

DOI: 10.1002/ange.200503394

Enantioselektive Ketonreduktion mit „Designerzellen“ bei hohen Substratkonzentrationen: hocheffizienter Zugang zu funktionalisierten optisch aktiven Alkoholen**

Harald Gröger,* Françoise Chamoulea,
Nicolas Orologas, Claudia Rollmann, Karlheinz Drauz,
Werner Hummel, Andrea Weckbecker und Oliver May*

Die Cofaktor-abhängige asymmetrische Reduktion von Ketonen unter Verwendung von Alkoholdehydrogenasen ist eine nützliche Methode zur Synthese optisch aktiver Alkohole.^[1] Zur In-situ-Regenerierung des wegen seines hohen Preises nur in katalytischen Mengen verwendeten Cofaktors stehen sowohl Substrat-gekoppelte^[2] als auch Enzym-gekoppelte^[3] Methoden zur Verfügung. Eine unabdingbare Voraussetzung für die kompetitive Anwendung dieser Enzymtechnologie im technischen Maßstab, besonders unter Berücksichtigung der hohen Effizienz der metallkatalytischen Hydrierung als Bezugsgröße,^[4] ist die Durchführung solcher biokatalytischen Reduktionen bei hohen Substratkonzentrationen und vorzugsweise ohne Zusatz an „externen“ Cofaktoren.

Bis dato erfüllen die meisten biokatalytischen Synthesen unter Anwendung eines Enzym-gekoppelten Ansatzes diese Voraussetzungen nicht und tolerieren Substratkonzentrationen von höchstens 50 g L^{-1} , oftmals sogar nur von weniger als

10 g L^{-1} . Entsprechend sind nur wenige Literaturbeispiele bekannt, die entweder technisches Anwendungspotenzial aufweisen oder gar bereits in Anwendungen im industriellen Maßstab eingesetzt worden sind.^[3,5]

Eine der Ausnahmen ist die von Shimizu et al. entwickelte, Ganzzell-katalysierte Reduktion von 4-Chlor-3-oxo-buttersäureethylester mit einer beeindruckenden Substratkonzentration von 250 g L^{-1} in einem zweiphasigen Lösungsmittelsystem aus Essigsäure-*n*-butylester und einer wässrigen Pufferlösung (Umsatz 89%; Enantioselektivität > 99% ee).^[3a,b] Erforderlich sind dabei nur sehr niedrige, katalytische Mengen des teuren Cofaktors.^[3a,b] Kürzlich berichteten zudem Weuster-Botz et al. über eine Methode, in der (noch teure) ionische Flüssigkeiten zum Einsatz kamen; die maximalen Substratkonzentrationen bezogen auf das Volumen des Gesamtlösungsmittels lagen hier bei ca. 20 g L^{-1} .^[3c] Die Arbeitsgruppe um Matsuyama berichtete über Reduktionen mit Substratkonzentrationen im Bereich von $30\text{--}50\text{ g L}^{-1}$, wobei ein rekombinanter Ganzzellkatalysator verwendet wurde, der eine Alkoholdehydrogenase (ADH) und Formiatdehydrogenase enthielt.^[3d] Nachteilig bei der Verwendung von Formiatdehydrogenase für die Regenerierung des Cofaktors ist ihre geringe spezifische Aktivität von maximal ca. 10 U pro Milligramm gereinigten Enzyms, was zu einem ungünstigen Verhältnis von Substrat- zu Katalysatormenge führt.

Hier berichten wir über ein die bisherigen Verfahren ergänzendes, einfaches, hocheffizientes und breit anwendbares Verfahren zur Synthese optisch aktiver Alkohole unter Einsatz von „Designerzellen“ (mit hoher Expression der benötigten Enzyme), das hohe Substratkonzentrationen von > 100 g L^{-1} toleriert, ohne „externen“ Cofaktor auskommt und in rein wässrigem Reaktionsmedium abläuft. Das Verfahren eignet sich für die Bildung eines breiten Spektrums (funktionalisierter) *R*- und *S*-Alkohole mit Umsätzen von > 90% und Enantioselektivitäten von zumeist > 99% ee.

