

Herstellung von Feinchemikalien mit
rekombinanten Schweineleberesterasen

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung des Akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Greifswald

vorgelegt von

Philipp Süss

geboren am 15.03.1988

in Ribnitz-Damgarten

Greifswald, August 2018

Dekan: Prof. Dr. Werner Weitschies
1. Gutachter : Prof. Dr. Uwe. T. Bornscheuer
2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Liese

Tag der Promotion: 06.11.2018

Für meine Familie
- ein klitzekleines Werk -

Inhaltsverzeichnis

1. Zielsetzung	1
2. Einleitung	2
2.1. Biokatalyse in der chemischen Industrie.....	2
2.2. Entwicklung biokatalytischer Prozesse aus Sicht eines kleinen mittelständischen Unternehmens	4
2.3. Die Schweineleberesterase als Biokatalysator	5
2.3.1. Isoenzyme	5
2.3.2. Biochemische Eigenschaften	7
2.3.3. Einsatz in der organischen Synthese	9
3. Ergebnisse und Diskussion	13
3.1. Desymmetrisierung von Cyclohex-4-en- <i>cis</i> -1,2-dicarbonsäure- dimethylester (Artikel 1)	13
3.1.1. Wahl des optimalen PLE Isoenzym	14
3.1.2. Auswahl der Reaktionsbedingungen.....	16
3.1.3. Maßstabsvergrößerung	19
3.2. Ökonomische Prozessoptimierung (Artikel 2).....	24
3.2.1. Substitution des Startmaterials	24
3.2.2. Etablierung einer Eintopfreaktion	25
3.3. Desymmetrisierung von <i>cis</i> -1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten (Artikel 3).....	29
3.3.1. Wahl des optimalen PLE Isoenzym	29
3.3.2. Auswahl der Reaktionsbedingungen.....	31
3.3.3. Maßstabsvergrößerung	33
4. Zusammenfassung.....	35
5. Literaturverzeichnis.....	37

Abkürzungsverzeichnis

cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNS)
EC.....	Enzyme Commission numbers
ee	Enantiomeric excess (Enantiomerenüberschuss)
kDa.....	Kilo-Dalton
pH-Stat	Automatisches Titriersystem zur Konstanthaltung eines definierten pH-Werts
PLE.....	Pig liver esterase (Schweineleberesterase)
pNPA.....	<i>para</i> -Nitrophenylacetat
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
STY	Space-time-yield (Raum-Zeit-Ausbeute)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v.....	Volumenanteil (Volumen/Volumen)
ZIM	Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand des Bundeswirtschaftsministeriums

1. Zielsetzung

Im Rahmen eines gemeinsamen ZIM-Projekts der Universität Rostock und der Enzymicals AG war es das Ziel dieser Dissertation, den Einsatz rekombinanter Schweineleberesterasen (PLE, pig liver esterase, porcine liver esterase) als Biokatalysatoren in industriellen Anwendungen zu etablieren. Die rekombinante Schweineleberesterase bietet enorme Vorteile gegenüber dem Leberextrakt, da sehr große Mengen dieses Enzyms in reproduzierbarer Qualität hergestellt werden können und auf die Verwendung von tierischem Material verzichtet werden kann. Auf Grundlage von sechs rekombinant verfügbaren Isoenzymen der PLE sollten neuartige biokatalytische Prozesse zur Herstellung definierter Zielprodukte erstellt, optimiert und charakterisiert werden. Hierfür sollte das jeweils am besten geeignete Isoenzym ermittelt, der Prozess etabliert und sukzessive optimiert, sowie in einen produktionstechnisch relevanten Maßstab vergrößert werden. In diese Betrachtungen sollten unter anderem die industriell relevanten Parameter Katalysatorbeladung, Produktkonzentration sowie Raum-Zeit-Ausbeute (STY, space-time-yield) einfließen.

