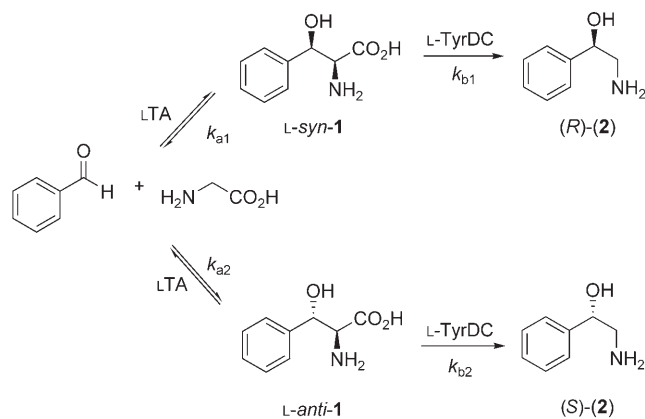




werden, um racemisches DL-*syn-1* zum 2-Amino-1-phenylethanol (*R*)-**2** mit einer maximalen Ausbeute von 50% umzusetzen, wobei D-*syn-1* zurückbleibt.<sup>[10]</sup> Bei Zugabe von DTA wird das nicht umgesetzte Diastereomer, D-*syn-1*, in einer parallelen kinetischen Racematspaltung zu Benzaldehyd und Glycin abgebaut, was die Rezyklierung von D-*syn-1* ermöglicht.<sup>[11,12]</sup>

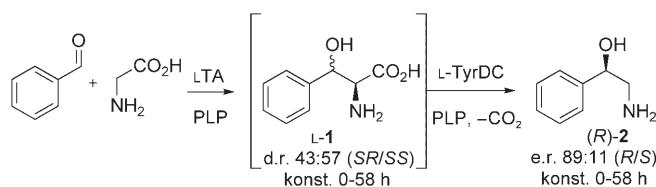
Außer mit dieser einfachen Racematspaltung von DL-*syn-1* kann die thermodynamische Limitierung auch durch die Kombination einer LTA-katalysierten Aldolreaktion mit einer In-situ-Decarboxylierung mit L-TyrDC überwunden werden. Damit wird das Aldolgleichgewicht auf die Seite der L-Aldolprodukte verschoben, und es resultieren höhere Umsätze. L-TyrDC (aus *Enterococcus faecalis* V583)<sup>[13]</sup> und LTA (aus *Pseudomonas putida*)<sup>[14]</sup> wurden kloniert und in *Escherichia coli* überexprimiert. Als Modellreaktion untersuchten wir die neuartige bienzymatische Synthese von **2** aus Benzaldehyd und Glycin unter Anwendung der reversiblen LTA-katalysierten Aldolreaktion (Zwischenprodukte L-*syn-1* und L-*anti-1*) und einer gekoppelten irreversiblen Decarboxylierung (Schema 2). Im Produkt dieser formalen Eintopf-



**Scheme 2.** Synthese von 2-Amino-1-phenylethanol (**2**) unter Verwendung von L-Threonin-Aldolase und L-Tyrosin-Decarboxylase.

Aminomethylierung von Benzaldehyd bleibt das hydroxy-substituierte Chiralitätszentrum erhalten, während das zweite Chiralitätszentrum „verloren“ geht, da die  $\alpha$ -Aminofunktion in eine terminale Gruppe überführt wird. Durch die hohe *syn/anti*-Selektivität der L-TyrDC (10:1, siehe Hintergrundinformationen) kann die niedrige  $C_\beta$ -Selektivität der Aldolase wettgemacht werden. Die hier beschriebene Umwandlung ist unseres Wissens die erste bienzymatische Racematspaltung von Diastereomeren. Ein ähnlicher Prozess mit einer organokatalytischen Methode wurde als dynamische kinetische asymmetrische Umwandlung (DYKAT) bezeichnet.<sup>[15,16]</sup> Für dynamische Prozesse ist es von größter Bedeutung, dass die Gleichgewichtseinstellung ( $k_{a1}$  und  $k_{a2}$ ) deutlich schneller abläuft als der irreversible Schritt ( $k_{b1}$  und  $k_{b2}$ ). Nur so können hohe Selektivitäten erhalten und die theoretische Ausbeute eines Stereoisomers von 100% erreicht werden.<sup>[17]</sup> In Gleichgewichtsstudien wurde nachgewiesen, dass die LTA-katalysierte *syn-anti*-Umwandlung von **1** schnell verläuft (siehe Hintergrundinformationen).