Für die gewünschte asymmetrische Reduktion – gemäß dem Prozessschema in Schema 1 – wurden mit Blick auf die Entwicklung eines effizienten, „maßgeschneiderten“ Ganzzellbiokatalysators ADHs mit einer hohen spezifischen Aktivität gewählt. Dabei erwiesen sich die *R*-enantioselektive ADH aus *Lactobacillus kefir*^[6a,b] und die *S*-enantioselektive ADH aus *Rhodococcus erythropolis*^[6c,d] (mit spezifischen Aktivitäten von mehr als 1000 U mg^{-1} für eine Reihe von Substraten) als besonders geeignet. Diese Enzyme liegen zudem bereits in der für technische Anwendungen erforderlichen, rekombinanten Form vor.^[6] Für eine hohe Effizienz des Ganzzellkatalysators ist auch eine hohe Aktivität des Cofaktor-regenerierenden Enzyms wünschenswert, weswegen bevorzugt Glucosedehydrogenasen mit einer Aktivität von mehreren Hundert U pro Milligramm gereinigten Proteins eingesetzt wurden. Die Coexpression der jeweiligen Alkoholdehydrogenase mit einer Glucosedehydrogenase verlief bei Verwendung des Stammes *E. coli* DSM14459 als Wirtorganismus äußerst erfolgreich.

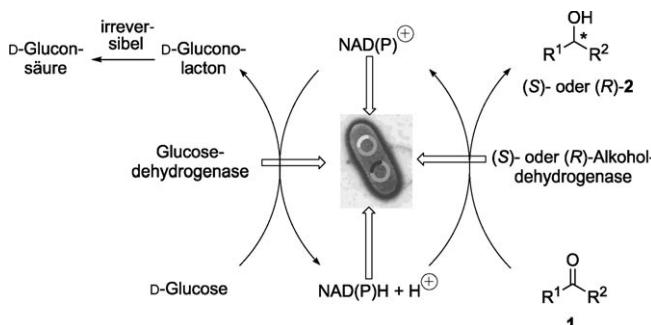
Im Folgenden demonstrieren wir dieses Konzept anhand des Designs eines *S*-enantioselektiven Ganzzellkatalysators (Schema 2). Dabei kommt eine Einplasmidstrategie zum Einsatz, bei der die beiden Gene, die für die Alkoholdehy-

[*] Dr. H. Gröger, Dr. F. Chamoulea, Dr. N. Orologas, C. Rollmann, Dr. O. May
Degussa AG
Service Center Biocatalysis
Postfach 1345, 63403 Hanau (Deutschland)
Fax: (+49) 618-159-2961
E-Mail: harald.groeger@degussa.com
oliver.may@degussa.com

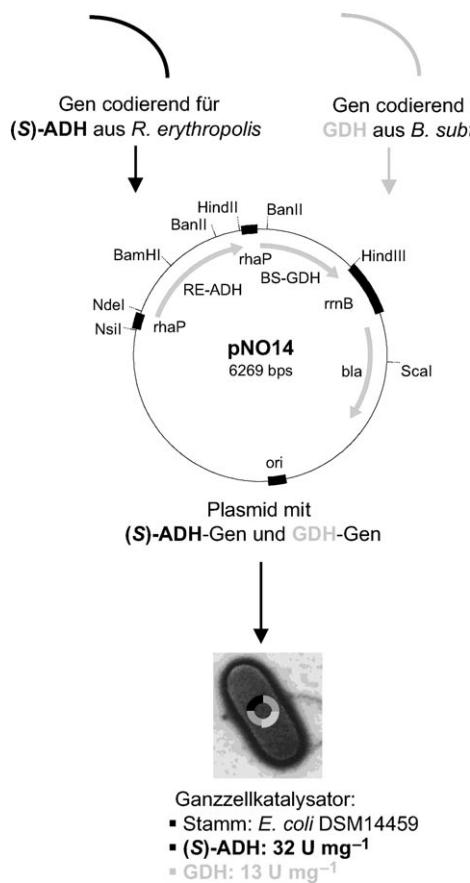
Prof. Dr. K. Drauz
Degussa AG
Corporate Center Innovationsmanagement
Postfach 1345, 63403 Hanau (Deutschland)
Prof. Dr. W. Hummel, A. Weckbecker
Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
auf dem Gelände des Forschungszentrums Jülich
Wilhelm-Johnen-Straße, 52426 Jülich (Deutschland)