Als potentielle Prozesse wurden, in Absprache mit der Enzymicals AG, folgende, bereits mit der klassischen PLE bekannten Reaktionen (Abbildung 1, Abbildung 2) ausgewählt, um diese mit der rekombinanten PLE durchzuführen.

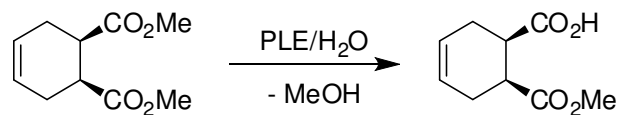


Abbildung 1. Prozess 1: Desymmetrisierung von Cyclohex-4-en-*cis*-1,2-dicarbon-säure-dimethylester.

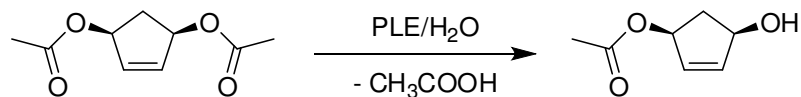


Abbildung 2. Prozess 2: Desymmetrisierung von *cis*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten.

2. Einleitung

2.1. Biokatalyse in der chemischen Industrie

Die Produktion von Feinchemikalien und chemischen Bausteinen für die pharmazeutische Industrie ist ein sich stetig entwickelnder und wachsender Bereich der chemischen Industrie.^[1] Synthesemoleküle mit mindestens einem chiralen Zentrum, besonders jene, die aus gut verfügbaren Ausgangsmaterialien synthetisiert werden, gewinnen zunehmend an Bedeutung.^[2] Während der letzten Jahrzehnte wurde eine steigende Anzahl chiraler Verbindungen durch verschiedene stereoselektive Synthesetechnologien produziert, wohingegen die Anzahl der Verbindungen welche aus chiralen Ausgangsmaterialien produziert worden sind, deutlich gesunken ist.^[3]

Diese Entwicklung verdeutlicht den stetigen Bedarf, die bereits etablierten Synthesewerkzeuge, wie z. B. die Biokatalyse, weiter auszubauen^[4], um mit effizienteren Routen aktuell gefragte Zielprodukte herstellen zu können.

Mit der Biokatalyse konnte bereits mehrfach demonstriert werden, dass im Vergleich zu chemisch katalysierten Alternativreaktionen, höhere Enantio- und Regioselektivitäten bei mildereren Reaktionsbedingungen erreicht und gleichzeitig unerwünschte Nebenreaktionen, wie Isomerisierungen und Racemisierungen vermieden werden können.^[5] Zusätzlich können wesentliche Eigenschaften des Biokatalysators selbst, wie Proteinstabilität, Substratspezifität und Enantioselektivität, durch molekularbiologische Techniken gezielt angepasst werden.^[3] Von dem in der Natur verfügbaren Pool an Biokatalysatoren haben diverse Enzyme bereits ihre Eignung zur industriellen Produktion von Synthesebausteinen unter Beweis gestellt.^[6]

Neben etablierten Technologien unter Nutzung von z. B. Oxidoreduktasen, Lyasen und Transferasen stellen die industriell am häufigsten genutzten Biokatalysatoren die Enzyme aus der Klasse der Hydrolasen (EC 3.x.x.x) dar.^[7] Diese oft sehr robusten Enzyme mit einem teilweise außerordentlich großen Substratspektrum und ohne Notwendigkeit der Zugabe von Kofaktoren, bieten damit attraktive Eigenschaften für die Anwendung in der industriellen Produktion.

