BAEYER-VILLIGER-Monooxygenasen gehören zu einer Superfamilie, die drei Klassen von flavin-abhängigen Monooxygenasen umfassen: die sogenannten Flavin-enthaltenden Monooxygenasen (FMOs), die *N*-hydroxylierenden Monooxygenasen (NMOs) und die BVMOs.^[107] Monooxygenasen werden anhand der von ihnen benötigten Cofaktoren unterteilt. Monooxygenasen vom Typ I sind Flavin-abhängig und benötigen NADPH als Elektronenquelle, während Enzyme des Typs II FMN und NADH

brauchen, hauptsächlich Heteroatome oxidieren und eukaryotischem Ursprungs sind.^[108] Die Typen III und IV von Monooxygenasen sind kupferabhängige bzw. eisenhaltige Enzyme.^[109,110] BVMOs vom Typ O sind ein neuartiger BVMO-Typ, die ebenfalls FAD und NADPH benötigen.^[111] Strukturell unterscheiden sie sich jedoch von den BVMOs vom Typ I, da sie nicht das für BVMOs charakteristische konservierte Sequenzmotiv (vgl. Abschnitt 3.2.2.2) besitzen und nur 8% Übereinstimmung zur PAMO zeigen. Alle bisher klonierten BVMOs gehören dem Typ I an.

Die BVMOs aktivieren reduktiv Sauerstoff (O₂) und bauen diesen in ein Substrat ein. Sie werden in Monooxygenasen und Dioxygenasen eingeteilt.^[109,110] Dabei führen Monooxygenasen, zu denen auch die BVMOs zählen, ein Sauerstoffatom in das Substrat ein; das zweite Sauerstoffatom wird zu Wasser reduziert (Abbildung 18). Dioxygenasen hingegen inserieren beide Atome des elementaren Sauerstoffs in das Substrat.

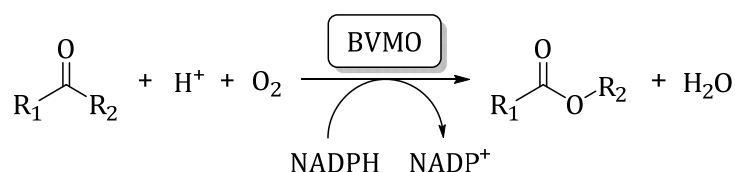


Abbildung 18. BAEYER-VILLIGER-Oxidation eines Ketons katalysiert durch BVMO.^[112]

Die ersten Anzeichen für eine enzymatische BAEYER-VILLIGER-Oxidation wurden von TURFITT 1948 während seinen Studien zu Steroid-Synthese in Pilzen entdeckt.^[113] 1953 konnten die Arbeitsgruppen von FRIED und PETERSON in der Synthese von Testolacton (**32**), ausgehend von Progesteron (**33**), zwei Reaktionsschritte nachweisen, die durch die Monooxygenase aus *Cyclindrocarpon radicola* katalysiert werden (Abbildung 19).^[114,115]

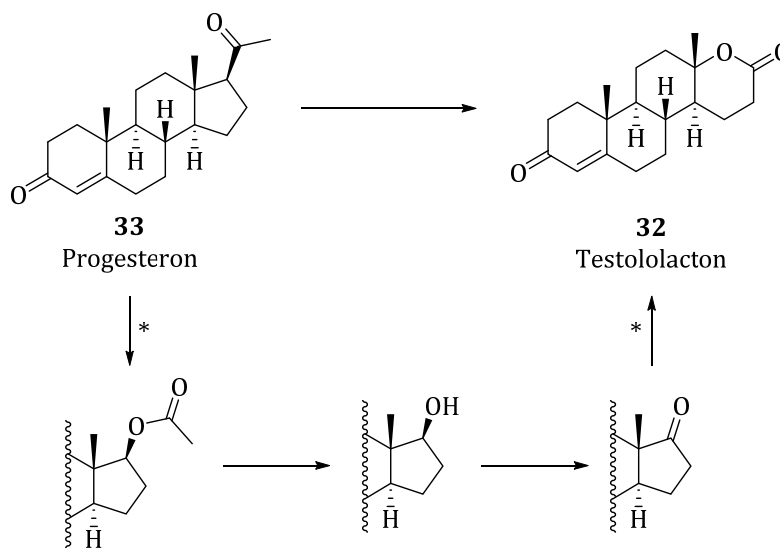


Abbildung 19. Schematische Synthese von Progesteron (**33**) zu Testolacton (**32**).^[116] Die durch BVMO katalysierten Schritte sind mit Sternchen gekennzeichnet.

Die erste Verknüpfung zwischen der Lactonisierung von Steroiden, der biochemischen Oxidation von Campher durch ein Bakterium und der chemischen BAEYER-VILLIGER-Oxidation erstellten PRAIRIE und TALALY 1963.^[117] Durch weitere mechanistische Studien wurde NADPH als essenzieller Cofaktor für diese Art der Oxygenase identifiziert.^[118]

BAEYER-VILLIGER-Monooxygenasen treten vorwiegend in Mikroorganismen auf und sind dort an katabolischen Vorgängen beteiligt, etwa in den Pilzen *Cylindrocarpon*^[113–115], *Exophiala*^[119], *Xanthobacter*^[120] und *Aspergillus*^[121] und in den Bakterien der Gattungen *Cormamonas* (ehemals *Pseudomonas*)^[122], *Nocardia*^[100], *Rhodococcus*^[123], *Gordonia*^[124], *Mycobacterium*^[125] und *Acinetobacter*^[126]. Aber auch bei höheren Organismen sind Monooxygenasen anzutreffen, beispielsweise bei der Synthese von Steroiden und Iridoiden in Pflanzen^[127] oder von Toxinen in Schalentieren^[128]. In Bakterien scheint die natürliche Rolle der Monooxygenasen in der Katalyse von einem oder mehreren wichtigen Schritten im oxidativen Katabolismus zu liegen, während diese Enzyme in Pilzen eine schwache Rolle im Wechsel zwischen dem Primär- und dem Sekundärmetabolismus spielen.^[129]

3.2.2.2 Struktur und Mechanismus

WALSH *et al.* konnten 1988 anhand der Oxidation von Cyclohexanon (**2**) zu ϵ -Caprolacton (**3**) durch CHMO aus *Acinetobacter calcoaceticus* den Mechanismus der Reaktion aufklären (Abbildung 20).^[109,110] Im ersten Schritt des Mechanismus wird das enzymgebundene Flavin (**34**) durch den Cofaktor NADPH reduziert und der Enzym-Cofaktor-Komplex **35** gebildet, welcher molekulare Sauerstoff bindet.^[130] Das so entstandene C4a-Peroxyflavin (**36**) greift, ähnlich wie die Persäure in der chemischen BAEYER-VILLIGER-Oxidation, nucleophil an die Carbonylfunktion des Ketons **2** an.^[12] Die Bildung des CRIGEE-Intermediats **37** ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.^[130] Bei der anschließenden Umlagerung müssen die stereoelektronischen Voraussetzungen der antiperiplanaren Anordnung der O-O-Einheit sowie das synchrone Wandern des Restes, wie bei dem Peroxid-Mechanismus (Abbildung 11, Abschnitt 3.1.1), stimmen. Das C4a-Hydroxyflavin (**38**) wird hydrolysiert und das oxidierte Flavin **39** für den nächsten katalytischen Zyklus regeneriert. NADPH, welches während eines Reaktionszyklus als erstes am Enzym gebunden wird und mit dem Flavin **34** reagiert, wird bis zum letzten Schritt als NADP⁺ im aktiven Zentrum gehalten.

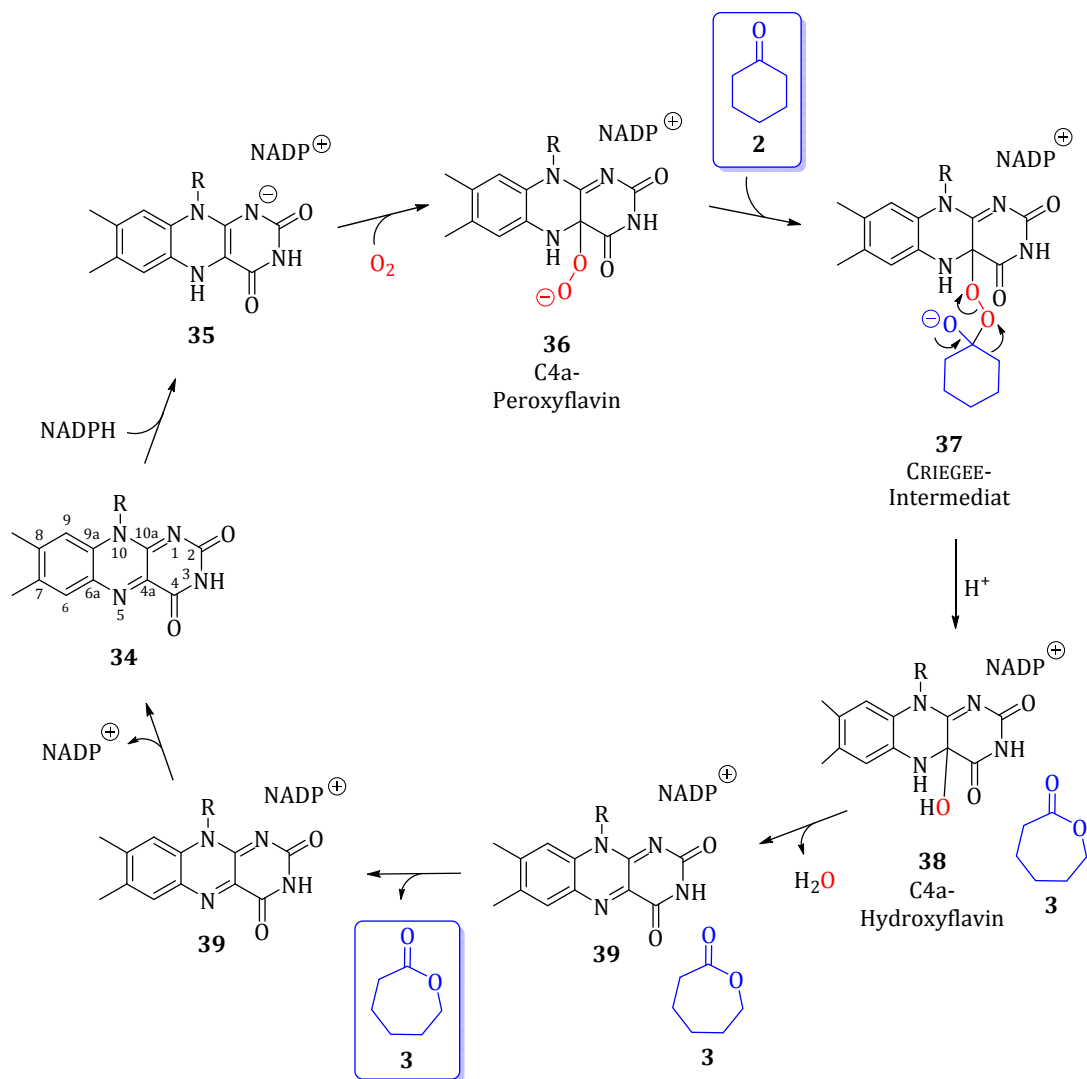


Abbildung 20. Mechanismus der enzymatischen BAEYER-VILLIGER-Oxidation am Beispiel von Cyclohexanon (2) bezogen auf PAMO.^[130]

WALSH *et al.* untersuchten 1982 die Fähigkeit der CHMO zur Oxidation von Heteroatom-Verbindungen.^[131] Der ambivalente Charakter des C4a-Peroxyflavins 36 ist demnach der Grund für die katalytische Aktivität gegenüber elektronenreichen, z.B. Ketone, als auch elektronenarmen Substraten, wie Sulfide (Abbildung 21).^[116,132] So greift die Schwefelverbindung 40 die C4a-Peroxy-Spezies 36 nucleophil an, im Unterschied zu der Oxidation eines Ketons, bei der das Peroxyflavin 36 als Nucleophil agiert.

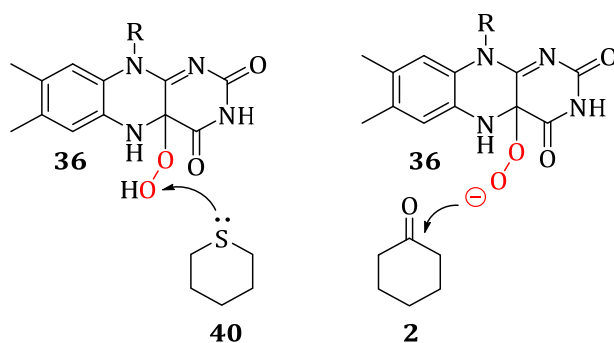


Abbildung 21. Ambivalente Reaktivität der C4a-Peroxyflavins **36** gezeigt an der Sulfid- (links) und BAEYER-VILLIGER-Oxidation (rechts).^[116,132]

Biochemische Studien an BVMOs sind aufgrund deren relativ geringen Anzahl, der geringen Stabilität und/oder der schwierigen Aufreinigung sehr rar.^[133] Die am besten untersuchte Monoxygenase ist die Cyclohexanon-Monoxygenase (CHMO, EC 1.14.13.22) vom Stamm *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871 aufgrund ihrer katalytischen und kinetischen Eigenschaften.^[130] Das Enzym hat eine Molekülmasse von etwa 59 kDa und besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette, die ein Mol gebundenes FAD enthält, welches auch nach der Aufreinigung nicht abgetrennt wird.^[100] Im *Acinetobacter*-Bakterium, welches natürlich in mariner Umgebung vorkommt, ist es im biologischen Abbau von Cyclohexanol (**1**), zu Adipinsäure (**41**) beteiligt, indem es Cyclohexanon (**2**) zu ϵ -Caprolacton (**3**) oxidiert (Abbildung 22).^[112,134] Weitere Oxidation der Adipinsäure (**41**) durch β -Oxidation liefert Acetyl- und Succinyl-Coenzym A. Cyclohexanol (**1**) selbst ist ein Abbauprodukt von Cyclohexan, welches der CHMO sowie weiteren Monoxygenasen als Kohlenstoffquelle dient und zu den über 1000 Bestandteilen von Erdöl gehört.^[135] Diese CHMO akzeptiert hunderte von unterschiedlichen Ketonen und weist somit ein außergewöhnlich breites Substratspektrum in Kombination mit einer sehr hohen Regio- und Enantio-selektivität auf.^[136]

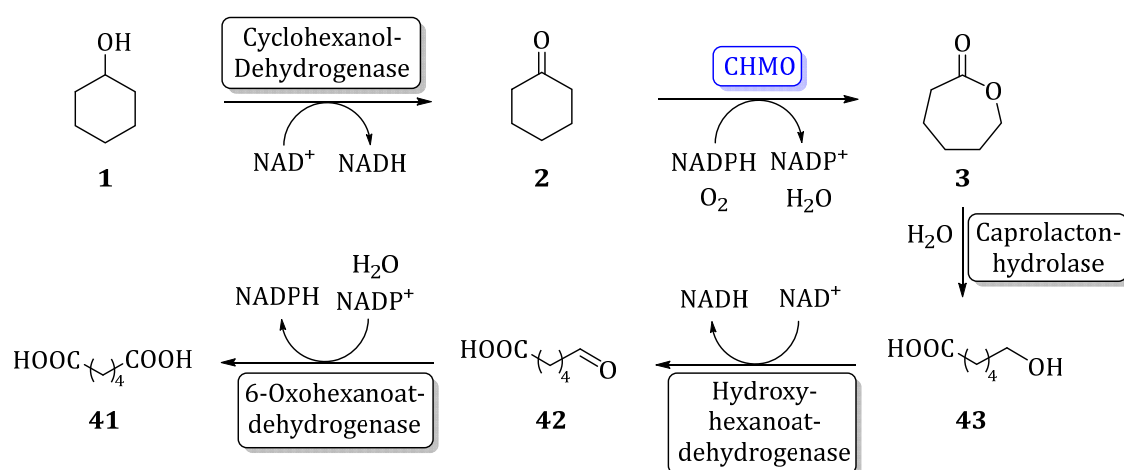


Abbildung 22. Katabolischer Abbau von Cyclohexanol (**1**) zu Adipinsäure (**41**) im Bakterium *Acinetobacter* sp.^[134]

Aufgrund der Instabilität der CHMO war es allerdings lange Zeit nicht möglich, eine Kristallstruktur des Enzyms zu erhalten, die einen Einblick in die strukturellen Details des Enzyms geben würden. 2002

vergleichen FRAAIJE *et al.* verschiedene sequenzierte bakterielle BVMOs und stießen dabei auf ein konserviertes Sequenzmotiv (FxGxxxHxxxW).^[107] Mit diesen Daten konnten sie die Superfamilie der BVMOs enthüllen. Zwei Jahre später veröffentlichte dieselbe Gruppe eine Kristallstruktur von der Phenylaceton-Monooxygenase (PAMO, EC 1.14.13.92) aus *Thermobifida fusca*, einem ungewöhnlich stabilen und hitzebeständigen Enzym, das jedoch nur einen sehr engen Substratbereich hat (Abbildung 23).^[137]

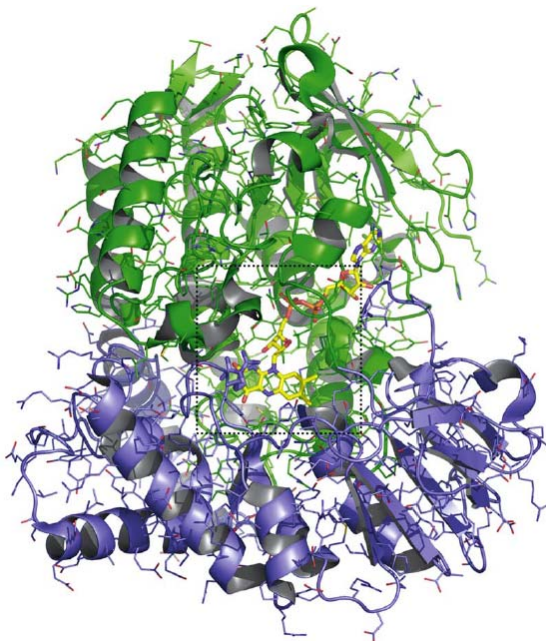


Abbildung 23. Kristallstruktur von PAMO aus *Thermobifida fusca*.^[138] Die FAD-Domäne ist grün, die NADPH-Domäne ist blau, das Arg337 ist zentriert dargestellt.

PAMO ist ein Monomer mit einer Molekülmasse von 62 kDa, welches die Oxidation von Phenylaceton zu Phenylessigester katalysiert, und weist eine Homologie von 40.3% zur CHMO von *Acinetobacter* sp. auf.^[116,137] Die Kristallstruktur wurde mit gebundenem FAD, jedoch in Abwesenheit von Cofaktor und Substrat, aufgeklärt. Für PAMO wurde eine Multidomänen-Struktur, bestehend aus einer FAD-bindenden und einer NADPH-bindenden Domäne, vorgeschlagen. Das aktive Zentrum befindet sich in direkter Nachbarschaft zu den beiden Domänen. Das Flavin ist tief in der FAD-Domäne verborgen und durch VAN DER WAALS- und Wasserstoffbrückenbindungen fixiert. Dieses stimmt mit der Beobachtung überein, dass FAD nicht vom Enzym dissoziiert, während NADP⁺ zwischen der FAD- und der NADPH-Domäne eingeklemt ist. Bemerkenswert ist, dass sich das Sequenzmotiv der BVMO nicht im aktiven Zentrum befindet, sondern in einer Schleife, die die beiden Domänen verbindet. Das aktive Zentrum enthält zudem die Aminosäure Arg337, der die Funktion zugeschrieben wird, das negativ geladene Flavin-Peroxid-Intermediat **35** durch Wasserstoffbrückenbindungen zu stabilisieren.

Arg337 ist außerdem nicht in einer einzelnen Konformation fixiert, sondern besitzt eine inhärente Flexibilität. Im Laufe des Katalysezyklus nimmt Arg337 zwei Konformationen ein: die „IN“-Position, wie es in der erhaltenen Kristallstruktur beobachtet wurde, bei der das Flavin stabilisiert wird, und die „OUT“-Position, in der der Cofaktor angrenzend zum Flavin positioniert wird. Die Übertragung eines Hydrid-Ions vom Nicotinamid-Ring zum FAD findet folglich erst nach einer Konformationsänderung im Enzym statt. Mutagenese-Studien zeigten, dass die Mutation des Arginin-Restes zu Alanin zu einer

vollständigen Inaktivierung des Enzyms führt.^[137,139] Die Mutation beeinflusst zwar nicht die Wechselwirkungen des Enzyms mit dem Cofaktor, jedoch schaltet es die Fähigkeit aus, Sauerstoff zu binden. Dieses zeigt die Bedeutung des Arginin-Restes zur Stabilisierung des negativ geladenen Peroxid-Flavins **36**.

MIRZA *et al.* lösten schließlich eine Kristallstruktur der Cyclohexanon-Monooxygenase aus *Rhodococcus* sp. vom Stamm HI-31 (CHMO_{Rhodo.}) in zwei verschiedenen Zuständen, der offenen und der geschlossenen Form, mit FAD und NADP⁺ auf (Abbildung 24).^[140] Diese CHMO ist ein stabiles, monomeres Enzym, welches ebenfalls FAD- und NADPH-Domänen besitzt und zu 55% identisch mit der CHMO aus *Acinetobacter* sp. ist. Werden nun beide Kristallstrukturen der CHMO_{Rhodo.} übereinandergelegt, so ergibt sich ein „äquivalentes Atom-Vektordiagramm“, das die Verschiebung der Atompositionen illustriert.^[140] Während die FAD-Domäne unverändert bleibt, rotiert die NADPH- und die Helix-Domäne um etwa 5° bzw. 3°, was zu einer Verschiebung um 5 Å bzw. 2 Å von Resten führt, die weiter entfernt von der Rotationsachse sind. Durch diese Rotation wird der Cofaktor seitlich näher zum Flavin geschoben, sodass der benötigte Hydridtransfer stattfinden kann.

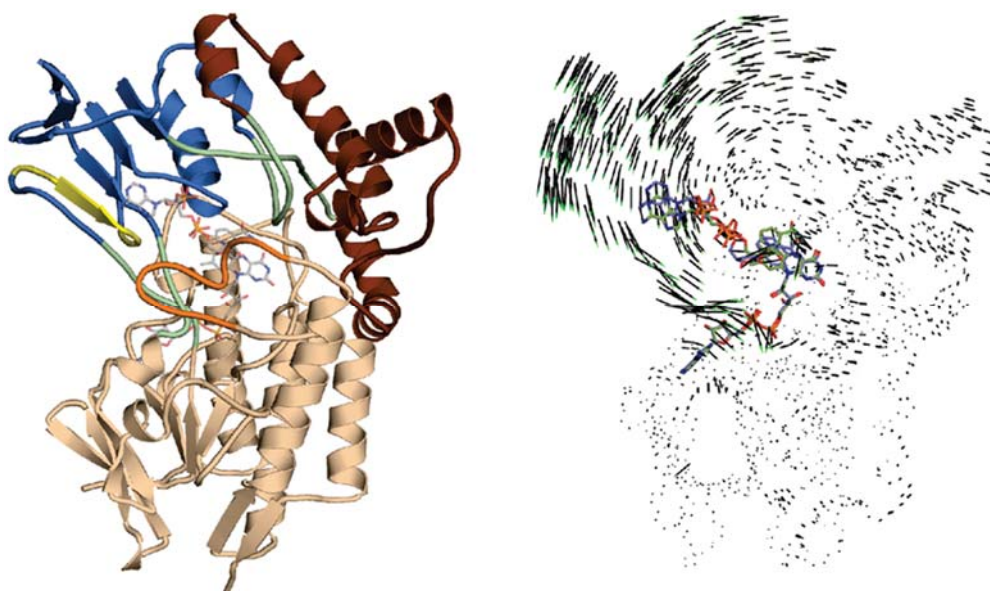


Abbildung 24. Kristallstruktur der CHMO von *Rhodococcus* sp. HI-31 (links); die FAD-Domäne ist beige, die NADPH-Domäne ist blau, die Linker-Region ist grün, die flexible Schleife ist orange, die Helix-Domäne ist braun, das BVMO-Sequenzmotiv ist gelb dargestellt.^[140] Äquivalentes Vektordiagramm derselben CHMO (rechts).

Obwohl schon lange bekannt ist, dass die CHMO von *Acinetobacter* sp. viele Ketone mit guter Regio- und Stereoselektivität umsetzen kann, war wenig über ihre Chemoselektivität bekannt. Die Chemoselektivität ist „die bevorzugte Reaktion eines chemischen Reagenz‘ mit einem von zwei oder mehreren unterschiedlichen funktionellen Gruppen“.^[141] Vor einigen Jahren wurde beschrieben, dass die Oxidation bevorzugt an der Carbonyl-Funktion stattfindet, wenn eine weitere oxidierbare Funktion, beispielsweise ein Alken oder Thioether, enthalten ist. WALSH schlug vor, dass α,β -ungesättigte Ketone nicht von der CHMO umgesetzt werden können.^[109,110] Diese Theorie wurde von OTTOLINA bestätigt, der zeigte, dass bei der chemoselektiven Oxidation des racemischen Diketons *rac*-**44** das Lacton (*S*)-**45** mit 35% Umsatz in enantiomerenreiner Form erhalten wurde (Abbildung 25).^[142]

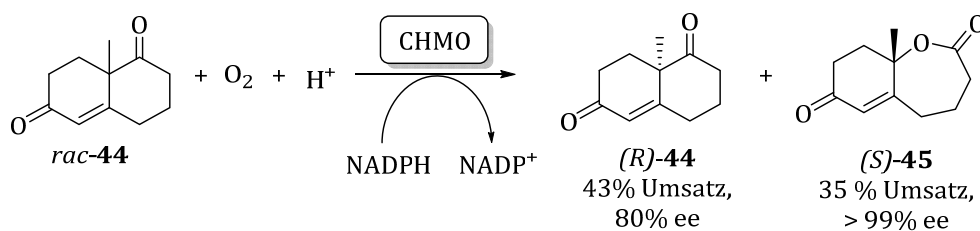


Abbildung 25. Chemoselektive Oxidation eines racemischen Diketons *rac-44* mit CHMO nach OTTOLINA.^[142]

Im Falle eines zweifachsubstituierten Cyclohexanon-Rings nimmt der Energieunterschied immer weiter ab, je ähnlicher sich die beiden Reste sind. Dadurch verschimmt der Energieunterschied der beiden möglichen CRIEGEE-Intermediate und beide Enantiomere werden gebildet.^[136]

Wie schon beschrieben wurde, können auch heterocyclische Verbindungen wie Thioether (**40**) durch Monooxygenasen oxidiert werden. Befindet sich jedoch eine Keto-Funktion in derselben Verbindung, so findet eine Oxidation ausschließlich dort statt (Abbildung 26). Selbst nach Verlängerung der Reaktionszeit konnte keine Oxidation des Heteroatoms festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist bemerkenswert, da nach organisch-chemischem Protokoll mit *m*-CPBA das Heteroatom bevorzugt oxidiert wird.^[143]

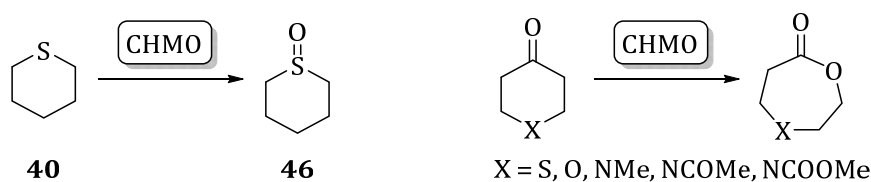


Abbildung 26. CHMO-katalysierte BAEYER-VILLIGER-Oxidation von Thioether (**40**)^[109,110] (links) und von heterocyclischem Keton^[143] (rechts).

3.2.3 Alkohol-Dehydrogenasen

Dehydrogenasen gehören allgemein zur Klasse der Oxidoreduktasen und haben in der Natur die Funktion, stereospezifisch prochirale Carbonylverbindungen zu reduzieren.^[144] Zur biokatalytischen Darstellung von sekundären Alkoholen aus Carbonylverbindungen als wichtige Bausteine für die pharmazeutische Industrie werden in großem Umfang Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) eingesetzt. Diese treten in einer Vielzahl von lebenden Organismen auf, in denen sie für die Entgiftung und den Metabolismus von Ethanol und anderen Alkoholen zuständig sind.^[145] Diese ADHs sind NAD(P)-abhängig und katalysieren den irreversiblen Transfer von Hydridionen von NAD(P)H auf die Carbonylverbindung.

Zu den bekanntesten Alkohol-Dehydrogenasen gehören unter anderem diejenigen, die aus Hefe, Pferdeleber oder *Thermoanaerobicum Brockii* isoliert wurden.^[144] Diese weisen jedoch eine geringe thermische Stabilität und Enantioselektivität sowie einen teilweise engen Substratbereich auf, sodass Substrate mit größeren Seitenketten, beispielsweise Acetophenon, nicht umgesetzt werden können. Verschiedene Alkohol-Dehydrogenasen können, in Analogie zu PRELOGS Regel, ein Hydrid-Ion vom NAD(P)H entweder

auf die *si*- oder die *re*-Seite eines Ketons übertragen. Daraus resultiert ein Alkohol mit (*R*)- bzw. (*S*)-Konfiguration mit in den meisten Fällen hoher Enantioselektivität.^[145,146] Der Großteil der bekannten ADHs gehört zu den (*S*)-selektiven Dehydrogenasen, wie beispielsweise *Rhodococcus erythropolis* und *Theormoanaerobicum* sp.^[144,147] Die zu Beginn der 1990er Jahre entdeckten (*R*)-ADHs gehören zu den kurzkettigen Dehydrogenasen, zu denen die ADH aus *Lactobacillus kefir* (Lk-ADH, EC 1.1.1.2) zählt.^[144] Die Lk-ADH ist ein Homotetramer mit 251 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 26.6 kDa pro Untereinheit.^[148] Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit (92.1% Identität) zu der ADH aus *Lactobacillus brevis* (Lb-ADH) kann dessen Mechanismus auf die Lk-ADH übertragen werden. Die Aminosäuren der Lk-ADH werden analog zu denen der Lb-ADH nummeriert. Der katalytische Mechanismus umfasst eine hoch konservierte Tetrade bestehend aus Ser142, Tyr155, Lys159 und Asn113. Der Tyrosin-Rest nimmt dabei die zentrale katalytische Säure bei der Reduktion einer Carbonylverbindung ein. Er wird während des Reaktionsverlaufs deprotoniert und muss durch das positiv geladene Lys159 stabilisiert werden. Ser142 hat die Aufgabe, das Substrat zu fixieren und zusätzlich die Ladung des Tyrosin-Restes auszugleichen, sodass ein Proton von zwei Bindungspartnern geteilt wird. Der konservierte Asn113-Rest soll zusammen mit der 2'-Hydroxygruppe des Cofaktors und einem gleichzeitig am Lysin- und Asparagin-Rest gebundenem Wassermolekül (Wat122) ein Protonen-Übertragungssystem bilden.^[149] FILLING *et al.* postulierten ein erweitertes Protonen-Übertragungssystem, welches eine Gruppe von verschiedenen Wassermolekülen umfasst, die eine hydrophobe Höhle ausfüllen, welche mit Carbonyl-Sauerstoffatomen bedeckt ist (Abbildung 27).^[150]

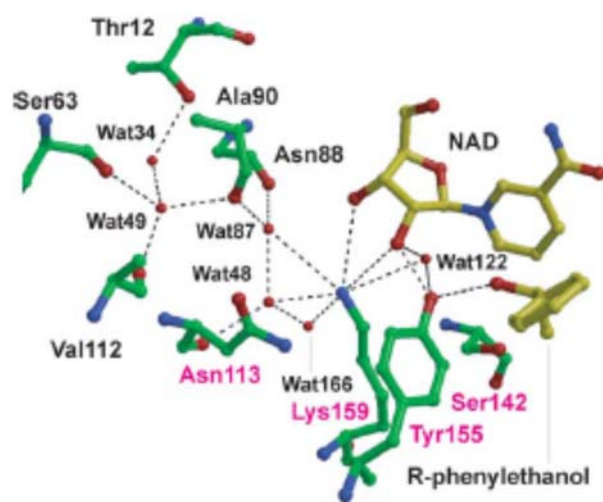


Abbildung 27. Nahaufnahme der wichtigsten Reste des erweiterten Protonen-Übertragungssystems der Lb-ADH.^[149] Die katalytische Tetrade ist in magenta und Wasserstoffbrückenbindungen sind gestrichelt dargestellt.

Die Lk-ADH enthält zwei Mg^{2+} -Ionen, die eher strukturelle als katalytische Eigenschaften besitzen, da sie je eine koordinative Bindung zu einem Monomer und elektrostatische Wechselwirkungen ausbilden. Durch Zugabe des Komplexbildners Ethyldiamintetraacetat (EDTA) wurde die Inaktivierung des Enzyms gezeigt, da so die quarternäre Struktur des Enzyms nicht mehr stabilisiert werden kann. Durch Zugabe von Mg^{2+} -Ionen kann dessen Aktivität zu etwa einem Drittel wieder regeneriert werden.^[148] Die Bedeutung der Anwesenheit von zusätzlichen Mg^{2+} -Ionen in der Reaktionsmischung macht sich im

Anstieg der Aktivität der Lk-ADH bemerkbar, was bedeutet, dass ein Teil der Ionen vom Enzym dissoziiert.^[151]

Da viele der Substrate nicht wasserlöslich sind, kann eine Zugabe von organischem Lösungsmittel zur Reaktionsmischung sinnvoll sein. Lösungsmittel mit logP-Werten <3.5 können jedoch sowohl die spezifische Aktivität als auch die Stabilität des isolierten Enzyms verringern.^[152] Die höchste Aktivität weist die Lk-ADH bei 50 °C auf, während das pH-Optimum bei pH 7 für die Reduktion und bei pH 8 für die Oxidation liegt.^[151]

HUMMEL *et al.* setzten 1990 erfolgreich das prochirale Substrat Acetophenon (**46**) zu (*R*)-Phenylethanol ((*R*)-**47**) mit der (*R*)-spezifischen Lk-ADH mit einer Aktivität von 558 U/mL um (Abbildung 28).^[151] Die Lk-ADH akzeptiert ein sehr breites Spektrum an Substraten wie aliphatische, offenkettige Ketone, 2- oder 3-Ketoester und cyclische Ketone mit hoher spezifischer Aktivität (100 – 500 U/mg).^[153]

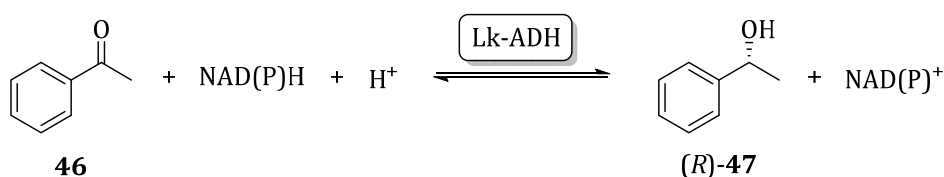


Abbildung 28. Schema der Lk-ADH-katalysierten Oxidations- sowie Reduktionsreaktionen.^[151]

Auch wenn die Reduktion prochiraler Ketone zu chiralen Alkoholen der wichtigste Anwendungsbereich der Lk-ADH ist, kann die Oxidationsreaktion ebenfalls genutzt werden. So wird die Lk-ADH bereits zur enzymatischen Racematspaltung von racemischen Alkoholen, beispielsweise von (*R*)- und (*S*)-Phenylethanol, eingesetzt, bei der nur der (*R*)-Alkohol zum entsprechenden Keton oxidiert wird.^[153] Im Rahmen dieser Arbeit soll die Lk-ADH die Oxidation von Cyclohexanol (**1**) zu Cyclohexanon (**2**) mit dem kostengünstigsten Cofaktor NADP⁺ katalysieren (Abbildung 29). Die Lk-ADH besitzt für die Oxidation des Alkohols **1** eine geringere Aktivität als für die Reduktion eines Ketons **2**, sodass die Wahrscheinlichkeit der Rückreaktion sehr groß ist. Allerdings kann das Gleichgewicht zugunsten der Oxidation verschoben werden, wenn das gebildete Keton **2** durch die CHMO direkt weiter umgesetzt wird (vergl. Abschnitt 2.1).

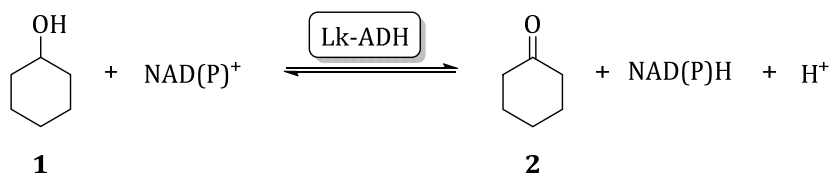


Abbildung 29. Enzymatische Oxidation durch Lk-ADH am Beispiel von Cyclohexanol (**1**) zu Cyclohexanon (**2**).

Aufgrund der Cofaktor-Abhängigkeit der Lk-ADH ist auch in diesem Fall die Anwesenheit eines Regenerationssystems notwendig. Auf verschiedene Systeme wird in Kapitel 3.2.4 näher eingegangen.

3.2.4 Cofaktor-Regeneration

Die Anwendung von BVMOs im industriellen Maßstab ist noch nicht vollständig entwickelt. Eines der größten Hindernisse ist die Abhängigkeit der Lk-ADH sowie der Monoxygenasen von dem Cofaktor NADP⁺ bzw. NADPH, welches in stöchiometrischen Mengen zur Reaktionsführung eingesetzt werden muss. Aus diesem Grund wurden Systeme zur *in situ*-Cofaktor-Regenerationssysteme entwickelt. Generell werden zwei unterschiedliche Strategien zur Cofaktor-Regeneration angewandt (**Abbildung 30**).^[14,154] Zum einen die substratgekoppelte Cofaktor-Regeneration, die auf einen Alkohol als Co-substrat, meist *iso*-Propanol, basiert, der in der Rückreaktion von derselben Alkohol-Dehydrogenase zum Keton oxidiert wird und somit den Cofaktor regeneriert. Durch Zugabe eines Überschusses an Cosubstrat kann das Gleichgewicht zur Produktseite verschoben werden.

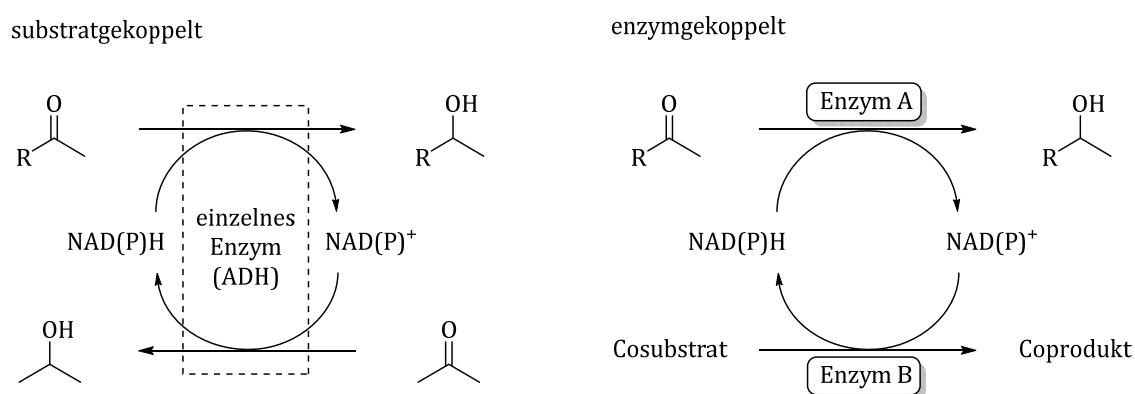


Abbildung 30. Strategien zur substrat- und enzymgekoppelten Cofaktor-Regeneration.^[154]

Ein anderes Konzept nutzt das enzymgekoppeltes Regenerationssystem. Dabei wird der Einsatz eines zweiten Enzyms notwendig, welches ein Cosubstrat unter Rückbildung des Cofaktors umsetzt. Die Reaktion ist irreversibel, wodurch das Gleichgewicht ebenfalls zur Produktseite verschoben wird. Ein gutes Regenerationssystem sollte preiswert sein, keine Nebenprodukte produzieren und nicht mit den katalytischen Eigenschaften des Enzyms wechselwirken. Klassisch werden als Redox-Enzym Dehydrogenasen, beispielsweise die Glucose- (GDH)^[155] und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)^[131,156] sowie die Formiat-^[157] oder Phosphit-Dehydrogenase^[158,159] eingesetzt. Die Dehydrogenasen können dabei sowohl als isoliertes Enzym^[158,159] als auch als Fusionsprotein^[160] oder Ganzzellbiokatalysator^[14,161] zusammen mit der BVMO zur Reaktionsmischung gegeben werden. Ganzzellbiokatalysatoren, die neben dem rekombinanten produzierenden Enzym ein Cofaktor-regenerierendes Enzym coexpressiert enthalten, besitzen weitere Vorteile wie die leichte Handhabbarkeit von Bio-transformationen durch Verzicht auf Isolierung und Reinigung von Enzymen sowie die zellinterne Cofaktor-Regeneration. Gleichzeitig schließen sie das Vorhandensein konkurrierender Enzyme, wie es bei Wildtypzellen der Fall ist, aus. Zu beachten ist sowohl bei isolierten Enzymen als auch bei Ganzzell-Systemen die Kompatibilität der beiden Enzymreaktionen, da Inhibierungsreaktionen durch unterschiedliche Reaktanden auftreten können.

Die für die Cofaktor-Regeneration häufig genutzte GDH oxidiert das Co-Substrat D-Glucose (**48-a**) und regeneriert dadurch den Cofaktor NAD(P)⁺ (Abbildung 31).^[155] Durch die spontane Hydrolyse des entstandenen Gluconolactons (**49-a**) zur Glukonsäure (**50-a**) ist die Reaktion irreversibel und verschiebt das Gleichgewicht zur Produktseite. Die GDH ist günstig, kommerziell erhältlich und stabiler als die meisten zur Regeneration verwendeten Enzyme. Weitere Vorteile der GDH sind die Akzeptanz von NAD⁺ sowie von NADP⁺ und ihre hohe spezifische Aktivität.

Die G6PDH ist ähnlich effizient und wird ebenfalls vielfach verwendet.^[16,131,156] Sie oxidiert den Zucker Glukose-6-Phosphat (**48-b**, G6P) zu Glukonolacton (**49-b**), welches spontan zu Glukonsäure (**50-b**) hydrolysiert. Einen großen Nachteil dieses Systems stellen die hohen Kosten für das G6P (**48-b**) dar. Die G6PDH wurde bereits in Ganzzellsystemen zusätzlich zur BVMO überexprimiert.^[16] Die erhöhte Verfügbarkeit von NADPH für die Oxidation führt zu einer Verbesserung der Produktion von ϵ -Caprolacton (**3**).

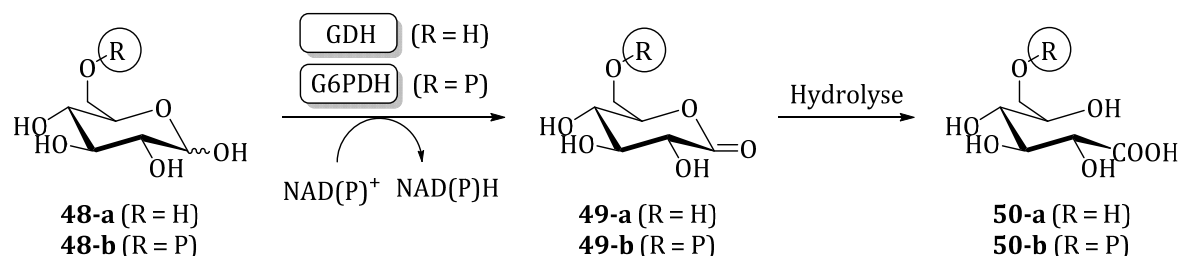


Abbildung 31. Cofaktorregeneration mit dem D-Glucose (**48-a**)/GDH- und dem G6P (**48-b**)/G6PDH-System.^[131,155,156]

Die Verwendung der Formiat-Dehydrogenase (FDH) ist eine weitere bekannte Methode und liefert CO₂ als Nebenprodukt.^[157] Da dieses flüchtig ist, erfolgt dadurch eine Verschiebung des Gleichgewichtes der Reaktion zur Produktseite. Nachteile dieses Systems sind die geringe spezifische Aktivität der FDH sowie die Abhängigkeit von NADH als Cofaktor.

Die Phosphit-Dehydrogenase (PtxD) katalysiert die Oxidation von Phosphit zu Phosphat mit gleichzeitiger Reduktion von NAD⁺ zu NADH (Abbildung 32).^[158,159] Anstelle von PtxD kann eine Alkohol-Dehydrogenase (ADH) zusammen mit *i*PrOH zugefügt werden, um NADP⁺ wieder zu regenerieren.^[162] Dabei wird Aceton gebildet, welches flüchtig ist und das Gleichgewicht zu Gunsten des Produktes verschiebt.

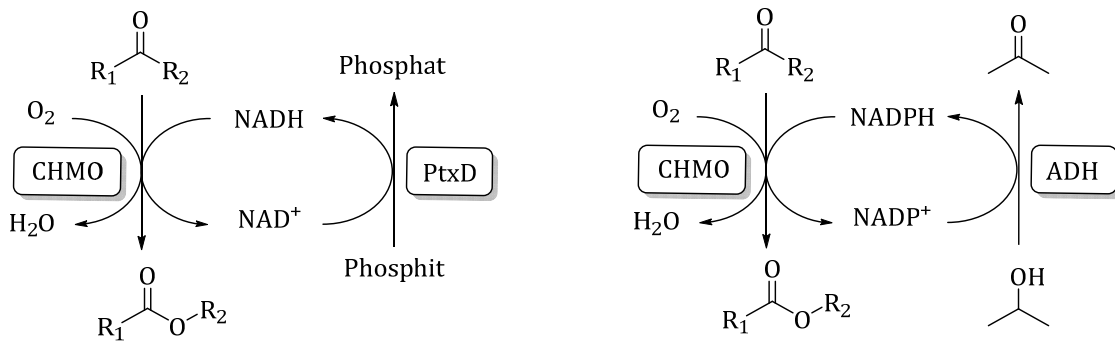


Abbildung 32. Schematische Darstellung für den Einsatz von Phosphit-Dehydrogenase (PtxD)^[158,159] (links) und Alkohol-Dehydrogenase (ADH)^[162] (rechts) zur Cofaktor-Regeneration.

Eine elegante Lösung für die Cofaktor-Regeneration stellten WILLETS *et al.* vor, indem sie eine CHMO mit einer isolierten ADH koppelten (Abbildung 33).^[163,164] Die ADH oxidiert den Alkohol als Substrat zum entsprechenden Keton und reduziert währenddessen das $NADP^+$ zu $NADPH$. Anschließend wird das Keton durch die Monoxygenase zum Lacton umgewandelt und $NADPH$ verbraucht. Diese Art der Cofaktor-Regeneration soll auch in dieser Arbeit Anwendung finden. Ein weiterer Vorteil dieser Reaktionsführung ist der Einsatz von nur sehr geringen Mengen der Cofaktoren $NADP^+$ bzw. $NADPH$ (700 € bzw. 2700 €/g).^[165]

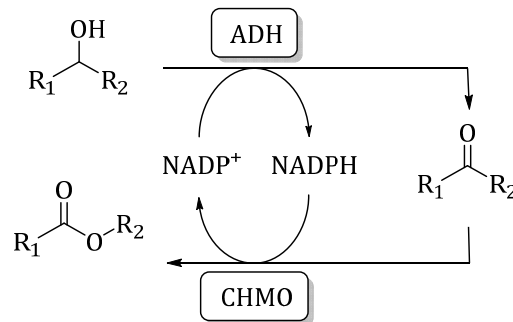


Abbildung 33. Schematische Darstellung des substratgekoppelten Regenerationssystems aus BVMO und ADH.^[163,164]

Neben den bisher erwähnten Methoden zur Cofaktor-Regeneration wurden in neuerer Zeit auch photochemische Verfahren beschrieben. Bei dieser Art der Cofaktor-Regeneration dient Ethyldiamintetraacetat (EDTA) als Elektronendonator, welches unter Lichteinwirkung zerfällt.^[166] Dieses System ist allerdings wenig effizient. Daneben gibt es Ansätze für elektrochemische Verfahren, die zur Zeit jedoch noch nicht ausgereift sind.^[167]

3.3 Eigene Ergebnisse und Diskussion

Die in diesem Teil der Arbeit verwendete Cyclohexanon-Monooxygenase aus *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871 (CHMO, EC 1.14.13.22, Handelsname ECS MO-1 von ENZYMICALS AG) wurde ausschließlich als Rohextrakt eingesetzt. Die verwendeten Chargen der Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* (Lk-ADH, EC 1.1.1.2, DSM 20587) wurden ebenfalls als Rohextrakt eingesetzt und in Glycerin in einer 1:1-Mischung (v/v) aufbewahrt. Die Bearbeitung dieses Forschungsprojektes fand im Rahmen des von der „Deutschen Bundesstiftung Umwelt“ (DBU) geförderten Projekts statt.

3.3.1 Standardreaktion: Doppeloxidation von Cyclohexanol (1) zu ϵ -Caprolacton (3)

Bei der in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Doppeloxidation wird Cyclohexanol (1) durch den Biokatalysator Lk-ADH *in situ* zu Cyclohexanon (2) und dieses anschließend durch die Cyclohexanon-Monooxygenase sofort weiter zu ϵ -Caprolacton (3) oxidiert (Abbildung 34).^[26] Die Enzymaktivitäten der Lk-ADH werden zuvor auf Acetophenon und die der CHMO auf Cyclohexanon (2) als Standard-Reagenz bezogen.

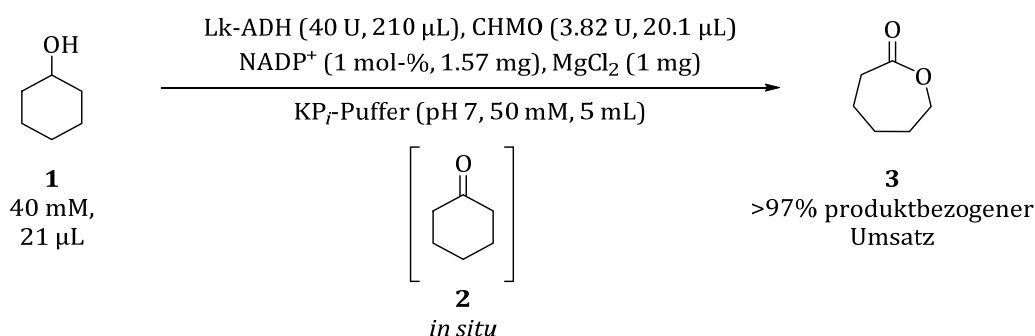


Abbildung 34. Standard-Reaktion der Doppeloxidation von Cyclohexanol (1).^[26]

Bei dieser Reaktion benötigt die CHMO die oxidierte Cofaktorform NADP⁺, welche durch die Lk-ADH als Cofaktor-Regenerationssystem wieder zur reduzierten Form NADPH umgewandelt wird. STAUDT erhielt den höchsten produktbezogenen Umsatz von >97% bei einer Substratkonzentration von 20 mM bei Raumtemperatur und 24 Stunden Reaktionszeit.^[26] Nach aktuellem Kenntnisstand ist diese Doppeloxidation die bis *dato* erste biokatalytische Synthese von ϵ -Caprolacton (3) ausgehend von Cyclohexanol (1).^[26,168]

3.3.2 Etablierung analytischer Methoden

Vor Beginn der synthetischen Arbeiten musste zunächst eine schnelle und robuste Analytik für die enzymatische BAEYER-VILLIGER-Oxidation zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Umsätze erarbeitet werden. Hierzu wurde zum einen eine NMR-Analytik in Kombination mit Urotropin (**51**) als externer Standard etabliert. Zum anderen wurde eine Umsatzbestimmung mittels Gaschromatographie mittels Eichgeraden validiert sowie die Wiederfindungsraten unter verschiedenen Bedingungen bestimmt.

3.3.2.1 Umsatzbestimmung mittels NMR-Analytik

Zur Bestimmung der Umsätze wurde im Anschluss an die Reaktion extraktiv in EPPENDORF-Gefäßen aufgearbeitet. Nach Entfernen des organischen Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der vollständige Reaktionsansatz in NMR-Röhrchen überführt. Urotropin (**51**) diente dabei in Form einer frisch angesetzten Stammlösung (0.17 M in CDCl_3 , 0.1 mL) als externer Standard. Mittels ^1H -NMR-Spektroskopie wurde das Verhältnis von Produkt **3** zum Standard **51** anhand der erhaltenen Integrale ermittelt (Abbildung 35). Das im Spektrum vorhandene Ethylacetat wurde bei der Versuchsdurchführung im Rahmen des Solvenz-Screenings zugegeben und ist für die Bestimmung des Umsatzes nicht von Bedeutung.

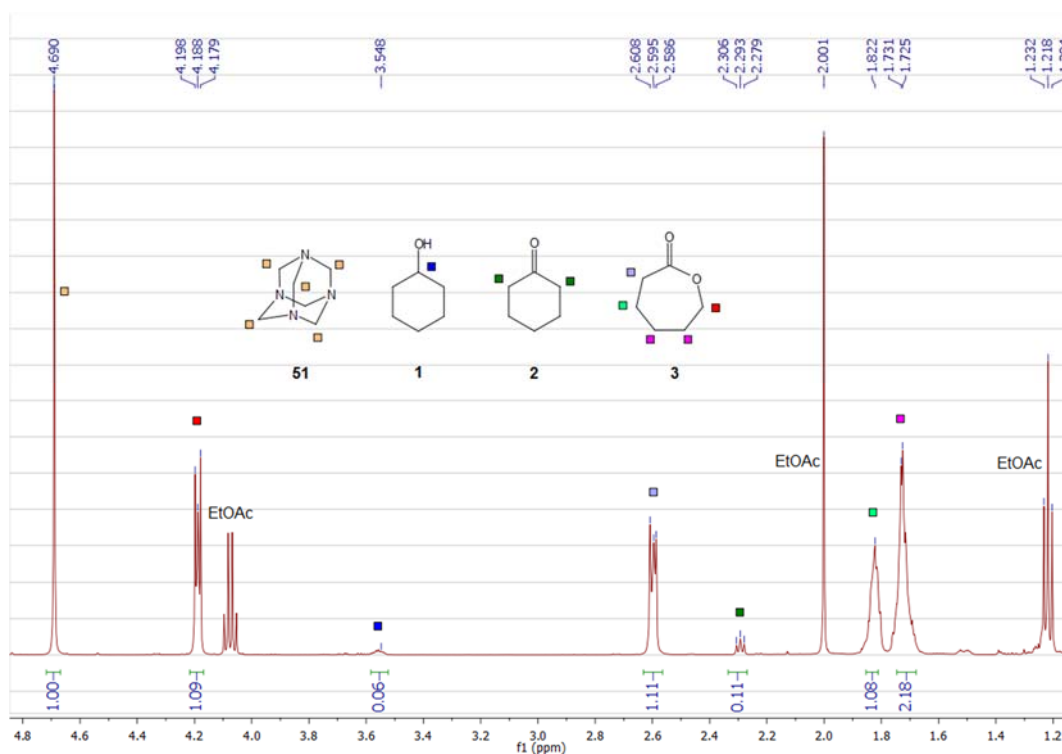


Abbildung 35. Umsatzbestimmung mittels ^1H -NMR-Spektroskopie mit Urotropin (**51**) als externem Standard.

Im vorliegenden Beispiel wurde der Umsatz wie folgt anhand der Integrale bestimmt (Gleichung 1):

$$\text{Umsatz [\%]} = \frac{\int \text{Produkt}}{\int \text{Urotropin}} = \frac{1.10 / 2}{1.00} = 55\% \quad \text{Gleichung 1}$$

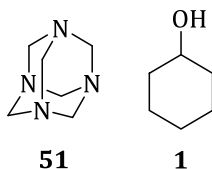
Des Weiteren kann der produktbezogene Umsatz am selben Beispiel nach folgender Gleichung 2 ermittelt werden:

$$\begin{aligned} \text{Umsatz [\%]} &= \frac{\int \text{Produkt}}{\int \text{Edukt} + \int \text{Zwischenprodukt} + \int \text{Produkt}} \\ &= \frac{0.55}{0.05 + 0.03 + 0.55} = 88\% \end{aligned} \quad \text{Gleichung 2}$$

Bei dem Vergleich der beiden Bestimmungsmethoden fällt jedoch auf, dass es große Unterschiede in den mithilfe der Gleichungen 1 und 2 ermittelten Umsätzen gibt. Dieses kann mit der Flüchtigkeit der Komponenten Cyclohexanol (**1**) und Cyclohexanon (**2**) während der extraktiven Aufarbeitung mit anschließendem Entfernen des Lösungsmittels bei vermindertem Druck begründet werden, da in Anwesenheit eines externen Standards nur das Verhältnis der Komponenten untereinander bestimmt werden kann und nicht der quantitative Umsatz. Es wurde somit, soweit nicht anders angegeben, auf die Bestimmung des Umsatzes mittels externem Standard **50** zurückgegriffen.

Die Stabilität des Standards wurde anschließend ermittelt. Dafür wurden Urotropin (**51**) und Cyclohexanol (**1**) eingewogen und das Verhältnis beider Komponenten sofort und erneut nach 24 Stunden Lagerzeit bei Raumtemperatur in einem geschlossenen Gefäß mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt (Tabelle 2). Laut Einwaage liegt das Verhältnis bei 1 : 0.80 (**51** / **1**), nach 24 Stunden wird dasselbe Verhältnis beider Komponenten erhalten. Urotropin (**51**) ist folglich optimal zur Verwendung als externer Standard geeignet.

Tabelle 2. Verhältnis von Urotropin (**51**) und Cyclohexanol (**1**) nach Einwaage und nach 24 Stunden Lagerzeit bei Raumtemperatur.



Eintrag	Verhältnis 51 / 1	Verhältnis 51 / 1
	Einwaage	nach 24 h
1	1 : 0.80	1 : 0.80

3.3.2.2 Umsatzbestimmung mittels Gaschromatographie

Da in $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie nur eine Genauigkeit in den Integralen von $\pm 5\%$ erzielt werden kann, soll eine Umsatzbestimmung mittels Gaschromatographie (GC) etabliert werden. Dafür war es notwendig, zunächst für jede der Komponenten Cyclohexanol (**1**), Cyclohexanon (**2**) und ϵ -Caprolacton (**3**) eine Eichgerade zu generieren, wobei bei der Erstellung der Methoden darauf geachtet werden sollte, dass sich die einzelnen Peaks nicht überlagerten. Es wurde eine Stammlösung der drei Komponenten (je 1 g Substanz / 100 mL DCM) hergestellt. Durch Verdünnung der Stammlösung auf 5 mg/mL, 2.5 mg/mL, 2 mg/mL, 1.75 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1.25 mg/mL und 1 mg/mL wurde eine Eichgerade angefertigt. Ein Beispiel für ein GC-Chromatogramm der drei Komponenten ist in Abbildung 36 dargestellt. Im Anschluss an die Messung kann die vorhandene Stoffmenge sofort bestimmt werden.

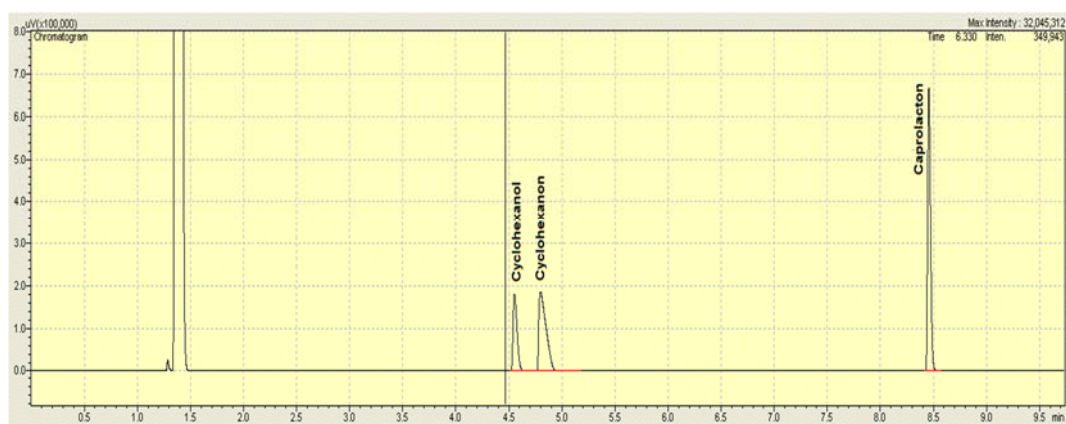


Abbildung 36. Beispiel eines GC-Chromatogramms der drei Komponenten **1**, **2** und **3**.

Die Schwankungsbreite der Umsatzbestimmung mittels Gaschromatographie wurde für die drei Komponenten Cyclohexanol (**1**), Cyclohexanon (**2**) und ϵ -Caprolacton (**3**) ermittelt, indem Lösungen der drei Komponenten unterschiedlicher Konzentration hergestellt und mittels GC in einer Dreifachbestimmung vermessen wurden (Tabelle 3). Die Abweichung beträgt demnach durchschnittlich 0.02 – 0.07 mg/mL bei unterschiedlichen Konzentrationen von 0.8 – 2.8 mg/mL. Somit kann die entwickelte Methode zur Umsatzbestimmung mittels GC als etabliert betrachtet werden. Allerdings kann auch mit dieser validen Analytikmethode das Problem des Verdampfens der einzelnen Komponenten während der Aufarbeitung nicht verhindert werden. Daher wurde in einem separaten Experiment die Rückgewinnungsrate während der Aufarbeitung untersucht (Abschnitt 3.3.2.3).

Tabelle 3. Bestimmung der Durchschnittsabweichung der Komponenten **1**, **2** und **3**.

Eintrag	Komponente	Einwaage [mg] ^{a)}	Abweichung [%] ^{a) b)}
1	1	0.93 – 2.49	2-4
2	2	0.81 – 1.58	1
3	3	1.25 – 2.75	2-5

a) Für exakte Messdaten siehe Kapitel 7.2.1.3.2. b) angegeben sind die minimalen und maximalen Abweichungen in %.

3.3.2.3 Ermittlung der Rückgewinnungsrate

Um die Rückgewinnungsraten von den Komponenten **2** und **3** zu erhalten, wurde die Aufarbeitung der Reaktion simuliert und die Rückgewinnungsrate abhängig von der jeweiligen Methode auf zwei Wegen ermittelt (Abbildung 37).

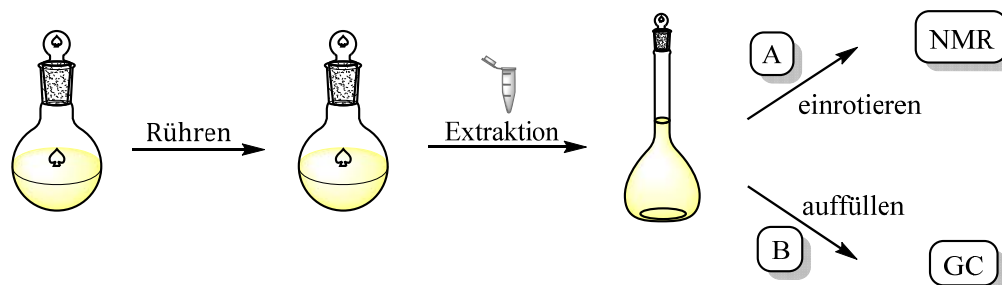
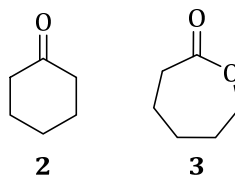


Abbildung 37. Schematische Darstellung der Aufarbeitungsmethoden für A) die NMR-Spektroskopie und B) die GC.

Zur Bestimmung der Rückgewinnungsrate mittels NMR-Spektroskopie wurden Cyclohexanon (**2**) bzw. ϵ -Caprolacton (**3**, je 40 mM) in KP_i -Puffer (5 mL) über einen Zeitraum von 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die jeweilige Lösung extraktiv aufgearbeitet, das Lösungsmittel entfernt und der gesamte Kolbeninhalt in ein NMR-Röhrchen überführt. Mithilfe des externen Standards **50** wurden die Wiederfindungsraten mittels NMR-Spektroskopie ermittelt, die bei sehr guten 91 – 98% lagen. Dieses entspricht einem Verlust von 9% bei Cyclohexanon (**2**) und von 2% beim ϵ -Caprolacton (**3**) (Tabelle 4).

Tabelle 4. Rückgewinnungsrate der Substanzen **2** und **3** nach simulierter Aufarbeitung nach 24 h Rühren bei RT.



Eintrag	Substanz	Rückgewinnungsrate [%] *
1	2	91
2	3	98

* ermittelt mittels NMR mit Urotropin (**51**) als Standard.

Die Rückgewinnungsrate wurde parallel dazu mit der GC-Methode bestimmt, wobei das Augenmerk dabei auf die unterschiedlichen Rückgewinnungsraten bei unterschiedlichen Konzentrationen gelegt wurde. Dafür wurden die Komponenten **1**, **2** und **3** in verschiedenen Konzentrationen (20 – 80 mM) eingewogen und für 24 Stunden in KP_i -Puffer (5 mL) gerührt. Im Anschluss an die extraktive Aufarbeitung wird das Lösungsmittel entfernt, der Kolbeninhalt in ein Maßkolben überführt und dieser zum Eichstrich aufgefüllt (Abbildung 37, B). Daraus werden drei Proben entnommen und mittels Fünffachbestimmung mittels GC vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 aufgezeigt.

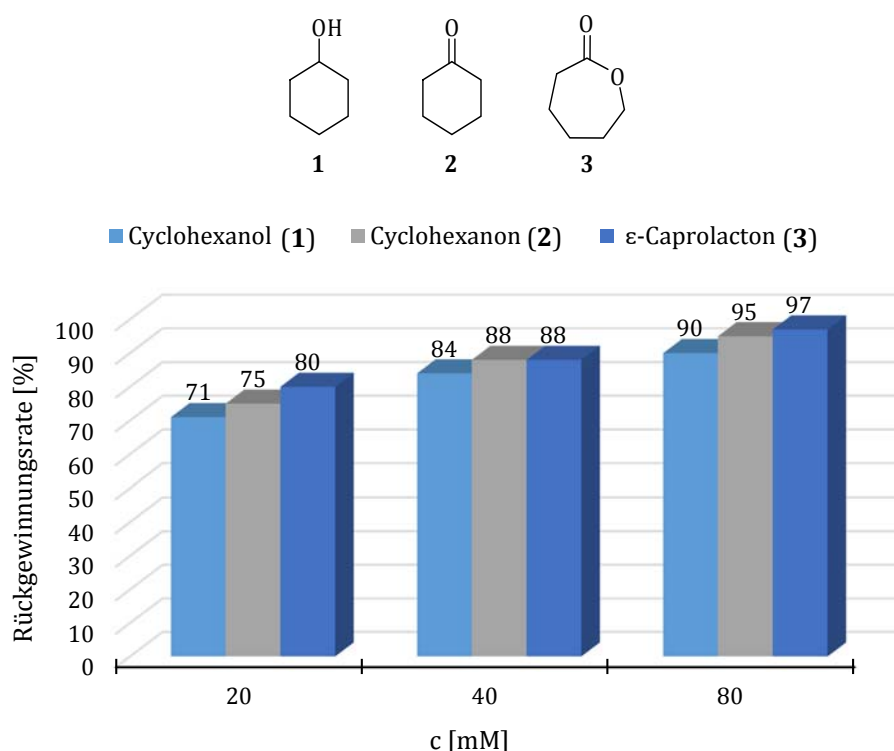


Abbildung 38. Rückgewinnungsrate der Komponenten **1**, **2** und **3** bei unterschiedlichen Konzentrationen, ermittelt mittels GC.

Mit zunehmender Konzentration steigt die Rückgewinnungsrate von 71 – 80% bei 0.1 mM auf hervorragende 90 – 97% bei einer Konzentration von 0.4 mM an. Bemerkenswert ist dabei, dass die Rückgewinnungsraten bei allen Konzentrationen für Cyclohexanol (**1**) am niedrigsten und für das Lacton **3** am höchsten sind. Auch dieses Ergebnis ist mit der Flüchtigkeit der Substanzen zu begründen, da bei höheren Konzentrationen insgesamt ein geringerer Anteil des Substrates notwendig ist, um die Atmosphäre im Reaktionsgefäß zu sättigen, und somit der Verlust geringer ist. Des Weiteren spielt der Verteilungskoeffizient der einzelnen Substanzen während Aufarbeitung eine wichtige Rolle. Der logP-Wert ist charakteristisch für jede einzelne Verbindung und somit auch die Effizienz des jeweiligen Extraktions-Vorgangs aus einer wässrigen Phase.

Die zunächst aus vorhergehenden Arbeiten^[26] übernommene Extraktionsmethode in EPPENDORF-Gefäßen wurde optimiert. Anfangs wurde die obere wässrige Phase in neue EPPENDORF-Gefäße überführt und das Enzym-Pellet mit der organischen Phase (DCM) zurückgelassen, sodass in den nächsten Extraktionsschritten nur die wässrige Phase weiter extrahiert werden konnte (Abbildung 39). Bei der neuen Extraktionsmethode wird die untere organische Phase aus dem EPPENDORF-Gefäß in ein Sammelgefäß gegeben und die zurückbleibende wässrige Phase, die noch das Enzym-Pellet enthält, erneut mit Lösungsmittel versetzt. Durch diese Änderung wird eine höhere Rückgewinnungsrate erzielt, da noch weitere Substanz aus dem Pellet erhalten werden kann. Somit konnte die gesamte in der Biotransformation eingesetzte Stoffmenge quantitativ zurückerhalten werden, während bei der bisherigen Aufarbeitungsmethode nur etwa 84% der Stoffmenge nachgewiesen werden konnten.

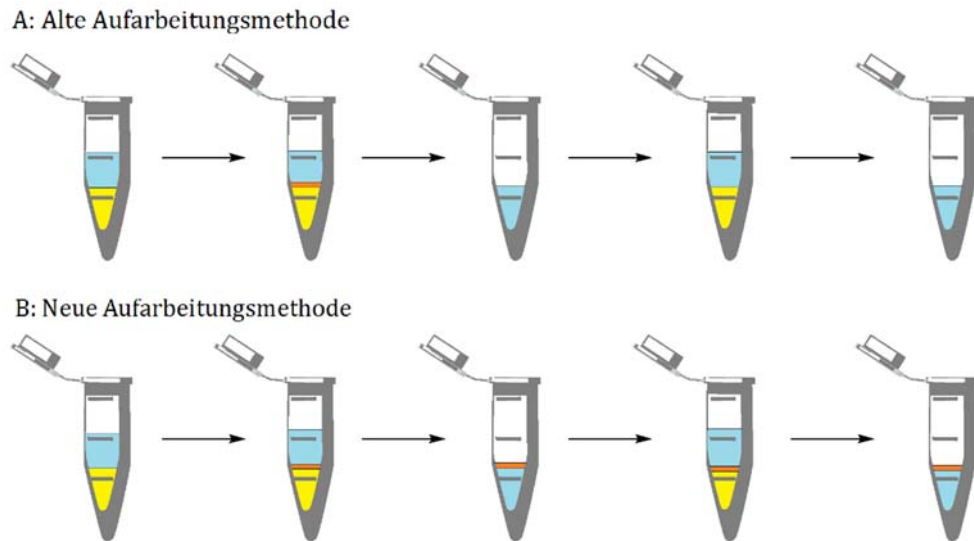


Abbildung 39. Alte (A) und neue (B) Aufarbeitungsmethode mittels EPPENDORF-Gefäßen. Dabei ist die wässrige Phase in blau, die organische Phase in gelb und das Enzym-Pellet in orange dargestellt.

Während der Aufarbeitung wird die in der Reaktionsmischung enthaltene Lk-ADH durch das organische Lösungsmittel denaturiert und bildet ein Enzym-Pellet, welches außer Lösungsmittelmolekülen auch Substrat einschließen kann. Es wurde folglich die Rückgewinnungsrate in Anwesenheit der Lk-ADH erneut bestimmt und mit der Rückgewinnung in Abwesenheit des Enzyms verglichen (Abbildung 40).

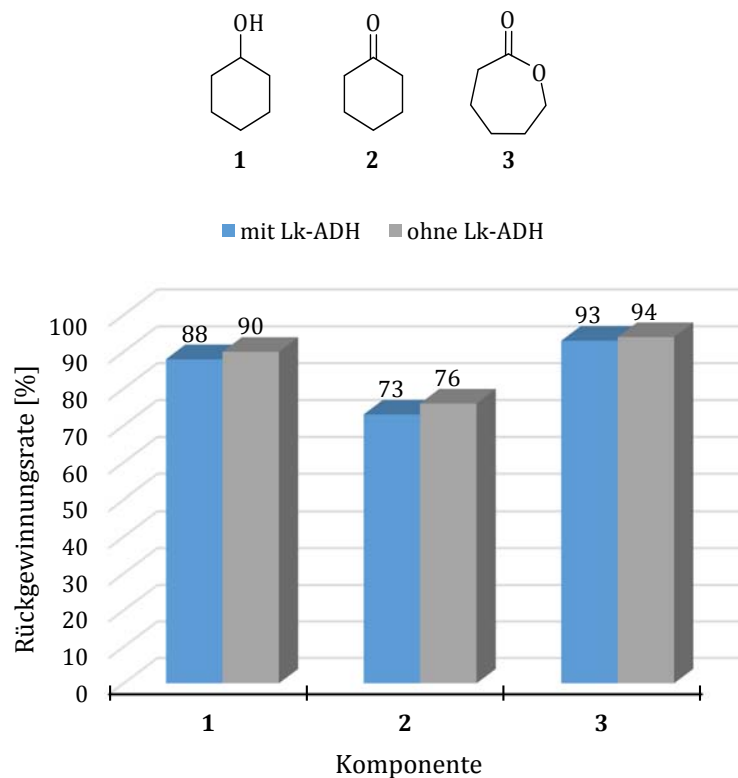


Abbildung 40. Bestimmung der Rückgewinnungsrate von Cyclohexanol (1), Cyclohexanon (2) und Lacton 3 in Anwesenheit und in Abwesenheit von Lk-ADH. Die Zentrifugierzeit betrug in allen Fällen 3 x 30 Minuten.

Dabei wurde die für die Standardreaktion typische Menge an Enzym eingesetzt. Die Anwesenheit der Lk-ADH während der Reaktion mit anschließender Bildung des Enzym-Pellets hat hierbei nur eine Verringerung der Wiederfindung von 1 – 3% zur Folge. Die Rückgewinnungsrate von ϵ -Caprolacton (**3**) wurde auch mit größeren Enzymmengen untersucht. Gleichzeitig wurde die Zentrifugierzeit während der Aufarbeitung von 3 x 30 min auf 3 x 5 Minuten verkürzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 41 aufgezeigt.

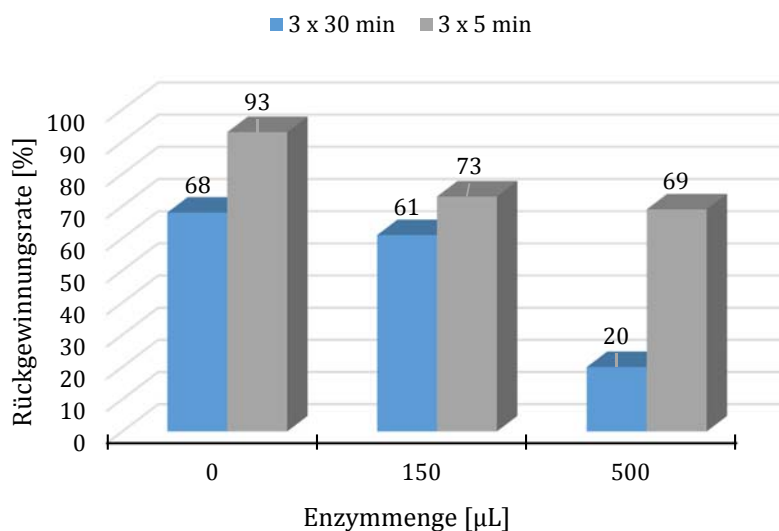


Abbildung 41. Bestimmung der Rückgewinnungsrate von ϵ -Caprolacton (**3**) bei verschiedenen Enzymmengen und bei unterschiedlichen Zentrifugierzeiten.

Die Rückgewinnungsrate sinkt mit steigendem Enzymgehalt der Mischung, was auf einen Einschluss von Substrat im Enzym-Pellet hindeutet. Dieses Pellet wird wahrscheinlich mit zunehmender Dauer des Zentrifugierens fester und stärker komprimiert, sodass das darin enthaltene Substrat auch durch mehrfaches Waschen nicht herausgespült werden kann. Auch konnte festgestellt werden, dass sich bei lang andauernder Zentrifugierzeit Rillen in den EPPENDORF-Gefäßen bildeten, durch die Teile der Lösungen in die Zentrifuge auslaufen konnten. Die Enzymmengen sollten folglich möglichst gering und die Zentrifugierzeit kurz gehalten werden.

3.3.2.4 Vergleich der Analytik-Methoden anhand der Standard-Reaktion

Im Anschluss wurden die beiden etablierten Methoden, die ^1H -NMR-Spektroskopie mittels externem Standard sowie die Gaschromatographie, mithilfe der erstellten Eichgerade anhand einer Standard-Reaktion miteinander verglichen (Abbildung 42).

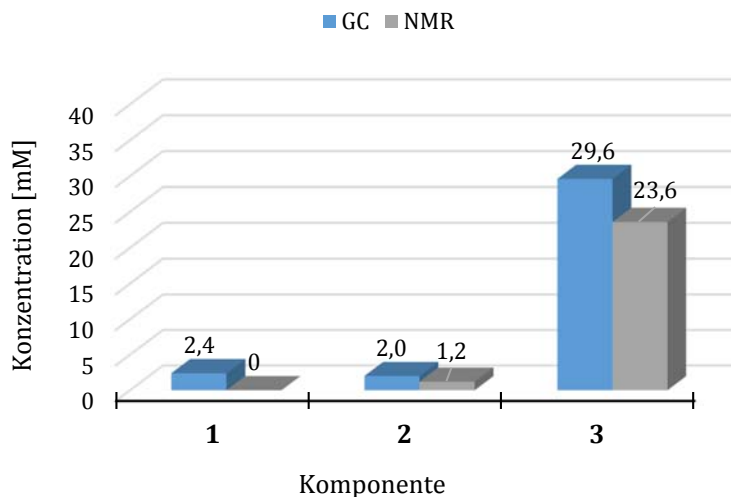
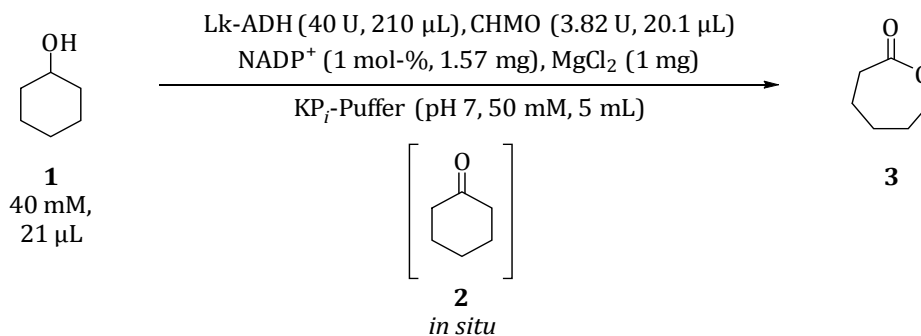


Abbildung 42. Vergleich der Analytik-Methoden nach extraktiver Aufarbeitung im Anschluss an eine Reaktion: GC vs. $^1\text{H-NMR}$.

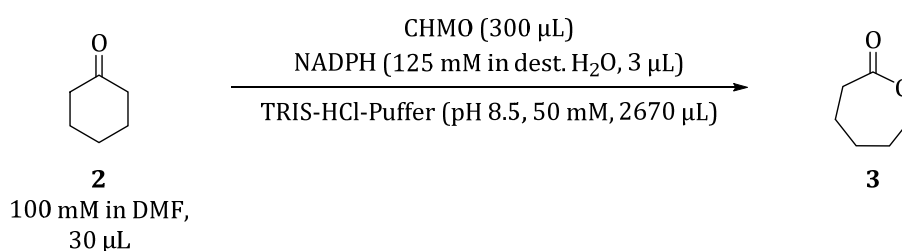
Dabei ist ersichtlich, dass bei den drei Komponenten Cyclohexanol (**1**), Cyclohexanon (**2**) sowie ϵ -Caprolacton (**3**) mittels GC in allen Fällen ein höherer Umsatz bestimmt werden konnte. Dieses kann mit den in den Methoden selbst vorhandenen Fehlern erklärt werden. Auch reagiert das GC vor allem bei niedrigeren Konzentrationen, wie es in diesem Beispiel beim Edukt **1** der Fall ist, sensibler, da im NMR-Spektrum Komponenten niedriger Konzentration im Signalrauschen untergehen können. Der Unterschied in der Produktkonzentration von 6 mM bei ϵ -Caprolacton (**3**) jedoch muss auf andere Ursachen zurückgeführt werden. Dabei können Wägefehler etc. ausgeschlossen werden, da beide Analysen mit demselben Reaktionsansatz durchgeführt worden sind. Zudem entfällt bei der GC-Analytik der Schritt des Entfernens des Lösungsmittels, sodass das teilweise Verdampfen der Substrate vermieden werden kann. Aus diesem Grund ist die Analytik mittels GC die Methode der Wahl für diese Arbeit.

3.3.2.5 Aktivitätsbestimmung mittels UV/Vis-Spektroskopie und BRADFORD-Test

Bei der Bestimmung der Aktivität eines Enzyms mittels UV/Vis-Spektroskopie wird der von NADPH durch Oxidation zu NADP^+ bzw. die Bildung von NADP^+ , welches bei einer anderen Wellenlänge adsorbiert, in Gegenwart des Substrats bei einer Wellenlänge von 340 nm zeitlich verfolgt. Aus der Anfangssteigung der erhaltenen Absorptionskurve wird die auf die Katalysatormenge (in mL) berech-

nete Aktivität bestimmt und mittels Gleichung 4 (Kapitel 7.2.1.4.1) berechnet. Da die Reagenzien nach dem Zusammengeben gut geschüttelt werden müssen, startet die Messung mit einigen Sekunden Verzögerung. Aus diesem Grund ist zu erwarten, dass die ermittelte Aktivität etwas geringer als die tatsächliche ausfällt. In solchen Fällen ist es wichtig, die Enzymlösung entsprechend zu verdünnen, um eine Linearität der Messgeraden der Anfangssteigung zu gewährleisten.

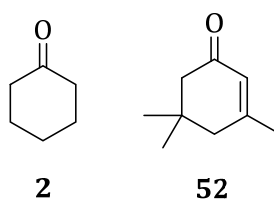
Tabelle 5. BVMO-Screening zur Oxidation von Cyclohexanon (**2**).



Eintrag	BVMO	Aktivität [U/mL _{Rohextrakt}]	Aktivität [U/mg _{Protein}]	Relative Aktivität [%]
1	ECS Mo-01	7.38	3.00	100
2	ECS Mo-03	0.50	0.20	7
3	ECS Mo-05	0.14	0.05	2

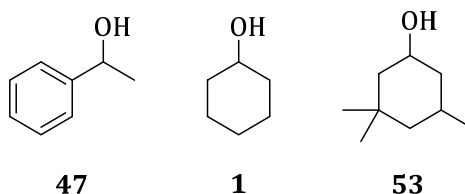
Die Aktivität der CHMO wurde in Gegenwart von Cyclohexanon (**2**, 1 mM) als Substrat bestimmt, indem der Verbrauch des Cofaktors NADPH zu NADP⁺ beobachtet wird. Diese beträgt demnach 0.082 U/mL. Mithilfe eines Enzymscreenings mit den von ENZYMICALS AG zur Verfügung gestellten Monooxygenasen ECS Mo-03, einer Phenylacetone-Monooxygenase (PAMO), sowie ECS Mo-05, einer *p*-Hydroxyacetophenon-Monooxygenase (HAPMO), mit Cyclohexanon (**2**) als Standardsubstrat sollten die Aktivitäten mit der von CHMO (ECS Mo-01) verglichen werden. Da alle drei BVMOs in flüssiger Form erhalten wurden, kann kein direkter Vergleich der mittels UV/Vis-Spektroskopie erhaltenen Aktivitäten (U/mL) erfolgen. Durch einen BRADFORD-Test wurde im Anschluss der Proteingehalt der einzelnen BVMOs bestimmt und daraus die Aktivität pro mg Protein (U/mg) ermittelt. Die erhaltene Aktivität der CHMO (ECS Mo-01) beträgt 3.00 U/mg und wurde gleich 100% gesetzt. Im Vergleich dazu beträgt die relative Aktivität der ECS Mo-03 und der ECS Mo-05 nur 7% bzw. 2% (Tabelle 5).

Da das Substratspektrum der enzymatischen Doppeloxydation durch die CHMO erweitert werden soll, wurde die Enzymaktivität gegenüber Isophoron (**52**, 1 mM) als mögliches weiteres Substrat bestimmt. Die erhaltene Aktivität werden auf die des Cyclohexanons (**2**) als Referenzsubstanz bezogen, welches gleich 100% gesetzt wird, um eine relative Aussage über die Enzymaktivität treffen zu können (Tabelle 6). Dabei konnte eine Aktivität der CHMO gegenüber Isophoron (**52**) von nur 0.003 U/mg im Vergleich zur Aktivität gegenüber Cyclohexanon (**2**) von 0.101 U/mL nachgewiesen werden. Die relative Aktivität der CHMO gegenüber Isophoron (**52**) beträgt demnach nur 3%, was unter den gegebenen Reaktionsbedingungen eine schwierige Reaktionsführung ist.

Tabelle 6. Bestimmung der Aktivität von CHMO gegenüber Isophoron (**52**).

Eintrag	Substrat	Aktivität [U/mg]	Relative Aktivität [%]
1	2	0.101	100
2	51	0.003	3

Die Aktivität der Lk-ADH wurde gegenüber dem Standard-Substrat 1-Phenylethanol (**47**, 10 mM) bestimmt und gleich 100% relative Aktivität gesetzt (Tabelle 8). Anschließend wurden sowohl Cyclohexanol (**1**, 10 mM) als auch 3,3,5-Trimethylcyclohexanol (**52**, 10 mM) auf gleiche Weise vermessen. Cyclohexanol (**1**) besitzt dabei eine relative Aktivität von 153% (33.0 U/mL), wird also demnach von der Lk-ADH sehr gut als Substrat akzeptiert. Die Lk-ADH weist gegenüber dem Alkohol **53** jedoch keine Aktivität auf. Eventuell ist die Reaktionszeit von 3 Minuten in diesem Fall nicht ausreichend, sodass bei einer verlängerten Reaktionsdauer von beispielsweise 24 Stunden trotzdem Produkt gebildet werden kann.