In einem ersten Versuch, die thermodynamische Limitierung mithilfe der DYKAT-Methode zu überwinden, untersuchten wir die Kompatibilität von LTA und L-TyrDC. Tatsächlich konnte die Gleichgewichtsreaktion von Benzaldehyd mit Glycin zu L-*syn-1*/L-*anti-1* durch die irreversible Decarboxylierung zur Produktseite verschoben werden. Nach 58 Stunden hatte sich der Benzaldehyd vollständig in die Zwischenprodukte L-*syn-1*/L-*anti-1* (8%) und das Endprodukt (*R*)-**2** (91%) umgewandelt (Schema 3). Damit konnten

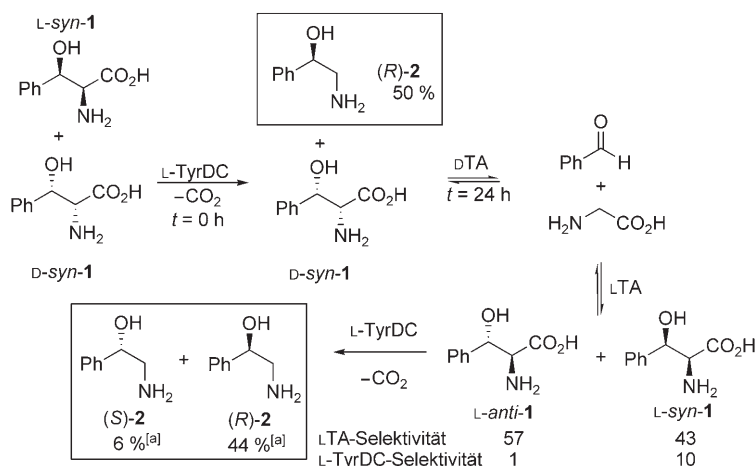


**Scheme 3.** Umwandlung von Benzaldehyd zu den Zwischenprodukten L-*syn-1*/L-*anti-1* und zum Endprodukt (*R*)-**2**. Reaktionsbedingungen: Benzaldehyd 100 mM, Glycin 1 M, LTA 38 U, L-TyrDC 0.4 U, PLP 50  $\mu$ M, pH 5.5, 25 °C; Ausbeute, Diastereomerenverhältnis (d.r.) und Enantiomerenverhältnis (e.r.) wurden mit HPLC bestimmt.

wir zeigen, dass die Kombination von LTA und L-TyrDC für die quantitative Umwandlung von Aldehyden in 1,2-Aminoalkohole anwendbar ist. Interessanterweise wird die niedrige  $C_\beta$ -Selektivität von LTA (*R/S* 60:40) im bienzymatischen Prozess etwas verändert (*R/S* 43:57). Dies kann durch die Tatsache erklärt werden, dass L-*syn-1* (2*S*,3*R*) schneller zu (*R*)-**2** umgesetzt wird als L-*anti-1* (2*S*,3*S*) zu (*S*)-**2** und dadurch das *anti/syn*-Verhältnis der Zwischenprodukte L-*syn-1*/L-*anti-1* leicht verschoben wird.

Mit der beschriebenen Vorgehensweise wurde die niedrige Selektivität an der  $\beta$ -Position durch die stereoselektive Decarboxylierung auf 89:11 (*R/S*) verbessert. Die Stereoisomerenverhältnisse von L-**1** (d.r.) und **2** (e.r.) waren während der Reaktion konstant, was belegt, dass tatsächlich ein wirkungsvoller dynamischer Prozess stattfindet.

Eine Racematspaltung von DL-*syn-1* durch die beschriebene Eintopf-Zweienzym-DYKAT ist wegen der hohen L-Selektivität von LTA und L-TyrDC nicht möglich. Nur L-*syn-1* wird in einer kinetischen asymmetrischen Umwandlung (KAT) umgesetzt, und das D-Enantiomer bleibt zurück. Hierdurch wird der Aminoalkohol (*R*)-**2** zwar mit exzellenten *ee*-Werten (> 99%) erhalten, die Ausbeute ist aber auf maximal 50% begrenzt. Um eine höhere Maximalausbeute bei gleichbleibend hohen *ee*-Werten zu erreichen, wurde ein neuartiges Eintopf-Dreienzym-Verfahren getestet (Schema 4). Eine anfängliche KAT (L-TyrDC) von L-*syn-1* liefert enantiomerenreines (*R*)-**2** (50%). Nach der Zugabe der Aldolasen LTA und DTA<sup>[9]</sup> nach 24 Stunden überführt nun eine Dreienzym-DYKAT (L-TyrDC, LTA/DTA) das nicht umgesetzte D-*syn-1* (50%) in Benzaldehyd und Glycin, danach in L-*syn-1*/L-*anti-1* und schließlich in (*R*)-**2**/*(S)*-**2**. Theoretisch sollte durch diese Racematspaltung von DL-*syn-1* mit verzögerter Zugabe von LTA und DTA unter Berücksichtigung der Resultate des Eintopf-Zweienzym-Protokolls (*R/S* 89:11) ein *ee*-Wert von 88% (*R*, Schema 3) des Aminoalkohols **2** erhalten werden. Das nachstehende Beispiel zeigt, dass bei



**Schema 4.** Theoretische Ausbeute der Synthese von (R)-2 bei Anwendung der KAT/DYKAT-Methode [88% ee: 94% (R)-2, 6% (S)-2]. [a] Angenommene  $C_\beta$ -Selektivität der gekoppelten LTA/L-TyrDC-Reaktion: 89:11 (R/S) (siehe Schema 3).