Schon aus frühen Zeiten, vor allem für die Herstellung von Nahrungsmitteln, sind Enzyme aus höheren Organismen wie Pflanzen und Tieren bekannt, die aktuell auch als Biokatalysatoren von besonderem Interesse sind.^[8]

Bekannte Beispiele aus der Klasse der Hydrolasen sind z. B. Papain, Bromelain, Chymosin, Ficin, Pepsin, Carboxypeptidase B, Trypsin, Schweinepankreas-Lipase und die Schweineleberesterase.^[8]

Der überwiegende Anteil der Hydrolasen findet aktuell seine Anwendung in der Wasch- und Lebensmittelindustrie, wo diese für weitestgehend unspezifische, milde Hydrolysen genutzt werden.^[7] Ein weiteres wachsendes Feld ist der Bereich der spezifischen Syntheseenzyme, in dem die Hydrolasen (und auch andere Enzymklassen) als hochselektive Biokatalysatoren in komplexe Syntheseprozesse eingebettet werden. Speziell die Unterklassen der Esterasen (EC 3.1.x.x), Lipasen (EC 3.1.1.x) und Proteasen (EC 3.4.x.x) werden dabei sowohl für die Hydrolyse von Estern oder Amiden, als auch zu deren Synthese verwendet.^[9] Neben diesen Hauptreaktionen sind noch weitere promiskuitive Reaktionen einiger Hydrolasen bekannt, zu denen unter anderem selektive Michael-Additionen, *in-situ* Persäurebildung oder die Henry-Reaktion zählen.^[10]

Für die Synthese von enantiomerenreinen Produkten mit Hydrolasen ergeben sich zwei Möglichkeiten des Reaktionsmodus, abhängig vom Substrat: die Racematspaltung und die asymmetrische Synthese (Desymmetrisierung).^[9]

In der Racematspaltung wird eine 1:1 Mischung aus zwei Enantiomeren durch eine ausgewählte Reaktion getrennt (Abbildung 3), wobei hier eine maximale theoretische Produktausbeute von 50 % erreicht werden kann.

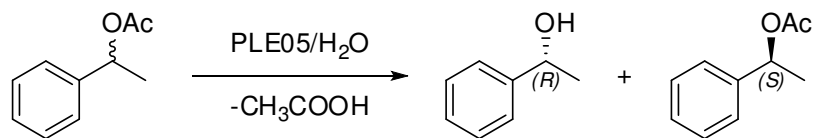


Abbildung 3. Beispiel einer biokatalytischen Racematspaltung.^[11]

Die Desymmetrisierung startet von einem symmetrischen Molekül und die Reaktion überführt das Startmolekül in ein asymmetrisches chirales Produkt (Abbildung 4). Hierbei ist eine theoretische Ausbeute von 100 % möglich, was für industriell relevante Prozesse besonders erstrebenswert ist.^[12]

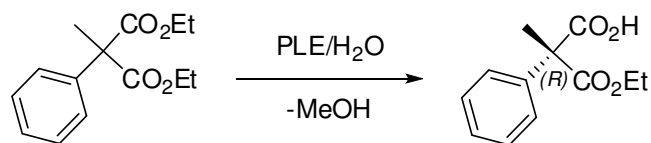


Abbildung 4. Beispiel einer Desymmetrisierung eines Malonsäurediesters.^[13]

2.2. Entwicklung biokatalytischer Prozesse aus Sicht eines kleinen mittelständischen Unternehmens

Das Ziel von Prozessen in der chemischen Industrie ist die wirtschaftlich sinnvolle Herstellung einer spezifischen Menge einer Zielverbindung. Zur Etablierung eines chemischen Prozesses durchläuft dessen Entwicklung mehrere aufeinander aufbauende Stufen. Diese Stufen können sich, je nach ausführendem Industriezweig (z. B. Feinchemie oder Polymerchemie) und der im finalen Prozess hergestellten Menge der Zielverbindung, im Detail unterscheiden.