Tabelle 7. Bestimmung der Aktivität der Lk-ADH gegenüber 3,3,5-Trimethylcyclohexanol (**53**) im Vergleich zu 1-Phenylethanol (**47**) und Cyclohexanol (**1**).

Eintrag	Substrat	Aktivität [U/mL]	Relative Aktivität [%]
1	47	21.5	100
2	1	33.0	153
3	53	0	0

3.3.2.6 Optimierung der Standardreaktion

Es ist in der Literatur bereits bekannt, dass bei einer Konzentration des Lactons **3** höher als 60 mM eine Inhibierung der CHMO auftritt.^[26] Um Produktinhibierungen zu vermeiden, wurden in den letzten Jahren verschiedene Methoden zur *in situ*-Produktentfernung entwickelt, darunter der Einsatz von Adsorberharzen^[169,170], worauf im Kapitel 3.3.4 eingegangen wird, sowie die Verwendung von Zweiphasen-Systemen.^[171-173] Hydrophobe Lösungsmittel, also solche mit hohen logP-Werten, besitzen im Gegensatz zu hydrophilen Solventien nicht die Fähigkeit, das am Enzym gebundene essentielle Wasser, welches als Substrathülle fungiert, zu entfernen, was zu einer Verringerung der Enzymaktivität führen

würde.^[174] In einem zweiphasigen System befinden sich das Enzym und die hydrophilen Komponenten in der wässrigen Phase, während die hydrophoben Anteile in der organischen Phase vorhanden sind. In der Literatur wurde beschrieben, dass für die BAEYER-VILLIGER-Oxidation von benzolgebundenen Ketonen durch Katalyse durch die Monooxygenasen PAMO und HAPMO höhere Umsätze durch Verwendung von verschiedenen organischen Lösungsmitteln in einer 5% (v/v) Konzentration erzielt werden können.^[112] Der Einsatz eines zweiphasigen Reaktionsmediums kann auch dazu dienen, die CHMO zu stabilisieren, wenn mit hohen Substratkonzentrationen gearbeitet werden soll. Zudem ist auch bekannt, dass die getesteten Monooxygenasen unterschiedliche organische Lösungsmittel tolerieren.^[172,173]

Ausgehend vom Standard-Versuch aus Kapitel 3.3.2.4 wurde zunächst der Lösungsmittelleffekt untersucht. Dafür sollte sowohl das organische Lösungsmittel als auch die Konzentration variiert werden (Abbildung 43). Die Bestimmung der Stoffmenge ist bei den gezeigten Reaktionen auf zwei Wegen durchgeführt worden. In den meisten Fällen ist die Stoffmenge mittels ¹H-NMR-Spektroskopie mit Urotropin (**51**) als externer Standard bestimmt worden. Bei den Reaktionen mit 10% organischem Lösungsmittel sowie mit Methylcyclohexan-gesättigtem Puffer wurden die Stoffmengen mittels GC-Methode ermittelt. Der Umsatz des Benchmark-Versuchs in Puffer (vgl. Kapitel 3.3.2.4) wurde ebenfalls mittels GC bestimmt und dient zum Vergleich. Dabei ist der in Kapitel 3.3.2.3 bestimmte Verlust der Substanzen mit bis zu 10% pro Komponente bei den hier verwendeten geringen Konzentrationen zu berücksichtigen.

Zunächst ist ein großer Unterschied der Reaktionen in Puffer und dest. Wasser zu erkennen. Der geringere Umsatz in Wasser ist mit einer möglichen Veränderung des pH-Wertes des ungepufferten Systems zu erklären, die durch hydrolytische Spaltung des gebildeten Lactons **3** auftreten kann.

Allgemein konnte gezeigt werden, dass die enzymatische BAEYER-VILLIGER-Oxidation auch in Anwesenheit eines organischen Lösungsmittels stattfindet. Zwar liefert die Oxidation in einem zweiphasigen System allgemein geringere Umsätze als in reinem Puffer, jedoch wird dieser negative Effekt teilweise durch eine bessere Löslichkeit des Lactons **3** in dem Lösungsmittel-Gemisch aufgehoben. Ähnliche Ergebnisse beschrieben DE GONZALO *et al.* bei der BVMO-katalysierten Oxidation von organischen Sulfiden in Zweiphasen-Systemen.^[173] Biokatalytische Reaktionen laufen im Allgemeinen langsam ab in Lösungsmitteln mit logP-Werten <2, mäßig bei logP-Werten zwischen 2 und 4 und schnell mit hohen logP-Werten von >4, was mit den jeweiligen Fähigkeiten des Lösungsmittels zusammenhängt, das das Enzym umgebende essentielle Wasser zu entfernen.^[175] Der höchste Umsatz von 87% konnte mit 10% Isooctan (v/v) erzielt werden. Dieses ist nicht weiter überraschend, da Isooctan von den hier verwendeten Lösungsmitteln den höchsten logP-Wert von 4.54 besitzt.^[176]

Die Umsätze mit jeweils 10% (v/v) Methylcyclohexan (logP = 3.88)^[177] und Toluol (logP = 2.73)^[177] sind geringer und folgen dem Trend.^[177] *n*-Heptan hätte mit einem logP-Wert von 4.40^[176] jedoch einen höheren Umsatz ähnlich dem von Isooctan liefern sollen. Mäßige Umsätze von 35 – 49% wurden mit Lösungsmittel-gesättigtem KP_i-Puffer (pH 7, 50 mM) erhalten.

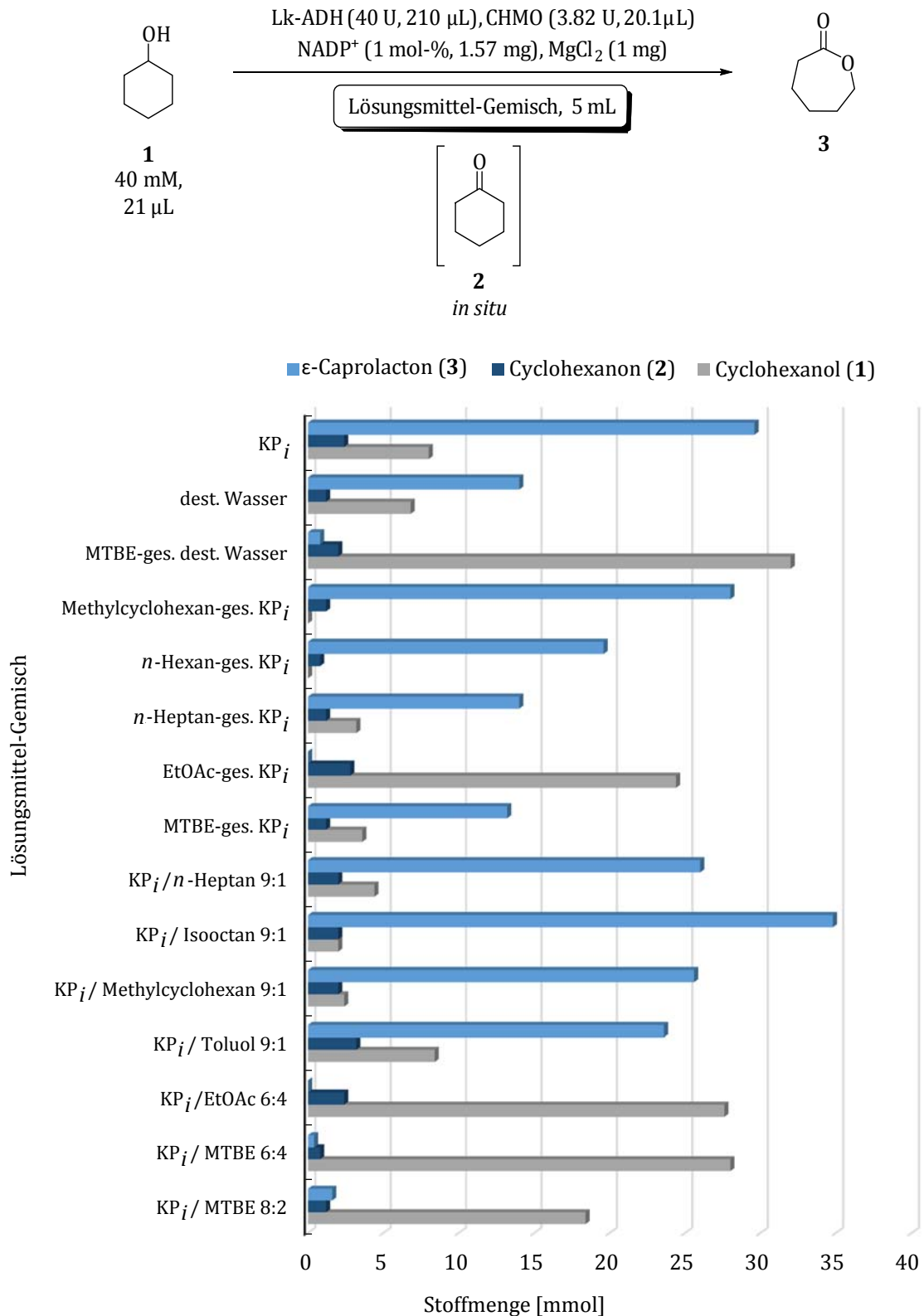


Abbildung 43. Variation des Lösungsmittelgemisches bei der Doppeloxidation von Cyclohexanol (**1**). Angegeben ist der Umsatz der Komponenten **2** und **3** sowie die nicht umgesetzte Stoffmenge von **1**. Die Reaktion in PK_i-Puffer ist in Kapitel 3.3.2.4 im Detail beschrieben und dient hier zum Vergleich als Standard-Reaktion.

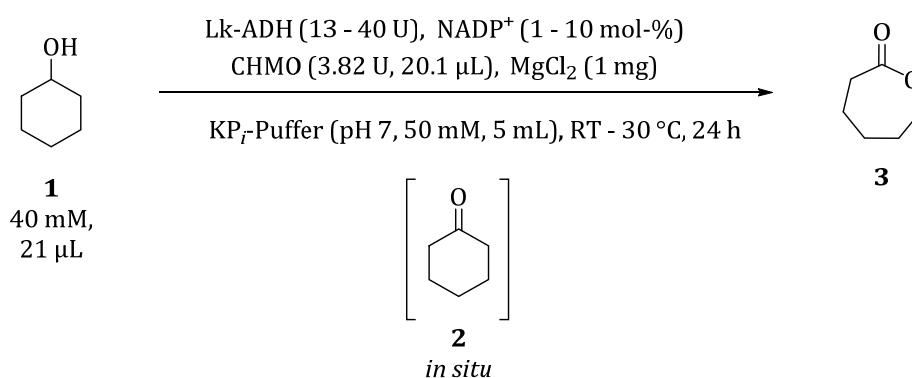
Gemische mit 20 bzw. 40% (v/v) organischem Lösungsmittel lieferten praktisch kein Lacton **3**. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass mit anderen Monooxygenasen keine Umsätze in Anwesenheit

des Essigesters **5** ($\log P = 0.68$) erhalten werden konnten.^[173,175] Dieses ist auch hier der Fall. Für die Lk-ADH scheint die Verwendung des Essigesters **5** als Lösungsmittel jedoch kein Hindernis zu sein, denn es konnten bis zu 6% des Cyclohexanons (**2**) als Zwischenstufe nachgewiesen werden. Wahrscheinlich lief die Oxidation von Cyclohexanol (**1**) zum Keton **2** so weit ab, bis der hinzugegebene Cofaktor vollständig zu NADPH reduziert worden ist und die Reaktion stagnierte. Es ist auch bekannt, dass die Lk-ADH ihre spezifische Aktivität und Stabilität in Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln mit $\log P$ -Werten <3.5 einbüßt.^[153]

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die Zugabe von 10% Isooctan (v/v), einem Lösungsmittel mit hohem $\log P$ -Wert, zur Reaktionsmischung immer noch zu hervorragenden Umsätzen bis zu 87% führt. Da die Ansätze stets nach 24 Stunden beendet worden sind, könnte hier eine Verlängerung der Reaktionszeit zu einer quantitativen Reaktion führen. Des Weiteren sollte untersucht werden, inwiefern unter diesen Bedingungen eine Produktinhibierung auftritt, wenn bei Konzentrationen von über 80 mM gearbeitet wird.

Anschließend wurde der Standard-Versuch bei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. So wurde die Menge des Cofaktors, die Menge der Lk-ADH sowie die Reaktionstemperatur variiert (Tabelle 8).

Tabelle 8. Variation der Reaktionsbedingungen der Oxidation von Cyclohexanol (**1**).



Eintrag	NADP+ [mol-%]	Lk-ADH [U]	T [°C]	Umsatz 3 [%] ^{b)}	Umsatz 2 [%] ^{b)}
1 ^{a)}	1	40	RT	97	3
2	2	40	RT	97	0
3	10	40	RT	61	11
4	1	40	30	48	5
2	1	13	RT	55	3

a) Standard-Reaktion; b) Umsatz bestimmt mittels ¹H-NMR-Spektroskopie, angegeben ist der produktbezogene Umsatz.

Eine vermehrte Zugabe von NADP⁺ zur Reaktionsmischung hat demnach keinen positiven Einfluss auf den Umsatz. Bei einer Erhöhung der Cofaktormenge auf 2 mol-% wurden ebenfalls 97% des Lactons **3** erhalten. Die Zugabe von 10 mol-% von NADP⁺ lieferte im Vergleich zur Standard-Reaktion (Eintrag 1) nur noch etwa 2/3 des Umsatzes (Eintrag 2); dazu passend konnten 11% an Cyclohexanon (**2**) ermittelt werden. Diese Tatsache spricht dafür, dass die Oxidation von Cyclohexanol (**1**) zum Keton **2** durch die Lk-ADH sehr viel schneller abläuft als die Oxidation von **2** zum Lacton **3** durch die Monooxygenase. Dieses deutet darauf hin, dass bei der verwendeten Cofaktor-Konzentration der MICHAELIS-Konstante,

der K_M -Wert, überschritten worden ist. Der K_M -Wert gibt diejenige Konzentration an, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit der halben Maximalgeschwindigkeit v_{max} entspricht. Bei weiterer Erhöhung der Konzentration wird schließlich v_{max} angestrebt und eine Sättigung tritt ein, da alle aktiven Zentren der Enzyme besetzt sind. Es ist bekannt, dass $NADP^+$ fest im Enzym in seiner reduzierten Form gebunden ist und das sonst labile C4a-Hydroperoxyflavin (**36**) der CHMO solange stabilisiert, bis ein Substrat verfügbar ist.^[178] Liegt nun in der Reaktionsmischung ein Überschuss an $NADP^+$ im Vergleich zum Substrat vor ($[S] > K_M$), so kommt es in solchen Fällen zu einer kompetitiven Inhibierung bezüglich $NADPH$. Diese Art der Hemmung des Enzyms kann jedoch durch Erhöhung der Substratkonzentration wieder rückgängig gemacht werden.

Die Erhöhung der Temperatur von 20 °C auf 30 °C führte lediglich zu 48% Umsatz (Eintrag 4). Die Halbwertszeit der isolierten CHMO beträgt laut Literatur bei 25 °C und pH 8,5, dem Optimum seiner katalytische Aktivität, etwa einen Tag^[179], sodass davon ausgegangen werden kann, dass die katalytische Aktivität der CHMO bei einer Reaktionstemperatur von 30 °C bereits rapide gesunken ist. Die Monooxygenase wird als das kritischere Enzym in diesem System angesehen, da die Lk-ADH für ihre Stabilität in Anwesenheit von hydrophoben Molekülen in großen Molekülen bekannt ist.^[26] Ein Weg, die CHMO zu stabilisieren, ist die Immobilisation auf einem Träger.

Der Einfluss der Verringerung der Enzymmenge von Lk-ADH auf den Reaktionsverlauf wurde ebenfalls untersucht (Eintrag 5), da für die Reaktion die zehnfache Menge an Units der Alkoholdehydrogenase verwendet im Vergleich zur CHMO wird. Es konnten demnach auch mit nur einem Drittel der bisher verwendeten Menge an Lk-ADH ein immer noch guter Umsatz von 55% Lacton **3** erhalten werden. Eventuell könnte hier eine Verlängerung der Reaktionszeit zu einem vollständigen Umsatz führen, was zu Kosteneinsparungen in Hinblick auf den Preis der Alkohol-Dehydrogenase führen kann.

3.3.3 Untersuchungen mittels Titrations-Apparatur

Mithilfe der Titrimetrie-Apparatur kann der Umsatz einer Reaktion bestimmt werden, indem D-Glucose (**47-a**)/ Glucose-Dehydrogenase (GDH) bei der Reaktion, in diesem Fall die Reduktion von Acetophenon (**46**) durch die Lk-ADH, als Cofaktor-Regenerationssystem eingesetzt wird (Abbildung 44). Dabei wird D-Glucose (**48-a**) über die Zwischenstufe Gluconolacton (**49-a**) zu Gluconsäure (**50-a**) umgewandelt. In der Apparatur wird diese Säure mit Natronlauge bekannter Konzentration gegentitriert. Nach Beenden der Reaktion kann direkt die Menge an verbrauchter NaOH abgelesen und daraus der Umsatz ermittelt werden.

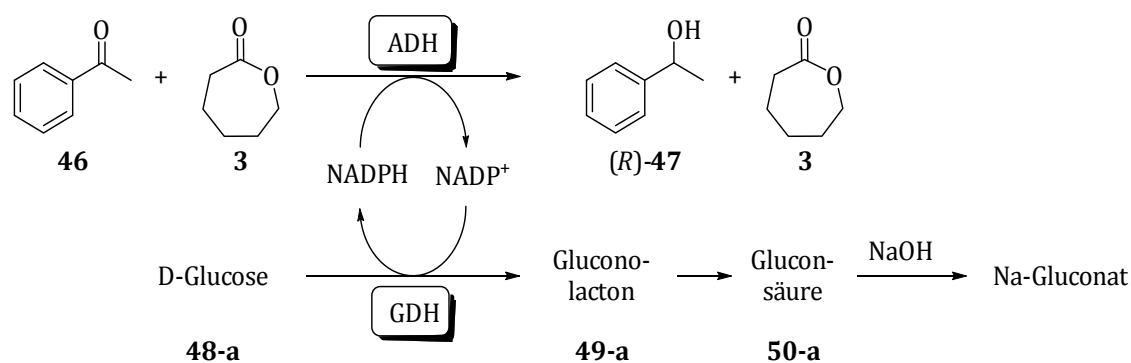


Abbildung 44. Oxidation von Acetophenon (**46**) durch Lk-ADH in Anwesenheit von ϵ -Caprolacton (**3**) mit D-Glucose (**48-a**) / GDH als Cofaktor-Regenerationssystem.

Zunächst sollte die Inhibierung der Lk-ADH durch ϵ -Caprolacton (**3**) in unterschiedlichen Konzentrationen über einen Zeitraum von 24 Stunden untersucht werden (Abbildung 45). Dafür wurde Acetophenon (**4**), welches als Standardsubstrat für die Lk-ADH fungiert, zu Phenylethanol ((*R*)-**47**) reduziert.

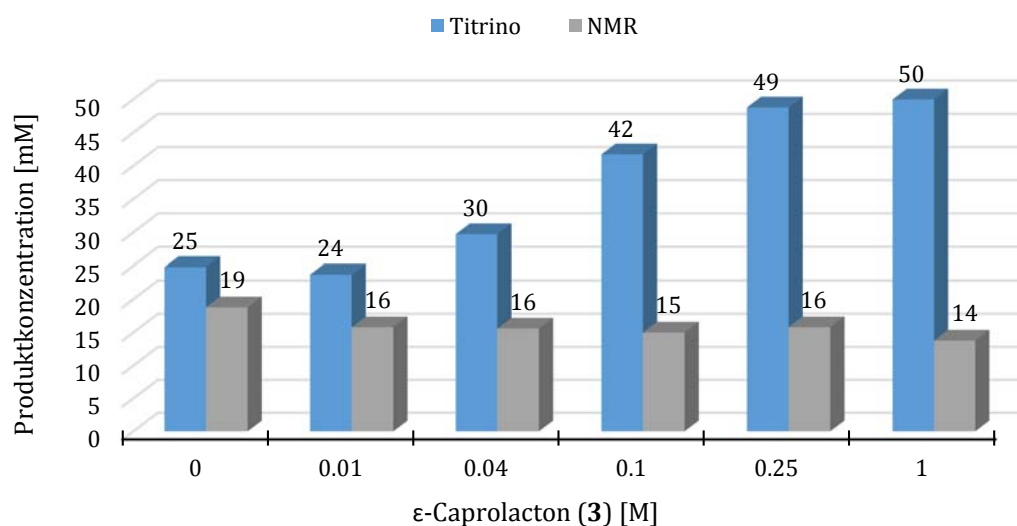


Abbildung 45. Untersuchung der Inhibierung der Lk-ADH durch ϵ -Caprolacton (**3**). Die Reaktionen bei 0.25 und 1 M Lacton-Konzentration wurden automatisch nach 3.5 h Reaktionszeit beendet.

Die Produktkonzentrationen wurden im Anschluss zum einen ausgehend von der verbrauchten Menge an Natronlauge während der Reaktion ermittelt. Zum anderen wurden die Produktkonzentrationen des gebildeten Phenylethanol (*R*)-**47** im Anschluss an die extractive Aufarbeitung mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie mit Urotropin (**51**) als externem Standard bestimmt. Dabei ist zu erkennen, dass die erhaltenen Konzentrationen des Alkohols (*R*)-**47** bei etwa 16 mM konstant bleiben. Folglich tritt keine Inhibierung der Lk-ADH durch das Lacton **3** auf. Die mittels Titrimetro-Apparatur berechneten Produktkonzentrationen des Alkohols (*R*)-**47** sind bei geringen Konzentrationen des ϵ -Caprolactons (**3**, 0 – 10 mM) zunächst zwar erhöht, bleiben jedoch konstant. Mit steigender Konzentration des Lactons **3** jedoch nimmt auch die *via* Titrimetro ermittelte Produktkonzentration zu. Dieses liegt zum Teil an Konzentrationsschwankungen der verwendeten Natronlauge. Außerdem kann die Neutralisation von Enzymbestandteilen durch die

Natronlauge erfolgen. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass hierbei eine hydrolytische Spaltung des zugegebenen Lactons **3** zur entsprechenden Säure **53** stattfindet, die ebenfalls mit NaOH neutralisiert wird (Abbildung 46). Die mittels Titrimetrie bestimmten Produktkonzentrationen können somit nicht als qualitative Werte angesehen werden.

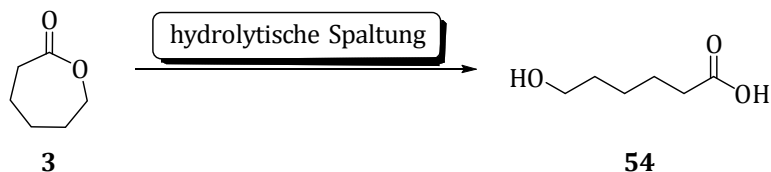


Abbildung 46. Hydrolytische Spaltung von ϵ -Caprolacton (**3**) zu 6-Hydroxyhexansäure (**54**).

Die Reaktion wurde in D_2O mit anschließender NMR-spektroskopischer Untersuchung der wässrigen Phase durchgeführt. Mittels 1H -NMR-Spektroskopie konnte die nahezu vollständige Rückgewinnung des eingesetzten Lactons **3** durch Verwendung des externen Standards Urotropin (**51**) nachgewiesen werden. In den Spektren konnten zwar die gebildeten wasserlöslichen Salze nicht belegt werden, jedoch konnte die Bildung von 6-Hydroxyhexansäure (**54**) nachgewiesen werden, welche durch hydrolytische Spaltung des Lactons **3** entstanden ist. Abbildung 47 zeigt ein NMR-Spektrum einer Biotransformation, in der die Hydrolyse des Lactons **3** zur Säure **54** stattgefunden hat. So sind charakteristische Signale im aliphatischen Bereich des Spektrums, beispielsweise bei 2.16 und 1.53 ppm, vorhanden. Das Verhältnis des gebildeten Lactons **3** zur entsprechenden Säure **54** beträgt in diesem Fall 1.0 : 2.2.

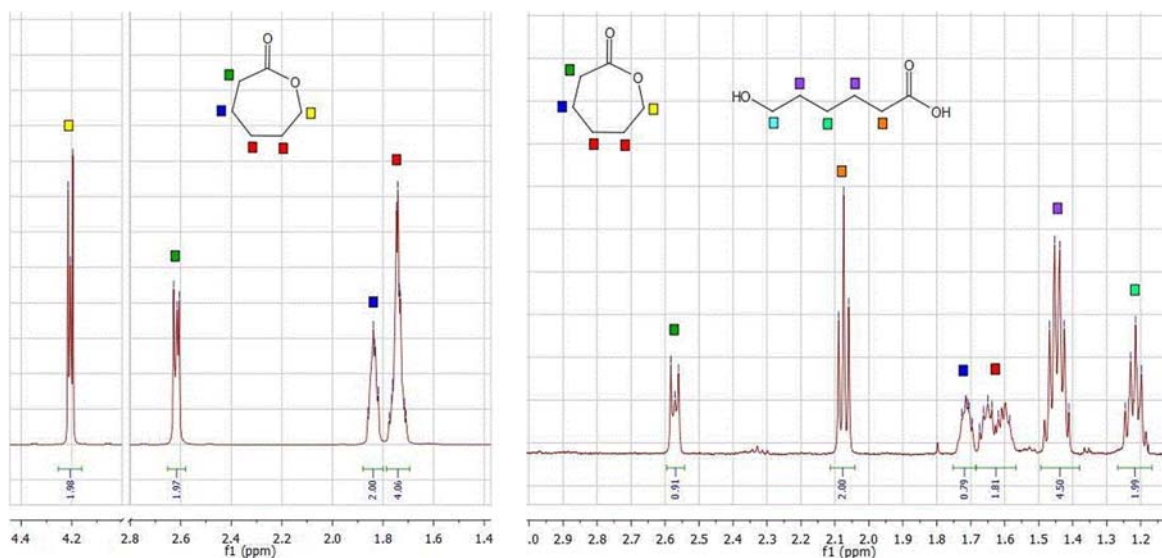


Abbildung 47. NMR-Spektrum von ϵ -Caprolacton (**3**, links) und Beispiel eines NMR-Spektrums der Hydrolyse des Lactons **3** zur Säure **54** (rechts).

Da die Reaktionsgefäße der Titrino-Apparaturen nur mit Parafilm verschlossen werden konnten, ist es nicht unwahrscheinlich, dass über den Reaktionszeitraum von 24 Stunden ein Teil der Substrate aufgrund der hohen Flüchtigkeit verdampft ist. Die mittels NMR-Spektroskopie erhaltenen Produktkonzentrationen des Alkohols (**R**)-**47** bleiben konstant bei etwa 16 mM. Da vor allem bei den Ansätzen mit hohen Konzentrationen des Lactons **3** das Gesamtvolumen an Substrat zunimmt, können sich Fehler

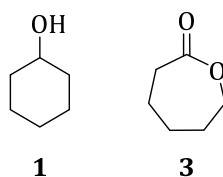
durch Inhomogenität der Produktmischungen ergeben. Insgesamt lässt sich sagen, dass auch bei hohen Konzentrationen an ϵ -Caprolacton (**3**) keine Produktinhibierung der Lk-ADH stattfindet. Dieses Enzym ist demnach für die Doppeloxidation von Cyclohexanol (**1**) über einen Zeitraum von 24 Stunden sehr gut geeignet.

3.3.4 Verwendung von Adsorberharzen

Die ersten Versuche, eine Produktinhibierung während der Reaktion durch Verwendung von Adsorberharzen zu vermeiden, wurden bereits 1997 von ELI LILLY AND COMPANY veröffentlicht.^[169] Das Harz wird zur Reaktionsmischung zugegeben und kann dabei als festes organisches Lösungsmittel angesehen werden. Die treibende Kraft hinter der Adsorption ist die Wechselwirkung zwischen den unpolaren Regionen des zu adsorbierenden Moleküls und der polaren Oberfläche des Harzes. So können viel höhere Substrat- und Produktkonzentrationen erreicht werden, während das Enzym nur geringen Konzentrationen ausgesetzt ist.

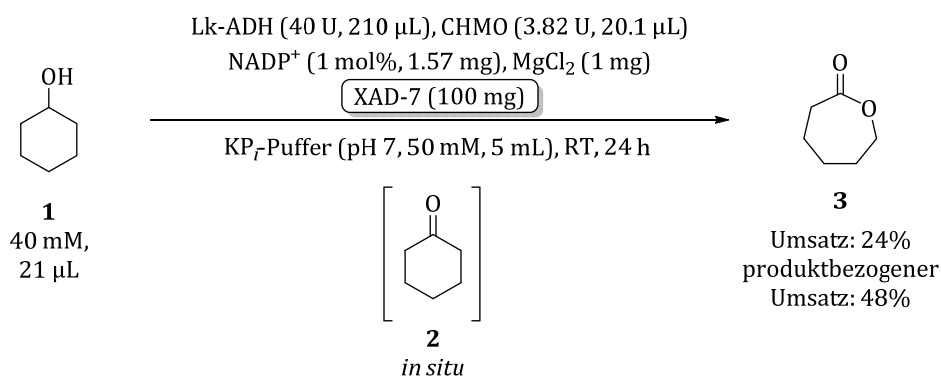
Die in dieser Arbeit getesteten Harze XAD-7 und XAD-1180 sind einfache poröse, nicht-funktionalisierte Kunststoff-Kügelchen mit großen Oberflächen, die aus unterschiedlichen Polymeren hergestellt wurden und somit verschiedene Partikel- und Porengrößen besitzen. XAD-7 ist ein Polyacrylat-Harz und nur mäßig polar und sollte somit sowohl das Substrat Cyclohexanol (**1**) als auch das Produkt **3** gut binden. XAD-1180 ist ein unpolares, poröses makrovernetztes aromatisches Polystyren-Divinylbenzol-Polymer. Die Harze besitzen eine durchschnittliche Porengröße von 400 bzw. 450 Å.

Zunächst sollte die Rückgewinnungsrate der Substanzen bei beiden Harzen XAD-7 und XAD-1180 durch Simulation der Aufarbeitung untersucht werden, indem das Substrat **1** bzw. das Lacton **3** über 20 Stunden bei Raumtemperatur in Puffer zusammen mit dem jeweiligen Adsorberharz gerührt. Anschließend wird zum einen das Harz abfiltriert und mehrmals mit organischen Lösungsmitteln gewaschen, zum anderen die organische Phase extraktiv aufgearbeitet (Tabelle 9). Die Aufnahmefähigkeit der beiden Harze XAD-7 und XAD-1180 für die Substrate Cyclohexanol (**1**) und ϵ -Caprolacton (**3**) liegen abhängig von Substrat, Lösungsmittel und Harz nur bei 2 –20%. Nach der extraktiven Aufarbeitung können nur 46 bzw. 74% von Cyclohexanol (**1**) bzw. ϵ -Caprolacton (**3**) in Anwesenheit von XAD-7 zurückgewonnen werden. Die Verwendung von MTBE anstelle von Dichlormethan als Extraktionsmittel jedoch führt zu einer drastischen Abnahme der Rückgewinnungsrate auf 30%. Eventuell kann dieser Unterschied mit den logP-Werten (DCM: 1.25, MTBE: 0.94) begründet werden, da das Produkt **3** (logP = 1.25)^[180] als auch der Alkohol **1** (logP = 1.23)^[177] in DCM besser löslich ist. Die höchste Rückgewinnungsrate vom Substrat **1** von 89% wurde in Anwesenheit von 100 mg XAD-1180 mit DCM als Extraktionsmittel erhalten.

Tabelle 9. Rückgewinnungsrate der Substanzen **1** bzw. **3** in Anwesenheit der Adsorberharze XAD-7 bzw. XAD-1180.

Eintrag	Substanz	Harz / [mg]	Solvenz	Rückgewinnungsrate [%]	
				Harz	insgesamt
1	1	XAD-7 / 100	DCM	2	46
2	3	XAD-7 / 100	DCM	8	68
3	3	XAD-7 / 200	DCM	8	74
4	3	XAD-7 / 100	MTBE	4	30
5	1	XAD-1180 / 100	DCM	20	89
6	1	XAD-1180 / 200	DCM	10	41

Da der Fokus bei der Doppeloxidation von Cyclohexanol (**1**) vor allem bei der Vermeidung der Produktinhibierung durch das Lacton **3** liegt, wurden die in Ansatz 3 verwendeten Bedingungen für die im Anschluss durchgeführte Reaktion aus-gewählt (Abbildung 48).

**Abbildung 48.** Doppeloxidation von Cyclohexanol (**1**) in Anwesenheit von XAD-7.

Das Harz XAD-7 wurde zusammen mit dem Cyclohexanol (**1**) sowie den restlichen Komponenten für 24 Stunden gerührt. Der dadurch erhaltene Umsatz beträgt 24% bezüglich des Urotropins (**51**) als externer Standard (produktbezogener Umsatz: 48%). Die insgesamt zurückgewonnene Stoffmenge aller drei Komponenten lag nach der Aufarbeitung bei nur 50%. Da die Reaktion nur zur Hälfte ablief, ist es wahrscheinlich, dass ein Teil des Cyclohexanols (**1**) gleich zu Beginn im Harz durch Wasserstoffbrückenbindungen und VAN DER WAALS-Kräfte gebunden wurde und für die Reaktion dadurch nicht mehr zur Verfügung stand.

Es wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass die Verwendung von Harzen bei der enzymatischen Doppeloxidation von Cyclohexanol (**1**) zum Lacton **3** ist möglich ist und mit 48% bereits einen guten produktbezogenen Umsatz liefert, der jedoch noch weiterer Optimierung bedarf. Des Weiteren könnten weitere Adsorberharze getestet werden, deren Porengröße sowie Polarität noch besser auf das hier

erhaltene Produkt **3** zugeschnitten ist. Die Verwendung von Lösungsmittel mit höheren logP-Werten (>1.25) könnte zu einer erhöhten Ausbeute während der Aufarbeitung führen.

3.3.5 Variation der Substrate

Alkylsubstituierte Caprolactone sind von großem Interesse für die Synthese von entsprechenden Polymeren. Die Copolymerisation von ϵ -Caprolacton (**3**) mit Trimethylcaprolactonen wurde von der Firma DAICEL patentiert.^[22] Durch Umsetzung der daraus entstandenen Polyole mit Diisocyanate werden Polyurethane erhalten, die sich durch exzellente Hydrolysebeständigkeit sowie durch hohe mechanische Stärke und Stabilität gegenüber hohen Temperaturen und Feuchtigkeit auszeichnen.

Bei der BAEYER-VILLIGER-Oxidation von 3,5,5-Trimethylcyclohexanon (**55**) entsteht auf chemischem Wege eine racemische Mischung aus den Regioisomeren 3,3,5- und 3,5,5,-Trimethyl- ϵ -caprolacton (**56** bzw. **57**) (Abbildung 49). In diesem Fall werden vier Produkte gebildet, da es nur einen geringen energetischen Unterschied der beiden wandernden Kohlenstoffatome gibt.^[181] Die Anwesenheit von Alkylsubstituenten macht sich auch in der längeren Reaktionszeit im Vergleich zur Oxidation von Cyclohexanon (**2**) bemerkbar; so sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Anzahl an Substituenten ebenfalls. Auch die Länge des Alkylrestes in 3-Position hat einen Einfluss auf die Geschwindigkeit.

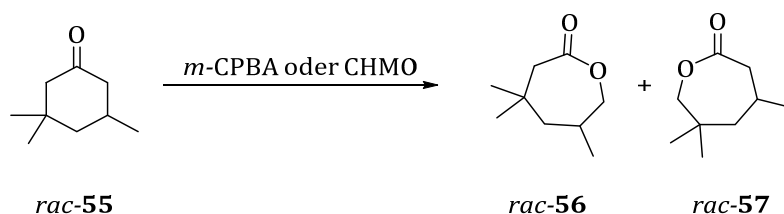


Abbildung 49. Produkte der chemischen und enzymatischen BAEYER-VILLIGER-Oxidation des Ketons *rac-55*.

In dieser Arbeit sollte außerdem die Möglichkeit der biokatalytischen Darstellung des entsprechenden Lactons ausgehend von 3,5,5-Trimethylcyclohexanol (**53**) mithilfe der Lk-ADH und der CHMO untersucht werden (Abbildung 50).

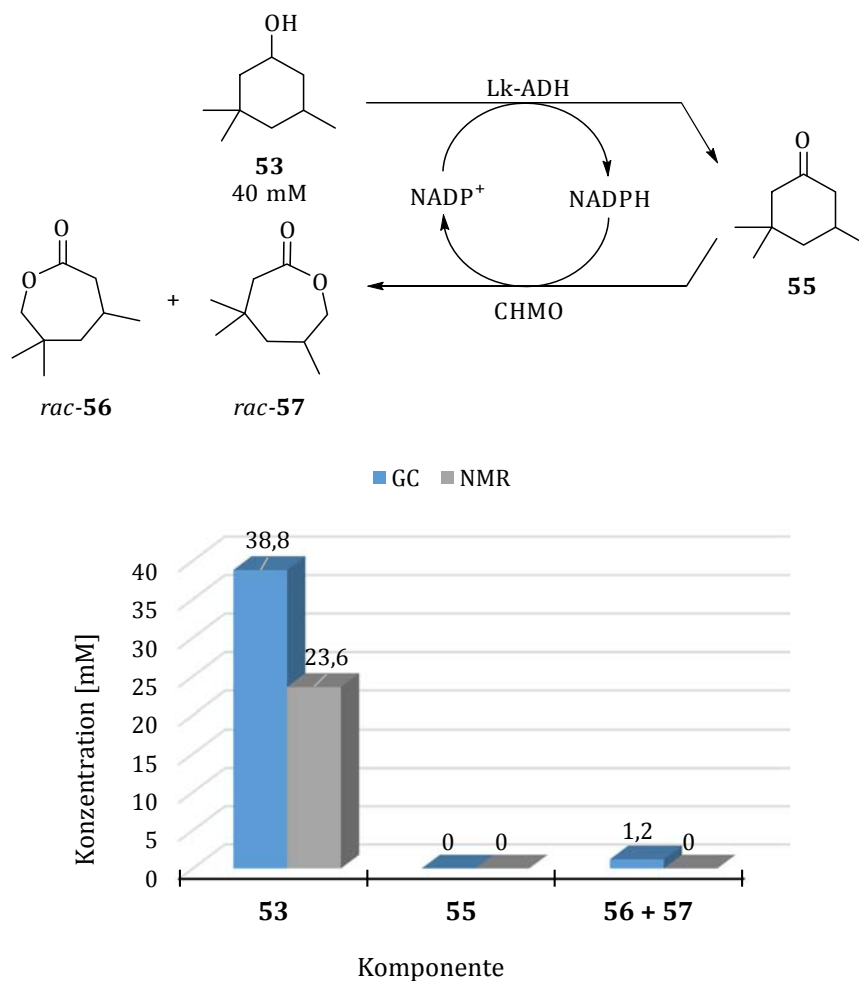


Abbildung 50. Enzymatische Doppeloxidation von 3,5,5-Trimethylcyclohexanol (**53**).

Bei dieser Reaktion konnte mittels NMR-Spektroskopie jedoch kein Umsatz zu den Lactonen **56** oder **57** festgestellt werden. Das ¹³C-NMR-Spektrum zeigt keine für Carbonylfunktionen charakteristischen Signale im Bereich zwischen 170 und 220 ppm, sodass davon ausgegangen werden kann, dass weder das Keton **55** noch eins der möglichen Lactone **56** bzw. **57** in der Reaktionsmischung anwesend sind. Dass kein Keton **54** als Zwischenprodukt zu erkennen ist, stimmt mit den Ergebnissen aus den vorherigen Aktivitätsmessungen überein. Zusätzlich sind allerdings Fremdsignale in den NMR-Spektren zu beobachten, die nicht weiter identifiziert werden können. Möglicherweise wurde gebildetes Lacton zur jeweiligen Säure hydrolysiert. Im GC-Chromatogramm kann jedoch ein neues Signal mit 3% Fläche gefunden werden, was einer Konzentration von 1.2 mM entspricht, wobei der Alkohol **53** sowie das Keton **55** aufgrund unterschiedlicher Retentionszeiten ausgeschlossen werden können. Die in Abbildung 50 gezeigten Konzentrationsunterschiede können mit den Unterschieden der Messverfahren begründet werden. Der mittels NMR-Spektroskopie erhaltene Wert wurde auf einen externen Standard bezogen, welcher nach der Aufarbeitung ins NMR-Röhrchen gegeben wurde. In diesem Fall wurde dabei auf Pyridazin (**58**) als Standard zurückgegriffen, um eventuelle Überlagerungen der Signale mit Urotropin (**51**) im aliphatischen Bereich des Spektrums zu vermeiden. Die *via* GC erhaltenen Werte wurden aus dem Verhältnis zwischen Edukt **53** und den möglichen Produkten **56** und **57** ermittelt. Der Verlust der Substanzen durch Verdampfen oder der extraktiven Aufarbeitung kann dabei nicht berücksichtigt werden.

So scheint bereits der erste Schritt, die Oxidation durch die Lk-ADH, nicht stattzufinden. Die Monooxygenase aus *Acinetobacter* sp. ist bekannt für ihr breites Substratspektrum und wurde bereits zur asymmetrischen Oxidation von substituierten Cyclohexanonem eingesetzt, um enantiomerenreine Caprolactone zu erhalten.^[182] So wird bei 2- oder 4-alkyliertem Cyclohexanon das (*R*)-Enantiomer mit hoher Selektivität gebildet, wobei bei längeren Alkylresten die Stereoselektivität zunimmt. Racemische 3-alkylierte Cyclohexanone liefern jedoch, besonders bei kleinen Alkylresten, ebenfalls beide Regioisomere als Racemate, da für die Monooxygenase keine elektronische Präferenz existiert (Abbildung 49). Parallel zu der Untersuchung der Oxidation von Trimethylcyclohexanol **53** sollte die enzymatische BAEYER-VILLIGER-Oxidation von Isophoron (**52**) untersucht werden. Isophoron (**52**) wird aufgrund seiner hervorragenden Lösefähigkeiten als Lösungsmittel für Harze, Bindemittel und Chemieprodukte in der Lack-, Druckfarben- und Klebstoffindustrie eingesetzt.^[183] In der Literatur ist nur ein Fall der Oxidation von Isophoron (**52**) beschrieben. RUIZ *et al.* erhielten 70% Umsatz zum entsprechenden Lacton **59**, indem sie Hydrocalcite als Oxidationsmittel verwendeten.^[184] Dabei findet die Epoxidierung der Doppelbindung als Konkurrenzreaktion statt. Es sind keine enzymkatalysierten Ansätze zur Oxidation von Isophoron (**52**) bekannt. In dieser Arbeit sollte die direkte biokatalytische Doppeloxidation von Isophoron (**52**) zum Lacton **59** untersucht werden, wobei die Lk-ADH zusammen mit *i*PrOH als Cofaktor-Regenerationssystem dienen sollte (Abbildung 51).

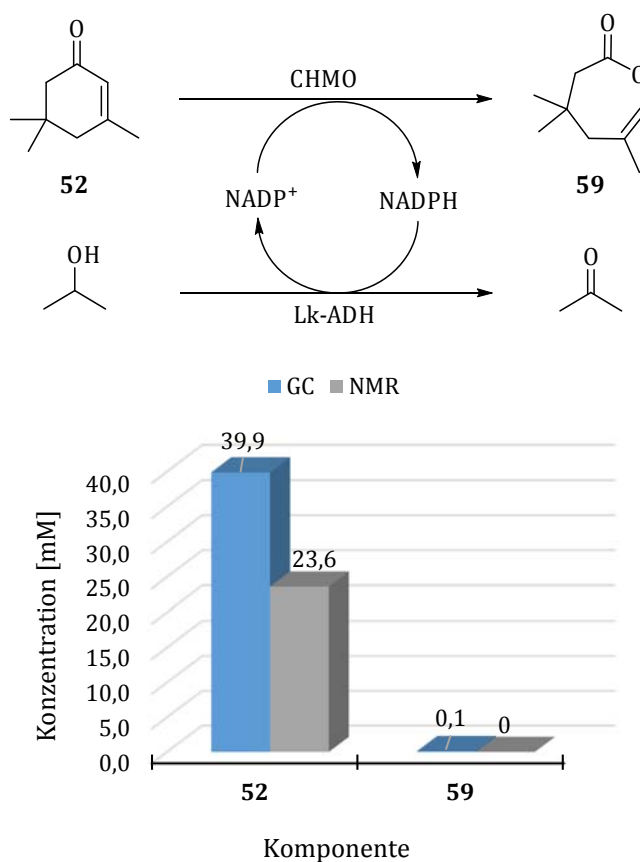


Abbildung 51. Enzymatische Oxidation von Isophoron (**51**) mittels GC und NMR-Spektroskopie.

In den NMR-Spektren konnten nur 59% Edukt **52** in Bezug auf den externen Standard Pyridazin (**58**) wiedergefunden werden, was 23.6 mM entspricht. Im Gegensatz dazu konnte im GC-Chromatogramm

der Reaktionsmischung ein neues Signal beobachtet werden, was etwa 0.3% Fläche und 0.12 mM entspricht. Auch in diesem Fall ist der Unterschied zwischen den erhaltenen Konzentrationen des Ketons **52** sehr groß und auf unterschiedliche Messverfahren zurückzuführen. Ebenso wie in Abbildung 50 wurden die *via* GC erhaltenen Werte durch das Verhältnis zwischen Edukt **52** und Produkt **59** bestimmt. Auch in diesem Fall werden Verluste der Substanzen während der Reaktionsführung sowie Aufarbeitung nicht näher betrachtet.

Zwar scheint es, als könne die BVMO nahezu alle Substrate umsetzen, die das aktive Zentrum erreichen, jedoch sind 2-Cyclohexanon-Derivate Ausnahmen, die nicht oder nur sehr langsam von der CHMO unter den hier gewählten Reaktionsbedingungen umgesetzt werden können.^[109,110]

4 Enantioselektive Racematspaltung von Aminen

4.1 Lipasen

4.1.1 Allgemeines

Lipasen (Triacylglycerol-Hydrolasen, EC 3.1.1.3) sind in der Natur allgegenwärtig und werden in verschiedenen Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen exprimiert.^[185] Lipasen mikrobiellen Ursprungs, hauptsächlich aus Bakterien und Pilzen, repräsentieren die am häufigsten verwendete Klasse an Enzymen in biotechnologischen Anwendungen und in der organischen Chemie. Sie finden Einsatz in einem breiten Spektrum industrieller Anwendungen, wie beispielsweise in der Lebensmittel-Technologie, Waschmittel und chemischen Industrie sowie in der biomedizinischen Forschung.^[185,186] Die meisten Lipasen werden von Bakterien produziert, wodurch sich deren großtechnische Herstellung viel einfacher gestaltet und diese dadurch von besonderem kommerziellem Interesse sind. Ihre Entdeckung wurde bereits 1901 von EIJKMAN beschrieben.^[187]

Obwohl bereits eine beträchtliche Anzahl an Stämmen zur Produktion von Lipasen verwendet wurden, sind *Candida* sp., *Pseudomonas* sp. und *Rhizopus* sp. die wichtigsten Quellen.^[186] Die natürlichen Substrate der Lipasen sind langkettige Triacylglycerole vom Typ **60**, die eine sehr geringe Löslichkeit in Wasser besitzen (Abbildung 52).^[185] Durch Hydrolyse werden Glycerol (**61**) sowie drei Äquivalente der entsprechenden Fettsäure **62** erhalten.

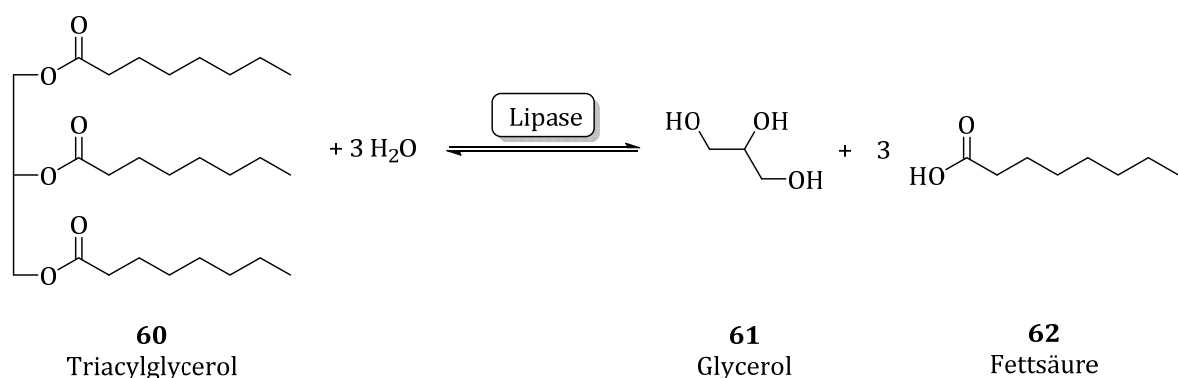


Abbildung 52. Lipasenkatalysierte Hydrolyse und Synthese eines Triacylglycerols **60**.^[185]

Neben den lipolytischen, d.h. fettspaltenden Eigenschaften, besitzen die Lipasen noch eine ester-spaltende Aktivität.^[185] Sie katalysieren neben der Hydrolyse und Umesterung außerdem die Alkoholyse, Acidolyse, Veresterung und Aminolyse.^[186] Die Vorteile der Verwendung von Lipasen sind vielfältig. Durch bereits aufgelöste Kristallstrukturen kann das katalytische Potential von Lipasen durch

molekularbiologische Ansätze wie *Protein engineering* oder gerichtete Evolution weiter verbessert werden.^[188] Lipasen benötigen keine teuren Cofaktoren und sind chemoselektiv. Sie besitzen eine hohe Substratbreite und sind hochspezifische Katalysatoren in Hinblick auf Regio- und Enantioselektivität.^[189] Aufgrund dieser Eigenschaften sind Lipasen die am breitesten angewendete Gruppe von Biokatalysatoren, was auch durch die jährlich durchschnittlich >1000 Veröffentlichungen zu dem Enzym deutlich wird.^[190]

Lipasen besitzen zudem die Fähigkeit, zwischen den Enantiomeren eines racemischen Gemisches zu unterscheiden, was zu einem Einsatz von Lipasen zur kinetischen Racemattrennung führte. Solche enantiomerenreinen oder -angereicherten Komponenten gewinnen in der Synthese von pharmazeutischen, synthetisch organischen und natürlichen Produkten sowie Agrarerzeugnissen immer mehr an Bedeutung.^[185]

4.1.2 Struktur und Mechanismus

BRADY *et al.* publizierten 1990 die erste Kristallstruktur einer Lipase aus dem Pilz *Mucor miehei*.^[191] Gleichzeitig wurde die Struktur der Lipase aus humaner Pankreas von WINKLER veröffentlicht.^[192] Seitdem wurden noch einige weitere Lipasen bakteriellen Ursprungs mittels Röntgenstruktur aufgelöst. Alle diese Lipasen variieren zwar stark in der Größe (20 – 60 kDa), haben jedoch trotz relativ geringer sequenzieller Übereinstimmungen alle eine ähnliche dreidimensionale Gesamtstruktur mit der sogenannten α/β -Hydrolase-Falte, die als allgemeines Faltpattern identifiziert werden konnte und hauptsächlich aus β -Faltblättern besteht und von α -Helices flankiert werden.^[187] Solch eine α/β -Hydrolase-Falte ist typisch für Enzyme, die keine offensichtliche Sequenzähnlichkeit aufweisen, jedoch von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen.^[187]

Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von unterschiedlichen Lipasen bestätigt deren Klassifikation als Serin-Hydrolasen.^[186] Das aktive Zentrum der Lipasen enthält eine katalytische Triade bestehend aus Ser-His-Asp-Resten, wobei sich der Serin-Rest in einem β - ϵ Ser- α -Motiv im aktiven Zentrum befindet. Dieses Motiv besteht aus einem β -Faltblatt, einer Schleife mit Serin in der ϵ -Position und einer α -Helix. Der unveränderliche erste und letzte Glycin-Rest in der Consensus-Sequenz (Gly-x-Ser-x-Gly) dieses Motivs liegen in helicaler Konformation vor, die aufgrund der sterischen Ansprüche dieses Motivs konserviert sind.^[187]

Ein unübliches und interessantes Merkmal der Struktur der Lipasen ist, dass das aktive Zentrum vollständig unter einer deckelartigen Struktur, bestehend aus ein oder zwei α -Helices, verdeckt ist. Durch eine Bewegung des Deckels wird das aktive Zentrum für das Substrat zugänglich. Diese strukturelle Änderung des Proteins wird begleitet von einer weiteren Bewegung in einer nahe gelegenen Schleife, wodurch die sogenannte Oxyanion-Höhle freigelegt wird. Eine weitere Folge dieser Konformationsänderungen ist die erhebliche Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche des Enzyms, was in der Lipid-Oberflächen-Erkennung eine Rolle spielt. ^[187]

Das aktive Zentrum besteht aus drei Resten: einem Serin- und einem Carboxylat-Rest, die beide wasserstoffverbrückt zu einem Histidin-Rest sind (Abbildung 53). Bei dem Carboxylat-Rest kann es sich um

einen Aspartat- oder Glutamat-Rest handeln. Während der Hydrolyse einer Ester-Bindung findet zunächst ein nucleophiler Angriff des Sauerstoffs des Serin-Restes auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Esters statt, was zu der Bildung des tetraedrischen Intermediates führt (Schritt 1). Dieses wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Resten in der Oxyanion-Höhle stabilisiert. Der Imidazol-Ring des Histidins wird protoniert und dadurch positiv geladen und erhöht somit die Nucleophilie der Serin-Hydroxygruppe. Diese positive Ladung wird durch die negative Ladung des Säure-Restes stabilisiert (Schritt 2). Das tetraedrische Intermediat wird durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu Amin-Funktionen von Resten, die sich in der Oxyanion-Höhle befinden, stabilisiert. Abschließend wird der Alkohol freigesetzt, welcher dann den Acyl-Enzym-Komplex verlässt (Schritt 3). Durch einen nucleophilen Angriff eines Hydroxy-Ions wird die Fettsäure freigesetzt und das Enzym regeneriert (Schritt 4).

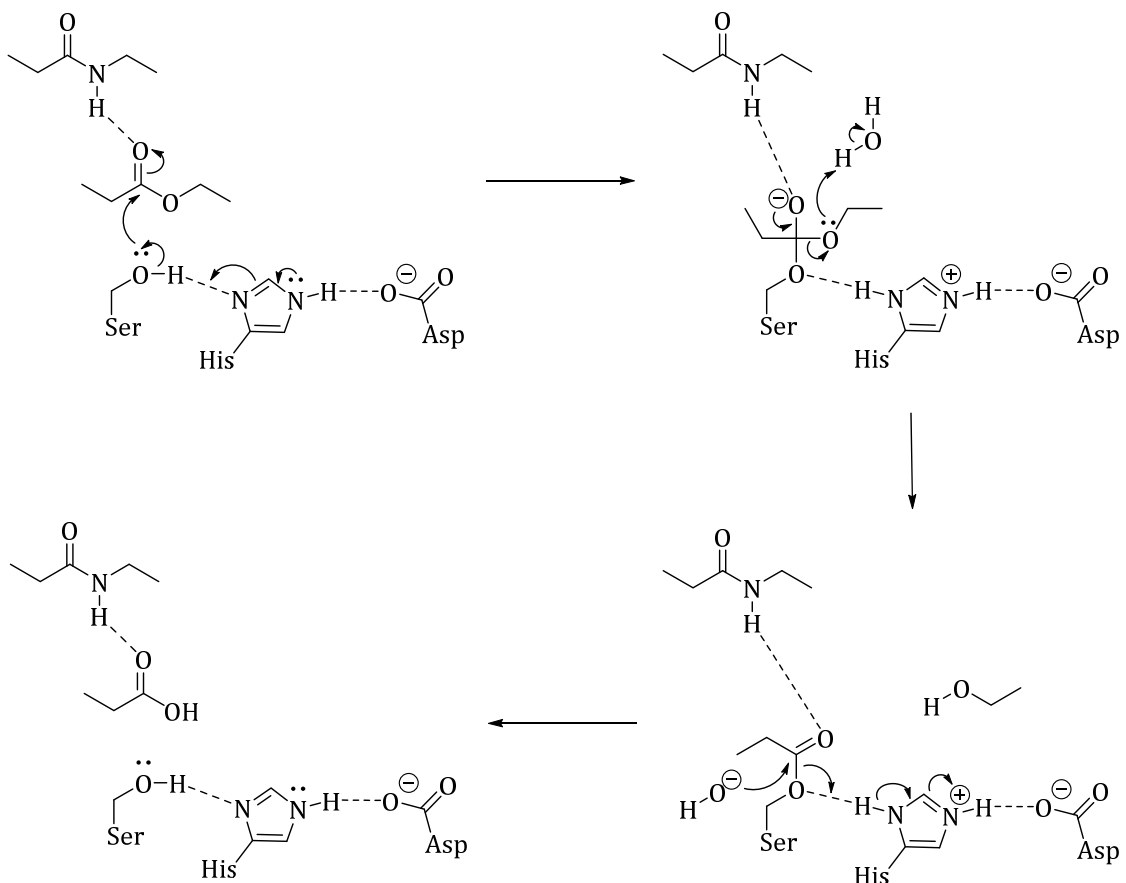


Abbildung 53. Detaillierter Mechanismus der Hydrolyse einer Ester-Bindung durch eine Lipase.^[187] Wasserstoffbrückenbindungen werden gestrichelt dargestellt.

Lipasen besitzen die Fähigkeit, an der Wasser/Öl-Grenzfläche zu agieren; dieses unterscheidet sie von den Esterasen.^[186] Das Konzept der Phasengrenzen-Aktivierung (*'interfacial activation'*) ergibt sich aus der Abhängigkeit der katalytischen Aktivität der Lipasen von dem Aggregatzustand des Substrates, da lipolytische Substrate in einem Gleichgewicht zwischen Monomeren, Micellen und emulgiertem Zustand vorliegen können. Die Aktivität der Lipasen wird durch unlösliche Substrate, die eine Emulsion bilden, erhöht.^[193] Diese Erhöhung der Aktivierung wird ausgelöst durch strukturelle Veränderungen am aktiven Zentrum. Während der Abwesenheit einer Wasser/Öl-Grenzfläche wird das aktive Zentrum

durch einen Deckel „geschlossen“. In Anwesenheit von hydrophoben Substanzen jedoch öffnen sich der Deckel und das aktive Zentrum und es wird eine große hydrophobe Oberfläche exponiert.

Aus der Hefe *Candida antarctica* konnten zwei Lipasen, A und B genannt, isoliert werden.^[194,195] Wie vom Namen ersichtlich ist, wurde der Stamm ursprünglich in der Antarktis mit dem Ziel isoliert, Enzyme mit extremen Eigenschaften zu finden.^[195] Beide Lipasen unterscheiden sich stark. Die Lipase A ist ein unspezifisches, thermostabiles und calciumabhängiges Enzym. Die in dieser Arbeit verwendete Lipase B (CAL-B) ist etwas weniger thermostabil und nicht calciumabhängig. Obwohl der optimale pH-Bereich bei pH 7 liegt, ist es im wässrigen Medium im Bereich von pH 3.5 – 9 noch stabil. Die CAL-B hat ein Molekulargewicht von 33.3 kDa und besteht aus 317 Aminosäuren (Abbildung 54). Die Consensussequenz (Gly-x-Ser-x-Gly) ist in der CAL-B nicht vorhanden, da das erste Glycin durch Threonin ausgetauscht wurde (Thr-x-Ser-x-Gly). Dadurch ergibt sich eine leicht veränderte Konformation des Faltblattes und der α -Helix im Vergleich zu anderen Lipasen. Auch in dieser Lipase ist eine kurze α -Helix des Enzyms dafür zuständig, als Deckel zur Kontrolle des aktiven Zentrums zu fungieren. Anders als die meisten Lipasen zeigt die CAL-B keine Grenzflächen-Aktivierung. Die CAL-B ist nicht so effektiv bei der Hydrolyse von Triacylglycolen wie andere Lipasen, reagiert jedoch sehr stereospezifisch bei Hydrolysen oder chemischen Synthesen.^[98]

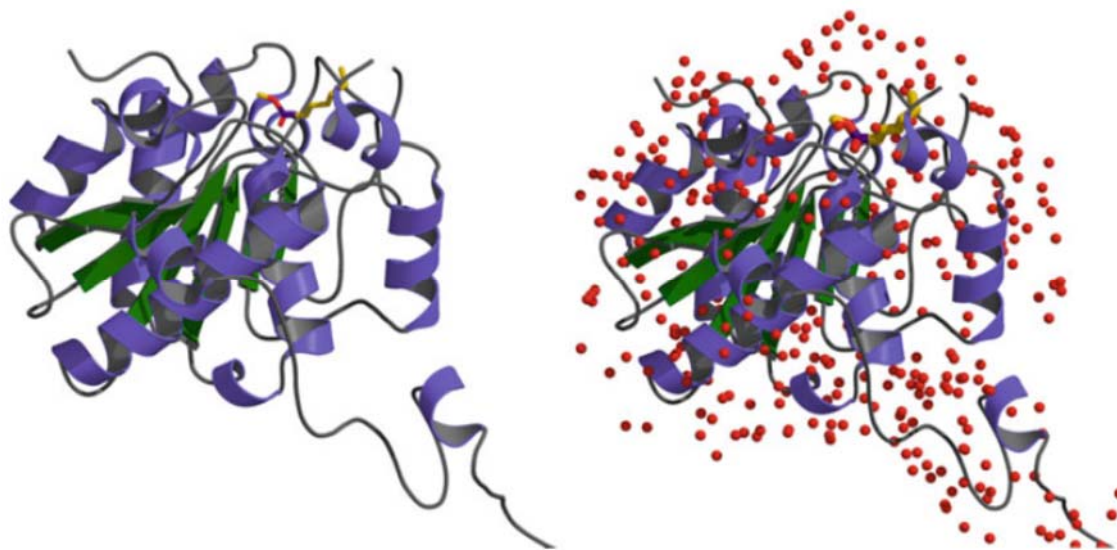


Abbildung 54. Kristallstruktur einer CAL-B-Mutante (links). Die strukturellen Wassermoleküle sind als rote Punkte dargestellt (rechts).^[11]

Die CAL-B (Novozym 435) ist auf einem macroporösen Polymer-Träger immobilisiert, der auf Methyl- und Butylmethacrylester basiert und durch Divinylbenzol quervernetzt ist.^[36] Das Immobilisat besitzt einen Proteingehalt von etwa 5% (w/w) des lyophilisierten Pulvers, wovon nur ca. 40% den Gehalt der Lipase darstellen.^[196]

4.1.3 Enantioselektivität von Lipasen

Obwohl die grobe Struktur und die katalytische Triade der Lipasen sehr ähnlich sind gibt es unter ihnen einen großen Unterschied in der Substratspezifität und deren Ausmaß.^[197] Eine allgemeine Regel für die Vorhersage der Enantioselektivität wurde von KAZLAUSKAS aufgestellt.^[198] Die Regel basiert auf der Größe der Substituenten am Stereozentrum. Mittels Kristallstruktur des Enzymkomplexes der Lipase aus *Candida rugosa* wurde mit dem schnell reagierenden (*R*)-Ester eines sekundären Alkohols eine Wasserstoffbrückenbindung vom katalytischen Histidin-Rest zum Sauerstoffatom des Esters gefunden. Diese Wasserstoffbrückenbindung fehlt im Komplex des Enzyms zum langsam reagierenden (*S*)-Enantiomer. Generell gilt zudem, dass die Stereoselektivität bei unterschiedlich großen Substituenten am chiralen Kohlenstoffatom höher ist als bei Substituenten gleicher Größe.^[11,199]



Abbildung 55. Schnell reagierendes (a) und langsam reagierendes (b) Enantiomer in dem Modell des aktiven Zentrums, abgeleitet von der KAZLAUSKAS-Regel.^[199]

Triacylglyceride können an allen drei Esterfunktionen oder spezifisch nur an einer oder zwei Positionen gespalten werden. Lipasen zeigen auch verschiedene Selektivitäten abhängig von der Kettenlänge der Ester.^[11,199]

4.2 Stand der Wissenschaft: Aminsynthesen

Für die pharmazeutische, agrochemische und feinchemische Industrie ist die Synthese von enantiomerenreinen Aminen ein wichtiger Bereich der organischen Chemie. Schätzungen zufolge enthalten 40-50% aller optisch aktiver Wirkstoffe chirale Amine.^[18] Zu den klassischen Synthesewegen von chiralen Aminen gehören die asymmetrische Hydrierung^[200,201], Aminierung^[18], Alkylierung^[202] oder Hydrosilylierung^[203] von Iminen, oder die Hydrierung von Enamiden.^[204,205] Außerdem finden biokatalytische Ansätze wie der Einsatz von Transaminasen^[206,207] oder die kinetische Racematspaltung von racemischen Ausgangsverbindungen^[31,208] zunehmend Anwendung. Einige Beispiele sind in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

4.2.1 Klassisch chemische und chemokatalytische Synthesen

Die katalytische asymmetrische Addition von Organometall-Reagenzien an Imine ist ein wichtiger Syntheseweg zu optisch aktiven Aminen.^[202] Die asymmetrische Addition an C=N-Bindungen wird generell durch Verwendung von chiralen Auxiliaren oder chiralen Liganden erreicht. Dieses bringt den Vorteil einer einfachen Trennung der diastereomeren Produkte vor der Abspaltung des chiralen Auxiliars mit sich. In den letzten Jahrzehnten fand die Addition von Organometall-Reagenzien in Anwesenheit eines chiralen Liganden vermehrt Anwendung. Die erste Synthese dieser Art berichtete TOMIOKA.^[202,209] Dabei wird das geschützte Amin **63** mit dem chiralen Aminoether-Liganden (*S*)-**64** umgesetzt (Abbildung 56).

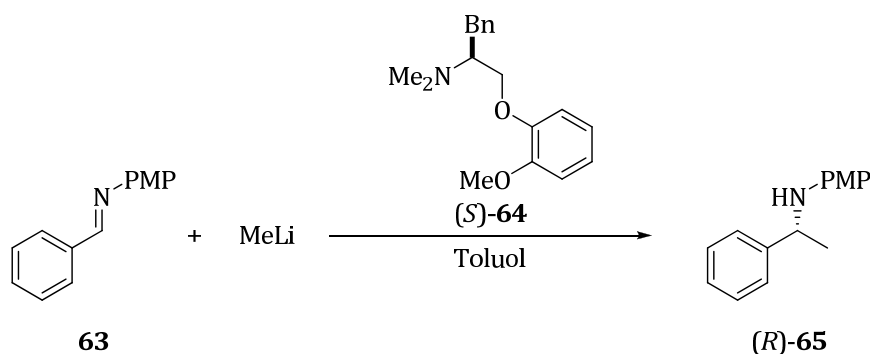


Abbildung 56. Asymmetrische Alkylierung des geschützten Imins **63**.^[202,209]

Das entstehende Amin (*R*)-**65** kann mit einem nahezu vollständigen Umsatz von 98% und guten ee-Werten von 75% erhalten werden, wobei der Einsatz von 2.6 Äquivalenten an (*S*)-**64** notwendig waren. Selbst mit 5 mol-% des Liganden (*S*)-**64** wird immer noch enantiomerenangereichertes Amin (*R*)-**65** mit 40% ee beobachtet. Der ee-Wert kann bei ähnlichen Aminen durch Verwendung des Bidentat-Liganden Bisoxazalin auf 91% gesteigert werden.^[210] Auch Dialkylzink-Verbindungen können in Anwesenheit von chiralen Liganden zu sehr guten Enantiomerenüberschüssen führen.^[202,211] In neuerer Zeit zeigten auch Allylstannane und Allylsilane gute Ergebnisse.^[212] Aufgrund der extremen

Reaktionsbedingungen (-100 °C) sind diese Organometall-katalysierten Reaktionen aus industrieller Sicht schwierig zu realisieren.

Eine der interessantesten Reaktionen der organischen Chemie ist laut dem *Green Chemistry Institute of American Chemical Society* die asymmetrische reduktive Aminierung von prochiralen Carbonylverbindungen.^[18] Dabei gibt es zwei Möglichkeiten der Aminsynthese: die direkte und die indirekte reduktive Aminierung (Abbildung 57). Bei der indirekten Aminierung wird die Carbonylverbindung **66** mit einem Amin zu einem Imin **67** oder Enamin als Zwischenprodukt umgesetzt, welches isoliert und anschließend enantioselektiv weiter zum chiralen Amin **68** reduziert wird. Eine Limitierung besteht allerdings in der Stabilität des zu isolierenden Zwischenproduktes **67**. Die direkte Aminierung umgeht die Isolation des Zwischenproduktes, indem die Carbonyl-Komponente **66** direkt zum chiralen Amin **68** reduziert wird. Als homogene Katalysatoren dienen Pt, Pd, Ni oder Rh mit chiralen P-Liganden. Veränderungen in der Struktur der Diphosphin-Liganden sowie der sterischen und elektronischen Faktoren machen sich in drastischen Abweichungen in Reaktivität und Stereokontrolle bemerkbar. Die Aminierung mit Ammoniak als Stickstoff-Donor ist immer noch ein ungelöstes Problem. Auf die biokatalytische Aminierung wird in Kapitel 4.2.2 eingegangen.

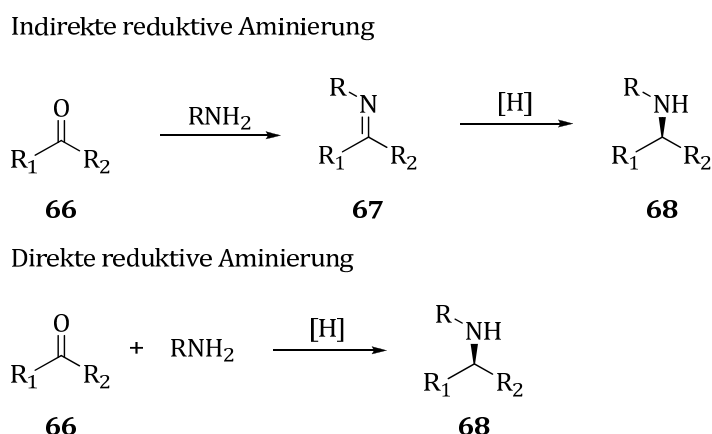


Abbildung 57. Indirekte und direkte reduktive Aminierung von Carbonylverbindungen **66**.^[18]

Die direkte asymmetrische Aminierung findet in der industriellen Herstellung von (*S*)-Metolachlor ((*S*)-**69**) der Firma SYNGENTA (ehemals NOVARTIS) Anwendung (Abbildung 58).^[213,214] (*S*)-**69** ist der aktive Bestandteil in DUAL®, einem der wichtigsten Herbizide. Durch die chirale Achse (Atropisomerie) sowie das stereogene Zentrum ergeben sich für (*S*)-**69** vier Stereoisomere. Diese Mischung wird seit 1976 durch Pt-Katalyse in Anwesenheit von Schwefelsäure mit >20000 t/a produziert. Nachdem 1982 erkannt wurde, dass 95% der Aktivität von den beiden (1'*S*)-Diastereomeren ausgeht, konnte 1997 eine enantiomerenangereicherte Form (Handelsname DUAL MAGNUM®) der beiden (1'*S*)-Diastereomere (90% ee) mit >10000 t/a in den Handel gebracht werden. Dieses führte zu einer Reduzierung der Umweltbelastung um etwa 40% im Vergleich zur racemischen Mischung. Für die Synthese des (*S*)-**69** wird das sterisch gehinderte Anilin **70** mit Methoxyaceton (**71**) umgesetzt. Der Schlüsselschritt der Synthese von Metolachlor ((*S*)-**69**) ist die Iridium-katalysierte enantioselektive Hydrierung des Imins **72**. Der optimierte Prozess verläuft bei 50 °C und 80 bar Wasserstoff-Druck. Der Katalysator wird *in situ* aus [Ir(COD)Cl]₂ und dem Ferrocenyl-Diphosphin-Liganden XyliPhos (**73**) generiert. In Anwesenheit

von TBAI (Tetrabutylammoniumiodid) und Säure kann innerhalb von drei Stunden ein vollständiger Umsatz mit bis zu 78% ee erreicht werden. Anschließend wird das Amin (*R*)-**74** mit Chloracetylchlorid ((*R,S*)-**75**) zum (*S*)-**69** umgesetzt. Dieses ist ein sehr schneller und effizienter katalysierter Prozess im gleichzeitig größten Maßstab, der zurzeit in der Industrie Anwendung findet.

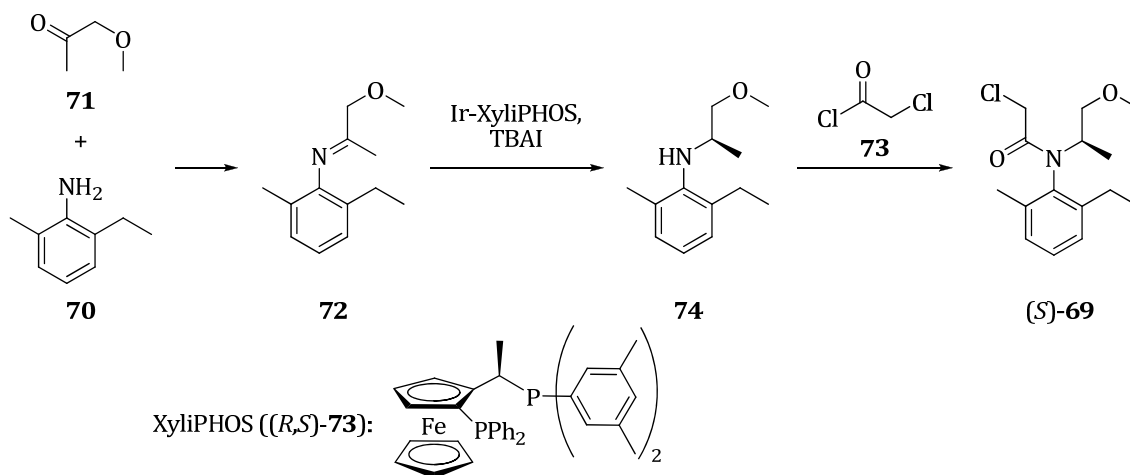


Abbildung 58. Enantioselektive asymmetrische reduktive Aminierung zur Synthese von (*S*)-Metolachlor ((*S*)-**69**).^[213]

Die katalytische asymmetrische Hydrierung von Iminen stellt eine weitere Möglichkeit zur Synthese von chiralen Aminen dar, wobei sich zweizählige Phosphor-Liganden am erfolgreichsten bewährt haben. Viele Methoden der asymmetrischen Hydrierung liefern oftmals nur eine geringe Enantioselektivität und benötigen den Einsatz von Schutzgruppen. ZHANG *et al.* zeigten die asymmetrische Hydrierung von ungeschützten Iminen **76**, die durch Addition von Organometallen an Nitrile **77** isoliert werden (Abbildung 59).^[200,201]

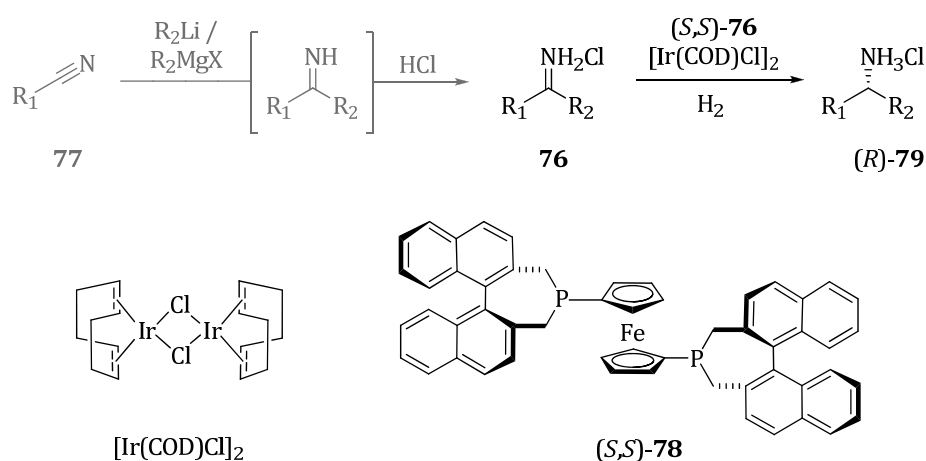


Abbildung 59. Iridium-katalysierte asymmetrische Hydrierung des Imins **76**.^[201]

Die Iridium-katalysierte Hydrierung des Imins **76** durch den starren und elektronenreichen chiralen Ferrocen-Phosphan-Liganden (*S,S*)-**78** liefert das Amin (*R*)-**79** in sehr guten Umsätzen von bis zu 99% und 93% ee. Die Sperrigkeit des Restes R_2 im Imin hat einen großen Einfluss auf die Enantioselektivität

der Hydrierung. Mit einer *tert*-Butyl-Gruppe anstelle einer Methyl-Gruppe sinkt der ee-Wert von 99% auf 80%. Trotz der sehr guten Ergebnisse ergibt sich ein Nachteil in der Verwendung von Ketoiminen **76** als Substrate, da diese oftmals nur in Mischungen von *E/Z*-Isomeren und Keto-Enol-Tautomeren erhalten werden können.

Die reduktive Aminierung von Carbonylverbindungen zu Aminen durch Ameisensäure unter Hydrid-Übertragung ist als LEUCKART-WALLACH-Reaktion bekannt.^[215] KADYROV *et al.* beschrieben 2003 die asymmetrische reduktive Aminierung von Acetophenon (**46**) mittels Ruthenium-Katalyse (**80**) und Ammoniumformat als Hydrid-Donor (Abbildung 60).^[216] Säuren beschleunigen die Reduktion, jedoch haben sie einen negativen Einfluss auf die asymmetrische Induktion. Der Einsatz von Ammoniak führt zu einer Erhöhung der Selektivität, aber auch zu einer Verringerung der Reaktivität. Bei 5 - 10 Äquivalenten HCOONH₄ in NH₃/Methanol (15 - 25%) und Temperaturen von 60 - 85 °C wurden die besten Enantioselektivitäten erhalten. Das Produkt wurde als freies Amin (*rac*-**4**) und in *N*-formulierter Form (**81**) als Hauptprodukt dieser Reduktion erhalten. Nach Hydrolyse von **81** wird das Amin (*rac*-**4**) mit hoher Enantioselektivität (86 - 98% ee) erzielt, wenn ein aromatisches Keton als Edukt verwendet worden ist. Mit aliphatischen Ketonen konnten unter den gegebenen Bedingungen nur Spuren des entsprechendenamins beobachtet werden.

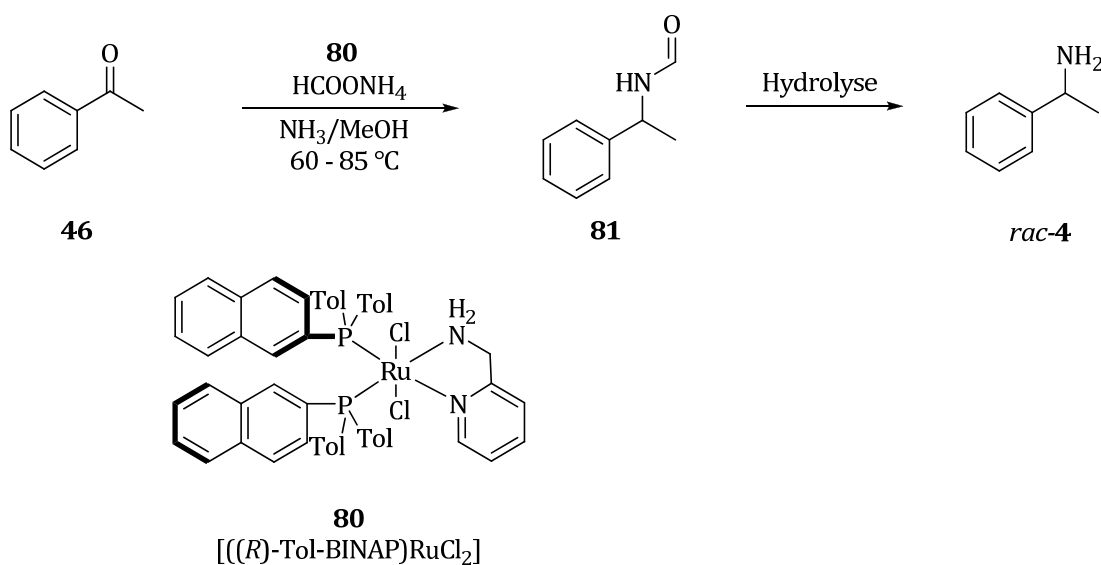


Abbildung 60. Asymmetrische Aminierung von Acetophenon (**46**) mittels Ruthenium-Katalyse (**80**).^[216]

Ebenfalls interessant ist die dreistufige Synthese optisch aktiver Amide von BURK *et al.* durch enantio-selektive katalytische Hydrierung von Enamiden mit Rh^I/DuPhos (*S,S*)-**82** (Abbildung 61).^[204,205] Die Enamide wiederum sind durch Reduktion der Oxime mit Eisen zugänglich. Ausgehend vom Pinakolon-Oxim **83** wird das nahezu enantiomerenreine Amid (*R*)-**85** über den Zwischenschritt des Enamins **84** erhalten, wobei nur 0.1 mol-% des Katalysators benötigt wird. Das Amid (*R*)-**85** kann anschließend zum primären Amin (*R*)-**86** hydrolysiert werden. Nachteile dieses Prozesses sind die aufwändige Synthese der Enamin-Vorstufe **83**, da diese durch Addition von Alkyl-Grignard an Nitrile hergestellt werden, sowie die geringe Ausbeute von 20 - 40% des Enamids **84**.

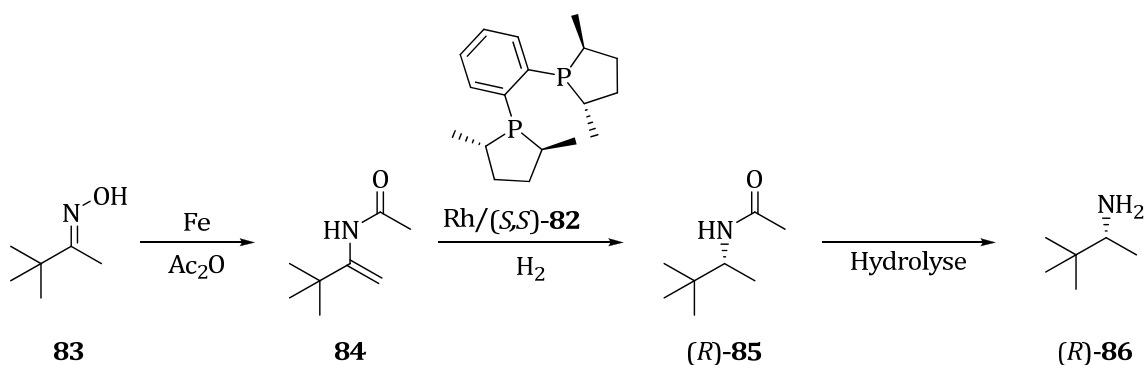


Abbildung 61. Enantioselektive katalytische Hydrierung von Enamin **84** mit Rh/(*S,S*)-**82**.^[204,205]

Rhodium-katalysierte asymmetrische Hydrierungsreaktionen von Enamiden werden erfolgreich auch mit anderen Liganden durchgeführt. In allen Fällen wird der eigentliche Katalysator aus der Metall-Spezies $[\text{Rh}(\text{COD})_2]\text{BF}_4$ und dem jeweiligen Liganden *in situ* hergestellt. Der Phosphin-Aminophosphin-Ligand (*S*)-**87** liefert einen quantitativen Umsatz und ee-Werte bis zu 94% (Abbildung 62).^[217] Die einfache Zugänglichkeit aus (*S*)-Phenylethylamin ((*S*)-**4**), die Modularität, die sehr gute Luft- und Feuchtigkeitsstabilität und der niedrige Preis machen diesen Liganden extrem attraktiv. Der PhthalaPhos-Ligand (*S*)-**88** enthält eine Phthalsäureamid-Einheit, die gute Donor- und Akzeptor-Eigenschaften zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, was zu supramolekularen Wechselwirkungen zwischen zwei Liganden, die einem supramolekularen Bidentat-Liganden bilden, und dem Substrat führt.^[218] Durch Variation verschiedener Einheiten des Liganden, wie beispielsweise dem Linker, können diese Eigenschaften weiter angepasst werden. Die Reaktionen laufen ebenfalls mit guten Umsätzen und ee-Werten von >97% ab.

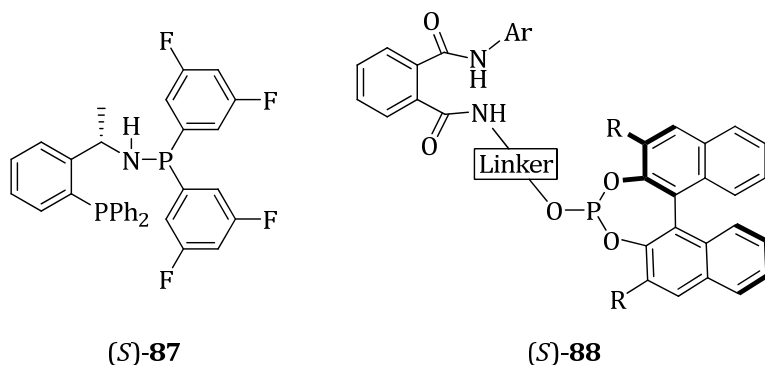


Abbildung 62. Chiraler Phosphin-Aminophosphin-Ligand (*S*)-**87** und PhthalaPhos-Ligand (*S*)-**88** zur asymmetrischen Hydrierung von Enamiden.^[217,218]

Der Ligand (*S*)-**89** ist ein hocheffizienter polymergebundenes Monophosphit-Ligand vom BINOL-Typ, der eine PEG-Struktur als Alkoxyeinheit gebunden hat (Abbildung 63).^[219] Die Produkte der Rhodium-katalysierten asymmetrischen Hydrierung von Enamiden werden bei Raumtemperatur und 60 bar Wasserstoffdruck mit quantitativem Umsatz mit bereits sehr guten ee-Werten von >96% erhalten. Bei einer Erhöhung der Katalysatormenge von 0.2% auf 1.0 mol% und einer Verringerung des Wasserstoffdruckes auf nur 10 bar konnte die Enantioselektivität noch weiter auf >98% gesteigert werden. Als Substrate eignen sich außerdem β -Aminoacrylate, wobei sowohl (*E*)- als auch (*Z*)-**90** zur entspre-

chenden Aminosäure **91** umgesetzt werden können. Hierbei weist (*E*)-**90** eine höhere Aktivität als das (*Z*)-Isomer (94% bzw. 73% Umsatz) auf, jedoch bleiben die Enantiomerenüberschüsse mit 96% bzw. 97% bei einer Katalysatorbeladung von 0.1 mol% etwa gleich. Sperrigere Substituenten wie die *iso*-Propyl-Gruppe führen zu optimierten Ergebnissen, allerdings wird dabei eine Umkehr der Selektivität von (*S*) zu (*R*) beobachtet. Weitere Vorteile von (*S*)-**89** sind die leichte Zugänglichkeit, Luftstabilität, einfache Abtrennung sowie die Recyclisierbarkeit des Katalysator-Systems.