[**] Wir danken dem BMBF für die Förderung des Projekts „Entwicklung eines biokatalytischen und nachhaltigen Verfahrens zur industriellen Herstellung enantiomerenreiner Amine und Alkohole unter besonderer Berücksichtigung der Atomökonomie“ im Rahmen des Förderprogramms „Biotechnologie 2000 – Nachhaltige BioProduktion“. Für die Durchführung der HPLC- und GC-Analysen sowie der NMR-spektroskopischen Messungen sei Dr. F.-R. Kunz und Dr. M. Janik und ihren Teams (Degussa, AQura GmbH) gedankt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



Schema 1. Allgemeines Reaktionsschema für das angestrebte Verfahren.



Schema 2. Konzept der „Designer-Bugs“-Ganzzellkatalysatoren („Designer Bug“: rekombinanter Mikroorganismus, in dem die Gene der gewünschten Enzyme überexprimiert werden).

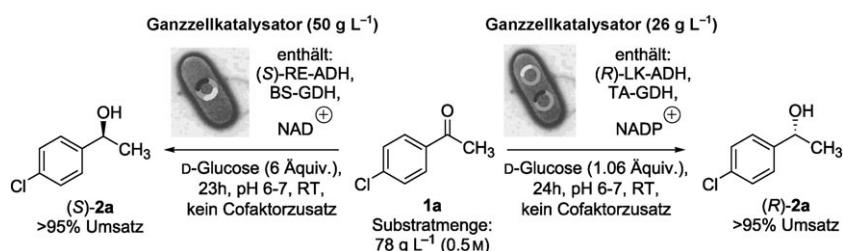
drogenase aus *Rhodococcus erythropolis* sowie für die Glucosedehydrogenase aus *Bacillus subtilis*^[6e] codieren, in ein Plasmid (pNO14c) ligiert wurden. Als Wirtorganismus fungiert *E. coli* DSM14459. Beide benötigten Enzyme werden überexprimiert und mit guten Aktivitäten von 32 U mg⁻¹ Rohprotein für die rekombinante (S)-Alkoholdehydrogenase aus *R. erythropolis* [(S)-RE-ADH] sowie 13 U mg⁻¹ Rohprotein für die rekombinante Glucosedehydrogenase aus *B. subtilis* (BS-GDH) erhalten. Der Aufbau des *R*-enantioselektiven Ganzzellkatalysators

erfolgte analog mit *E. coli* DSM14459 als Wirtorganismus, allerdings wurden zwei Plasmide (pNO5c/pNO8c) verwendet, die Gene enthalten, die zum einen für die oben erwähnte ADH aus *L. kefir* [(*R*)-LK-ADH] und zum anderen für eine Glucosedehydrogenase aus *Thermoplasma acidophilum* (TA-GDH)^[6f] codieren.

Die Durchführung der Reaktion in reinem Wasser oder wässriger Pufferlösung wurde in Betracht gezogen, um ein möglichst einfaches Reaktionssystem zu erhalten. Dieses Konzept eignete sich – unter Überschreitung der Löslichkeitsgrenze und Bildung einer zweiten Phase oder einer Emulsion – hervorragend für die angestrebten asymmetrischen Reduktionen, die zudem ohne Zusatz eines „externen“ Cofaktors verliefen. Dabei konnte ein hoher Umsatz bereits in den einleitenden Untersuchungen erzielt werden, bei denen das Modellsubstrat 4-Chloracetophenon (**1a**) in einer Konzentration von 500 mM (78 g L⁻¹) eingesetzt wurde (Schema 3). Interessanterweise wurden sowohl mit dem *R*-als auch mit dem *S*-enantioselektiven Ganzzellkatalysator Umsätze von > 95 % erzielt. Ein möglicher negativer Effekt infolge von hohen Substratkonzentrationen und damit verbundener Destabilisierung – hervorgerufen durch Effekte an der vergrößerten Phasengrenzfläche – tritt somit nicht oder zumindest nicht in nennenswertem Maße auf. Die Gegenwart einer organischen Phase dürfte zudem wesentlich zur Permeabilisierung der Zellmembran beitragen, die für den Stofftransport erforderlich ist.