Die Grundlage einer Prozessentwicklung ist zunächst eine Machbarkeitsstudie (Proof-of-concept), wobei diese durch akademische Arbeitsgruppen aber auch von Forschungs- und Entwicklungsabteilungen verschiedener Firmen entwickelt und durchgeführt werden kann. Diese erste Stufe soll die generelle Umsetzbarkeit einer theoretischen Reaktion darstellen und berücksichtigt noch keine ökonomischen Parameter. Für ein Proof-of-concept im Bereich der Biokatalyse bedeutet das in der Regel einen Reaktionsmaßstab von < 5 mL, geringe Substratkonzentration und hohe Enzymkonzentration. In dieser Stufe erfolgt bereits eine Vorauswahl des geeigneten Biokatalysators, wobei die Selektivität (Chemoselektivität und/oder Enantioselektivität) meist das entscheidende Auswahlkriterium darstellt.

Die anschließende Optimierung im Labormaßstab findet bereits in einem Reaktionsvolumen von 5 – 500 mL statt, wobei ebenfalls der Einfluss der Prozessparameter (z. B. Temperatur, pH und Co-Solventien) detailliert untersucht wird. Außerdem erfolgen eine Erhöhung der Substratkonzentration und eine Reduktion der Enzymkonzentration. Das Ziel ist hierbei eine möglichst hohe Produktivität (g Produkt/g Katalysator). Neben der Reaktion selbst, wird in dieser Stufe die Produktaufarbeitung im Detail betrachtet. Dieser Teil des Gesamtprozesses macht in der Regel mindestens 50 % der Verfahrenskosten des Prozesses aus und bedarf daher ebenso einer intensiven Optimierung. In Betracht kommen dabei verschiedene Methoden (z. B. Extraktion, Fällung, Destillation oder Kristallisation), sowie deren individuelle Effizienz und Handhabbarkeit. Besteht der Prozess aus mehreren Teilreaktionen können einzelne Aufarbeitungsschritte durch die Etablierung einer Eintopfreaktion vermieden werden, bei der mehrere Reaktionsschritte in einem Reaktor, ohne intermediäre Aufarbeitung durchgeführt werden.^[14] Die in dieser Stufe durchgeführte Optimierung erfolgt stets im Hinblick auf den finalen Prozessmaßstab, was die Auswahl der geeigneten Vorgehensweise (z. B. in der Aufarbeitung) und der signifikanten Parameter beeinflusst. Die isolierte Produktausbeute wird in dieser Stufe zur

Berechnung der Raum-Zeit-Ausbeute benötigt, welche einen elementaren Parameter in der Prozessentwicklung ausmacht und für die Kostenkalkulation hochrelevant ist.

In Stufe 3, der Maßstabsvergrößerung im Labor, wird der Prozess mit einer Produktkonzentration von $> 0,2 \text{ M}$ in ein Reaktorvolumen von $0,5 - 10 \text{ L}$ überführt. Dieser Entwicklungsabschnitt dient der Feinjustierung von Prozessparametern, der Überprüfung der Verfügbarkeit von Ausgangsmaterialien (Substrat, Lösungsmittel und Katalysator) und den ersten ökonomischen Berechnungen des Gesamtprozesses.

In weiteren Stufen durchläuft der Prozess das Stadium der Mini-Plant Anlage im 10 bis 100 L Maßstab, wobei hier z. B. erste Produktmuster hergestellt werden. Eine anschließende Stufe stellt beispielsweise die Pilotproduktion im Kubikmeter-Maßstab dar. Die Anzahl der Stufen kann in Abhängigkeit des Industriezweigs weiter fortgeführt werden, je nachdem in welchen Dimensionen das Endprodukt produziert werden soll (z. B. Pharma-Intermediate mit Produktionsmengen von mehreren 100 kg/Jahr oder Monomere für die Polymerproduktion mit $\gg 1000 \text{ t/Jahr}$).