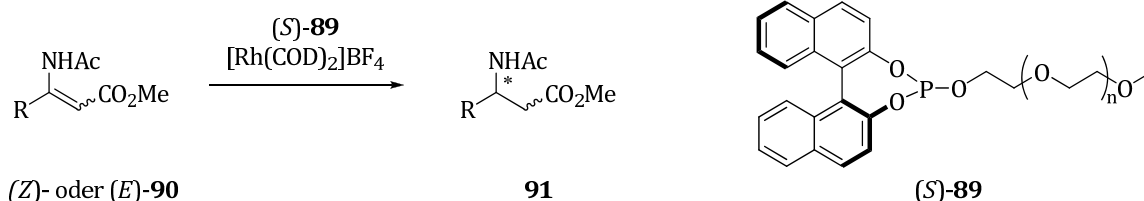


Abbildung 63. Asymmetrische Rh-katalysierte Hydrierung von Enamiden **90** (links) mit dem Monophosphit-Liganden (*S*)-**89** (rechts).^[219]

Die Möglichkeiten zur chemischen asymmetrischen Synthese chiraler Amine sind sehr vielfältig und liefern in den meisten Fällen sehr gute Umsätze sowie hohe Enantiomerenreinheiten. Die Synthesen verlaufen jedoch oft mehrstufig und erfordern Organometall-Katalysatoren und Liganden, die kostenintensiv sind und aufwendig hergestellt werden müssen. Auch können die Reaktionsbedingungen nicht direkt auf andere Substrate übertragen werden, sodass jeder Schritt individuell optimiert werden muss.

4.2.2 Enzymkatalysierte Synthesen

Zur biokatalytischen Synthese von chiralen Aminen gibt es unterschiedliche Ansätze ausgehend von prochiralen Carbonylverbindungen oder von racemischen Aminen bzw. Amiden wie die Transaminierung, die Deracemerisierung und die kinetische sowie dynamisch kinetische Racematspaltung (Abbildung 64).

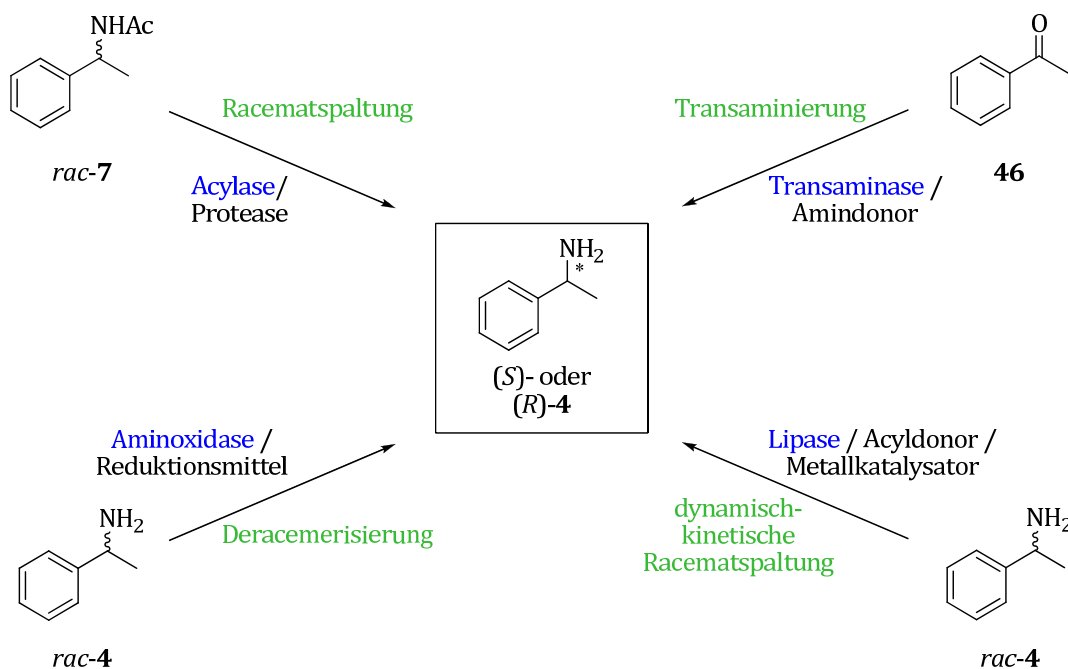
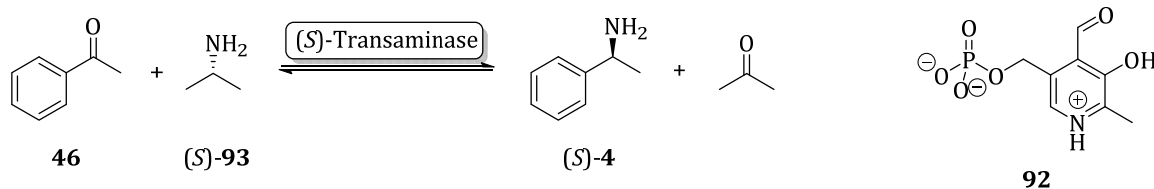


Abbildung 64. Methoden zur biokatalytischen Synthese von chiralen Aminen.^[220]

Seit BRAUNSTEIN 1939 erstmals von dem Transfer einer Aminofunktion zwischen einer Donor-Aminosäure und einer α -Ketosäure als Akzeptor durch lebendes Gewebe tierischen Ursprungs berichtete, zählt die Enzymklasse der Transaminase zu den am besten untersuchte Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen.^[221] Ein von CELGENE entwickeltes industrielles Verfahren zur biokatalytischen Synthese von chiralen Aminen nutzt die Transaminierung. Dabei katalysieren Transaminasen die asymmetrische Übertragung einer Aminofunktion auf eine Carbonylverbindung wie Keton **46** oder eine α -Ketosäure, wobei Pyridoxalphosphat **92** als Cofaktor dient, in dem die Aminofunktion sowie das Reduktionsäquivalent gespeichert werden (Abbildung 65, A).^[207,222] Da sowohl (S)- als auch (R)-selektive Transaminasen entwickelt wurden, sind beide Enantiomere der Amine zugänglich.^[208] Ein prochirales Keton **46** übernimmt dabei vom Amin-Donor (S)-**93** eine Aminofunktion. Enantiomerenreines (S)-**4** und Aceton entstehen mit einer Ausbeute von >90%. Des Weiteren kann die Reaktion auch im Sinne einer Racematspaltung geführt werden (Abbildung 65, B). Dabei wird das (S)-**4** in das entsprechende Acetophenon (**46**) umgewandelt. Als Aminogruppenakzeptor werden Aldehyde wie **94** verwendet, aus dem das Amin **95** entsteht. Das Amin (R)-**4** wird enantiomerenrein mit maximal 50% Umsatz erhalten. Allerdings erweist sich die Trennung der Produktmischungen aus der Racematspaltung als aufwendig.

Transaminasen akzeptieren ein breites Substratspektrum an aliphatischen und aromatischen Ketonen und Aminen.^[208] Ein Nachteil besteht allerdings in der Abhängigkeit des Enzyms von wässrigen Medien. Daher werden mit hydrophoben Reagenzien meist nur geringe Produktkonzentrationen erzielt.

A: Transaminierung



B: Racematspaltung

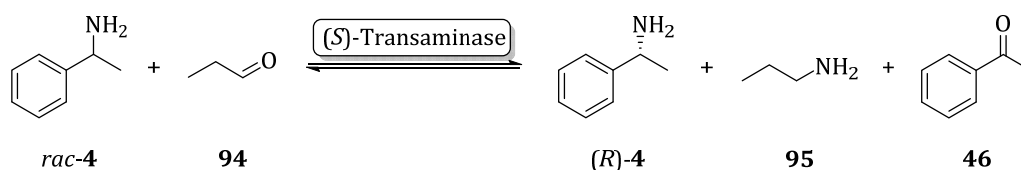


Abbildung 65. Enantioselektive Transaminierung von Keton *rac*-4 mit dem Cofaktor Pyridoxal-phosphat **92** (A) und Racematspaltung (B).^[208]

Die mehrstufige Synthese von Sitagliptin ((*R*)-**96**), einem Wirkstoff zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2, umfasst unter anderem eine Rhodium-katalysierte asymmetrische Reduktion eines Enamins.^[206,207] Das in Kapitel 4.2.1 beschriebene chomokatalytische Verfahren enthält ein toxisches Schwermetall als Katalysator, welches aufwendig wieder entfernt werden muss. Als Alternative wurde von MERCK & Co. und CODEXIS, INC. ein biokatalytischer Prozess entwickelt (Abbildung 66), der 2010 mit dem *Green Chemistry Award* für eine verbesserte grüne Synthese ausgezeichnet worden ist.^[223] Die ω -Transaminase katalysiert die Übertragung der Amin-Funktion sowie des Reduktionsäquivalentes von einer günstigen Stickstoffquelle wie 2-Propylamin (*rac*-**93**) auf das Diketon **97**. Durch die Flüchtigkeit des gebildeten Acetons wird das Gleichgewicht zur Produktseite verschoben. Die Reaktion wird mit einer hohen Substratkonzentration von bis zu 500 mM und >40 °C Reaktionstemperatur durchgeführt. Sitagliptin ((*R*)-**96**) wird innerhalb von 24 Stunden mit einem Umsatz von 90 – 95% und einem Enantiomerenüberschuss von 99.5% gewonnen.

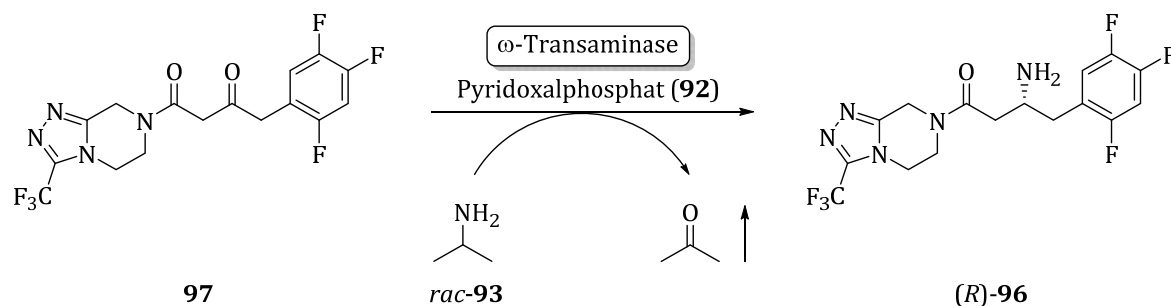


Abbildung 66. Biokatalytische Synthese von Sitagliptin ((*R*)-**96**) mittels ω -Transaminase.^[206,207]

Die Deracemerisierung von racemischen Aminen, wie α -Aminosäuren, wurde kürzlich durch die Kupplung einer enantioselektiven Oxidation mittels einer D-spezifischen Aminoxidase und einer chemischen, nicht-selektiven Reduktion durchgeführt (Abbildung 67).^[224] Dieser Prozess führt somit zur Bildung von L-**98** ausgehend vom prochiralen Imin **99**. Da chirale Amine jedoch nicht von Aminosäureoxidasen oxidiert werden können, wurden in neuerer Zeit eine Aminoxidase aus *Aspergillus niger* als aktiver Biokatalysator identifiziert.^[225] Somit kann nun ein breites Substratspektrum an chiralen Aminen mit guter Enantioselektivität umgesetzt werden. In allen bekannten Fällen ist dieses Enzym (*S*)-selektiv. Allerdings sind für Anwendungen in großem Maßstab noch Optimierungen in Hinblick auf Selektivität, Aktivität und Stabilität notwendig.

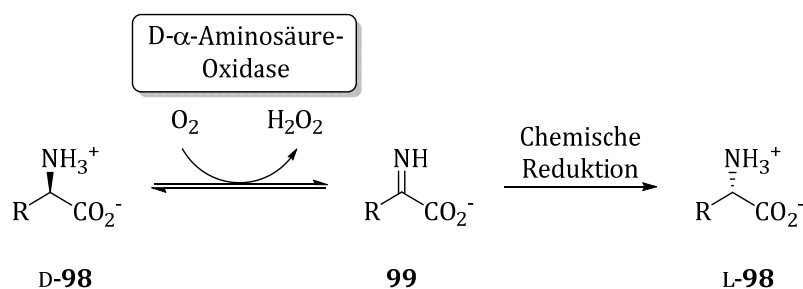


Abbildung 67. Deracemerisierung einer D- α -Aminosäure D-**98** mittels einer Aminoxidase.^[224]

Im großen Maßstab werden Lipasen zur biokatalytischen Synthese von chiralen Aminen herangezogen. Nach einer Empfehlung von IUPAC ist eine kinetische Racematspaltung wie folgt definiert: „Das Erreichen von einer teilweisen oder vollständigen Trennung aufgrund von unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten der Enantiomere eines Racemates mit einem chiralen Agens (Reagenz, Katalysator, Lösungsmittel, etc).“^[226] Im einfachsten Fall einer Racematspaltung regieren die Enantiomere des Substrats mit einem chiralen Agens oder Katalysator über zwei diastereomere Übergangszustände. Die Energien dieser Übergangszustände bestimmen die Geschwindigkeitskonstanten für die Umsetzung des langsam und des schneller reagierenden Enantiomers und damit die Produktverteilung.^[37] Zwar wurden vermehrt chemische Katalysatoren zur Racematspaltung getestet, allerdings konnten die Ergebnisse, die mit vielen Biokatalysatoren erzielt wurden, nicht übertroffen werden.^[208]

Anfang der 90er Jahre wurden bei SHELL erste Arbeiten zur enantioselektiven Hydrolyse racemischer Amide mittels *Arthrobacter* sp. durchgeführt, wobei sich die Verwendung von ganzen Zellen sowie die sehr langen Reaktionszeiten als nachteilig erwiesen.^[227] Mitte der 90er Jahre wurden von der BAYER AG Methoden zur selektiven Hydrolyse von racemischen Acetamiden wie **100** mit Lipase B aus *Candida antarctica* (CAL-B) als Biokatalysator ausgearbeitet (Abbildung 68).^[228] Die CAL-B hat sich, in Form eines Immobilisats auf einem Acrylamid-Träger (Novozym 435), in einer Reihe von Arbeiten als die geeignetste Lipase erwiesen.^[27-29] Aufgrund unbefriedigender Raum-Zeit-Ausbeuten, 43% Umsatz nach sieben Tagen Reaktionszeit, wurde dieser Prozess trotz sehr guter Enantiomerenüberschüssen von >99.5% technisch nicht angewendet.^[208]

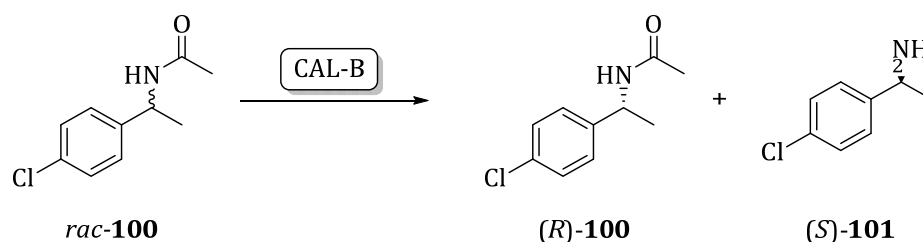


Abbildung 68. Selektive Hydrolyse des racemischen Acetamids *rac*-**100** nach BAYER AG.^[228]

Nach einem von BASF SE patentierten Verfahren der enantioselectiven Acylierung, der sogenannten kinetischen Racematspaltung, von Amin *rac*-**4** wird in der ersten Stufe nahezu enantiomerenreines Amin (*S*)-**4** und das entsprechende Amid (*R*)-**102** mit >99% ee erhalten.^[208] Eine Besonderheit stellt der induktive Effekt der Methoxygruppe dar, die die Reaktivität an der Carbonylfunktion aktiviert. Durch *Molecular Modelling* eines Übergangszustandes konnte eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem β -Sauerstoffatom des Esters **103** und der Aminofunktion von *rac*-**4** ermittelt werden.^[229,230] Wahrscheinlich stabilisieren diese Wechselwirkung sowie induktive Effekte und sterische Gründe den Übergangszustand und erhöhen dadurch die Reaktionsgeschwindigkeit.

Nach Abtrennung von (*R*)-**102** durch Destillation oder Extraktion wird das ebenfalls enantiomerenreine (*R*)-**4** durch basische Hydrolyse freigesetzt. Die Substratbreite ermöglicht die Racematspaltung von vielen strukturell sehr unterschiedlichen Aminen. Weitere Vorteile dieses Prozesses sind die Möglichkeit zur Rückführung der unerwünschten Enantiomere durch Racemisierung^[231-233] und die Rückgewinnung des Acylierungsmittels^[234]. Seit Anfang 2002 produziert BASF SE mit diesem Verfahren optisch aktive Amine mit >3500 t/a und ist somit der weltweit führende Anbieter chiraler Amine.^[208]

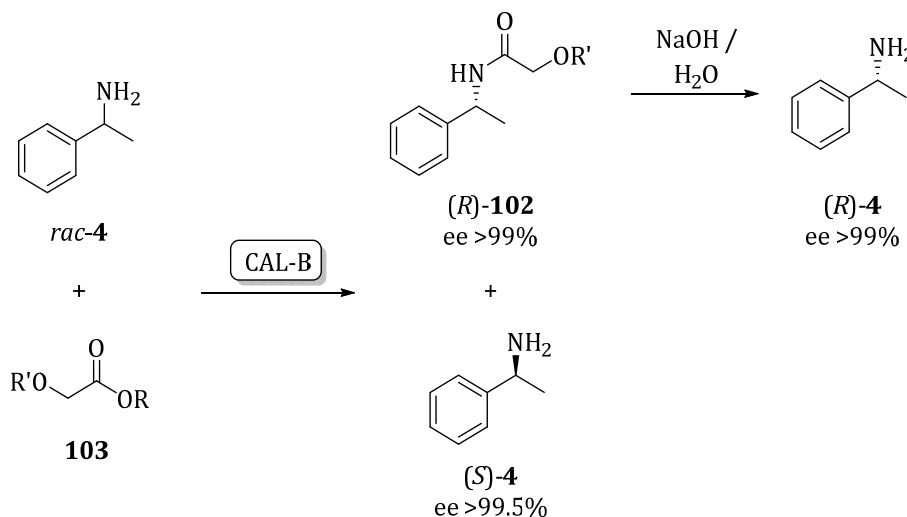


Abbildung 69. Enantioselective Amidbildung ausgehend von *rac*-**4** nach BASF SE.^[208] Basische Hydrolyse von (*R*)-**102** ergibt (*R*)-**4**.

Bei der Umsetzung von cyclischen Aminoalkoholen^[235] und Diaminen (wie (\pm)-**104**)^[236,237] wird ebenfalls CAL-B als Biokatalysator verwendet. Im Fall des Diamins (\pm)-**104** können mit Dimethylmalonester (**105**) als Acyldonor zwei sequenzielle Acylierungsreaktionen durchgeführt werden (Abbildung 70).^[236,237] Dabei wird zunächst durch Monoacylierung das optisch angereicherte Monoamid

(*R,R*)-**106** mit 66% Enantiomerenüberschuss und das nicht umgesetzte Amin (*S,S*)-**104** mit 83% ee erhalten. Der zweite Acylierungsschritt ist enantioselektiv, wodurch das Diamid (*R,R*)-**107** mit >99% ee erzielt werden. Die CAL-B zeigt folglich in beiden Schritten die gleiche Präferenz in Bezug auf das (*R,R*)-Enantiomer. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Regel von KAZLAUSKAS, da das monoacylierte Amid (*R,R*)-**106** einen größeren sterischen Unterschied in den Substituenten aufweist als das freie Diamin (\pm)-**104**.^[28]

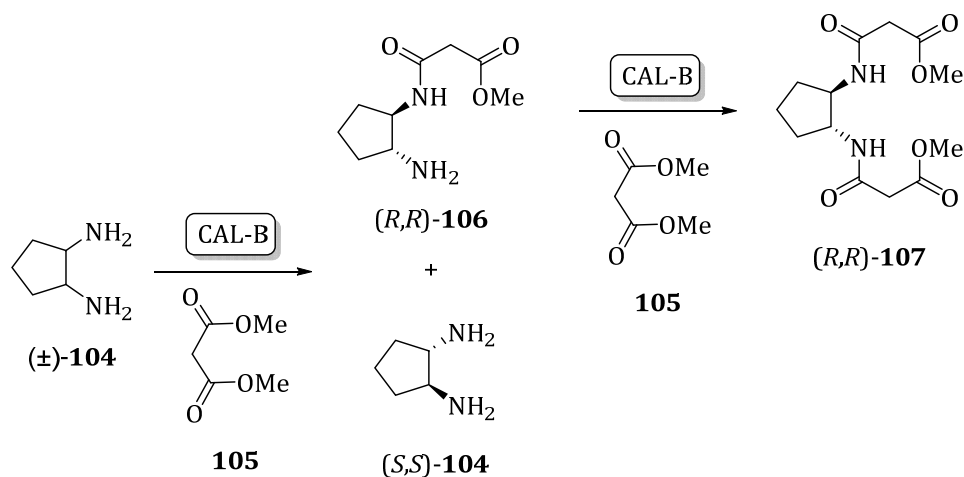


Abbildung 70. Lipasen-katalysierte doppelte Acylierung des Diamins (\pm)-**104** mit Malonsäuredimethylester (**105**) als Acyldonor.^[236,237]

Die Optimierung der katalytischen Aktivität und Selektivität der CAL-B kann durch Variation des Lösungsmittels sowie des Acyldonors erreicht werden. Da Amine sehr gute Nucleophile sind, können hochreaktive Acyldonoren bereits durch spontane nicht-enzymatische nucleophile Substitution zu racemischen Amiden führen.^[31] GIL *et al.* zeigten die Akzeptanz eines breiten Substratspektrums der CAL-B am Beispiel der Acylierung von *rac*-**108** (Abbildung 71).^[31] Sowohl kurz- als auch langkettige Carbonsäuren und Ester, wie Laurinsäure (**109**) und dessen Ester **110**, wurden dabei als Acyldonoren getestet, wobei die Enantioselektivität sowie die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Kettenlänge zunimmt. Allerdings kann dieser Einfluss nicht als allgemeiner Trend für Lipasen angesehen werden. Während mit simplen Estern, das bekannteste davon ist Essigester **5**, nur bis zu 91% ee erhalten werden können, liefert Methoxyessigsäureethylester (**111**) in nur 1.5 Stunden >99.5% ee, das Amid (*R*)-**8** allerdings nur mit 77.4% ee.

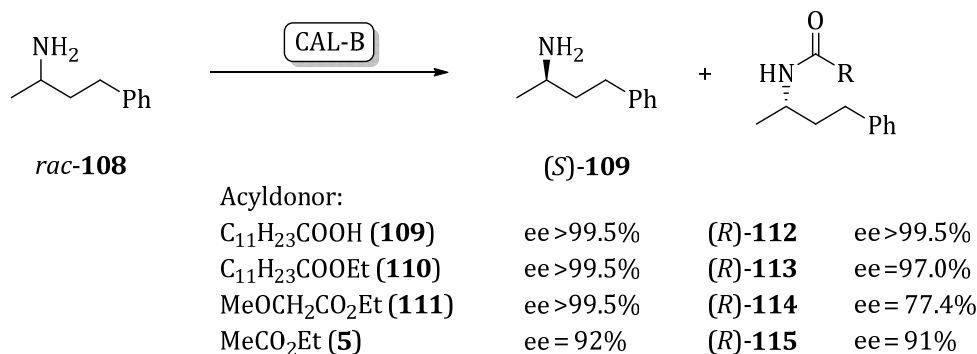


Abbildung 71. Enzymatische Acylierung von *rac*-**108** mit unterschiedlichen Acyldonoren.^[31]

Ein großer Nachteil der kinetischen Racematspaltung ist die Limitierung des Umsatzes auf maximal 50%. Aus diesem Grund ist die Racemisierung ein wichtiges Hilfsmittel, das in Kombination mit der biokatalytischen kinetischen Racematspaltung zu einem Umsatz von theoretisch 100% und einem effizienteren Gebrauch des gesamten Racemates führen kann. Ein möglicher Mechanismus der Racemisierung besteht aus einer Kombination von Dehydrierung des chiralen Amins und einer Re-Addition von Wasserstoff an das Imin.^[231] Des Weiteren ist die basenkatalysierte Racemisierung des resultierenden chiralen Amins möglich.^[238] Ein Schlüsselproblem der dynamisch-kinetischen Racematspaltung (DKR) ist es, Bedingungen zu finden, unter denen der Bio- und der Chemokatalysator effizient arbeiten können. Wenn das erwünschte Enantiomer das (*R*)-Produkt ist, dann ist bei den Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Schritte folgende Reihenfolge vorausgesetzt: $k_{rac} > k_R > k_S$ (Abbildung 72).^[239]

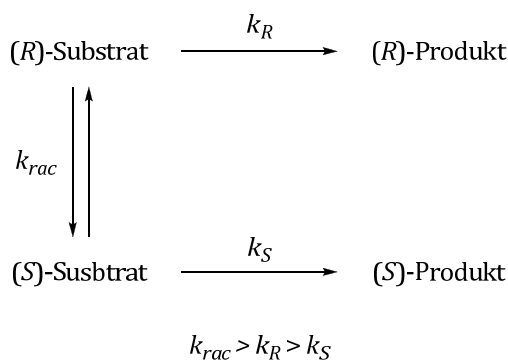


Abbildung 72. Schema der dynamisch-kinetischen Racematspaltung (DKR).^[239]

REETZ und SCHIMOSSEK beschrieben 1996 die erste dynamisch-kinetische Racematspaltung mit Palladium auf Aktivkohle als Katalysator, wobei nach fünf Tage Reaktionszeit ein Umsatz von 64% zum Amid und ein Enantiomerenüberschuss von 99% erreicht werden konnte.^[240] Weitere Ansätze verwendeten Pd-Partikel immobilisiert auf Trägern wie BaSO_4 ^[241] oder einen Palladium-Nanokatalysator eingeschlossen in Aluminiumhydroxid.^[242] BÄCKVALL *et al.* kombinierten die CAL-B schließlich in einer Zweistufen-Synthese mit dem Ruthenium-Katalysator **116**, der in ähnlicher Form bereits erfolgreich bei der Racemisierung von Alkoholen Verwendung findet (Abbildung 73).^[231] Ausgehend von den Aminen *rac*-**4** und *rac*-**117** werden die Amide (*R*)-**7** und (*R*)-**118** nahezu enantiomerenrein mit >98% ee und mit Umsätzen von 69% bzw. 66% erhalten. Die Anwesenheit von elektronenschiebenden Gruppen erhöht

die Geschwindigkeit der Racemisierung. Allerdings erfordert diese Methode eine extractive Trennung des (*S*)-Amins vom Produkt für die anschließende Racemisierung. In den letzten Jahren wurden weitere Katalysatoren entwickelt, beispielsweise durch Modifizierungen von **116**^[232,233] oder durch Einsatz von Metallen wie Iridium^[239] oder dem Thiyil-Radikal^[243], die höhere Reaktionsgeschwindigkeiten und Selektivitäten aufweisen.

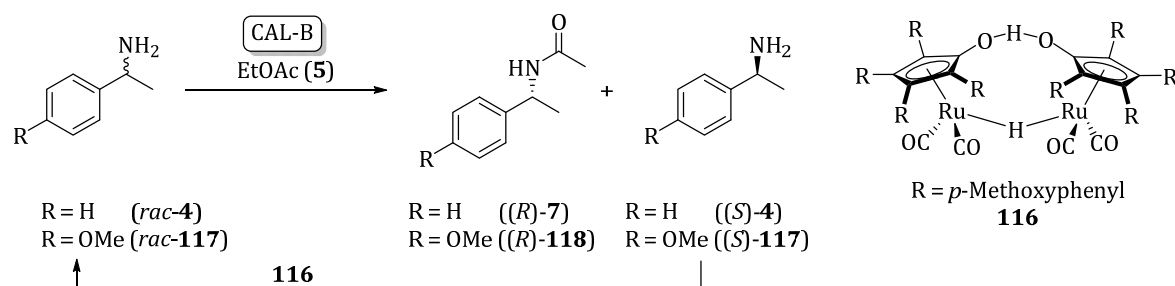


Abbildung 73. DKR ausgehend von *rac-4* und *rac-117* mit dem Ruthenium-Katalysator **116**.^[231]

In neuerer Zeit gibt es auch Versuche, die Racemisierung biokatalytisch durch Einsatz von Racemasen anstelle von Chemokatalysatoren durchzuführen. In der Natur gibt es wegen der Mehrzahl an stereospezifischen Prozessen nur eine kleine Anzahl an Racemasen. Die am besten untersuchte Mandelat-Racemase aus *Pseudomonas putida* ATCC 12633 ist aufgrund der Stabilität, dem relativ breiten Substratspektrum sowie der Cofaktor-Unabhängigkeit ein attraktiver Biokatalysator für Racemisierungen von Hydroxy-Carbonsäuren.^[244] Die geringe Aktivität gegenüber nicht-natürlichen Substraten konnte in diesem Fall bereits durch Mutationen optimiert werden. Die Anwendung der meisten Racemasen ist jedoch auf Aminosäuren und deren Derivate beschränkt.^[238] Da für jede Substratklasse die geeignete Racemase gefunden und verbessert werden muss steckt die generelle Anwendung von Racemasen jedoch noch in den Anfängen.^[11]

Trotz seines Vorteils als nicht-toxisches und natürliches Lösungsmittel ist Wasser für viele unpolare organische Substrate ein schlechtes Lösungsmittel. Oft finden Nebenreaktionen statt und die Rückgewinnung der Produkte gestaltet sich schwierig. So gehört die im Vergleich zu Wasser erhöhte Löslichkeit von unpolaren Substraten, sowie die Vermeidung der Hydrolyse des gebildeten Produktes zu den Vorteilen der Verwendung von Enzymen in organischen Lösungsmitteln.^[245] Dennoch ist die katalytische Aktivität der Enzyme in organischen Lösungsmitteln häufig um einige Größenordnungen geringer als in wässrigen Systemen. Dieses lässt sich teilweise auf die Limitierung der Diffusion sowie Änderungen der Flexibilität und Destabilisierung des Enzyms zurückführen. Auch bei Enzymen, die in organischen Medien aktiv sind, ist eine geringe Menge an Wasser notwendig. Generell sind zwei Arten von Wassermolekülen im Enzym vorhanden. Die Wassermoleküle in der „inneren Klasse“ sind im Inneren des Enzyms gebunden und spielen eine wichtige Rolle in dessen Tertiär-Struktur. Die Wassermoleküle der „Kontakt-Klasse“ sind nur schwach an der Oberfläche des Enzyms gebunden und können bei getrockneten Enzymen drei Gew.% oder mehr ausmachen.^[246] Diese können schnell durch andere Moleküle ausgetauscht werden, was eine große Flexibilität des Enzyms zur Folge hat. Unpolare Lösungsmittel tauschen nur einen Teil dieser Wassermoleküle aus und führen somit zu verringerter Flexibilität, während polare Lösungsmittel stärker an der Oberfläche binden. Die Verwendung von organischen

Lösungsmitteln ist aus mehreren Gründen nachteilig für den Einsatz in der Industrie.^[247] Sie sind meist stark flüchtig und deren Verwendung bedarf kostenintensiven Nachbehandlungen wie Abdampfen und Recycling. Des Weiteren führt der Einsatz von Lösungsmittel durch die hohe Verdünnung zur Verringerung der Raum-Zeit-Ausbeute. Demnach wäre ein lösungsmittelfreier Prozess sowohl aus ökologischer und ökonomischer Perspektive von großem Vorteil.

Lösungsmittelfreie Systeme sind hauptsächlich bei der biokatalytischen Acylierung von Alkoholen bekannt.^[248,249] Für die lipasenkatalysierte, lösungsmittelfreie Racematspaltung von Aminen, in denen der Acyldonor nicht als Lösungsmittel dient, sind strenge Reaktionsbedingungen sowie erhöhte Temperaturen und verminderter Druck notwendig. So beschrieben KATO *et al.*, aufbauend auf den früheren Arbeiten von HULT, eine der ersten enantioselektiven lipasenkatalysierte Acylierung von Amin *rac*-**4** durch Reaktion mit Carbonsäuren **119** und **109** in einem lösungsmittelfreien System (Abbildung 74).^[250,251] Das Gleichgewicht der Reaktion wird zugunsten der Bildung der Amide (*R*)-**120** verlagert, indem das als Nebenprodukt gebildete Wasser kontinuierlich unter niedrigem Druck entfernt wird. Aufgrund der Viskosität der Reaktionsmischung musste bei 55 °C gearbeitet werden, um eine effiziente Durchmischung des Systems zu ermöglichen. Die Acylierung liefert Enantiomerenüberschüsse von >97% für das Amid (*R*)-**120-a** bzw. >99% für (*R*)-**120-b** bei mäßigen Umsätzen von 32 bzw. 45%. Kurze Zeit später berichtete GUPTA, dass ein vollständiger Umsatz durch zusätzliches Erhitzen der Reaktionsmischung auf 90 °C erreicht werden kann.^[252] Allerdings werden hierbei keine Angaben zur Stabilität des Enzyms gemacht.

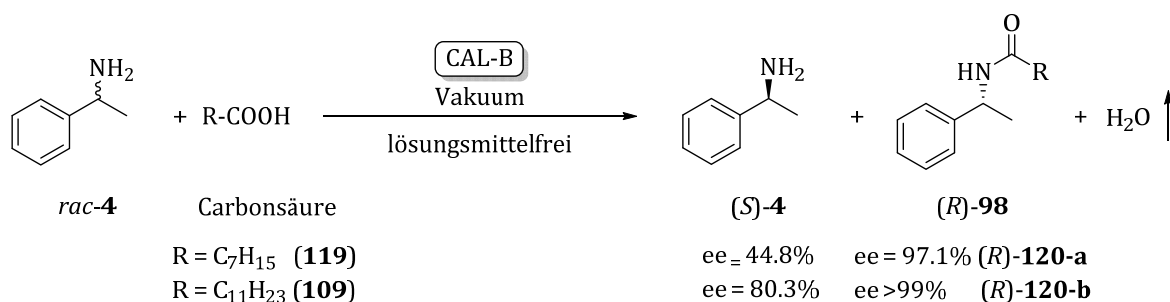


Abbildung 74. Lösungsmittelfreie biokatalytische Acylierung von *rac*-**4**.^[250]

KANERVA *et al.* schließlich führten die lösungsmittelfreie Racematspaltung unterschiedlicher Amine mit äquimolarer Menge an aktivierten Methoxyestern mittels CAL-B bei Raumtemperatur durch.^[36] Alle (*S*)-Amine und (*R*)-Amide konnten mit hoher Enantiomerenreinheit von $\geq 95\%$ erhalten werden. Die größten Unterschiede zwischen Reaktionen in Gegenwart oder Abwesenheit von organischen Lösungsmitteln liegen in der benötigten Zeit, um 50% Umsatz zu erreichen, sowie in der Enzymeffizienz, da statt 100 mg Enzym pro mmol Substrat in diesem Fall nur noch 25 mg Enzym benötigt wurden. Außerdem konnte die Reaktionstemperatur auf 23 °C gesenkt werden ohne Verluste in den Umsätzen oder ee-Werten zu beobachten.

In der Arbeitsgruppe von GRÖGER wurde Malonsäurediethylester (**9**) als effizienter Acyldonor in *n*-Heptan als organisches Lösungsmittel eingesetzt.^[33,34] Dabei wurde das Amid (*R*)-**10** bei 80 °C Reaktionstemperatur nach 4.5 Stunden mit vollständigem Umsatz nahezu enantiomerenrein erhalten.^[33,34]

In derselben Arbeitsgruppe wurde anschließend der Malonester **9** erfolgreich unter lösungsmittelfreien Bedingungen eingesetzt. So konnte in einem größerem Maßstab von 50 mmol das Amid (*R*)-**10** bei nur 60 °C mit 50% Umsatz und 99% ee erzielt werden (Abbildung 75).^[35]

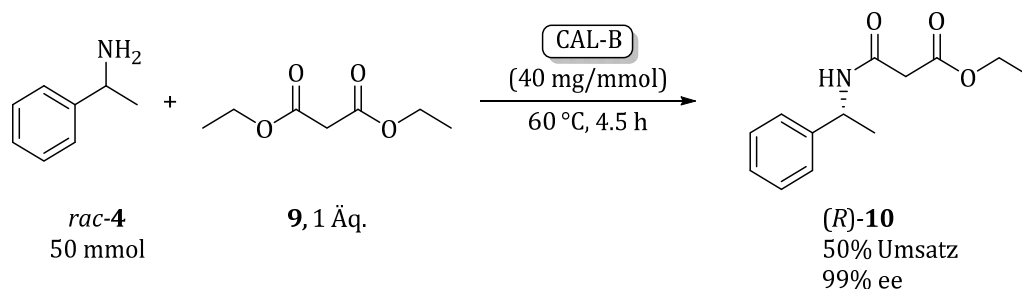


Abbildung 75. Enzymatische Racematspaltung von *rac*-**4** mit Malonsäurediethylester (**9**).^[35]

Die Verwendung eines lösungsmittelfreien Reaktionssystems ist ein großer Schritt in Hinblick auf *Green Chemistry*, da das Lösungsmittel einen großen Teil des Abfalls der enzymatischen kinetischen Racematspaltung ausmacht. Limitierungen der lösungsmittelfreien Racematspaltung sind Enzymtoleranzen und Selektivitäten sowie langsame Reaktionsraten in äquimolaren Reaktionsmischungen. Zudem muss gewährleistet sein, dass die Substrate unter den Reaktionsbedingungen flüssig oder ineinander löslich sind.^[4]

4.3 Eigene Ergebnisse und Diskussion

Die in dieser Arbeit verwendete Lipase B aus *Candida antarctica* (CAL-B) wurde, sofern nicht anders erwähnt, ausschließlich in immobilisierter Form (Novozym 435) eingesetzt. Diese wird im Folgenden nur als CAL-B bezeichnet.

4.3.1 Referenzen und Analytik

Im Folgenden wurde die enantioselektive Racematspaltung an racemischen Aminen durch die (*R*)-spezifische CAL-B untersucht. Um die Enantiomerenüberschüsse der daraus resultierenden Amide mittels HPLC bestimmen zu können wurden zunächst die entsprechenden Racemate chemisch synthetisiert. Diese dienten als Referenz zur Identifikation der Signale der Enantiomere im Chromatogramm sowie als Vergleich für die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren.

4.3.1.1 Synthese der Referenzverbindungen

Die chemische Acylierung erfolgte im Fall der Amide *rac*-**10** und *rac*-**121** ausgehend von Phenylethylamin *rac*-**4** mit den Acyldonoren Malonsäurediethylester (**9**) und Phenoxyessigsäureethylester (**122**) unter Erhitzen zum Rückfluss für 4 bzw. 5 Stunden (Abbildung 76).^[253]

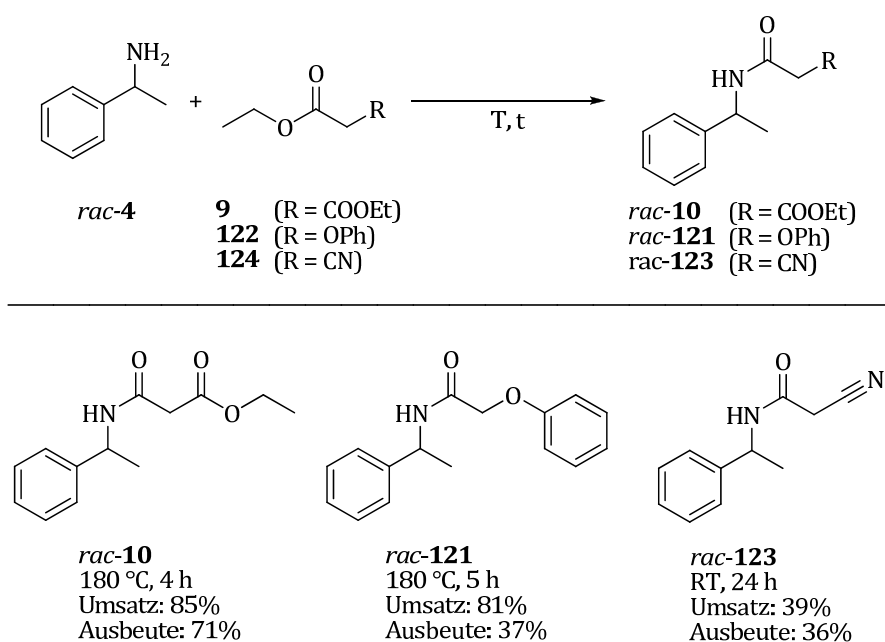


Abbildung 76. Synthese der Referenzverbindungen *rac*-**10**, *rac*-**121** und *rac*-**123**.^[253,254]

Die Amide *rac-10* und *rac-121* wurde mit Umsätzen von $\geq 81\%$ erhalten, im Fall von *rac-121* allerdings nach chromatographischer Aufreinigung nur mit einer Ausbeute von 37%.

Zwar konnte das Cyano-Amid *rac-123* mit dieser Vorgehensweise mit einem Umsatz von 39% erhalten werden, jedoch gelang die Produkttrennung ausgehend von der braunen Reaktionsmischung nicht. Stattdessen wurde das Amin *rac-4* mit Cyanessigsäureethylester (**124**) für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (Abbildung 76).^[254] Das Amid *rac-123* konnte mit einer Ausbeute von 36% isoliert werden. Trotz des geringen Umsatzes wurde keine weitere Optimierung zur Synthese vorgenommen.

Für die Synthese des Acetamids *rac-7* ausgehend von *rac-4* und dem Acyldonor Essigsäurevinylester (**125**) war jedoch eine Erhöhung der Temperatur auf 60 °C notwendig (Abbildung 77). Bei der Acylierung wurde ein Umsatz von 95% erzielt, weswegen auf weitere Aufreinigungsschritte verzichtet worden ist, da die erhaltene Reinheit ausreichend war, um eine Methode für die HPLC zu etablieren.

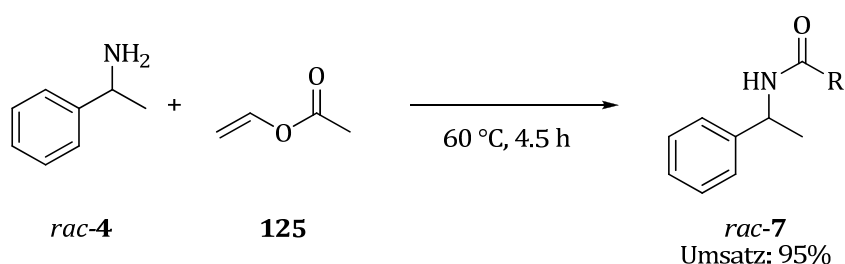


Abbildung 77. Synthese des Racemates *rac-7* als Referenzverbindung.

Eine weitere Synthese wurde für die Darstellung der Amide *rac-126* und *rac-8* herangezogen, die ausgehend von *rac-4* mit einem Acyldonor, 2-Phenylacetylchlorid (**127**) bzw. 2-Methoxyacetylchlorid (**128**), und einer Hilfsbase, wie Triethylamin oder Piperidin, bei 0 – 20 °C erhalten wurden (Abbildung 78).^[255,256] Die Synthese der Amide *rac-126* und *rac-8* gelang mit quantitativen Umsätzen und Ausbeuten von 80% (*rac-126*) bzw. 95% (*rac-8*) nach extraktiver Aufarbeitung.

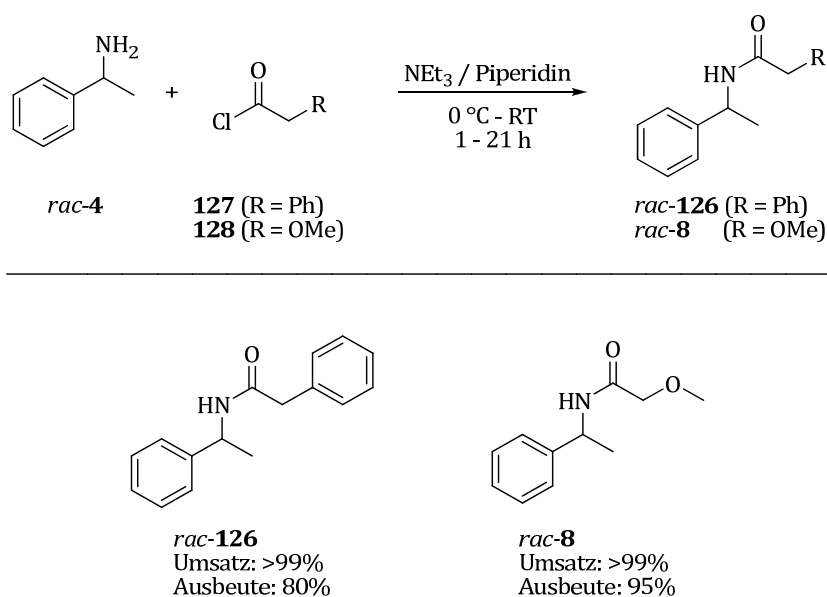


Abbildung 78. Synthese der Racemate *rac-126* und *rac-8* als Referenzverbindungen.^[255,256]

Die Synthese des Aminoindan-Amids *rac*-**129** benötigte weit längere Reaktionszeiten als die bisher beschriebenen Synthesen. Das Aminoindan *rac*-**130** wurde zusammen mit dem Malonester **9** und 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) in DCM für drei Tage bei 40 °C gerührt (Abbildung 79).^[257] Das Amid *rac*-**129** konnte mit einer Ausbeute von 17% isoliert werden. Zusätzlich zum Produkt *rac*-**129** konnte durch säulenchromatographische Aufreinigung das entsprechende Diamid **131** als Nebenprodukt mit 9% Ausbeute isoliert werden.

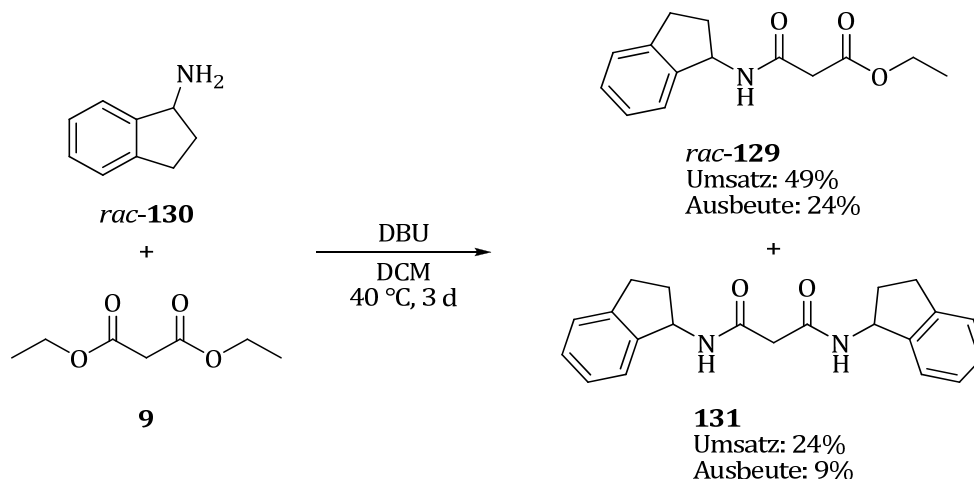


Abbildung 79. Synthese des Aminoindan-Amids *rac*-**129**.^[257]

4.3.1.2 Analytik

Um eine genaue Umsatzbestimmung mittels ¹H-NMR-Spektroskopie etablieren zu können, wurde zunächst die Aufarbeitung validiert. Dafür wurde eine 1:1-Mischung aus Malonsäurediethylester (**9**) und *rac*-**4** eingewogen und das genaue Verhältnis mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Nach anschließender Aufarbeitung analog der Allgemeinen Arbeitsvorschrift 5 (AAV 6, Abschnitt 7.2.2.3.3) erfolgte erneut eine Bestimmung des Verhältnisses mittels ¹H-NMR-Spektroskopie. Die dabei erhaltenen Abweichungen lagen nach dreifacher Bestimmung zwischen 1 – 4% und somit mit durchschnittlich 2% im akzeptablen Bereich. Im Rahmen von Messunsicherheit kann dieser Wert toleriert werden. Es konnten auch keine Produkte einer Hydrolyse-Reaktion beobachtet werden.

Die produktbezogene Bestimmung des Umsatzes mithilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie erfolgte nach Gleichung 2. In Abbildung 80 ist beispielhaft ein Spektrum einer Acylierung bei 60°C Reaktions-temperatur und 4.5 Stunden Reaktionszeit gezeigt. Anhand der am besten isolierten Integrale des Amids (*R*)-**10** bei 5.15 ppm und des Malonats **9** bei 3.36 ppm konnte in diesem Fall ein produktbezogener Umsatz von 42% ermittelt werden. Da durch Variation der Signale Schwankungen der Umsätze mit bis zu 2% auftreten können, wurden für die Umsatzbestimmung immer auf die genannten Signale zurückgegriffen.

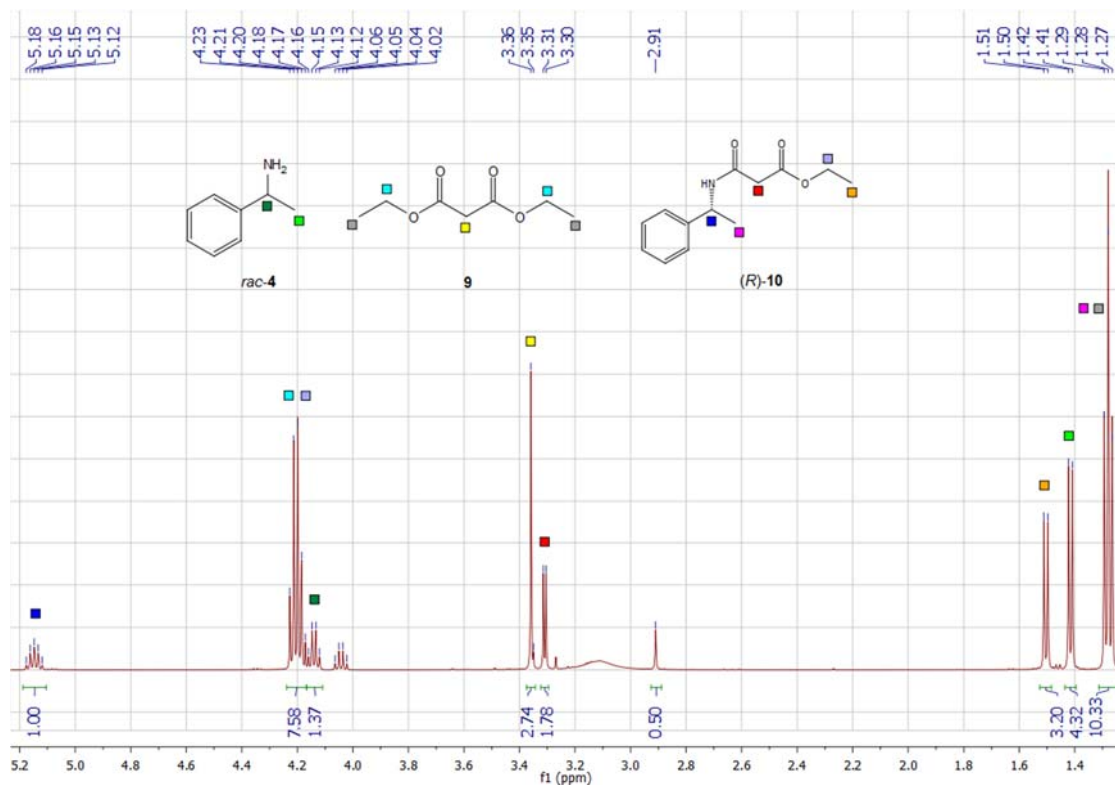


Abbildung 80. Beispiel der Umsatzbestimmung der Acylierung von *rac*-4 mit Diethylmalonat (**9**) mittels ^1H -NMR-Spektroskopie.

Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit des bei der Racematspaltung des Amins *rac*-4 mit dem Malonester **9** erhaltenen Amids (*R*)-10 wurde mithilfe des zuvor synthetisierte Racemat *rac*-10 eine geeignete HPLC-Methode entwickelt und etabliert (Abbildung 81).

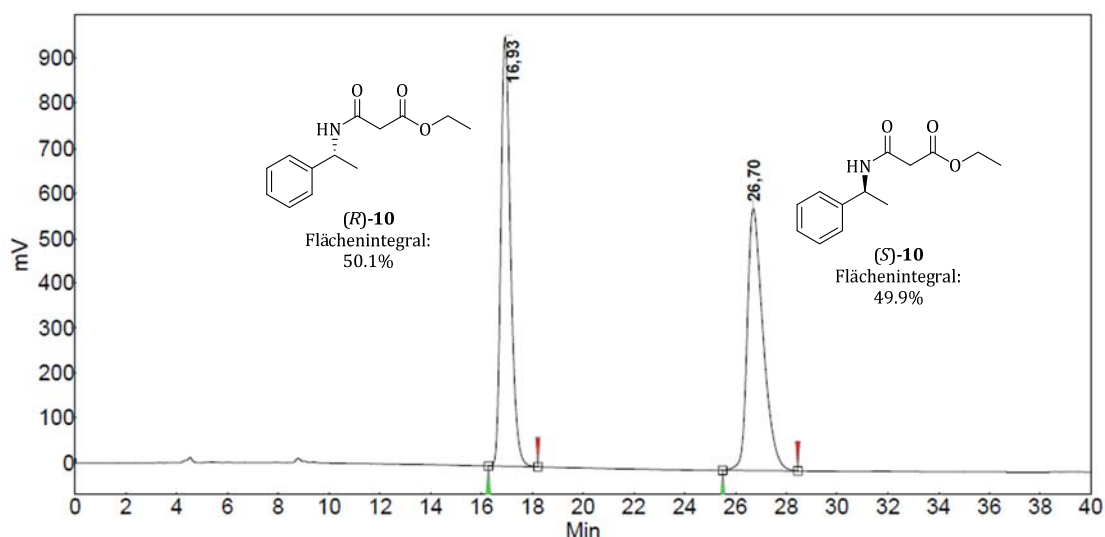


Abbildung 81. HPLC-Chromatogramm des Amids *rac*-10 (gemessen an AD-H-Säule mit *n*-Heptan/*i*-PrOH (95/5 (v/v)), flow: 0.8 mL/min, Retentionszeiten: t_{R} = 16.63 min (*R*), 26.70 min (*S*), *ee*-Wert: 0%).

Der *ee*-Wert des bei einer Racematspaltung nicht umgesetzten Amins (*S*)-4 kann mittels HPLC nicht ermittelt werden. Aus diesem Grund wurde im Anschluss an eine enzymatische Racematspaltung von

rac-**4** die gesamte Reaktionsmischung ohne vorherige Aufarbeitung mit Acetanhydrid (**132**) umgesetzt, sodass eine Acylierung des nicht-umgesetzten Amins (*S*)-**4** erfolgen kann (Abbildung 82). Das Acetamid (*S*)-**7** wurde dabei quantitativ erhalten. Mithilfe des zuvor dargestellten Racemates *rac*-**7** konnte ebenfalls eine HPLC-Analytik etabliert werden und der ee-Wert des Amins (*S*)-**7** somit ermittelt werden. Dieser beträgt <0.2% ee.

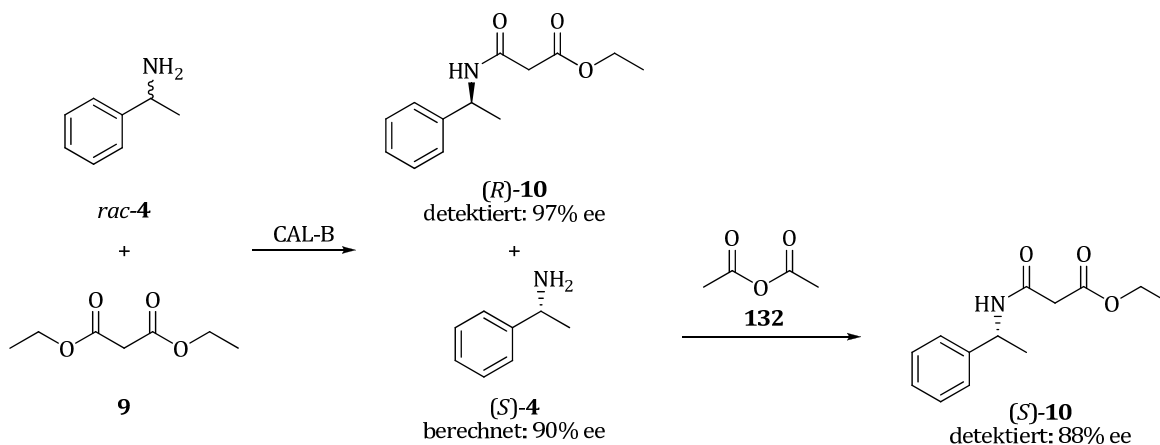


Abbildung 82. Chemische Acylierung des resultierenden Amins (*S*)-**4**. Die Berechnung des ee-Wertes von (*S*)-**4** erfolgte mithilfe des Programms „Enantioselectivity“ durch Angabe des Umsatzes zum Amid (*R*)-**10** und dessen detektierten ee-Wertes.^[258]

Der ermittelte ee-Wert des Amins (*S*)-**4** von 88% stimmte mit dem ee-Wert, der mittels Umsatz der enzymatischen Acylierung und den ee-Werten des erhaltenen Amids (*R*)-**4** berechnet wurden, bis auf 2% Differenz sehr gut überein, sodass die Enantiomerenüberschüsse der Substrate im Folgenden nur berechnet worden sind. Die Berechnung der Selektivität sowie der E-Werte kann mithilfe des Programms „Enantioselectivity“ der Universität Graz erfolgen (Abbildung 83).^[258]

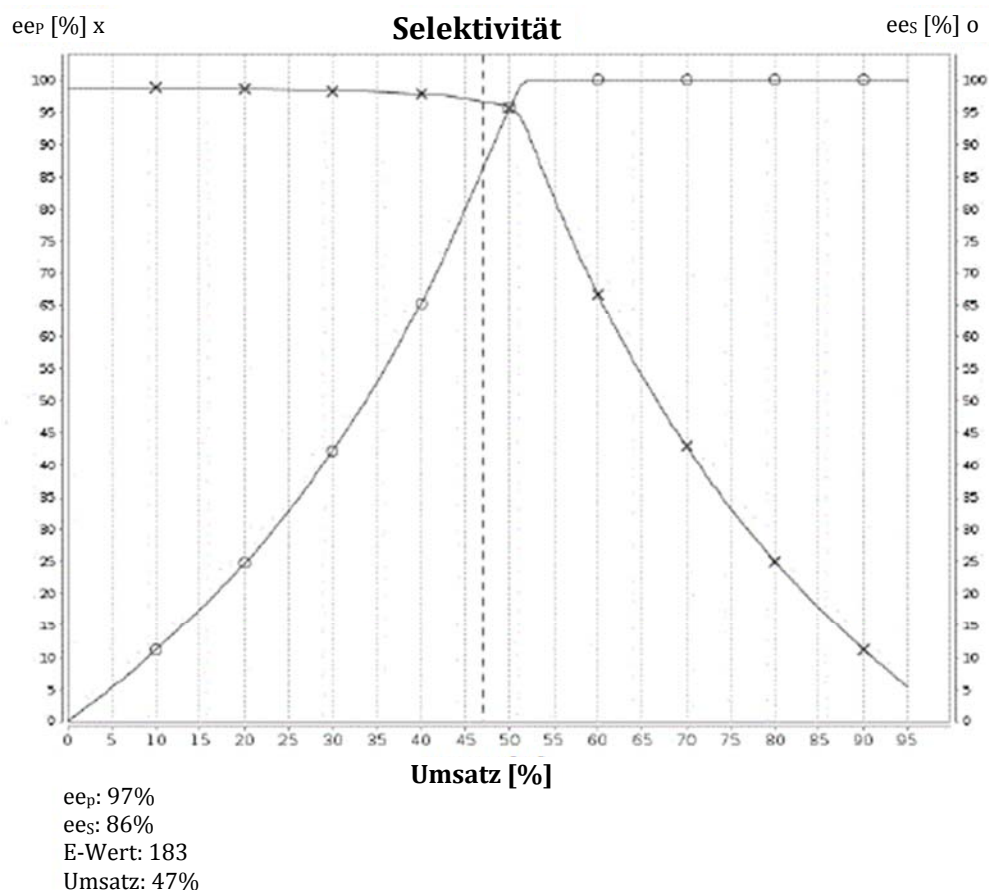


Abbildung 83. Selektivitätsbestimmung der Racematspaltung von *rac*-4 mit Malonester **9**, bestimmt mit dem Programm „Enantioselectivity“.^[258]

Der E-Wert dient als Maß für die Enantioselektivität eines Systems, der die Selektivität der kinetischen Racematspaltung mit dem Umsatz und dem Enantiomerenüberschuss in Verbindung setzt. Die Berechnung erfolgt nach folgender Gleichung 3:^[11]

$$E = \frac{\ln[1 - C \cdot (1 + ee_p)]}{\ln[1 - C \cdot (1 - ee_p)]} = \frac{\ln[1 - C \cdot (1 - ee_s)]}{\ln[1 - C \cdot (1 + ee_s)]} \quad \text{Gleichung 3}$$

In der Literatur finden sich verschiedene Richtwerte, ab wann eine Racematspaltung effizient ist und in großem Maßstab durchgeführt werden könnte.^[11] Als Faustregel gilt, dass Racematspaltungen mit E-Werten <15 inakzeptabel sind für praktische Anwendungen. E-Werte zwischen 15 – 30 werden als moderat bis gut und bei Werten >30 als exzellent angesehen. E-Werte von >200 jedoch können nicht genau bestimmt werden aufgrund von Ungenauigkeiten, die durch Bestimmungen der ee-Werte, z.B. durch die HPLC, entstehen, da in diesem Bereich selbst eine sehr kleine Abweichung der ee-Werte eine signifikante Änderung des E-Wertes zu Folge hat. Aufgrund dieser Schwankungen wird im Rahmen dieser Arbeit die Genauigkeits-Grenze der E-Werte als 100 definiert und größere E-Werte als $E > 100$ angegeben.

4.3.2 Vorversuche mit substituierten Benzylaminen als Substrate

4.3.2.1 Synthese des Benzylamids **133**

Zur detaillierten Etablierung von Methoden der Analytik und Umsatzbestimmung sollte zunächst ein Modellsubstrat zum Einsatz kommen, das keine Stereoinformation trägt. Dafür wurde sowohl das einfachste aromatische Amin, Benzylamin (**134**), als auch substituierte Derivate ausgewählt. In *meta*-Position substituierte aromatische Amine dienen als Ausgangsstoffe für die Synthese pharmazeutischer Wirkstoffe. Beispiele dafür sind Rivastigmin (**135**)^[259,260] oder das Calcimimeticum **136**^[261], die zur Behandlung der Alzheimerschen Krankheit bzw. zur Therapie von Hyperparathyroidismus, einer Regulationsstörung der Nebenschilddrüse, eingesetzt werden (Abbildung 84).

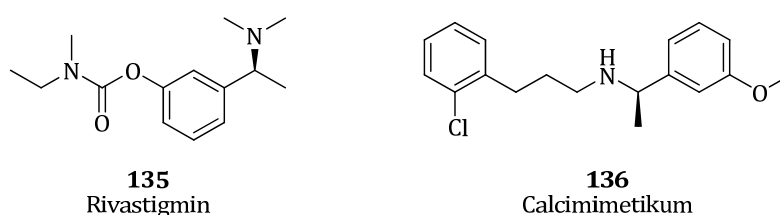


Abbildung 84. Beispiele für pharmazeutische Wirkstoffe mit *meta*-substituierten aromatischen Aminen: Rivastigmin (**135**)^[259,260] und das Calcimimeticum **136**^[261].

Für eine vollständige Analytik wurde diese Acylierungsreaktion zunächst chemisch, d.h. beim Erhitzen zum Rückfluss für 3 Stunden, durchgeführt (Abbildung 85).^[253] Dabei konnte neben dem Benzylamid **133**, das mit 48% Ausbeute isoliert wurde, die Bildung des entsprechenden Diamids **137** beobachtet werden. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde das Diamid **137** mit 20% Ausbeute isoliert. Die Bildung dieses Nebenproduktes **137** kann durch schrittweise Zugabe des Acyldonors zur Reaktionsmischung unterdrückt werden.

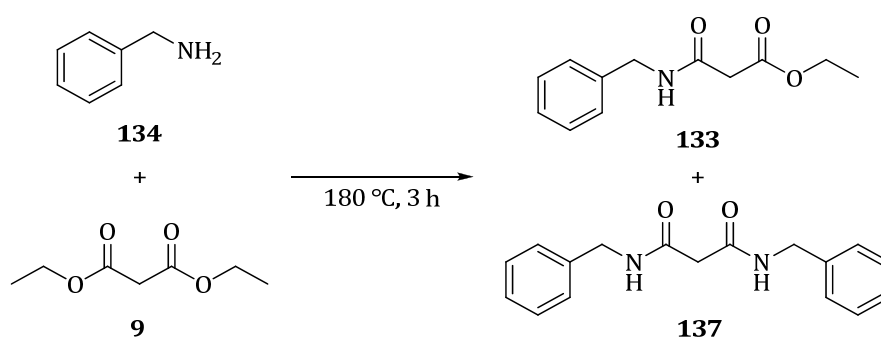


Abbildung 85. Chemische Acylierung von Benzylamin (**134**) mit Malonsäurediethylester (**9**).^[253]

Im Anschluss wurde der Verlust der Substanzen **134** und **9** während der Aufarbeitung bestimmt, indem diese eingewogen und bei unterschiedlichen Drücken bei einer Badtemperatur von 40 °C gerührt wurden. Die jeweiligen Verluste wurden im Anschluss mittels Auswaage ermittelt (Abbildung 86). Ein großer Verlust an beiden Substanzen **134** und **9** während der Aufarbeitung macht die genaue Bestimmung eines produktbezogenen Umsatzes unmöglich. Der Verlust der beiden Komponenten **134** und **9**

ist abhängig von den Dampfdrücken (0.6 bzw. 1.3 hPa) der Komponenten.^[262] Somit kann der Verlust des Amins **134** beim Erhöhen des Druckes von 230 auf 550 mbar bei einer Rührdauer von 120 Minuten von 69% auf nur noch 12% gesenkt werden. Da in der Regel aber Rührzeiten von unter 30 Minuten für die Aufarbeitung ausreichen kann der mittels Auswaage ermittelte Verlust von <3% für beide Komponenten vernachlässigt werden. Der produktbezogene Umsatz wird, sofern nicht anders angegeben, in dieser Arbeit auf den Acyldonor Malonsäurediethylester (**9**) bezogen.

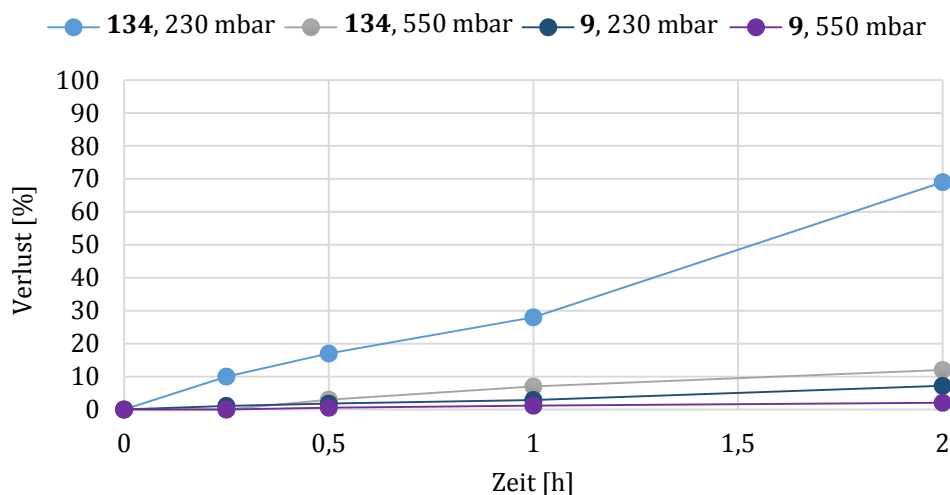


Abbildung 86. Verlust der Substanzen **134** und **9** während der Aufarbeitung.

4.3.3 Enzymatische Acylierung substituierter Benzylamine

Zur Untersuchung des Einflusses eines Substituenten in *meta*-Position wurden unterschiedlich substituierte Benzylamine **134** und **138** – **140** mit Malonsäurediethylester (**9**) und CAL-B als Biokatalysator lösungsmittelfrei umgesetzt (Abbildung 87). Bei allen Acylierungsreaktionen wurden, mit Ausnahme des *m*-Hydroxybenzylamins (**138**), nahezu vollständige Umsätze erzielt. Das Amin **138** ist im Gegensatz zu den Methoxy- und Bromo-substituierten Benzylaminen **139** und **140** ein kristalliner Feststoff, der sich nur zu einem gewissen Anteil im Malonester **9** löst. Eine Verlängerung der Reaktionszeit würde hierbei zu einem höheren Umsatz führen. Allerdings konnte bei der Acylierung des Hydroxyamins **138**, welche nicht in lösungsmittelfreier Umgebung durchgeführt werden kann, neben der Bildung des Produktes **141** auch die Bildung des entsprechenden Diamids **142** mit einem Umsatz von 17% beobachtet werden. Da jeweils nur ein Teil des *m*-Hydroxybenzylamins (**138**) gelöst in der Reaktionsmischung vorliegt und das entstandene Amid **141** mit dem Malonester **9** gut mischbar ist, ist die Wahrscheinlichkeit einer zweiten Acylierung sehr groß.

Die Bildung des entsprechenden Diamids konnte bei den Acylierungsreaktionen der Amine **134** bzw. **139** und **140** mit **9** bzw. 5% nachgewiesen werden. Die Anwesenheit eines elektronenziehenden Substituenten in *meta*-Position scheint demnach einen positiven Einfluss auf den Umsatz zu haben. Allein die schlechte Löslichkeit des Hydroxyamins **138** ist für dessen sehr niedrigen Umsatz verantwortlich. Durch

die Inhomogenität der Mischung wird die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes verhindert, was der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Acylierung ist.

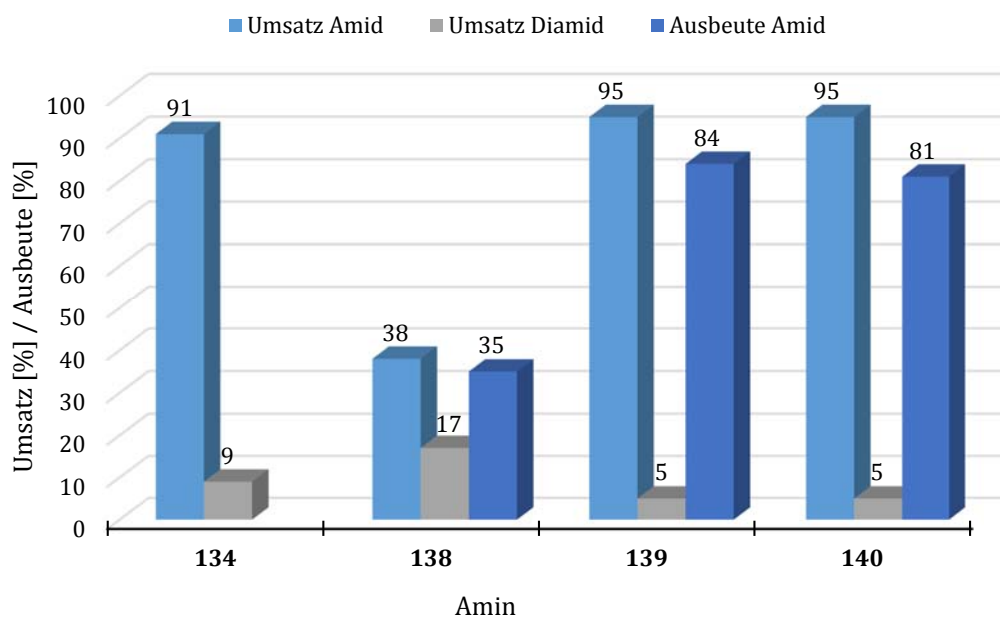
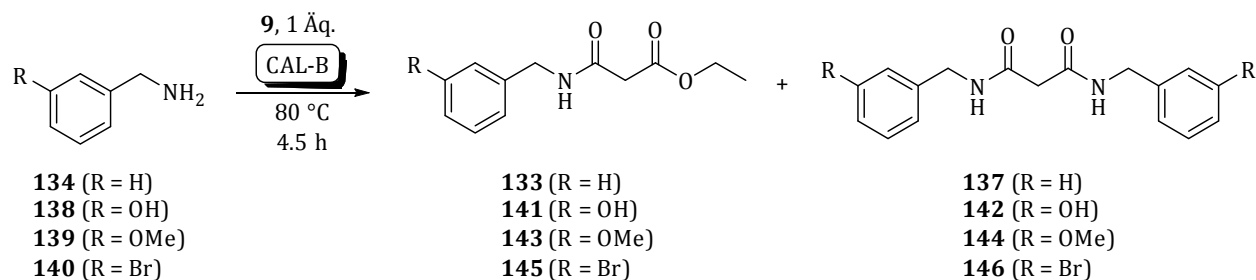


Abbildung 87. Enzymatische Acylierung substituierter Benzylamine.

Durch Acylierungen des Benzylamins (**134**) sowie der substituierten Amine **139** und **140** unter den bisher verwendeten Reaktionsbedingungen, jedoch in Abwesenheit der Lipase CAL-B, wurde auf eine mögliche parallel ablaufende chemische Reaktion getestet (Abbildung 88). Dabei zeigte sich, dass mit den substituierten Aminen **139** und **140** auch in Abwesenheit der Lipase Acylierungsreaktionen stattfinden, da 7% bzw. 8% des entsprechenden Amids **143** und **145** nachgewiesen werden können. Die Bildung des Diamids läuft nur mit dem Methoxy-substituierten Amin **139** mit einem Umsatz von 2% ab.

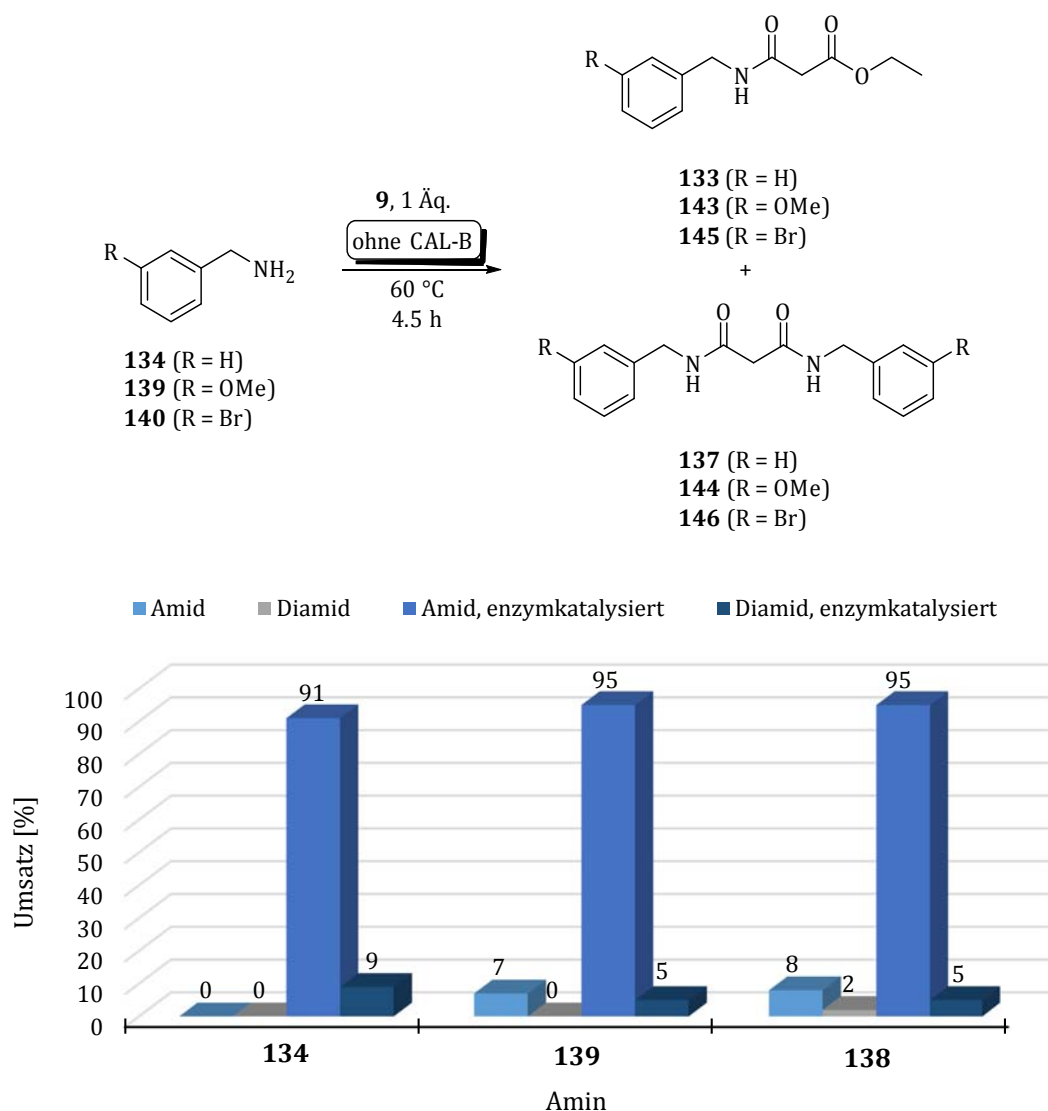


Abbildung 88. Vergleich zwischen enzym- und unkatalysierter Acylierung von Benzylaminen.

Im Anschluss sollten die Bedingungen zur Diamidbildung ermittelt werden. Aufgrund der Inhomogenität der Reaktionsmischung wurde anstelle von 3-Hydroxybenzylamin (**138**) das Methoxy-substituierte Amin **139** sowie Malonsäurediethylester (**9**) in verschiedenen Äquivalenten eingesetzt (Abbildung 89). Dabei ist ersichtlich, dass mit nur 0.6 Äquivalenten Malonester **9**, also einem deutlichen Überschuss an Amin **143**, bis zu 32% des Diamids **144** gebildet werden. Bei einem leichten Überschuss an Acyldonor **9** jedoch entstehen bei der Acylierung nur noch etwa 3% des Diamids. Die Nebenreaktionen zum Diamid können somit durch einen leichten Überschuss an Acyldonor **9** unterdrückt werden.

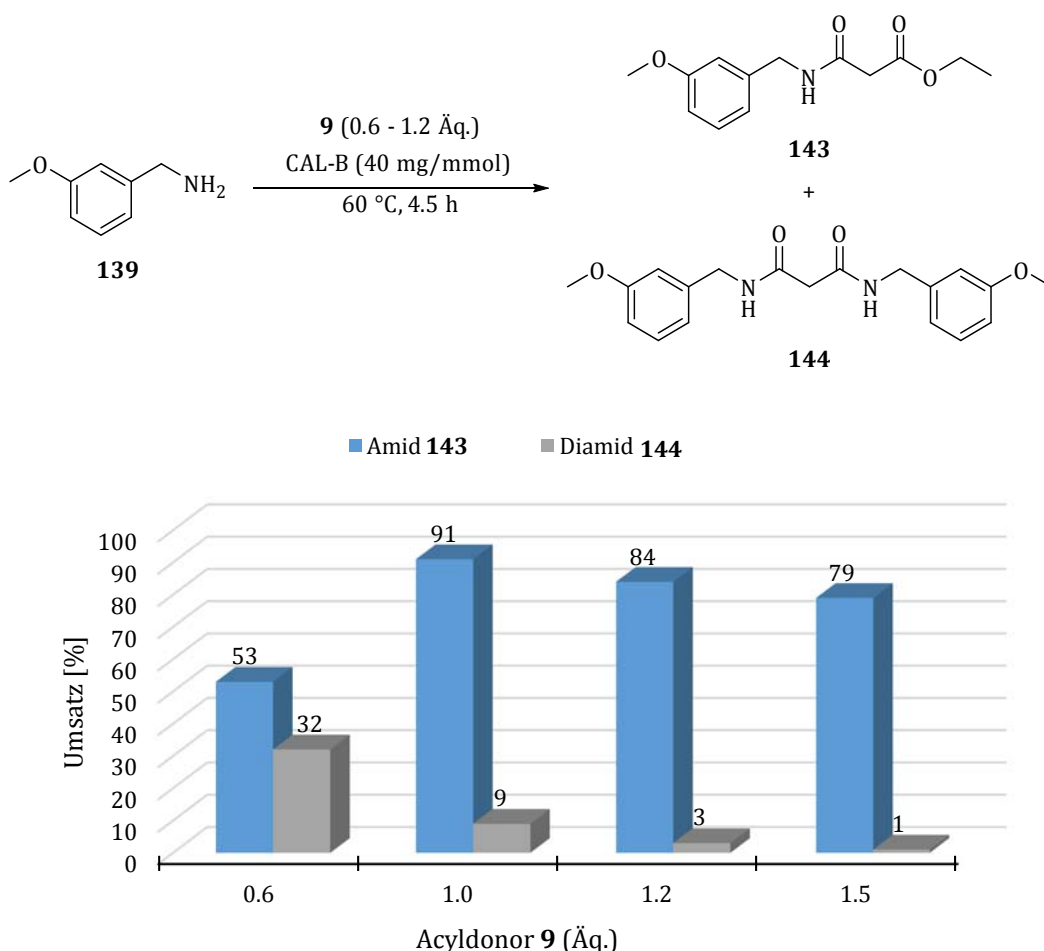


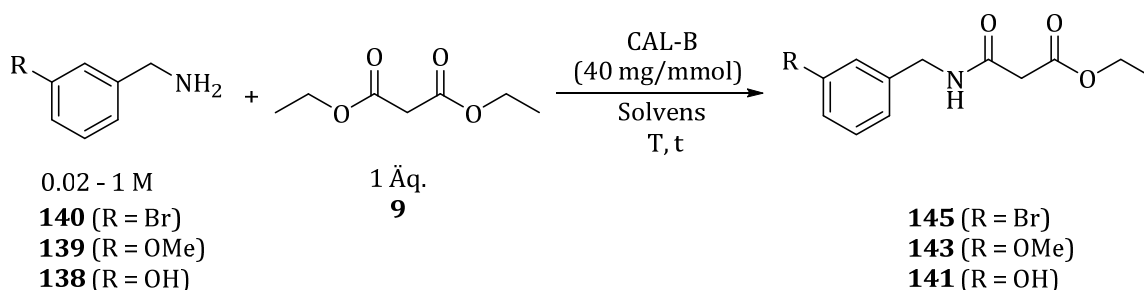
Abbildung 89. Untersuchung der Diamidbildung am Beispiel von Amin **139**.

Es wurden Versuche zur Prozessoptimierung der enzymatischen Acylierung substituierter Amine **138**, **139** und **140** durchgeführt. Dabei wurde zum einen nach einem passenden organischen Lösungsmittel für die Acylierung des Hydroxyamins **138** gesucht und zum anderen die Möglichkeit der Reduktion der Reaktionstemperatur getestet (Tabelle 10). In der Literatur finden 1,4-Dioxan^[236] sowie *n*-Heptan^[33,34] als Lösungsmittel Anwendung. Bei der enzymatischen Acylierung von Bromamin **140** werden dabei 75% bzw. 76% Umsatz bei 60 °C Reaktionstemperatur erzielt (Einträge 1 und 2). In lösungsmittelfreier Umgebung jedoch konnten sehr gute 91% Umsatz zum Amid **145** erreicht werden. Einen ähnlich sehr guten Umsatz von 93% konnte bei der Acylierung von Amin **140** erhalten werden. Dabei konnte die Reaktionstemperatur von 80 °C auf 60 °C herabgesetzt werden, was aus ökonomischer Sicht von Vorteil ist.

Aufgrund der geringen Löslichkeit des Hydroxyamins **138** im Malonester **9** ist es notwendig, die Acylierung in organischem Lösungsmittel durchzuführen, um ein homogenes System zu gewährleisten. Es wurden Lösungsmittel unterschiedlicher Polarität mit logP-Werten zwischen -0.34 und 4.50 verwendet. Der produktbezogene Umsatz wird aus dem Verhältnis des Integrals des Produktes zu der Summe der Integrale von Edukt, Produkt sowie eventuellen Zwischenprodukten ermittelt (vgl. Gleichung 2, Kapitel 3.2.2.1). Dabei wurde mit dem polaren THF (logP = 0.46)^[177] das beste Ergebnis mit 75% produktbezogenem Umsatz erhalten. Ebenfalls gute Ergebnisse von 51% bzw. 50% lieferten MTBE (logP = 0.94)^[177] bzw. der Acyl donor **9** (logP = 0.90)^[263] selbst, wobei letzterer bei einer Reaktionstem-

peratur von nur 60 °C eingesetzt worden ist. Beide Varianten bieten Vorteile, denn das MTBE ist aufgrund seines hohen Dampfdruckes einfach aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen, während Malonsäurediethylester (**9**) nach Destillation einer weiteren Acylierungsreaktion zugeführt werden könnte. Eine weitere Besonderheit zeigt sich bei der Verwendung von Diethylether ($\log P = 0.89$)^[177] als Lösungsmittel, da das Herabsenken der Temperatur von 60°C auf Raumtemperatur mit gleichzeitiger Verlängerung der Reaktionsdauer auf 24 Stunden den gleichen Umsatz von 30% liefert. Dieses steht in Einklang mit Beobachtungen von DITRICH, der mit Methoxyacetat **6** als Acyldonor mit CAL-B in Diethylether bei Raumtemperatur über 24 Stunden Reaktionszeit das entsprechende Amid enantiomerenrein mit vollständigem Umsatz erzielen konnte.^[30] Dieses zeigt deutlich die hohe Aktivität der CAL-B in einem breiten Temperaturbereich.

Tabelle 10. Versuche zur Prozessoptimierung der enzymatischen Acylierung *meta*-substituierter Benzylamine.



Eintrag	Amin	T [°C]	t [h]	Solvens	logP	Umsatz [%]
1	140	60	4.5	1,4-Dioxan	-1.10 ^{a)}	75
2	140	60	4.5	<i>n</i> -Heptan	4.50 ^{b)}	76
3	140	60	4.5	-	-	91
4	139	60	4.5	-	-	93
5	138	80	4.5	MTBE	0.94 ^{b)}	51
6	138	80	4.5	THF	0.46 ^{b)}	75
7	138	80	4.5	2-Me-THF	1.00 ^{c)}	70
8	138	80	4.5	MeCN	-0.34 ^{b)}	43
9	138	80	4.5	<i>i</i> -PrOH	0.28 ^{b)}	22
10	138	60	4.5	<i>n</i> -Heptan	4.50 ^{b)}	45
11	138	60	4.5	EtOAc	0.73 ^{b)}	41
12	138	60	4.5	Malonester 9 (100 Äq.)	0.90 ^{c)}	50
13	138	60	4.5	Et ₂ O	0.89 ^{b)}	30
14 ^{d)}	138	RT	24	Et ₂ O	0.89 ^{b)}	30
15	138	RT	24	EtOH	-0.24 ^{a)}	5

Daten entnommen aus: a) LAANE *et al.*^[175]; b) SANGSTER *et al.*^[177]; c) Bestimmt durch *Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02* ^[263]; d) Zugabe von 1.5 Äquivalente Malonsäurediethylester (**9**).