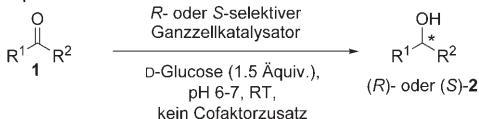
Im Anschluss wurden präparative Versuche mit mehreren Substraten bei hohen Konzentrationen durchgeführt. Typischerweise lagen die Substratkonzentrationen bei 1.0 M oder darüber und überstiegen damit signifikant 100 g Substrat pro Liter Reaktionsvolumen. Die Reaktionsführung ist sehr ökonomisch und einfach: Außer dem Substrat und der Glucose wird zum Starten der Reaktion lediglich der Ganzzellkatalysator (als Biofeuchtmasse) benötigt; dem Reaktionsgemisch muss kein (oder in Ausnahmefällen nur sehr wenig) Cofaktor zugesetzt werden. Die Reaktion mit dem Modellsubstrat **1a** gelingt bei einer Substratkonzentration von 1.0 M (156 g L⁻¹) bei Einsatz des *S*-enantioselektiven Ganzzellkatalysators mit einem hohen Umsatz von 94 % bei gleichzeitiger Exzellenz der Enantioselektivität von > 99.8 % ee (Tabelle 1, Nr. 1). Eine Zugabe von Cofaktor ist hierbei nicht erforderlich.

Anschließend wurde eine Reihe weiterer Ketone zu den *S*- und *R*-Enantiomeren der Alkohole **2** umgesetzt, wofür ebenfalls kein Zusatz von Cofaktor notwendig war. Die Reaktion gelingt auch unter Einsatz von Acetophenonsubstanzen mit sterisch anspruchsvollen Resten. So wird beim Einsatz des *R*-enantioselektiven Ganzzellkatalysators 4-Phenoxy-



Schema 3. Umsetzungen bei 500 mM Substratkonzentration.

Tabelle 1: Präparative Beispiele.



Nr.	Produkt	abs. Konf. ^[a]	Biokatalysator ^[b] (Menge in g L ⁻¹)	Substratkonz. [g L ⁻¹]	t [h]	Umsatz [%]	ee [%]
1 ^[c]		(S)-2a	(S)-ADH/GDH (52)	156	31	94	>99.8
2		(R)-2b	(R)-ADH/GDH (52)	212	25	>95	>99.4
3		(S)-2c	(R)-ADH/GDH (52)	140	26	94	97
4		(S)-2d	(S)-ADH/GDH (51)	210	27	93	96
5		(S)-2e	(S)-ADH/GDH (48)	156	76	95	>99.4

[a] Absolute Konfiguration. [b] Eingesetzt als Biofeuchtmasse. [c] Es wurden 3 Äquiv. Glucose eingesetzt.

acetophenon (1.0 M; 212 g L⁻¹) mit einem Umsatz von >95 % und einer Enantioselektivität von >99.4 % ee in das gewünschte (R)-2b überführt (Tabelle 1, Nr. 2). Die Ausbeute des nach einfacher extraktiver Aufarbeitung in hoher Reinheit erhaltenen (R)-2b lag bei 88 %.

Im weiteren Verlauf wurden Substrate untersucht, die eine zusätzliche funktionelle Gruppe tragen und so nachfolgende Funktionalisierungen ermöglichen. Besonders interessante Substrate sind dabei α -halogenierte Acetophenone, die die Möglichkeit bieten, die entsprechenden Alkohole vom Typ 2c anschließend in bekannter Weise in optisch aktive Epoxide umzuwandeln, die ebenfalls von kommerziellem Interesse sind. Exemplarisch wurde diese Reaktion mit 2-Brom-1-(4-bromphenyl)ethanon als Substrat untersucht. Als Biokatalysator wurde der R-enantioselektive *E. coli*-Stamm DSM14459 gewählt, der die ADH aus *L. kefir* enthält. Die Reaktion verläuft bei einer Substratkonzentration von 0.5 M (140 g L⁻¹) äußerst effizient unter Bildung des gewünschten Alkohols (S)-2c mit einem Umsatz von 94 % und einer Enantioselektivität von 97 % ee (Tabelle 1, Nr. 3).