2.3. Die Schweineleberesterase als Biokatalysator

2.3.1. Isoenzyme

Die Schweineleberesterase (PLE, pig liver esterase, porcine liver esterase) wird bis heute überwiegend als Lebergewebeextrakt hergestellt und in diversen Anwendungen industriell eingesetzt. Schon in einer der ersten biochemischen Untersuchungen durch Wolfgang Junge und Eberhard Heymann wurde im Jahr 1979 gezeigt, dass die Schweineleberesterase aus mehreren verschiedenen Isoenzymen (PLE-Isoenzyme) zusammengesetzt ist.^[15,16] Diese Isoenzyme weisen unterschiedliche biochemische Eigenschaften und Reaktionskinetiken zu bestimmten Substraten auf. Auch Lister K. P. Lam und J. Bryan Jones untersuchten in den 80er Jahren verschiedene Fraktionen einer aufgetrennten Mischung von Schweineleberesterase und wiesen die verschiedenen Eigenschaften dieser Fraktionen nach.^[17] Anfang der 90er Jahre wurden isolierte PLE-Isoenzyme auf ihre unterschiedlichen Eigenschaften in der asymmetrischen Synthese untersucht wobei sich zeigte, dass die Isoenzyme unterschiedliche Enantioselektivitäten für bestimmte Substrate aufwiesen.^[18]

Trotz des Wissens um die Heterogenität der Schweineleberesterase wurden keine Untersuchungen zur gezielten Herstellung der einzelnen Isoenzyme veröffentlicht. Erst im Jahr 2001 gelang es der Arbeitsgruppe Bornscheuer, die sogenannte γ -PLE bzw. das Isoenzym

1 über cDNA-Synthese aus der Schweineleber rekombinant in *Pichia pastoris* herzustellen.^[19] Darauffolgend konnten die Sequenzen weiterer fünf Isoenzyme erfolgreich ermittelt und alle sechs funktional im prokaryontischen Wirtssystem *Escherichia coli* exprimiert werden.^[20] Die Unterschiede in den Sequenzen der einzelnen sechs Isoenzyme betragen dabei maximal 24 Aminosäuren. Parallel zu den Entwicklungen der Arbeitsgruppe Bornscheuer wurde in der Arbeitsgruppe Schwab (Graz) in Kooperation mit der Firma DSM eine rekombinante PLE zur Synthese des Schlüsselintermediats von Aliskiren entwickelt (Abbildung 5). Diese sogenannte APLE (Alternative PLE) stellt die erste kommerzialisierte rekombinante Isoform der PLE dar.^[21]

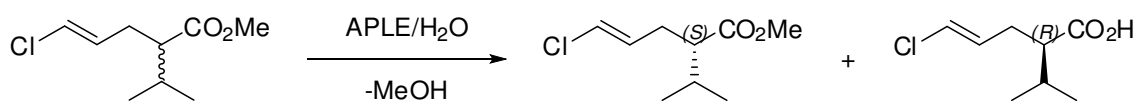


Abbildung 5. Racematspaltung von (4E)-5-Chloro-2-isopropyl-4-pentensäure-methylester mit der APLE.^[21]

Neben den bereits rekombinant verfügbaren Isoenzymen wurden weitere, durch Gensequenzanalysen des chinesischen Hausschweins, identifiziert.^[22] Somit liegt die Gesamtzahl der bekannten PLE-Isoenzyme aktuell bei zehn (Tabelle 1).

Tabelle 1 Übersicht der Variationen der PLE-Isoenzyme.											
Pos.	γ PLE	PLE2	PLE3	PLE4	PLE5	PLE6	APLE	PLE-1	PLE-B9	PLE-C4	PLE-G2
73	D	D	E	D	D	E	E	D	D	E	D
75	V	V	I	V	V	I	I	V	I	I	V
76	V	V	G	A	A	G	G	V	G	G	A
77	E	E	G	G	G	G	G	E	E	E	G
80	T	T	L	T	T	L	L	T	L	L	T
87	G	G	R	R	R	R	R	G	R	R	G
92	T	T	I	I	I	I	I	T	I	T	I
93	L	L	P	P	P	P	P	L	P	P	P
129	L	L	V	V	V	V	V	L	V	V	V
133	P	P	S	S	S	S	S	P	S	S	S
134	M	M	T	T	T	T	T	M	T	T	T
138	V	V	L	L	L	L	L	V	L	L	L
139	V	V	A	A	A	A	A	V	A	A	A
234	L	L	F	F	F	F	F	L	F	L	L
236	V	V	A	A	A	A	A	V	A	A	V
237	A	A	G	G	G	G	G	A	A	A	A
285	F	F	P	P	F	F	F	F	F	F	F
286	L	L	L	L	F	F	F	L	F	F	L
287	T	T	T	T	A	A	A	T	A	A	T
290	F	F	L	L	L	L	L	F	L	L	F
294	Q	Q	P	P	P	P	P	Q	P	P	Q
302	P	P	T	T	T	T	T	P	T	T	T
459	F	A	F	A	A	A	F	F	A	A	F
461	L	F	L	F	F	F	L	L	F	F	L
463	K	R	K	R	R	R	K	K	R	K	K