Zugabe aller drei Enzyme bei Reaktionsbeginn (pH 5.5) ein leicht höherer ee-Wert von **2** (82% R) verglichen mit dem DYKAT-Verfahren erreicht wird, bei jedoch geringerer Ausbeute von 44% (Tabelle 1, Nr. 1). Die niedrige Ausbeute könnte durch inhibierende Effekte von  $\text{MnCl}_2$  oder dTA auf L-TyrDC erklärt werden; Untersuchungen hierzu sind im Gange. Die verzögerte Zugabe von LTA/dTA (nach 24 h) lieferte enantiomerenreines **2** (Tabelle 1, Nr. 2 und 11, ee > 99% R) bei erhöhter Ausbeute (HPLC 67%; isoliertes Produkt 58%). Ähnliche Resultate wurden auch bei pH 6.0 und 6.5 erreicht (Tabelle 1, Nr. 3–6). Höhere pH-Werte (7.0 und 7.5, Nr. 7–10) führten zu beträchtlich geringeren Ausbeuten. Dies kann damit erklärt werden, dass die Aktivität von L-

TyrDC bei pH > 6.5 stark abnimmt (pH-Optimum 5.5). Der exzellente ee-Wert von **2** bei gleichzeitig hoher Ausbeute (pH 5.5–6.5) belegt, dass alle drei Enzyme effektiv zusammenwirken. Damit kann die kinetische Limitierung – die niedrige  $C_\beta$ -Selektivität in einer LTA-katalysierten Reaktion – überwunden und enantiomerenreines (R)-**2** mit Ausbeuten über 50% erhalten werden.

Mit den hier beschriebenen Methoden gelingt es, die thermodynamischen (DYKAT) und die kinetischen Limitierungen (KAT/DYKAT) der durch L-Threonin-Aldolase katalysierten Reaktionen zu überwinden. Die erste bienzymatische DYKAT beruht auf der Kombination einer Aldolase niedriger Diastereoselektivität mit einer hochspezifischen Decarboxylase. Damit konnten wir das „Aldol“-Gleichgewicht der Reaktion von Benzaldehyd mit Glycin zu quantitativen Umsätzen führen und gleichzeitig die niedrige  $C_\beta$ -Selektivität stark erhöhen. Mithilfe der KAT/DYKAT-Methode erhielten wir ausgehend von DL-syn-1 den enantiomerenreinen Aminoalkohol (R)-**2** in guter Ausbeute. In bereits ange-

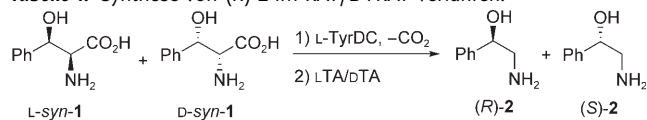
laufenen Tests untersuchen wir weitere Akzeptoraldehyde, um synthetisch wertvolle enantiomerenangereicherte 1,2-Aminoalkohole zu erhalten.

Eingegangen am 9. Oktober 2006

Online veröffentlicht am 24. Januar 2007

**Stichwörter:** Aldolreaktionen · Aminoalkohole · Biokatalyse · Lyasen · Threonin-Aldolase

**Tabelle 1:** Synthese von (R)-**2** im KAT/DYKAT-Verfahren.<sup>[a]</sup>



Nr.	pH	Ausb. <b>2</b> [%] (5 h)	ee (R) [%] (5 h)	Ausb. <b>2</b> [%] (80 h)	ee (R) [%] (80 h)
1 <sup>[b]</sup>	5.5	23	80	44	82
2 <sup>[c]</sup>	5.5	46	> 99	67	> 99
3 <sup>[b]</sup>	6.0	15	72	47	82
4 <sup>[c]</sup>	6.0	39	> 99	57	> 99
5 <sup>[b]</sup>	6.5	13	80	28	80
6 <sup>[c]</sup>	6.5	35	> 99	58	> 99
7 <sup>[b]</sup>	7.0	3	> 99	11	82
8 <sup>[c]</sup>	7.0	25	> 99	50	> 99
9 <sup>[b]</sup>	7.5	< 1	> 99	4	> 99
10 <sup>[c]</sup>	7.5	10	> 99	24	> 99
11 <sup>[c,d]</sup>	5.5	n.b. <sup>[f]</sup>	n.b. <sup>[f]</sup>	58 <sup>[e]</sup>	> 99

[a] Reaktionsbedingungen: 1 mL Reaktionsvolumen, DL-syn-1 100 mM, Glycin 900 mM, PLP 50  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MnCl}_2$  50  $\mu\text{M}$ , 25 °C, LTA 19 U, dTA 6 U, L-TyrDC 0.4 U; Ausbeuten und ee-Werte wurden durch HPLC bestimmt.