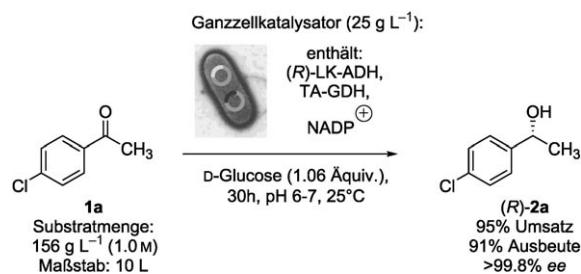
Auch die enantioselektive Reduktion sterisch anspruchsvoller α -Ketoester ist möglich. So wird 4-Phenyl-2-oxobuttersäureethylester mit einer Substratkonzentration von 1.02 M (210 g L⁻¹) in (S)-2d mit einem Umsatz von 93 % und einer Enantioselektivität von 96 % ee umgewandelt (Tabelle 1, Nr. 4). Biokatalysator ist hier der Stamm *E. coli* DSM14459, der die S-enantioselektive ADH aus *R. erythropolis* enthält.

Bemerkenswert ist auch die Eignung der Biokatalysatoren für die Reduktion von Acetophenonderivaten mit Substituenten in der *ortho*-Position. Die Umsetzung dieses Substrattyps hat sich unter anderem bei chemokatalytischen

Reduktionen als oftmals schwierig erwiesen. Beim Einsatz des R-enantioselektiven Ganzzellkatalysators wurde (R)-2e allerdings mit einer deutlich verminderten Enantioselektivität von 90 % ee erhalten, wobei auch diese Reaktion bei einer hohen Substratkonzentration von 156 g L⁻¹ durchgeführt und dabei ein Umsatz von >95 % nach einer verlängerten Reaktionszeit von 53 h erhalten wurde. Der analoge S-enantioselektive Ganzzellkatalysator führte dagegen zu (S)-2e mit >99.4 % ee bei einem Umsatz von 95 %, allerdings erst nach verlängerter Reaktionszeit von 76 h (Tabelle 1, Nr. 5). Bei den bisher untersuchten Reduktionen, die sich auch zur Umsetzung von rein aliphatischen Ketonen eignen, ergab sich keine Einschränkung durch die geringe Löslichkeit des Ketons in wässrigem Reaktionsmedium.

Die hohen Reaktionsgeschwindigkeiten, Umsätze und Enantioselektivitäten sowie die einfache Durchführbarkeit bei hohen Substratkonzentrationen ermöglichen eine schnelle Übertragung des Verfahrens auf einen größeren Maßstab. Dies soll am Beispiel der Reduktion von 1a im 10-L-Maßstab verdeutlicht werden (Schema 4).

Bei Durchführung der Reaktion mit einer Substratkonzentration von 1.0 M (156 g L⁻¹) erhält man mit dem R-enantio-



Scheme 4: Anwendung des Verfahrens im 10-L-Maßstab.

selektiven Ganzzellkatalysator einen Umsatz von 95 % nach einer Reaktionszeit von 30 h. Anschließende Filtration (nach Herabsetzen des pH-Werts und Zugabe eines Filterhilfsstoffes in Anlehnung an ein ähnliches Verfahren^[7] zur Vermeidung der Emulsionsbildung beim Downstream Processing), Extraktion und Eindampfen des Solvens liefert (R)-2a bereits als Rohprodukt in einer Ausbeute von 91 % mit einer Reinheit von 95 % und einem exzellenten Enantiomerenüberschuss von >99.8 % ee (Schema 4). Die Reaktion wurde bei einer niedrigen Biokatalysatorkonzentration von 25 g Biofeuchtmasse pro Liter durchgeführt.