Benennung der Isoenzyme in dieser Arbeit: γ PLE = PLE-1 = PLE01; PLE2 = PLE02; PLE3 = PLE03; PLE4 = PLE04; PLE5 = PLE05; PLE6 = PLE06. APLE, PLE-B9, PLE-C4 und PLE-G2 besitzen keine alternativen Bezeichnungen.

Die durch die intensiven Untersuchungen der Arbeitsgruppe Bornscheuer sehr gut zugänglichen sechs PLE-Isoenzyme wurden durch die Enzymicals AG kommerzialisiert und folglich in dieser Arbeit als Katalysatoren verwendet.

2.3.2. Biochemische Eigenschaften

Die Schweineleberesterase ist eine Carboxylesterase mit der EC Nummer 3.1.1.1 und gehört damit zu einer großen Gruppe ausführlich untersuchter Enzyme.^[9] Sie besitzt die für diese Enzymklasse typische α/β -Hydrolase Faltung mit sechs α -Helices und acht β -Faltblättern (Abbildung 6). Mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa und zwei

Disulfidbrücken unterscheidet sie sich aber von den mikrobiellen Esterasen, welche durchschnittlich kleiner sind und überwiegend keine Disulfidbrücken enthalten.^[23]

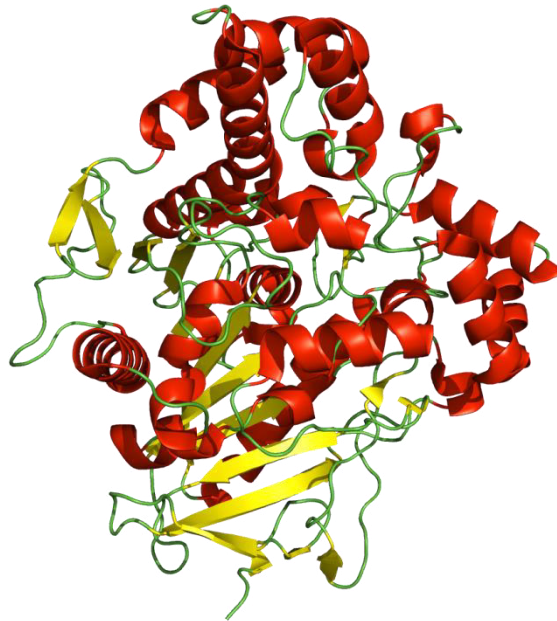


Abbildung 6. Kristallstruktur des PLE-Isoenzym 5: rot: α -Helix, gelb: β -Faltblatt, grün: Loop-Region.^[24]

Im nativen Zustand besteht die PLE aus Homotrimeren oder Heterotrimeren der einzelnen Isoenzyme. Dabei kommen bei den rekombinant hergestellten Isoenzymen ausschließlich Homotrimeren vor. In den PLE-Präparationen aus tierischem Gewebe liegt durch die Anwesenheit verschiedener Isoenzyme eine Mischung aus Heterotrimeren und Homotrimeren vor.^[15,16]

Das Serin (Ser204) der katalytischen Triade befindet sich im sogenannten GX SXG-Motiv der Carboxylesterasen. Bei der PLE wurden als benachbarte Reste des Serin Glutamat und Alanin identifiziert, wodurch das Motiv als GESAG abgebildet wird.^[25] Die zwei weiteren Reste der Triade sind Histidin (His449) und Glutamat (Glu336).