4.3.4 Enzymatische Racematspaltung von 1-Phenylethylamin (*rac*-4)

In der Literatur ist die enzymatische Racematspaltung von aliphatischen und aromatischen Aminen durch unterschiedliche Acyldonoren in Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln bereits vielfach beschrieben worden. Häufig finden dabei Acyldonoren wie langkettige Säuren sowie deren Ester Anwendung, die allerdings sehr lange Reaktionszeiten für einen vollständigen Umsatz benötigen (vgl. Kapitel 4.2.2).^[31] Weitere häufig verwendete Acyldonoren sind Essigester **5** oder Methoxyester wie **6** bzw. **111** (Abbildung 90).^[30,31] Zwar werden die dabei erhaltenen (*R*)-Amide mit sehr hohen Enantiomerenüberschüssen erhalten, allerdings liegen die Reaktionszeiten auch hierbei noch bei 15 bzw. 60 Stunden. Durch Einsatz eines Heteroatoms in β -Position des Acyldonors kann die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht werden, wobei die besten Ergebnisse mit *O*-Substituenten erhalten werden.^[31]

Die Racematspaltung racemischer Amine unter lösungsmittelfreien Bedingungen findet erst seit Beginn dieses Jahrhunderts Beachtung.^[36,250-252] Zu den ersten enantioselektiven lipasenkatalysierten Acylierungen des Phenylethylamins *rac*-4 in Abwesenheit von organischen Lösungsmitteln zählen die Reaktionen mit Carbonsäuren (**119** oder **109**)^[250,252] oder Methoxyestern (**6** oder **111**)^[36] als Acyldonoren. Im Fall der Carbonsäuren ist zur Gleichgewichtseinstellung ein verringerter Druck notwendig, während mit Methoxyestern bereits bei Raumtemperatur gearbeitet werden kann. Methoxyester sind durch das Heteroatom in β -Position aktivierte Acyldonoren.

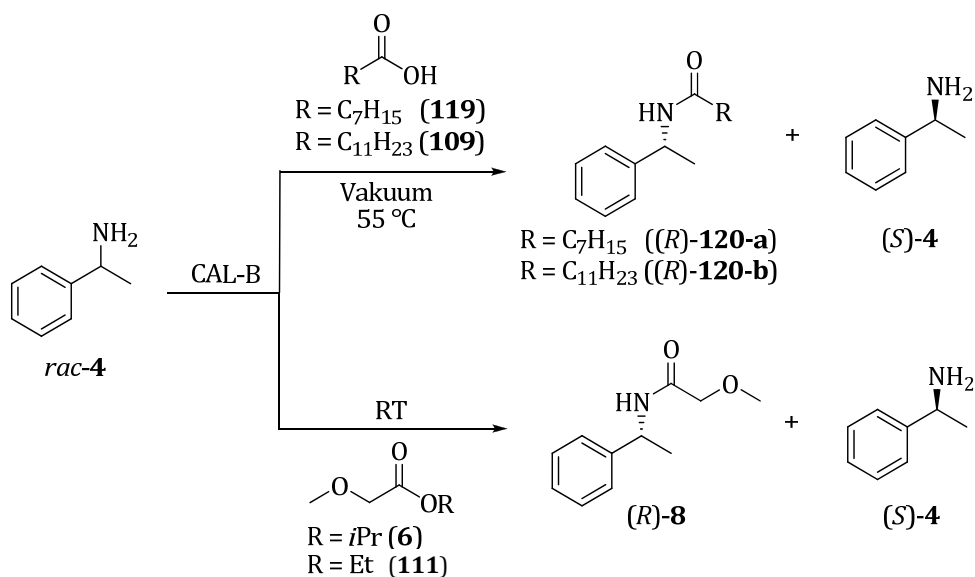


Abbildung 90. Enzymatische Racematspaltung von *rac*-4 mit unterschiedlichen Acyldonoren in Abwesenheit von organischen Lösungsmitteln. ^[36,250]

Der in dieser Arbeitsgruppe bereits erfolgreich etablierte Acyldonor Malonsäurediethylester (**9**) soll unter lösungsmittelfreien Bedingungen als Standard-Acyldonor dienen.^[33-35] Ausgehend von den vorangegangenen Arbeiten sollte sie lösungsmittelfrei Acylierung von *rac*-4 weiter optimiert und in Hinblick auf weitere mögliche Acyldonoren untersucht werden, Der Weiteren sollen weitere mögliche Lipasen auf ihre Fähigkeit zur solvenzfreen Acylierung von *rac*-4 getestet und die Kinetiken dieser Reaktionen geprüft werden.

4.3.4.1 Prozessoptimierung

4.3.4.1.1 Einfluss der Temperatur und Reaktionszeit

Zunächst sollte der Einfluss der Temperatur bei einer Reaktionsdauer von 4.5 Stunden in Hinblick auf Umsatz und Enantioselektivität untersucht werden (Abbildung 91). Zu Beginn wurde die zuvor in der Arbeitsgruppe^[33] etablierte Syntheseroute zur Racematspaltung des 1-Phenylethylamins (*rac*-**4**) mit Malonester **9** in MTBE als organisches Lösungsmittel zum Vergleich mit späteren Reaktionen durchgeführt. Dabei wurde bei 80 °C Reaktionstemperatur das Amid (*R*)-**10** mit einem Umsatz von 42% und 92% ee erhalten, was einer Enantioselektivität von 48 entspricht und mit dem Literaturwert^[33] übereinstimmt. Dieselbe Reaktion wurde im Anschluss in Abwesenheit von organischen Lösungsmittel durchgeführt, wobei 46% Umsatz zum Amid (*R*)-**10** mit 96% ee ($E > 100$) erzielt werden konnten. Auch diese Werte passen zu den in der Arbeitsgruppe erhaltenen Ergebnissen.^[35] Selbst eine Verringerung der Reaktionstemperatur auf 0 °C lieferte das Amid (*R*)-**10** enantiomerenrein mit 24% Umsatz, was einer sehr guten Enantioselektivität von >100 entspricht. Die CAL-B arbeitet folglich in einem breiten Temperaturbereich hoch selektiv.

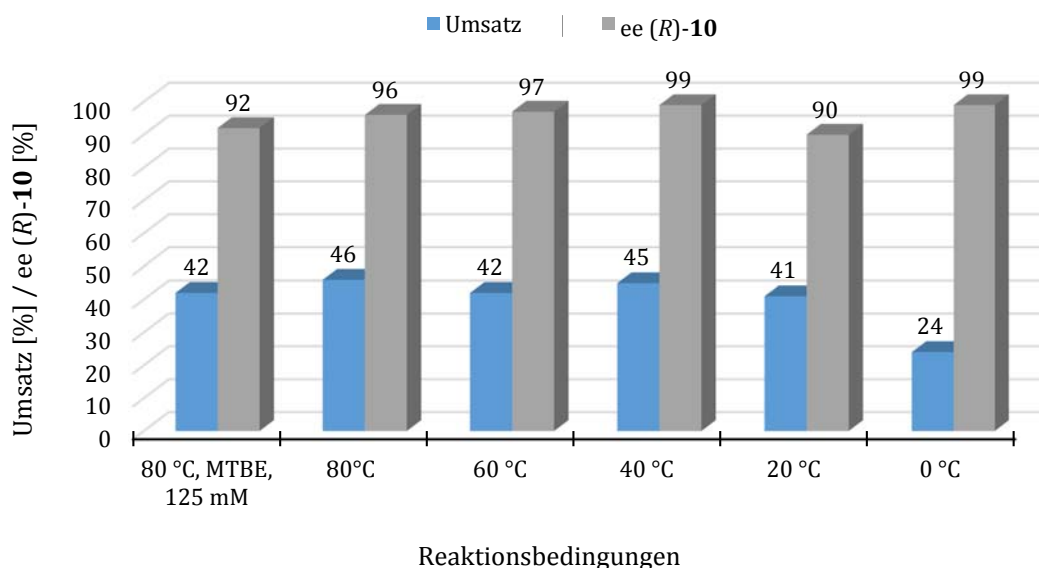
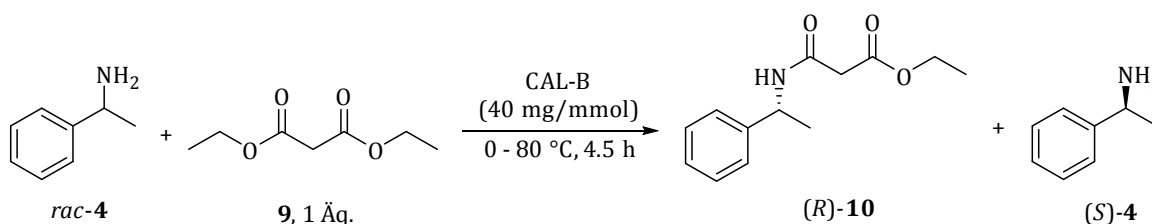


Abbildung 91. Einfluss der Reaktionstemperatur bei der Racematspaltung von *rac*-**4**.

Infolge dieser Ergebnisse aus Abbildung 91 wurde die Reaktionen bei 60 °C und 40 °C, als Kompromiss zwischen hohem Umsatz und hohem Enantiomerenüberschuss, in Hinblick auf Verlängerung der Reaktionsdauer untersucht. Dabei sind die bereits durchgeführten Racematspaltungen bei 4.5 Stunden zum Vergleich im Diagramm aufgetragen (Abbildung 92). Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf acht

Stunden bei 60 °C Temperatur lieferte eine leichte Erhöhung des Umsatzes, jedoch wurde ein etwas verringerter ee-Wert von 89% ($E = 39$) beobachtet. Bei 24 Stunden Reaktionszeit konnte das Amid (*R*)-**10** nahezu enantiomerenrein mit 50% Umsatz erhalten werden. Dieses entspricht einer sehr guten Enantioselektivität von >100 . Ähnliche Ergebnisse wurden im Fall der Racematspaltungen bei 40 °C erzielt. Während das Amid (*R*)-**10** nach 4.5 Stunden Reaktionszeit mit 45% Umsatz und 95% ee erhalten wurden, konnte bei sechs Stunden Reaktionsdauer keine Umsatzsteigerung und ein etwas geringerer ee-Wert des Amids (*R*)-**10** von 85% ($E = 27$) erreicht werden. Dieser relativ niedrige Enantiomerenüberschuss ist ungewöhnlich, da in der Literatur bereits die enantiomerenreine Synthese unterschiedlicher Amide bei Raumtemperatur und 24 Stunden Reaktionszeit beschrieben worden ist.^[30] Fehler während der Reaktionsführung sowie bei der Auswertung der HPLC-Chromatogramme können ausgeschlossen werden.

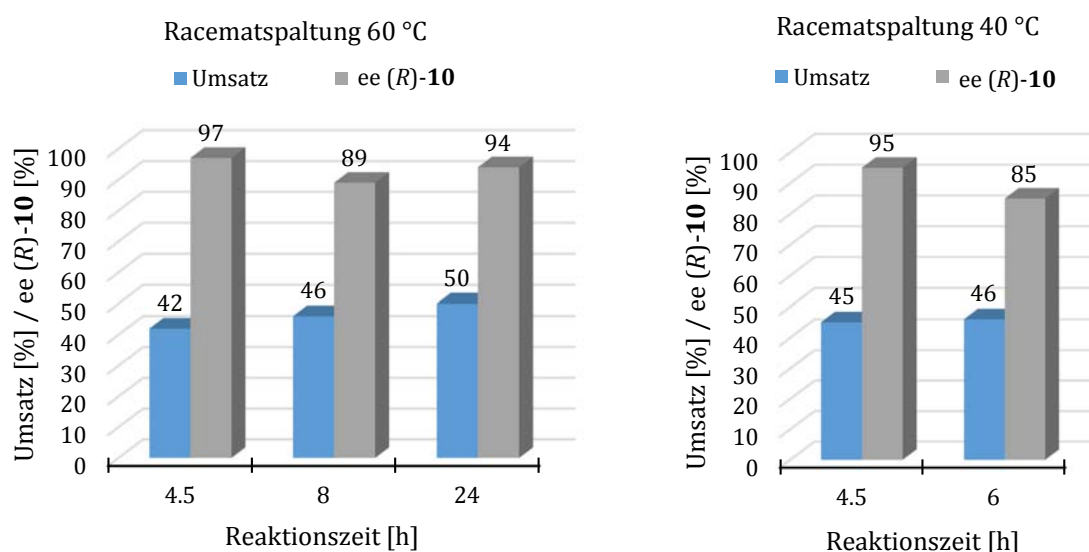


Abbildung 92. Einfluss der Reaktionszeit bei der Racematspaltung von *rac*-**4** bei 60 °C (links) und 40 °C (rechts).

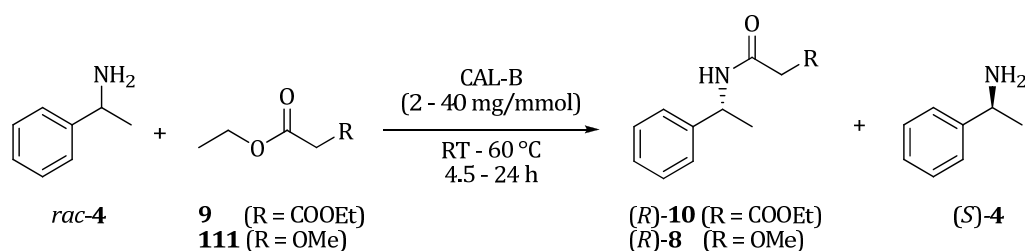
Um parallel ablaufende chemische Acylierungsreaktionen von *rac*-**4** mit Malonsäurediethylester (**9**) ausschließen zu können wurden Acylierungen in Abwesenheit von CAL-B als Biokatalysator bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Dabei wurde in allen Fällen eine chemische Acylierung ausgeschlossen, da mittels ¹H-NMR-Spektroskopie hierbei keine Produktbildung beobachtet werden konnte. Die mit fortschreitender Reaktionszeit sinkender ee-Wert bei 40 °C kann demzufolge nicht mit chemisch ablaufenden Parallelreaktionen begründet werden.

Die enzymatische Racematspaltung von *rac*-**4** mit dem Malonester **9** kann in einem sehr breiten Temperaturbereich von 0 – 80 °C mit sehr guten Enantiomerenüberschüssen und folglich auch sehr guten Selektivitäten durchgeführt werden. Dabei wird der Umsatz in Abwesenheit eines organischen Lösungsmittels leicht gesteigert. Da milde Reaktionsbedingungen sowohl aus ökonomischer Sicht als auch in Hinblick auf Enzymstabilität vorteilhaft sind, wurden 60 °C Reaktionstemperatur und 4.5 Stunden als Standard-Bedingungen gewählt. Alle weiteren lösungsmittelfreien Racematspaltungen von *rac*-**4** wurden im Folgenden unter diesen Reaktionsbedingungen durchgeführt.

4.3.4.1.2 Vergleich mit bestehenden industriellen Prozessen

Nachdem die optimale Reaktionstemperatur auf 60 °C und die Reaktionsdauer auf 4.5 Stunden festgelegt worden sind, wurde die lösungsmittelfreie enzymatische Racematspaltung des Amins *rac*-**4** mit Malonester **9** als Acyldonor mit bestehenden industriellen Prozessen verglichen (Tabelle 11, Eintrag 1). Nach einer Patentanmeldung von BASF SE wird ein aromatisches racemisches Amin mit Methoxyester **111** (1.5 Äq.) und 2 mg/mmol CAL-B bei 20 °C umgesetzt und das entsprechende Amid (*R*)-**8** mit hoher Enantiomerenreinheit erhalten.^[264] Die Übertragung dieser Vorschrift auf die Racematspaltung mit Malonsäurediethylester (**9**) als Acyldonor lieferte jedoch nur 25% Umsatz mit 95% ee (Eintrag 2). Der bestimmte gute E-Wert von 53 liegt jedoch deutlich unter den unter Standard-Bedingungen erhaltenen Wert. Der Unterschied in den Enantioselektivitäten von >100 und 53 kann mit der geringeren verwendeten Enzymmenge sowie niedrigeren Reaktionstemperatur und die dadurch etwas geringere Aktivität der Lipase begründet werden. Des Weiteren ist der Methoxyester **104** als Acyldonor stärker aktiviert als das Malonat **9**. Durch Verlängerung der Reaktionszeit könnte auch in diesem Fall ein vollständiger Umsatz und dadurch eine höhere Enantioselektivität erreicht werden.

Tabelle 11. Vergleich mit bestehenden industriellen Prozessen.



Eintrag	Ester (Äq.)	CAL-B [mg/mmol]	Solvens	Temperatur [°C]	Umsatz [%]	ee _p [%]	ee _s [%] ^{a)}	E
1 ^{b) c)}	9 (1)	40	-	60	42	96	70	>100
2 ^{d)}	9 (1)	2	-	20	25	95	n.b.	53
3 ^{d)}	9 (1.5)	10	Et ₂ O	20	48	95	88	>100
4 ^{d)}	111 (1.5)	10	Et ₂ O	20	52	95	99	>100

a) Bestimmt mittels „Enantioselectivity“^[258]; b) Darstellung dieses Versuches erfolgte bereits in Abbildung 91 und ist hier zum Vergleich aufgeführt; c) Reaktionszeit: 4.5 h; d) Reaktionszeit: 24 h; n.b. = nicht bestimmt.

DITRICH *et al.* setzten *rac*-**4** mit Methoxyessigsäurepropylester (**6**) bei Raumtemperatur in Diethylether um, wobei 10 mg/mmol CAL-B verwendet wurden.^[30] Dabei wird das entsprechende Amid nach 24 Stunden Reaktionszeit mit 46% Umsatz enantiomerenrein (E >100) erhalten. Bei der Reproduktion dieser Reaktion mit dem Acyldonor **104** konnten 52% Umsatz zum Amid (*R*)-**8** sowie sehr gute 95% ee (E >100) erreicht werden (Eintrag 4). Durch Ersatz des Acyldonors **111** durch den Malonester **9** wurde unter den gleichen Bedingungen ebenfalls ein sehr guter Umsatz von 48% erzielt (Eintrag 3). Der Enantiomerenüberschuss wurde für das Amid (*R*)-**10** auf 95% ee bestimmt, was ebenfalls einer Enantioselektivität von >100 entspricht. Zwar wird nach dieser Vorschrift nur ein Viertel der in dieser Arbeit eingesetzten Enzymmenge von 40 mg/mmol bei Raumtemperatur verwendet, allerdings ist der Einsatz

von Diethylether als Lösungsmittel notwendig. Des Weiteren wird für einen vollständigen Umsatz zum (*R*)-Amid eine Reaktionszeit von 24 Stunden benötigt, was aus ökonomischer Sicht unvorteilhaft ist. Bei der Racematspaltung von *rac*-4 unter den in dieser Arbeit gewählten lösungsmittelfreien Reaktionsbedingungen mit dem Malonester **9** als Acyldonor konnte eine sehr gute Enantioselektivität von >100 erreicht werden, die in derselben Größenordnung der bestehenden industriellen Prozesse liegt. Durch Up-Scaling zu größeren Maßstäben könnte die Aufarbeitung dann mittels Destillation erfolgen, sodass kein organisches Lösungsmittel für extraktive Aufarbeitung mehr benötigt würde. Der im Rahmen dieser Arbeit gewählte Syntheseweg stellt folglich eine sehr gute Alternative zu den bestehenden industriellen Prozessen dar.

4.3.5 Enzymrecycling

Im Rahmen eines Enzymrecyclings wurde die Aktivität und die Stabilität der CAL-B aus *Candida antarctica* getestet werden. Durch Filtration, Waschen und Trocknen war die Rückgewinnung der Lipase im Anschluss an eine Reaktion sehr einfach in der Handhabung. Der Verlust der CAL-B bei der Reinigung sowie durch mechanische Belastung während des Reaktionsablaufs wurde durch einen entsprechend größeren Reaktionsaufbau gering gehalten. In vorhergehenden Versuchen von SIMON konnte bei starkem mechanischen Rühren ein starker Enzymabrieb beobachtet werden, der durch Rühren mit <200 rpm verringert werden konnte.^[33] Das Enzymrecycling wurde unter Standardbedingungen durchgeführt, indem das racemische Amin *rac*-4 zusammen mit dem Malonester **9** und die CAL-B bei 60 °C gerührt wird (Abbildung 93).

Die Auswertung der Ergebnisse deutet auf eine starke Abnahme der Aktivität und auch der Stabilität der CAL-B während der Zyklisierungsversuche durch Inaktivierung hin. So konnte schon im zweiten Zyklus des Recyclings nur noch 30% Umsatz anstelle der 43% des ersten Zyklus erreicht werden. In den folgenden Zyklen (Zyklus 3 und 4) sank der Umsatz weiter auf 25% bzw. 20% Umsatz. Im fünften Zyklus konnten 24% Umsatz nur durch Verlängerung der Reaktionszeit auf über sechs Stunden erzielt werden. Auch wenn ein stetiger Abfall in der Aktivität der CAL-B zu erkennen ist, bleibt die Stereoselektivität konstant hoch. In allen Fällen, mit Ausnahme des zweiten Zyklus (81% ee), konnten gute Enantiomerenüberschüsse von >88% und somit E-Werte von >13 erreicht werden.

In der Literatur sowie in einer Doktorarbeit dieses Arbeitskreises sind erfolgreiche Recyclingprozesse der CAL-B bei der Racematspaltung von Aminen in Anwesenheit von Lösungsmitteln sowie in lösungsmittelfreier Umgebung beschrieben worden.^[33,36] Dabei wurden gleichbleibend hohe Umsätze mit sehr guten ee-Werten für die ersten Zyklen erhalten, bevor ein leichter Rückgang der Umsätze zu beobachten war. Die rapide sinkenden Umsätze in der Recycling-Versuchsreihe im Rahmen dieser Arbeit in lösungsmittelfreiem Milieu deuten auf eine verringerte Aktivität der CAL-B hin. In der Tat wurde dieses Phänomen auch von der Arbeitsgruppe um KANERVA bei der lösungsmittelfreien Racematspaltung von *rac*-4 mit Methoxyester **6** beobachtet.^[36] Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Lipase bei mehrfacher Anwendung bei höheren Temperaturen teilweise von Trägermaterial abgelöst wird.^[33]

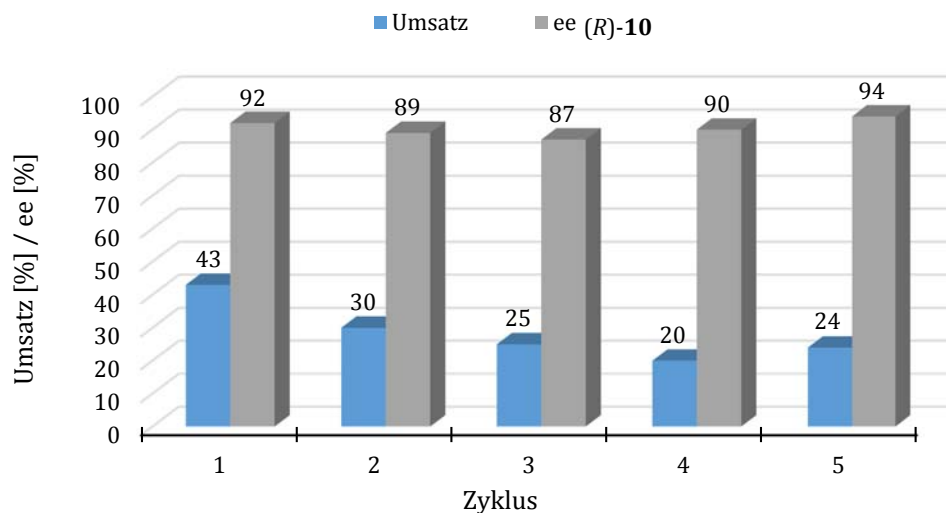
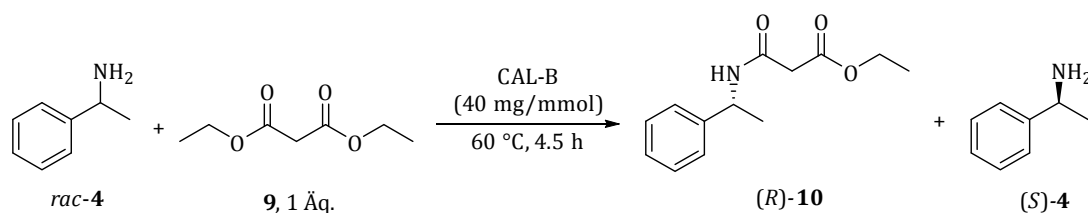


Abbildung 93. Enzymrecycling am Beispiel der Racematspaltung von *rac*-4 mit Malonester 9.

Die CAL-B kann somit zwar durch Immobilisierung stabilisiert werden, allerdings eignet sich diese Lipase nicht für Recyclingreaktionen unter den in dieser Arbeit gewählten lösungsmittelfreien Standardbedingungen, da mit jedem Zyklus ein beträchtlicher Verlust an Umsatz einhergeht. Allerdings konnte gezeigt werden, dass nur der Verlust der Aktivität die Möglichkeit des Recyclings beeinträchtigt, da die Enantiomerenüberschüsse stets >81% betragen.

4.3.6 Verwendung von alternativen Lipasen

4.3.6.1 Lipasen-Screening

Obwohl die CAL-B die am häufigsten verwendete Lipase ist und auch bereits großtechnisch Anwendung findet,^[27-29] sind auch andere Prozesse bekannt, die alternative Lipasen benutzen. Als Beispiel sei hier die Racematspaltung von 1-Phenylethylamin (*rac*-4) mit Methoxyessigsäureestern wie **111** von BASF SE genannt, in der die Lipase aus *Burkholderia plantarii* erfolgreich eingesetzt wird.^[229] In dieser Arbeit sollten somit alle in der Arbeitsgruppe vorhandenen Lipasen auf ihre Fähigkeit untersucht werden, die entsprechenden Acylierungsreaktionen zu katalysieren. Als einfachstes Substrat wurde zunächst Benzylamin (**134**) eingesetzt, das kein Stereozentrum besitzt und somit zu einem vollständigen Umsatz zum Amid **133** führen sollte (Abbildung 94). In allen Screening-Ansätzen wurde MTBE als Lösungsmittel verwendet, da das Hydroxy-Amin **138** als feste Komponente zu einer inhomogenen Mischung führen würde. Neben der immobilisierten CAL-B aus *Candida antarctica* (Novozym 435) lieferten die immo-

bilisierte und lyophilisierte Lipasen CAL-B (beide von C-LECTA) einen nahezu vollständigen Umsatz zum Amid **133** (89% bzw. 94%). Weitere Lipasen führten zu niedrigen Umsätzen im Bereich von 15 - 22%. Beachtlich ist hierbei, dass die Lipasen L 5, GC 4, R 10, AY 30 sowie CE 5 und D 20 (alle von AMANO) alle ungewöhnlich hohe Umsätze zum Diamid **137** zeigten. Dieses kann als Indiz für eine sehr langsame Acylierungsreaktion gesehen werden, in der die zweite Acylierung mit größerer Wahrscheinlichkeit abläuft als die gewünschte einfache Reaktion zum Amid **133**. Eventuell spielt die durch den ersten Acylierungsschritt schon entstandene Nähe des Amids **133** zur aktiven Seite der Lipase eine wichtige Rolle dabei.

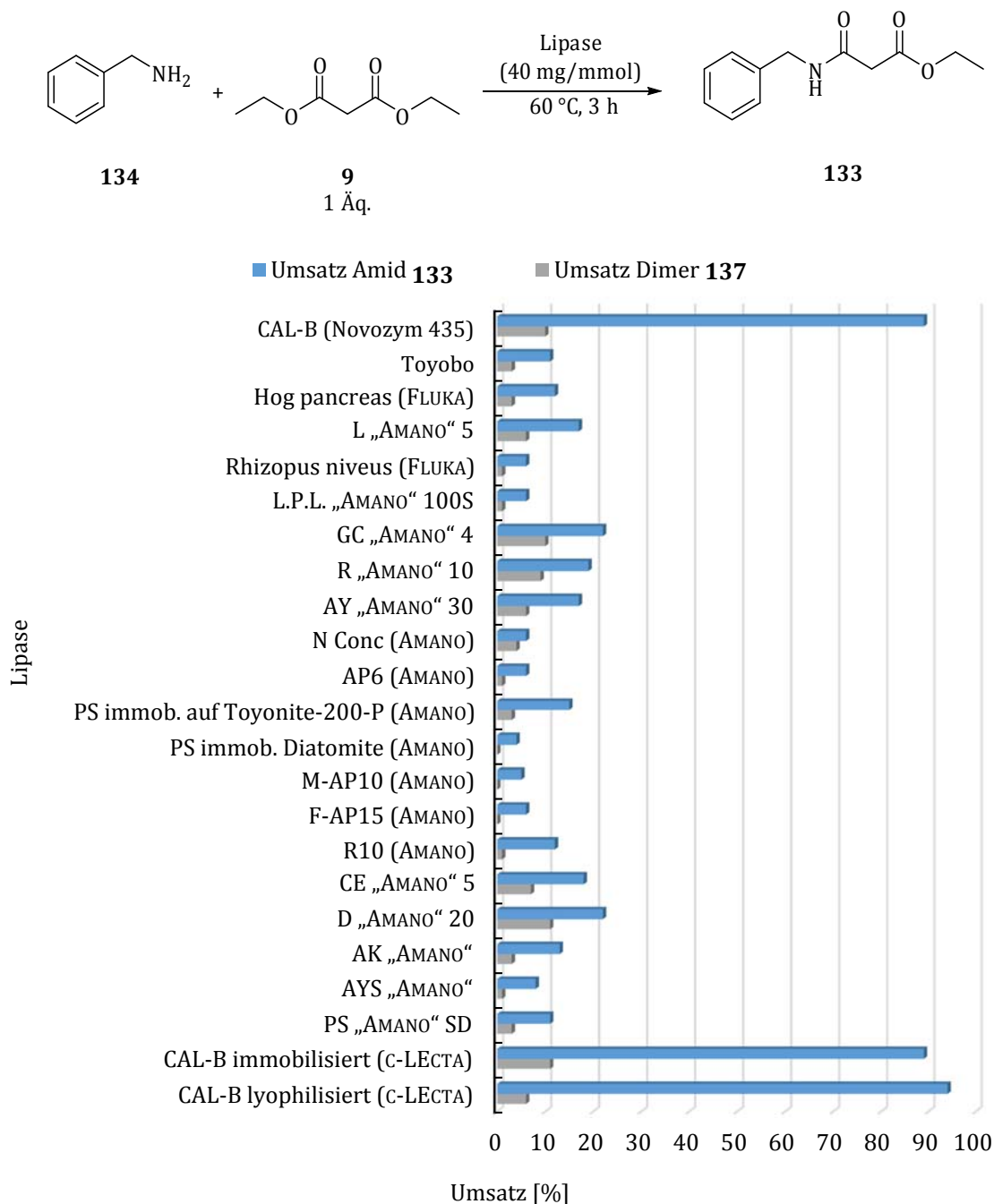


Abbildung 94. Lipasen-Screening mit Benzylamin (**134**) als Substrat.

Die oben genannten Lipasen wurden im Anschluss in der Acylierung des Hydroxy-Amins **138** eingesetzt (Abbildung 95). Unter den hier verwendeten Reaktionsbedingungen konnten mit der CAL-B (Novozym 435) nur maximal 52% Umsatz erreicht werden. Weiterhin lieferten die immobilisierten Lipasen PS (AMANO) und die CAL-B (C-LECTA) moderate Umsätze von 47% bzw. 44%. Mit der lyophilisierten Lipase von C-LECTA konnten noch 18% Umsatz zum Hydroxy-Amid **141** erzielt werden. Auffällig ist, dass bei der Verwendung der Lipase PS, die auf dem keramischen Träger Toyonite-200-P immobilisiert ist, kein Diamid **142** als Nebenprodukt gebildet worden ist.

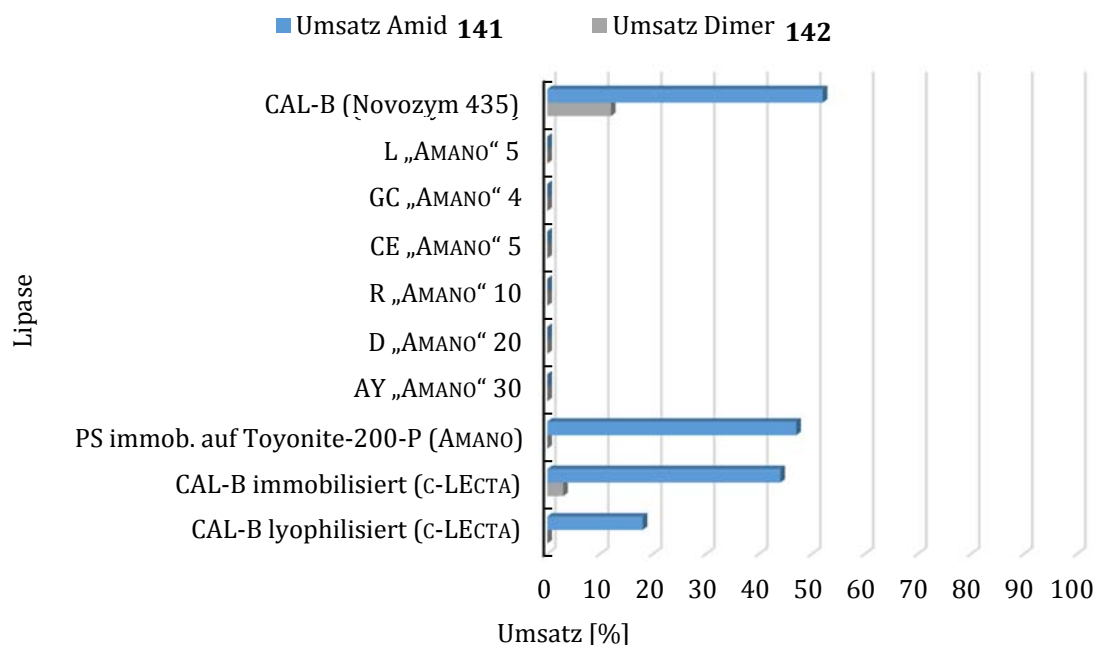
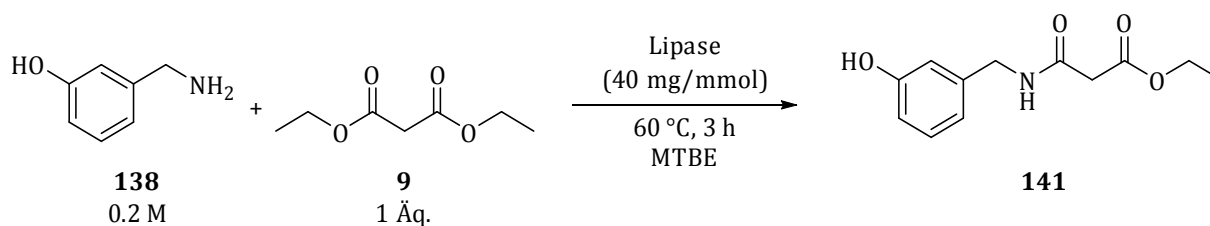


Abbildung 95. Lipasen-Screening mit Hydroxy-Amin **138** als Substrat.

Dieselben Lipasen wurden schließlich für die Acylierung des racemischen 1-Phenylethylamins (*rac*-**4**) verwendet (Abbildung 96). Nur die CAL-B (Novozym 435) sowie die immobilisierte Lipase von C-LECTA (46% bzw. 45%) zeigten einen sehr guten Umsatz. Mit der lyophilisierten Lipase von C-LECTA konnte noch ein Umsatz von 12% erzielt werden. Alle weiteren Lipasen zeigten keine Aktivität in Hinblick auf die Acylierung des racemischen Amins *rac*-**4**. Die Bildung des entsprechenden Diamids wurde nicht beobachtet.

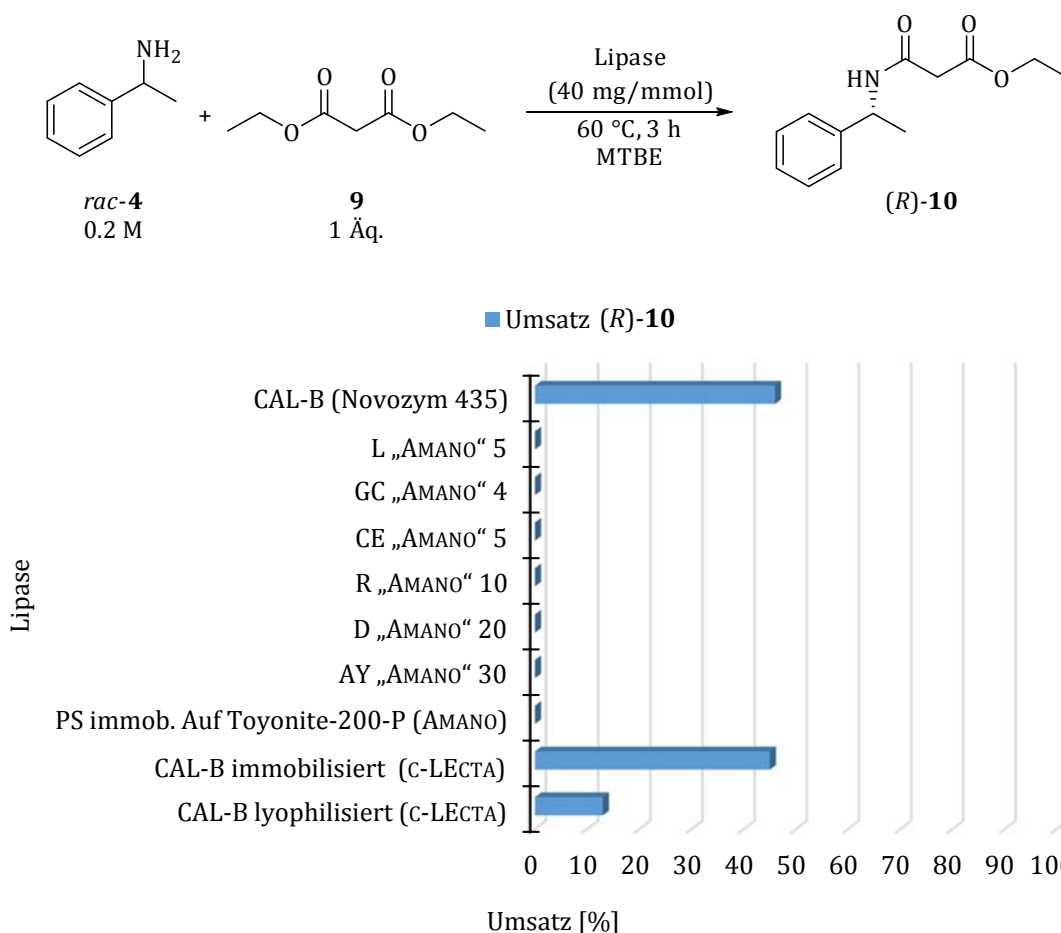


Abbildung 96. Lipasen-Screening mit 1-Phenylethylamin (*rac*-4) als Substrat.

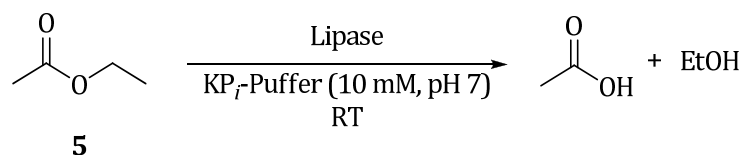
In einem breit angelegten Lipasen-Screening wurden alle vorrätigen Enzyme an der gewünschten Acylierungsreaktion getestet. Die Lipase B aus *Candida antarctica* erwies sich als das einzige aktive Enzym bei der Racematspaltung des Amins *rac*-4. Dabei wurden die besten Ergebnisse mit den auf unterschiedliche Träger immobilisierte Lipasen erhalten. Die Enzymaktivitäten der beiden Lipasen von c-LECTA wurden im Folgenden direkt mit der von CAL-B (Novozym 435) verglichen.

4.3.6.2 Verwendung der Lipasen von c-LECTA als Biokatalysatoren

Mit den beiden Lipasen aus *Candida antarctica* der Firma c-LECTA, insbesondere die auf einen Metacrylat-Träger immobilisierte Lipase, konnten sehr gute bzw. mäßige Umsätze erzielt werden (vergl. Abschnitt 4.3.6.1). Zunächst wurden die Enzymaktivitäten dieser beiden Lipasen mit denen der CAL-B (Novozym 435) verglichen. Dabei wurde mit Essigester 5 gesättigter KP_T -Puffer zusammen mit der jeweiligen Lipase bei Raumtemperatur an einer Titrationsapparatur umgesetzt. Die bei der Spaltung entstandene Essigsäure wurde mit NaOH gegentitriert und das erhaltene Volumen der Lauge zur Berechnung der relativen Aktivität der Lipase eingesetzt. Die Aktivität der CAL-B (0.855 U/mg) wurde dabei gleich 100% gesetzt (Tabelle 12). Im Vergleich dazu konnte bei der immobilisierten Lipase von c-LECTA, mit der im Rahmen des Lipasen-Screenings (Abschnitt 4.3.6.1) ein Umsatz von 45% bei der

Acylierung von *rac*-4 erhalten wurde, nur eine relative Aktivität von nur 68% nachgewiesen werden. Von der lyophilisierte Lipase von c-LECTA wurde nur 1/20 der Enzymmenge eingesetzt. Die dabei ermittelte relative Aktivität dieser Lipase betrug 2000%. Aufgrund des niedrigen Umsatzes im Rahmen des Lipasen-Screenings ist dieses Ergebnis überraschend.

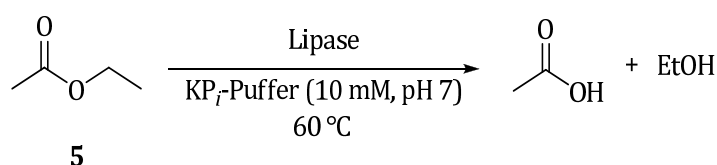
Tabelle 12. Enzymkatalysierte Spaltung des Essigesters 5 mit unterschiedlichen Lipasen bei 20 °C.



Eintrag	Lipase	Enzym [mg/mmol]	Steigung [mL/sec]	Aktivität [U/mg]	Rel. Aktivität [%]
1	Novozym 435	20	0.0057	0.855	100
2	c-LECTA immobilisiert	20	0.0039	0.585	68
3	c-LECTA lyophilisiert	1	0.0057	17.100	2000

Die enzymatische Spaltung des Essigesters 5 durch die CAL-B (Novozym 435) sowie die immobilisierte und lyophilisierte Lipasen von c-LECTA wurden im Anschluss bei 60 °C an der Titrationsapparatur durchgeführt (Tabelle 13). Dabei wurde erneut die Aktivität der CAL-B (Novozym 435) gleich 100% gesetzt. Die mittels immobilisierter Lipase (c-LECTA) erhaltene relative Aktivität gleicht mit 69% den Werten in Tabelle 12 (Eintrag 2).

Tabelle 13. Enzymkatalysierte Spaltung des Essigesters 5 mit unterschiedlichen Lipasen bei 60 °C.



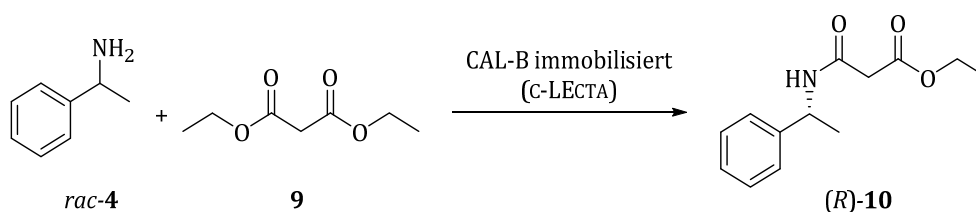
Eintrag	Lipase	Enzym [mg/mmol]	Aktivität [U/mg]	Rel. Aktivität [%]
1	Novozym 435	20	3.180	100
2	c-LECTA immobilisiert	20	2.190	69
3	c-LECTA lyophilisiert	1	31.800	1000

Bei der lyophilisierten CAL-B von c-LECTA konnte eine relative Aktivität von 1000% nachgewiesen werden. Dieses entspricht der Hälfte des Wertes bei einer Temperatur von 20 °C und lässt darauf schließen, dass die nicht-immobilisierte CAL-B bei höheren Temperaturen an Stabilität einbüßt. Die erhöhte Stabilität vieler Enzyme durch Immobilisierung ist in der Literatur oftmals beschrieben.^[13] Auch in den Produktinformationsblättern der Firma c-LECTA wird der immobilisierten CAL-B eine höhere Thermostabilität zugewiesen.^[265]

Da die beiden Lipasen von c-LECTA hohe bzw. sehr hohe Aktivitäten in Hinblick auf die enzymatische Esterspaltung aufweisen, sollte im Folgenden die enzymatische Racematspaltung von *rac*-4 unter Standardbedingungen untersucht werden. Die jeweilige Enzymmenge wurde dafür entsprechend an die ermittelte relative Aktivität angepasst.

Die Acylierung von 1-Phenylethylamin (*rac*-4) mit der immobilisierten CAL-B von c-LECTA wurde zum einen lösungsmittelfrei und zum anderen in Anwesenheit von MTBE als Lösungsmittel durchgeführt (Tabelle 14). Zwar führten dabei beide Acylierungsreaktionen zu einem vollständigen Umsatz, allerdings konnte nur in Abwesenheit von Lösungsmitteln (Eintrag 1) sehr gute ee-Werte von 96% (E = 194) erreicht werden. Im Gegensatz dazu wurden in Anwesenheit von MTBE nur 84% ee und ein guter E-Wert von 29 erzielt (Eintrag 2). Die immobilisierte Lipase von c-LECTA stellt somit ein weiteres wichtiges Werkzeug zur Darstellung enantiomerenreiner Amine in lösungsmittelfreier Umgebung dar.

Tabelle 14. Enzymatisch Racematspaltung von *rac*-4 mittels immobilisierter CAL-B von c-LECTA.

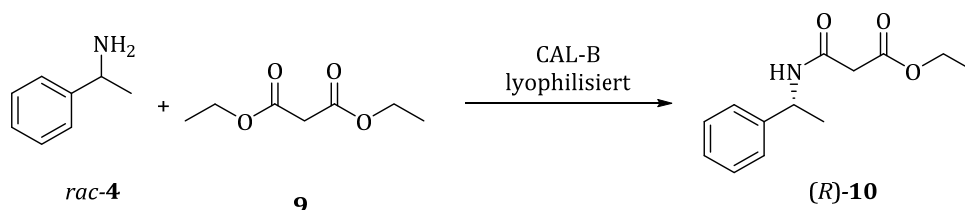


Eintrag	MTBE [mL]	Umsatz [%]	ee _P [%]	ee _S [%] ^{a)}	E
1	0	52	96	96	194
2	0.5	49	84	81	29

a) berechnet mit „Enantioselectivity“^[258].

Parallel zu der enzymatischen Racematspaltung von *rac*-4 mittels immobilisierter CAL-B von c-LECTA wurde die Trennung der Enantiomere mithilfe der lyophilisierten CAL-B, ebenfalls von c-LECTA, untersucht. Auch in diesem Fall wurde die Enzymmenge an die ermittelte relative Aktivität angepasst.

Die Racematspaltung von *rac*-4 durch die lyophilisierte CAL-B wurde zunächst unter Standardbedingungen in Abwesenheit von Lösungsmitteln durchgeführt (Tabelle 15, Eintrag 1). Dabei wurde nur ein geringer Umsatz von 9% erzielt, jedoch mit einem guten Enantiomerenüberschuss von 81% (E = 1). Mit der fünffachen Enzymmenge konnte sowohl der Umsatz auf 26% als auch der ee-Wert auf 91% gesteigert werden. Dieses entspricht einer exzellenten Enantioselektivität von 29. Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 24 Stunden mit 4 mg/mmol CAL-B lieferte nur einen etwas höheren Umsatz von 19%, jedoch war hierbei der Enantiomerenüberschuss mit 74% (E = 8) nicht zufriedenstellend (Eintrag 3). Eventuell hat in diesem Fall bei der langen Reaktionsdauer eine parallel chemische Acylierung stattgefunden, sodass der ee-Wert dadurch sinkt. Interessanterweise wurde bei einer Reaktionstemperatur von 20 °C bei 24 Stunden Reaktionsdauer nahezu das identische Ergebnis der Reaktion unter Standardbedingungen erhalten. Auch die Durchführung der Racematspaltung in Anwesenheit von MTBE als Lösungsmittel lieferte nur 7% Umsatz mit 87% ee (Eintrag 5). Die Zugabe von Wasser zu der ansonsten lösungsmittelfreien Synthese führte nur zu einem Umsatz von 6%. Auf eine Bestimmung des Enantiomerenüberschusses ist in diesem Fall aufgrund des niedrigen Umsatzes verzichtet worden.

Tabelle 15. Enzymkatalysierte Racematspaltung von *rac*-**4** mittels lyophilisierter CAL-B von C-LECTA.

Eintrag	CAL-B [mg/mmol]	T [°C]	t [h]	Umsatz [%]	ee [%]	E
1	4	60	4.5	9	81	10
2	20	60	4.5	26	91	29
3	4	60	24	19	74	8
4	4	20	24	6	80	10
5 a)	4	60	4.5	7	87	2
6 b)	4	60	4.5	6	n.b.	n.b.

a) Zugabe von 0.5 mL MTBE; b) Zugabe von 10 μ L dest. Wasser; n.b. = nicht bestimmt.

Insgesamt ist festzustellen, dass die enzymatische Racematspaltung des Amins *rac*-**4** unter lösungsmittelfreien Bedingungen trotz der sehr hohen relativen Aktivität der lyophilisierten CAL-B im Vergleich zu den beiden immobilisierten Lipasen (Novozym 435 und die CAL-B von C-LECTA) nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen führt. Allein die Erhöhung der Enzymmenge um das Fünffache (20 mg/mmol anstelle von 4 mg/mmol unter Standardbedingungen) lieferte einen mäßigen Umsatz mit hoher Enantiomerenreinheit und Enantioselektivität von 29 (Eintrag 2). Die Verwendung einer hohen Enzymmenge ist demnach sinnvoll, um Nebenreaktionen zum Diamid zu unterdrücken. Aus ökonomischer Sicht ist diese Art der Reaktionsführung jedoch nicht ratsam.

4.3.7 Variation der Acyldonoren

Bei der Racematspaltung von Aminen ist die Wahl des Acyldonors von großer Bedeutung. Hochreaktive Acyldonoren, wie beispielsweise Enolester, können Carbonyl-Verbindungen freisetzen, die dann wiederum mit der Aminfunktion zu einem Imin reagieren könnten.^[31] Aufgrund der hohen Nucleophilie des Amins führen diese spontanen, nicht-enzymatischen Acylierungsreaktionen somit zu einer verringerten Enantioselektivität. Sehr gute Ergebnisse wurden in der Literatur mit Acyldonoren erhalten, die in β -Position ein Heteroatom, meistens Sauerstoff, tragen, wie Methoxyessigsäureethyl- oder -propylester (**111** bzw. **6**, Abbildung 4). Die Anwesenheit eines Heteroatoms hat eine erhöhte Aktivität des Carbonyl-Kohlenstoffs zur Folge.^[229] In der Arbeit von SIMON wurde schließlich Malonsäurediethylester (**9**) als sehr effizienter Acyldonor gefunden.^[33,34] Aufgrund des sehr breiten Substratspektrums der CAL-B kann eine Vielzahl an Acyldonoren verwendet werden. Eine Auswahl an Acyldonoren wurde bei der enzymatischen Racematspaltung von Amin *rac*-**4** unter lösungsmittelfreien Bedingungen eingesetzt und die Ergebnisse der Acylierung miteinander und mit Malonsäurediethylester (**9**) als Standard-Acyldonor verglichen. Bei den untersuchten Acyldonoren handelt es sich um Phenoxyessigsäureethylester

(**122**), Phenylethylamin (**147**), Methoxyessigsäureethylester (**111**), Cyanoessigsäureethylester (**124**) und Essigsäurevinylester (**125**). Die ausgewählten Acyldonoren sind in Abbildung 97 dargestellt.

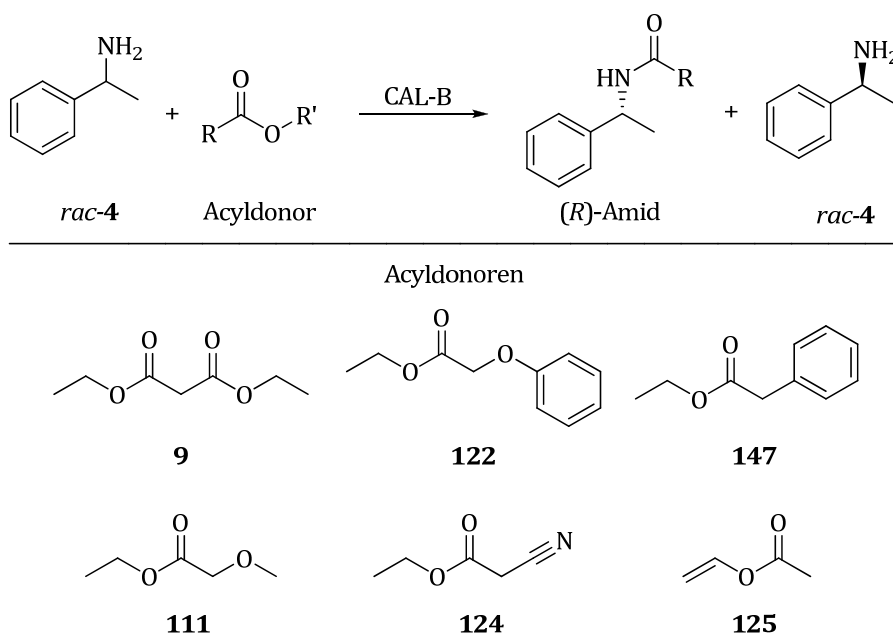


Abbildung 97. Alternative Acyldonoren.

4.3.7.1 Vergleich der Acyldonoren unter Standard-Reaktionsbedingungen

Bei der enzymatischen Racematspaltung von 1-Phenylethylamin (*rac-4*) unter Standard-Reaktionsbedingungen bei 60 °C Reaktionstemperatur sollten die Aktivitäten der Acyldonoren aus Abschnitt 4.3.5 untereinander verglichen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 98 graphisch dargestellt. Es ist ersichtlich, dass bei der Acylierung des Amins *rac-4* bereits nach 4.5 Stunden Reaktionszeit mit dem Standard-Acyldonor Malonsäurediethylester (**9**) 46% Umsatz sowie sehr gute 98% ee erhalten wurden. Dieses entspricht einem exzellenten E-Wert von >200.

Der Acyldonor Phenoxyessigester **122** lieferte 51% Umsatz mit 65% ee (E = 9). Eine Verringerung der Reaktionstemperatur von 60 °C auf 40 °C lieferte ein ähnliches Ergebnis, da 49% Umsatz zum Amid (*R*)-**121** sowie 67% ee (E = 10) erreicht worden sind. Trotz der guten Umsätze sind diese Werte für eine effiziente Racematspaltung nicht ausreichend.

Der Cyanoester **124** wurde in der Literatur bereits als Acyldonor für die Synthese von Zytostatica beschrieben, jedoch nur mittels Chemokatalyse.^[266] Bei der enzymatisch katalysierten Acylierung liefert der Acyldonor **124** einen guten Umsatz von 45%. Allerdings können dabei nur 10% ee beobachtet werden, demnach ist eine Racematspaltung auch mit diesem Donor nicht erfolgreich. Mit Methoxyessigester **111** konnten nach 4.5 Stunden Reaktionszeit zwar nur mäßige 25% Umsatz zum Amid (*R*)-**8** erzielt werden, jedoch lag der Enantiomerenüberschuss erfreulicherweise bei 92%. Dieses entspricht einer sehr guten Enantioselektivität von 33. Allgemein werden mit Methoxyessigestern bei der Acylierung von Aminen in der Literatur vollständige Umsätze erhalten.^[30] So setzten DITRICH *et al.* das Amin *rac-4* mit

Methoxyessigsäurepropylester (**6**) mit 46% Umsatz zum Amid (*R*)-**8** enantiomerenrein ($E > 100$) um. Diese Enantioselektivitäten können im Rahmen dieser Arbeit und auch bei vorherigen Acetylierungsreaktionen in organischem Lösungsmittel innerhalb der Arbeitsgruppe^[33,34] nicht mehr erreicht werden. Der Grund dafür kann unter anderem in der Viskosität des lösungsmittelfreien Systems und des dadurch verminderten Transportprozesses innerhalb der Reaktionsmischung liegen. Es sollte im Anschluss überprüft werden, inwiefern eine Verlängerung der Reaktionszeit eine Steigerung des Umsatzes zur Folge hat.

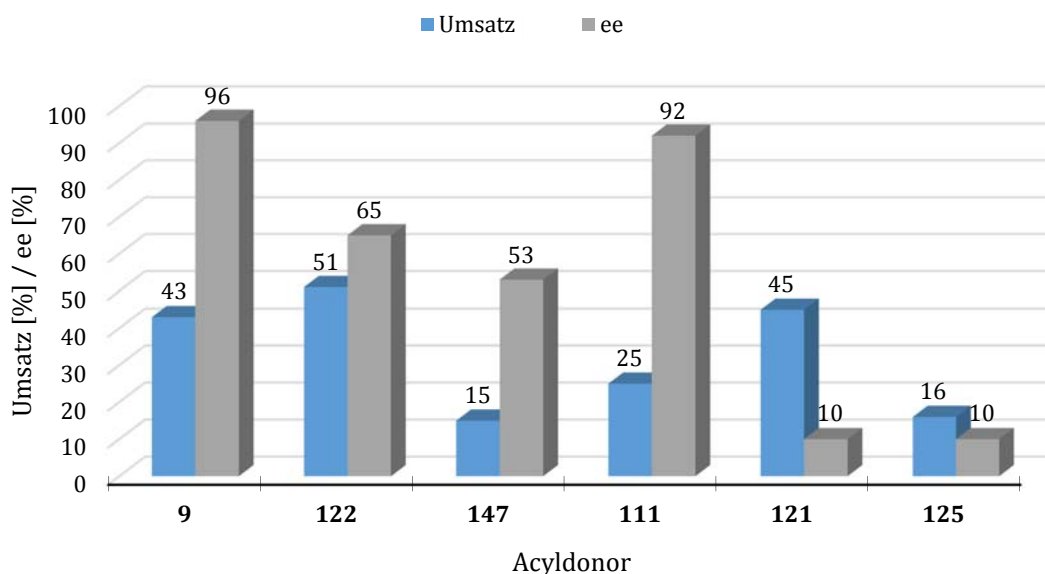
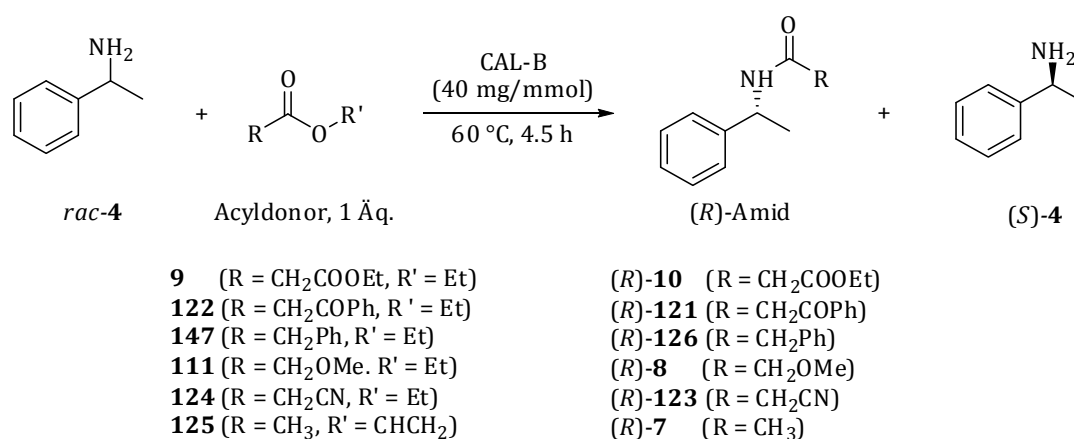


Abbildung 98. Vergleich der alternativen Acyldonoren unter Standard-Reaktionsbedingungen.

Enttäuschende Ergebnisse lieferten die Racematspaltungen von *rac-4* mit Phenylesterges **147** sowie Vinylester **125**. Mit dem Acyldonor **147** konnten nur 15% Umsatz zum Amid (*R*)-**126** beobachtet werden. Dieses kann mit dem fehlenden Heteroatom in β -Position und die dadurch bedingte geringere Aktivität des Esters **147** begründet werden.^[31] Vermutlich wirkt sich die Kettenlänge des Donors **147** negativ auf die Selektivität des Enzyms aus. Der ee-Wert dieser Acylierungsreaktion beträgt für das Amid (*R*)-**126** 53% mit einer inakzeptablen Enantioselektivität von 4. Der Acyldonor **147** ist demnach ungeeignet für eine enzymatische Acylierung des Amins *rac-4*. Die Acylierung mit dem Vinylester **125** liefert bei ebenfalls nur 16% Umsatz zum Amid (*R*)-**7** jedoch nur 10% ee.

Unter den gewählten Standard-Reaktionsbedingungen konnte folglich mit Malonsäurediethylester (**9**) als Acyldonor der beste Umsatz und die höchste Enantiomerenreinheit von 96% erzielt werden. Im Anschluss an diese Versuchsreihe wurden die Acylierungsreaktionen mit Phenoxy- oder Vinyllessigester (**122** bzw. **125**) bei verringerter Temperatur durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen.

4.3.7.2 Vergleich der Acyldonoren bei verringerter Temperatur

Die alternativen Acyldonoren wurden auch bei verringerter Temperatur von 40 °C mit dem Amin *rac*-**4** umgesetzt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Das Herabsetzen der Reaktionstemperatur kann sich, besonders bei stark aktivierten Acyldonoren wie **122** und **124**, als vorteilhaft erweisen, da die Reaktionen dann langsamer und somit selektiver ablaufen könnten. Als Standard-Acyldonor diente hierbei wieder Malonsäurediethylester (**9**). Die Ergebnisse sind in Abbildung 99 graphisch dargestellt.

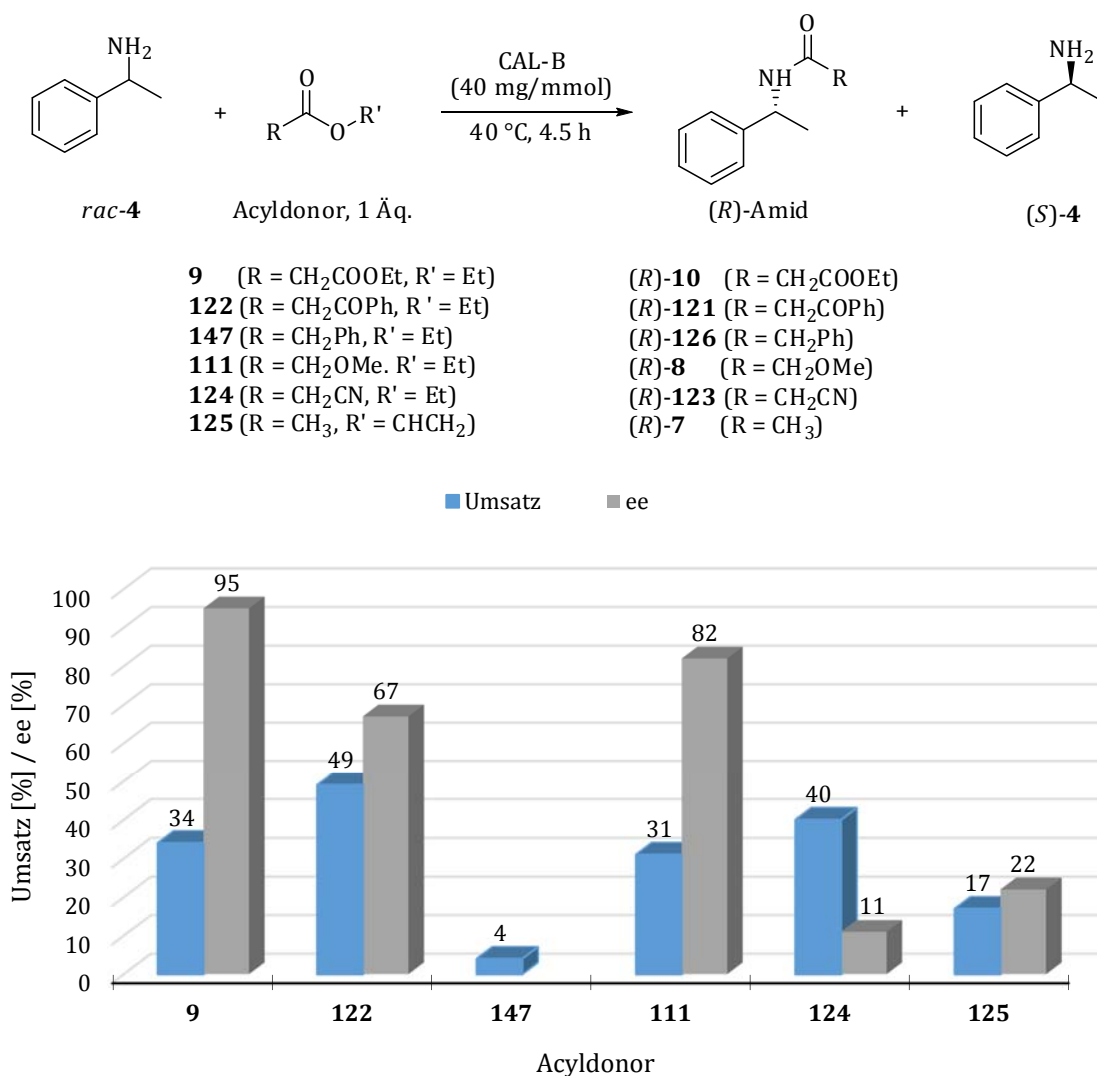


Abbildung 99. Vergleich der alternativen Acyldonoren bei verringerter Reaktionstemperatur.

Der Malonester **9** liefert bei 40 °C Reaktionstemperatur mit 34% Umsatz und sehr hoher Enantiomerenreinheit von 96% einen sehr guten E-Wert von 80. Dieses ist für eine effiziente Racematspaltung ein hervorragendes Ergebnis. Mit Phenoxyessigester **122** als Acyldonor wurden zwar sehr gute 49% Umsatz erzielt, jedoch konnten nur mäßige 67% ee beobachtet werden. Dieses entspricht einer Enantioselektivität von 10 und ist, ebenso wie bei 60 °C, nicht zufriedenstellend.

Der Methoxyessigester **111** lieferte zwar einen leicht erhöhten Umsatz von 31% im Vergleich zur Acylierung bei 60 °C, allerdings konnte ein leichtes Absinken des ee-Wertes von 92% auf 82% bei 40°C (E = 14) detektiert werden. Auch eine weitere Verringerung der Temperatur auf 20 °C führte noch zu guten 31% Umsatz, allerdings nur mit mäßigen 71% ee (E = 8). Die niedrigen Enantiomerenüberschüsse des Amids (*R*)-**8** bei Verringerung der Reaktionstemperatur auf nur noch 71% ee weichen deutlich von den in der Literatur bei Raumtemperatur erhaltenen Werten mit Acyldonor **6** ab (>99% ee, E >100).^[30] Eine Verringerung der Selektivität der CAL-B bei niedrigeren Temperaturen kann demnach ausgeschlossen werden.

Unveränderte Ergebnisse (40% Umsatz mit 11% ee zum Amid (*R*)-**123**) im Vergleich zu den Acylierungsreaktionen bei 60 °C wurden mit Cyanoessigester **124** erhalten. Unter den hier verwendeten Reaktionsbedingungen ist eine Racematspaltung mit diesem Donor nicht möglich. Mit Vinylessigester **125** konnten auch bei 40 °C Reaktionstemperatur nur 17% Umsatz erzielt werden. Für eine gute Durchmischung der dickflüssigen Reaktionsmischung war in diesem Fall die Zugabe von MTBE als Lösungsmittel notwendig. Der ee-Wert beträgt hierbei 22%. Dieses entspricht einem E-Wert von 2 und ist nicht ausreichend für die Racematspaltung. Ebenfalls negative Ergebnisse mit 4% Umsatz werden mit dem Phenylessigester **147** als Acyldonor erhalten. Auf eine Bestimmung des Enantiomerenüberschusses wurde in diesem Fall verzichtet.

Es hat sich folglich auch bei verringerter Reaktionstemperatur von 40 °C Malonsäurediethylester (**9**) als der geeignetste Acyldonor erwiesen, sowohl in Hinblick auf den Umsatz als auch auf die Enantiomerenreinheit der Racematspaltung. Mit den Acyldonoren Malonester **9**, Phenoxyessigester **122**, Cyanessigester **124** sowie dem Methoxyessigester **111** wurden im Folgenden Kinetiken der Racematspaltung des Amins *rac*-**4** unter lösungsmittelfreien Standard-Bedingungen untersucht.

4.3.7.3 Parallel ablaufende chemische Acylierung von 1-Phenylethylamin (*rac*-**4**)

In den beiden vorangegangenen Abschnitten sind teilweise ungewöhnlich niedrige Enantiomerenüberschüsse erhalten worden. Dieses sollte daraufhin näher untersucht werden, indem die entsprechenden Acylierungsreaktionen von *rac*-**4** zwar unter Standard-Bedingungen, jedoch in Abwesenheit der Lipase CAL-B durchgeführt wurden (Abbildung 100).

Sowohl mit dem Cyanessigester **124**, als auch in noch stärkerem Maße mit dem Vinylessigester **125**, finden unkatalysierte Acylierungsreaktionen statt. Dieses erklärt die sehr niedrigen Enantiomerenüberschüsse, die in den Abschnitten 4.3.7.1 und 4.3.7.2 beschrieben worden sind. So konnten in Abwesenheit der CAL-B bei 60 °C und 4,5 Stunden Reaktionszeit bereits 33% Umsatz zum entsprechenden racemischen Amid *rac*-**123** mit 3% ee (E = 1) erhalten werden. Durch Verringerung der Temperatur auf

40 °C kann die chemische Reaktion zu einem Großteil unterdrückt werden, da nur noch 12% Umsatz ermittelt werden.

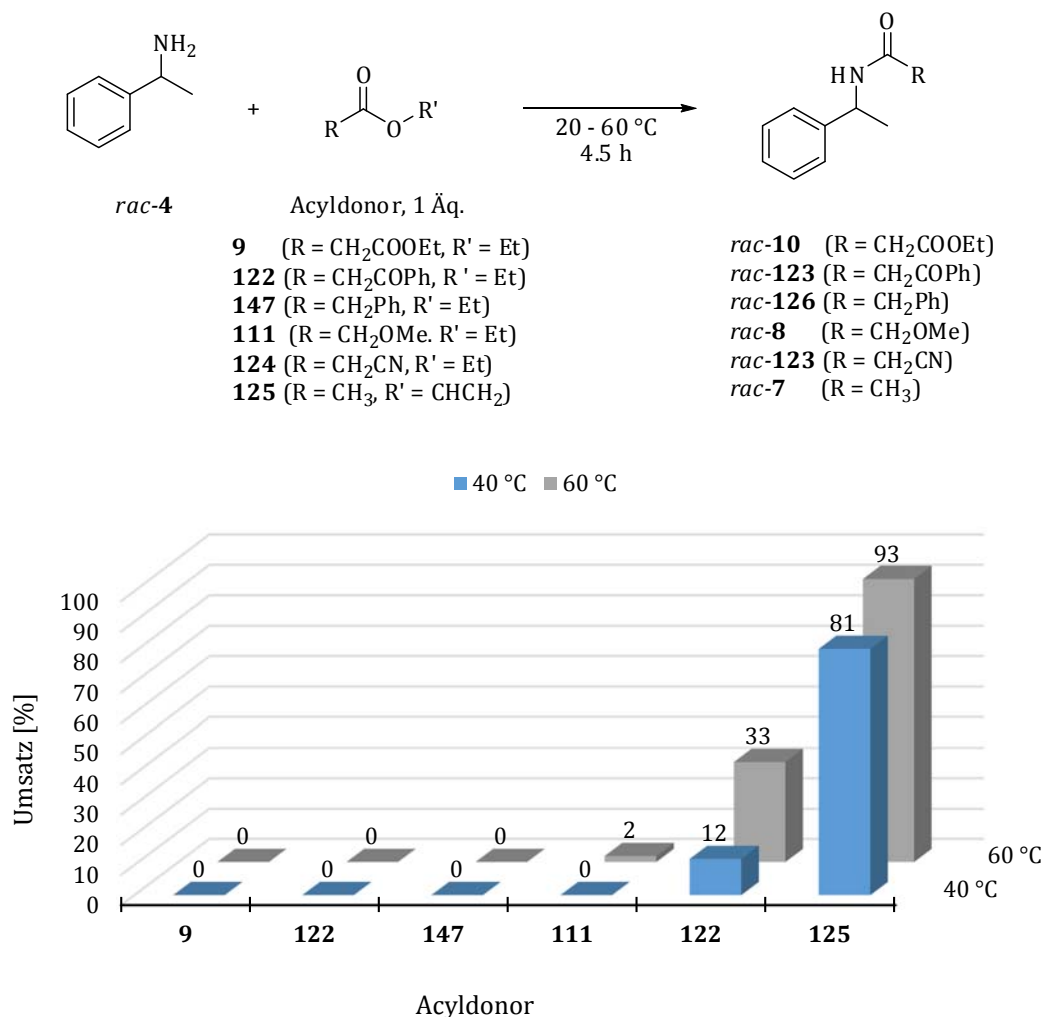


Abbildung 100. Parallel ablaufende chemische Acylierung von *rac-4*.

Im Falle des Vinylessigesters **125** können bei 60 °C Reaktionstemperatur bis zu 93% des Amids *rac-8* erreicht werden. Die Geschwindigkeit der chemischen Acylierung kann während der Reaktionsführung mit und ohne Lipase beobachtet werden, da bereits nach wenigen Minuten eine Braunfärbung zu erkennen ist. Dieses ist mit einer erhöhten Reaktivität des Esters **125** zu begründen und erklärt den relativ niedrigen Umsatz von 16% in Abschnitt 4.3.7.1, der durch enzymatische Acylierung des Amins *rac-4* erhalten wurde. Obwohl der Vinylester **125** bereits erfolgreich zur Acylierung von Alkoholen unter lösungsmittelfreien Bedingungen^[248] eingesetzt worden ist, eignet er sich nicht zur Racematspaltung von *rac-4*.

Wird mit stark aktivierten Acyldonoren gearbeitet, so lässt sich die chemische Acylierung durch Verringerung der Reaktionstemperatur zu einem gewissen Teil vermeiden. Allerdings muss in solchen Fällen die vorhandene Aktivität der CAL-B bei entsprechenden Temperaturen bestimmt werden, da diese ihr Temperaturoptimum bei 60 – 80 °C hat.^[195]

4.3.8 Reaktionskinetiken der Racematspaltung von 1-Phenylethylamin (*rac*-4) mit unterschiedlichen Acyldonoren

Um die Effizienz der unterschiedlichen Acyldonoren effektiv miteinander vergleichen zu können, wurden die Anfangsgeschwindigkeiten kinetischer Racematspaltungen dieser Acyldonoren miteinander und mit Malonsäurediethylester (**9**) als Standard-Acyldonor verglichen.

Die Reaktionskinetiken der Acylierungsreaktionen desamins *rac*-4 wurden unter den Standard-Reaktionsbedingungen durchgeführt. Dabei wurden die Reaktionen nach der entsprechenden Zeit abgebrochen und aufgearbeitet, was generell zu kleineren Abweichungen durch Wägefehlern führen kann. Weitere Fehlerquellen sind die Schwankungsbreiten bei der Auswertung der ¹H-NMR-Spektren sowie der HPLC-Chromatogramme. Der Umsatz wird bei diesen Acylierungsreaktionen in Bezug auf das Amin *rac*-4 bestimmt, da die Flüchtigkeit der Acyldonoren nicht untersucht worden ist.

Als Vergleich für die alternativen Acyldonoren diente die Reaktionskinetik der Acylierung von *rac*-4 mit Malonsäurediethylester (**9**) als Acyldonor unter lösungsmittelfreien Bedingungen (Abbildung 101). Es ist ein steter Anstieg des Umsatzes mit der Zeit zu erkennen bis nach 24 Stunden ein vollständiger Umsatz erreicht wird. Die Enantiomerenüberschüsse für das Amid (*R*)-**10** liegen bei diesen Acylierungsreaktionen immer >94% ee. Eine Ausnahme stellt dabei die Reaktion mit acht Stunden Reaktionszeit an, bei der nur 89% ee beobachtet werden können. Diese Abweichung kann nicht auf Fehler während der Reaktionsführung begründet werden.

Die Kinetik der Racematspaltung von *rac*-4 mit Malonsäurediethylester (**9**) wurde in vorherigen Arbeiten im Arbeitskreis^[33] bereits untersucht, allerdings bei einer Reaktionstemperatur von 80 °C und in Anwesenheit von *n*-Heptan als Lösungsmittel. Dabei konnte ebenfalls eine schnelle Reaktionsrate festgestellt werden, wobei der vollständige Umsatz bereits nach drei Stunden erreicht wurde. Allerdings war der Einsatz von 200 mg/mmol CAL-B, also der fünffachen Menge des im Rahmen dieser Kinetikstudie verwendeten Enzyms, für die Versuchsreihe notwendig.

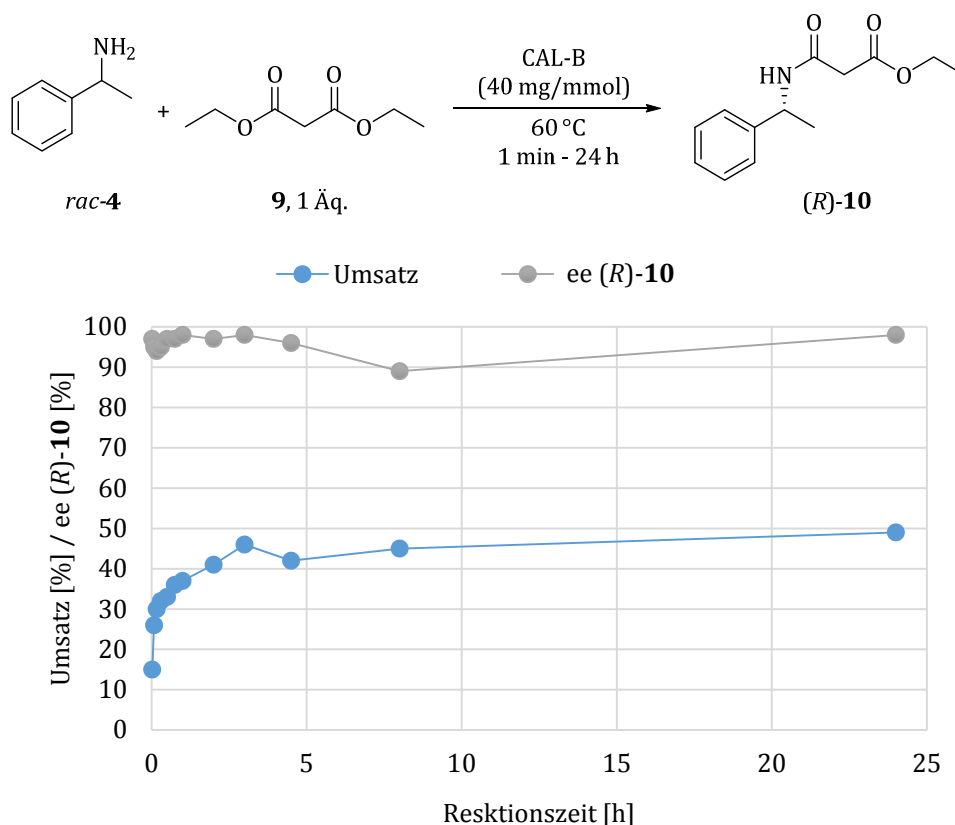


Abbildung 101. Kinetik der Racematspaltung von *rac*-4 mit Malonsäurediethylester (9).

Bei der Verwendung von Phenoxyessigsäureethylester (122) als Acyldonor bei der enzymatischen Racematspaltung des Amins *rac*-4 in Abwesenheit von Lösungsmitteln wurden moderate Ergebnisse erzielt (Abbildung 102). So werden hierbei zwar bereits nach einer Minute Reaktionszeit 30% Umsatz zum Amid (*R*)-121 und ein Enantiomerenüberschuss von 79% ee erreicht, was einem E-Wert von 12 entspricht. Nach zehn Minuten liegt der Umsatz schon bei 41%, allerdings sinkt hierbei der Enantiomerenüberschuss auf 72% ($E = 10$). Im Verlauf der Reaktion jedoch steigt der Umsatz weiter an, sodass bei 24 Stunden Reaktionsdauer 58% Umsatz erhalten werden. Der ee-Wert liegt in diesem Fall bei 61%, was einer Enantioselektivität von 9 entspricht. Dieses ist für eine effiziente Racematspaltung nicht ausreichend. Der bei längerer Reaktionsdauer ansteigender Umsatz und sinkende Enantiomerenreinheit ist ein Indiz dafür, dass eine parallel ablaufende chemische Acylierung stattfindet. Sollte Phenoxyessigester 122 als Acyldonor Einsatz finden, so würde das beste Ergebnis mit der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Enzymmenge bereits nach zehn Minuten Reaktionszeit erzielt werden.

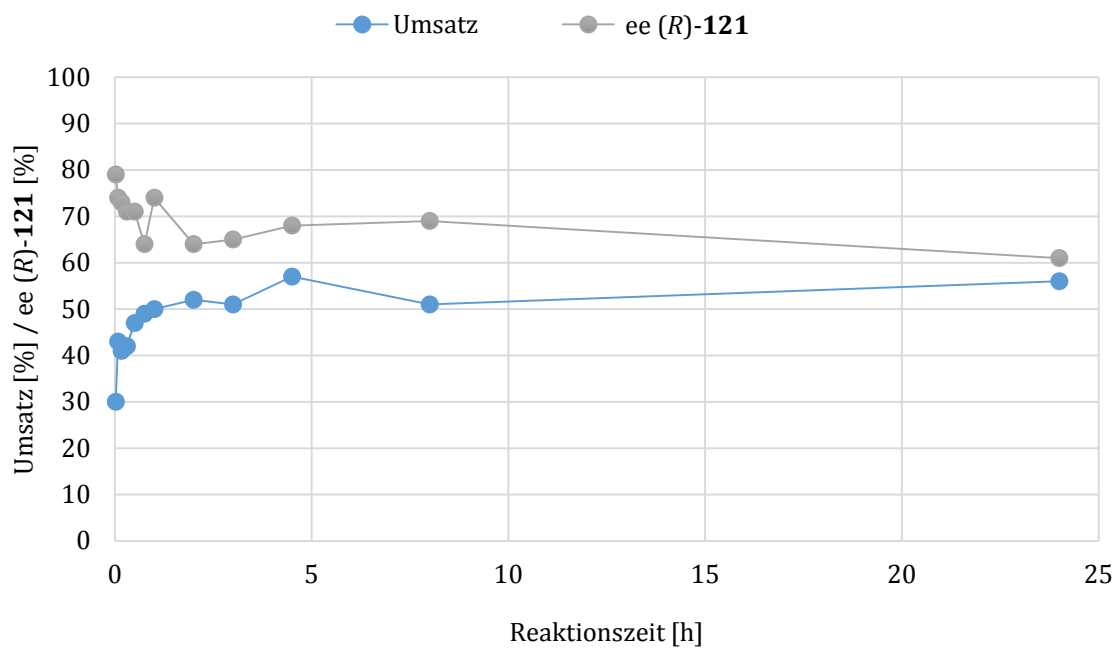
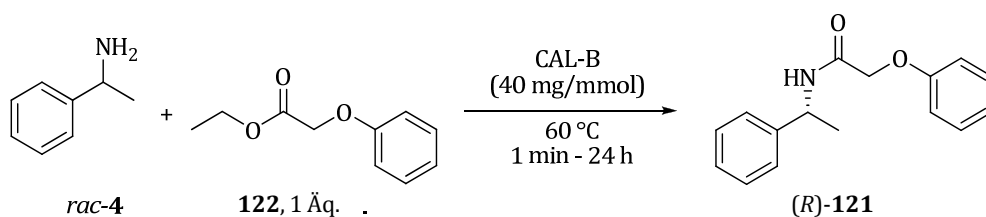


Abbildung 102. Kinetik der Racematspaltung von *rac*-4 mit Phenoxyessigester **122**.

Die Kinetik der Racematspaltung des Amins *rac*-4 mit Cyanessigester **124** als Acyldonor unter lösungsmittelfreien Bedingungen ist in Abbildung 103 dargestellt. Zwar werden hierbei bereits nach einer Minute 20% Umsatz erreicht, allerdings steigt dieser im Verlauf der Reaktion nur sehr langsam weiter an. Nach 4.5 Stunden Reaktionszeit können dennoch 42% Umsatz erzielt werden. Bei einer Verlängerung der Reaktionsdauer auf 24 Stunden liegt der Umsatz bei 65%, was für eine theoretische Racematspaltung mit maximal 50% Umsatz zum Amid (R)-**123** nachteilig ist. Die Enantiomerenüberschüsse dieser Acylierungen liegen bei höchstens 12% ee, was einer Enantioselektivität von 1 entspricht. Dieses spricht dafür, dass die enzymatische Acylierung nicht enantioselektiv verläuft. Vielmehr stimmt es mit den in Abschnitt 4.3.7.3 erhaltenen Ergebnissen überein. Demnach wird in Abwesenheit von CAL-B 33% Umsatz zum Amid **123** mit 3% ee erzielt. Die Lipase selbst hat folglich in dieser Versuchsreihe mit Cyanessigester **124** als Acyldonor keinen Einfluss auf die Racematspaltung. Der Donor ist somit für die kinetische Racematspaltung nicht geeignet.