Damit steht nun ein praktikables biokatalytisches Reduktionskonzept unter Einsatz eines maßgeschneiderten Ganzzellkatalysators in einem rein wässrigen Reaktionsme-

dium zur Verfügung, das sich leicht auf größere Maßstäbe übertragen lässt. Es liefert unter Einsatz hoher Substratkonzentrationen von $> 100 \text{ g L}^{-1}$ effizient die gewünschten (funktionalisierten) *R*- und *S*-Alkohole mit hohen Umsätzen ($> 90\%$) und Enantioselektivitäten (zumeist $> 99\% ee$, teilweise sogar $> 99.8\% ee$). Das Verfahren ist (nach erfolgter Optimierung) bereits technisch etabliert und wird gegenwärtig auf die Reduktion weiterer Substrate erweitert.

Experimentelles

Allgemeine Versuchsvorschrift zur Herstellung der Ganzzellkatalysatoren: Chemisch kompetente Zellen von *E. coli* DSM14459^[8a] werden mit dem Plasmid pNO14c (Schema 2) oder den Plasmiden pNO5c und pNO8c (siehe Hintergrundinformationen) gemäß dem in Lit. [8b] beschriebenen Vorgehen transformiert (für die Gensequenzen der Plasmide siehe Hintergrundinformationen). Das Plasmid pNO14c codiert für eine Alkoholdehydrogenase aus *R. erythropolis*^[6c,d] und eine Glucosedehydrogenase aus *B. subtilis*,^[6e] wobei die Dehydrogenasen unter der Kontrolle eines Rhamnose-Promotors stehen.^[8c] Die Plasmide pNO5c und pNO8c codieren für eine Alkoholdehydrogenase aus *L. kefir* bzw. eine Glucosedehydrogenase aus *T. acidophilum*. Die Herstellung aktiver Zellen erfolgt beispielsweise, indem zunächst eine Einzelkolonie von *E. coli* DSM14459 (pNO14c) oder *E. coli* DSM14459 (pNO5c, pNO8c) in 2 mL Luria-Bertani(LB)-Medium mit Antibiotika ($50 \mu\text{g L}^{-1}$ Ampicillin sowie zusätzlich $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Chloramphenicol im Falle des *R*-enantioselektiven Ganzzellkatalysators) 18 Stunden bei 37°C unter Schütteln (250 Upm) inkubiert wird. Diese Kultur wird 1:100 in frischem LB-Medium mit Rhamnose (2 g L^{-1}) als Induktor, Antibiotika ($50 \mu\text{g L}^{-1}$ Ampicillin sowie zusätzlich $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Chloramphenicol im Falle des *R*-enantioselektiven Ganzzellkatalysators) und 1 mM ZnCl_2 verdünnt und 18 Stunden bei 30°C unter Schütteln (250 Upm) inkubiert. Die Zellen werden durch Zentrifugieren (10000 g, 10 min, 4°C) geerntet, der Überstand wird verworfen und das Zellpellet – nach Aufbewahrung bei -20°C – in den Biotransformationsversuchen eingesetzt.