Der Reaktionsmechanismus verläuft über die Bindung eines Substratmoleküls im aktiven Zentrum (Abbildung 7). Das durch die Wechselwirkung des Histidins und Glutamats aus der Triade aktivierte Serin, führt einen nukleophilen Angriff auf die Carbonylfunktion des Substratmoleküls durch und es entsteht das tetraedrische Intermediat. Die entstandene negative Ladung des Intermediats wird über das Peptidrückgrat der Oxyanionen-Tasche stabilisiert. Bei der PLE ist dieses Motiv ein GGG(X), welches die Esterase dazu befähigt, auch tertiäre Alkoholester als Substrate umzusetzen.^[26] Die positive Ladung wird über das Histidin und Glutamat abgefangen. Durch die Abspaltung des ersten Produkts wird

der Acyl-Enzym-Komplex gebildet, welcher durch den Angriff eines Nucleophils zum zweiten tetraedrischen Intermediat umgewandelt wird. Das so gebildete neue Produkt kann das aktive Zentrum des Enzyms verlassen und das freie Enzym kann einen weiteren Zyklus durchführen.

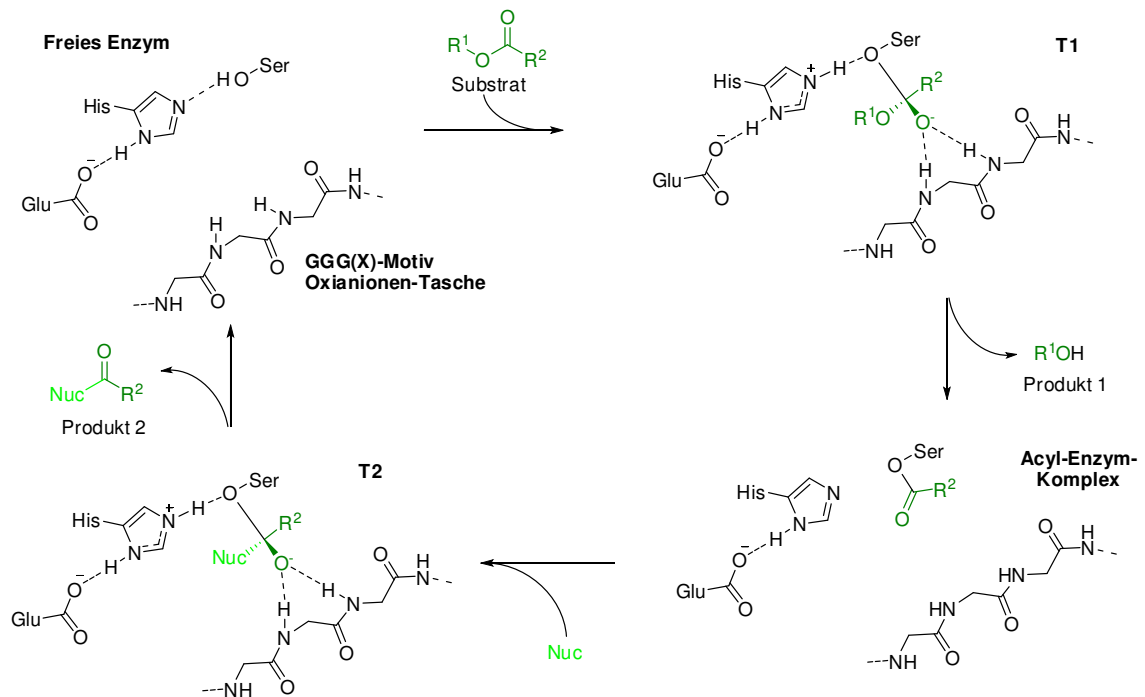


Abbildung 7. Reaktionsmechanismus der Schweineleberesterase.^[9]