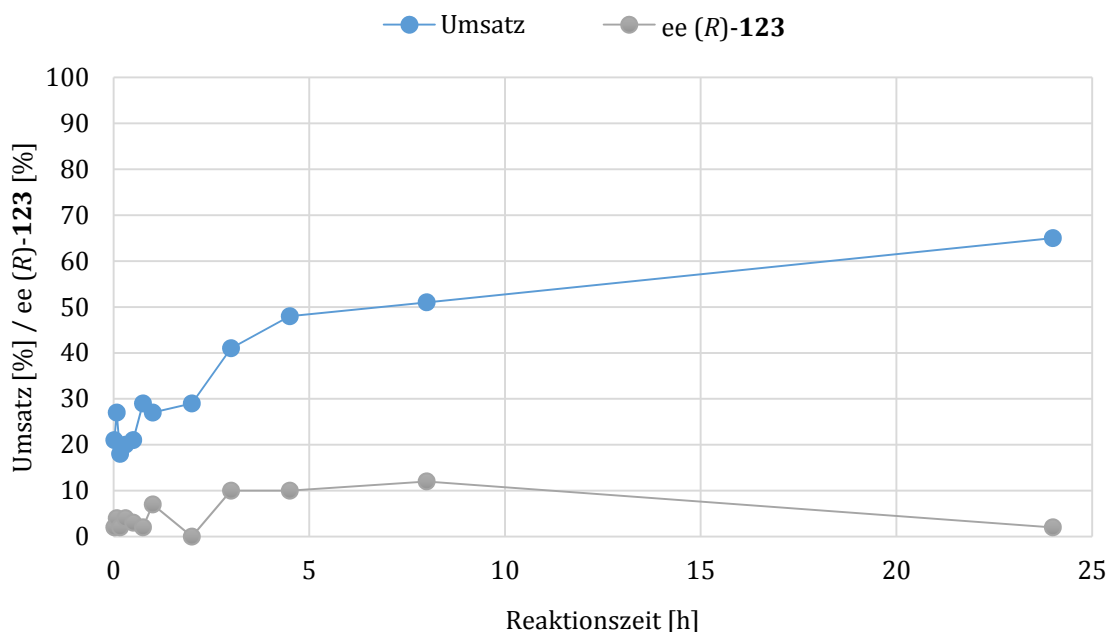
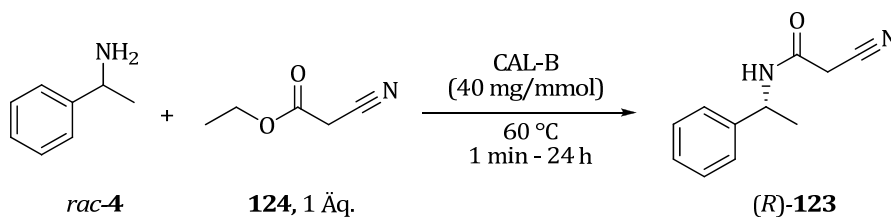


Abbildung 103. Kinetik der Racematspaltung von *rac*-**4** mit Cyanessigester **124**.

Die Versuchsreihe zur Bestimmung der Kinetik der Racematspaltung von *rac*-**4** mit Methoxyessigester **111** als Acyldonor zum entsprechenden Amid (*R*)-**8** wurde ebenfalls unter lösungsmittelfreien Bedingungen durchgeführt (Abbildung 104). Hierbei ist zu erkennen, dass die Reaktion mit nur geringer Geschwindigkeit verläuft, da der Umsatz sehr langsam von 16% nach einer Minute Reaktionszeit auf 33% nach 24 Stunden ansteigt. Der Enantiomerenüberschuss beträgt nach einer Minute Reaktionsdauer 72%, was einer Enantioselektivität von 7 entspricht. Im Laufe der Reaktion über 24 Stunden bleibt der ee-Wert konstant bei etwa 76 – 83% ee. Auch hierbei findet wahrscheinlich eine konkurrierende, parallel ablaufende unkatalysierte Acylierung des Amins *rac*-**4** statt, da das Methoxyessigester **111** in β -Position stark aktiviert ist. Ein Abfall des Enantiomerenüberschusses bei erhöhten Temperaturen mit dem Ester **111** wurde auch von KANERVA beobachtet.^[36] Der höchste E-Wert von 16 wird somit nach 24 Stunden Reaktionsdauer erreicht wird, wobei der Umsatz allerdings jedoch nur bei 33% liegt.

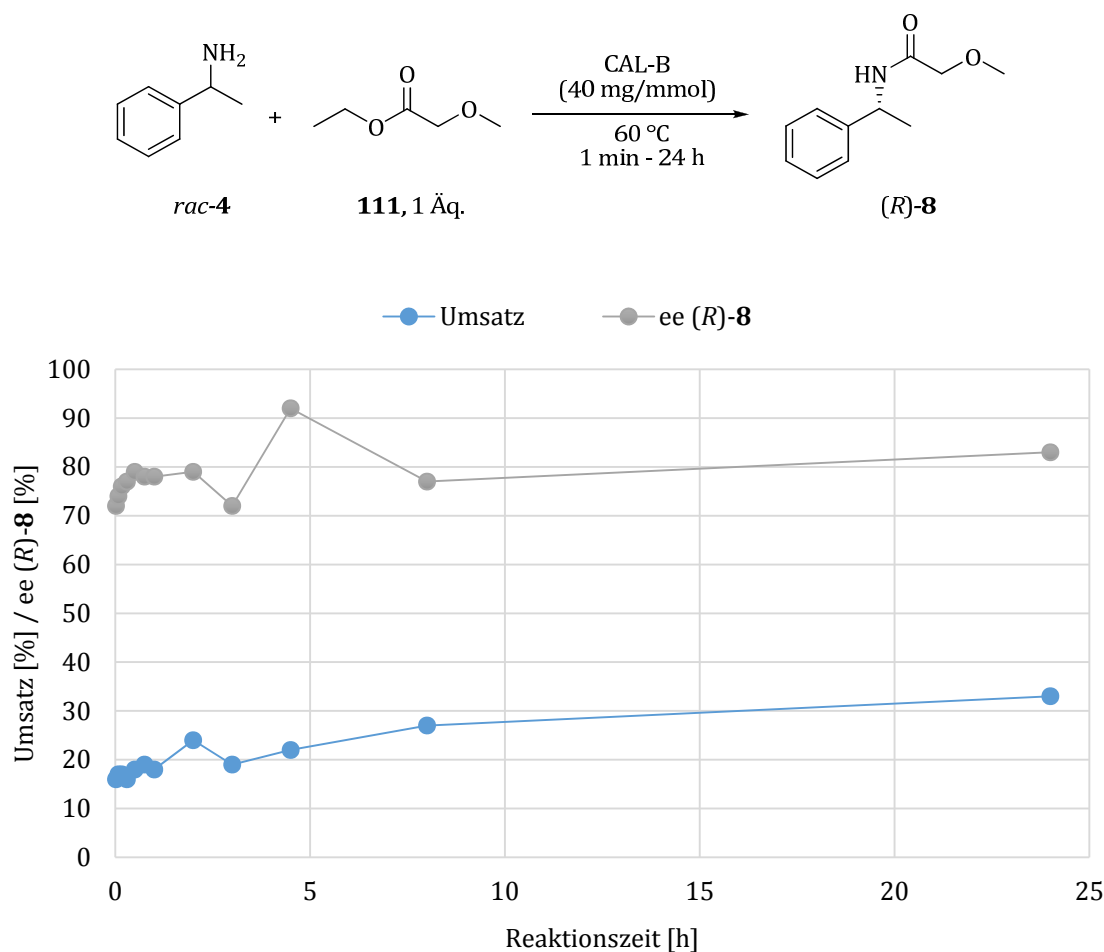


Abbildung 104. Kinetik der Racematspaltung von *rac*-4 mit Methoxyessigester **111**.

Bei dem direkten Vergleich der hier gewählten Acyldonoren wird deutlich, dass Malonsäurediethylester (**9**) eine Sonderstellung einnimmt (Abbildung 105). Dabei wurde das Amid (*R*)-**10** nach 4.5 Stunden Reaktionszeit mit 42% Umsatz und 95% ee ($E > 100$). Zwar konnten mit dem Phenoxyessigester **122** bereits nach zehn Minuten Reaktionszeit 43% Umsatz erhalten werden, allerdings steigt dieser nach 4.5 Stunden auf 57% an. Dieses liegt deutlich über dem maximalen Umsatz einer kinetischen Racematspaltung von 50% und hat eine verringerte Enantiomerenreinheit und somit auch Enantioselektivität ($E = 18$) zur Folge. Der in der Literatur häufig verwendete Methoxyessigester **111** weist zu Beginn der Reaktion eine hohe Reaktionsrate auf, allerdings stagniert diese bereits nach etwa 30 Minuten. Nach 4.5 Stunden kann das Amid (*R*)-**8** mit 22% Umsatz und 92% ee ($E = 31$) beobachtet werden. Eventuell ist die Carbonylfunktion des Esters **111** durch die aktivierte Methoxy-Funktion zu reaktiv für Acylierungsreaktion in lösungsmittelfreien Systemen. Daher wäre ein Einsatz des Esters **111** in größeren Maßstäben nicht befriedigend.

Ein Vergleich der Racematspaltungen mit den Acyldonoren **9** und **124** zeigt zunächst ein ähnliches Verhalten, allerdings wird nur mit Malonsäurediethylester (**9**) ein vollständiger Umsatz mit sehr guten Enantiomerenüberschüssen und exzellenten E -Werten von >100 erreicht. Die Cyano-Funktion im Ester **124** hat demnach einen zu stark aktivierenden Einfluss auf die Carbonylfunktion und somit auch auf die Reaktionsrate, da hierbei nach 4.5 Stunden zwar 48% Umsatz zum Amid (*R*)-**123** erzielt werden, jedoch beträgt der Enantiomerenüberschuss bei 10% ee ($E = 1$). Für Racematspaltungen in lösungsmittelfreien

Systemen ist Malonsäurediethylester (**9**) folglich der Acyldonor der Wahl und wird als Standard-Acyldonor eingesetzt.

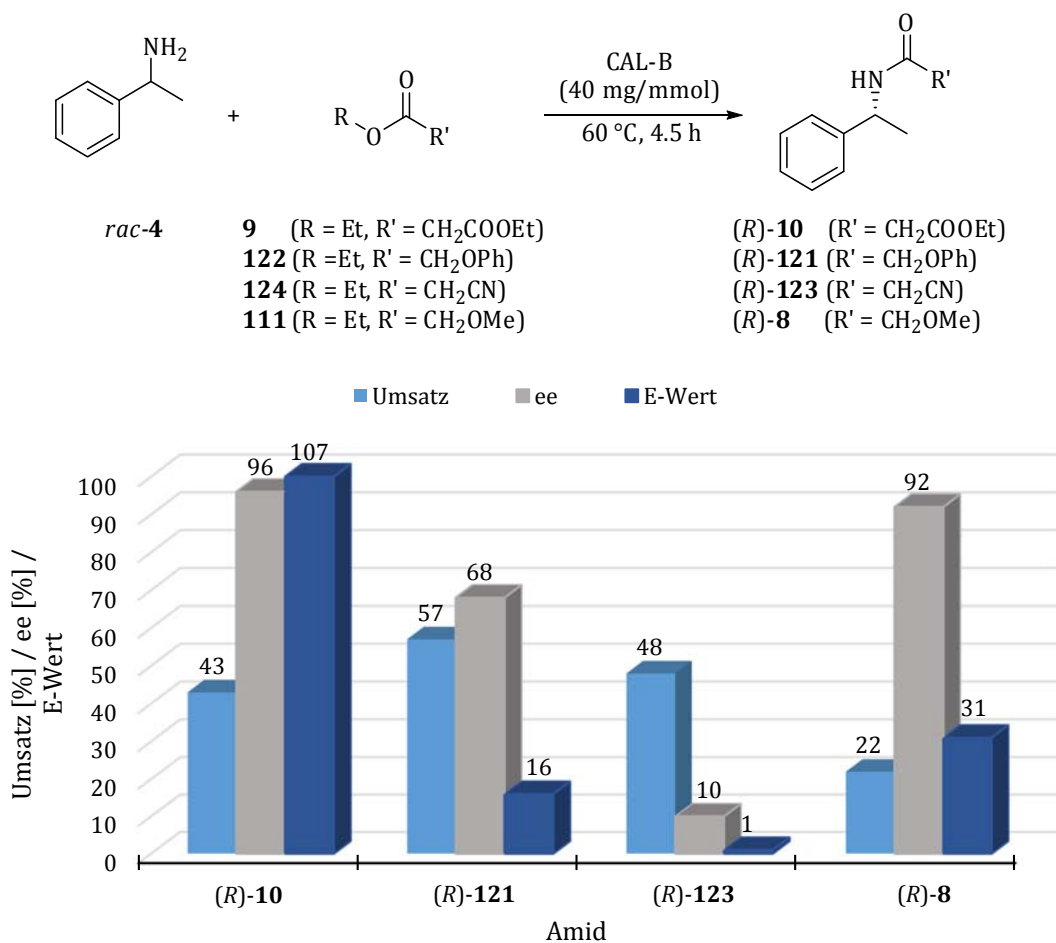


Abbildung 105. Vergleich der Acyldonoren nach 4.5 Stunden Reaktionszeit.

4.3.9 Substratbreite

4.3.9.1 1-Aminoindan (*rac*-130)

1-(*R*)-Aminoindan (*(R)*-130) ist ein wichtiger Metabolit des Antiparkinson-Medikaments Rasagilin (**148**) und kann gleichzeitig als Baustein für die Synthese dieses Wirkstoffes dienen (Abbildung 106). *(R)*-130 selbst besitzt zusätzlich neuroprotektive Eigenschaften.

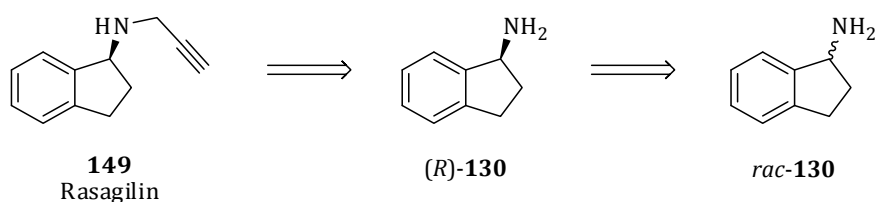


Abbildung 106. Retrosynthese von Rasagilin (**148**), ausgehend von (*R*)-130.

Ein möglicher Syntheseweg ausgehend von (*R*)-**130** beginnt mit der Racematspaltung der Vorstufe *rac*-**130**, die in der Literatur bereits mehrfach sowohl auf chemischem als auch enzymatischem Weg beschrieben wurde.^[30,31,68,242,267] Dabei konnten, insbesondere bei der Racematspaltung mittels CAL-B, bereits sehr gute Ergebnisse in Hinblick auf Umsatz und Enantioselektivität erzielt werden. So konnten DITRICH *et al.* das entsprechende Amid mit 1.5 Äquivalenten Methoxyacetat **6** als Acyldonor nach 24 Stunden bei Raumtemperatur mit 92% Umsatz (bezogen auf 50% maximalen Umsatz) und >98% ee erhalten.^[30] Auch die Acylierung mit Carbonsäuren liefert das jeweilige Amid mit >99% ee.^[31] Durch eine dynamisch-kinetische Racematspaltung mithilfe der CAL-B und eines Pd-Katalysators mit Ethylacetat **5** als Acyldonor konnte PARK das entsprechende Amid enantiomerenrein mit 88% Umsatz erhalten.^[242] Zu Beginn der Arbeiten mit Aminoindan (*rac*-**130**) wurde auch diese Racematspaltung in Hinblick auf parallel ablaufende, spontane chemische Acylierungsreaktionen untersucht. Dafür wurde die Acylierung von *rac*-**130** mit Malonsäurediethylester (**9**) bei unterschiedlichen Temperaturen und Reaktionszeiten löungsmittelfrei zum entsprechenden Amid *rac*-**129** umgesetzt (Abbildung 107). Bei 60 °C und 24 Stunden Reaktionsdauer wurde der höchste Umsatz von 9% erzielt. Eine Erhöhung auf 80 °C bei 4.5 Stunden Reaktionsdauer lieferte noch 8% Umsatz, während bei 20 °C nur noch 2% erhalten wurden. Unter den im Rahmen dieser Arbeit gewählten Standard-Reaktionsbedingungen von 60 °C und 4.5 Stunden Reaktionsdauer wurden nur 4% Umsatz zum Amid *rac*-**129** erzielt. Im Rahmen der enzymatischen Acylierung sind die Auswirkungen dieses Ergebnisses vernachlässigbar.

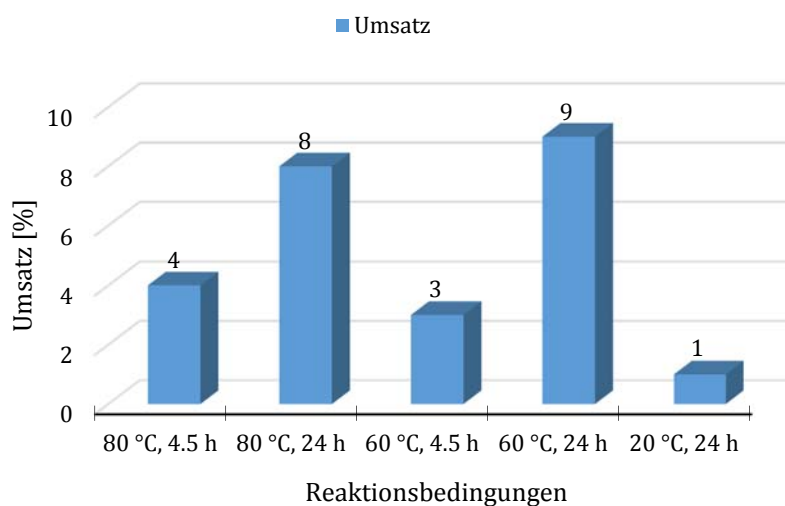
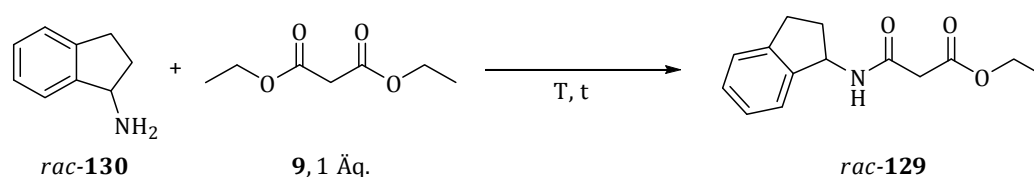


Abbildung 107. Parallel ablaufende chemische Acylierung von *rac*-**129**.

Im Anschluss an die Bestimmungen der durch unkatalsierte Parallelreaktionen erhaltenen Umsätze sollte die enzymatische Racematspaltung von *rac*-**130** mit Malonsäurediethylester (**9**) unter Standard-Bedingungen durchgeführt und in Hinblick auf optimale Reaktionsbedingungen untersucht werden. Dafür wurde die Racematspaltung von *rac*-**130** zunächst in Abhängigkeit von der Temperatur bei

4.5 Stunden Reaktionsdauer untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 108 graphisch dargestellt. Dabei ist ersichtlich, dass bei der Racematspaltung kein Trend der Abhängigkeit von der Temperatur hinsichtlich des Umsatzes vorliegt. So werden bei 80 °C Reaktionstemperatur 39% Umsatz erzielt, während bei 20 °C noch 43% Umsatz erhalten werden. Die Enantiomerenüberschüsse liegen dabei für das Amid *rac*-129 im Bereich von nur 73-79% ee. Die Racematspaltung von *rac*-130 mit dem Methoxyester **6** wurde von BASF SE mit hoher Enantiomerenreinheit sowohl des Amids (*R*)-129 als auch des Amins (*S*)-130 durchgeführt.^[30] KANERVA et al. führten die Acylierung, ebenfalls mit dem Methoxyester **6**, unter lösungsmittelfreien Bedingungen bei 23 °C mit hoher Enantioselectivität durch, wobei bereits nach einer Stunde 39% Umsatz erzielt worden sind.^[36] Bei den in dieser Arbeit gewählten Reaktionsbedingungen spielt die Wahl des Acyldonors sowie die Abwesenheit von Lösungsmitteln eine entscheidende Rolle.

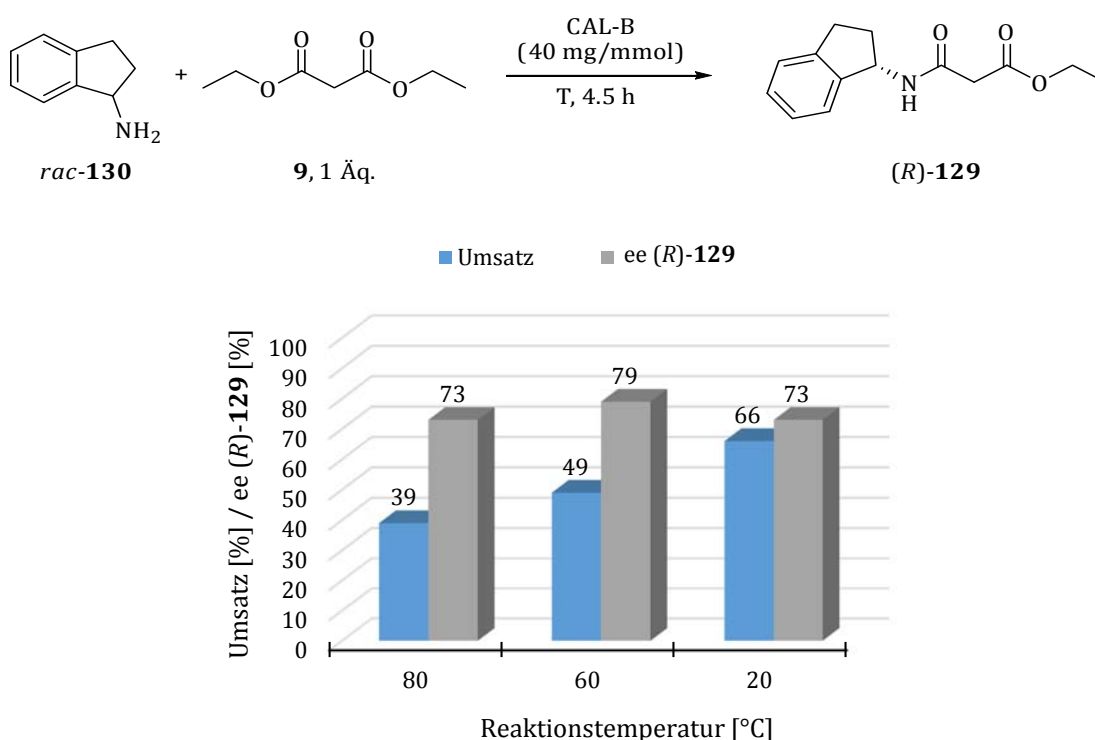


Abbildung 108. Racematspaltung von *rac*-130 in Abhängigkeit der Temperatur bei 4.5 h.

Die Reaktionsdauer wurde unter den sonst gleich bleibenden Bedingungen auf 24 Stunden verlängert, um den Einfluss der Reaktionszeit zu überprüfen (Abbildung 109). Dabei wird bei 80 °C Reaktionstemperatur ein Umsatz von 42% erreicht, was nur eine leichte Steigerung zu dem Wert von 39% bei 4.5 Stunden Reaktionszeit ist. Der Enantiomerenüberschuss für das Amid (*R*)-129 ist mit 97% ee ($E > 100$) sehr gut. Allerdings wurde bereits beschrieben, dass bis zu 8% des Amids (*R*)-129 bei 80 °C und 24 Stunden Reaktionsdauer auf chemischem Wege gebildet wird. Die Enantiomerenüberschüsse der Acylierungen nehmen jedoch mit weiter sinkender Temperatur ab, sodass das Amid (*R*)-129 bei 40 °C zwar noch mit 50% Umsatz und 90% ee, bei 20 °C jedoch nur noch ein ee-Wert von 54% detektiert werden kann. Diese niedrige Enantioselectivität ist überraschend, da die Arbeitsgruppe um KANERVA sehr gute Ergebnisse mit der CAL-B in Hinblick auf Enantioselectivität bei 23 °C Reaktionstemperatur erhalten hat.^[36]

Das beste Resultat wurde bei 24 Stunden Reaktionsdauer somit bei 60 °C Reaktionstemperatur erzielt (E > 100). Das Amid (*R*)-**129** wurde hierbei nahezu enantiomerenrein erhalten. Dieses ist ungewöhnlich, da nach 4.5 Stunden Reaktionszeit bereits ein ee-Wert von 79% beobachtet werden konnte (Abbildung 108). Obwohl es sich bei den beiden Acylierungen um eigenständige Reaktionen handelt können technische Fehler ausgeschlossen werden. Während der Lagerung des Amins *rac*-**130** ist eine Änderung der eigentlich farblosen Verbindung zu einer gelben sichtbar gewesen. Mithilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass neue Fremdsignale sowohl im aromatischen als auch aliphatischen Bereich des Spektrums vorhanden sind, die jedoch nicht weiter zugeordnet werden können. Diese beobachteten Verunreinigungen sollten jedoch keine Auswirkung auf die Enantiomerenüberschüsse haben.

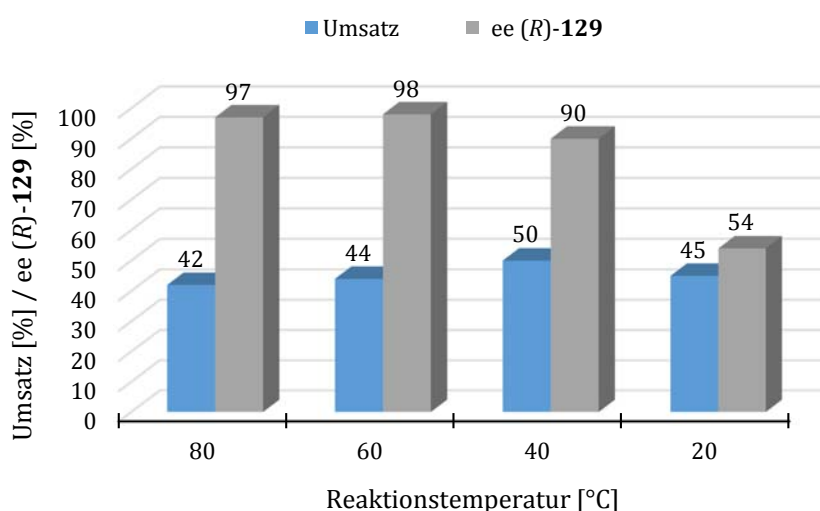
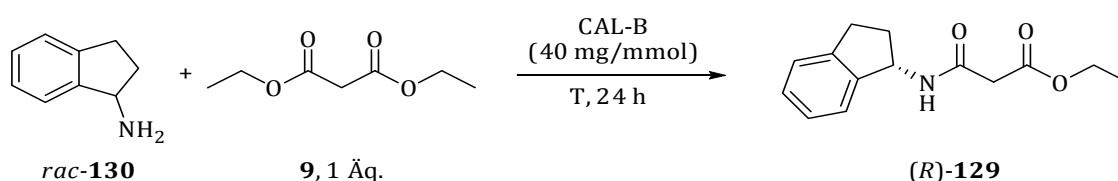


Abbildung 109. Racematspaltung von *rac*-**130** in Abhängigkeit der Temperatur bei 24 h.

Nachdem die Standardreaktions-Bedingungen von 60 °C und 4.5 Stunden für die enzymatische Racematspaltung von *rac*-**130** zwar zu einem guten Umsatz von 39%, jedoch nur zu einem mäßigen Enantiomerenüberschuss von 79% ee führten, sollten im Anschluss daran weitere Variablen, wie die Anzahl an Äquivalenten des Acyldonors **9** oder die Zugabe von MTBE zum Reaktionsgemisch zur besseren Durchmischung der Komponenten, getestet werden (Abbildung 110). Die unter den lösungsmittelfreien Standardreaktionsbedingungen erhaltenen Ergebnisse dienen dabei als Vergleichsreaktion.

Durch Zugabe von 1.5 Äquivalenten des Malonesters **9** kann ein nahezu vollständiger Umsatz mit sehr hoher Enantiomerenreinheit erzielt werden, was einer sehr guten Enantioselektivität von 61 entspricht. Als Vergleich wurde die Racematspaltung in MTBE als Lösungsmittel durchgeführt, die 41% Umsatz mit mäßigen 70% ee (E = 9) lieferte. Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 24 Stunden lieferte bessere Ergebnisse mit 52% Umsatz und 85% ee (E = 40). Eine Erhöhung der Menge an Acyldonor **9** auf

5 Äquivalente, ebenfalls in MTBE, führte zu 63% Umsatz zum Amid (*R*)-**129** und 76% ee. Dieses entspricht einer Enantioselektivität von 14 und ist für eine effiziente Racematspaltung ungenügend. Allerdings spielt bei 24 Stunden Reaktionszeit die spontane chemische Acylierung von *rac*-**130** eine tragende Rolle.

Auch bei diesen Acylierungsreaktionen sind die großen Schwankungen der Enantioselektivitäten nicht auf Fehler während der Durchführung sowie der Messungen mittels HPLC zu erklären.

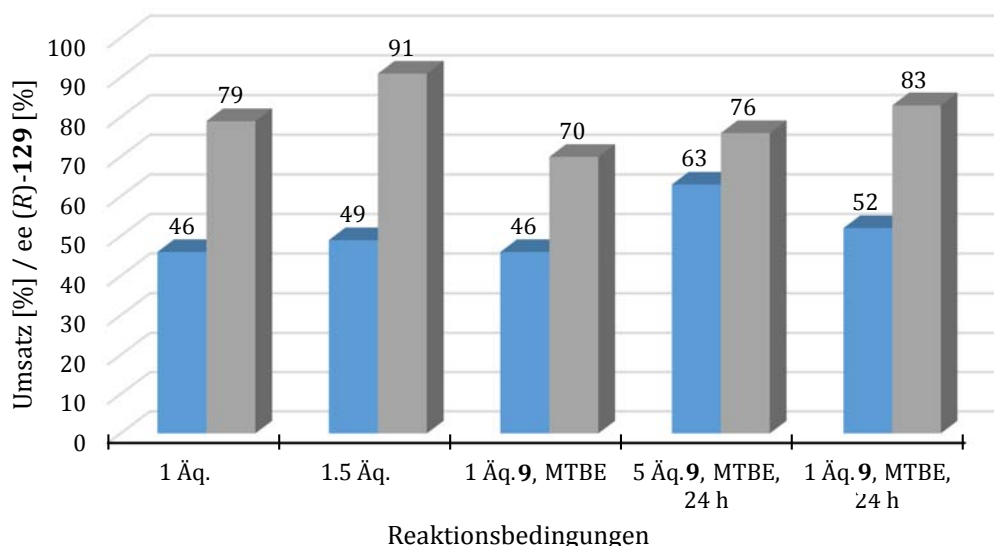
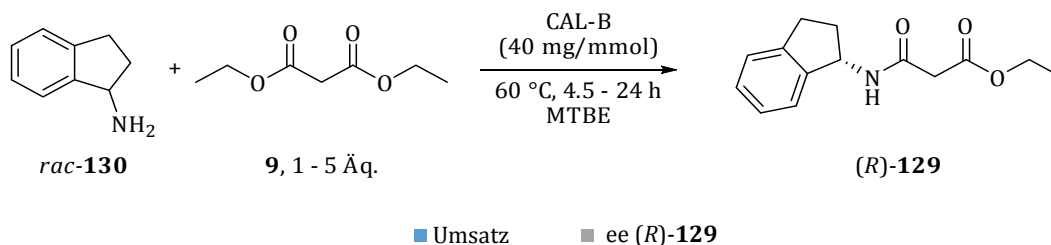


Abbildung 110. Variation von Reaktionsbedingungen der Acylierung von *rac*-**130**.

Zusätzlich wurde der Verlust des Aminoindans (*rac*-**130**) während der Aufarbeitung ermittelt. Dabei wurde nach 15 Minuten Rühren bei 550 mbar und 40 °C nur ein Verlust von 3% ermittelt, was noch im akzeptablen Bereich liegt.

Die gezeigten Acylierungsreaktionen sind über einen längeren Zeitraum mit unterschiedlichen Chargen des Amins *rac*-**130** durchgeführt worden. Zwar war ein Farbunterschied von farblos bis gelb sowohl zwischen den Chargen als auch während der Lagerung zu erkennen, jedoch sind in allen aufgenommenen ¹H-NMR-Spektren die gleichen Peaks von Verunreinigungen mit <1 – 3% vorhanden. Somit kann eine Zersetzung des Eduktes *rac*-**130** ausgeschlossen werden.

Insgesamt lässt sich folgern, dass bei der enzymatischen Racematspaltung des Aminoindans (*rac*-**130**) die Verwendung eines leichten Überschusses des Acyldonors **9** zu einem vollständigen Umsatz und sehr guten 91% ee (E = 61) führt. Dieses scheint zunächst nachteilig zu sein, allerdings kann der Malonester **9** bei größeren Reaktionsansätzen destillativ vom Rohprodukt abgetrennt und in weiteren Racematspaltungen eingesetzt werden.

4.3.9.2 Sekundäre Amine

Enantiomerenreine Amine sind wichtige Bausteine für pharmazeutische Wirkstoffe und Agrochemikalien. Es sind jedoch nur wenige Methoden zur Racematspaltung sekundärer Amine bekannt. Der Stand der Wissenschaft ist dabei auf Chromatographie mit chiralen stationären Phasen oder klassische Racematspaltung durch Bildung von Diastereomerenpaaren beschränkt. Sekundäre Amine reagieren aufgrund ihrer starken Nucleophilie mit den Acyldonoren unter Standard-Reaktionsbedingungen, wie niedrige Temperaturen und Konzentrationen, meist nicht. Die Schwierigkeit bei der Acylierung cyclischer sekundärer Amine liegt wahrscheinlich in der großen Anzahl an potentiellen Übergangszuständen sowie an den möglichen Konformationen, die energetische sehr ähnlich sind.^[268] Bei der Racematspaltung finden dabei klassisch Lipasen aus *Candida rugosa*^[239] sowie die CAL-A aus *Candida antarctica*^[28,269] Anwendung.

In dieser Arbeit sollten zunächst die Referenzverbindungen der ausgehend von 2- bzw. 3-Methylpiperidin (**149** bzw. **150**) synthetisiert werden, um eine Methode für die HPLC zu finden. Im Anschluss daran sollte die enzymatische Acylierung mit Malonsäurediethylester (**9**) untersucht werden.

Die chemische Acylierung erfolgt im Fall der sekundären Amine **149** und **150** mit dem Acyldonor Malonsäurediethylester (**9**) unter Erhitzen zum Rückfluss für 3 Stunden (Abbildung 111).^[253] Die Amide *rac*-**151** und *rac*-**152** wurde mit Umsätzen von 56% bzw. 63% erhalten. Die isolierten Ausbeuten betragen dabei 41% für *rac*-**151** und 42% für *rac*-**152**, was für die Analytik jedoch ausreichend war.

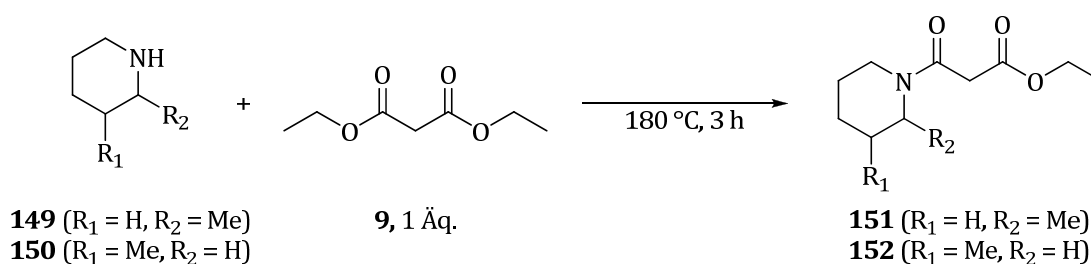


Abbildung 111. Synthese der Racemate *rac*-**151** und *rac*-**152** als Referenzverbindungen.^[253]

Anschließend konnte für die Amide eine geeignete Methode für die HPLC etabliert werden. In Abbildung 112 ist ein charakteristisches HPLC-Chromatogramm am Beispiel von *rac*-**152** dargestellt. Der ee-Wert des Racemates *rac*-**144** beträgt <0.2%.

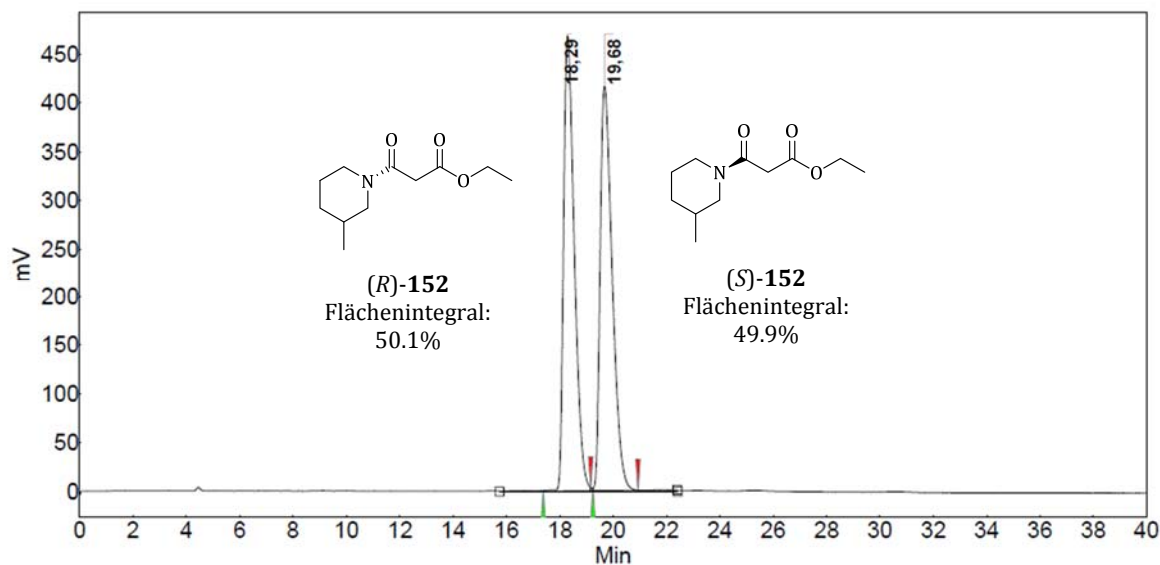


Abbildung 112. HPLC-Chromatogramm des racemischen Amids *rac*-**152** (gemessen an AD-H-Säule mit *n*-Heptan/*i*-PrOH (95/5 (v/v)), flow: 0.8 mL/min, Retentionszeiten: $t_{\text{R}} = 18.29$ min (*R*), 19.68 min (*S*), *ee*-Wert: 0%).

Durch Rühren bei vermindertem Druck konnte der Verlust der sekundären Amine **149** und **150** ermittelt werden (Abbildung 113).

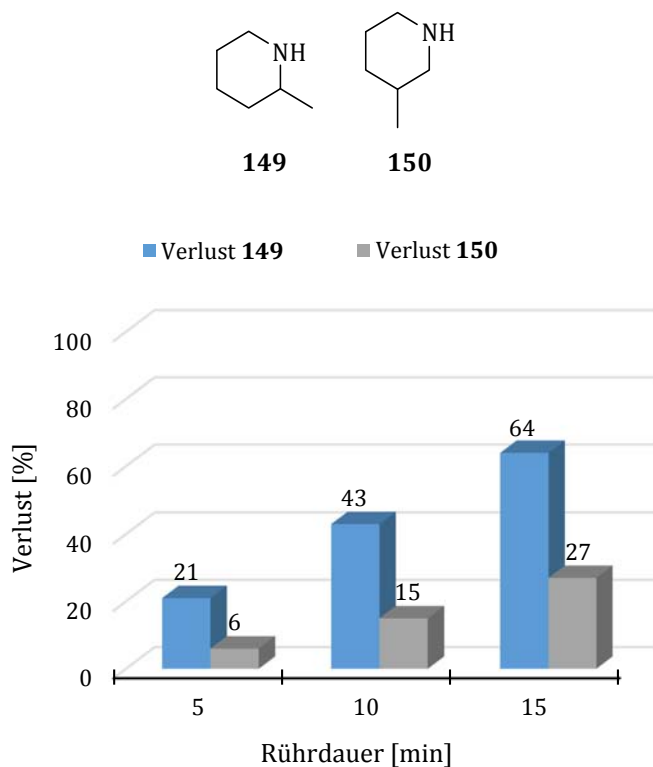


Abbildung 113. Verlust der sekundären Amine **149** und **150**.

So wird mit kontinuierlicher Rührdauer ein größerer Verlust der Komponenten beobachtet. Nach 15 Minuten wird bei dem Amin **149** ein Verlust von 64% und bei **150** von 27% bestimmt. Infolgedessen sollte während der Reaktionsführung besonders bei höheren Temperaturen auf ein dicht ver-

schlossenes Reaktionssystem geachtet werden. Die Bestimmung des Umsatzes sollte aufgrund der Flüchtigkeit der Amine **149** und **150** in Bezug auf den jeweiligen Acyldonor geschehen.

Im Anschluss an die chemische Acylierung der sekundären Amine **149** und **150** wurden die enzymatische Racematspaltung mit Malonsäurediethylester (**9**) als Acyldonor unter Standardbedingungen, abweichend davon jedoch mit 24 Stunden Reaktionsdauer, durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 114 graphisch dargestellt.

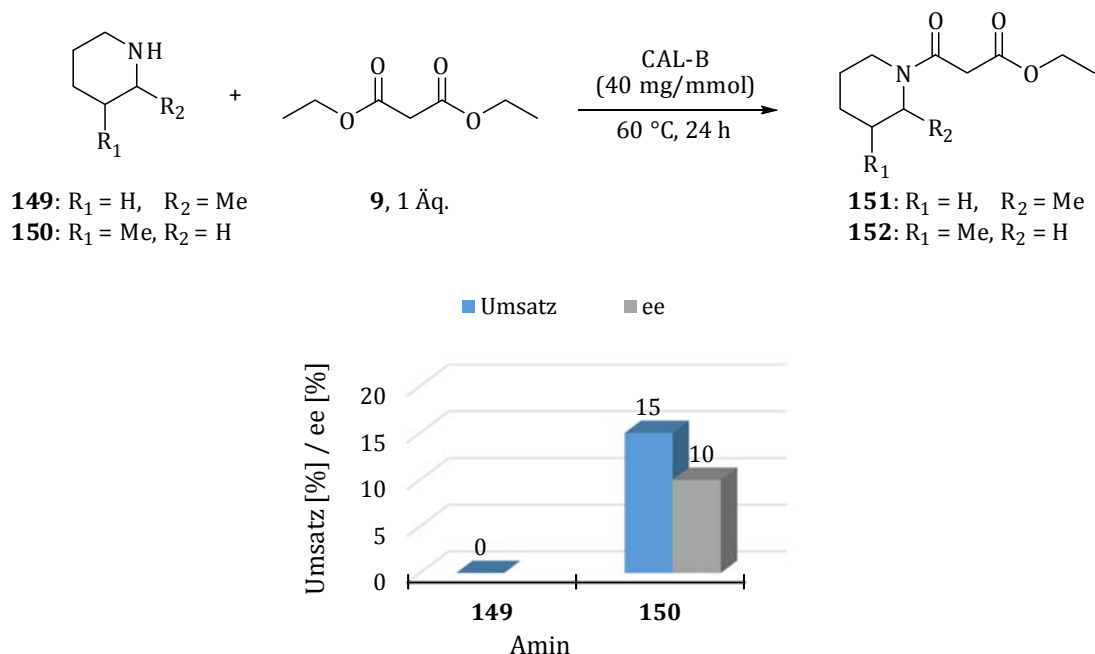


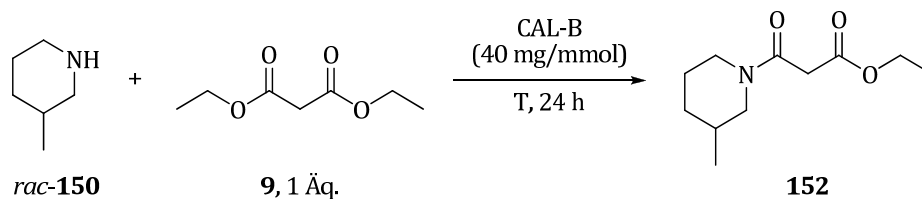
Abbildung 114. Enzymatische Acylierung der sekundären Amine **149** und **150**.

Die Acylierung des Amins *rac*-**149** mit Malonsäurediethylester (**9**) gelang unter den hier gewählten Bedingungen nicht. Sterische Gründe könnten in diesem Fall eine wichtige Rolle spielen, da das in 2-Position methylierte Amin **149** einen schlechten Zugang zu der Amino-Funktion bietet. Mit dem Amin *rac*-**150** konnten 15% Umsatz zum Amid **152** erreicht werden. Der ermittelte ee-Wert betrug nur 10%, was einer Enantioselektivität von 1 entspricht.

Im Anschluss an die Acylierungsreaktionen unter Standard-Reaktionsbedingungen sollten Versuche zur Optimierung der enzymatischen Acylierung von 3-Methylpiperidin (*rac*-**150**) in Hinblick auf Umsatz bzw. Enantioselektivität durchgeführt werden. Dabei wurden die Reaktionstemperatur sowie die Enzymmenge und die Zugabe von MTBE als Lösungsmittel variiert (Tabelle 16). So konnte mit sinkender Temperatur ein Anstieg des Umsatzes von 5% bei 80 °C auf 19% bei 40 °C festgestellt werden. Die Verlängerung der Reaktionsdauer auf 48 Stunden führte nur zu einem leichten Anstieg des Umsatzes auf 22% (Eintrag 6). Die Enantiomerenüberschüsse liegen dabei in allen Fällen bei 10%, was einer Enantioselektivität von <2 entspricht. Die Zugabe von MTBE zur Reaktionsmischung bei 60 °C (Eintrag 3) führte zu einer Verdopplung des Umsatzes auf 34%, jedoch kaum zu einer Erhöhung des ee-Wertes. Die zusätzliche Erhöhung der Enzymmenge auf 80 mg/mmol lieferte das Amid **152** in 75% Umsatz, aber auch in diesem Fall lag der ee-Wert nur bei 18%. Zwar gelingt eine Racematspaltung von *rac*-**150** mit der Lipase CAL-B nicht, jedoch kann auch in diesem Fall die Lipase als Biokatalysator für

die Darstellung des racemischen Amids *rac*-**152** dienen, da hierbei auf das Erhitzen zum Rückfluss verzichtet werden kann.

Tabelle 16. Prozessoptimierung der enzymatischen Racematspaltung von *rac*-**150**.

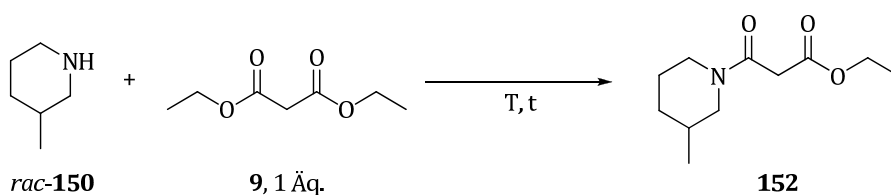


Eintrag	MTBE [mL]	T [°C]	Umsatz [%]	ee [%]	E
1	-	80	5	10	<2
2	-	60	15	10	1
3	0.1	60	34	13	<2
4 a)	0.1	60	75	18	2
5	-	40	19	11	<2
6 b)	-	40	22	10	<2

a) CAL-B: 80 mg/mmol, b) Reaktionsdauer: 48 h.

Zusätzlich zum Versuch der Prozessoptimierung wurde die parallel ablaufende chemische Acylierung des sekundären Amins **150** bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen untersucht (Tabelle 17). Dabei konnte bei allen Temperaturen die Bildung des Amids *rac*-**152** mit bis zu 9% Umsatz bei 60 °C und 24 Stunden Reaktionszeit beobachtet werden. Die ee-Werte betragen erwartungsgemäß <1%. Dieses Ergebnis weicht von der chemischen Acylierung mit *rac*-**4** als Amin ab (vergl. Abschnitt 4.3.4.1.1), bei der kein Umsatz zum entsprechenden Amid erhalten wurde. Dieses wird mit der stärkeren Nucleophilie des sekundären Amins *rac*-**150** begründet.

Tabelle 17. Parallel ablaufende chemische Acylierung von *rac*-**150**.



Eintrag	T [°C]	t [h]	Umsatz [%]	ee [%]	E
1	80	24	5	n.b.	n.b.
2	60	24	9	0	0
3	40	48	6	<1	1

n.b. = nicht bestimmt.

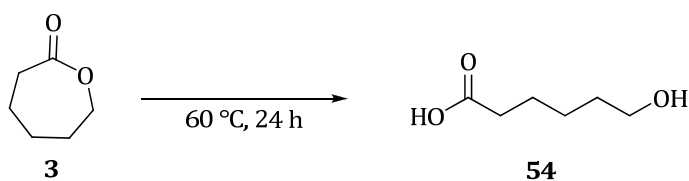
4.3.10 ϵ -Caprolacton (**3**) als Acyldonor

4.3.10.1 Chemische Acylierung mit ϵ -Caprolacton (**3**)

In dem ersten Teil dieser Arbeit (vergl. Abschnitt 3.3) wurde die enzymatische Herstellung von ϵ -Caprolacton (**3**) beschrieben. Im Folgenden wurde nun die Fähigkeit des Lactons **3** zur Racematspaltung von Aminen wie 1-Phenylethylamin (*rac*-**4**) näher untersucht. Dafür wurden die Referenzverbindungen chemisch hergestellt sowie die Stabilität des Lactons **3** ermittelt. Im Anschluss wurde die enzymatische Acylierung der Amine durchgeführt und der Temperatureffekt untersucht.

Als Vorbereitung der Acylierungsreaktionen wurde zunächst die Stabilität von ϵ -Caprolacton (**3**) untersucht. Dazu wurde das Lacton **3** in An- und Abwesenheit der CAL-B bei 60 °C für 24 Stunden gerührt (Tabelle 18). Im Fall der CAL-B erfolgt zusätzlich eine Aufarbeitung nach AAV 6. Die Ansätze wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht.

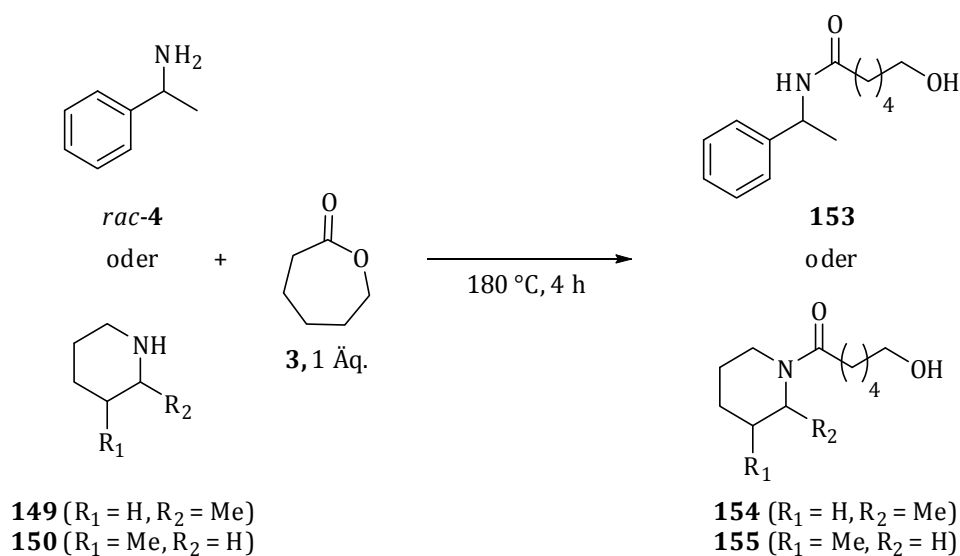
Tabelle 18. Bestimmung der Stabilität von ϵ -Caprolacton (**3**).



Eintrag	Bedingungen	Verhältnis 3 / 146
1	Rühren ohne CAL-B	100 : 0
2	Rühren mit CAL-B und Aufarbeitung nach AAV 6	1 : 77

So wird nach 24 Stunden Rühren in Abwesenheit der Lipase nur das reine Lacton **3** im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum erhalten. In Anwesenheit der CAL-B mit anschließender Aufarbeitung mittels Filtration und Spülen mit organischen Lösungsmitteln werden jedoch nur noch Spuren des Lactons **3** gefunden. Den größten Anteil der Mischung macht die entsprechende Hydroxysäure **54** aus, die durch die Spaltung des Lactons **3** gebildet wird. Für die Spaltung des Lactons **3** kann die bereits in Spuren vorhandene Säure **54** und zum anderen die Lipase selbst verantwortlich sein. Für die Reaktionsführung ist dieses jedoch nicht von Nachteil, da in der Literatur Carbonsäuren bereits mehrfach erfolgreich als Acyldonoren eingesetzt worden sind.^[250,251]

Die chemische Acylierung des Amins *rac*-**4** mit dem Acyldonor ϵ -Caprolacton (**3**) erfolgt unter Erhitzen zum Rückfluss für 4 Stunden (Tabelle 19, Eintrag 1).^[253] Das Amid *rac*-**147** wurde dabei mit 62% Umsatz erhalten, was für die Analytik jedoch ausreichend war. Zusätzlich wurden auf gleichem Wege Acylierungsreaktionen der sekundären Amine **142** und **143** durchgeführt (Eintrag 2 und 3). Die entsprechenden Amide konnten dabei nur mit geringen Umsätzen von 7 bzw. 17% erhalten werden.

Tabelle 19. Chemische Acylierungsreaktionen mit ϵ -Caprolacton (**3**).^[253]

Eintrag	Amin	Umsatz [%]
1	<i>rac</i> -4	62
2	149	7
3	150	17

Anschließend konnte für das Amid *rac*-**153** eine geeignete Methode für die HPLC gefunden werden (Abbildung 115). Das Amid **153** wurde als Racemat mit 0% ee erhalten. Die Etablierung einer HPLC-Methode für die Amide **154** und **155** gelang nicht aufgrund der geringen Substanzmenge nicht.

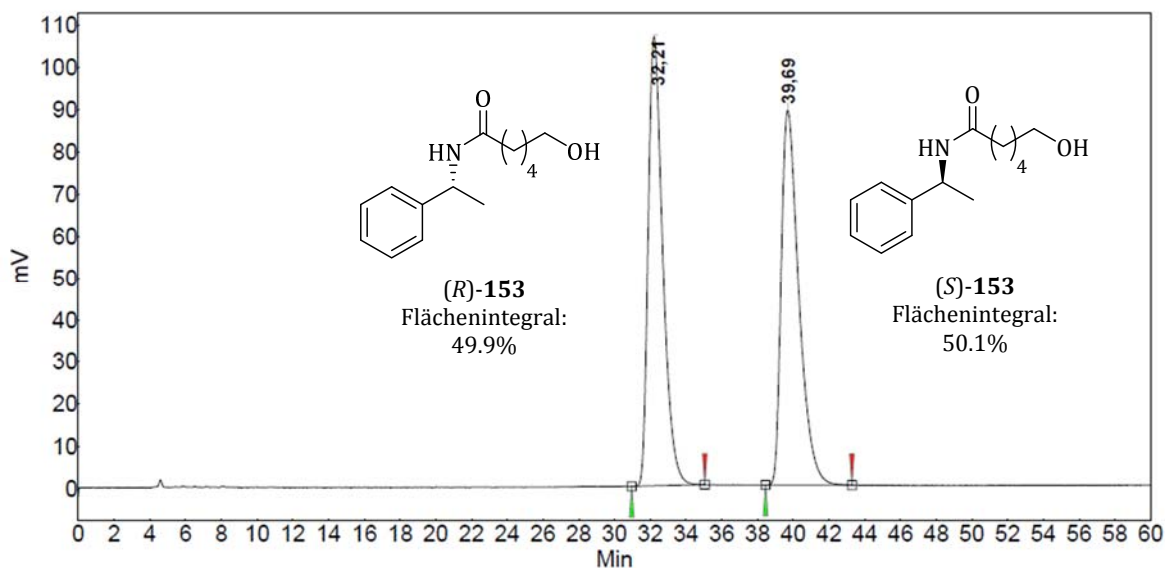


Abbildung 115. HPLC-Chromatogramm von *rac*-**153** (gemessen an AD-H-Säule mit *n*-Heptan/*i*-PrOH (95/5 (v/v)), flow: 0.8 mL/min, Retentionszeiten: $t_R = 32.21$ min (R), 39.69 min (S), ee-Wert: 0%).

4.3.10.2 Enzymatische Acylierung von Benzylamin (**134**) mit ϵ -Caprolacton (**3**)

Im Anschluss an die Bestimmung der Stabilität des Lactons **3** sollte zunächst dessen Aktivität untersucht werden, bevor Versuche zur Selektivität durchgeführt werden. Dafür wurde dieses zunächst mit Benzylamin (**134**) als Model-Substrat unter Standardbedingungen enzymatisch umgesetzt (Abbildung 116). Da es sich bei dem Amin **134** nicht um eine racemische Verbindung handelt ist hier von einem vollständigen Umsatz auszugehen. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnte allerdings nur ein Umsatz von 46% bezogen auf das Amin **130** nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall ist etwa ein Drittel des Lactons **3** zur Säure **54** gespalten worden. Wird der Umsatz zum Amid **156** auf die Summe der Integrale des Lactons **3** und der Säure **54** bezogen, so ergibt sich ein Umsatz von 44%. Während der Reaktionsführung und der Aufarbeitung tritt demnach kein Verlust der Komponenten auf.

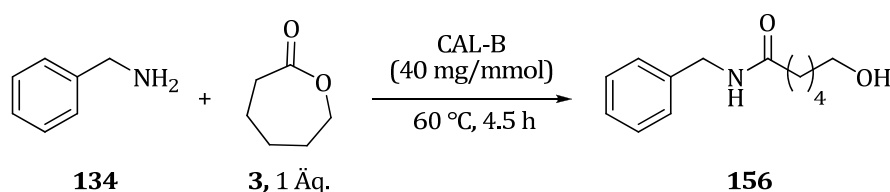
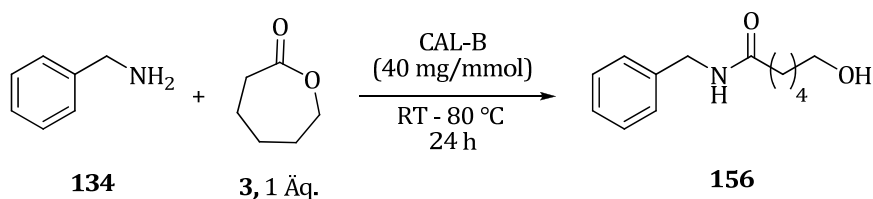


Abbildung 116. Enzymatische Acylierung von Benzylamin (**130**) mit ϵ -Caprolacton (**3**).

Durch Variation der Temperatur sollte die enzymatische Acylierung in Hinblick auf eine mögliche Umsatzsteigerung untersucht werden (Tabelle 20). So wurden bei 80 °C Reaktionstemperatur 51% Umsatz zum Amid **156** erreicht. Durch Zugabe von MTBE als organisches Lösungsmittel bei 80 °C konnte eine Umsatzsteigerung auf 65% erzielt werden. Erfreulicherweise konnten bereits bei 20 °C Reaktionstemperatur nach 4.5 Stunden 57% Umsatz erhalten werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Erhöhung der Temperatur auf 80 °C keinen positiven Einfluss auf die enzymatische Acylierung des Benzylamins **134** hat.

Tabelle 20. Prozessoptimierung der enzymatischen Racematspaltung von Benzylamin (**134**) mit ϵ -Caprolacton (**3**).

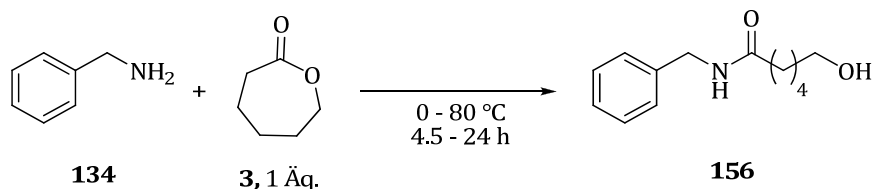


Eintrag	MTBE [mL]	T [°C]	t [h]	Umsatz [%]
1	-	80	4.5	51
2	0.5	80	4.5	65
3	-	RT	4.5	57

Die parallel ablaufende chemische Acylierung des Amins **134** mit dem Lacton **3** wurde bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht (Tabelle 21). Bei 80 °C Reaktionstemperatur können in Abwesenheit der Lipase noch 30% Umsatz zum Amid erzielt werden. Mit sinkender Temperatur sinkt der

Umsatz, bis schließlich bei 0 °C nur noch 3% Amid **156** gebildet werden. Durch Verlängerung der Reaktionszeit auf 24 Stunden bei 20 °C (Eintrag 4) werden noch 53% Umsatz erhalten.

Tabelle 21. Parallel ablaufende chemische Acylierung von Benzylamin (**134**) mit ϵ -Caprolacton (**3**).



Eintrag	T [°C]	t [h]	Umsatz [%]
1	80	4.5	30
2 a)	60	4.5	69
3	RT	4.5	12
4	RT	24	53
5	0	4.5	3

a) Verwendung einer alten Charge an ϵ -Caprolacton (**3**).

Durch Verwendung einer älteren Charge des Lactons **3** (Eintrag 2), in der laut $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bereits 17% des Lactons **3** während der Lagerung zur entsprechenden Säure **54** gespalten worden sind, konnten bei 60 °C und 4.5 Stunden Reaktionszeit 69% Umsatz zum Amid **156** erhalten werden. Carbonsäuren werden selten als Acyldonoren verwendet, da eine reversible Salzbildung mit dem Amin stattfindet.^[250] Dieses unreaktive Salz ist nicht mehr für die Bildung des Acyl-Enzym-Komplexes vorhanden. Somit steht nur ein Teil der Säure als Acyldonor zur Verfügung, was zu einer verringerten Reaktionsgeschwindigkeit führt. Unaktivitierte Carbonsäuren benötigen folglich ein Kupplungsreagenz zur Aktivierung und häufig drastische Reaktionsbedingungen, um mit einem Amin eine Amid-Bindung zu bilden und die Bildung des entsprechenden Salzes zu vermeiden.^[270] Die Wahrscheinlichkeit einer Acylierungsreaktions durch die Säure **54** als Acyldonor ist unter den verwendeten Reaktionsbedingungen demnach sehr gering. Durch die Wahl einer möglichst kurzen Reaktionsdauer und niedriger Temperatur kann die unkatalysierte Acylierung des Amins **134** somit unterdrückt werden. Das cyclische Lacton **3** ist, eventuell durch die Ringspannung, sehr stark aktiviert, sodass bei den folgenden Acylierungen des racemischen Amins *rac*-**4** auf eine Vermeidung der chemischen Acylierung geachtet wurde.

4.3.10.3 Enzymatische Acylierung von 1-Phenylethylamin (*rac*-**4**) mit ϵ -Caprolacton (**3**)

Zunächst wurde die Möglichkeit einer parallel zu der enzymatischen ablaufende chemische Acylierung des Amins *rac*-**4** mit dem Lacton **3** untersucht. Dazu wurden die beiden Komponenten bei unterschiedlichen Temperaturen für 4.5 Stunden in Abwesenheit der Lipase gerührt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 117 graphisch dargestellt. So kann bei 80 °C noch ein Umsatz zum Amid **157** von 10% erzielt werden. Mit sinkender Temperatur nimmt auch der Umsatz ab, bis bei 0 °C kein Amid **157** mehr im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum detektiert werden kann.

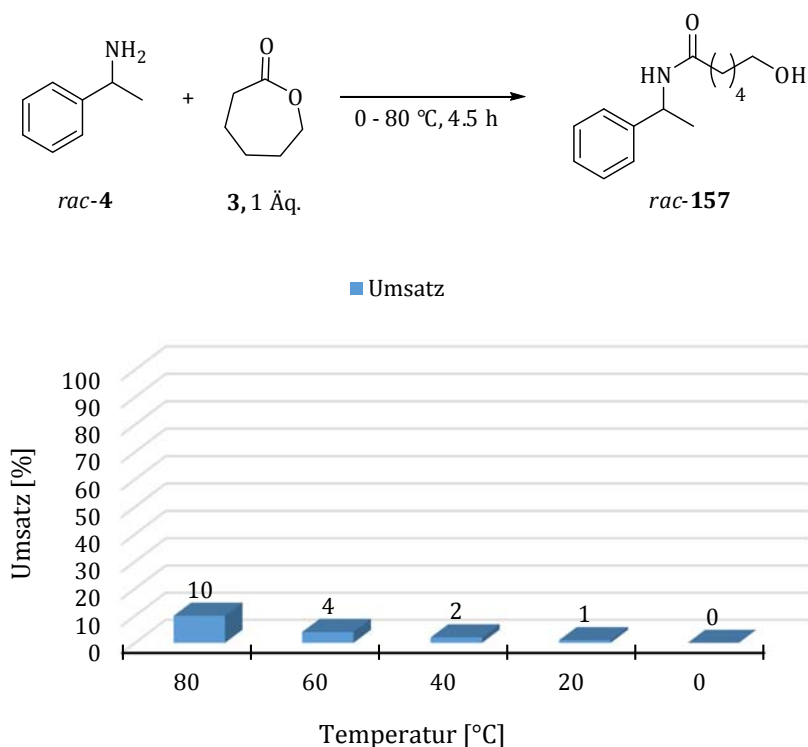


Abbildung 117. Parallel ablaufende chemische Acylierung von *rac*-4 mit ϵ -Caprolacton (3).

Die enzymatische Acylierung von *rac*-4 mit ϵ -Caprolacton (3) als Acyldonor wurde im Anschluss bei unterschiedlichen Temperaturen und Reaktionszeiten untersucht (Abbildung 118). Mit sinkender Temperatur nimmt der Umsatz bei 4.5 Stunden Reaktionsdauer ab. So wird bei 80 °C ein Umsatz von 49% erzielt, während bei 20 °C noch 26% Umsatz zum Amid 157 erhalten wird. Zusätzlich wurde der Effekt der Verlängerung der Reaktionsdauer bei 60 °C untersucht. Dabei wurde mit andauernder Reaktionszeit eine leichte Steigerung des Umsatzes von 41% bei 4.5 Stunden auf 45% bei acht Stunden beobachtet. Die ee-Werte aller Acylierungsreaktionen zum Amid *rac*-157 betragen hierbei 0%. Des Weiteren können bei einem enzymatischen Ansatz bis zu 10% des entstandenen Amids 157 bei 80 °C Reaktionstemperatur und bis zu 4% bei 60 °C parallel auf chemischem Wege mit 0% ee gebildet werden. Dieses bedeutet, dass die Lipase das Lacton 3 nicht spezifisch umsetzen kann und eine Racematspaltung des Amins *rac*-4 durch das Lacton 3 demnach nicht möglich ist. Die Darstellung des Amids *rac*-157 sollte hierbei jedoch mit vollständigem Umsatz ablaufen, da die für die Racematspaltung typische Grenze von maximal 50% Umsatz im Fall des Lactons 3 als Acyldonor nicht relevant ist. Das Lacton 3 eignet sich allerdings sehr gut zur Synthese von Amiden. Diese Art der Acylierung kann eventuell als Starter-Reaktion für die Polymerisation des Lactons 3 zu Polycaprolacton (PCL) dienen.^[271]

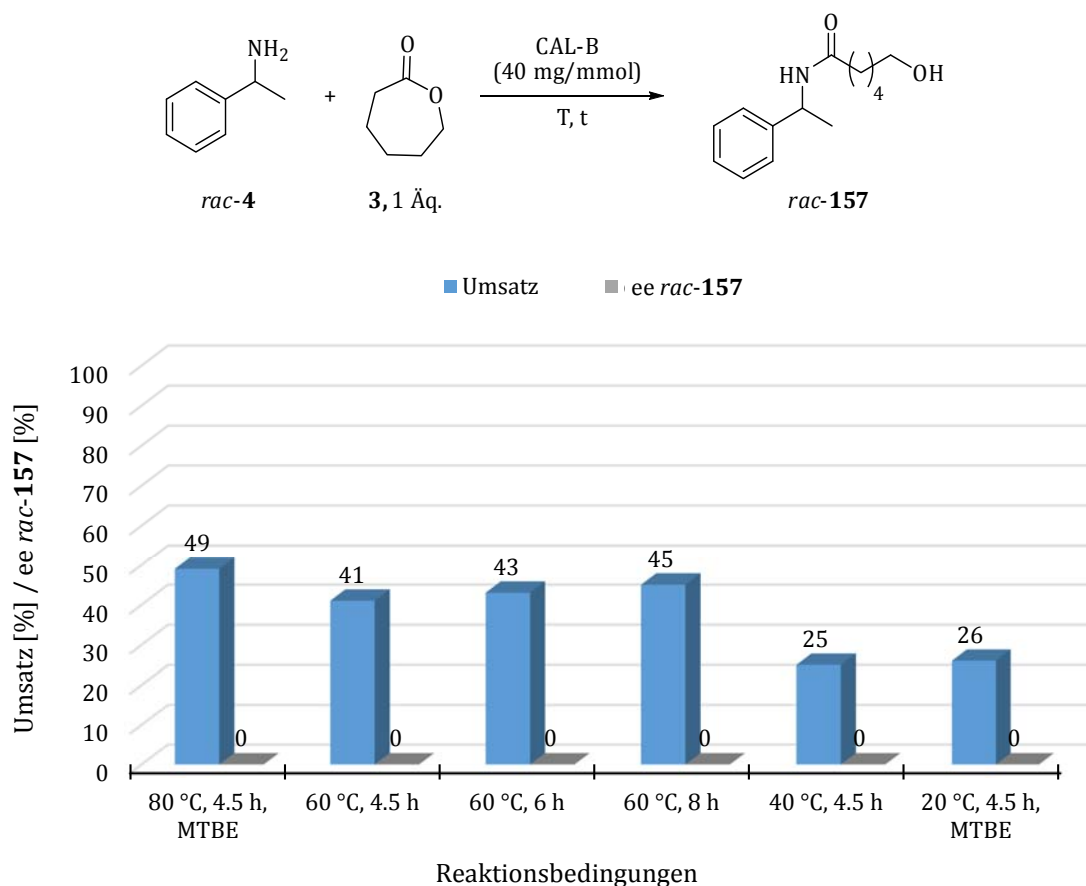


Abbildung 118. Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Racematspaltung von *rac*-4 mit ϵ -Caprolacton **3**.

Im Anschluss wurde die Reaktionskinetik der enzymatischen Acylierung von *rac*-4 mit ϵ -Caprolacton (**3**) untersucht. Dafür wurden die Acylierungen unter Standard-Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 119 graphisch dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Reaktion zu Beginn mit einer relativ niedrigen Geschwindigkeit startet, da nach zwei Stunden erst 20% Umsatz erreicht worden sind. Danach verläuft die Acylierung nahezu linear, bis nach 24 Stunden 65% Umsatz zum Amid **157** erhalten werden. Die ee-Werte dieser Acylierungsreaktionen betragen in allen Fällen 0%, was in Analogie zu den Ergebnissen in den Abschnitten 4.3.10.3 steht. Da die Reaktion nur zum racemischen Produkt **157** führt, sollte hierbei mit längerer Reaktionsdauer allerdings ein vollständiger Umsatz erzielt werden.

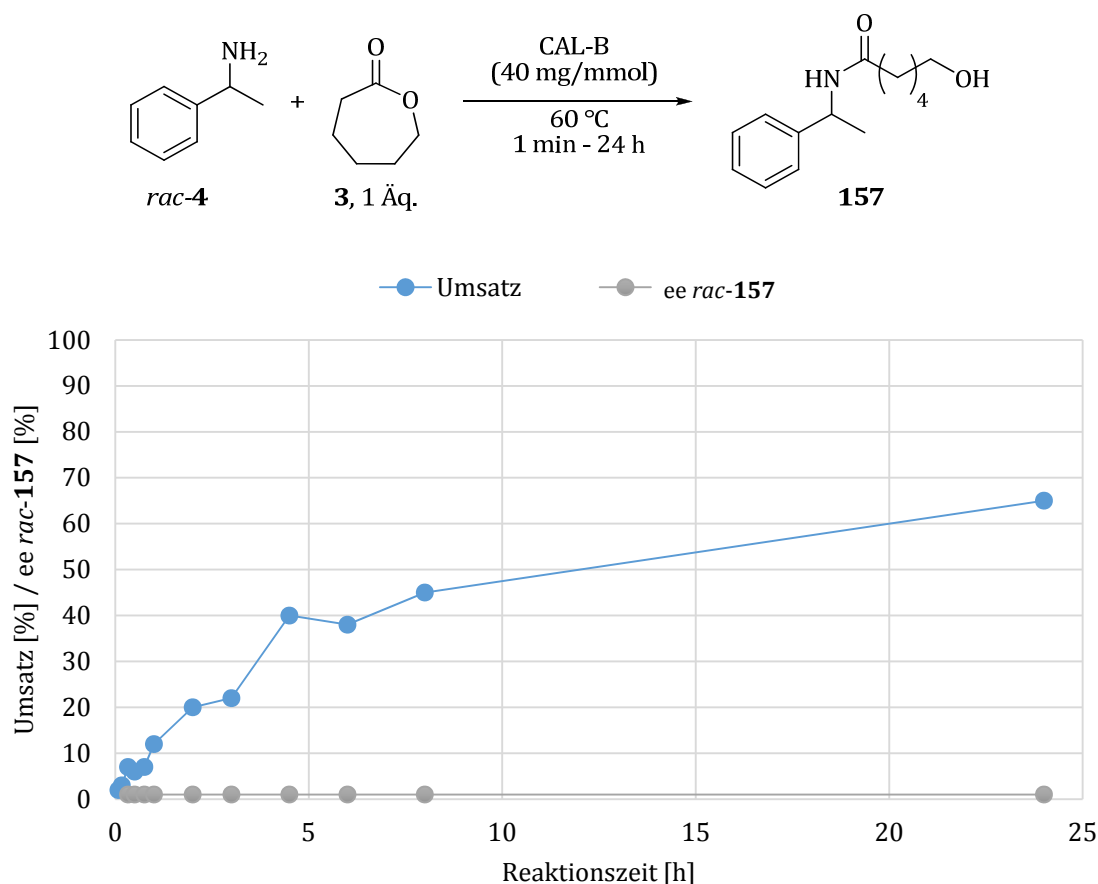


Abbildung 119. Reaktionskinetik der enzymatischen Acylierung von *rac*-4 mit dem Lacton 3.

Zwar gelingt mit ϵ -Caprolacton (3) als Acyldonor keine Racematspaltung des Amins *rac*-4, jedoch beschleunigt die Anwesenheit der CAL-B die Acylierungsreaktion bei 60 °C und 4,5 Stunden Reaktionsdauer um das zehnfache. So werden ohne CAL-B 4% Umsatz zum Racemat 157 erhalten (vgl. Abbildung 118), während in Anwesenheit des Biokatalysators 41% Umsatz erzielt werden können. Da keine Nebenprodukte gebildet werden, erfolgt die Aufreinigung durch Abtrennen der nicht-umgesetzten Edukte. Die Synthese von racemischen Amiden kann somit mittels Enzymkatalyse bereits bei niedrigen Temperaturen ohne weitere Zugabe von Zusätzen erfolgen. Wird beispielsweise eine Carbonsäure als Acyldonor eingesetzt, so ist die Zugabe von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) als Kondensationsprodukt bei hohen Temperaturen notwendig (Abbildung 120). Bei der Verwendung von Estern als Acyldonoren ist, wie im Abschnitt 7.2.2.1 beschrieben, das Erhitzen zum Rückfluss erforderlich.

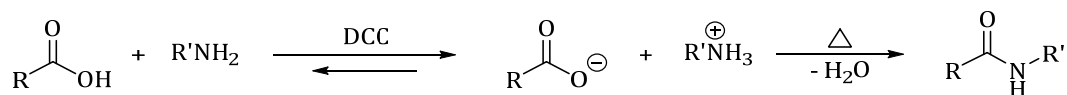


Abbildung 120. Chemische Amidbildung mit DCC.

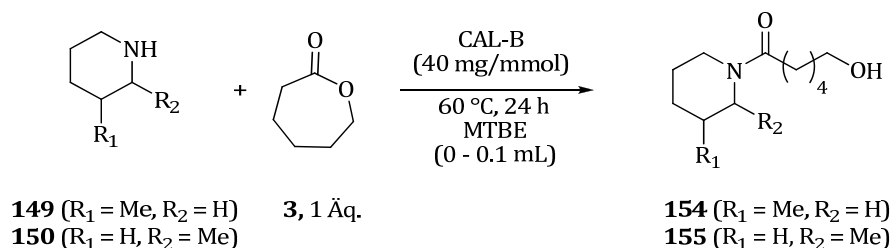
Die Bildung eines Amids mit ϵ -Caprolacton (3) als Acyldonor mittels Lipasen-Katalyse kann als Initiationsreaktion für die Polymerisation zum Polycaprolacton (PCL) dienen, was in der Literatur bereits mit anderen Lipasen beschrieben wurde. Im Anschluss an den Kettenstart findet dann das

Kettenwachstum durch ringöffnende Polymerisation statt, was ebenfalls durch die Lipase katalysiert werden kann.^[271]

4.3.10.4 Enzymatische Acylierung von sekundären Aminen mit ϵ -Caprolacton (3)

Im Anschluss an die chemische Darstellung der Amide **154** bzw. **155** wurden die entsprechenden sekundären Amine **149** und **150** enzymatisch unter Standard-Reaktionsbedingungen umgesetzt (Tabelle 22). So konnte mit beiden Aminen nur 9% Umsatz zu den jeweiligen Amiden **154** und **155** erzielt werden. Die Acylierungsreaktionen der sekundären Amine **149** und **150** liefern unter lösungsmittelfreien Bedingungen somit ungenügende Umsätze von 7 bzw. 9%. Durch Zugabe von MTBE zu dem Reaktionsgemisch (Eintrag 3) zur besseren Durchmischung der Komponenten konnte eine Steigerung des Umsatzes auf 18% erreicht werden. Die enzymatische Acylierung der in 2-Position substituiertes sekundärer Amine gelingt demnach nicht.

Tabelle 22. Enzymatische Acylierung der sekundären Amine **149** und **150** mit ϵ -Caprolacton (**3**).



Eintrag	Amin	MTBE [mL]	Umsatz [%]
1	149	-	7
2	150	-	9
3	150	0.1	18

5 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, effiziente und nachhaltige Syntheserouten von ϵ -Caprolacton (**3**) und chiralen Aminen zu etablieren. Innerhalb dieser Arbeit konnte zum einen die enzymatische Doppeloxidation von Cyclohexanol (**1**) zum Lacton **3** unter Verwendung der CHMO aus *Acinetobacter calcoaceticus* sowie die Lk-ADH aus *Lactobacillus kefir* erfolgreich durchgeführt werden. Die Synthese wurde in Bezug auf ihre Effizienz optimiert. Zum anderen stand besonders die enzymatische Racematspaltung von chiralen Aminen durch die Verwendung von Lipase B aus *Candida antarctica* (CAL-B) in einem lösungsmittelfreien System im Fokus der Untersuchungen.

5.1 Enzymatische Oxidation von Cyclohexanol (**1**) mittels CHMO

Die zweistufige biokatalytische Oxidation von Cyclohexanol (**1**) zu ϵ -Caprolacton (**3**) mittels ADH aus *Lactobacillus kefir* sowie einer Cyclohexanon-Monooxygenase aus *Acinetobacter calcoaceticus* über das *in situ*-gebildete Cyclohexanon (**2**) als Zwischenstufe wurde eingehend untersucht.

Einleitend wurden zwei Methoden zur zuverlässigen Umsatzbestimmung etabliert, die Verwendung von Urotropin (**51**) als externer Standard für $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie sowie die Analytik mittels erstellter Eichgerade durch Gaschromatographie. Beim Vergleich der beiden Methoden hat sich gezeigt, dass die GC-Methode höhere Umsätze und geringere Schwankungsbreiten liefert, da diese Methode besonders bei geringen Konzentrationen sensibler reagiert und der Schritt des Entfernens des Lösungsmittels entfällt. Aus diesem Gründen war die Analytik mittels GC die Methode der Wahl.

Anschließend wurden die Rückgewinnungsraten der einzelnen Substanzen bestimmt. Diese sind sowohl von der eingesetzten Enzymmenge als auch von der Zentrifugierzeit während der Aufarbeitung abhängig. Bei steigender Konzentration des Substrats Cyclohexanol (**1**) wurde ein Anstieg der Rückgewinnungsrate von 71 – 80% auf 90 – 97% beobachtet. Zusätzlich konnte die zuvor im Arbeitskreis verwendete Extraktionsmethode mittels EPPENDORF-Gefäßen optimiert und dadurch der Verlust der Substanzen verringert werden.

Zunächst wurde die spezifische Aktivität der hier verwendeten CHMO bezüglich Cyclohexanon (**2**) als Substrat bestimmt und mit weiteren BVMOs, ECS Mo-03 und ECS Mo-05 von ENZYMICALS AG, verglichen. Dazu wurden zum einen die volumetrischen Aktivitäten mittels Photometertest bestimmt und zum anderen BRADFORD-Tests durchgeführt, um den jeweiligen Proteingehalt der Enzyme zu ermitteln. Dadurch konnten die spezifischen Aktivitäten der drei Monooxygenasen berechnet werden. Die spezifische Aktivität der CHMO wurde gleich 100% relative Aktivität gesetzt. Die beiden BVMOs ECS Mo-03 und ECS Mo-05 wiesen spezifische Aktivitäten von 0.2 U/mg bzw. 0.05 U/mg auf. Dieses

entspricht relativen Aktivitäten von 7% bzw. 2%. Folglich sind die beiden Monooxygenasen nicht fähig, Cyclohexanon (**2**) effektiv zu oxidieren.

Des Weiteren wurde die Aktivität der Enzyme gegenüber den Referenz-Substanzen sowie gegenüber weiteren Substraten photometrisch bestimmt. Die CHMO wies bezüglich Cyclohexanon (**2**) eine Aktivität von 0.082 U/mL, was gleich 100% relativer Aktivität gesetzt wurde. Gegenüber dem Substrat Isophoron (**52**) besitzt die CHMO eine relative Aktivität von nur 3%. So konnte bei der biokatalytischen Oxidation von Isophoron (**52**) mit dem D-Glucose (**48-a**)/GDH-Regenerationssystem kein Umsatz festgestellt werden. Unter den in dieser Arbeit gewählten Reaktionsbedingungen ist diese Aktivität nicht ausreichend für eine ökonomisch sinnvolle Oxidation.

Die Aktivität der Lk-ADH wurde gegenüber dem Standard-Substrat 1-Phenylethanol (**47**) bestimmt und gleich 100% relative Aktivität gesetzt. Im Vergleich dazu wurde gegenüber Cyclohexanol (**1**) und 3,3,5-Trimethylcyclohexanol (**53**) eine relative Aktivität von 153% bzw. 0% bestimmt. Während sich Cyclohexanol (**1**) demnach hervorragend als Substrat für die Oxidation durch die Lk-ADH eignet, liefert die enzymatische Doppeloxidation des dreifach methylierten Alkohols **53** unter den Standard-Reaktionsbedingungen kein Lacton **56** oder **57**.

Im Anschluss wurde die Standard-Reaktion in Hinblick auf Produktinhibierung der CHMO optimiert, indem unterschiedliche organische Lösungsmittel in einem Zweiphasensystem getestet wurden. Dabei zeigte sich ein Gemisch aus KP_i -Puffer und 10% Isooctan (v/v) als bestes Lösungsmittel. Dieses lieferte einen sehr guten Umsatz von 87% (Abbildung 121). Allgemein können mit Lösungsmitteln mit höheren logP-Werten auch höhere Umsätze erzielt werden.

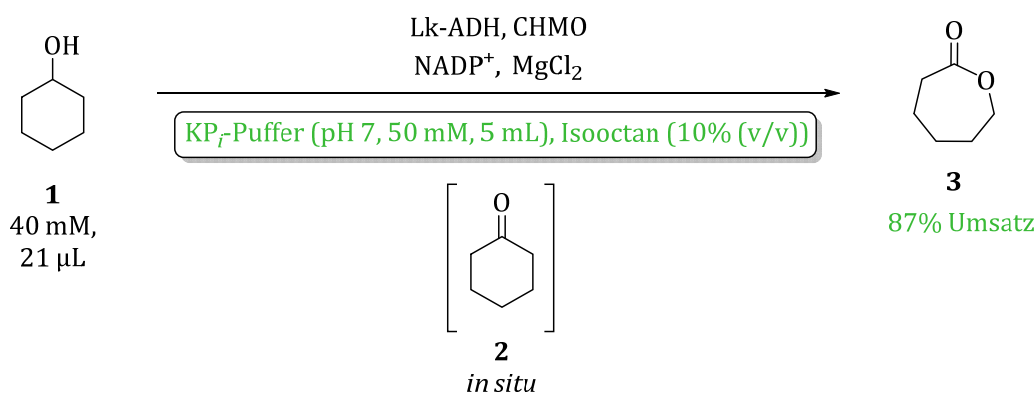


Abbildung 121. Enzymatische Doppeloxidation von Cyclohexanol (**1**) mit 10 % (v/v) Isooctan.

Außerdem wurden sowohl der Einfluss der Mengen der Lk-ADH und des Cofaktors sowie der Reaktionstemperatur untersucht. Bei der Erhöhung der Cofaktormenge von 1 auf 10 mol-% sinkt der Umsatz dabei um ein Drittel. Einen noch stärkeren negativen Einfluss haben die Verringerung der Lk-ADH-Menge von 40 auf 13 U sowie die Erhöhung der Reaktionstemperatur von RT auf 30 °C.

Es konnte nachgewiesen werden, dass selbst bei sehr hohen Produktkonzentrationen von 1 M keine Produktinhibierung der Lk-ADH auftritt. Allerdings wurde mittels Titrimetrie die hydrolytische Spaltung des Lactons **3** zur entsprechenden Säure **54** beobachtet.

Die *in situ*-Produktentfernung mittels Adsorbentharzen gelang mit den für diese Arbeit gewählten Harzen nicht. Auch die Rückgewinnungsrate der Substanzen aus den Harzen durch extraktive Aufarbeitung ist

mit maximal 74% nur mäßig. Eventuell kann durch ein Screening weiterer Harze ein für dieses System effizienteres gefunden werden.

5.2 Enzymatische Racematspaltung chiraler Amine

Als einleitende Versuche zur Racematspaltung wurden enzymatische Acylierungsreaktionen substituierter Benzylamine mit Malonsäurediethylester (**9**) als Standard-Acyldonor in Abwesenheit von organischen Lösungsmitteln durchgeführt (Bildung **122**). Als Biokatalysator fand die immobilisierte Lipase B aus *Candida antarctica* (CAL-B, Handelsname: Novozym 435) Anwendung, die sich in der Literatur als hochselektives Enzym erwiesen hat.^[27-29] Die zuvor in der Literatur^[33-35] verwendeten Benchmark-Bedingungen konnten dabei optimiert werden. So wurde die Reaktionstemperatur von 80 °C auf 60 °C bei 4.5 Stunden Reaktionszeit in lösungsmittelfreier Umgebung gesenkt, ohne Verluste beim Umsatz zu beobachten (Abbildung 122).