Allgemeine Vorschrift zur biokatalytischen Ketonreduktion: In einem Titrino-Reaktionsgefäß werden 20 mL eines wässrigen Phosphatpuffers (0.2 M; eingestellt auf pH 7.0) versetzt mit dem *R*- oder *S*-enantioselektiven Ganzzellkatalysator vom Typ *E. coli* DSM14459 [der (*S*)-RE-ADH oder (*R*)-LK-ADH sowie eine Glucosedehydrogenase enthält; Zellkonzentration ca. 50 g Biofeuchtmasse pro Liter (siehe Tabelle 1)], D-Glucose (typischerweise 1.5 Äquiv.; die Äquivalente sind bezogen auf die molare Menge an eingesetztem Keton) sowie 20 mmol (0.5 M) oder 40 mmol (1.0 M) des Ketons (siehe Tabelle 1); das Volumen wird mit Wasser auf 40 mL aufgefüllt. Die Reaktionsmischung wird für die Dauer der angegebenen Reaktionszeit bei Raumtemperatur gerührt, wobei der pH-Wert durch Zugabe von 5 M NaOH konstant bei ca. 6.5 gehalten wird. Nach der in Tabelle 1 angegebenen Reaktionszeit wird der Umsatz mittels HPLC oder NMR-Spektroskopie ermittelt. Die Aufarbeitung erfolgt durch Absenkung des pH-Wertes auf < 3 mit konzentrierter Salzsäure sowie Zugabe von 3.0 g des Filterhilfsstoffs Celite Hyflo Supercel zum Reaktionsgemisch und anschließende Filtration. Der Filterkuchen wird mit 3-mal 50 mL *tert*-Butylmethylether (MTBE) gewaschen und die wässrige Phase entsprechend mit den drei erhaltenen organischen MTBE-Faktionen extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden nach Trocknung über Magnesiumsulfat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und liefern bereits als Rohprodukt den optisch aktiven Alkohol in einer hohen, für die weitere Verwendung geeigneten technischen Produktreiheit von typischerweise mindestens 93 %. Die Produktreiheit kann im Bedarfsfall durch weitere Stan-

dard-Reinigungsverfahren, wie Destillation oder Chromatographie, erhöht werden.

Eingegangen am 25. September 2005,
veränderte Fassung am 2. März 2006
Online veröffentlicht am 21. Juli 2006

Stichwörter: Alkohole · Asymmetrische Katalyse · Cofaktoren · Enzymkatalyse · Reduktionen

- [1] Übersichtsartikel: a) K. Nakamura, T. Matsuda in: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Vol. 3, 2. Aufl. (Hrsg.: K. Drauz, H. Waldmann), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, S. 991–1047; b) W. Hummel, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **1997**, 58, 146–184; c) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 5. Aufl., Springer, Berlin, **2004**, Kap. 2.2.3, S. 192–197.
- [2] Für ausgewählte Beiträge zur Substrat-gekoppelten Cofaktorregeneration mit 2-Propanol bei der asymmetrischen enzymatischen Ketonreduktion siehe: a) W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1056–1059; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1014–1017; b) M. Wolberg, W. Hummel, C. Wandrey, M. Müller, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 4476–4478; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 4306–4308; c) M. Amidjojo, D. Weuster-Botz, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 899–901.
- [3] a) N. Kizaki, Y. Yasohara, J. Hasegawa, M. Wada, M. Kataoka, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 55, 590–595; b) M. Kataoka, K. Kita, M. Wada, Y. Yasohara, J. Hasegawa, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 62, 437–445; c) H. Pfrunder, M. Amidjojo, U. Kragl, D. Weuster-Botz, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 4629–4631; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4529–4531; d) A. Matsuyama, H. Yamamoto, Y. Kobayashi, *Org. Process Res. Dev.* **2002**, 6, 558–561.
- [4] R. Noyori, T. Okuhama, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 40–75; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 40–73.
- [5] Übersicht: A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [6] a) W. Hummel, M.-R. Kula (FZ Jülich GmbH), EP 456107, **1991**; b) A. Weckbecker, W. Hummel in *Microbial Enzymes and Biotransformations, Methods in Biotechnology*, Vol. 17 (Hrsg.: J. L. Barredo), Humana Press, Totowa, **2004**, S. 241–253; c) W. Hummel, K. Abokitse, H. Gröger (Degussa AG), EP 1499716, **2003**; d) K. Abokitse, W. Hummel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 62, 380–386; e) W. Hilt, G. Pfleiderer, P. Fortnagel, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1076, 298–304; f) J. R. Bright D. Byrom, M. J. Danson, D. W. Hough, P. Towner, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 211, 549–554.
- [7] R. L. Hanson, S. Goldberg, A. Goswami, T. P. Tully, R. N. Patel, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, 347, 1073–1080.
- [8] a) O. May, K. Liebeton, J. Eck (Degussa AG), WO 2003042412, **2003**; b) J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **1989**; c) T. Stumpp, B. Wilms, J. Altenbuchner, *BIOspektrum* **2000**, 6, 33–36.