[b] Zugabe von LTA/dTA bei Reaktionsbeginn. [c] Zugabe von LTA/dTA nach 24 h Reaktionszeit. [d] 5 mL Reaktionsvolumen. [e] Ausbeute des isolierten Produkts nach 100 h Reaktionszeit. [f] n.b. = nicht bestimmt.

- [1] a) M. G. Silvestri, G. Desantis, M. Mitchell, C.-H. Wong, *Top. Stereochem.* **2003**, *23*, 267–342; b) W.-D. Fessner in *Modern Aldol Reactions* (Hrsg.: R. Mahrwald), VCH, Weinheim, **2004**, S. 201–272.
- [2] L. J. Whalen, C.-H. Wong, *Aldrichimica Acta* **2006**, *39*, 63–71.
- [3] M. Braun in *Modern Aldol Reactions* (Hrsg.: R. Mahrwald), VCH, Weinheim, **2004**, S. 1–62.
- [4] Übersichtsartikel über Threonin-Aldolasen: J. Q. Liu, T. Dairi, N. Itoh, M. Kataoka, S. Shimizu, H. Yamada, *J. Mol. Catal. B* **2000**, *10*, 107–115.
- [5] a) F. P. Seebeck, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10158–10159; b) F. P. Seebeck, A. Guainazzi, C. Amoreira, K. K. Baldrige, D. Hilvert, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6978–6980; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6824–6826.
- [6] a) B. T. Lotz, C. M. Gasparski, K. Peterson, M. J. Miller, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1107–1109; b) V. P. Vassilev, T. Uchiyama, T. Kajimoto, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4081–4084; c) T. Kimura, V. P. Vassilev, G.-J. Shen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11734–11742.
- [7] J. Steinreiber, K. Fesko, C. Reisinger, M. Schürmann, F. van Assema, M. Wolberg, D. Mink, H. Griengl, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 918–926.
- [8] M. Bechthold, S. Makart, M. Heinemann, S. Panke, *J. Biotechnol. Microbiol.* **2006**, *124*, 146–162.
- [9] J. Q. Liu, M. Odani, T. Yasuoka, T. Dairi, N. Itoh, M. Kataoka, S. Shimizu, H. Yamada, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *54*, 44–51.
- [10] T. Nikaido, N. Kawada, T. Hamatani, Y. Ueda (Daicel Chemical Industries), WO 9523869, **1995**; T. Nikaido, N. Kawada, T. Hamatani, Y. Ueda (Daicel Chemical Industries), US 5731175,

- 1998**; T. Nikaido, N. Kawada, T. Hamatani, Y. Ueda (Daicel Chemical Industries), US 5846792, **1998**; T. Nikaido, N. Kawada, T. Hamatani, Y. Ueda (Daicel Chemical Industries), US 5874613, **1999**.
- [11] S. Ito, T. Nikaido, A. Matsuyama (Daicel Chemical Industries), JP 46076, **2001**.
- [12] Übersichtsartikel über parallele kinetische Racematspaltungen:  
a) J. R. Dehli, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 365–370;  
b) E. Vedejs, M. Jure, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4040–4069; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3974–4001.
- [13] a) T. Boerresen, N. K. Klausen, L. M. Larsen, H. Soerensen, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *993*, 108–115; b) N. Connil, Y. Le Breton, X. Dousset, Y. Auffray, A. Rince, H. Prevost, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3537–3544.
- [14] J. Q. Liu, S. Ito, T. Dairi, N. Itoh, S. Shimizu, H. Yamada, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *49*, 702–708.
- [15] DYKAT: a) asymmetrische allylische Alkylierung: B. M. Trost, *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 1–14; b) chemoenzymatische Racematspaltung von 1,3-Diolen: M. Edin, J. Steinreiber, J.-E. Bäckvall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5761–5766.
- [16] Organokatalytische DYKAT: E. Reyes, A. Cordova, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6605–6609.
- [17] a) O. Pamies, J.-E. Baeckvall, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3247–3261; b) H. Pellissier, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 8291–8327.