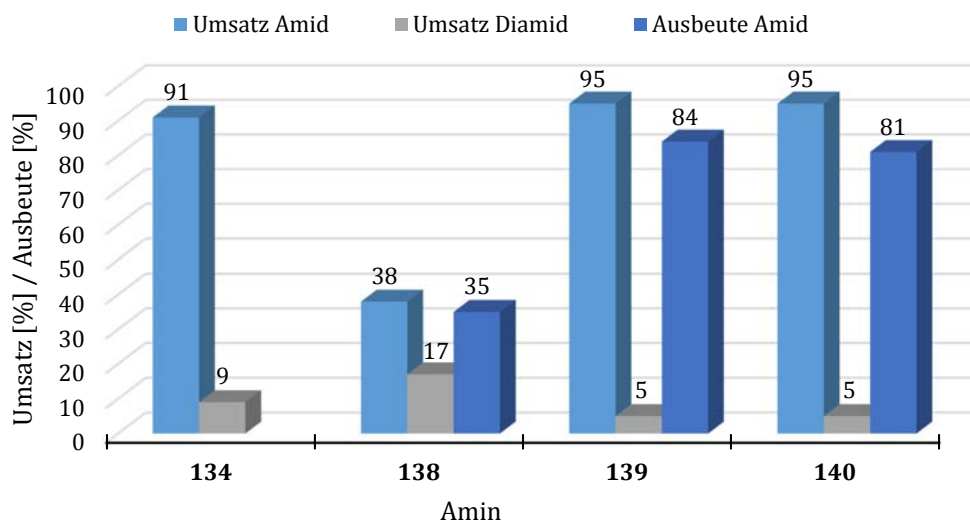
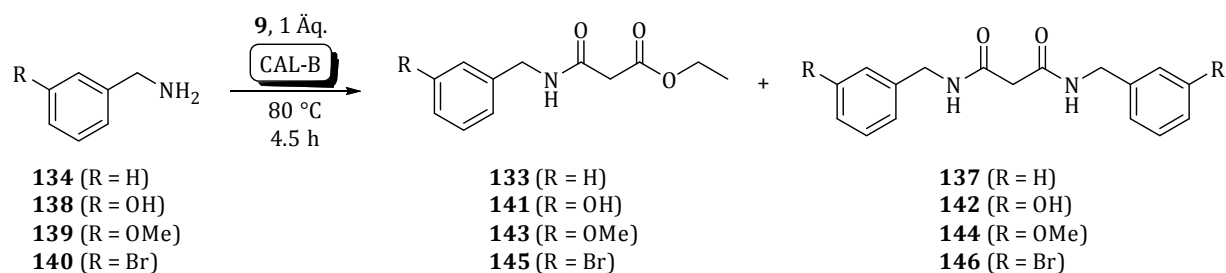


Abbildung 122. Enzymatische Acylierung substituierter Benzylamine.

Diese Reaktionsbedingungen wurden als Standard-Reaktionsbedingungen definiert. Es zeigte sich zudem, dass die Anwesenheit eines elektronenziehenden Substituenten in *meta*-Position einen leichten positiven Einfluss auf den Umsatz hat. Allerdings konnte eine parallel ablaufende chemische Acylierung zum entsprechenden Amid mit bis zu 8% nachgewiesen werden. Die Bildung der Diamide, bestehend

aus Malonsäurediethylester (**9**) und zwei Äquivalenten substituierten Benzylamins, wurde in nahezu allen Fällen nachgewiesen. Durch Einsatz eines leichten Überschusses (1.2 Äquivalente) an Malonester **9** konnte die Bildung ausgehend von Methoxy-Amin **139** nahezu unterdrückt werden. Dabei ist allerdings ein leichter Abfall des Umsatzes von 91% auf 82% zu beobachten. Bei der Verwendung des Hydroxy-substituierten Benzylamins **134** war jedoch aufgrund des hohen Schmelzpunktes der Einsatz von Lösungsmitteln notwendig, um die Homogenität der Mischung zu gewährleisten. Von den untersuchten unterschiedlichen Lösungsmitteln lieferten THF (75% Umsatz bei 80 °C Reaktionstemperatur) und 2-Methyl-THF (70% Umsatz bei 80°C) die besten Ergebnisse.

Die enzymatische Racematspaltung von racemischen Aminen unter lösungsmittelfreien Bedingungen konnte anschließend anhand des Systems aus 1-Phenylethylamin (*rac*-**4**) und Malonsäurediethylester (**9**) zum enantiomerenreinen Amid *rac*-**10** untersucht werden (Abbildung 123). Dabei wurde der Einfluss von Temperatur und Reaktionsdauer sowie der Enzymbeladung untersucht und die Reaktionskinetik unter den optimierten Bedingungen dokumentiert. Das Amid *rac*-**10** konnte dabei mit 42% Umsatz und mit 97% Enantiomerenreinheit erhalten werden, was einer exzellenten Enantioselektivität von >100 entspricht. Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 24 Stunden bei 60 °C Reaktionstemperatur führte zu einem vollständigen Umsatz zum Amid (*R*)-**10** mit 98% ee. Eine parallel ablaufende chemische Acylierung wurde bei *rac*-**4** mit dem Malonester **9** als Acyldonor nicht beobachtet.

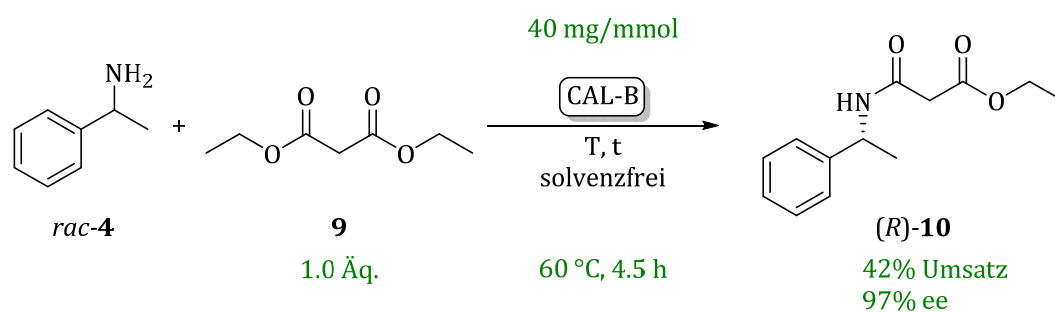


Abbildung 123. Enzymatische Racematspaltung (Benchmark-Reaktion).

Ein Vergleich dieses Verfahrens mit bestehenden industriellen Prozessen^[30,264] zeigte, dass die Racematspaltung des chiralen Amins *rac*-**4** unter den in dieser Arbeit gewählten lösungsmittelfreien Bedingungen Enantioselektivitäten der gleichen Größenordnung liefert. Während das in der Literatur^[30] verwendete Methoxyessigester **111** 52% Umsatz und 95% ee ($E > 100$) lieferte, gelang die Racematspaltung unter den gleichen in der Industrie verwendeten Bedingungen mit Malonester **9** als Donor das Amid (*R*)-**10** mit 48% Umsatz und ebenfalls 95% ee ($E > 100$). Die Racematspaltung unter den im Rahmen dieser Arbeit gewählten Bedingungen lieferte eine Enantioselektivität von >100. Die verwendete größere Enzymmenge und höhere Temperatur wird folglich durch Vermeidung von Lösungsmitteln und viel kürzerer Reaktionszeit ausgeglichen. Der in dieser Arbeit etablierte lösungsmittelfreie Prozess stellt somit eine sehr gute Alternative zu bestehenden Verfahren dar.

Bei den anschließend durchgeführten Recyclingversuchen der Racematspaltung von *rac*-**4** mit Malonester **9** durch die immobilisierten CAL-B (Novozym 435) konnte ein deutlicher Abfall des Umsatzes im Verlauf der Recyclingschritte beobachtet werden (Abbildung 124). Nach dem zweiten Recyclingschritt wurden nur noch 30% und im dritten bis fünften Durchgang nur 20-24% Umsatz zum

entsprechenden Amid (*R*)-**10** gefunden. Die ee-Werte der einzelnen Durchgänge blieben allerdings konstant hoch. Dieses Verhalten ist auf die Instabilität des Biokatalysators in lösungsmittelfreier Umgebung zurückzuführen und steht in Analogie zur Literatur.^[36]

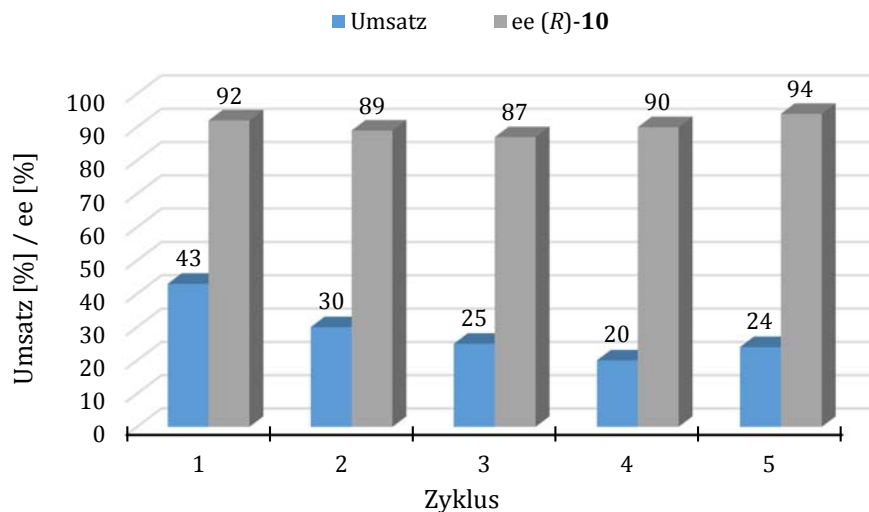


Abbildung 124. Enzymrecycling.

In einem breiten Enzym-Screening aus 23 Lipasen konnte sowohl die CAL-B aus *Candida antarctica* (Novozym 435) als auch zwei Formen der CAL-B der Firma c-LECTA, in immobilisierter und lyophilisierter Form, als die effektivsten Lipasen bei der Acylierung der Benzylamine **134** und **138** sowie der Racematspaltung von *rac*-**4** nachgewiesen werden. Bei Titrationsuntersuchungen wiesen die Lipasen von c-LECTA 68% bzw. 1000% relative Aktivität in Bezug auf Novozym 435 auf. Bei präparativen Versuchen jedoch zeigte nur die immobilisierte Lipase von c-LECTA sehr gute Ergebnisse (52% Umsatz, 96% ee). Die lyophilisierte CAL-B lieferte unter optimierten Bedingungen (5fache Enzymmenge) nur 26% Umsatz. Die immobilisierte CAL-B von c-LECTA stellt somit ein weiteres Werkzeug zur enzymatischen Racematspaltung von Aminen dar.

Die Untersuchung zur Verwendung alternativer Acyldonoren erfolgte in Hinblick auf eine Verbesserung der Racematspaltung mit der immobilisierten CAL-B (Novozym 435). Die unter Standard-Bedingungen enzymatisch dargestellten Amide wiesen sehr unterschiedliche Enantiomerenüberschüsse auf. So konnte nur mit dem literaturbekanntem^[229] Methoxyessigester **111** 92% ee erzielt werden. Racematspaltungen mit weiteren getesteten Acyldonoren führten zu ee-Werte von 10 – 65%, sodass diese unter den gewählten Standard-Bedingungen eine effiziente Racematspaltung nicht stattfindet. Bei den teilweise sehr reaktiven Acyldonoren konnte eine parallel ablaufende chemische Acylierung nachgewiesen werden. So wurde mit Vinyllessigester **125** in Abwesenheit der Lipase bereits bei 40 °C 81% Umsatz zum entsprechenden racemischen Amid erzielt. Durch diese Hintergrundreaktionen werden die ee-Werte der Racematspaltungen verringert. Das bereits in der Arbeitsgruppe etablierte^[33,34] und in dieser Arbeit als Standard-Acyldonor verwendete Malonsäurediethylester (**9**) stellte sich auch in lösungsmittelfreier Umgebung als der effektivste Donor dar.

Zum direkten Vergleich der Acyldonoren untereinander wurden Reaktionskinetiken der enzymatischen Acylierung von *rac*-**4** unter lösungsmittelfreien Standard-Bedingungen aufgenommen (Abbildung 125).

Phenoxyessigester **122** zeigt zwar einen schnellen Reaktionsverlauf, jedoch werden nach 24 Stunden 68% Umsatz erhalten. Dieses übersteigt den theoretischen Umsatz einer Racematspaltung von 50%. Methoxyessigester **111** weist zu Beginn der Reaktion eine hohe Reaktionsrate auf, allerdings stagniert diese bereits nach etwa 0.5 Stunden. Die Acyldonoren **9** und **124** zeigen zunächst ein ähnliches Verhalten, allerdings wird nur mit Malonsäurediethylester (**9**) ein vollständiger Umsatz mit sehr guten Enantiomerenüberschüssen und E-Werten von >100 erreicht. Für Racematspaltungen in lösungsmittelfreien Systemen ist Malonsäurediethylester (**9**) folglich der Acyldonor der Wahl.

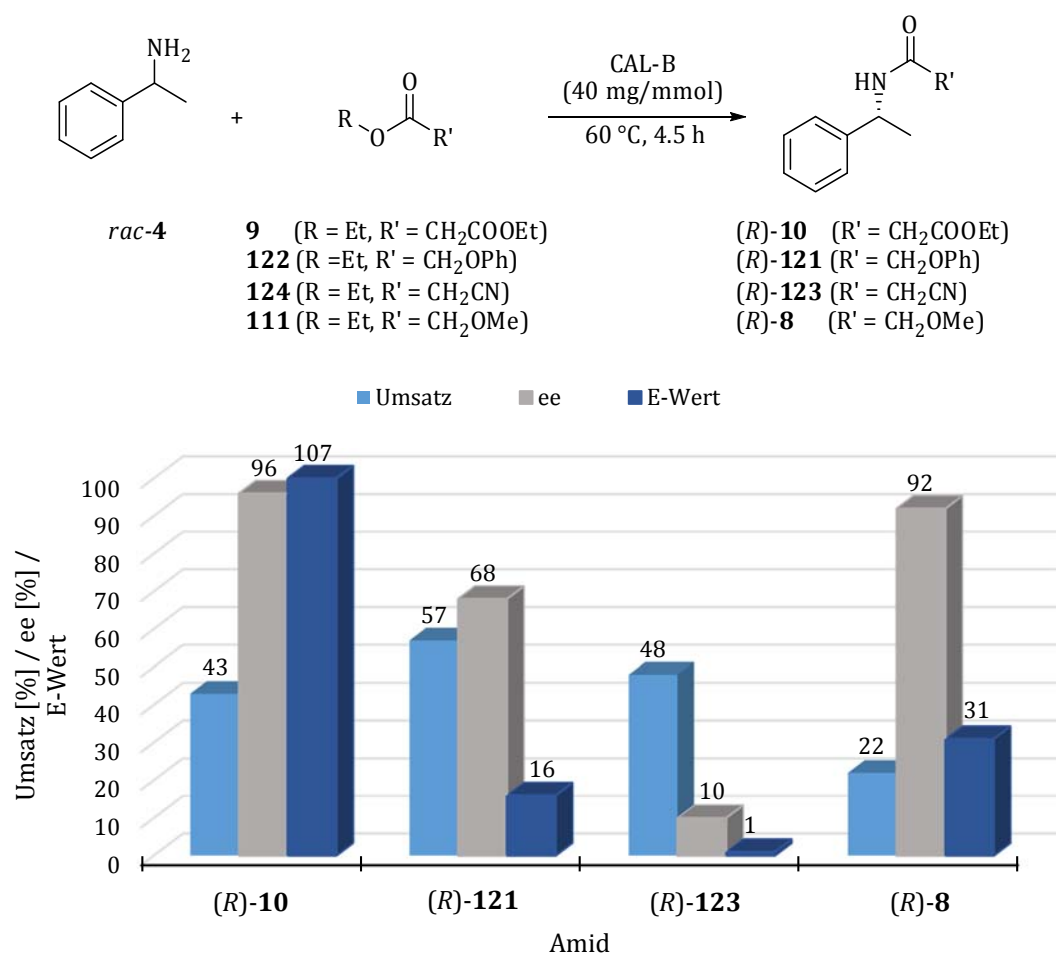


Abbildung 125. Vergleich der Acyldonoren nach 4.5 Stunden Reaktionszeit.

Zur Untersuchung des Substratspektrums wurden 1-Aminoindan (*rac-130*) und sekundäre Amine mit Malonsäurediethylester (**9**) enzymatisch umgesetzt. Die Racematspaltung von 1-Aminoindan (*rac-130*) führte unter lösungsmittelfreien Bedingungen zu 49% Umsatz und 79% ee. Eine Verlängerung der Reaktionszeit lieferte das Amid (*R*)-**129** bei Temperaturen von 80 °C bzw. 60 °C nahezu enantiomerenrein. Durch Einsatz von 1.5 Äquivalenten des Malonesters **9** konnten 91% ee erhalten werden, was einem guten E-Wert von 61 entspricht. Die enzymatische Acylierung der sekundären Amine gelang nur mit Amin **150**, wobei unter Standard-Bedingungen ein Umsatz von 15% mit nur 18% ee erzielt

werden konnte. Unter den gewählten Bedingungen konnte eine effiziente Racematspaltung nicht erreicht werden.

Als weiterer Acyldonor sollte das zuvor enzymatisch synthetisierte ϵ -Caprolacton (**3**) dienen. Dabei konnte in allen Fällen nur geringe Umsätze und auch nur racemische Gemische des entsprechenden Amids erhalten werden. Somit ist das Lacton **3** kein geeigneter Acyldonor. Allerdings kann die enzymatische Amidbildung als Startreaktion für die Polymerisation zum Polycaprolacton (PCL) genutzt werden.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die lösungsmittelfreie Racematspaltung vergleichbar ist mit Reaktionen in organischen Medien. Der Unterschied zwischen lösungsmittelfreien Acylierungen und Reaktionen in Lösungsmitteln liegen in der benötigten Zeit, um 50% Umsatz zu erreichen, sowie in der benötigten Enzymmenge. Besonders mit Malonsäurediethylester (**9**) als Acyldonor und der Lipase B aus *Candida antarctica* (CAL-B, Novozym 435) konnten bei der Racematspaltung chiraler Amine wie *rac*-**4** und *rac*-**130** in Abwesenheit von organischen Lösungsmitteln sehr gute Ergebnisse bei 60 °C Reaktionstemperatur in nur 4.5 Stunden bzw. 24 Stunden Reaktionszeit im Fall von *rac*-**130** erzielt werden.

6 Summary

The aim of this work was to establish efficient and sustainable synthesis routes of ϵ -caprolactone (**3**) and chiral amines. In this thesis the enzymatic double oxidation of cyclohexanol (**1**) to lactone **3** by usage of CHMO from *Acinetobacter calcoaceticus* as well as Lk-ADH from *Lactobacillus kefir* has been successfully carried out. The synthesis was optimized in regard of its efficiency. In particular the enzymatic resolution of chiral amines by usage of lipase B from *Candida antarctica* (CAL-B) in a solvent-free system was in the focus of research.

6.1 Enzymatic oxidation of cyclohexanol (**1**) by means of CHMO

The two-step biocatalytic oxidation of cyclohexanol (**1**) to ϵ -caprolactone (**3**) performed by means of ADH from *Lactobacillus kefir* and cyclohexanone-monooxygenase from *Acinetobacter calcoaceticus* via the intermediate state of the *in situ*-formed cyclohexanone (**2**) has been examined in detail.

For a reliable determination of the conversion two methods have been developed first, the use of urotropine (**51**) as an external standard for $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy and a method of analysis by use of a created standard curve *via* gas chromatography. It has to be taken into account when comparing both methods that the GC method provides higher conversions and lower range of fluctuation because this method is sensitive at higher concentrations and the measure of removing the solvent is eliminated. Therefore analysis *via* GC is the method of choice.

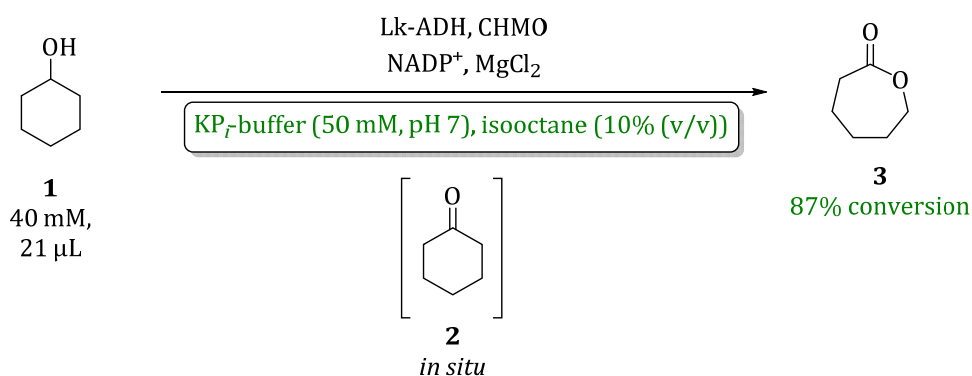
Afterwards the recovery rates of the individual substances had to be determined which are dependent on the used amount of enzyme as well as the time of centrifugation during the work-up procedure. At growing concentration of the substrate cyclohexanol (**1**) an increased recovery rate from 71 – 80% to 90 – 97% is observed. In addition the beforehand used method of extraction *via* EPPENDORF vials has been improved and thus reduction of the loss factor of the substances was achieved.

The specific activity of the herein used CHMO with regard to cyclohexanone (**2**) as substrate has been determined and compared with other BVMOs, ECS Mo-03 and ECS Mo-05 from ENZYMICALS AG. Therefore firstly the volumetric activity has been determined *via* photometer tests and secondly a BRADFORD test has been performed to identify the protein content of the enzymes. In this way the specific activity of these monooxygenases could be calculated. The specific activity of the CHMO is represented as 100%. The other two BVMOs, ECS Mo-03 and ECS Mo-05, showed 0.2 U/mg and 0.05 U/mg specific activity, which corresponds to 7% and 2% relative activity, respectively. Thus both other monooxygenases are not capable of oxidizing cyclohexanone (**2**) effectively.

In addition the activity of the enzymes have been assayed photometrically with regard to the benchmark substance as well as further substrates. The CHMO showed an activity of 0.082 U/mL regarding cyclohexanone (**2**), which is represented as 100%. Towards the substrate isophorone (**52**) the CHMO showed an activity of just 3%. So no conversion could be detected by the biocatalytic oxidation of isophorone (**52**) with the D-glucose (**48-a**)/GDH-regeneration system. Under the terms used in this work this activity is not sufficient for an economically reasonable oxidation.

The activity of the Lk-ADH has been determined with regard of the benchmark substrate 1-phenylethylethanol (**47**) and represented as 100% relative activity. Compared to this the relative activity with regard to cyclohexanol (**1**) and 3,3,5-trimethylcyclohexanol (**53**) has been set at 153% and 0%, respectively. Cyclohexanol (**1**) is an extremely well-suited substrate for oxidation by Lk-ADH. However, the enzymatic double oxidation of the threefold methylated alcohol **53** provides no lactone **56** or **57** under the benchmark reaction conditions.

This results are followed by the optimization of the benchmark reaction in view of product inhibition of the CHMO by testing different organic solvents in a two-phase system. It was found that the best solvent is a mixture of KP_i-buffer and 10% isooctane (v/v), which led to a conversion of 87% (Scheme 1). With organic solvents with higher logP-values, in general, higher conversions can be achieved. Besides both the influence of the amount of the Lk-ADH and of the cofactor as well as the temperature has been investigated. The conversion has fallen by one third by increasing the amount of cofactor from 1 to 10 mol-%. The reduction of the amount of Lk-ADH from 40 to 13 U and the rise of the temperature from RT to 30 °C had an even stronger negative impact.



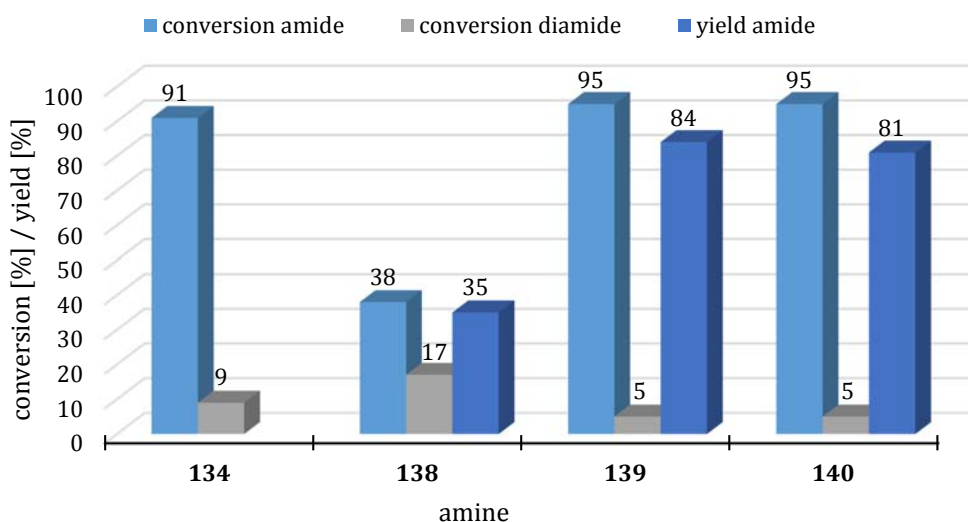
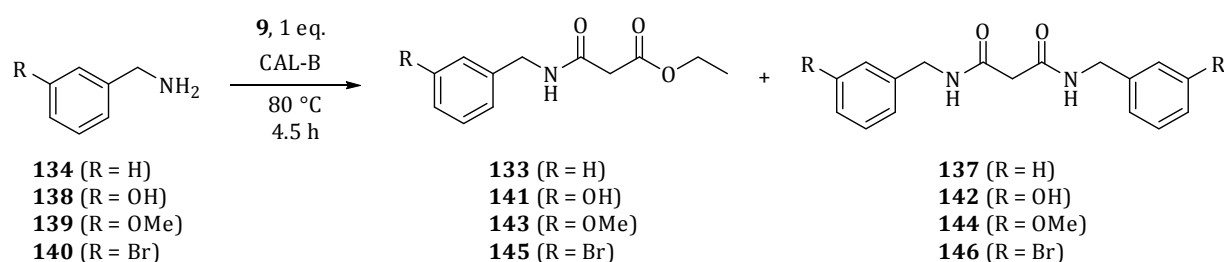
Scheme 1. Enzymatic double oxidation of cyclohexanol (**1**) with 10% (v/v) isooctane.

It was demonstrated that even with very high product concentration of 1 M no product inhibition of the Lk-ADH appeared. However, by use of the Titrino titration apparatus the hydrolytic cleavage of the lactone **3** to the corresponding acid **53** could be observed.

The *in situ*-product removal *via* adsorber resins did not succeed under the chosen conditions. Also the recovery rates from the resins by means of extractive recycling is modest with a maximum of 74%. Eventually a more efficient system can be found by screening of further resins.

6.2 Enzymatic resolution of chiral amines

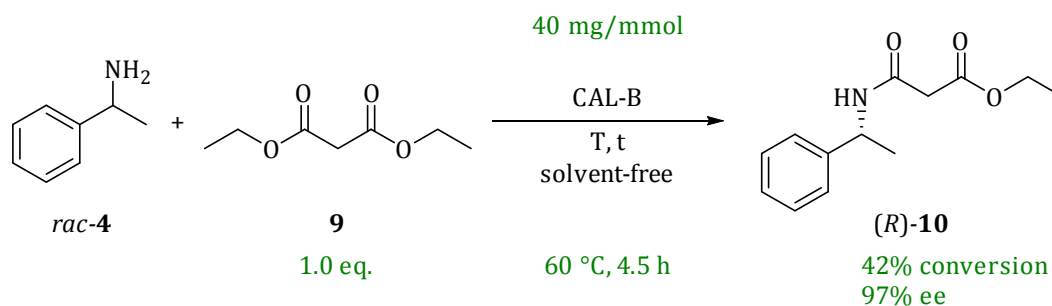
As initiating tests for the resolution of amines, enzymatic acylation reactions of substituted benzylamines with diethyl malonate (**9**) as standard acyl donor have been performed in absence of organic solvents (Scheme 2). The immobilized lipase B from *Candida Antarctica* (CAL-B, trade name: Novozym 435) is used as biocatalyst, which has proved to be a highly selective enzyme.^[27–29] The former used benchmark conditions^[33–35] could be optimized. The reaction temperature could be reduced from 80 °C to 60 °C at 4.5 hours of reaction time in a solvent-free environment without any loss of conversion. These conditions were defined as standard reaction conditions (Scheme 2).



Scheme 2. Enzymatic acylation of substituted benzylamines.

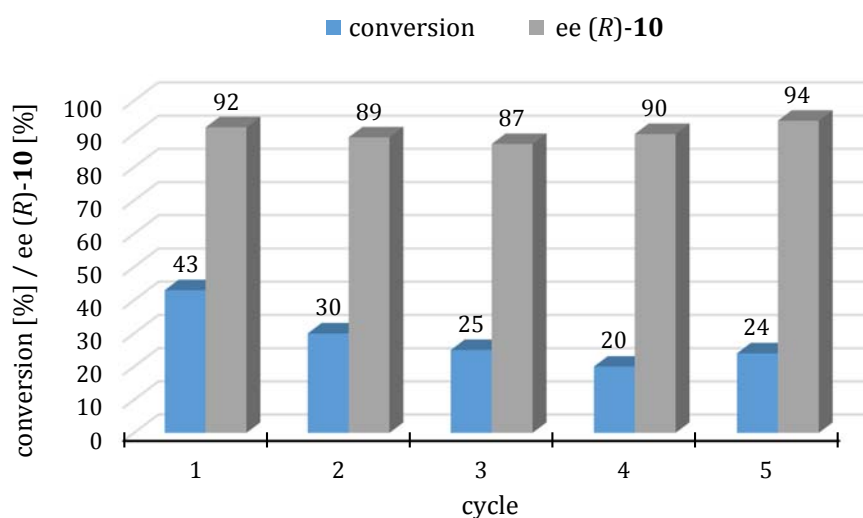
It has been shown furthermore, that there is a positive effect on the conversion by the presence of electron withdrawing substituents in *meta* position. However, parallel chemical acylation reactions towards the accordingly amide up to 8% has been proven. By using the hydroxy-substituted benzylamine **134** the usage of solvents is necessary to ensure homogeneity of the mixture due to the high melting point of the amine. Of the solvents investigated THF (75% conversion at 80 °C reaction temperature) and 2-methyl-THF (70% at 80 °C) showed the best results. The formation of diamids consisting of diethyl malonate (**9**) and two equivalents of substituted benzyl amine could be proven in nearly all cases. By usage of a slight excess of malonate **9** the formation of the diamide could be almost suppressed. However, a slight decrease of the conversion from 91% to 82% has been detected.

The enzymatic resolution of racemic amines in a solvent-free environment was investigated by means of the system of 1-phenylethyl amine (*rac*-**4**) and diethyl malonate (**9**) towards amide *rac*-**10** (Scheme 3). Thereby the influence of temperature und reaction time as well as enzyme loading was examined and the reaction kinetics at optimized conditions were documented. The amide *rac*-**10** was obtained with 42% conversion and 97% enantiomeric purity, meaning an excellent enantioselectivity of >100. Extension of the reaction time to 24 hours at 60 °C gave complete conversion with 98% ee. A parallel chemical acylation reaction of *rac*-**4** and malonate **9** as acyl donor has not been detected.



Scheme 3. Enzymatic resolution (benchmark-reaction).

A comparison of this procedure with existing industrial processes^[30,264] showed, that the resolution of the chiral amine *rac*-**4** under solvent-free conditions chosen for this work provides values of enantioselectivity in the same range of magnitude. Methoxy acetate **111** used in literature^[30] led to 52% conversion and 95% ee ($E > 100$) whereas the resolution with malonate **9** as donor succeeded with 48% conversion and also 95% ee ($E > 100$) under the same conditions. The resolution under conditions used in this thesis led to enantioselectivity of >100. The used increased amount of enzyme and higher temperature are being compensated by avoidance of organic solvents and shorter reaction times. The technique established here constitutes a very good alternative to existing industrial processes. Enzyme recycling experiments by means of resolution of *rac*-**4** with malonate **9** by the immobilized CAL-B showed a significant drop of conversion during the recycling steps (Scheme 4).



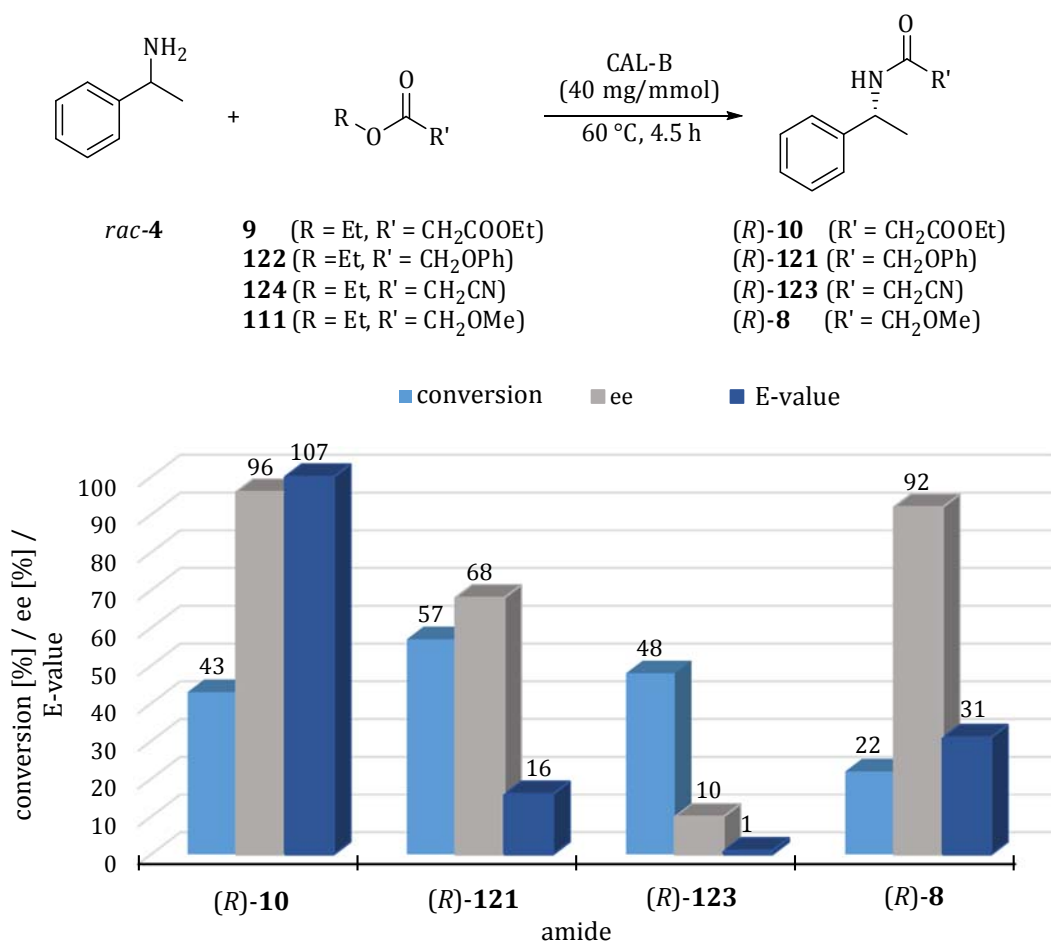
Scheme 4. Enzyme recycling.

After the second recycling step, only 30% conversion and in the following recycling steps, merely 20 - 24% conversion towards the amide (*R*)-**10** could be detected. The ee-values of the resolution reactions remained constantly high though. This behavior is due to the instability of the biocatalyst in a solvent-free environment and is analogous to literature.^[36]

In a broad lipase screening from 23 lipases CAL-B from *Candida antarctica* (Novozym 435) as well as two forms of CAL-B, received from c-LECTA in immobilized and lyophilized form, have been demonstrated as the most effective lipases by the acylation of benzyl amines **130** and **132** as well as the resolution of *rac*-**4**. Titration investigations of the lipases from c-LECTA showed 68% and 1000% relative activity regarding Novozym 435, respectively. In preparative experiments only the immobilized lipase from c-LECTA offered very good results (52% conversion, 96% ee). The lyophilized CAL-B delivered merely 26% conversion under optimized conditions (fivefold amount of enzyme). Thus the immobilized CAL-B from c-LECTA presents an important tool for enzymatic resolution of chiral amines.

The examination of the usage of alternative acyl donors occurred with regard to the improvement of the resolution by the immobilized CAL-B. The amides, which were enzymatically synthesized under standard conditions, presented very different enantiomeric ratios. So only with methoxy acetate **111** known from literature^[229] 92% ee could be achieved. Resolution with the other tested acyl donors led to ee-values of 10 – 65%. Thus these donors do not lead to efficient resolution under the conditions chosen in this thesis. In case of very reactive acyl donors, parallel running chemical acylation reactions were proven. So with vinyl acetate **125** at 40 °C already 81% conversion to the respective racemic amide was received in absence of lipase. Due to this background reaction the ee-values of the enzymatic resolution are being decreased. Diethyl malonate (**9**), already established in this working group^[33-35] and used as standard acyl donor in this thesis, represented itself as the most effective acyl donor in solvent-free environment also.

For the direct comparison of the acyl donors among themselves reaction kinetics of the resolution of *rac*-**4** under solvent-free conditions were measured (Scheme 5). Phenoxy acetate **118** presented a fast reaction process but after 24 hours 68% conversion were achieved, which surpasses the theoretic conversion of a resolution of 50%. Methoxy acetate **111** exhibited a very high reaction rate at the beginning which stagnated already after 0.5 hours. The acyl donors **9** and **124** showed similar behavior, but just diethyl malonate (**9**) led to complete conversion and very high enantiomeric ratio ($E > 100$). For resolution reactions in solvent-free system diethyl malonate (**9**) is the acyl donor of choice.



Scheme 5. Comparison of acyl donors after 4.5 h reaction time.

For the examination of the substrate spectrum 1-aminoindane (*rac*-**130**) and secondary amines were reacted with malonate **9**. The resolution of *rac*-**130** led to 49% conversion and 79% ee under solvent-free conditions after 4.5 hours reactions time. By enhancing the reaction time to 24 hours nearly enantiomeric pure amide (*R*)-**129** could be obtained. The enantiomeric purity could also be increased to 91% through usage of 1.5 equivalents of malonate **9**, representing a good enantioselectivity of 61. The enzymatic acylation of secondary amines partly succeeded with amine **150**, whereby just 15% conversion and 18% ee could be achieved under standard-conditions. Under these chosen conditions resolution of secondary amines failed.

ϵ -Caprolactone (**3**), previously enzymatically synthesized, should be employed as possible acyl donor. It is not suited as acyl donor due to low conversions and racemic mixtures of the respective amide received in all cases. However, the enzymatic formation of amide can be used as starting reaction for polymerization to polycaprolactone (PCL).

The results obtained showed the comparability of the solvent-free resolution with reactions in organic media. The differences between solvent-free acylation reactions and reactions in organic solvents result from the time needed to achieve 50% conversion as well from the amount of enzyme needed. Especially with diethyl malonate (**9**) as acyl donor and lipase B from *Candida antarctica* (CAL-B, Novozym 435) resolution of chiral amines like *rac*-**4** and *rac*-**130** very good results at 60 °C reaction temperature in

just 4.5 hours reaction time and 24 hours for the amine *rac*-**130**, respectively, have been achieved in absence of organic solvents.

7 Experimenteller Teil

7.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

Automatisches Titrationssystem:

Titrationen wurden auf einem TitroLine alpha Plus der Firma DI ANALYTICS durchgeführt. Als Titrierlösung diente verdünnte NaOH-Lösung (0.1 M). Die Spektren werden mit der TitriSoft 2.73 Software von SCHOTT INSTRUMENTS aufgenommen und bearbeitet.

Chemikalien:

Die verwendeten käuflichen Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von ACROS ORGANICS®, ALFA AESAR®, FLUKA®, FLUOROCHEM LTD. UNIT.®, MERCK®, ROTH®, SIGMA-ALDRICH® bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Das Lösungsmittel MTBE wurde als Hochschulspende von EVONIK DEGUSSA GMBH zur Verfügung gestellt. Alle weiteren verwendeten Lösungsmittel wurden von VWR CHEMICALS®, FISHER CHEMICAL®, ROTH® und APPLICHEM® bezogen und waren für Reaktionen und Analytik von p.a. Qualität. Deuterierte Lösungsmittel stammen von DEUTERO.

Dünnschichtchromatographie (DC):

Dünnschichtchromatogramme werden mit MERCK DC-Folien, Kieselgel 60 auf Aluminiumfolie (F₂₄₅), durchgeführt. Die DC-Folien werden nach dem Entwickeln mit Ioddampf angefärbt. Die Detektion erfolgt mittels UV-Licht.

DC-MS-Spektrometrie:

DC-MS-Kopplungen wurden am ZQ2000 (Normalphase; Eluens: *i*PrOH) mit einer ESI-Ionenquelle der Firma WATERS durchgeführt. Die Daten wurden mit der Software MestReNova (MESTRELAB RESEARCH, Version 7.0.2-8636) ausgewertet.

Elementaranalyse (EA):

Elementaranalysen wurden an einem Euro EA Elementaranalysator durchgeführt.

Enzyme und Cofaktoren:

Die BAEYER-VILLIGER-Monooxygenasen (BVMO) ECS-MO 01 sowie ECS-MO 03 und ECS-MO 05 wurden freundlicherweise von der ENZYMICALS AG zur Verfügung gestellt. Die Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* (Lk-ADH, DSM 20587) wurden im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. W. HUMMEL (FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH) entwickelt und zur Verfügung gestellt. Die Cofaktoren NAD(P)H und NAD(P)⁺ wurden von ORIENTAL YEAST erworben. *Candida antarctica* Lipase B (CAL-B) in immobilisierter

Form (Novozym 435) wurde von SIGMA ALDRICH® käuflich erworben. CAL-B in lyophilisierter Form und immobilisiert auf einem Methacrylat-Träger wurde von c-LECTA GMBH zur Verfügung gestellt.

ESI-MS:

ESI-Massenspektren werden mit dem Esquire 3000 der Firma BRUKER DALTONIK mit Ionenfalle und ESI-Quelle aufgenommen. Die Proben werden direkt mit einer automatischen Spritze eingeführt. Stickstoff dient als Zerstäuber- und Trockengas und wird durch den Stickstoffgenerator NGM 11 von BRUKER generiert. Zur Kühlung der Ionenfalle dient Helium. Die Spektren werden mit der BRUKER Daltonik esquireNT 4.0 esquire Control Software (V6.04) aufgenommen und mit der Data Analysis Software 2.0 bearbeitet.

Gaschromatographie (GC):

Umsatzbestimmungen erfolgten an einem GC-2010 von SHIMADZU mit einem Autoinjektor AOC-20i von SHIMADZU und einer Rt- β DEXm-Säule von RESTEK. Als Trägergas diente Stickstoff (100 kPa). Die Säule weist eine Länge von 30 m und einen Innendurchmesser von 0.25 mm auf. Die Spektren werden mit der Software GCsolution Analysis (Version 2.41.00) von SHIMADZU aufgenommen und mit der Software GCsolution Postrun (Version 2.41.00) bearbeitet.

Methode: Start bei 70 °C, mit 7.5 °C/min auf 110 °C, mit 25 °C/min auf 220 °C.

HPLC:

Die Chromatogramme werden mit einem Gerät, bestehend aus folgenden Bausteinen der Firma JASCO, aufgenommen: Pumpen PU-2080Plus, automatischer Rückdruckregler BP-2080Plus, Säulentermostat CO-2060Plus, Multiwellenlängen-Detektor MD-2010Plus und Autosampler AS-2059Plus. Die Trennung der Proben erfolgte mit Säulen von DAICEL Chiralpak® (AD-H). Die Chromatogramme wurden mit der Galaxy Chromatography Data System Software aufgenommen und ausgewertet.

IR-Spektroskopie:

IR-spektroskopische Messungen wurden an einem Nicolet 308 FT-IR-Spektrometer der Firma THERMO ELECTRON CORPORATION durchgeführt und mit der Software Omnic (Version 2.11) aufgenommen. Die Absorption wird in Wellenzahl $\tilde{\nu}$ in [cm⁻¹] angegeben.

NMR-Spektroskopie:

Die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden an einem BRUKER DRX-500 oder BRUKER Advance 500 NMR-Spektrometer bei Raumtemperatur aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ [ppm] der ¹H- und ¹³C-Spektren werden, sofern nicht anders angegeben, in Relation zur normierten chemischen Verschiebung des verwendeten partiell undeuterten Lösungsmittels angegeben (CDCl₃ δ = 7.26 ppm). Die Spin-Multiplizitäten werden als br (broad), 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.

UV/Vis-Spektroskopie:

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.

7.2 Synthesen, Methoden und spektroskopische Daten

7.2.1 Enzymatische Oxidation von Cyclohexanol (1) unter Einsatz von CHMO und Lk-ADH

7.2.1.1 Standardreaktion: Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV 1): Enzymatische Oxidation von Cyclohexanol (1) zu ϵ -Caprolacton (3)

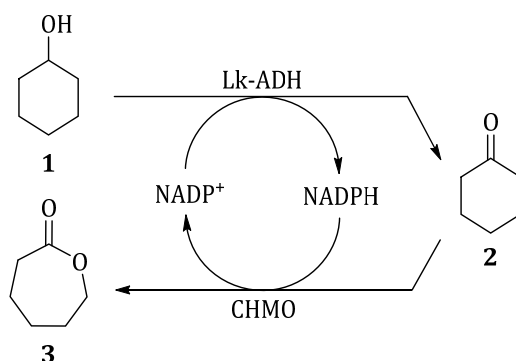
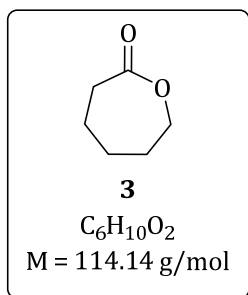


Abbildung 126. Doppeloxidation von Cyclohexanol (1) zu ϵ -Caprolacton (3).^[26]

In einem 10 mL-Rundkolben wird Rohextrakt der CHMO aus *Acinetobacter calcoaceticus* (3.82 U, bezogen auf Cyclohexanon (2)) in KP_i-Puffer (pH 7.0, 50 mM, 5 mL) aufgenommen und gut geschüttelt. Cyclohexanol (1, 0.2 mmol, 20.0 mg), MgCl₂ (1mM), und Lk-ADH (40 U, Rohextrakt/Glycerin 1:1 (v/v), bezogen auf Acetophenon) werden zugegeben. Das Gemisch wird für 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von NADP⁺ (1 mol-%, 1.57 mg) wird die Reaktion gestartet und die Mischung für eine bestimmte Zeit bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden die 5 mL zu je 0.7 mL auf sieben 1.5 mL-EPPENDORF-Gefäße verteilt und jeweils mit 0.7 mL DCM versetzt. Durch 30 min Schütteln im Thermomixer wird das Zweiphasensystem extrahiert. Die Phasentrennung wird durch 30 min Zentrifugieren bei 13000 rpm erreicht. Die überstehende wässrige Phase wird abgenommen und in sieben neue EPPENDORF-Gefäße gegeben. Die Extraktion mit anschließender Phasentrennung wird noch zweimal wiederholt. Die organischen Phasen werden in einem 25 mL-Rundkolben überführt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 900 mbar und 40 °C Badtemperatur entfernt. Der produktbezogene Umsatz wird mithilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

Produktbezogener Umsatz: >97%.



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1.75 (m, 4H, H-4, H-5), 1.84 (2H, H-3), 2.62 (t, ³J = 6.5 Hz, 2H, H-2), 4.21 (t, ³J = 4.5 Hz, 2H, H-6).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): 23.22 (C-3), 29.25 (C-5), 29.57 (C-4), 34.85 (C-2), 69.60 (C-6), 176.52 (C-1).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.^[272]

7.2.1.2 Analytik

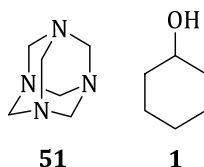
7.2.1.2.1 Umsatzbestimmung mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie

Für die Umsatzbestimmung mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie wird Urotropin (**51**) als externer Standard verwendet. Dazu wird der gesamte Reaktionsansatz im Anschluss an die Aufarbeitung in ein NMR-Röhrchen gegeben und frisch angesetzte Urotropin-Stammlösung (**51**, 0.17 M in CDCl_3 , 0.1 mL) sowie CDCl_3 (0.7 mL) zugegeben. Der Umsatz wird in Bezug auf das Singulettsignal des Standards **50** bestimmt.

7.2.1.2.2 Stabilität von Urotropin (**51**) als Standard

Zur Bestimmung der Stabilität des externen Standards Urotropin (**51**) werden Cyclohexanol (**1**, 0.2 mmol, 21 μL) sowie Urotropin (**51**, 0.1 mL der 0.17 M-Stammlösung in CDCl_3) zusammen mit CDCl_3 in ein NMR-Röhrchen gegeben und sofort vermessen. Das Verhältnis beider Komponenten wird bestimmt. Nach 24 h bei RT wird dieselbe Probe erneut vermessen und das Verhältnis beider Komponenten mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 23** aufgelistet.

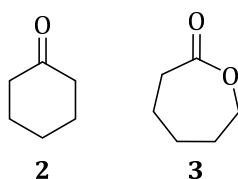
Tabelle 23. Bestimmung der Stabilität von Urotropin (**51**) über 24 h.



Eintrag	Verhältnis 51 / 1 eingewogen	Verhältnis 51 / 1 nach 24
1	1 : 0.80	1 : 0.80

7.2.1.2.3 Bestimmung der Rückgewinnungsrate mittels NMR

Zur Bestimmung der Rückgewinnungsrate der Substanzen wird die Aufarbeitung simuliert. Dazu werden Cyclohexanon (**2**, 0.2 mmol, 20.7 μL) bzw. ϵ -Caprolacton (**3**, 0.2 mmol, 21.1 μL) in KP_i -Puffer (pH 7, 50 mM, 5 mL) gelöst und für 24 h bei RT gerührt. Die Aufarbeitung durch Extraktion erfolgt analog der AAV 1. Zur Bestimmung der Substanzmenge mittels $^1\text{H-NMR}$ -Analytik wird Urotropin (**51**) als Standard (0.1 mL der 0.17 M-Stammlösung in CDCl_3) verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 aufgelistet.

Tabelle 24. Rückgewinnungsrate der Substanzen nach simulierter Aufarbeitung.

Eintrag	Substanz	Rückgewinnungsrate [%]
1	2	91
2	3	98

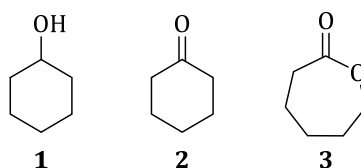
7.2.1.3 Umsatzbestimmung mittels GC

7.2.1.3.1 Erstellen der Eichgerade

Vor dem Erstellen einer Eichgeraden wurde zunächst eine Methode am Gaschromatographen erstellt, die eine gute Trennung der Substanzen erlaubt. Im Anschluss wurde eine Stammlösung (10 g/l) von Cyclohexanol (**1**), Cyclohexanon (**2**) und ϵ -Caprolacton (**3**) hergestellt. Dafür wurden je 1 g der drei Substanzen in ein 100 mL-fassenden Maßkolben eingewogen, mit DCM bis zum Eichstrich aufgefüllt und sehr gut geschüttelt. Ausgehend von dieser Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt, sodass Lösungen der Konzentrationen von 5 g/l, 2.5 g/l, 2.0 g/l, 1.75 g/l, 1.5 g/l, 1.25 g/l, 1.0 g/l hergestellt werden konnten. Von der Stammlösung sowie von den weiteren Lösungen wurden jeweils 3 Probenfläschchen abgefüllt und doppelt am Gaschromatographen vermessen. Aus den erhaltenen Werten wurde mithilfe des Programms der Mittelwert gebildet und die Eichgerade erstellt.

7.2.1.3.2 Bestimmung der Durchschnittsabweichungen

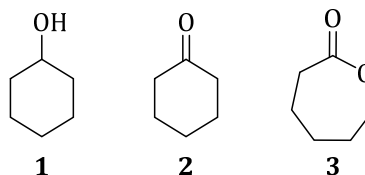
Zur Bestimmung der durchschnittlichen Abweichungen der zuvor erstellten Eichgerade werden unterschiedliche Mengen der Substanzen **1**, **2** und **3** in einen 100 mL-Maßkolben eingewogen und mit DCM aufgefüllt. Davon werden jeweils drei Proben abgefüllt und mittels Gaschromatographie vermessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 aufgelistet.

Tabelle 25. Bestimmung der Durchschnittsabweichungen bei GC-Messungen.

Eintrag	Substanz	Einwaage [mg/mL]	Stoffmenge erhalten [mg/mL]	Abweichung [mg/mL] / [%]
1	1	2.39	2.49	0.10 / 4
2	2	0.81	0.82	0.01 / 1
3	3	1.78	1.85	0.07 / 4
4	1	1.25	1.28	0.03 / 2
5	2	1.40	1.42	0.02 / 1
6	3	1.25	1.28	0.07 / 2
7	1	0.93	0.96	0.03 / 3
8	2	1.58	1.60	0.02 / 1
9	3	2.75	2.89	0.14 / 5
10	3	2.45	2.45	0 / 0

7.2.1.3.3 Bestimmung der Wiederfindungsrate mittels GC

Die Komponenten **1**, **2** und **3** werden in verschiedenen Konzentrationen (0.1 – 0.4 mmol) eingewogen und in KP_i-Puffer (pH 7, 50 mM, 5 mL) für 24 h bei RT gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 1. Der Rückstand wird nach Entfernen des Lösungsmittels in einen Maßkolben gegeben und auf den Eichstrich aufgefüllt. Davon wird eine Probe abgefüllt und die Substanzmenge mittels Gaschromatographie bestimmt. Jede Messung wird fünfmal durchgeführt und daraus der Durchschnittswert ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 aufgelistet.

Tabelle 26. Bestimmung der Wiederfindungsrate während der Aufarbeitung.

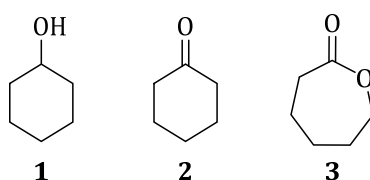
Eintrag	Substanz	Stoffmenge [mmol]	Wiederfindung [%]
1	1	0.1	71
2	2	0.1	75
3	3	0.1	80
4	1	0.2	84
5	2	0.2	88
6	3	0.2	88
7	1	0.4	90

Eintrag	Substanz	Stoffmenge [mmol]	Wiederfindung [%]
8	2	0.4	95
9	3	0.4	97

7.2.1.3.4 Bestimmung der Wiederfindungsrate in Anwesenheit von Lk-ADH

Die Komponenten **1**, **2** und **3** (0.2 mmol) werden eingewogen und in KP_i -Puffer (pH 7, 50 mM, 5 mL) zusammen mit Lk-ADH (0 - 40 U, 0 - 141 μ L) für 1 h bei RT gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 1. Der Rückstand nach Entfernen des Lösungsmittels wird in einen 25 mL-Maßkolben gegeben und davon drei Proben abgefüllt. Die Substanzmenge wird mittels Gaschromatographie bestimmt. Jede Messung wird dreimal durchgeführt und daraus der Durchschnittswert ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 aufgelistet.

Tabelle 27. Bestimmung der Wiederfindungsrate in Anwesenheit von Lk-ADH.



Eintrag	Substanz	Lk-ADH	Wiederfindung [%]
1	1	-	88
2	1	+	90
3	2	-	76
4	2	+	73
5	3	-	94
9	3	+	93

7.2.1.3.5 Einfluss der Enzymellet-Bildung auf die Rückgewinnungsrate

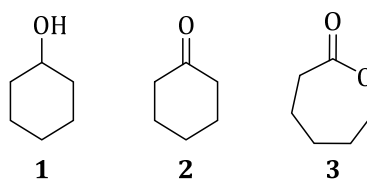
Zur Untersuchung der Einflusses der Pellet-Bildung auf die Rückgewinnungsrate werden ϵ -Caprolacton (**3**, 0.2 mmol, 22.8 mg) und Lk-ADH (0 - 500 μ L) in KP_i -Puffer (pH 7, 50 mM, 5 mL) für 10 min bei RT gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 1, mit der Abweichung der Zentrifugierzeit t zwischen 5 - 30 Minuten. Die Substanzmenge von **3** wird anschließend mittels Gaschromatographie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 28 aufgelistet.

Tabelle 28. Einfluss der Pellet-Bildung in Anwesenheit von Lk-ADH.

Eintrag	Lk-ADH [μ]	t [min]	Rückgewinnungsrate [%]
1	0	3 x 30	68
2	150	3 x 30	61
3	500	3 x 30	20
4	0	3 x 5	93
5	150	3 x 5	73
6	500	3 x 5	69

7.2.1.3.6 Vergleich der Analytikmethoden: GC vs. NMR

Die Synthese erfolgt analog der AAV 1. Dazu wird CHMO (3.82 U, 20.1 mg), Cyclohexanol (**1**, 0.2 mmol), $MgCl_2$ (1 mM) sowie Lk-ADH (40 U, 210.5 μ L) und $NADP^+$ (1 mol%, 1.57 mg) eingesetzt und in KP_i -Puffer (pH 7, 50 mM, 5 mL) für 24 h gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 1. Der Rückstand wird nach Entfernen des Lösungsmittels in einen Maßkolben gegeben und auf den Eichstrich aufgefüllt. Davon werden drei Proben abgefüllt und per GC vermessen. Der restliche Inhalt der GC-Gläschen wird mit der restlichen Lösung zusammengegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 900 mbar und 40 °C Badtemperatur entfernt. Der gesamte Reaktionsansatz wird im Anschluss an die Aufarbeitung in ein NMR-Röhrchen gegeben und frisch angesetzte Urotropin-Stammlösung (**51**, 0.17 M in $CDCl_3$, 0.1 mL) sowie $CDCl_3$ (0.7 mL) zugegeben. Der Umsatz wird in Bezug auf das Singulettsignal des Standards **50** bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 29 aufgezeigt.

Tabelle 29. Vergleich der Analytikmethoden: GC vs. NMR

Eintrag	Substanz	Umsatz <i>via</i> GC [%]	Umsatz <i>via</i> NMR [%]
1	1	6	0
2	2	5	3
3	3	74	59

7.2.1.4 Photometertests

7.2.1.4.1 Bestimmung der Enzymaktivität der Lk-ADH gegenüber 3,3,5-Trimethylcyclohexanol (**53**)

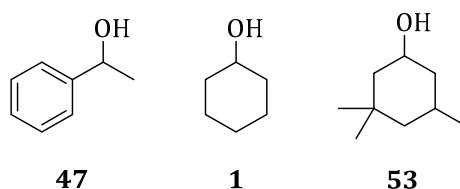
Die Enzymaktivität der Lk-ADH wird spektroskopisch analog einer arbeitsgruppeninterner Vorschrift spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 340 nm durch Messung des Verbrauchs von NADPH durch Oxidation zu NADP⁺ in Gegenwart eines Substrates bestimmt. Dafür werden in eine 3 mL fassende Küvette 2880 µL der Substratlösung (10 mM bis 2M in KPi-Puffer (pH 7, 50 mM)) und 60 µL einer NADPH-Lösung (12.5 mM in KPi-Puffer (pH 7, 50 mM)) gegeben und gut geschüttelt. Abschließend werden 60 µL der entsprechend verdünnten Lk-ADH-Lösung (Rohextrakt) zugegeben. Die Lösung wird noch einmal gut geschüttelt und die Messung sofort gestartet. Es wurde über 3 Minuten jede Sekunde ein Messpunkt aufgenommen. Zur Berechnung der volumetrischen Enzymaktivität wird die Anfangssteigung der Absorptionskurve in folgende Gleichung 4 eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 30 aufgezeigt.

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\Delta E_{340\text{nm}} \cdot V_g \cdot f}{\epsilon \cdot V_p \cdot t \cdot d} \quad \text{Gleichung 4}$$

U/mL:	volumetrische Enzymaktivität
$\frac{\Delta E_{340\text{nm}}}{t}$:	Anfangssteigung/-abnahme der Absorptionskurve [min ⁻¹]
V _g :	Gesamtvolumen der Probe [mL]
f:	Verdünnungsfaktor des Rohextraktes
V _p :	Enzymvolumen [mL]
ε:	molarer Extinktionskoeffizient $\left[\frac{\text{mL}}{\text{mM} \cdot \text{cm}} \right]$
d:	Schichtdicke der Küvette [cm]

In dieser Arbeit sind $d = 1 \text{ cm}$ und $\epsilon = 6.3 \frac{\text{mL}}{\text{mM} \cdot \text{cm}}$.

Tabelle 30. Bestimmung der Aktivität der Lk-ADH gegenüber 3,3,5-Trimethylcyclohexanol (**53**) im Vergleich zu 1-Phenylethanol (**47**) und Cyclohexanol (**1**).



Eintrag	Substrat	Aktivität [U/mL]	Relative Aktivität [%]
1	47	21.5	100
2	1	33.0	153
3	53	0	0

7.2.1.4.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV 2): Bestimmung der Enzymaktivität der CHMO

Die Enzymaktivität der CHMO (ECS Mo-01) wird nach einer Vorschrift der ENZYMICALS AG bei einer Wellenlänge von 340 nm durch Messung des Verbrauchs an NADPH durch Oxidation zu NADP⁺ in Gegenwart von Cyclohexanon (**2**) als Substrat bestimmt. Dazu werden Stammlösungen des Substrats Cyclohexanon (**2**, 100 mM in DMF) und eine NADPH-Lösung (125 mM in dest. Wasser) hergestellt. Es werden 2670 µL des TRIS-HCl-Puffers (pH 8.5, 50 mM) zusammen mit 30 µL der Substratlösung und 3 µL der NADPH-Lösung in eine Küvette pipettiert und durch Schütteln gut vermischt. Anschließend werden 300 µL der jeweiligen Enzymlösung (Rohextrakt in Puffer) zugegeben und die Lösung noch ein weiteres Mal gut durchmischt und die Messung gestartet. Es wird über 3 Minuten jede Sekunde ein Messpunkt aufgenommen. Zur Berechnung der volumetrischen Enzymaktivität wird die Anfangssteigung der Absorptionskurve nach Gleichung 5 berechnet.

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\Delta E_{340\text{nm}} \cdot 10 \cdot f}{t \cdot \epsilon \cdot d} \quad \text{Gleichung 5}$$

U/mL:	volumetrische Enzymaktivität
$\frac{\Delta E_{340\text{nm}}}{t}$:	Anfangssteigung/-abnahme der Absorptionskurve [min ⁻¹]
f:	Verdünnungsfaktor des Rohextraktes
ϵ :	molarer Extinktionskoeffizient $\left[\frac{\text{mL}}{\text{mM} \cdot \text{cm}} \right]$
d:	Schichtdicke der Küvette [cm]

In dieser Arbeit sind $d = 1 \text{ cm}$ und $\epsilon = 6.3 \frac{\text{mL}}{\text{mM} \cdot \text{cm}}$.

Aktivität: 0.082 U/mg.

7.2.1.4.3 BVMO-Screening und BRADFORD-Test zur Oxidation von Cyclohexanol (**2**)

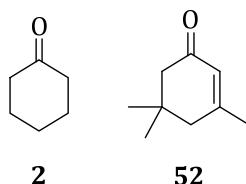
Die Enzymaktivitäten der BVMOs ECS Mo-03 und ECS Mo-05 (ENZYMICALS AG) sollen photometrisch analog zur AAV 2 bestimmt werden. Dazu werden Stammlösungen des Substrats Cyclohexanon (**2**, 100 mM in DMF) und eine NADPH-Lösung (125 mM in dest. Wasser) hergestellt. Es werden 2670 µL des TRIS-HCl-Puffers (pH 8.5, 50 mM) zusammen mit 30 µL der entsprechenden Substratlösung und 3 µL der NADPH-Lösung in eine Küvette pipettiert und durch Schütteln gut vermischt. Anschließend werden 300 µL der jeweiligen Enzymlösung (Rohextrakt in Puffer) zugegeben und die Lösung noch ein weiteres Mal gut durchmischt und die Messung gestartet. Es wird über 3 Minuten jede Sekunde ein Messpunkt aufgenommen. Zur Berechnung der Enzymaktivität wird die Anfangssteigung der Absorptionskurve nach Gleichung 5 berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 31 aufgezeigt.

Tabelle 31. BVMO-Screening zur Oxidation von Cyclohexanon (**2**).

Eintrag	BVMO	Aktivität [U/mL]	Aktivität [U/mg]	Relative Aktivität [%]
1	ECS Mo-01	7.38	3.00	100
2	ECS Mo-03	0.50	0.20	7
3	ECS Mo-05	0.14	0.05	2

7.2.1.4.4 Aktivitätsbestimmung der CHMO gegenüber Isophoron (**52**)

Die Enzymaktivität der CHMO soll photometrisch gegenüber Isophoron (**52**) als Substrat bestimmt werden. Abweichend von der AAV 1 wird die Aktivität nach einer Vorschrift der Firma ENZYMICALS AG dargestellt. Dazu werden Stammlösungen der Substrate Cyclohexanon (**2**) und Isophoron (**52**, 100 mM in DMF) und eine NADPH-Lösung (125 mM in dest. Wasser) hergestellt. Es werden 2670 μL des TRIS-HCl-Puffers (pH 8.5, 50 mM) zusammen mit 30 μL der entsprechenden Substratlösung und 3 μL der NADPH-Lösung in eine Küvette pipettiert und durch Schütteln gut vermischt. Anschließend werden 300 μL der jeweiligen Enzymlösung (Rohextrakt in Puffer) zugegeben und die Lösung noch ein weiteres Mal gut durchmischt und die Messung gestartet. Es wird über 3 Minuten jede Sekunde ein Messpunkt aufgenommen. Zur Berechnung der Enzymaktivität wird die Anfangssteigung der Absorptionskurve nach Gleichung 5 berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 32 aufgezeigt.

Tabelle 32. Bestimmung der Aktivität von CHMO gegenüber Isophoron (**52**) im Vergleich zu Cyclohexanon (**2**).

Eintrag	Substrat	Aktivität [U/mg]	Aktivität [%]
1	2	0.101	100
2	52	0.003	3

7.2.1.5 Optimierung der Standard-Reaktion

7.2.1.5.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV 3): Doppeloxidation zu ϵ -Caprolacton (**3**) mit optimierter Aufarbeitung

Zur Optimierung der Aufarbeitung wird die Synthese analog der AAV 1 (siehe Abbildung 126) durchgeführt. Dazu werden CHMO (3.82 U, 68.2 mg) in KPi -Puffer (pH 7, 50 mM, 5 mL), Cyclohexanol (**1**, 0.2 mmol, 22.0 mg), MgCl_2 (1 mM) sowie Lk-ADH (40 U, 210.5 μL) und NADP^+ (1 mol-%, 1.57 mg) eingesetzt und für 24 h bei RT gerührt. Anschließend werden die 5 mL zu je 1 mL auf fünf 2 mL-EPPENDORF-Gefäße verteilt und jeweils mit 1 mL DCM versetzt. Durch 30 min Schütteln im Thermomixer wird

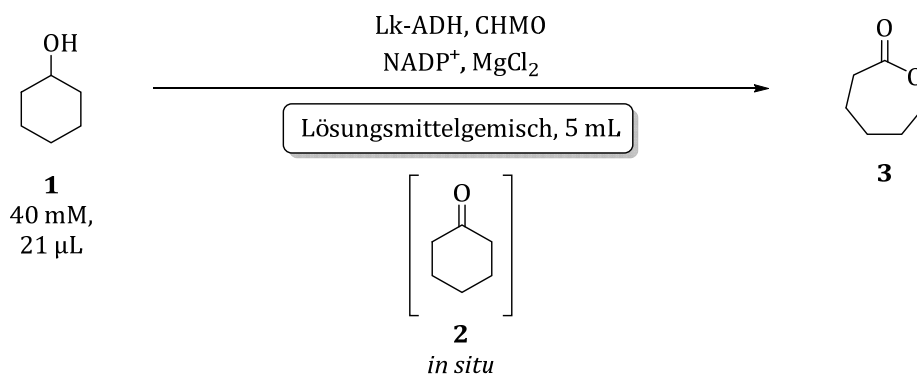
das Zweiphasensystem extrahiert. Die Phasentrennung wird durch 5 min Zentrifugieren bei 13000 rpm erreicht. Die untere organische Phase wird abgenommen und die zurückbleibende wässrige Phase sowie das denaturierte Enzym werden erneut mit je 1 mL DCM versetzt. Die Extraktion mit anschließender Phasentrennung wird noch zweimal wiederholt. Die organischen Phasen werden in einem 50 mL-Maßkolben überführt und der Kolben bis zur Eichmarke mit DCM aufgefüllt. Es werden drei Probenfläschchen abgefüllt und der Umsatz mittels Gaschromatographie bestimmt.

Umsatz: 74% ϵ -Caprolacton (**3**), 20% Cyclohexanon (**2**), 10% Cyclohexanol (**1**).

7.2.1.5.2 Variation des Lösungsmittels

Die Synthesen erfolgen analog der AAV 1. Dazu werden jeweils CHMO (3.82 U, 20.1 mg), Cyclohexanol (**1**, 0.2 mmol), MgCl_2 (1 mM) sowie Lk-ADH (40 U, 210.5 μL) und NADP^+ (1 mol-%, 1.57 mg) eingesetzt und für 24 h bei RT gerührt. Als Lösungsmittel dient zum einen ein mit organischem Co-Solventien versetzter KPi -Puffer (pH 7, 50 mM) bzw. dest. Wasser. Zum anderen wird KPi -Puffer (pH 7, 50 mM) bzw. dest. Wasser mit dem Co-Solvenz (je 10 mL) für 24 h bei RT und 1200 rpm gerührt um eine gesättigte wässrige Phase zu erhalten. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 1. Die Umsätze zu **2** und **3** sowie die Stoffmenge des nicht umgesetzten Edukts **1** werden entweder mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt und auf den Standard Urotropin (**51**) bezogen oder via GC ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 aufgelistet.

Tabelle 33. Variation des Lösungsmittelgemisches bei der Doppeloxidation von Cyclohexanol (**1**).



Eintrag	Lösungsmittel-Gemisch	Stoffmenge 3 [mmol]	Stoffmenge 2 [mmol]	Stoffmenge 1 [mmol]
1 a)	KPi / MTBE 8:2	1.6	1.2	18.4
2 a)	KPi / MTBE 6:4	0.4	0.8	28.0
3 a)	$\text{KPi} / \text{EtOAc}$ 6:4	0	2.4	27.6
4 b)	$\text{KPi} / \text{Toluol}$ 9:1	23.6	3.2	8.4
5 b)	$\text{KPi} / \text{Methylcyclohexan}$ 9:1	25.6	2.0	2.4
6 b)	$\text{KPi} / \text{Isooctan}$ 9:1	34.8	2.0	2.0
7 b)	$\text{KPi} / n\text{-Heptan}$ 9:1	26.0	2.0	4.4
8 a)	MTBE-ges. KPi	13.2	1.2	3.6

Eintrag	Lösungsmittel-Gemisch	Stoffmenge 3 [mmol]	Stoffmenge 2 [mmol]	Stoffmenge 1 [mmol]
9 a)	EtOAc-ges. KP _i	0	2.8	24.4
10 a)	<i>n</i> -Heptan-ges. KP _i	14.0	1.2	3.2
11 a)	<i>n</i> -Hexan-ges. KP _i	19.6	0.8	0
12 a)	Methylcyclohexan-ges. KP _i	28.0	1.2	0
13 a)	MTBE-ges. dest. Wasser	0.8	2.0	32.0
14 a)	dest. Wasser	14.0	1.2	6.8

a) Umsatz bestimmt mittels NMR-Spektroskopie mit Urotropin (**51**) als Standard; b) Umsatz bestimmt mittels GC.

7.2.1.5.3 Variation der Reaktionsbedingungen

Die Synthesen erfolgen analog der AAV 1. Dazu werden CHMO (3.82 U, 20.1 mg) in KP_i-Puffer (pH 7, 50 mM, 5 mL), Cyclohexanol (**1**, 0.2 mmol), MgCl₂ (1 mM) sowie Lk-ADH (13 – 40 U, 70.2 - 210.5 µL) und NADP⁺ (2-10 mol-%) eingesetzt und für 24 h bei RT – 30 °C gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 1. Die produktbezogenen Umsätze werden mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 34 aufgelistet.

Tabelle 34. Variation der Reaktionsbedingungen der Oxidation von Cyclohexanol (**1**).

Eintrag	NADP ⁺ [mol-%]	Lk-ADH [U]	T [°C]	Umsatz 3 [%]	Umsatz 2 [%]
1	2	40	RT	97	3
2	10	40	RT	61	11
3	1	40	30	48	5
4	1	13	RT	55	3

7.2.1.6 Allgemeine Arbeitsvorschrift 4 (AAV 4): Untersuchung der Stabilität der Lk-ADH mittels Titrations-Apparatur

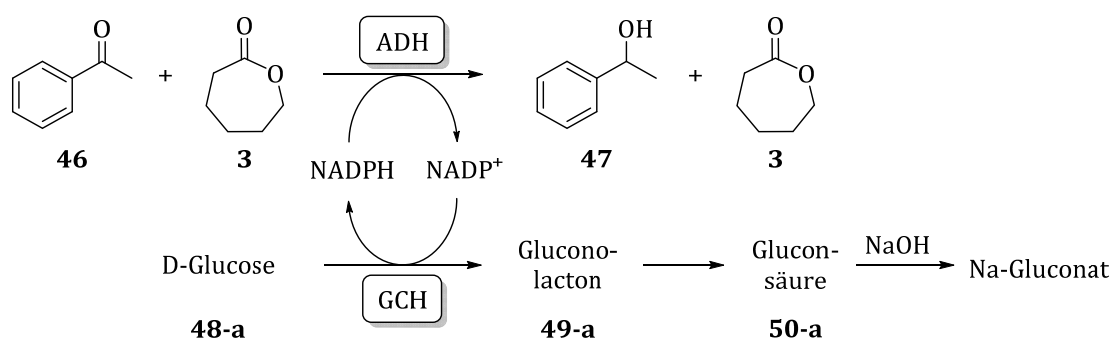


Abbildung 127. Untersuchung der Stabilität der Lk-ADH in Anwesenheit von Lacton **3**.

In einer Titrino-Apparatur werden Acetophenon (**46**, 20 mM, 21 µL), ε-Caprolacton (**3**, 10 mM – 1 M) sowie D-Glucose (**48-a**, 100 mM, 180.1 mg) in 10 mL dest. Wasser gegeben. Anschließend werden 1 mg

MgCl₂, 40 U/mmol Lk-ADH und 40 U/mmol Glucosedehydrogenase (GDH) „AMANO 2“ zugegeben und die Reaktion mit Zugabe von NADP⁺ (1 mol%, 1.57 mg) als Cofaktor für 24 h gestartet.

D-Glucose (**48-a**) dient hierbei als Regenerationsmedium für den eingesetzten Cofaktor, der durch die Verwendung von GDH zum benötigten NADPH reduziert wird. D-Glucose (**48-a**) selbst wird zunächst in Gluconolacton (**49-a**) umgewandelt, welches irreversibel zur Gluconsäure (**50-a**) gespalten wird. Durch Zugabe von Natronlauge (0.2 M) wird die gebildete Säure zum Natriumgluconat neutralisiert. Die verbrauchte Menge an Natronlauge gibt Auskunft über den Umsatz der Reaktion.

Durch Zugabe von 15 mL DCM wird die Reaktion beendet. Es wird im Scheidetrichter ausgeschüttelt und die organische Phase abgetrennt. Anschließend wird noch zweimal mit je 15 mL DCM extrahiert. Das organische Lösungsmittel wird bei 900 mbar und 40 °C Badtemperatur am Rotationsverdampfer entfernt. Der Umsatz wird ebenfalls mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt und auf den Standard Urotropin (**51**) bezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 35 aufgezeigt.

Tabelle 35. Untersuchung der Stabilität von Lk-ADH in Anwesenheit von Lacton **3**.

Eintrag	Keton 46 [M]	Lacton 3 [M]	Produktkonzentration via Titrimetrie [%]	Produktkonzentration via NMR ^{a)} [%]
1	0.02	0	25	19
2	0.02	0.01	24	16
3	0.02	0.04	30	16
4	0.02	0.10	42	15
5 ^{b)}	0.02	0.25	49	16
6 ^{b)}	0.02	1.00	50	14
7 ^{b)}	0	0.25	0	0

a) Umsatz bestimmt mittels Urotropin (**51**) als externer Standard; b) automatischer Abbruch der Reaktion nach 3.5 h.

7.2.1.7 Variation des Substrates

7.2.1.7.1 3,5,5-Trimethylcyclohexanol (**53**) als Substrat

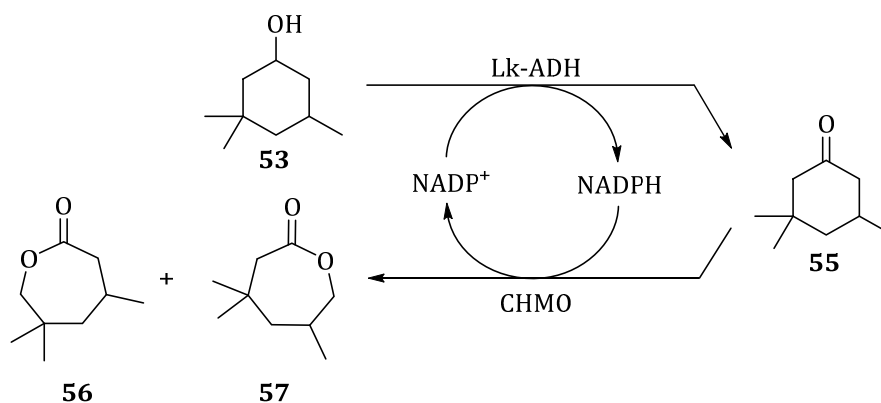


Abbildung 128. Doppeloxidation von 3,5,5-Trimethylcyclohexanol (**53**).

Die Synthesen erfolgen analog der AAV 1. Dazu werden jeweils CHMO (3.82 U, 20.1 mg), 3,5,5-Trimethylcyclohexanol (**53**, 0.2 mmol), MgCl₂ (1 mM) sowie Lk-ADH (40 U, 210.5 µL) und NADP⁺ (1 mol-%) eingesetzt und für 24 h bei RT gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 1. Die Konzentrationen der Komponenten wird sowohl mittels ¹H-NMR-Spektroskopie, bezogen auf den Standard Urotropin (**51**), sowie mittels Gaschromatographie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 36 aufgelistet.

Tabelle 36. 3,5,5-Trimethylcyclohexanol (**53**) als Substrat.

Eintrag	Analytik	Konzentration 53 [mM]	Konzentration 55 [mM]	Konzentration 56 / 57 [mM]
1	¹ H-NMR	28.4	0	0
2	GC	38.8	0	1.2

7.2.1.7.2 Isophoron (**52**) als Substrat

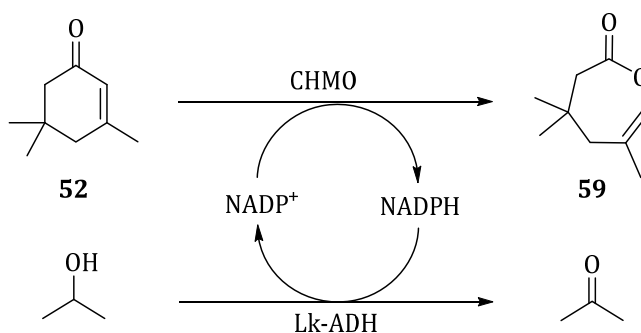


Abbildung 129. Oxidation von Isophoron (**52**) mit Lk-ADH als Regenerationssystem.

In einem 10 mL-Rundkolben wird Rohextrakt der CHMO (3.82 U, 20.1 mg) in KP_i-Puffer (pH 7.0, 50 mM, 5 mL) aufgenommen und gut geschüttelt. Isophoron (**52**, 0.2 mmol, 27.6 mg), MgCl₂ (1mM), Lk-ADH (40 U, Rohextrakt/Glycerin 1:1 (v/v)) sowie *i*-PrOH (1.25 ml) werden zugegeben. Das Gemisch wird für 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von NADP⁺ (1 mol-%, 1.57 mg) wird die Reaktion gestartet und die Mischung für eine bestimmte Zeit bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 1. Die Konzentration wird mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt und auf den Standard Urotropin (**51**) bezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 37 aufgelistet.

Tabelle 37. Isophoron (**52**) als Substrat.

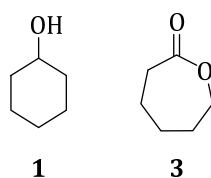
Eintrag	Analytik	Konzentration 52 [mM]	Konzentration 59 [%]
1	¹ H-NMR	23.6	0
2	GC	39.9	1

7.2.1.8 Verwendung von Adsorberharzen

7.2.1.8.1 Bestimmung der Rückgewinnungsrate in Anwesenheit von XAD-7 und XAD-1180

Zur Bestimmung der Rückgewinnungsrate werden Cyclohexanol (**1**) bzw. das Lacton **3** (0.2 mmol) in KP_T -Puffer (pH 7, 50 mM) mit XAD-7 bzw. XAD-1180 (100 – 200 mg) für 20 h bei RT gerührt. Die Harzkügelchen werden abfiltriert und zunächst mit dest. Wasser (3 x 20 mL) und anschließend mit DCM bzw. MTBE (3 x 20 mL) gewaschen und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird mit DCM bzw. MTBE (3 x 20 mL) extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint und das Lösungsmittel bei 900 mbar und 40 °C entfernt. Der Umsatz wird mittels 1H -NMR-Spektroskopie bestimmt und auf den Standard Urotropin (**51**) bezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 38 aufgelistet.

Tabelle 38. Bestimmung der Rückgewinnungsrate in Anwesenheit der Adsorberharze XAD-7 bzw. XAD-1180.



Eintrag	Substanz	Harz / [mg]	Solvenz	Rückgewinnung [%]
1	1	XAD-7 / 100	DCM	46
2	3	XAD-7 / 100	DCM	68
3	3	XAD-7 / 200	DCM	74
4	3	XAD-7 / 100	MTBE	30
5	1	XAD-1180 / 100	DCM	89
6	1	XAD-1180 / 200	DCM	41

7.2.1.8.2 Doppeloxidation von Cyclohexanol (**1**) in Anwesenheit von XAD-7

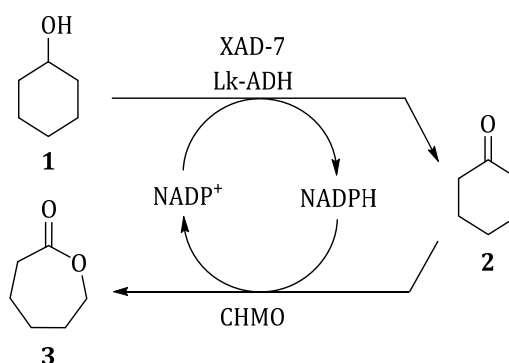


Abbildung 130. Doppeloxidation von Cyclohexanol (**1**) in Anwesenheit von XAD-7.

Die Synthese erfolgt analog der AAV 1. Dazu werden CHMO (3.82 U, 20.1 mg), Cyclohexanol (**1**, 0.2 mmol), XAD-7 (100 mg), $MgCl_2$ (1 mM) sowie Lk-ADH (40 U, 210.5 μ L) und $NADP^+$ (1 mol-%) in KP_T -Puffer (pH 7, 50 mM, 5 mL) eingesetzt und für 24 h bei RT gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog

der AAV 1. Der Umsatz wird mittels ^1H -NMR-Spektroskopie bestimmt und auf den Standard Urotropin (**51**) bezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 39 aufgelistet.

Tabelle 39. Doppeloxidation von Cyclohexanol (**1**) in Anwesenheit von XAD-7.

Umsatz 3 [%]	Umsatz 2 [%]	Zurückgewonnene Stoffmenge 1 + 2 + 3 [%]
24	3	50

7.2.2 Enantioselektive Racematspaltung von Aminen mittels Lipasen

7.2.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift 5 (AAV 5): Synthese von Referenzverbindungen

Zum jeweiligen *rac*-Amin wird der entsprechende Acyldonor (1 Äq.) gegeben und für die angegebene Reaktionszeit zum Rückfluss (Ölbad auf 180 °C) erhitzt (Abbildung 131).^[253] Der produktbezogene Umsatz wird mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie aufgereinigt, um das isolierte *rac*-Amid zu erhalten.

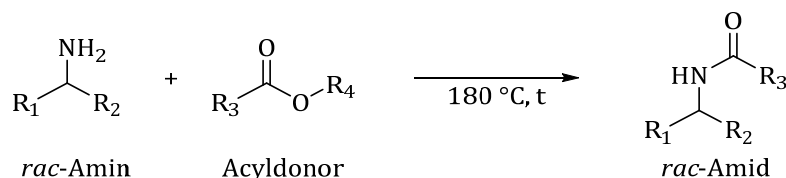
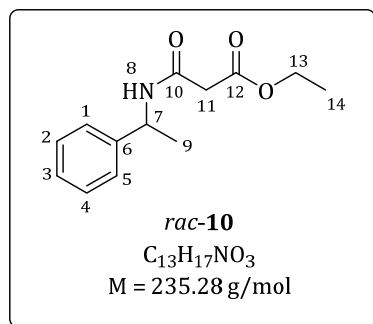


Abbildung 131. Synthese der Referenzverbindungen.^[253]

7.2.2.1.1 Synthese des DL-Ethyl-3-oxo-3-(1-phenylethylamino)propanoats (*rac*-10)

Die Synthese erfolgt analog der AAV 5.^[253] Zu 1-Phenylethylamin (*rac*-4, 2.7 mmol, 327.3 mg) wird Malonsäurediethylester (**9**, 15.1 mmol, 2.4 g) gegeben und für 4 h zum Rückfluss erhitzt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (Laufmittel: CH/EtOAc 2:1). Das Amid *rac*-10 wird als farbloser Feststoff erhalten.

Umsatz: 85%; Ausbeute: 71% (448.6 mg, 1.9 mmol).



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1.28 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H, H-14), 1.51 (d, ³J = 6.9 Hz, 3H, H-9), 3.32 (d, ³J = 4.9 Hz, 2H, H-11), 4.19 (q, ³J = 7.2 Hz, 2H, H-13), 5.15 (q, ³J = 7.2 Hz, 1H, H-7), 7.24 – 7.36 (m, 5H, H^{ar}), 7.50 (m, 1H, H-8).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): 14.16 (C-14), 22.22 (C-9), 41.21 (C-11), 49.04 (C-7), 61.69 (C-13), 126.19 (C-1, C-5), 127.46 (C-3), 128.80 (C-2, C-4), 143.16 (C-6), 164.12 (C-10), 169.83 (C-12).

HPLC: AD-H-Säule, 95:5 (*n*-Hexan/*i*-PrOH, v/v), 210 nm, flow: 0.8 mL/min, $t_R = 16.9\text{ min (R)}, 26.7\text{ min (S)}$, *ee*-Wert: 0%.

IR (ATR): (cm⁻¹) = 3276.0, 3064.4, 2977.5, 2930.4, 2359.4, 1735.8, 1642.7, 1541.0, 1448.4, 1367.9, 1152.8, 1031.6, 943.8, 761.0, 698.3, 613.8, 537.9.

MS (ESI): m/z (%) = 258.1 (100) [M+Na]⁺, 356.3 (3), 437.3 (5), 493.2 (31) [2M+Na]⁺.

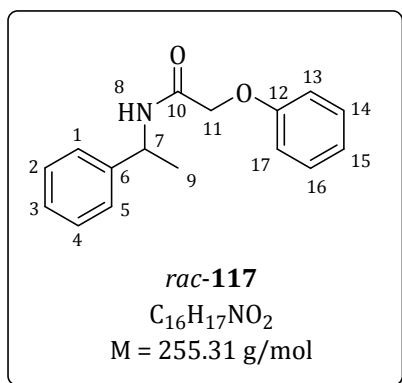
EA (C₁₃H₁₇NO₃): berechnet: C: 61.95%, H: 8.98%, N: 6.57%, O: 22.50%; gefunden: C: 61.08%, H: 8.99%, N: 6.47%, O: 23.46%.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.^[273]

7.2.2.1.2 Synthese des 2-Phenoxy-N-(1-phenylethyl)acetamids (*rac*-121)

Die Synthese erfolgt analog der AAV 5.^[253] Zu *rac*-1-Phenylethylamin (*rac*-4, 0.5 mmol, 61.0 mg) wird Phenoxyessigsäureethylester (**122**, 0.5 mmol, 90.6 mg) gegeben und für 5 h zum Rückfluss erhitzt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (Laufmittel: CH/EtOAc 3:2). Das Produkt wird als farbloser Feststoff erhalten.

Umsatz: 81%, Ausbeute: 37% (47.2 mg, 0.18 mmol).



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1.56 (d, ³J = 7.0 Hz, 3H, H-9), 4.51 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H, H-11), 5.24 (qui, ³J = 7.5 Hz, 1H, H-7), 6.79 (br, 1H, H-8), 6.92 (d, ³J = 8.5 Hz, 2H, H^{ar}), 7.03 (t, ³J = 7.5 Hz, 1H, H^{ar}), 7.27 – 7.36 (m, 5H, H^{ar}), 7.50 (m, 1H, H-8).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): 21.96 (C-9), 48.43 (C-7), 67.51 (C-11), 114.86 (C^{ar}), 122.30 (C^{ar}), 126.24 (C^{ar}), 127.61 (C^{ar}), 128.85 (C^{ar}), 129.92 (C^{ar}), 142.80 (C-5), 157.26 (C-12), 167.44 (C-10).

HPLC: AD-H-Säule, 95:5 (*n*-Hexan/*i*-PrOH, v/v), 210 nm, flow:

0.8 mL/min, t_R = 15.11 min (*R*), 16.18 min (*S*), *ee*-Wert: 0%.

IR (ATR): (cm⁻¹) = 3269.9, 3062.6, 3970.0, 2929.9,

MS (ESI): m/z (%) = 278.1 (80) [M+Na]⁺, 410.7 (12), 533.1 (100) [2M+Na]⁺.

Die spektroskopischen Daten sind nicht literaturbekannt.

7.2.2.1.3 Synthese des 2-Cyano-N-(1-phenylethyl)-acetamids (*rac*-123)

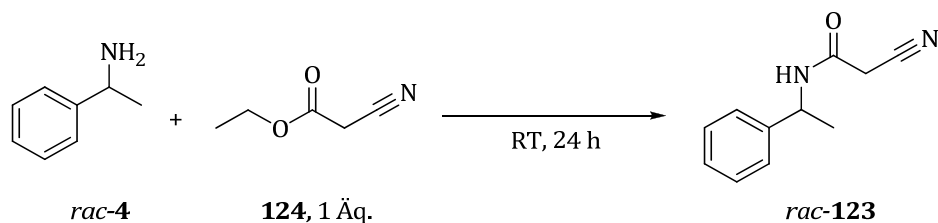
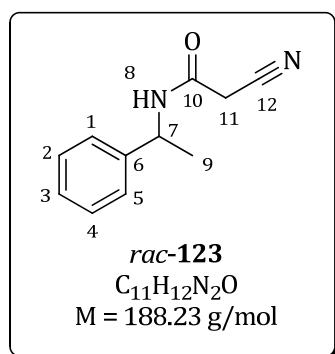


Abbildung 132. Synthese des Cyano-Amids *rac*-123.^[254]

Zu *rac*-1-Phenylethylamin (*rac*-4, 0.5 mmol, 59.8 mg) wird Cyanessigsäureethylester (**124**, 0.5 mmol, 57.7 mg) zugegeben und für 24 h bei RT gerührt (Abbildung 132).^[254] Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Laufmittel: CH/EtOAc 2:3) aufgereinigt. Das Produkt wird als farbloser Feststoff erhalten.

Umsatz: 40%, Ausbeute: 36% (33.9 mg, 0.18 mmol).



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 1.56 (d, $^3J = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, H-9), 3.35 (d, $^3J = 2.5 \text{ Hz}$, 2H, H-11), 5.12 (qui, $^3J = 7 \text{ Hz}$, 1H, H-7), 6.29 (br, 1H, H-8), 7.29 – 7.38 (m, 5H, H^{ar}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 21.60 (C-8), 26.04 (C-11), 50.12 (C-7), 114.85 (C-13), 126.27 (C^{ar}), 128.01 (C^{ar}), 129.02 (C^{ar}), 141.99 (C-5), 160.09 (C-10).

HPLC: AD-H-Säule, 95:5 (*n*-Hexan/*i*-PrOH, v/v), 210 nm, flow: 0.8 mL/min, $t_{\text{R}} = 17.14 \text{ min}$ (*R*), 21.38 min (*S*), *ee*-Wert: 0%.

IR (ATR): (cm^{-1}) = 3275.3, 3064.8, 2966.1, 2919.9, 2357.5, 2341.2, 2256.4, 1644.8, 1550.2, 1445.2, 1355.0, 1241.6, 1195.0, 1106.6, 934.9, 748.5, 684.3, 597.8, 587.6, 528.2.

MS (ESI): m/z (%) = 211.0 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 316.2 (4), 353.3 (13), 399.1 (52) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 437.2 (6), 569.2 (3).

EA ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$): berechnet C: 70.19%, H: 6.43%, N: 14.88%, O: 8.50; gefunden: C: 70.53%, H: 6.66%, N: 3.93%, O: 6.69%.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.^[254]

7.2.2.1.4 Synthese des *N*-(1-Phenylethyl)acetamids (*rac*-7)

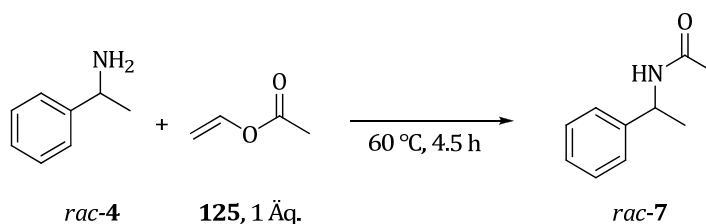
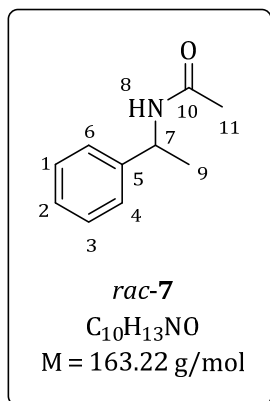


Abbildung 133. Acylierung von *rac*-4 mit Essigsäurevinylester (**125**).

Zu 1-Phenylethylamin (*rac*-4, 0.5 mmol, 59.8 mg) wird Essigsäurevinylester (**125**, 0.5 mmol, 57.7 mg) zugegeben und für 4.5 Stunden bei 60 °C gerührt. Das Rohprodukt wird in dest. H_2O (0.5 mL) aufgenommen und mit DCM extrahiert. Das Produkt wird als gelbes Öl erhalten.

Umsatz: 95%.



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 1.49 (d, $^3J = 6.9 \text{ Hz}$, 3H, H-9), 1.98 (s, 3H, H-11), 5.13 (qui, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, 1H, H-7), 5.71 (br, 1H, H-8), 7.25 – 7.36 (m, 5H, H^{ar}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 21.82 (C-9), 23.56 (C-11), 48.91 (C-7), 114.85 (C-13), 126.32 (C-6, C-5), 127.49 (C-2), 128.78 (C^{ar}), 143.28 (C-5), 169.25 (C-10).

HPLC: AD-H-Säule, 95:5 (*n*-Hexan/*i*-PrOH, v/v), 210 nm, flow: 0.8 mL/min, $t_{\text{R}} = 27.39 \text{ min}$ (*R*), 37.85 min (*S*), *ee*-Wert: 0%.

IR (ATR): (cm^{-1}) = 3733.9, 3278.5, 2974.9, 2358.8, 2340.8, 1646.2, 1541.3, 1473.4, 1447.8, 1370.5, 1296.7, 1274.5, 1209.7, 1138.5, 1028.3, 728.9, 638.2, 519.8, 499.2.

MS (ESI): m/z (%) = 186.0 (100) $[M+Na]^+$, 393.3 (15), 556.3 (5).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.^[274]

7.2.2.1.5 Synthese des 2-Phenyl-*N*-(1-phenylethyl)acetamids (*rac*-126)

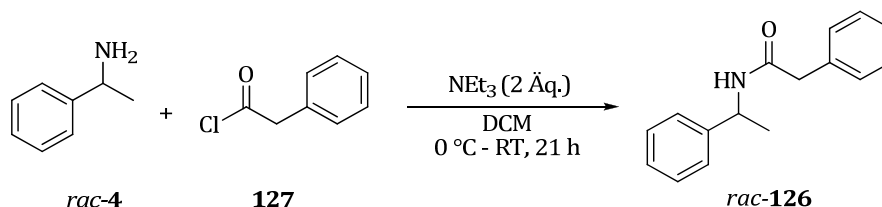
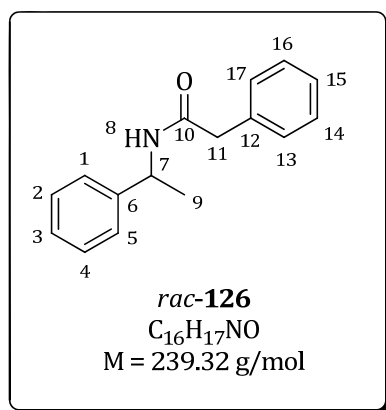


Abbildung 134. Acylierung von *rac*-4 mit 2-Phenylacetylchlorid (**127**).^[255]

Zu 1-Phenylethylamin (*rac*-4, 2 mmol, 0.24 g), gelöst in DCM (2.5 mL), wird NEt_3 (4 mmol, 0.57 mL) gegeben und für 10 Minuten auf 0 °C gekühlt (Abbildung 134).^[255] 2-Phenylacetylchlorid (**127**, 2 mmol, 0.27 mL) wird zugetropft und für 21 h bei Raumtemperatur gerührt. Ammoniumchlorid-Lösung wird zugegeben und die Phasen werden getrennt. Die wässrige Phase wird mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (3x) gewaschen, die vereinten organischen Phasen werden mit DCM (3x) extrahiert und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird i.Vak. entfernt. Das Produkt wird als farbloser Feststoff erhalten.

Umsatz: >99%, Ausbeute: 80% (0.38 g, 1.61 mmol).



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 1.40 (d, $^3J = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, H-9), 3.58 (s, 2H, H-11), 5.12 (qui, $^3J = 7.0 \text{ Hz}$, 1H, H-7), 5.61 (br, 1H, H-8), 7.18 – 7.37 (m, 12H, H^{ar}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 21.92 (C-9), 44.04 (C-11), 48.86 (C-7), 126.07 (C-1, C-5), 127.42 (C-3), 127.49 (C-15), 128.75 (C-2, C-4), 129.16 (C-16, C-14), 129.51 (C-17, C-13), 135.01 (C-13), 143.17 (C-6), 170.13 (C-10).

HPLC: AD-H-Säule, 95:5 (*n*-Hexan/*i*-PrOH, v/v), 210 nm, flow: 0.8 mL/min, $t_R = 24.14 \text{ min}$ (*R*), 3.51 min (*S*), *ee*-Wert: <1%.

IR (ATR): (cm^{-1}) = 3317.6, 3057.3, 3014.9, 2973.3, 2910.0, 2359.1, 1716.3, 1646.0, 1525.6, 1493.8, 1450.1, 1341.8, 1243.2, 1209.1, 1130.6, 1072.0, 1027.5, 952.6, 905.7, 756.4, 692.8, 532.2.

MS (ESI): m/z (%) = 262.1 (81) $[M+Na]^+$, 303.2 (13), 379.4 (100), 437.3 (57), 502.2 (7) $[2M+Na]^+$, 559.4 (7).

EA ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}$): berechnet C: 80.30%, H: 7.16%, N: 5.85%, O: 6.69; gefunden: C: 68.55%, H: 6.23%, N: 3.93%, O: 8.43%.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.^[275]

7.2.2.1.6 Synthese des 2-Methoxy-*N*-(1-phenylethyl)acetamids (*rac*-8)

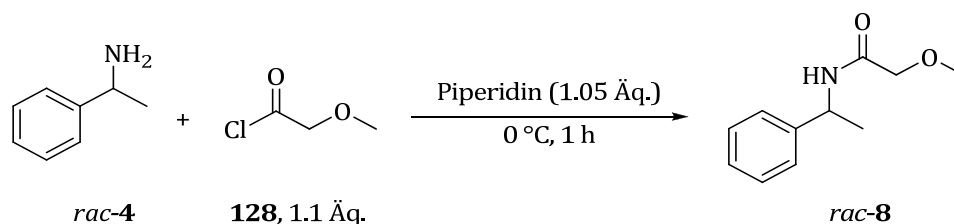
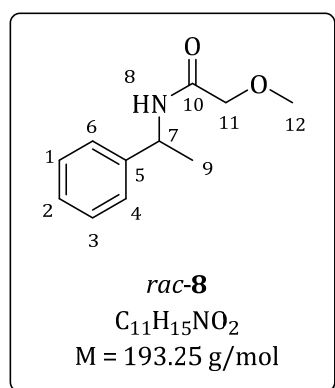


Abbildung 135. Acylierung von *rac*-4 mit 2-Methoxyacetylchlorid (**128**).^[256]

Zu 1-Phenylethylamin (*rac*-4, 1.25 mmol, 161.8 μL) wird bei 0 $^\circ\text{C}$ Piperidin (1.05 \u00c4q., 103.8 μL) zugegeben (Abbildung 135).^[256] Es wird mit 2-Methoxyacetylchlorid (**128**, 1.1 \u00c4q., 131.5 μL) versetzt und f\u00fcr 1 h unter Eisbadk\u00fchlung ger\u00fchrt. Das erhaltene farblose \u00d6l wird in DCM aufgenommen und die Phasen werden getrennt. Die organische Phase wird mit HCl (1M, 2x), mit ges. Natriumchlorid-L\u00f6sung (2x) sowie mit ges. Natriumhydrogencarbonat-L\u00f6sung (2x) gewaschen und \u00fcber MgSO_4 getrocknet. Das L\u00f6sungsmittel wird i.Vak. entfernt. Das Produkt wird als farbloser Feststoff erhalten.

Umsatz: >99%, Ausbeute: 95% (227.8 mg, 1.18 mmol).



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 1.52 (d, $^3J = 7.0 \text{ Hz}$, 3H, H-12), 3.40 (s, 3H, H-12), 3.90 (d, $^3J = 10.5 \text{ Hz}$, 2H, H-11), 5.18 (qui, $^3J = 7.0 \text{ Hz}$, 1H, H-7), 6.75 (br, 1H, H-8), 7.25 – 7.28 (m, 1H, H^{ar}), 7.31 – 7.37 (m, 4H, H^{ar}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 21.97 (C-9), 48.14 (C-7), 59.21 (C-12), 72.03 (C-11), 126.24 (C^{ar}), 127.49 (C^{ar}), 127.78 (C^{ar}), 143.01 (C-5), 167.71 (C-10).

HPLC: AD-H-S\u00e4ule, 95:5 (*n*-Hexan/*i*-PrOH, v/v), 210 nm, flow: 0.8 mL/min, $t_{\text{R}} = 13.09 \text{ min}$ (*R*), 17.47 min (*S*), *ee*-Wert: <1%.

IR (ATR): (cm^{-1}) = 3342.7, 2971.0, 2931.3, 2828.6, 1650.5, 1521.7,

1454.9, 1208.0, 1112.0, 1018.2, 977.9, 766.0, 701.1, 663.4, 614.5, 571.8, 537.5, 501.7.

MS (ESI): m/z (%) = 216.0 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 217.0 (13), 409.2 (8) $[\text{2M}+\text{Na}]^+$.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten \u00fcberein.^[276]

7.2.2.1.7 Synthese des Ethyl-3-((2,3-dihydro-1H-inden-1-yl)amino)-3-oxo-propanoats (*rac*-129)

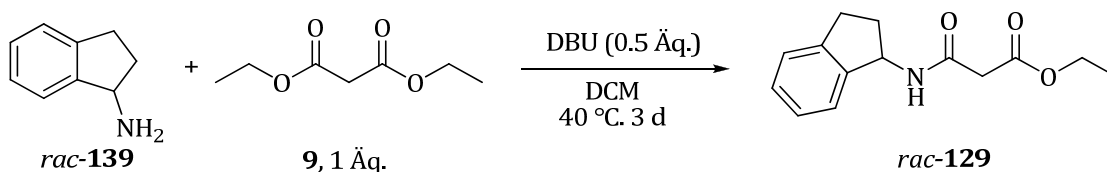
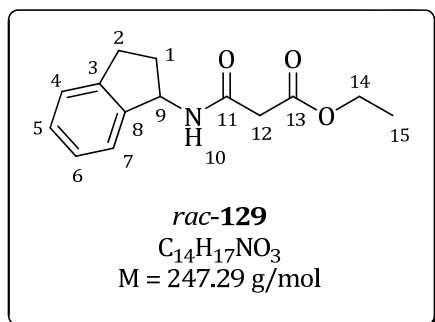


Abbildung 136. Synthese des Aminoindan-Amids *rac*-129.^[257]

Zu 1-Aminoindan (**130**, 1.0 mmol, 132.5 mg) werden Malonsäurediethylester (**9**, 1.0 mmol, 159.0 mg) und DBU (0.5 mmol, 78.0 mg) in DCM (0.2 mL) gegeben und bei 40 °C für 3 d gerührt (Abbildung 136).^[257] Der Umsatz wird mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Laufmittel CH/EtOAc 1:4) aufgereinigt um das isolierte Produkt zu erhalten. Umsatz: 43%, Ausbeute: 17% (40.6 mg, 0.17 mmol).



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1.28 (t, ³J = 7.1 Hz, 3H, H-15), 1.84 (m, 1H, H-2), 2.62 (m, 1H, H-1), 2.88 (m, 1H, H-2), 3.00 (m, 1H, H-2), 3.37 (d, ³J = 2.2 Hz, 2H, H-12), 4.19 (q, ³J = 7.2 Hz, 2H, H-14), 5.51 (q, ³J = 7.8 Hz, 1H, H-9), 7.20 – 7.30 (m, 4H, H^{ar}).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): 14.19 (C-15), 30.39 (C-1), 34.08 (C-2), 41.42 (C-12), 54.89 (C-9), 61.71 (C-14), 124.12 (C-4), 124.92 (C-7), 126.92 (C-5), 128.11 (C-6), 143.00 (C-8), 143.48

(C-3), 164.96 (C-11), 169.58 (C-13).

HPLC: AD-H-Säule, 95:5 (*n*-Hexan/*i*-PrOH, v/v), 210 nm, flow: 0.8 mL/min, t_R = 21.89 min (*R*), 28.47 min (*S*), *ee*-Wert: 0%.

IR (ATR): (cm⁻¹) = 3269.9, 3069.2, 2990.9, 2961.8, 2847.6, 2358.0, 1732.4, 1640.2, 1548.9, 1457.6, 1409.5, 1363.8, 1228.4, 1148.2, 1023.2, 749.1, 587.1, 539.3.

MS (ESI): *m/z* (%) = 270.1 (100) [M+Na]⁺, 315.2 (3), 437.2 (3), 517.1 (5) [2M+Na]⁺.

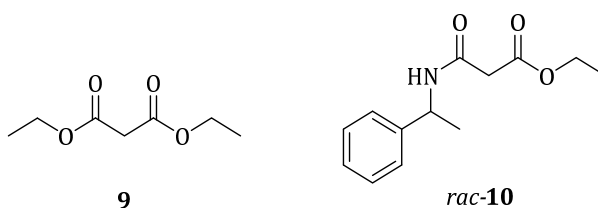
EA (C₁₄H₁₇NO₃): berechnet C: 68.00%, H: 6.93%, N: 5.66%; gefunden: C: 68.58%, H: 6.96%, N: 5.77%.

Die spektroskopischen Daten sind nicht literaturbekannt.

7.2.2.2 Analytik

7.2.2.2.1 Validierung der Aufarbeitung von AAV 5 mittels NMR-Analytik

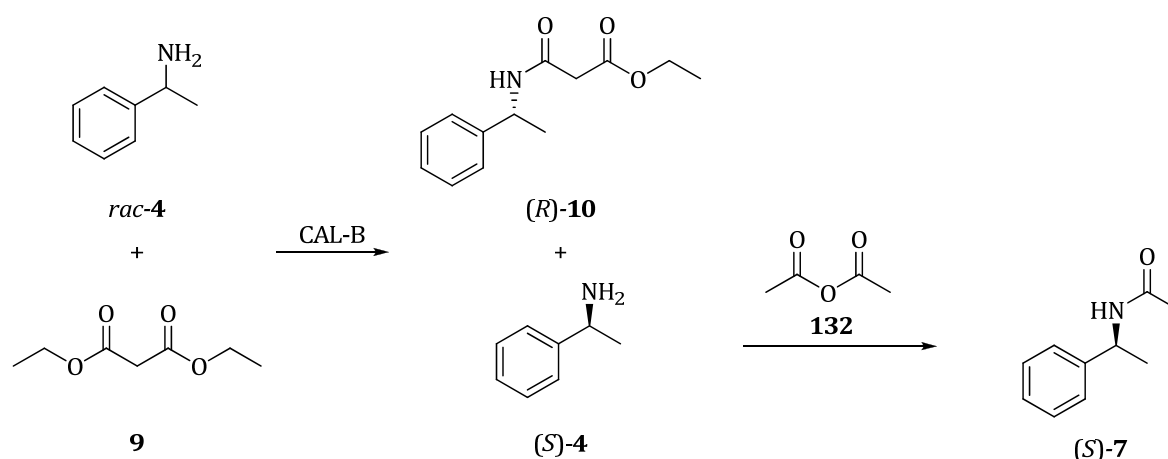
Zur Validierung der Analytik werden Malonsäurediethylester (**9**) und *rac*-**10** im Verhältnis 1:1 eingewogen. Mittels ¹H-NMR-Spektroskopie wird das Verhältnis beider Komponenten bestimmt. Anschließend erfolgt eine Aufarbeitung analog der AAV 6, indem filtriert und mit DCM und MTBE (je 10 mL) gespült wird. Das Verhältnis der beiden Komponenten wird erneut mittels ¹H-NMR-Spektroskopie ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 40 dargestellt.

Tabelle 40. Validierung der Aufarbeitung von AAV 6 mittels $^1\text{H-NMR}$ -Analytik.

Eintrag	Verhältnis 9 / <i>rac</i> -10 vor Aufarbeitung	Verhältnis 9 / <i>rac</i> -10 nach Aufarbeitung	Abweichung [%]
1	1 : 0.98	1 : 0.99	1
2	1 : 1.02	1 : 1.06	4
3	1 : 1.04	1 : 1.05	1

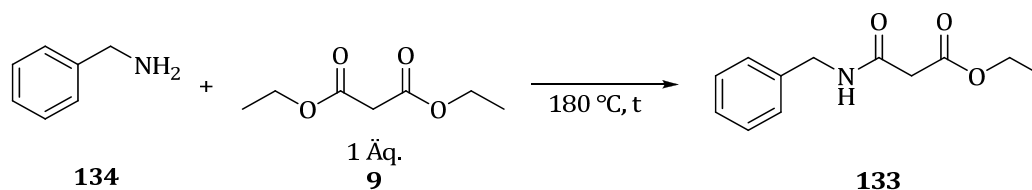
7.2.2.2.2 Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse durch chemische Acylierung des resultierenden Amins (*S*)-4

Die Synthese erfolgt analog der AAV 5. Zu *rac*-1-Phenylethylamin (*rac*-4, 0.5 mmol, 60.1 mg) werden Malonsäurediethylester (**9**, 0.5 mmol, 80.1 mg) und CAL-B (40 mg/mmol) gegeben und für 24 h bei 60 °C gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 5. Im Anschluss wird der gesamte Reaktionsansatz zusammen mit Acetanhydrid (**132**, 0.5 mmol, 47.7 μL) für 6 h bei RT in Chloroform gerührt. Das Lösungsmittel wird i.Vak. entfernt. Mittels HPLC werden die ee-Werte des Amids (*R*)-**10** bestimmt. Der ee-Wert des Amids (*S*)-**7** wurde ebenfalls mittels HPLC detektiert und mit dem berechneten Wert für (*S*)-4 verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 41 aufgelistet.

Tabelle 41. Bestimmung des Enantiomerenüberschusses des resultierenden Amins (*S*)-4.

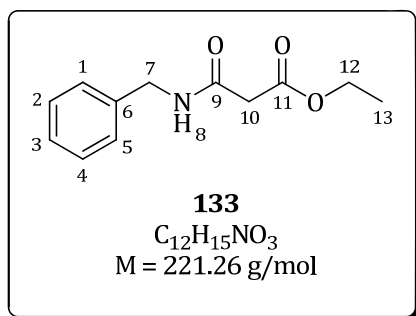
ee-Wert (<i>S</i>)-10 detektiert	ee-Wert (<i>S</i>)-4 berechnet	ee-Wert (<i>R</i>)-7 detektiert
97%	90%	88%

7.2.2.3 Vorversuche zur enzymatischen Acylierung mit Benzylaminen als Substrate

7.2.2.3.1 Synthese von Ethyl-3-(benzylamino)-3-oxopropanoat (**133**)Abbildung 137. Chemische Acylierung von Benzylamin (**134**) mit Malonsäurediethylester (**9**).^[253]

Die Synthese erfolgt analog der AAV 5.^[253] Zu Benzylamin (**134**, 10.0 mmol, 1.07 g) wird Malonsäurediethylester (**9**, 10.0 mmol, 1.60 g) gegeben und für 3 h zum Rückfluss erhitzt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (Laufmittel: CHCl₃/Aceton 85:15). Das Amid **133** wird als farbloser kristalliner Feststoff erhalten.

Umsatz: 49%, Ausbeute: 48% (1.22 g, 4.82 mmol).



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1.28 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 3H, H-13), 3.36 (s, 2H, H-10), 4.20 (q, $^3J = 7.0$ Hz, 2H, H-12), 4.49 (d, $^3J = 5.5$ Hz, 2H, H-7), 7.28 – 7.35 (m, 5H, H^{ar}), 7.45 (br, 1H, H-8).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): 14.17 (C-13), 41.21 (C-10), 43.69 (C-7), 61.74 (C-12), 127.63 (C-3), 127.82 (C-2, C-4), 128.83 (C-1, (113)C-5), 138.00 (C-6), 156.02 (C-9), 169.68 (C-11).

IR (ATR): (cm⁻¹) = 3280.4, 2977.4, 1732.2, 1638.7, 1551.2, 1499.2, 1453.8, 1364.9, 1284.0, 1214.7, 1149.2, 1027.7, 749.5,

670.4, 580.4.

DC-MS (ESI): m/z (%) = 244.9 (93) [M+Na]⁺, 260.0 (19) [M+K]⁺, 465.0 (100) [2M+Na]⁺, 466.0 (19), 906.2 (13).

MS (ESI): m/z (%) = 222.0 (10) [M]⁺, 244.0 (100) [M+Na]⁺, 260.0 (34) [M+K]⁺, 465.0 (78) [2M+Na]⁺, 466.1 (15), 906.3 (12).

EA (C₁₇H₁₈N₂O₂): berechnet C: 65.14%, H: 6.83%, N: 6.33%; gefunden: C: 65.37%, H: 7.20%, N: 6.52%.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.^[273,277]

7.2.2.3.2 Analyse des Diamids *N,N'*-Dibenzylmalonamid (**137**)

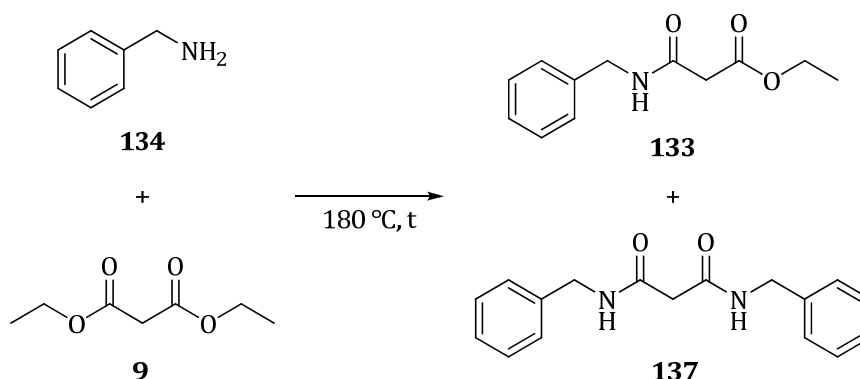
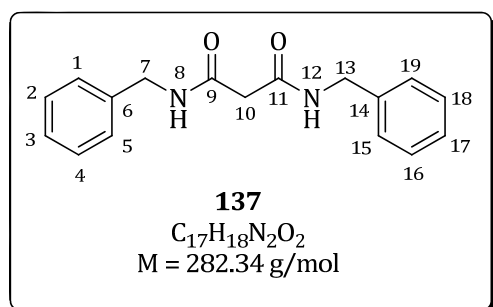


Abbildung 138. Bildung des Diamids **137** als Nebenprodukt.

Bei der chemischen Acylierung des Benzylamins (**134**) mit Malonsäurediethylester (**9**) analog der AAV 5 (Abschnitt 7.2.2.3.1) entsteht das gewünschte Benzylamid **133** (Abbildung 138).^[253] Als Nebenprodukt wird dabei das entsprechende Diamid **137** erhalten, welches durch Säulenchromatographie (Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{Aceton}$ 85:15) isoliert und als farbloser Feststoff erhalten wird.

Umsatz: 27%, Ausbeute: 20% (0.56 g, 1.98 mmol).



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 3.23 (s, 2H, H-10), 4.44 (d, $^3J = 6.0 \text{ Hz}$, 2H, H-7 + H-13), 7.18 (br, 2H, H-8 + H-12), 7.25 – 7.34 (m, 10H, H^{ar}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 43.17 (C-10), 43.76 (C-7, C-13), 127.68 (C-3, C-17), 127.81 (C-2, C-4, C-18, C-16), 128.85 (C-1, C-5, C-19, C-15), 137.80 (C-6, C-14), 167.25 (C-9, C-11).

IR (ATR): (cm^{-1}) = 3279.4, 3062.5, 2359.1, 1654.6, 1623.7, 1541.3, 1452.2, 1354.0, 1243.0, 1225.9, 1026.3, 716.8, 691.9, 604.3.

DC-MS (ESI): m/z (%) = 305.0 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 306.0 (15), 320.0 (27) $[\text{M}+\text{K}]^+$, 587.0 (73) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 588.1 (20), 967.3 (24).

MS (ESI): m/z (%) = 102.1 (100), 116.1 (68), 118.1 (30), 305.0 (35) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 321.0 (10) $[\text{M}+\text{K}]^+$, 587.0 (15) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 685 (17), 764.3 (31).

EA ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$): berechnet C: 72.32%, H: 6.43%, N: 9.92%; gefunden: C: 72.10%, H: 6.75%, N: 10.00%.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.^[278]

7.2.2.3.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift 6 (AAV 6): Enzymatische Acylierung substituierter Benzylamine

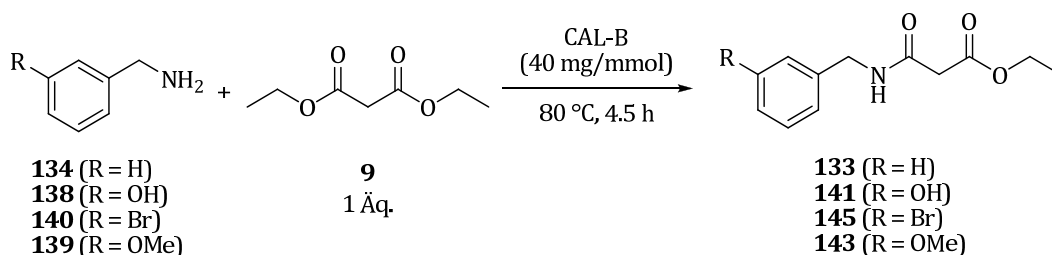


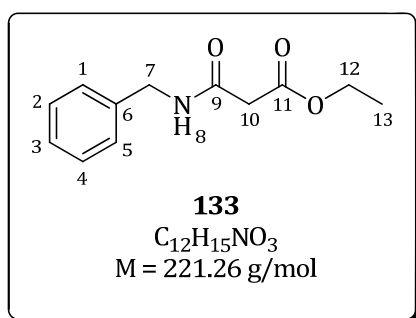
Abbildung 139. Enzymatische Acylierung substituierter Benzylamine.

Zu substituiertem Benzylamin (**134**, **138** - **140**, 0.5 - 2.5 mmol) werden Malonsäurediethylester (**9**, 1 Äq.) und CAL-B (40 mg/mmol) gegeben und bei 80 °C für 4.5 h bei 200 rpm gerührt oder im Thermoschüttler bei 300 rpm geschüttelt (Abbildung 139). Die Lipase wird abfiltriert, mit DCM und MTBE (je 10 - 40 mL) gewaschen und die Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Der Umsatz wird mithilfe von ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Das Produkt wird mittels Säulenchromatographie isoliert.

7.2.2.3.4 Enzymatische Synthese von Ethyl-3-(benzylamino)-3-oxopropanoat (**133**)

Die Synthese erfolgt analog der AAV 6. Zu Benzylamin (**134**, 0.5 mmol, 53.6 mg) werden Malonsäurediethylester (**9**, 0.5 mmol, 81.3 mg) und CAL-B (40 mg/mmol, 20 mg) gegeben und bei 80 °C für 4.5 h erhitzt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 2. Das Produkt **133** wird in einer Mischung mit dem Diamid **137** erhalten.

Umsatz: 91% **133** + 9% **137**.



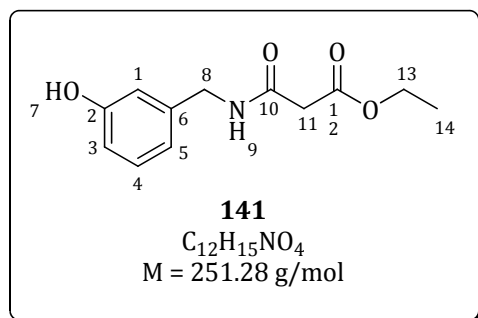
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1.28 (t, ³J = 7.0 Hz, 3H, H-13), 3.36 (s, 2H, H-10), 4.20 (q, ³J = 7.0 Hz, 2H, H-12), 4.48 (d, ³J = 5.5 Hz, 2H, H-7), 7.28 - 7.35 (m, 5H, H^{ar}), 7.45 (br, 1H, H-8).

Die analytischen Daten stimmen mit den Vergleichsdaten aus Abschnitt 7.2.1.1 und der Literatur überein.^[277]

7.2.2.3.5 Enzymatische Synthese von N-(*m*-Hydroxybenzyl)-N-ethylmalonamid (**141**)

Die Synthese erfolgt analog der AAV 6. Zu 3-Hydroxybenzylamin (**138**, 1.0 mmol, 123.8 mg) werden Malonsäurediethylester (**9**, 1.0 mmol, 162.5 mg) und CAL-B (40 mg/mmol, 40 mg) gegeben und bei 80 °C für 4.5 h gerührt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (Laufmittel: CHCl₃/Aceton 3:2). Das Produkt wird als farbloser Feststoff erhalten.

Umsatz: 38%, Ausbeute: 35% + 17% (**136**).



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 1.26 (t, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 3H, H-14), 3.36 (s, 2H, H-11), 3.80 (s, 3H, H-7), 4.18 (q, $^3J = 7.0 \text{ Hz}$, 2H, H-13), 4.46 (d, $^3J = 5.5 \text{ Hz}$, 2H, H-8), 6.75 – 6.81 (m, 3H, H^{ar}), 7.18 (t, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, H^{ar}), 7.61 (br, 1H, H-7).

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 14.07 (C-14), 41.12 (C-11), 43.66 (C-8), 61.89 (C-13), 114.80 (C-3), 114.96 (C-1), 119.31 (C-4), 129.94 (C-4), 139.18 (C-6), 156.91 (C-2),

166.03 (C-10), 169.42 (C-12).

IR (ATR): (cm^{-1}) = 3291.6, 2980.8, 2358.9, 1720.8, 1646.4, 1588.9, 1541.5, 1455.3, 1368.9, 1330.2, 1194.0, 1154.6, 1020.6, 946.9, 866.2, 780.6, 731.5, 694.3.

MS (ESI): m/z (%) = 260.0 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 497.1 (52).

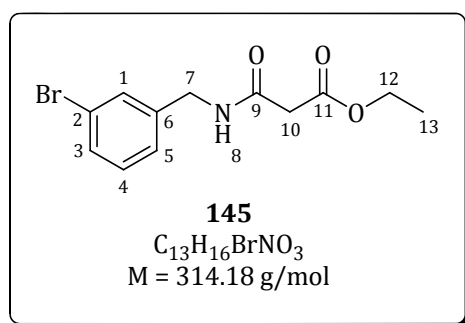
EA ($\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}_3$): berechnet C: 60.75%, H: 6.37%, N: 5.90%; gefunden; C: 59.24%, H 6.86%, N: 5.83%.

Die spektroskopischen Daten sind nicht literaturbekannt.

7.2.2.3.6 Enzymatische Synthese von *N*-(*m*-Bromobenzyl)-*N*-ethylmalonamid (**145**)

Die Synthese erfolgt analog der AAV 6. Zu 3-Brombenzylamin (**140**, 2.5 mmol, 468.5 mg) werden Malonsäurediethylester (**9**, 2.5 mmol, 404.1 mg) und CAL-B (40 mg/mmol, 200 mg) gegeben und bei 80 °C für 4.5 h gerührt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (Laufmittel: $\text{CHCl}_3/\text{Aceton}$ 85/15). Das Produkt **137** wird in Form von kristallinen Nadeln erhalten.

Umsatz: 95%, Ausbeute: 81%.



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 1.29 (t, $^3J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H, H-13), 3.37 (s, 2H, H-10), 4.20 (q, $^3J = 7.0 \text{ Hz}$, 2H, H-12), 4.46 (d, $^3J = 6.0 \text{ Hz}$, 2H, H-7), 7.18 – 7.23 (m, 2H, H^{ar}), 7.39 – 7.44 (m, 2H, H^{ar}), 7.55 (br, 1H, H-8).

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 14.19 (C-13), 41.07 (C-10), 42.97 (C-7), 61.86 (C-12), 122.85 (C-2), 126.39 (C-5), 130.37 (C-3 + C-4), 130.76 (C-1), 140.43 (C-6), 165.17 (C-9), 169.72 (C-11).

IR (ATR): (cm^{-1}) = 3234.5, 3059.8, 2973.5, 2360.5, 2341.5, 1745.7, 1635.4, 1551.8, 1416.9, 1329.3, 1275.8, 1234.8, 1143.8, 1071.7, 1030.9, 994.6, 786.5, 683.5.

MS (ESI): m/z (%) = 322.0 (95), 324.0 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 393.3 (4), 437.2 (6).

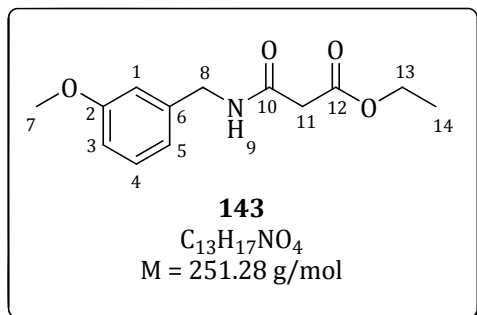
EA ($\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}_3$): berechnet C: 48.02%, H: 4.70%, N: 4.67%; gefunden: C: 47.71%, H 4.79%, N: 4.67%.

Die spektroskopischen Daten sind nicht literaturbekannt.

7.2.2.3.7 Synthese von *N*-(*m*-Methoxybenzyl)-*N*-ethylmalonamid (**143**)

Die Synthese erfolgt analog der AAV 6. Zu 3-Methoxybenzylamin (**139**, 2.5 mmol, 345.5 mg) werden Malonsäurediethylester (**9**, 2.5 mmol, 403.4 mg) und CAL-B (40 mg/mmol, 200 mg) gegeben und bei 80 °C für 4.5 h gerührt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (Laufmittel: CHCl₃/Aceton 85/15). Das Produkt **138** wird in Form von kristallinen Nadeln erhalten.

Umsatz: 95%, Ausbeute: 84%.



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1.29 (t, ³J = 7.0 Hz, 3H, H-14), 3.36 (s, 2H, H-11), 3.80 (s, 3H, H-7), 4.20 (q, ³J = 7.0 Hz, 2H, H-13), 4.46 (d, ³J = 5.5 Hz, 2H, H-8), 6.81 – 6.84 (m, 2H, H^{ar}), 6.87 – 6.88 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H, H^{ar}), 7.25 (t, ³J = 8.0 Hz, 2H, H^{ar}), 7.55 (br, 1H, H-7).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): 14.18 (C-14), 41.20 (C-11), 43.65 (C-8), 55.37 (C-7), 61.76 (C-13), 113.08 (C-1), 113.43 (C-3), 120.03 (C-5), 129.88 (C-4), 139.58 (C-6),

160.00 (C-2), 165.01 (C-10), 169.70 (C-12).

IR (ATR): (cm⁻¹) = 3229.5, 3056.8, 2978.2, 2361.0, 2341.5, 1748.1, 1635.5, 1597.8, 1553.4, 1453.1, 1325.2, 1276.3, 1134.6, 1037.7, 879.5, 792.2, 737.6, 669.9, 570.0.

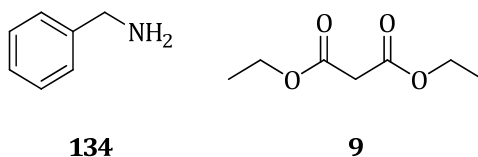
MS (ESI): m/z (%) = 322.0 (95), 324.0 (100) [M+Na]⁺, 393.3 (4), 437.2 (6).

EA (C₁₃H₁₇NO₄): berechnet C: 62.14%, H: 6.82%, N: 5.57%; gefunden; C: 61.96%, H 7.04%, N: 5.63%.

Die spektroskopischen Daten sind nicht literaturbekannt.

7.2.2.3.8 Bestimmung des Verlusts von Benzylamin (**134**) und Malonsäurediethylester (**9**)

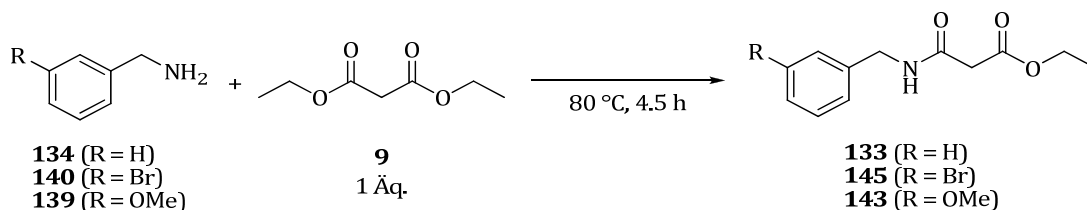
Zur Bestimmung des Verlusts von Benzylamin (**134**) und Malonsäurediethylester (**9**) während der Aufarbeitung wird eine bekannte Menge der Substanzen über einen bestimmten Zeitraum bei 230 bzw. 550 mbar und 40 °C gerührt. Durch Auswaage wird der Verlust der Substanzen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 42 aufgelistet.

Tabelle 42. Bestimmung des Verlusts von Benzylamin (**134**) und Malonsäurediethylester (**9**) während der Aufarbeitung.

Eintrag	Substanz	Zeit [min]	Verlust [mg]		Verlust [%]	
			230 mbar	550 mbar	230 mbar	550 mbar
1	134	0	0	0	0	0
2	134	15	1.1	0	10	0
3	134	30	1.8	0.5	17	3
4	134	60	2.9	1.2	28	7
5	134	120	7.2	2.1	69	12
6	9	0	0	0	0	0
7	9	15	0.4	0.1	1	0
8	9	30	0.7	0.1	2	0
9	9	60	1.3	0.5	3	1
10	9	120	4.0	0.9	9	2

7.2.2.3.9 Allgemeine Arbeitsvorschrift 7 (AAV 7): Kontrolle der chemischen Parallelreaktion der Acylierung verschiedener Benzylamine

Zu substituiertem Benzylamin (**134**, **139** bzw. **140**, 0.25 - 0.5 mmol) wird Malonsäurediethylester (**9**, 1 Äq.) gegeben und bei 80 °C für 4.5 h gerührt. Es wird analog der AAV 6 filtriert, mit DCM und MTBE (je 10 - 40 mL) gewaschen und die Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Der Umsatz wird mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 43 aufgelistet.

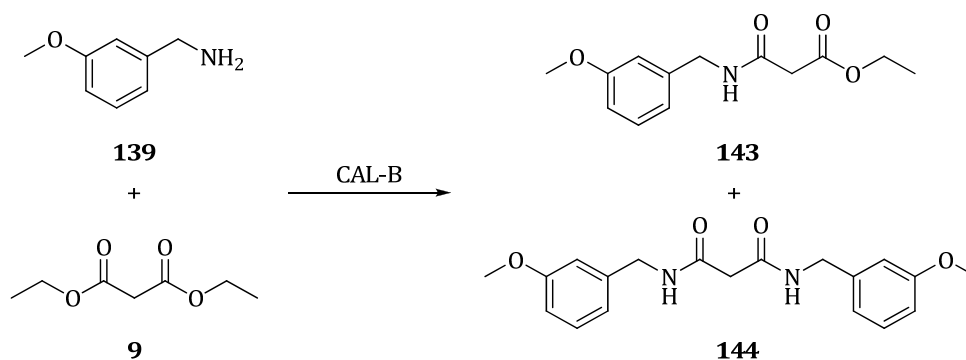
Tabelle 43. Parallel ablaufende chemische Acylierung substituierter Benzylamine.

Eintrag	Amin	Umsatz Amid [%]	Umsatz Diamid [%]
1	134	0	0
2	140	7	0
3	139	8	2

7.2.2.3.10 Untersuchungen zur Diamidbildung ausgehend von 3-Methoxybenzylamin (139)

Zu 3-Methoxybenzylamin (**139**, 0.1 mmol) werden analog der AAV 2 Malonsäurediethylester (**9**, 0.6 – 1.5 mmol) und CAL-B (40 mg/mmol) zugegeben und für 4.5 h bei 80 °C gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 6. Die Umsätze werden mittels ^1H NMR-Spektroskopie ermittelt. Die Ergebnisse werden in Tabelle 44 aufgelistet.

Tabelle 44. Untersuchungen zur Bildung des Diamids **144** bei der enzymatischen Acylierung von 3-Methoxybenzylamin (**139**).

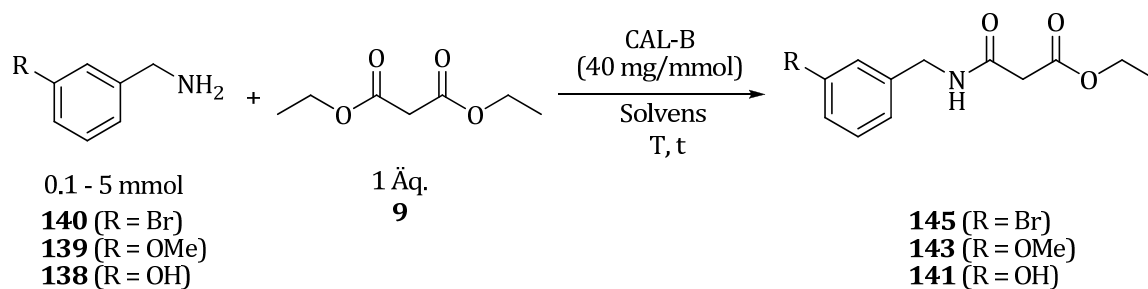


Eintrag	Malonsäurediethylester (9) [mmol]	Umsatz Amid 143 [%]	Umsatz Diamid 144 [%]
1	0.6	53	32
2	1.0	91	9
3	1.2	84	3
4	1.5	79	1

7.2.2.3.11 Lösungsmittelleffekt der enzymatischen Acylierung substituierter Benzylamine

Die enzymatische Acylierung substituierter Benzylamine (0.5 mmol) mit Malonsäurediethylester (**9**, 1 Äq.) und Lipase CAL-B (40 mg/mmol) wurde bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen untersucht. Die Synthese mit anschließender Aufarbeitung erfolgte analog der AAV 6. Die Ergebnisse sind in Tabelle 45 aufgelistet.

Tabelle 45. Einleitende Versuche zur Prozessoptimierung der enzymatischen Acylierung substituierter Benzylamine.



Eintrag	Amin	T [°C]	t [h]	Solvens	logP	Umsatz [%]
1	140	60	4.5	1,4-Dioxan	-1.10 ^{a)} / -0.30	75
2	140	60	4.5	<i>n</i> -Heptan	4.50 ^{b)}	76
3	140	60	4.5	-	-	91
4	139	60	4.5	-	-	93
5	138	80	4.5	MTBE	0.94 ^{b)}	51
6	138	80	4.5	THF	0.46 ^{b)}	75
7	138	80	4.5	2-Me-THF	1.00 ^{c)}	70
8	138	80	4.5	MeCN	-0.34 ^{b)}	43
9	138	80	4.5	<i>i</i> -PrOH	0.28 ^{b)}	22
10	138	60	4.5	<i>n</i> -Heptan	4.50 ^{b)}	45
11	138	60	4.5	EtOAc	0.73 ^{b)}	41
12	138	60	4.5	Malonester 9 (100 Äq.)	0.90 ^{c)}	50
13	138	60	4.5	Et ₂ O	0.89 ^{b)}	30
14 ^{d)}	138	RT	24	Et ₂ O	0.89 ^{b)}	30
15	138	RT	24	EtOH	-0.24 ^{a)}	5

Daten entnommen aus: a) LAANE *et al.*^[175]; b) SANGSTER *et al.*^[177]; c) Bestimmt durch *Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02*^[263]; d) Zugabe von 1.5 Äquivalenten Malonsäurediethylester (**9**).

7.2.2.4 Enzymatischen Racematspaltung von 1-Phenylethylamin (*rac*-4)

7.2.2.4.1 Standardreaktion: Racematspaltung von 1-Phenylethylamin (*rac*-4) mit Malonsäurediethylester (**9**)

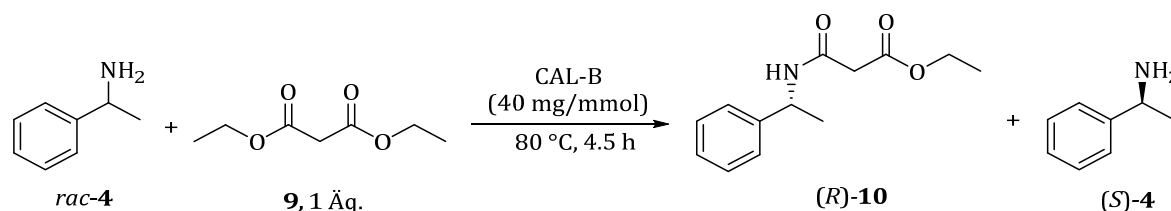
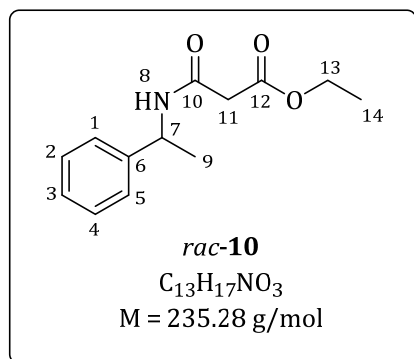


Abbildung 140. Racematspaltung von *rac*-4 mit Malonester **9**.

Die Synthese erfolgt analog der AAV 6. Zu *rac*-1-Phenylethylamin (*rac*-4, 5.0 mmol, 604.1 mg) werden Malonsäurediethylester (**9**, 5.1 mmol, 810.6 mg) und CAL-B (40 mg/mmol) gegeben und für 4.5 h bei

80 °C und 200 rpm gerührt (Abbildung 140). Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 6. Durch Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (Laufmittel: CH/EtOAc 2:1) wird das Produkt *rac*-**10** als farbloser Feststoff erhalten.

Umsatz: 44%, Ausbeute: 26% (312.0 mg, 1.3 mmol).



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1.28 (t, ³J = 7.0 Hz, 3H, H-14), 1.51 (d, ³J = 7.0 Hz, 3H, H-9), 3.31 (d, ³J = 5.0 Hz, 2H, H-11), 4.19 (q, ³J = 7.5 Hz, 2H, H-13), 5.15 (qui, ³J = 7.0 Hz, 1H, H-7), 7.24 – 7.28 (m, 1H, H^{ar}), 7.31 – 7.36 (m, 5H, H^{ar}), 7.47 (m, 1H, H-8).

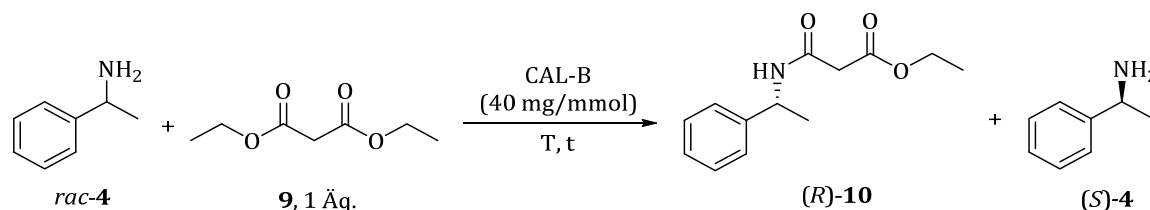
HPLC: AD-H-Säule, 95:5 (*n*-Hexan/*i*-PrOH, v/v), 210 nm, flow: 0.8 mL/min, t_R = 17.0 min (*R*), 27.1 min (*S*), *ee*-Wert: 96%.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur und in Abschnitt 7.2.2.1.1 angegebenen Werten überein.^[279]

7.2.2.4.2 Prozessoptimierung der enzymatischen Racematspaltung von *rac*-**4**

Die enzymatische Racematspaltung von 1-Phenylethylamin (*rac*-**4**) mit Malonsäurediethylester (**9**, 1 Äq.) und Lipase CAL-B (40 mg/mmol) wurde in Analogie zu AAV 6 mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen untersucht. Die Synthese erfolgte analog der AAV 6. Die Ergebnisse sind in Tabelle 46 aufgelistet.

Tabelle 46. Prozessoptimierung der enzymatischen Racematspaltung von *rac*-**4**.



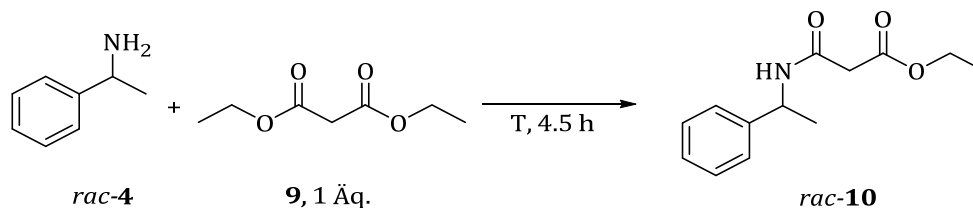
Eintrag	T [°C]	t [h]	Umsatz [%]	ee _P [%]	ees [%] ^{a)}	E
1 ^{b)}	80	4.5	42	92	67	48
2	80	4.5	46	96	82	>100
3	60	4.5	42	97	70	>100
4	60	8	46	89	76	39
5	60	24	50	94	94	>100
6 ^{c)}	40	4.5	45	99	81	>100
7	40	6	46	85	72	27
8	20	4.5	41	90	63	36
9 ^{c)}	0	4.5	24	99	n.b.	>100

a) berechnet mit „Enantioselectivity“^[258]; b) Zugabe von 0.4 mL MTBE; c) präoperative Durchführung der Versuche durch T. Geisler.

7.2.2.4.3 Untersuchung der Parallelreaktion der Acylierung von 1-Phenylethylamin (*rac*-4)

Die Synthesen werden analog der AAV 7 durchgeführt. Zu 1-Phenylethylamin (*rac*-4, 0.5 mmol) wird Malonsäurediethylester (**9**, 1 Äq.) gegeben und bei RT – 60 °C für 4.5 h gerührt. Es wird, analog der AAV 6, filtriert, mit DCM und MTBE (je 10 mL) gewaschen und die Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Der Umsatz wird mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 47 aufgelistet.

Tabelle 47. Negativkontrolle der Racematspaltung von *rac*-4 mit Malonsäurediethylester (**9**).



Eintrag	T [°C]	Umsatz <i>rac</i> -10 [%]
1	60	0
2	40	0
3	RT	0

7.2.2.4.4 Enzymatische Racematspaltung von 1-Phenylethylamin (*rac*-4) bei geringerer Enzymbeladung

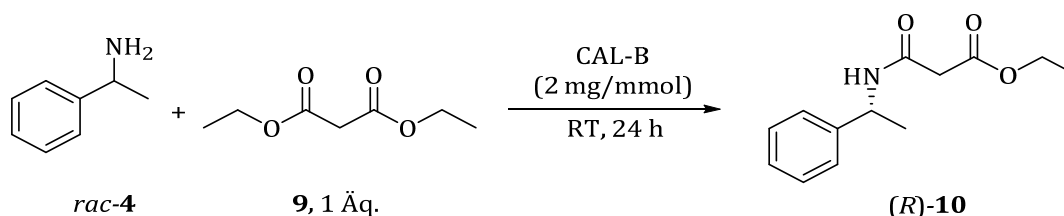


Abbildung 141. Enzymatische Racematspaltung von *rac*-4 mit Malonsäurediethylester (**9**) bei geringerer Enzymbeladung.^[264]

Zu 1-Phenylethylamin (*rac*-4, 0.49 mmol, 59.8 mg) werden Malonsäurediethylester (**9**, 0.49 mmol, 79.1 mg) und CAL-B (2 mg/mmol, 1 mg) gegeben und für 24 h bei RT und 200 rpm gerührt.^[264] Das Enzym wird abfiltriert und analog der AAV 6 mit DCM und MTBE (je 10 mL) gespült. Die Lösungsmittel werden i.Vak. entfernt. Der Umsatz wird mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

Umsatz: 25%.

HPLC: AD-H-Säule, 95:5 (CO₂/*i*-PrOH, v/v), 210 nm, flow: 0.8 mL/min, *t_r* = 21.38 min (*R*), 34.97 min (*S*), *ee*-Wert: >95%.

7.2.2.4.5 Enzymatische Racematspaltung von 1-Phenylethylamin (*rac*-**4**) bei geringerer Enzymbeladung in Et₂O

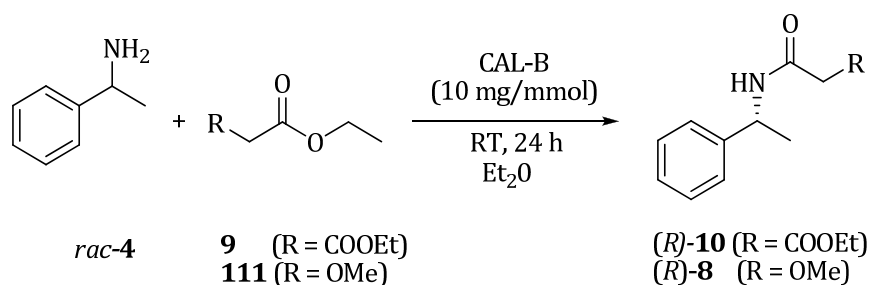


Abbildung 142. Enzymatische Racematspaltung von *rac*-**4** bei geringerer Enzymbeladung in Et₂O.^[30]

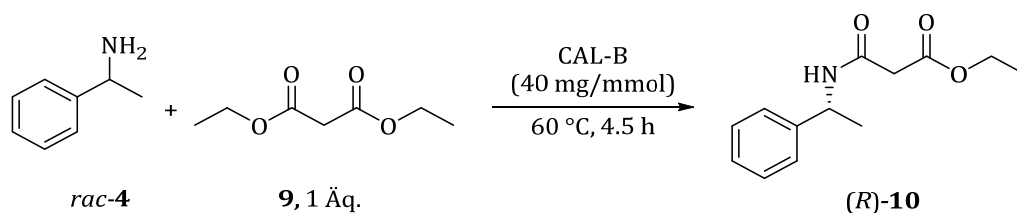
Zu 1-Phenylethylamin (*rac*-**4**, 1.25 – 2.5 mmol) werden der entsprechende Ester **9** oder **111** (1.5 Äq.) und CAL-B (10 mg/mmol) gegeben und in Et₂O (5 – 10 mL) für 24 h bei RT gerührt (Abbildung 142).^[30] Das Enzym wird abfiltriert und analog der AAV 6 mit DCM und MTBE (je 10 mL) gespült. Die Lösungsmittel werden i.Vak. entfernt. Der Umsatz wird mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 48 aufgelistet.

Tabelle 48. Enzymatische Racematspaltung von *rac*-**4** mit geringerer Enzymbeladung in Et₂O.^[30]

Eintrag	Ester	Umsatz [%]	ee [%]	E
1	9	48	95	>100
2	111	52	95	>100

7.2.2.5 Enzymrecycling

Das Enzymrecycling wird analog der AAV 6 durchgeführt. Dazu werden 1-Phenylethylamin (*rac*-**4**, 5 mmol) und Malonsäurediethylester (**9**, 5 mmol) zusammen mit der CAL-B (40 mg/mmol) für 4.5 h bei 60 °C gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 6. Die zurückerhaltene CAL-B wird getrocknet und im nächsten Zyklus eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 49 aufgelistet.

Tabelle 49. Enzymrecycling.

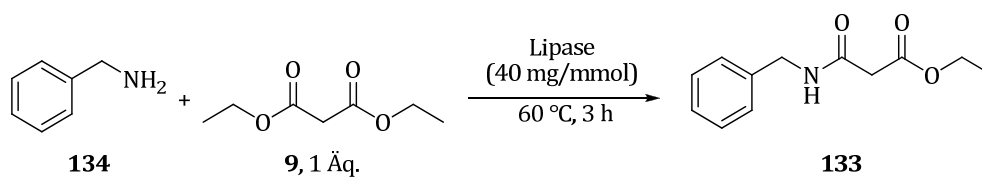
Eintrag	Zyklus	Umsatz [%]	ee _P [%]	ees [%] ^{a)}	E
1	1	43	90	68	39
2	2	30	81	35	13
3	3	25	87	n.b.	19
4	4	20	90	n.b.	26
5 ^{b)}	5	24	94	n.b.	45

a) berechnet mit „Enantioselectivity“^[258]; b) Reaktionsdauer: 6,5 h; n.b. = nicht bestimmt.

7.2.2.6 Lipasen-Screening durch Acylierung von Aminen

7.2.2.6.1 Lipasen-Screening durch Acylierung von Benzylamin (134)

Das Screening wird analog der AAV 6 durchgeführt. Dazu werden Benzylamin (**134**, 0.5 mmol) und Malonsäurediethylester (**9**, 0.5 mmol) zusammen mit der jeweiligen Lipase (20 mg) in MTBE (0.3 mL) für 3 h bei 60 °C in einem Thermomix-Schüttler bei 300 rpm geschüttelt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 6. Die Ergebnisse sind in Tabelle 50 aufgelistet.

Tabelle 50. Lipasen-Screening mittels Acylierung von Benzylamin (**134**).

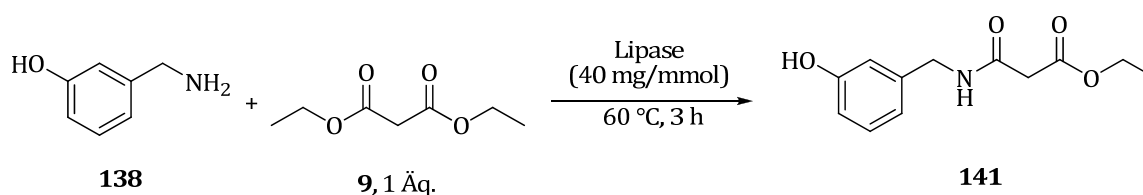
Eintrag	Lipase	Umsatz Amid 133 [%]	Umsatz Diamid 137 [%]	Gesamtumsatz [%]
1	CAL-B (Novozym 435)	89	10	>99
2	Toyobo	11	3	14
3	Hog pancreas (FLUKA)	12	3	15
4	L „AMANO“ 5	17	6	20
5	Rhizopus niveus (FLUKA)	6	1	7
6	L.P.L. „AMANO“ 100S	6	1	7
7	GC „AMANO“ 4	22	10	32
8	R „AMANO“ 10	19	9	28
9	AY „AMANO“ 30	17	6	23
10	N Conc (AMANO)	6	4	10

Eintrag	Lipase	Umsatz Amid 133 [%]	Umsatz Diamid 137 [%]	Gesamtumsatz [%]
11	AP6 (AMANO)	6	1	7
12	PS immob. auf Toyonite-200-P (AMANO)	15	3	18
13	PS immob. auf Diatomite (AMANO)	4	<1	5
14	M-AP10 (AMANO)	5	<1	5
15	F-AP15 (AMANO)	6	<1	6
16	R10 (AMANO)	12	1	13
17	CE „AMANO“ 5	18	7	25
18	D „AMANO“ 20	22	11	33
19	AK „AMANO“	13	3	16
20	AYS „AMANO“	8	1	9
21	PS „AMANO“ SD	11	3	15
22	CAL-B immob. (C-LECTA)	89	11	>99
23	CAL-B lyo. (C-LECTA)	94	6	>99

7.2.2.6.2 Lipasen-Screening durch Acylierung von 3-Hydroxybenzylamin (138)

Das Screening wird analog der AAV 6 durchgeführt. Dazu werden 3-Hydroxybenzylamin (**138**, 0.1 mmol) und Malonsäurediethylester (**9**, 0.1 mmol) zusammen mit der jeweiligen Lipase (40 mg/mmol, 4 mg) in MTBE (0.3 mL) für 3 h bei 60 °C in einem Thermomix-Schüttler bei 300 rpm geschüttelt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 6. Die Ergebnisse sind in Tabelle 51 aufgelistet.

Tabelle 51. Lipasen-Screening mittels Acylierung von 3-Hydroxybenzylamin (**138**).



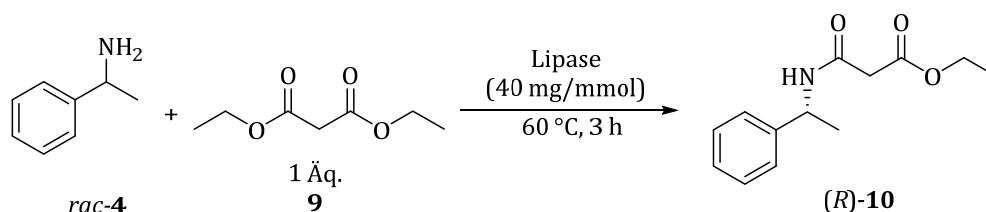
Eintrag	Lipase	Umsatz Amid 141 [%]	Umsatz Diamid 142 [%]	Gesamtumsatz [%]
1	CAL-B (Novozym 435)	52	12	60
2	L „AMANO“ 5	0	0	0
3	GC „AMANO“ 4	0	0	0
4	CE „AMANO“ 5	0	0	0
5	R „AMANO“ 10	0	0	0
6	D „AMANO“ 20	0	0	0
7	AY „AMANO“ 30	0	0	0
8	PS immob. auf Toyonite-200-P (AMANO)	47	0	47

Eintrag	Lipase	Umsatz	Umsatz	Gesamtumsatz
		Amid 141	Diamid 142	
		[%]	[%]	
9	BSA	0	0	0
10	CAL-B immob. (C-LECTA)	44	3	47
11	CAL-B lyo. (C-LECTA)	18	<1	18

7.2.2.6.3 Lipasen-Screening durch Acylierung von 1-Phenylethylamin (*rac*-4)

Die Synthesen werden nach AAV 6 durchgeführt. Dafür werden 1-Phenylethylamin (*rac*-4, 0.1 mmol) und Malonsäurediethylester (**9**, 0.1 mmol) zusammen mit der jeweiligen Lipase (4 mg) in MTBE (0.3 mL) für 3 h bei 60 °C in einem Thermomix-Schüttler bei 300 rpm geschüttelt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 6. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 aufgelistet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 52 aufgelistet.

Tabelle 52. Lipasen-Screening mittels Acylierung von 1-Phenylethylamin (*rac*-4).



Eintrag	Lipase	Umsatz [%]
1	CAL-B (Novozym 435)	46
2	L „AMANO“ 5	0
3	GC „AMANO“ 4	0
4	CE „AMANO“ 5	0
5	R „AMANO“ 10	0
6	D „AMANO“ 20	0
7	AY „AMANO“ 30	0
8	PS immob. auf Toyonite-200-P (AMANO)	<1
9	CAL-B immob. (C-LECTA)	45
10	CAL-B lyo. (C-LECTA)	13

7.2.2.7 Enzymatische Racematspaltung von 1-Phenylethylamin (*rac*-4) mit alternativen Lipasen CAL-B von c-LECTA

7.2.2.7.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift 9 (AAV 9): Vergleich der Aktivität von Lipasen von c-LECTA mittels Titration mit NaOH

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wird Puffer (KP_i, pH 7, 10 mM) mit Essigester **5** gesättigt, indem Puffer und Ester für 1 h bei RT gerührt und anschließend die Phasen getrennt werden. Zunächst wird als Referenz die Aktivität der CAL-B (Novozym 435) bestimmt. Anschließend werden die beiden Lipasen von c-LECTA, immobilisiert auf einem Methacrylat-Träger sowie lyophilisiert, vermessen. Dazu werden 20 mg Enzym in 5 mL Puffer vorgelegt und gegebenenfalls auf die entsprechende Temperatur erwärmt. Vor Beginn der Messung ist der pH-Wert des Enzym-enthaltenen Puffers zu prüfen und mithilfe der wässr. NaOH-Lösung (0.05 M) neu einzustellen. Durch Zugabe von 5 mL des EtOAc-ges. Puffers wird die Titration gestartet. Gemessen wird 1 Minute jede Sekunde, wobei der Verbrauch an wässr. NaOH-Lösung beobachtet und die Anfangssteigung bestimmt wird. Diese kann am genauesten bestimmt werden, wenn der Kurvenverlauf zu Beginn der Messung über mehrere Sekunden konstant ist. Gegebenenfalls muss die Menge des immobilisierten Enzyms reduziert bzw. die Lösung der lyophilisierten CAL-B verdünnt und die Messung entsprechend wiederholt werden. Für die Berechnung der Enzymaktivität wird die Anfangssteigung der Titration mit wässr. NaOH-Lösung (0.1 M) verwendet. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgt nach folgender Gleichung 6:

$$\frac{U}{\text{mg}} = \frac{M \cdot v \cdot f}{m} \quad \text{Gleichung 6}$$

U/mg:	Enzymaktivität
M:	Molarität der NaOH [$\mu\text{mol/mL}$]
v:	Anfangssteigung des Kurvenverlaufs [mL/sec]
f:	Umrechnungsfaktor [sec/min]
m:	Menge der Lipase in 5 mL Puffer [mg]

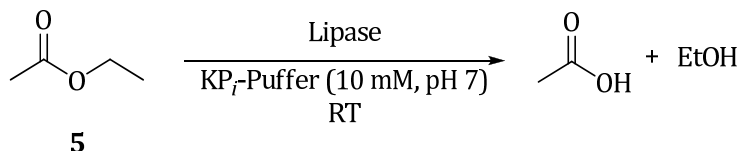
In dieser Arbeit sind $M = 50 \mu\text{mol/mL}$ und $f = 60 \text{ sec/min}$.

7.2.2.7.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten der Lipasen von c-LECTA mittels enzymatischer Spaltung des Essigesters **5** bei 20 °C

Die Spaltung des Essigesters **5** zu Essigsäure und Ethanol mit der immobilisierten sowie der lyophilisierten CAL-B von c-LECTA wird analog der AAV 7 bei 20 °C durchgeführt. Als Referenz dient die CAL-B von SIGMA ALDRICH (Novozym 435). Die für Novozym 435 erhaltene Aktivität von 855 U/g wird als

100% definiert und die jeweils gemessenen Aktivitäten der Lipasen werden auf diesen Wert bezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 53 aufgelistet.

Tabelle 53. Enzymkatalysierte Spaltung des Essigesters **5** mit unterschiedlichen Lipasen bei 20 °C.

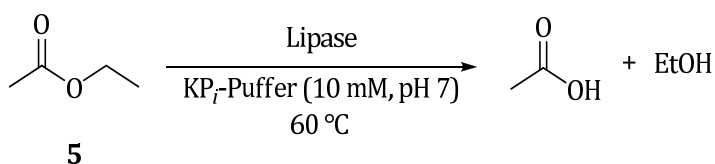


Eintrag	Lipase	Enzym [mg/mmol]	Steigung [mL/sec]	Aktivität [U/mg]	Rel. Aktivität [%]
1	Novozym 435	20	0.0057	0.855	100
2	c-LECTA immobilisiert	20	0.0039	0.585	68
3	c-LECTA lyophilisiert	1	0.0057	17.100	2000

7.2.2.7.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten der Lipasen mittels enzymatischer Spaltung des Essigesters **5** bei 60 °C

Die Spaltung des Essigesters **5** zu Essigsäure und Ethanol mit der immobilisierten sowie der lyophilisierten CAL-B von c-LECTA wird analog der AAV **5** bei 60 °C durchgeführt. Als Referenz dient die CAL-B von SIGMA ALDRICH (Novozym 435). Die für CAL-B Novozym 435 bestimmte Aktivität von 3.180 U/mg wird als 100% definiert und die jeweils gemessenen Aktivitäten der Lipasen werden auf diesen Wert bezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 54 aufgelistet.

Tabelle 54. Enzymkatalysierte Spaltung des Essigesters **5** mit unterschiedlichen Lipasen bei 60 °C.

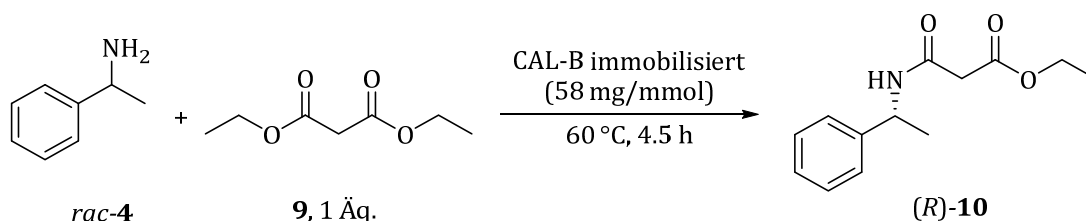


Eintrag	Lipase	Enzym [mg/mmol]	Aktivität [U/mg]	Rel. Aktivität [%]
1	Novozym 435	20	3.180	100
2	c-LECTA immobilisiert	20	2.190	69
3	c-LECTA lyophilisiert	1	31.800	1000

7.2.2.7.4 Enzymatische Racematspaltung von *rac*-4 mittels immobilisierter CAL-B von c-LECTA

Nach der AAV 6 werden 1-Phenylethylamin (*rac*-4, 0,5 mmol) und Malonsäurediethylester (**9**, 0,5 mmol) zusammen mit immobilisierter CAL-B von c-LECTA (2.190 U/mg, 29,0 mg) und MTBE (0 - 0,5 mL) für 4,5 h bei 60 °C gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 1. Die Ergebnisse sind in Tabelle 55 aufgelistet.

Tabelle 55. Enzymkatalysierte Racematspaltung von *rac*-4 mittels immobilisierter CAL-B von c-LECTA.

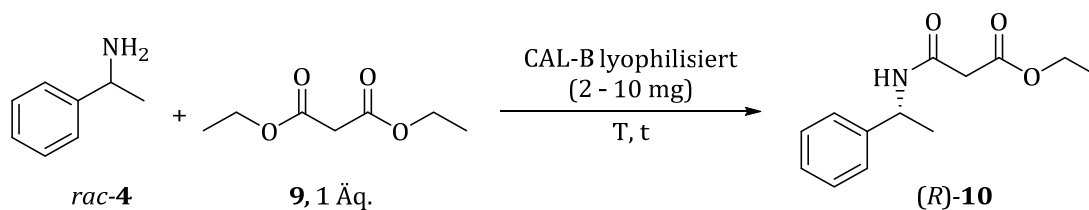


Eintrag	MTBE [mL]	Umsatz [%]	ee _P [%]	ees [%] ^{a)}	E
1	0	52	96	96	194
2	0.5	49	84	81	28

a) berechnet mit „Enantioselectivity“^[258].

7.2.2.7.5 Enzymatische Racematspaltung von *rac*-4 mittels lyophilisierter CAL-B von c-LECTA

Nach der AAV 6 werden 1-Phenylethylamin (*rac*-4, 0,5 mmol) und Malonsäurediethylester (**9**, 0,5 mmol) zusammen mit lyophilisierter CAL-B von c-LECTA (31,8 U/mg, 2 - 10 mg) für 4,5 - 24 h bei 20 - 60 °C gerührt. Gegebenenfalls erfolgt noch eine Zugabe von MTBE (0 - 0,5 mL) und dest. Wasser (10 µL). Es erfolgt keine weitere Aufarbeitung. Der Umsatz wird mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Vor der Bestimmung des ee-Wertes mittels HPLC wird die lyophilisierte CAL-B mittels Spritzenfilter abfiltriert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 56 aufgelistet.

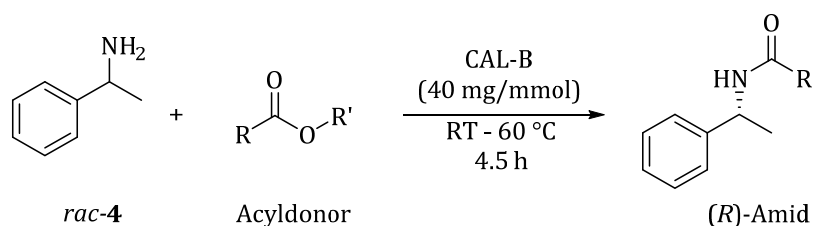
Tabelle 56. Enzymkatalysierte Racematspaltung von *rac-4* mittels lyophilisierter CAL-B von c-LECTA.

Eintrag	CAL-B [mg]	T [°C]	t [h]	Umsatz [%]	ee [%]	E
1	2	60	4.5	9	81	10
2	10	60	4.5	26	91	29
3	2	60	24	19	74	8
4	2	20	24	6	80	10
5 a)	2	60	4.5	7	87	2
6 b)	2	60	4.5	6	n.b.	n.b.

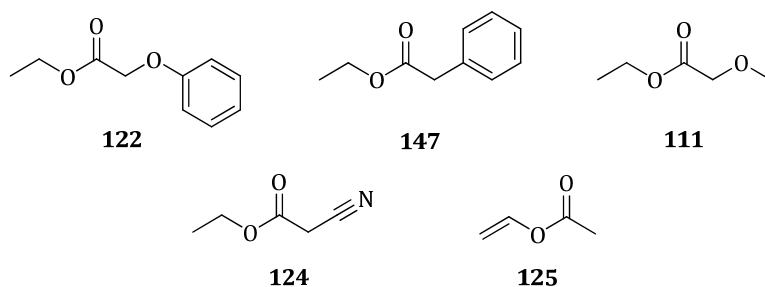
a) Zugabe von 0.5 mL MTBE; cb) Zugabe von 10 µL dest. Wasser; n.b. = nicht bestimmt.

7.2.2.8 Variation der Acyldonoren

7.2.2.8.1 Enzymatische Racematspaltung von *rac-4* mit alternativen Acyldonoren

**Abbildung 143.** Vergleich von alternativen Acyldonoren durch enzymatische Racematspaltung von *rac-4*.

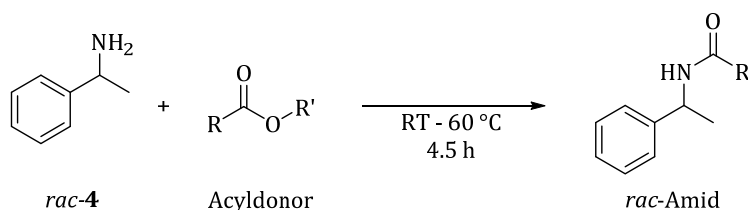
Der Vergleich der alternativen Acyldonoren erfolgt analog der AAV 6. Zu 1-Phenylethylamin (*rac-4*, 0.5 mmol) wird der entsprechende Acyldonor (1 Äq.) gegeben und bei RT – 60 °C für 4.5 h gerührt (Abbildung 143). Die Aufarbeitung erfolgt nach der AAV 6. Der Umsatz wird mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 57 aufgelistet.

Tabelle 57. Vergleich der alternativen Acyldonoren mittels Racematspaltung von *rac-4*.

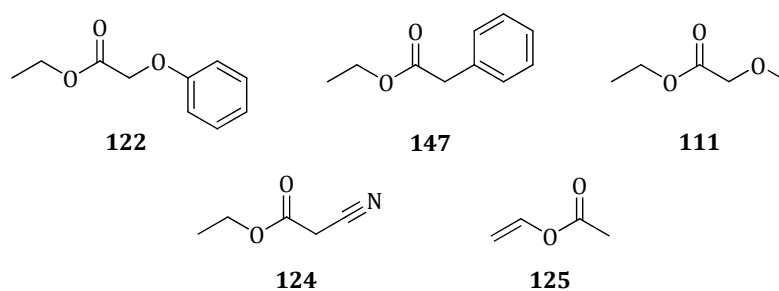
Eintrag	Acyldonor	T [°C]	Umsatz [%]	ee _R [%]	ees [%] ^{a)}	E
1	122	60	51	65	68	9
2	122	40	49	67	64	10
3	147	60	15	53	n.b.	4
4	147	40	4	n.b.	n.b.	n.b.
5	111	60	25	92	n.b.	33
6	111	40	31	82	37	14
7	111	RT	29	71	30	8
8 ^{b)}	111	RT	51	87	91	45
9	124	60	45	10	8	1
10	124	40	40	11	7	1
11 ^{c)}	125	60	16	10	n.b.	1
12 ^{c)}	125	40	17	22	n.b.	2

a) bestimmt mittels „Enantioselectivity“ ^[258]; b) Reaktionszeit t = 24 h, nach AAV 4: CAL-B = 10 mg/mmol, Et₂O = 4 mL/mmol; c) Zugabe von 0.5 mL MTBE; n.b. = nicht bestimmt.

7.2.2.8.2 Parallel ablaufende chemische Acylierung von *rac-4* mit unterschiedlichen Acyldonoren

**Abbildung 144.** Parallel ablaufende chemische Acylierung von *rac-4* mit alternativen Acyldonoren.

Die Reaktionen werden analog der AAV 7 durchgeführt. Zu 1-Phenylethylamin (*rac-4*, 0.5 mmol) wird der entsprechende Acyldonor (1 Äq.) gegeben und bei RT - 60 °C für 4.5 h gerührt (Abbildung 144). Der Umsatz wird, ohne vorherige Aufarbeitung, mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 58 aufgelistet.

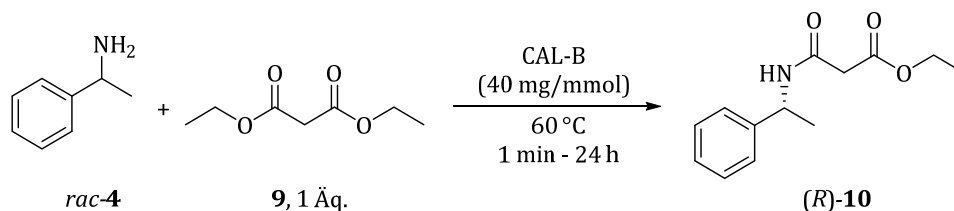
Tabelle 58. Parallel ablaufende Acylierung von *rac*-4 mit alternativen Acyldonoren.

Eintrag	Acyldonor	T [°C]	Umsatz [%]	ee _P [%]	ees [%] ^{a)}	E
1	122	60	0	-	-	-
2	122	40	0	-	-	-
3	147	60	0	-	-	-
4	147	40	0	-	-	-
5	111	60	2	n.b.	n.b.	n.b.
6	111	40	0	-	-	-
7	124	60	33	3	1	1
8	124	40	12	5	n.b.	1
9	125	60	93	0	13	1
10	125	40	81	0	4	1

a) Bestimmt mittels „Enantioselektivität“^[258]; n.b. = nicht bestimmt.

7.2.2.8.3 Kinetik der Racematspaltung von *rac*-4 mit Malonsäurediethylester (9)

Die Synthesen erfolgen analog der AAV 6. Zu 1-Phenylethylamin (*rac*-4, 0.5 mmol) werden Malonsäurediethylester (9, 1 Äq.) und CAL-B (40 mg/mmol) gegeben und bei 60 °C für 1 min – 24 h gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 6. Die Ergebnisse sind in Tabelle 59 aufgelistet.

Tabelle 59. Kinetik der enzymatischen Racematspaltung von *rac*-4 mit Malonsäurediethylester (9).

Eintrag	t [min]	Umsatz [%]	ee _P [%]	ees [%] ^{a)}	E
1	1	15	97	n.b.	78
2	5	26	95	n.b.	54
3	10	30	94	40	48
4	20	32	95	45	61
5	30	33	97	48	>100

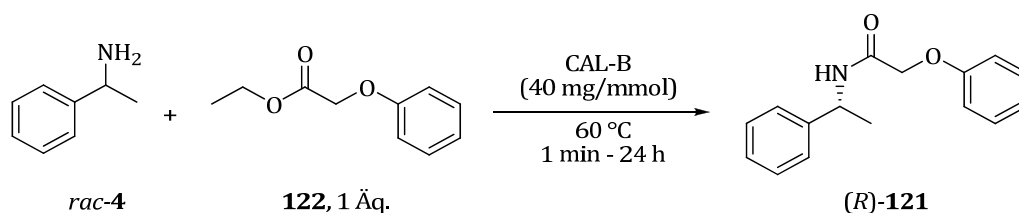
Eintrag	t [min]	Umsatz [%]	ee _P [%]	ees [%] ^{a)}	E
6	45	36	97	55	>100
7	60	37	98	58	>100
8	120	41	97	67	>100
9	180	46	98	83	>100
10	270	43	96	70	>100
11	480	45	89	73	37
12	1440	49	98	94	>100

a) Bestimmt mittels „Enantioselectivity“^[258]; n.b. = nicht bestimmt.

7.2.2.8.4 Kinetik der Racematspaltung von *rac*-4 mit Phenoxyessigsäureethylester (122)

Die Synthesen erfolgen analog der AAV 6. Zu 1-Phenylethylamin (*rac*-4, 0.5 mmol) werden Phenoxyessigsäureethylester (122, 1 Äq.) und CAL-B (40 mg/mmol) gegeben und bei 60 °C für 1 min – 24 h gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 6. Die Ergebnisse sind in Tabelle 60 aufgelistet.

Tabelle 60. Kinetik der enzymatischen Racematspaltung von *rac*-4 mit Phenoxyessigester 122.



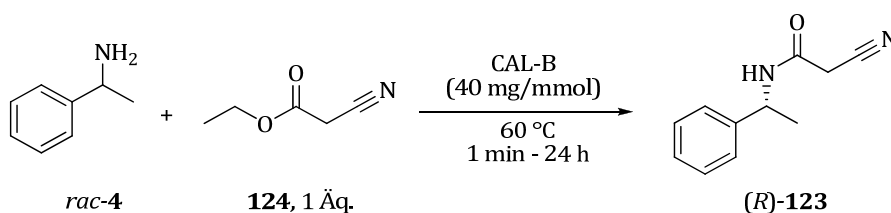
Eintrag	t [min]	Umsatz [%]	ee _P [%]	ees [%] ^{a)}	E
1	1	30	79	34	12
2	5	43	74	56	12
3	10	41	73	51	11
4	20	42	71	51	10
5	30	47	71	63	11
6	45	49	64	61	8
7	60	50	62	62	8
8	120	52	64	69	9
9	180	51	65	67	9
10	270	57	68	90	16
11	480	51	69	72	12
12	1440	56	61	78	9

a) Bestimmt mittels „Enantioselectivity“^[258]; n.b. = nicht bestimmt.

7.2.2.8.5 Kinetik der Racematspaltung von *rac*-4 mit Cyanessigsäureethylester (**124**)

Die Synthesen erfolgen analog der AAV 6. Zu 1-Phenylethylamin (*rac*-4, 0.5 mmol) werden Cyanessigsäureethylester (**124**, 1 Äq.) und CAL-B (40 mg/mmol) gegeben und bei 60 °C für 1 min – 24 h gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 6. Die Ergebnisse sind in Tabelle 61 aufgelistet.

Tabelle 61. Kinetik der enzymatischen Racematspaltung von *rac*-4 mit Cyanessigsäureethylester (**124**).

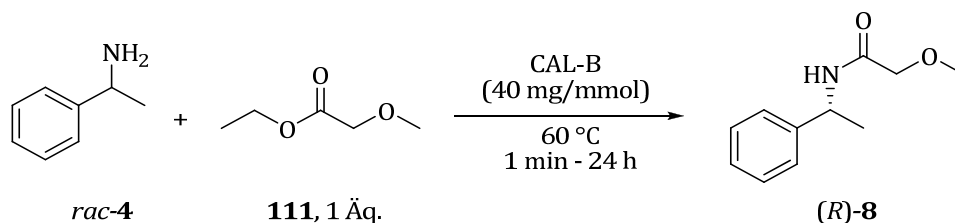


Eintrag	t [min]	Umsatz [%]	ee _P [%]	ees [%] ^{a)}	E
1	1	21	2	n.b.	1
2	5	27	4	n.b.	1
3	10	18	2	n.b.	1
4	20	20	4	n.b.	1
5	30	21	3	n.b.	1
6	45	29	2	n.b.	1
7	60	27	7	n.b.	1
8	120	29	0	n.b.	0
9	180	41	10	7	1
10	270	48	10	9	1
11	480	51	12	12	1
12	1440	65	2	4	1

a) Bestimmt mittels „Enantioselectivity“^[258]; n.b. = nicht bestimmt

7.2.2.8.6 Kinetik der Racematspaltung von *rac*-4 mit Methoxyessigsäureethylester (**111**)

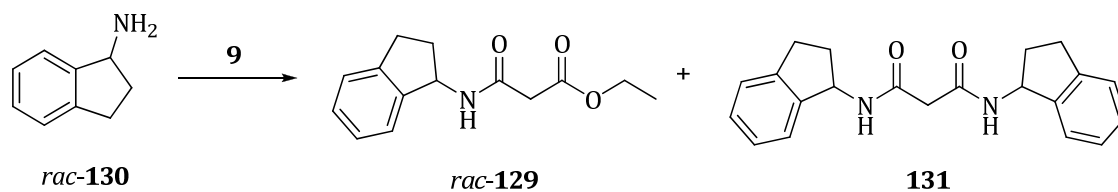
Die Synthesen erfolgen analog der AAV 6. Zu *rac*-1-Phenylethylamin (*rac*-4, 0.5 mmol) werden Methoxyessigsäureethylester (**111**, 1 Äq.) und CAL-B (40 mg/mmol) gegeben und bei 60 °C für 1 min – 24 h gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 6. Die Ergebnisse sind in Tabelle 62 aufgelistet.

Tabelle 62. Kinetik der enzymatischen Racematspaltung von *rac*-**4** mit Methoxyessigsäureethylester (**111**).

Eintrag	t [min]	Umsatz [%]	ee [%]	E
1	1	16	72	7
2	5	17	74	8
3	10	17	76	9
4	20	16	77	9
5	30	18	79	9
6	45	19	78	10
7	60	18	78	10
8	120	24	79	11
9	180	19	72	7
10	270	22	92	31
11	480	27	77	10
12	1440	33	83	16

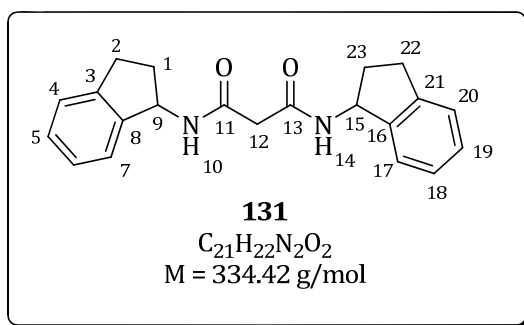
7.2.2.9 1-Aminoindan (*rac*-**130**) als Substrat

7.2.2.9.1 Analyse des Diamids *N*¹,*N*³-bis(2,3-dihydro-1H-inden-1-yl)malonamid (**129**)

**Abbildung 145.** Bildung des Diamids **131** als Nebenprodukt.

Bei der Reaktion des 1-Aminoindans (*rac*-**130**) mit Malonsäurediethylester (**9**, 1 Äq.) als Acyldonor analog der AAV 6 entsteht das gewünschte Indan-Amid (*rac*-**129**, Abbildung 145). Als Nebenprodukt wird dabei das entsprechende Diamid **131** erhalten, welches durch Säulenchromatographie (Laufmittel: CH/EtOAc 1:4) isoliert werden kann. Das Diamid **131** wird als farbloser Feststoff erhalten.

Umsatz: 11%, Ausbeute: 9% (29.9 mg, 0.09 mmol).



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 1.89 (m, 2H, H-2 + H-22), 2.57 (m, 2H, H-1 + H-23), 2.90 (m, 2H, H-2 + H-22), 3.02 (m, 2H, H-1 + H-23), 3.27 (s, 2H, H-12), 5.14 (q, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 2H, H-9 + H-15), 7.21 – 7.31 (m, 8H, H^{ar}), (t, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, H-10 + H-14).

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 30.36 (C-2 + C-22), 33.82 (C-1 + C-23), 43.31 (C-12), 54.90 (C-9 + C-15), 124.11 (C-4 + C-20), 124.89 (C-5 + C-19), 126.86 (C-6 + C-18),

128.11 (C-7 + C-17), 142.81 (C-8 + C-16), 143.41 (C-3 + C-21), 167.24 (C-11 + C-13).

MS (ESI): m/z (%) = 357.2 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 691.2 (30) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

EA ($C_{21}H_{22}N_2O_2$): berechnet C: 75.42%, H: 6.63%, N: 8.38%; gefunden: C: 74.27%, H: 6.63%, N: 8.08%.

Die spektroskopischen Daten sind nicht literaturbekannt.

7.2.2.9.2 Bestimmung des Verlusts von 1-Aminoindan (*rac*-130) während der Aufarbeitung

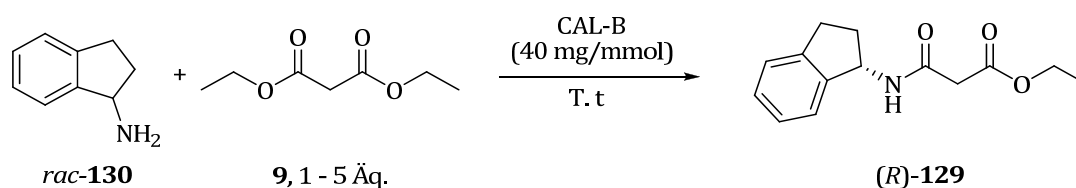
Zur Bestimmung des Verlusts von 1-Aminoindan (*rac*-130) während der Aufarbeitung werden 49.6 mg der Substanz eingewogen und über einen bestimmten Zeitraum bei 550 mbar gerührt. Durch Auswaage wird der Verlust von *rac*-130 bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 63 aufgelistet.

Tabelle 63. Bestimmung des Verlusts von 1-Aminoindan (*rac*-130) während der Aufarbeitung.

Eintrag	Zeit [min]	Verlust <i>rac</i> -130 [mg]	Verlust <i>rac</i> -130 [%]
1	0	0	0
2	5	0.33	0.7
3	10	1.12	2.3
4	15	1.44	2.9

7.2.2.9.3 Temperatur- und Zeiteffekt der enzymatischen Racematspaltung von 1-Aminoindan (*rac*-130)

Die enzymatische Racematspaltung von 1-Aminoindan (*rac*-130) mit Malonsäurediethylester (**9**, 1 – 5 Äq.) und CAL-B (40 mg/mmol) wurde analog der AAV 6 mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen untersucht. Die Synthese erfolgte analog der AAV 6. Die Ergebnisse sind in Tabelle 64 dargestellt.

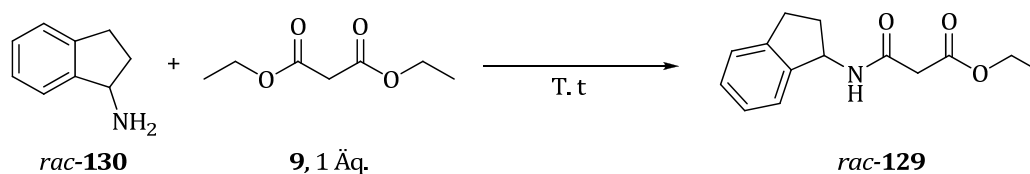
Tabelle 64. Temperatur- und Zeiteffekt der enzymatischen Racematspaltung von *rac*-130.

Eintrag	9 (Äq.)	T [°C]	t [h]	Umsatz [%]	ee _P [%]	ees [%] ^{a)}	E
1	1	80	4.5	39	73	47	10
2	1	80	24	42	97	70	>100
3	1	60	4.5	49	79	79	20
4	1	60	24	44	98	77	>100
4	1.5	60	4.5	49	91	87	61
5 ^{b)}	5	60	24	63	76	n.b.	12
6 ^{b)}	1	60	4.5	46	70	60	10
7 ^{b)}	1	60	24	52	83	92	40
8	1	40	24	50	90	90	58
9	1	RT	4.5	43	67	51	8
10	1	RT	24	45	54	44	5

a) Bestimmt mittels „Enantioselectiviy“^[258]; b) Zugabe von 0.2 mL MTBE; n.b. = nicht bestimmt.

7.2.2.9.4 Parallel ablaufende chemische Acylierung von 1-Aminoindan (*rac*-130)

Die Synthesen werden analog der AAV 7 durchgeführt. Zu 1-Aminoindan (*rac*-130, 0.22 mmol) wird Malonsäurediethylester (**9**, 1 Äq.) gegeben und bei RT – 60 °C für 4.5 – 24 h gerührt. Es wird, analog der AAV 6, filtriert, mit DCM und MTBE (je 10 mL) gewaschen und die Lösungsmittel i.Vak. entfernt. Der Umsatz wird mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 65 aufgelistet.

Tabelle 65. Parallel ablaufende chemische Acylierung von *rac*-130.

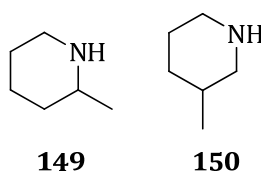
Eintrag	T [°C]	t [h]	Umsatz [%]
1	80	24	8
2	80	4.5	4
3	60	24	9
4	60	4.5	3
5	RT	24	1

7.2.2.10 Sekundäre Amine als Substrate

7.2.2.10.1 Bestimmung des Verlusts der sekundären Amine **149** bzw. **150**

Zur Bestimmung des Verlusts von 2-Methyl- bzw. 3-Methylpiperidin (**149** bzw. **150**) während der Aufarbeitung werden 43.7 bzw. 41.2 mg der Substanzen eingewogen und über einen bestimmten Zeitraum bei 550 mbar gerührt. Durch Auswaage wird der Verlust der Substanzen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 66 aufgelistet.

Tabelle 66. Bestimmung des Verlusts der sekundären Amine **149** und **150**.

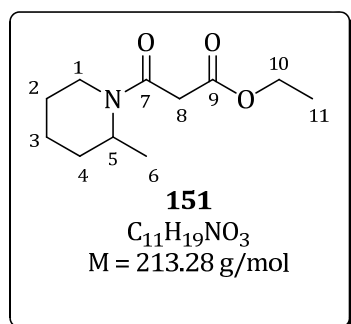


Eintrag	Amin	Rührzeit [min]	Verlust [mg]	Verlust [%]
1	149	5	9.2	21
2	149	10	18.7	43
3	149	15	28.2	64
4	150	5	2.6	6
5	150	10	6.0	15
6	150	15	11.1	27

7.2.2.10.2 Synthese von Ethyl-3-(2-methylpiperidin-1-yl)-3-oxopropanoat (*rac*-**151**)

Die Synthese erfolgt analog der AAV 5.^[253] Zu 2-Methylpiperidin (**149**, 1 mmol, 99.8 mg) wird Diethylmalonester (**9**, 1 mmol, 161.2 mg) gegeben und für 3 h bei 180 °C erhitzt. Der Umsatz wird mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Das Produkt *rac*-**151** wird mittels Säulenchromatographie (Laufmittel: EtOAc) isoliert.

Umsatz: 56%, Ausbeute: 41% (87.9 mg, 0.41 mmol).



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1.16 (d, ³J = 7.0 Hz, 3H, H-6), 1.27 – 1.30 (t, ³J = 7.0 Hz, 3H, H-11), 1.35 – 1.47 (m, 2H, H-3), 1.52 – 1.69 (m, 2H, H-2), 2.69 (td, ³J = 13.5 Hz, 1H, H-4), 3.16 (td, ³J = 13.5 Hz, 1H, H-4), 3.43 (s, 2H, H-8), 3.48 (m, 1H, H-5), 4.19 (q, ³J = 7.0 Hz, 2H, H-10), 4.49 (m, 1H, H-1), 4.90 (m, 1H, H-1).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): 14.22 (C-11), 18.66 (C-6), 25.46 (C-3), 26.13 (C2), 29.71 (C-4), 36.68 (C-8), 41.96 (C-1), 61.41 (C-10), 164.46 (C-9), 167-96 (C-7).

HPLC: AD-H-Säule, 95:5 (*n*-Hexan/*i*-PrOH, v/v), 210 nm, flow: 0.8 mL/min, t_R = 18.29 min (*R*), 19.68 min (*S*), *ee*-Wert: 0%.

IR (ATR): (cm^{-1}) = 2935.4, 2864.0, 2357.9, 1733.0, 1634.9, 1437.3, 1367.5, 1319.5, 1239.4, 1149.7, 1032.0, 850.0, 608.6.

MS (ESI): m/z (%) = 236.0 (100) $[M+Na]^+$, 277.1 (10), 449.2 (23) $[2M+Na]^+$.

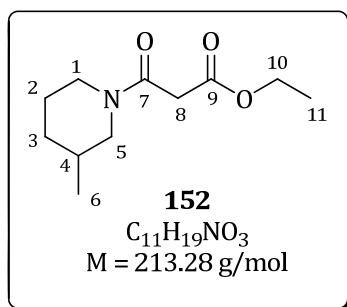
EA ($\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_3$): berechnet C: 61.95%, H: 8.98%, N: 6.57%, O: 22.50%; gefunden: C: 61.08%, H: 8.99%, N: 6.47%, O: 23.46%.

Die spektroskopischen Daten sind laut SciFinder in der Literatur beschrieben worden.^[280]

7.2.2.10.3 Synthese von Ethyl-3-(3-methylpiperidin-1-yl)-3-oxopropanoat (*rac*-152)

Die Synthese erfolgt analog der AAV 5.^[253] Zu 3-Methylpiperidin (**150**, 1 mmol, 99.6 mg) wird Malonsäurediethylester (**9**, 1 mmol, 159.8 mg) gegeben und für 3 h bei 180 °C erhitzt. Der Umsatz wird mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Laufmittel CH/ EtOAc 1:4) aufgereinigt um das isolierte Produkt zu erhalten.

Umsatz: 63%, Ausbeute: 42% (87.9 mg, 0.41 mmol).



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 0.90 (d, $^3J = 6.5 \text{ Hz}$, 3H, H-6), 1.08 – 1.18 (m, 1H, H-11), 1.40 – 1.73 (m, 2H, H-3), 1.80 – 1.84 (m, 1H, H-2), 2.30 (dd, $^3J = 12.5 \text{ Hz}$, 10.5 Hz, 1H, H-4), 2.62 (td, $^3J = 12.5 \text{ Hz}$, 3.0 Hz, 1H, H-4), 2.69 (dd, $^3J = 13.5 \text{ Hz}$, 10.5 Hz, 1H, H-4), 2.97 – 3.03 (m, 1H, H-8), 3.55 – 3.66 (m, 1H, H-5), 4.38 – 4.45 (m, 1H, H-1).

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 14.26 (C-11), 18.93 (C-6), 21.11 (C-2), 24.74 (C-4), 30.90 (C-3), 32.89 (C-8), 41.52 (C-1), 54.00 (C-5), 60.44 (C-10), 164.20 (C-7), 171.19 (C-9).

HPLC: AD-H-Säule, 95:5 (*n*-Hexan/*i*-PrOH, v/v), 210 nm, flow: 0.8 mL/min, $t_R = 19.11 \text{ min}$ (*R*), 21.01 min (*S*), *ee*-Wert: 0%.

IR (ATR): (cm^{-1}) = 2929.0, 2852.3, 2360.1, 2341.4, 1733.0, 1603.5, 1440.1, 1366.8, 1316.8, 1266.2, 1224.5, 1157.9, 1139.5, 1030.7, 969.2, 851.8, 667.6, 578.6.

MS (ESI): m/z (%) = 214.0 (5), 236.1 (100) $[M+Na]^+$, 277.1 (3), 449.2 (97) $[2M+Na]^+$.

Die spektroskopischen Daten sind laut SciFinder in der Literatur beschrieben worden.^[280]

7.2.2.10.4 Enzymatische Acylierung von 3-Methylpiperidin (*rac*-150)

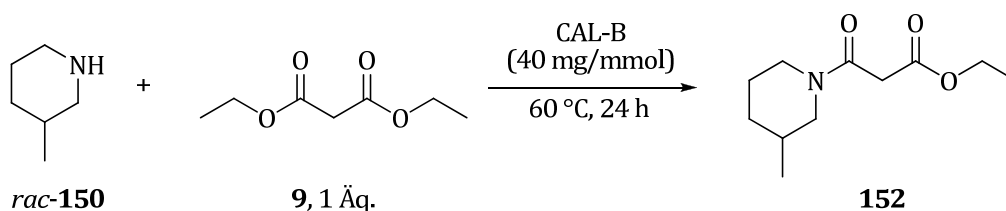


Abbildung 146. Enzymatische Racematspaltung von *rac*-150.

Die Synthese erfolgt analog der AAV 6. Zu 3-Methylpiperidin (**150**, 0.5 mmol, 47.4 mg) werden Malonsäurediethylester (**9**, 0.5 mmol, 79.6 mg) und CAL-B (40 mg/mmol, 20 mg) gegeben und bei 60 °C für 24 h erhitzt. Die Aufarbeitung erfolgt analog zur AAV 6. Der Umsatz wird mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

Umsatz: 15%.

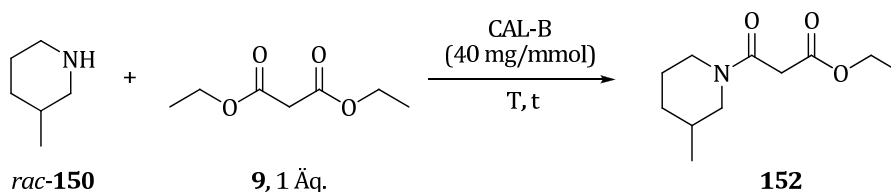
HPLC: AD-H-Säule, 95:5 (*n*-Hexan/*i*-PrOH, v/v), 210 nm, flow: 0.8 mL/min, t_R = 19.35 min (*R*), 21.27 min (*S*), *ee*-Wert: 10%.

Die analytischen Daten stimmen mit den Vergleichsdaten aus Abschnitt 7.2.2.10.3 überein.

7.2.2.10.5 Prozessoptimierung der enzymatischen Racematspaltung von 3-Methylpiperidin (*rac*-**150**)

Die enzymatische Racematspaltung von 3-Methylpiperidin (*rac*-**150**) mit Malonsäurediethylester (**9**, 1 – 5 Äq.) und Lipase CAL-B (40 mg/mmol) wurde analog der AAV 6 mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen untersucht. Die Synthese erfolgte analog der AAV 6. Der Umsatz wird mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 67 dargestellt.

Tabelle 67. Prozessoptimierung der enzymatischen Racematspaltung von *rac*-**150**.

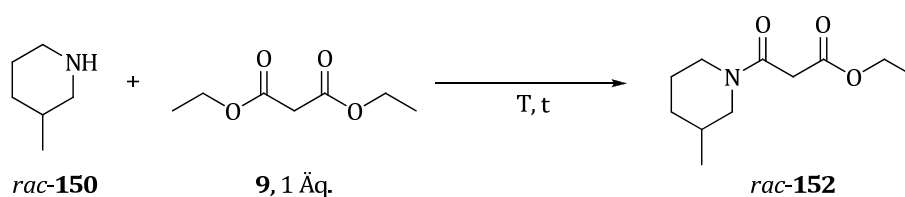


Eintrag	MTBE [mL]	T [°C]	Umsatz [%]	ee _P [%]	ees [%] ^{a)}	E
1	-	80	5	10	n.b.	<2
2	-	60	15	10	n.b.	1
3	0.1	60	34	13	7	<2
4 ^{b)}	0.1	60	75	18	54	2
5	-	40	19	11	n.b.	<2
6 ^{c)}	-	40	22	10	n.b.	<2

a) Bestimmt mittels „Enantioselektivität“^[258]; b) CAL-B: 80 mg/mmol; c) Reaktionsdauer: 48 h.; n.b. = nicht bestimmt.

7.2.2.10.6 Parallel ablaufende chemische Acylierung von *rac*-**150**

Die Synthesen werden analog der AAV 6 durchgeführt. Zu 3-Methylpiperidin (**150**, 0.5 mmol) wird Malonsäurediethylester (**9**, 1 Äq.) gegeben und bei 40 – 80 °C für 24 - 48 h gerührt. Der Umsatz wird ohne weitere Aufarbeitung mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 68 aufgelistet.

Tabelle 68. Parallel ablaufende chemische Acylierung von *rac*-150.

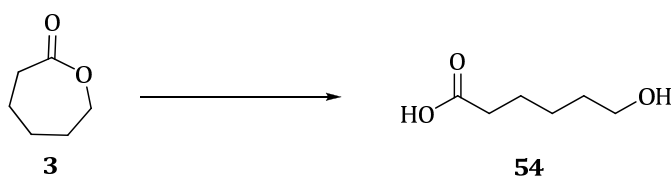
Eintrag	T [°C]	t [h]	Umsatz [%]	ee [%]	E
1	80	24	5	n.b.	n.b.
2	60	24	9	<1	1
3	40	48	6	<1	1

n.b. = nicht bestimmt.

7.2.2.11 Verwendung von ϵ -Caprolacton (3) als Acyldonor

7.2.2.11.1 Bestimmung der Stabilität von ϵ -Caprolacton (3) während der Reaktion und Aufarbeitung

ϵ -Caprolacton (3) wird über einen Zeitraum von 24 h bei 60 °C in Anwesenheit und ohne CAL-B gerührt. Bei Abwesenheit von CAL-B wird direkt eine NMR-Probe entnommen. Beim Ansatz mit Enzym erfolgt zusätzlich eine Aufarbeitung analog AAV 6. Das Verhältnis von ϵ -Caprolacton (3) zum Zersetzungsprodukt 6-Hydroxyhexansäure (54) wird mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 69 aufgelistet.

Tabelle 69. Bestimmung der Stabilität von ϵ -Caprolacton (3).

Eintrag	Bedingungen	Verhältnis 3 / 54
1	Rühren ohne CAL-B	100 : 0
2	Rühren mit CAL-B und Aufarbeitung nach AAV 6	1 : 77

7.2.2.11.2 Enzymatische Acylierung von Benzylamin (134) mit ϵ -Caprolacton (3)

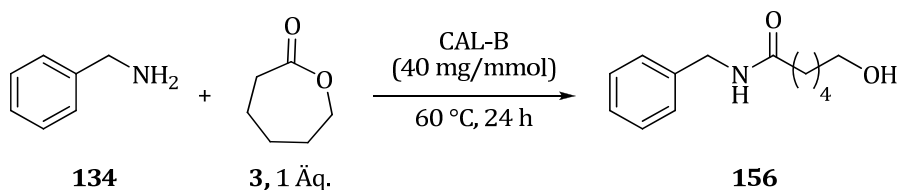
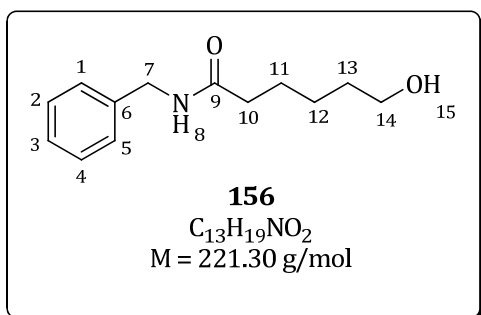


Abbildung 147. Enzymatische Acylierung von Benzylamin (134) mit ϵ -Caprolacton (3).

Die Synthese erfolgt nach der AAV 6. Zu Benzylamin (134, 1 mmol, 105.7 mg) werden ϵ -Caprolacton (3, 1 mmol, 113.7 mg) und CAL-B (40 mg/mmol) gegeben und für 24 h bei 60 °C gerührt (Abbildung 147). Der Umsatz wird mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 6. Umsatz: >99%.



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 1.38 – 1.44 (m, 2H, H-12), 1.55 – 1.60 (m, 2H, H-13), 1.66 – 1.72 (m, 2H, H-11), 2.23 (t, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, H-14), 3.63 (t, $^3J = 6.5 \text{ Hz}$, 2H, H-10), 4.43 (d, $^3J = 5.7 \text{ Hz}$, 2H, H-7), 5.84 (br, 1H, H-8), 7.28 – 7.35 (m, 5H, H^{ar}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 172.95 (C9), 138.45 (C6), 128.85 (C2 + C4), 127.97 (C1 + C5), 127.66 (C3), 62.68 (C14), 43.75 (C7), 36.69 (C10), 32.39 (C14), 25.50 (C12), 25.40 (C13).

IR (ATR): (cm^{-1}) = 3406.0, 3234.6, 3062.7, 2925.6, 2856.9, 1732.4, 1626.8, 1540.7, 1449.6, 1361.0, 1233.1, 1058.3, 1025.0, 1006.8, 989.6, 792.1, 739.7, 708.2, 615.6, 592.8, 508.4.

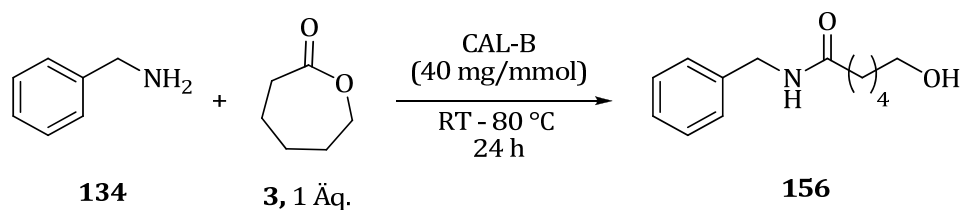
MS (ESI): m/z (%) = 244.0 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 358.2 (76), 425.3 (4), 465.2 (28) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 579.1 (4).

EA ($\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_3$): berechnet C: 68.00%, H: 6.93%, N: 5.66%; gefunden: C: 61.23%, H: 8.96%, N: 6.83%.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.^[281]

7.2.2.11.3 Variation der Reaktionsbedingungen der enzymatischen Acylierung von Benzylamin (134) mit ϵ -Caprolacton (3)

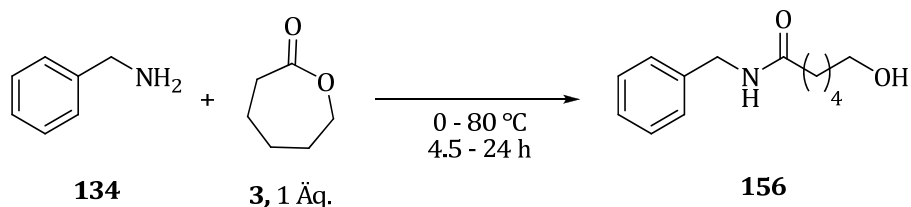
Die enzymatische Acylierung von Benzylamin (134) mit ϵ -Caprolacton (3, 1 Äq.) und Lipase CAL-B (40 mg/mmol) wurde analog der AAV 6 mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen untersucht. Die Synthese erfolgte analog der AAV 6. Der Umsatz wird mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 70 dargestellt.

Tabelle 70. Prozessoptimierung der enzymatischen Racematspaltung von Benzylamin (**134**) mit ϵ -Caprolacton (**3**).

Eintrag	MTBE [mL]	T [°C]	t [h]	Umsatz [%]
1	0	80	4.5	51
2	0.5	80	4.5	65
3	0	RT	4.5	57

7.2.2.11.4 Parallel ablaufende chemische Acylierung von Benzylamin (**134**) mit ϵ -Caprolacton (**3**)

Die Synthesen werden analog der AAV 7 durchgeführt. Zu Benzylamin (**134**, 0.5 mmol) wird ϵ -Caprolacton (**3**, 1 Äq.) gegeben und bei verschiedenen Temperaturen und Reaktionszeiten gerührt. Der Umsatz wird ohne weitere Aufarbeitung mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 71 aufgelistet.

Tabelle 71. Parallel ablaufende Acylierung von Benzylamin (**134**) mit ϵ -Caprolacton (**3**).

Eintrag	T [°C]	t [h]	Umsatz [%]
1	80	4.5	30
2	60	4.5	69
3	RT	4.5	12
4	RT	24	53
5	0	4.5	3

7.2.2.11.5 Synthese von 6-Hydroxy-*N*-(1-phenylethyl)hexanamid (**157**)

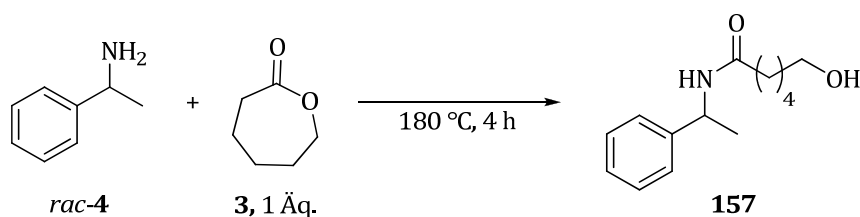
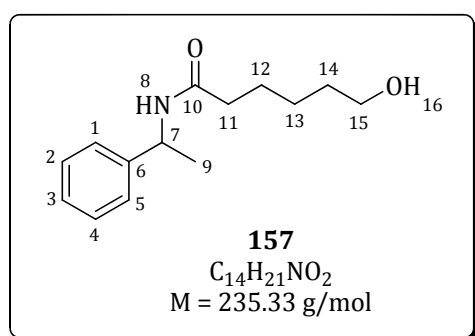


Abbildung 148. Synthese von **157** ausgehend von *rac*-**4**.^[253]

Die Synthese erfolgt analog der AAV 5.^[253] Zu 1-Phenylethylamin (*rac*-**4**, 2.5 mmol, 303.4 mg) wird ϵ -Caprolacton (**3**, 2.5 mmol, 288.1 mg) gegeben und für 4 h auf 180 °C erhitzt (Abbildung 148). Der Umsatz wird ohne weitere Aufarbeitung mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

Umsatz: 62%.



¹H-NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm): 1.34 – 1.42 (m, 3H, H-13), 1.49 (d, $^3J = 6.9 \text{ Hz}$, 2H, H-9), 1.54 – 1.60 (m, 2H, H-12), 1.61 – 1.71 (m, 2H, H-14), 2.19 (t, $^3J = 7.4 \text{ Hz}$, 2H, H-15), 3.63 (t, $^3J = 6.6 \text{ Hz}$, 2H, H-11), 5.14 (p, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, 1H, H-7), 5.70 (br, 1H, H-8), 7.25 – 7.35 (m, 5H, H^{ar}).

HPLC: AD-H-Säule, 95:5 (*n*-Hexan/*i*-PrOH, v/v), 210 nm, flow: 0.8 mL/min, $t_R = 32.21 \text{ min (R)}$, 39.69 min (*S*), ee-Wert: 0%.

Die spektroskopischen Daten sind in der Literatur nicht bekannt.

7.2.2.11.6 Enzymatische Acylierung von 1-Phenylethylamin (*rac*-**4**) mit ϵ -Caprolacton (**3**)

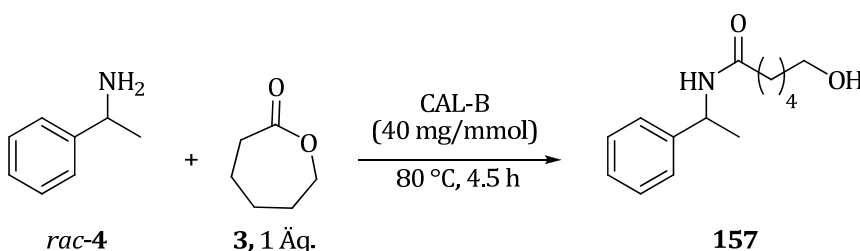
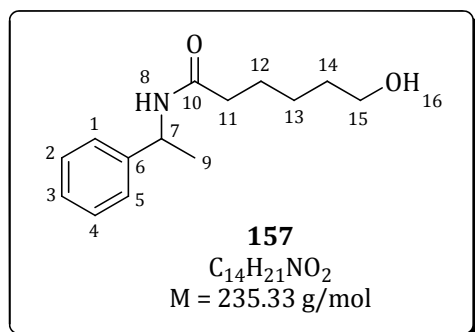


Abbildung 149. Enzymatische Acylierung von *rac*-**4** mit ϵ -Caprolacton (**3**).

Die Synthese erfolgt analog der AAV 6. Zu 1-Phenylethylamin (*rac*-**4**, 5.0 mmol, 0.61 g) werden ϵ -Caprolacton (**3**, 4.9 mmol, 0.56 g) und CAL-B (40 mg/mmol, 200 mg) gegeben und für 4.5 h bei 80 °C gerührt (Abbildung 149). Die Aufarbeitung erfolgt analog AAV 6. Der Umsatz wird mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (Laufmittel: CHCl_3 /Aceton 7:3). Das Produkt **157** wird als farbloser Feststoff erhalten.

Umsatz: 51%, Ausbeute: 43% (0.51 g, 2.15 mmol).



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1.36 – 1.42 (m, 3H, H-13), 1.49 (d, ³J = 6.9 Hz, 2H, H-9), 1.54 – 1.60 (m, 2H, H-12), 1.64 – 1.70 (m, 2H, H-14), 2.19 (t, ³J = 7.4 Hz, 2H, H-15), 3.63 (t, ³J = 6.5 Hz, 2H, H-11), 5.14 (p, ³J = 7.2 Hz, 1H, H-7), 5.73 (br, 1H, H-8), 7.25 – 7.35 (m, 5H, H^{ar}).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): 21.84 (C-9), 25.36 (C-13), 25.42 (C-12), 32.33 (C-14), 36.70 (C-11), 48.73 (C-7), 62.50

(C-15), 126.26 (C-1 + C-5), 127.41 (C-3), 128.73 (C-2 + C-4), 143.38 (C-6), 172.27 (C-10).

HPLC: AD-H-Säule, 95:5 (*n*-Hexan/*i*-PrOH, v/v), 210 nm, flow: 0.8 mL/min, t_R = 32.21 min (*R*), 39.69 min (*S*), ee-Wert: 0%.

IR (ATR): (cm⁻¹) = 3270.5, 3062.7, 2929.3, 2859.9, 2360.1, 2341.3, 1731.2, 1540.1, 1448.9, 1374.9, 1277.9, 1209.4, 1129.5, 1051.0, 1020.7, 908.7, 759.6, 703.5, 539.7.

MS (ESI): m/z (%) = 258.1 (100) [M+Na]⁺, 493.2 (47) [2M+Na]⁺.

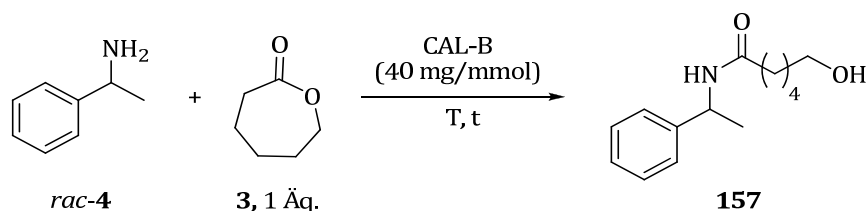
EA (C₁₄H₂₁NO₂): berechnet C: 70.46%, H: 9.00%, N: 5.95%, O: 16.60%; gefunden: C: 70.01%, H: 9.27%, N: 5.99%, O: 14.73%.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in Abschnitt 7.2.2.11.5 überein.

7.2.2.11.7 Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Acylierung von 1-Phenylethylamin (*rac*-4) mit ε-Caprolacton (3)

Die enzymatische Acylierung von 1-Phenylethylamin (*rac*-4, 1 mmol) mit ε-Caprolacton (3, 1 Äq.) und CAL-B (40 mg/mmol) wurde analog der AAV 6 mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen untersucht. Die Synthese erfolgte analog der AAV 6. Der Umsatz wird mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 72 dargestellt.

Tabelle 72. Prozessoptimierung der enzymatischen Acylierung von *rac*-4 mit ε-Caprolacton (3).



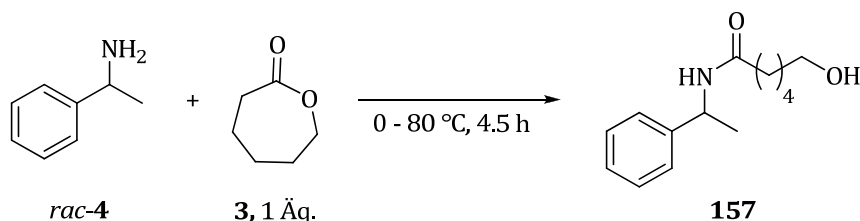
Eintrag	T [°C]	t [h]	Umsatz [%]	ee [%]	E
1	80	4.5	51	0	<1
2 a)	80	4.5	49	0	<1
3	60	4.5	41	0	<1
4	60	6	38	0	<1
5	60	8	45	0	<1
6	40	4.5	25	3	1
7	RT	4.5	26	4	1

a) Zugabe von 0.5 mL MTBE nach 1 h.

7.2.2.11.8 Parallel ablaufende chemische Acylierung von *rac*-4 mit ϵ -Caprolacton (3)

Die Synthesen werden analog der AAV 6 durchgeführt. Zu 1-Phenylethylamin (*rac*-4, 1 mmol) wird ϵ -Caprolacton (3, 1 Äq.) gegeben und bei 0 – 80 °C für 4.5 h gerührt. Der Umsatz wird ohne weitere Aufarbeitung mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 73 aufgelistet.

Tabelle 73. Parallel ablaufende chemische Acylierung von *rac*-4 mit ϵ -Caprolacton (3).



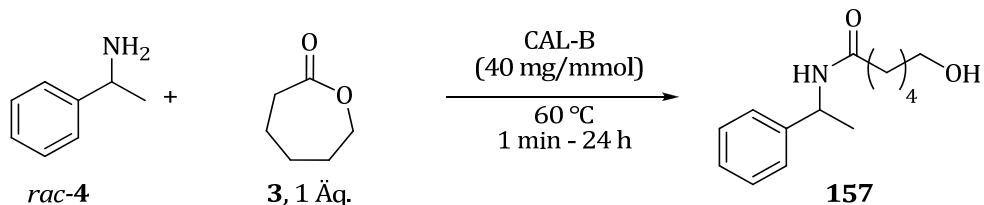
Eintrag	T [°C]	Umsatz [%]	ee [%]
1	80	37	0
2	60	4	n.b.
3	40	2	n.b.
4	RT	1	n.b.
5	0	0	n.b.

n.b. = nicht bestimmt.

7.2.2.11.9 Reaktionskinetik der Acylierung von 1-Phenylethylamin (*rac*-4) mit ϵ -Caprolacton (3)

Die Synthesen erfolgen analog der AAV 11. Zu Phenylethylamin (*rac*-4, 0.5 mmol) werden ϵ -Caprolacton (3, 1 Äq.) und CAL-B (40 mg/mmol) gegeben und bei 60 °C für 1 min – 24 h gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog der AAV 7. Die Ergebnisse sind in Tabelle 74 aufgelistet.

Tabelle 74. Kinetik der enzymatischen Acylierung von *rac*-4 mit ϵ -Caprolacton (3).



Eintrag	t [min]	Umsatz [%]	ee [%]	E
2	5	2	n.b.	n.b.
3	10	3	n.b.	n.b.
4	20	7	0	0
5	30	6	<2	1
6	45	7	0	0
7	60	12	0	0

Eintrag	t [min]	Umsatz [%]	ee [%]	E
8	120	20	0	1
9	180	22	0	1
10	270	41	0	1
11	360	38	0	1
11	480	45	0	1
12	1440	65	0	1

n.b. = nicht bestimmt.

7.2.2.11.10 Synthese von 6-Hydroxy-1-(3-methylpiperidin-1-yl)hexan-1-on (**155**)

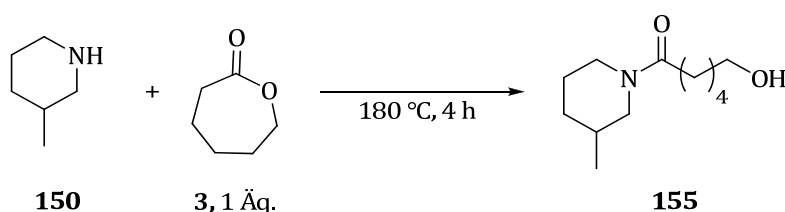
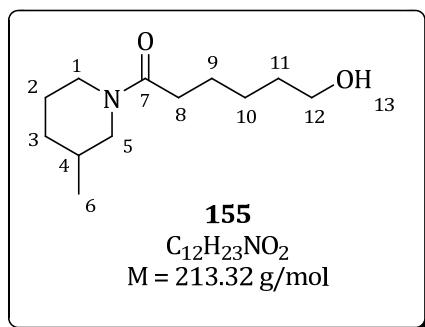


Abbildung 150. Chemische Acylierung von 3-Methylpiperidin (**150**) mit ϵ -Caprolacton (**3**).^[253]

Die Synthese erfolgt analog der AAV 6.^[253] Zu 3-Methylpiperidin (**150**, 1 mmol, 99.6 mg) wird ϵ -Caprolacton (**3**, 1 mmol, 115.5 mg) gegeben und für 4 h bei 180 °C gerührt (Abbildung 150). Die Aufarbeitung erfolgt analog AAV 6. Der Umsatz wird mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

Umsatz: 17%.



¹H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm): 0.90 (d, 3H, $^3J = 6.7$ Hz, H-6), 1.07 – 1.16 (m, 3H, H-10), 1.34 – 1.46 (m, H2, H-3), 1.51 – 1.71 (m, 6H, H-9, H-11, H2), 2.21 (t, $^3J = 12.1$ Hz, 2H, H-8), 2.52 – 2.59 (m, 2H, H-5), 2.93 (t, $^3J = 12.5$ Hz, 2H, H-4), 3.73 (d, $^3J = 13.6$ Hz, 2H, H-1), 4.39 – 4.44 (m, 2H, H-12).

¹³C-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): 19.00 (C-6), 22.45 (C-2), 24.50 (C-10), 25.49 (C-9), 28.31 (C-4), 31.56 (C-11), 31.83 (C-3), 34.03 (C-8), 46.61 (C-1), 52.31 (C-5), 62.05 (C-12).

DC-MS (ESI): m/z (%) = 214.1 (99) $[M]^+$, 236.2 (40) $[M+Na]^+$, 427.2 (20) $[2M]^+$, 449.2 (1) $[2M+Na]^+$.

MS (ESI): m/z (%) = 236.1 (9) $[M+Na]^+$, 350.3 (100), 464.3 (59) $[2M+K]^+$, 578.3 (10).

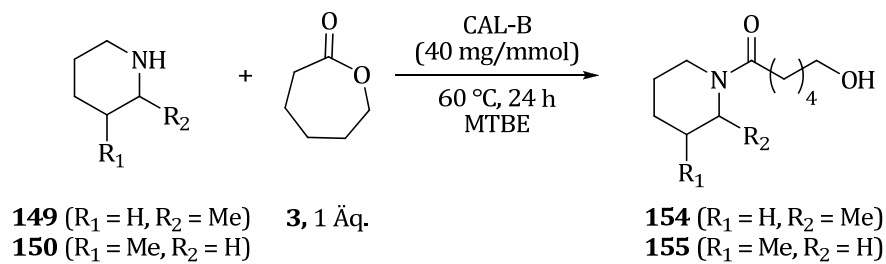
Die spektroskopischen Daten sind in der Literatur nicht bekannt.

7.2.2.11.11 Enzymatische Acylierungen sekundärer Amine mit ϵ -Caprolacton (**3**)

Die Synthesen erfolgen analog der AAV 6. Zu dem Amin (**149** bzw. **150**, 0.5 mmol) werden ϵ -Caprolacton (**3**, 0.5 mmol, 57.3 mg) und CAL-B (40 mg/mmol, 20 mg) gegeben und in MTBE (0 - 0.1 mL) für 24 h bei

60 °C gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog AAV 6. Der Umsatz wird mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 75 aufgelistet.

Tabelle 75. Enzymatische Acylierung der Amine **149** und **150** mit ϵ -Caprolacton (**3**).



Eintrag	Amin	MTBE [mL]	Umsatz [%]
1	149	0	7
2	150	0	9
3	150	0.1	18

8 Literaturverzeichnis

- [1] M. N. Gupta, S. Raghava, *Chem. Centr. J.* **2007**, *1*, 17.
- [2] a) Bundesministerium für Forschung und Bildung (BMBF), *Weißer Biotechnologie. Chancen für eine bio-basierte Wirtschaft*, Berlin, **2012**; b) E. Flaschel, *Positionspapier der DECHEMA e.V. Weißer Biotechnologie: Chancen für Deutschland*, Frankfurt am Main, **2004**.
- [3] United States Department of Agriculture, *2008*.
- [4] M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Kessler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788–824.
- [5] a) A. G. McDonald, K. F. Tipton, *FEBS J.* **2014**, *281*, 583–592; b) D. Schomburg, "BRENDA. The Comprehensive Enzyme Information System", zu finden unter <http://www.brenda-enzymes.org/>.
- [6] S. L. Neidleman, *Biotechnol. Gen. Engin. Rev.* **1984**, 1–38.
- [7] A. Illanes (Hrsg.) *Enzyme Biocatalysis. Principles and Applications*, Springer Science + Business Media B. V., Heidelberg, **2008**.
- [8] J. B. Jones, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3351–3403.
- [9] F. M. Menger, *Acc. Chem. Res.* **1993**, 206–212.
- [10] K. Drauz, H. Waldmann (Hrsg.) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. A Comprehensive Handbook*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2002**.
- [11] K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry. A textbook*, 6. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2011**.
- [12] Z.-G. Zhang, L. P. Parra, M. T. Reetz, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 10160–10172.
- [13] D. Brady, J. Jordaan, *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 1639–1650.
- [14] H. Gröger, F. Chamouleau, N. Orologas, C. Rollmann, K. Drauz, W. Hummel, A. Weckbecker, O. May, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5677–5681.
- [15] F. Zambianchi, S. Raimondi, P. Pasta, G. Carrea, N. Gaggero, J. M. Woodley, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *31*, 165–171.
- [16] W.-H. Lee, J.-B. Park, K. Park, M.-D. Kim, J.-H. Seo, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 329–338.
- [17] M. A. Woodruff, D. W. Hutmacher, *Prog. Pol. Sci.* **2010**, *35*, 1217–1256.
- [18] D. Zhu, L. Hua **2009**, *4*, 1420–1431.
- [19] G. A. R. Nobes, R. J. Kazlauskas, R. H. Marchessault, *Macromol.* **1996**, 4829–4833.
- [20] *SIDS Initial Assessment Report For SIAM 19. E-Caprolactone*. UNEP Publication, Berlin, **2004**.
- [21] a) A. R. Pohlmann, F. N. Fonseca, K. Paese, C. B. Detoni, K. Coradini, R. C. R. Beck, S. S. Guterres, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2013**, *10*, 623–638; b) T. K. Dash, V. B. Konkimalla, *J. Contr. Rel.* **2012**, *158*, 15–33.
- [22] T. Fujiwa (Daicel Chemical Industries Ltd.), 5,116,932, **1990**.
- [23] K. Weissermel, H.-J. Arpe (Hrsg.) *Industrial Organic Chemistry*, VCH Wiley Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1997**.

- [24] BASF, *Presse-Information. BASF erhöht Preise für Polyamid 6 Basis-Polymere, Caprolactam und Adipinsäure in Europa*, Ludwigshafen, **2014**.
- [25] A. J. Willetts, C. J. Knowles, M. S. Levitt, S. M. Roberts, H. Sandey, N. F. Shipston, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1991**, 1608–1610.
- [26] S. Staudt, U. T. Bornscheuer, U. Menyes, W. Hummel, H. Gröger, *Enzyme Microb. Technol.* **2013**, *53*, 288–292.
- [27] I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 201–209.
- [28] V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797–812.
- [29] F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 501–519.
- [30] K. Ditrich, *Synthesis* **2008**, *14*, 2283–2287.
- [31] M. Nechab, N. Azzi, N. Vanthuyne, M. Bertrand, S. Gastaldi, G. Gil, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6918–6923.
- [32] a) F. Balkenhohl, B. Hauer, W. Ladner, U. Pressler (BASF SE), DE4332738A1, **25.09.93**; b) K. Ditrich, F. Balkenhohl, W. Ladner (BASF SE), DE 195 34 208 A1, **1995**.
- [33] S. Simon, *Dissertation*, Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg, **2011**.
- [34] S. Simon, S. Oßwald, J. Roos, H. Gröger, *Z. Naturforsch.* **2012**, *67*, 1123–1126.
- [35] F. Uthoff, *Bachelorarbeit*, Universität Bielefeld, Bielefeld, **2012**.
- [36] M. Päiviö, P. Perkiö, L. T. Kanerva, *Tetrahed. Asymm.* **2012**, *23*, 230–236.
- [37] A. Ghanem, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1721–1754.
- [38] A. Baeyer, V. Villiger, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1899**, *32*, 3625–3633.
- [39] H. Caro, *Angew. Chem.* **1898**, *36*, 815–846.
- [40] M. Renz, B. Meunier, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 737–750.
- [41] L. Ruzicka, M. Stoll, *Helv. Chim. Acta* **1928**, 1159–1173.
- [42] a) W. Dilthey, M. Inckel, H. Stephan, *J. Prakt. Chem.* **1939**, 219–237; b) R. Robinson, L. Hart Smith, *J. Chem. Soc.* **1937**, 371–374.
- [43] G. Wittig, G. Pieper, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1940**, *73*, 295–297.
- [44] R. Criegee, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1948**, 127–135.
- [45] W. von E. Doering, E. Dorfman, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 5595–5598.
- [46] G. R. Krow, *Org. React.* **1993**, *43*, 251–353.
- [47] G. R. Krow, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 2697–2724.
- [48] R. B. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 878–882.
- [49] J. A. Berson, S. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 4088–4094.
- [50] K. Mislow, J. Brenner, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2318–2322.
- [51] G. Strukul, *Angew. Chem.* **1998**, 1256–1267.
- [52] G. Strukul, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 1198–1209.
- [53] S. E. Jacobson, R. Tang, F. Mares, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1978**, 888–889.
- [54] W. A. Herrmann, R. W. Fischer, J. D. G., Correira, *J. Molecul. Cat.* **1994**, *94*, 213–223.
- [55] R. Bernini, A. Coratti, G. Fabrizi, A. Goggiamani, *Tetrahed. Lett.* **2003**, *44*, 8991–8994.
- [56] A. M. F. Philips, C. Romao, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 1767–1770.

- [57] a) G. Strukul, A. Varagnolo, F. Pinna, *J. Mol. Cat. A: Chem.* **1997**, 413–423; b) M. Del Tedesco Frisone, F. Pinna, G. Strukul, *Organometallics* **1993**, 148–156; c) A. Cavarzan, A. Scarso, P. Sgarbossa, R. A. Michelin, G. Strukul, *ChemCatChem* **2010**, 2, 1296–1302.
- [58] a) L. Syper, *Synthesis* **1989**, 167–172; b) L. Yu, Y. Wu, H. Cao, X. Zhang, X. Shi, J. Luan, T. Chen, Y. Pan, Q. Xu, *Green Chem.* **2014**, 16, 287–293.
- [59] A. Bhaumik, P. Kumar, R. Kumar, *Catal. Lett.* **1996**, 40, 47–50.
- [60] M. Sasidharan, S. Suresh, A. Sudalai, *Tetrahed. Lett.* **1995**, 36, 9071–9072.
- [61] T. Yamada, T. Takai, O. Rhode, T. Mukaiyama, *Tetrahed. Lett.* **1991**, 1–4.
- [62] a) T. Yamada, K. Takahashi, K. Kato, T. Takai, S. Inoki, T. Mukaiyama, *Chem. Lett.* **1991**, 20, 641–644; b) I. C. Chisem, J. Chisem, J. S. Rafelt, D. J. Macquarrie, J. H. Clark, K. A. Utting, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1999**, 923–930.
- [63] C. Bolm, G. Schlingloff, K. Weickhardt, *Tetrahed. Lett.* **1993**, 34, 3405–3408.
- [64] Y.-y. Yan, L.-m. Dong, J.-p. Guo, M.-y. Huang, Y.-y. Jiang, *J. Macromol. Sci., Part A* **1997**, 34, 1097–1104.
- [65] S.-I. Murahashi, Y. Oda, T. Naota, *Tetrahed. Lett.* **1992**, 33, 7557–7560.
- [66] K. Kaneda, S. Ueno, T. Imanaka, E. Shimotsuma, Y. Nishiyama, Y. Ishii, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 2915–2917.
- [67] H. Subramanian, E. G. Nettleton, S. Budhi, R. T. Koodali, *J. Mol. Cat. A: Chem.* **2010**, 330, 66–72.
- [68] E.-Y. Jeong, M. B. Ansari, S.-E. Park, *ACS Catal.* **2011**, 855–863.
- [69] a) A. Corma, L. T. Nemeth, M. Renz, S. Valencia, *Nature* **2001**, 423–425; b) M. Renz, T. Blasco, A. Corma, V. Fornés, R. Jensen, L. T. Nemeth, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 4708–4717.
- [70] S. P. Panchgalle, U. R. Kalkote, P. S. Niphadkar, P. N. Joshi, S. P. Chavan, G. M. Chaphekar, *Green Chem.* **2004**, 6, 308.
- [71] a) T. Hara, M. Hatakeyama, A. Kim, N. Ichikuni, S. Shimazu, *Green Chem.* **2012**, 14, 771; b) Z. Lei, Q. Zhang, J. Luo, X. He, *Tetrahed. Lett.* **2005**, 46, 3505–3508; c) C. Li, Z. Lei, H. Ma, S. Wu, Q. Sun, *J. Disp. Sci. Technol.* **2012**, 33, 983–989.
- [72] a) K. Kaneda, S. Ueno, T. Imanaka, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 787–789; b) K. Kaneda, T. Yamashita, *Tetrahed. Lett.* **1996**, 37, 4555–4558; c) C. Chen, J. Peng, B. Li, L. Wang, *Catal. Lett.* **2009**, 131, 618–623.
- [73] M. Hamamoto, K. Nakayama, Y. Nishiyama, Y. Ishii, *J. Org. Chem.* **1993**, 58.
- [74] a) C. Palazzi, F. Pinna, G. Strukul, *J. Mol. Cat. A: Chemical* **2000**, 245–252; b) J. Fischer, W. F. Hölderich, *Appl. Catal. A: General* **1999**, 435–443.
- [75] H.-J. Xu, F.-F. Zhu, Y.-Y. Shen, X. Wan, Y.-S. Feng, *Tetrahedron* **2012**, 68, 4145–4151.
- [76] a) W. Adam, A. Rodríguez, *J. Org. Chem.* **1979**, 26, 4969–4970; b) M. Suzuki, H. Takada, R. Noyori, *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 902–904.
- [77] S. Baj, A. Chrobok, R. Słupska, *Green Chem.* **2009**, 11, 279.
- [78] N. O. Mahmoodi, S. Z. D. Heirati, K. Ekhlasi-Kazaj, *J. Iran Chem. Soc.* **2012**, 9, 521–528.
- [79] R. Mello, A. Olmos, J. Parra-Carbonell, M. E. González-Núñez, G. Asensio, *Green Chem.* **2009**, 11, 994.
- [80] S. Baj, A. Chrobok, A. Siewniak, *Appl. Catal. A: General* **2011**, 395, 49–52.

- [81] X.-H. Li, X.-G. Meng, Y. Liu, X. Peng, *Green Chem.* **2013**, *15*, 3332.
- [82] K. Matuszek, P. Zawadzki, W. Czardybon, A. Chrobok, *New J. Chem.* **2013**, *38*, 237.
- [83] S. L. Jain, B. Sain, *Appl. Catal. A: General* **2006**, *301*, 259–264.
- [84] B. H. Brodsky, J. Du Bois, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15391–15393.
- [85] A. Gusso, C. Baccin, F. Pinna, G. Strukul, *Organometallics* **1994**, 3442–3451.
- [86] a) G. Bianchini, A. Cavarzan, A. Scarso, G. Strukul, *Green Chem.* **2009**, *11*, 1517; b) A. Cavarzan, G. Bianchini, P. Sgarbossa, L. Lefort, S. Gladiali, A. Scarso, G. Strukul, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7930–7939.
- [87] T. Uchida, T. Katsuki, *Tetrahed. Lett.* **2001**, *42*, 6911–6914.
- [88] a) S. Xu, Z. Wang, X. Zhang, X. Zhang, K. Ding, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2840–2843; b) S. Xu, Z. Wang, X. Zhang, X. Zhang, K. Ding, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2882–2885; c) B. Wang, Y.-M. Shen, Y. Shi, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9519–9521; d) S.-I. Murahashi, S. Ono, Y. Imada, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2472–2474; e) S.-I. Murahashi, S. Ono, Y. Imada, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2366–2368.
- [89] C. Bolm, K. K. Luong, G. Schlingloff, *Synlett* **1997**, 1151–1152.
- [90] a) A. V. Malkov, F. Friscourt, M. Bell, M. E. Swarbrick, P. Kočovský, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3996–4003; b) K. S. Petersen, B. M. Stoltz, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 4352–4357; c) K. Ito, A. Ishii, T. Kuroda, T. Katsuki, *Synlett* **2003**, 643–646.
- [91] C. Paneghetti, R. Gavagnin, F. Pinna, G. Strukul, *Organometallics* **1999**, *18*, 5057–5065.
- [92] a) A. Wanatabe, T. Uchida, R. Irie, T. Katsuki, *PNAS* **2004**, *101*, 5737–5742; b) C. Bolm, O. Beckmann, *Chirality* **2000**, *12*, 523–525.
- [93] K. Matsumoto, A. Watanabe, T. Uchida, K. Ogi, T. Katsuki, *Tetrahed. Lett.* **2004**, *45*, 2385–2388.
- [94] C. Bolm, O. Beckmann, A. Cosp, C. Palazzi, *Synlett* **2001**, 1461–1463.
- [95] a) J.-C. Frison, C. Palazzi, C. Bolm, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 6700–6706; b) C. Bolm, O. Beckmann, C. Palazzi, *Can. J. Chem.* **2001**, *79*, 1593–1597.
- [96] S. C. Lemoult, P. F. Richardson, S. M. Roberts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, 89–91.
- [97] M. Y. Ríos, E. Salazar, H. F. Olivo, *Green Chem.* **2007**, *9*, 459–462.
- [98] O. Kirk, M. W. Christensen, T. Damhus, S. E. Godtfredsen, *Biocatalysis* **1994**, *11*, 65–77.
- [99] B. K. Pchelka, M. Gelo-Pujic, E. Guibé-Jampel, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1998**, 2625–2628.
- [100] N. A. Donoghue, D. B. Norris, P. W. Trudgill, *Eur. J. Biochem.* **1976**, 175–192.
- [101] S. Colonna, N. Gaggero, G. Carrea, G. Ottolina, P. Pasta, F. Zambianchi, *Tetrahed. Lett.* **2002**, *43*, 1797–1799.
- [102] a) D. R. Light, D. J. Waxman, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1982**, 2490–2498; b) G. Carrea, B. Redigolo, S. Riva, S. Colonna, N. Gaggero, E. Battistel, D. Bianchi, *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, 1063–1068; c) S. Colonna, N. Gaggero, P. Pasta, G. Ottolina, *Chem. Commun.* **1996**, 2303–2307; d) J. Beecher, P. Richardson, A. Wiletta, *Biotechnol. Lett.* **1994**, *16*, 909–912; e) D. R. Kelly, C. J. Knowles, J. G. Mahdi, I. N. Taylor, M. A. Wright, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 365–368.
- [103] B. P. Branchaud, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2153–2161.
- [104] G. Ottolina, S. Bianchi, B. Belloni, G. Carrea, B. Danieli, *Tetrahed. Lett.* **1999**, *40*, 8483–8486.
- [105] C. T. Walsh, J. A. Latham, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 527–528.

- [106] J. A. Letham, B. P. Brenchaud, Y.-C. J. Chen, C. T. Walsh, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 528–530.
- [107] M. W. Fraaije, N. M. Kamerbeek, Berkel, Willem J. H. van, D. B. Janssen, *FEBS Lett.* **2002**, 43–47.
- [108] N. M. Kamerbeek, D. B. Janssen, W. J. H. van Berkel, M. W. Fraaije, *Adv. Synth. Cat.* **2003**, 345, 667–678.
- [109] C. T. Walsh, Y.-C. J. Chen, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 342–352.
- [110] C. T. Walsh, Y.-C. J. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, 27, 333–343.
- [111] M. P. Beam, M. A. Bosserman, N. Noinaj, M. Wehenkel, J. Rohr, *Biochemistry* **2009**, 48, 4476–4487.
- [112] G. de Gonzalo, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *ChemBioChem* **2010**, 11, 2208–2231.
- [113] G. E. Turfitt, *Biochem. J.* **1948**, 376–383.
- [114] J. Fried, R. W. Thoma, A. Klingsberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 5764–5765.
- [115] G. E. Peterson, R. W. Thoma, D. Perlman, J. Fried, *J. Bacteriol.* **1957**, 684–688.
- [116] H. Leisch, K. Morley, P. C. K. Lau, *Chem. Rev.* **2011**, 111, 4165–4222.
- [117] R. L. Prairie, P. Talaly, *Biochemistry* **1963**, 203–208.
- [118] M. A. Rahim, C. J. Sih, *J. Biol. Chem.* **1996**, 3615–3623.
- [119] a) Y. Hasegawa, Y. Nakai, T. Tokuyama, H. Iwaki, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, 2696–2698; b) H. H. J. Cox, B. W. Faber, W. N. M. van Heiningen, H. Radhoe, H. J. Doddema, W. Harder, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 1471–1474.
- [120] V. Champreda, N.-Y. Zhou, D. J. Leak, *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, 239, 309–318.
- [121] C. A. Townsend, S. B. Christensen, S. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 6152–6153.
- [122] a) L. N. Britton, A. J. Markovez, *J. Biol. Chem.* **1977**, 8561–8566; b) M. Griffin, P. W. Trudgill, *Eur. J. Biochem.* **1976**, 199–209; c) N. M. Kamerbeek, M. J. H. Moonen, J. G. M. van der Ven, W. J. K. van Berkel, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, *Eur. J. Biochem.* **2001**, 2547–2557; d) J. Rehdorf, C. L. Zimmer, U. T. Bornscheuer, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, 75, 3106–3114.
- [123] J. D. Schumacher, R. M. Fakoussa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 85–90.
- [124] T. Kotani, H. Yurimoto, N. Kato, Y. Sakai, *J. Bacteriol.* **2007**, 189, 886–893.
- [125] S. Hartmans, A. M. de Bont, *FEMS Microbiol. Lett.* **1986**, 155–158.
- [126] Y. C. Chen, O. P. Peoples, C. T. Walsh, *J. Bacteriol.* **1988**, 781–789.
- [127] a) S. Damtoft, H. Franzyk, S. Rosendal Jensen, *Phytochemistry* **1995**, 40, 773–784; b) J. Winter, B. Schneider, S. Meyenburg, D. Strack, G. Adam, *Phytochemistry* **1999**, 237–242.
- [128] J. L. C. Wright, T. Hu, J. L. McLachlan, J. Needham, J. A. Walter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8757–8758.
- [129] A. Willetts, *Trends Biotechnol.* **1997**, 55–62.
- [130] D. Sheng, D. P. Ballou, V. Massey, *Biochemistry* **2001**, 40, 11156–11167.
- [131] D. R. Light, D. J. Waxman, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1982**, 2490–2498.
- [132] G. Ottolina, G. de Gonzalo, G. Carrea, *J. Mol. Structure: THEOCHEM* **2005**, 757, 175–181.
- [133] D. E. Torres Pazmiño, B.-J. Baas, D. B. Janssen, M. W. Fraaije, *Biochemistry* **2008**, 47, 4082–4093.
- [134] H. Iwaki, Y. Hasegawa, M. Teraoka, T. Tokuyama, H. Bergeron, P. C. K. Lau, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 5158–5162.

- [135] Q. Cheng, S. M. Thomas, P. Rouvière, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58*, 704–711.
- [136] M. D. Mihovilovic, B. Müller, P. Stanetty, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3711–3730.
- [137] E. Malito, A. Alfieri, M. W. Fraaije, A. Mattevi, *PNAS* **2004**, *101*, 13157–13162.
- [138] D. E. Torres Pazmiño, H. M. Dudek, M. W. Fraaije, *Curr. Op. Chem. Bio.* **2010**, *14*, 138–144.
- [139] N. M. Kamerbeek, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 2107–2116.
- [140] I. A. Mirza, B. J. Yachnin, S. Wang, S. Grosse, H. Bergeron, A. Imura, H. Iwaki, Y. Hasegawa, P. C. K. Lau, A. M. Berghuis, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8848–8854.
- [141] P. Muller, *Pure Appl. Chem.* **1994**, 1077–1184.
- [142] G. Ottolina, G. de Gonzalo, G. Carrea, B. Danieli, *Adv. Synth. & Catal.* **2005**, *347*, 1035–1040.
- [143] M. D. Mihovilovic, B. Müller, M. M. Kayser, J. D. Stewart, J. Fröhlich, P. Stanetty, H. Spreitzer, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, 349–353.
- [144] K. Abokitse, W. Hummel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *62*, 380–386.
- [145] R. A. Kwiecień, F. Ayadi, Y. Nemmaoui, V. Silvestre, B.-L. Zhang, R. J. Robins, *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *482*, 42–51.
- [146] V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, 119–130.
- [147] a) R. J. Lamed, J. G. Zeikus, *Biochem. J.* **1981**, 183–190; b) E. Keinan, K. K. Seth, R. J. Lamed, *Ann. NY Acad. Sci.* **1987**, 130–149.
- [148] K. Niefind, J. Müller, B. Riebel, W. Hummel, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **2003**, *327*, 317–328.
- [149] N. H. Schlieben, K. Niefind, J. Müller, B. Riebel, W. Hummel, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **2005**, *349*, 801–813.
- [150] C. Filling, K. D. Berndt, J. Benach, S. Knapp, T. Prozorovski, E. Nordling, R. Ladenstein, H. Jörnvall, U. Oppermann, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25677–25684.
- [151] W. Hummel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1990**, 15–19.
- [152] W. Hummel, *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* **1997**, 145–184.
- [153] W. Hummel, *Trends Biotechnol.* **1999**, 487–492.
- [154] W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 120–126.
- [155] C.-H. Wong, D. G. Drueckhammer, H. M. Sweers, *J. Am. Chem. Soc.*, *1985*, 4028–4031.
- [156] C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4890–4899.
- [157] R. Wichmann, C. Wandrey, A. F. Bückmann, M.-R. Kula, *Biotechnol. Bioengin.* **1981**, 2789–2802.
- [158] J. M. Vrtis, A. K. White, W. W. Metcalf, van der Donk, Wilfred A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3257–3259.
- [159] J. M. Vrtis, A. K. White, W. W. Metcalf, van der Donk, Wilfred A., *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3391–3393.
- [160] D. E. Torres Pazmiño, R. Snajdrova, B.-J. Baas, M. Ghobrial, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 2275–2278.
- [161] H. Gröger, F. Chamouleau, N. Orologas, C. Rollmann, K. Drauz, W. Hummel, A. Weckbecker, O. May, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5806–5809.
- [162] M. C. Hogan, J. M. Woodley, *Chem. Engin. Sci.* **2000**, *55*, 2001–2008.
- [163] A. J. Willetts, C. J. Knowles, M. S. Levitt, S. M. Roberts, H. Sandey, N. F. Shipston, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1991**, 1608.

- [164] G. Grogan, S. M. Roberts, A. Willetts, *Biotechnol. Lett.* **1992**, *14*, 1125–1130.
- [165] a) "NADP+ (β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrate)", zu finden unter <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n5755?lang=de®ion=DE>, **2014**; b) "NADPH (β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced tetra(cyclohexylammonium) salt)", zu finden unter <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n5130?lang=de®ion=DE>, **2014**.
- [166] F. Hollmann, A. Taglieber, F. Schulz, M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2961–2964.
- [167] F. Hollmann, K. Hofstetter, A. Schmid, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 163–171.
- [168] H. Mallin, H. Wulf, U. T. Bornscheuer, *Enz. Microb. Technol.* **2013**, *53*, 283–287.
- [169] J. T. Vicenzi, M. J. Zmijewski, M. R. Reinhard, B. E. Landen, W. L. Muth, P. G. Marler, *Enz. Microb. Technol.* **1997**, 494–499.
- [170] a) H. D. Simpson, V. Alphand, R. Furstoss, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, 101–108; b) I. Hilker, V. Alphand, R. Wohlgemuth, R. Furstoss, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 203–214.
- [171] F. Schulz, F. Leca, F. Hollmann, M. T. Reetz, *Beilstein J. Org. Chem.* **2005**, *1*, 10.
- [172] A. Rioz-Martínez, G. de Gonzalo, D. E. Torres Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 2526–2532.
- [173] G. de Gonzalo, G. Ottolina, F. Zambianchi, M. W. Fraaije, G. Carrea, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *39*, 91–97.
- [174] A. M. Klibanov, *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 97–101.
- [175] C. Laane, S. Boeren, K. Vos, C. Veeger, *Biotechnol. Bioengin.* **1987**, 81–87.
- [176] S. C. Basak, G. J. Niemi, G. D. Veith, *J. Math. Chem.* **1990**, 185–205.
- [177] J. Sangster, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1989**, *18*, 1111–1227.
- [178] a) D. Sheng, D. P. Ballou, V. Massey, *Biochemistry* **2001**, *40*, 11156–11167; b) B. J. Yachnin, T. Sprules, M. B. McEvoy, Lau, Peter C K, A. M. Berghuis, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7788–7795.
- [179] F. Zambianchi, P. Pasta, G. Carrea, S. Colonna, N. Gaggero, J. M. Woodley, *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *78*, 489–496.
- [180] Merck Millipore, "Sicherheitsdatenblatt. E-Caproacton", zu finden unter http://www.emdmillipore.com/DE/de/product/%CE%B5-Caprolacton,MDA_CHEM-802801#anchor_MSD.
- [181] J. D. Stewart, K. W. Reed, C. A. Martinez, J. Zhu, G. Chen, M. M. Kayser, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 3541–3548.
- [182] N. Berezina, E. Kozma, R. Furstoss, V. Alphand, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 2049–2053.
- [183] "Isophoron. Damit der Lack nicht ab ist", zu finden unter <http://history.evonik.com/sites/geschichte/de/erfindungen/isophoron/Pages/default.aspx>.
- [184] C. Jiménez-Sanchidrián, J. R. Ruiz, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 2011–2026.
- [185] R. Gupta, N. Gupta, P. Rathi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 763–781.
- [186] A. Pandey, S. Benjamin, C. R. Soccol, P. Nigam, N. Krieger, V. T. Soccol, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, 119–131.
- [187] K.-E. Jaeger, S. Ransac, B. W. Dijkstra, C. Colson, M. van Heuvel, O. Misset, *FEMS Microbiol. Rev.* **1994**, 29–63.

- [188] N. J. Turner, *Nature Chem. Biol.* **2009**, *5*, 567–573.
- [189] K.-E. Jaeger, T. Eggert, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 390–397.
- [190] American Chemical Society, "SciFinder.cas.org", zu finden unter <https://scifinder.cas.org>.
- [191] L. Brady, A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J. P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Høge-Jensen, L. Norskov et al., *Nature* **1990**, 767–770.
- [192] F. K. Winkler, A. D'Arcy, W. Hunziker, *Nature* **1990**, 771–774.
- [193] K.-E. Jaeger, B. W. Dijkstra, M. T. Reetz, *Annu. Rev. Microbiol.* **1999**, 315–351.
- [194] J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, T. A. Jones, *Structure* **1994**, 293–308.
- [195] E. M. Anderson, K. M. Larsson, O. Kirk, *Biocatal. Biotrans.* **1998**, 181–204.
- [196] F. Secundo, G. Carrea, C. Soregaroli, D. Varinelli, R. Morrone, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 157–163.
- [197] J. Uppenberg, N. Öhrner, M. Norin, K. Hult, G. J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen, T. A. Jones, *Biochemistry* **1995**, 16838–16851.
- [198] R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, 2656–2665.
- [199] V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111–120.
- [200] D. Xia, X. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 3425–3428.
- [201] G. Hou, F. Gosselin, W. Li, J. C. McWilliams, Y. Sun, M. Weisel, P. D. O'Shea, C.-y. Chen, I. W. Davies, X. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9882–9883.
- [202] K.-i. Yamada, K. Tomioka, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2874–2886.
- [203] J. M. Blackwell, E. R. Sonmor, T. Scoccitti, W. E. Piers, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3921–3923.
- [204] N. B. Johnson, M. J. Burk, G. Casy (Chirotech Technology Ltd.), WO 9918065A1 I, **1998**.
- [205] M. J. Burk, G. Casy, N. B. Johnson, *J. Org. Chem.* **1998**.
- [206] 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.
- [207] F. G. Mutti, J. Sattler, K. Tauber, W. Kroutil, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 109–111.
- [208] M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 806–843.
- [209] K. Tomioka, I. Inoue, M. Shindo, K. Koga, *Tetrahed. Lett.* **1990**, 6681–6684.
- [210] S. E. Denmark, C. M. Stiff, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5875–5878.
- [211] a) I. Sato, K. Hosoi, R. Kodaka, K. Soai, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3115–3118; b) I. Sato, R. Kodaka, K. Soai, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 2912–2914.
- [212] a) M. Bao, H. Nakamura, Y. Yamamoto, *Tetrahed. Lett.* **2000**, 131–134; b) R. A. Fernandes, A. Stimac, Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14133–14139; c) R. A. Fernandes, Y. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 735–738; d) K. Nakamura, H. Nakamura, Y. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2614–2615.
- [213] H.-U. Blaser, H.-P. Buser, H.-P. Jalett, B. Pugin, F. Spindler, *Synlett* **1999**, 867–868.
- [214] H.-U. Blaser, F. Spindler, *Top. Catal.* **1997**, 275–282.
- [215] S. Ram, R. E. Ehrenkauf, *Synthesis* **1988**, 91–95.
- [216] R. Kadyrov, T. H. Riermeier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5472–5474.
- [217] X.-M. Zhou, J.-D. Huang, L.-B. Luo, C.-L. Zhang, Z. Zheng, X.-P. Hu, *Tetrahed. Asymm.* **2010**, *21*, 420–424.

- [218] L. Pignataro, S. Carboni, M. Civera, R. Colombo, U. Piarulli, C. Gennari, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 6783–6787.
- [219] X.-P. Hu, J.-D. Huang, Q.-H. Zeng, Z. Zheng, *Chem. Commun.* **2006**, 293–295.
- [220] N. J. Turner, *Nature Chem. Bio.* **2009**, *5*, 567–573.
- [221] S. Mathew, H. Yun, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 993–1001.
- [222] D. Zhu, L. Hua, *Biotechnol. J. (Biotechnology journal)* **2009**, *4*, 1420–1431.
- [223] United States Environmental Protection Award, "2010 Greener Reaction Conditions Award", zu finden unter <http://www2.epa.gov/green-chemistry/2010-greener-reaction-conditions-award>, **2015**.
- [224] K. Faber, W. Kroutil, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 181–187.
- [225] R. Carr, M. Alexeeva, A. Enright, Eve, Tom S C, M. J. Dawson, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4807–4810.
- [226] G. P. Moss, *Pure Appl. Chem.* **1996**, 2193–2222.
- [227] O. Ghisalba, M. Kittelmann, K. Laumen, P. Walser-Volken (Novartis AG), EP0954571B1 I, **1997**.
- [228] H. Smidt, A. Fischer, P. Fischer, R. D. Schmid, U. Stelzer (Bayer AG), EP0812363B1, **1996**.
- [229] F. Balkenhohl, K. Ditrich, B. Hauer, W. Ladner, *J. Prakt. Chem.* **1997**, 381–384.
- [230] a) M. Cammenberg, K. Hult, S. Park, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1745–1749; b) H. Ismail, R. Madeira Lau, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1511–1516.
- [231] O. Pàmies, A. H. Èll, J. S. M. Samec., N. Hermanns, J.-E. Bäckvall, *Tetrahed. Lett.* **2002**, 4699–4702.
- [232] J. Paetzold, J. E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17620–17621.
- [233] L. K. Thalén, D. Zhao, J.-B. Sortais, J. Paetzold, C. Hoben, J.-E. Bäckvall, *Chemistry* **2009**, *15*, 3403–3410.
- [234] K. Ditrich, U. Block (BASF AG), WO 0046177A1 I, **2000**.
- [235] A. Maestro, C. Astorga, V. Gotor, *Tetrahed. Asymm.* **1997**, 3153–3159.
- [236] A. Luna, I. Alfonso, V. Gotor, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3627–3629.
- [237] I. Alfonso, C. Astorga, F. Rebolledo, V. Gotor, *Chem. Commun.* **1996**, 2471–2472.
- [238] E. J. Ebbers, Ariaans, Gerry J. A., Houbiers, Joannes P. M., A. Bruggink, B. Zwanenburg, *Tetrahedron* **1997**, 9417–9476.
- [239] M. Stirling, J. Blacker, M. I. Page, *Tetrahed. Lett.* **2007**, *48*, 1247–1250.
- [240] M. T. Reetz, K. Schimossek, *Chimia* **1996**, 668–669.
- [241] A. N. Parvulescu, P. A. Jacobs, D. E. de Vos, *Chemistry* **2007**, *13*, 2034–2043.
- [242] M.-J. Kim, W.-H. Kim, K. Han, Y. K. Choi, J. Park, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1157–1159.
- [243] S. Gastaldi, S. Escoubet, N. Vanthuyne, G. Gil, M. P. Bertrand, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 837–839.
- [244] a) J. Gu, M. Liu, F. Guo, W. Xie, W. Lu, L. Ye, Z. Chen, S. Yuan, H. Yu, *Enz. Microb. Technol.* **2014**, *55*, 121–127; b) U. Felfer, M. Goriup, M. F. Koegl, U. Wagner, B. Larissegger-Schnell, K. Faber, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 951–961.
- [245] P. Trodler, J. Pleiss, *BMC Struct. Biol.* **2008**, *8*, 9.
- [246] D. S. Clark, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **2004**, *359*, 1299–1307.
- [247] P. Tufvesson, A. Annerling, R. Hatti-Kaul, D. Adlercreutz, *Biotechnol. Bioengin.* **2007**, *97*, 447–453.

- [248] A. B. Majumder, B. Singh, D. Dutta, S. Sadhukhan, M. N. Gupta, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4041–4044.
- [249] a) A. Mahapatro, A. Kumar, B. Kalra, R. A. Gross, *Macromol.* **2004**, *37*, 35–40; b) B. Guyot, M. Pina, J. Graille, *Biotechnol. Lett.* **1997**, *6*, 529–532; c) L. Hilterhaus, O. Thum, A. Liese, *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 618–625; d) G. A. Hills, A. R. Macrae, R. R. Poulina, **1990**; e) K. Bélafi-Bakó, F. Kovács, L. Gubicza, J. Hancsók, *Biocatal. Biotransform.* **2002**, *20*, 437–439; f) V. V. Kuperkar, V. G. Lade, A. Prakash, V. K. Rathod, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2014**, *99*, 143–149; g) R. Irimescu, T. Saito, K. Kato, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *27*, 69–73.
- [250] R. Irimescu, K. Kato, *Tetrahed. Lett.* **2004**, *45*, 523–525.
- [251] N. Öhrner, C. Orrenius, A. Mattson, T. Norin, K. Hult, *Enz. Microb. Technol.* **1996**, 328–331.
- [252] A. K. Prasad, M. Husain, B. K. Singh, R. K. Gupta, V. K. Manchanda, C. E. Olsen, V. S. Parmar, *Tetrahed. Lett.* **2005**, *46*, 4511–4514.
- [253] Z. Finta, Z. Hell, J. Bálint, A. Takács, L. Párkányi, L. Töke, *Tetrahed. Asymm.* **2001**, 1287–1292.
- [254] K. Wang, K. Nguyen, Y. Huang, A. Dömling, *J. Combinat. Chem.* **2009**, *11*, 920–927.
- [255] C. E. Rye, D. Barker, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6636–6648.
- [256] D. C. Horwell, R. A. Lewthwaite, M. C. Pritchard, G. S. Ratcliffe, J. R. Rubin, *Tetrahedron* **1998**, 4591–4606.
- [257] K. E. Price, C. Larrivéé-Aboussafy, B. M. Lillie, R. W. McLaughlin, J. Mustakis, K. W. Hettenbach, J. M. Hawkins, R. Vaidyanathan, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2003–2006.
- [258] K. Faber, W. Kroutil, "Enantioselectivity", zu finden unter <http://biocatalysis.uni-graz.at/enantio/cgi-bin/enantio.pl>, **2014**.
- [259] M. Fuchs, D. Koszelewski, K. Tauber, W. Kroutil, K. Faber, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5500–5502.
- [260] J. Mangas-Sánchez, M. Rodríguez-Mata, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5304–5310.
- [261] B. C. Vanwagenen, S. R. Duff, W. A. Nelson, T. E. D'Ambra, WO 9602492A1 I, **2014**.
- [262] a) "Diethyl malonate", zu finden unter <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w237507?lang=de®ion=DE>, **2014**;
b) "Benzylamin", zu finden unter <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/185701?lang=de®ion=DE>, **2014**.
- [263] "Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02", zu finden unter www.scifinder.cas.org, **2015**.
- [264] K. Ditrach (BASF), WO 2006136538A1 I, **2006**.
- [265] a) c-LEcta, "CalB lyo. immobilized, recombinant", zu finden unter <http://www.c-lecta.com/?lang=de&category=products&page=lipasen>, **2014**; b) c-LEcta, "CalB immo. immobilized, recombinant", zu finden unter <http://www.c-lecta.com/?lang=de&category=products&page=lipasen>, **2014**.
- [266] a) M. M. Darla, B. S. Krishna, K. Umamaheswara Rao, N. B. Reddy, M. K. Srivash, K. Adeppa, C. S. Sundar, C. S. Reddy, K. Misra, *Res. Chem. Intermed.* **2015**, *41*, 1115–1133; b) W. Priebe, N. Donato, M. Talpaz, S. Szymanski, I. Fokt, A. Levitki, WO 2005058829 A1, **2005**.

- [267] X. Huang, M. Ortiz-Marciales, K. Huang, V. Stepanenko, F. G. Merced, A. M. Ayala, W. Correa, M. D. Jesús, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1793–1795.
- [268] M. Binanzer, S.-Y. Hsieh, J. W. Bode, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19698–19701.
- [269] A. Liljeblad, J. Lindborg, A. Kanerva, J. Katajisto, L. T. Kanerva, *Tetrahed. Lett.* **2002**, 2471–2474.
- [270] a) T. K. Houlding, K. Tchabanenko, M. T. Rahman, E. V. Rebrov, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 4171–4177; b) C. L. Allen, A. R. Chhatwal, Williams, Jonathan M J, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 666–668; c) A. Orliac, D. Gomez Pardo, A. Bombrun, J. Cossy, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 902–905.
- [271] L. A. Henderson, Y. Y. Svirkin, R. A. Gross, *Macromolecules* **1996**, 7759–7766.
- [272] B. H. Brodsky, J. Du Bois, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15391–15393.
- [273] N. Chandan, A. L. Thompson, M. G. Moloney, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 7863.
- [274] Y. Ksashima, A. Uzawa, K. Hashimoto, Y. Yokoyama, T. Mino, M. Sakamoto, T. Fujita, *J. Oleo Sci.* **2010**, *11*, 607–613.
- [275] B. V. Subba Reddy, N. Sivasankar Reddy, C. Madan, J. S. Yadav, *Tetrahed. Lett.* **2010**, *51*, 4827–4829.
- [276] M. A. J. Veld, K. Hult, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *2007*, 5416–5421.
- [277] N. D. Paul, A. Chirila, H. Lu, X. P. Zhang, B. de Bruin, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 12953–12958.
- [278] T. Zweifel, J.-V. Naubron, H. Grützmacher, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 559–563.
- [279] N. Chandan, A. L. Thompson, M. G. Moloney, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 7863.
- [280] N. Shindo, *Bull. Fac. Agricul.* **1988**, 29.
- [281] Y. Kita, O. Tamura, N. Shibata, T. Miki, *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, 1473–1478.