2.3.3. Einsatz in der organischen Synthese

Seit über 100 Jahren wird die Schweineleberesterase bereits als Katalysator in der organischen Synthese eingesetzt. Die erste Anwendung der PLE wurde 1905 von Henry D. Dakin beschrieben, wobei die PLE noch als Lipase bezeichnet wurde. Schon damals wurde an der Racematspaltung von Mandelsäurederivaten erkannt (Abbildung 8), dass die PLE zwischen verschiedenen Enantiomeren unterscheiden kann und optisch inaktive Ausgangsstoffe in optisch aktive Produkte überführt.^[27]

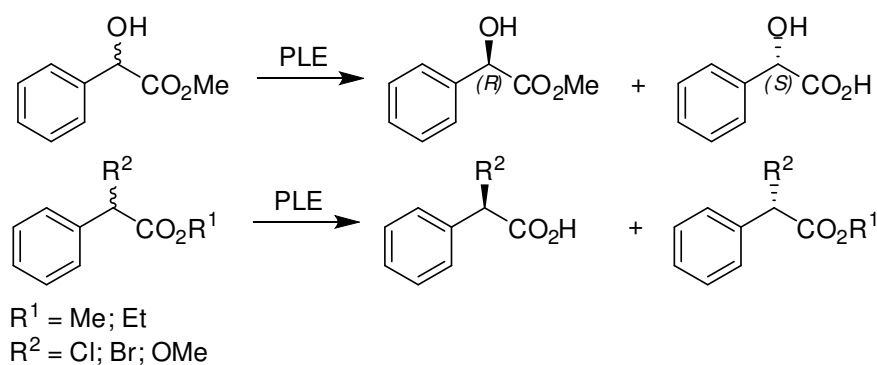


Abbildung 8. Racematspaltung von Mandelsäurederivaten mit der Schweineleberesterase.^[27]

In der Zeit der 1980er bis 1990er wurde das Potential der PLE als Syntheseezym in der organischen Synthese durch eine Vielzahl wissenschaftlicher Publikationen dargelegt.^[28]

Auch danach blieb sie in vielen Publikationen ein Referenzenzym, um neue Hydrolasen mit der Leistungsfähigkeit der PLE zu vergleichen. Bis heute sind mehr als 400 Substrate für die Schweineleberesterase beschrieben, was die breite Vielfalt der Anwendungsmöglichkeiten aufzeigt.^[29] Die leichte Zugänglichkeit dieser eukaryontischen Esterase aus dem tierischen Gewebe macht sie bis heute attraktiv für diverse Anwendungen.

Die PLE ist eines der ersten Enzyme, welches sich in einer beachtlichen Anzahl von Totalsynthesen etabliert hat und dort wie ein üblicher Katalysator eingesetzt wurde (Tabelle 2).

Tabelle 2 Produkte in denen die PLE in der Synthese eingesetzt wurde.			
Jahr	Autor	Produkt	Literatur
1990	Born et al.	Rifamycin S	[30]
1990	Kobayashi et al.	Synthon Vitamin D3	[31]
1992	Canet et al.	Cuparenone	[32]
1995	Borzilleri et al.	Papuamin	[33]
1995	Baldwin et al.	Anticapsin	[34]
1998	Colombo et al.	(+)-Cassiold und (-)-Cassioside	[35]
2000	Michael et al.	Pumiliotoxin C	[36]
2000	Yu et al.	Paroxetine	[37]
2000	Müller et al.	Atrochryson, Toroachryson, 3,4-Dihydroanthracen-1(2H)-on	[38]
2004	Toyota et al.	7-β-Hydroxykaurenoat	[39]
2004	Vong et al.	Borrelinidin	[40]
2007	O'Malley et al.	Sceptin	[41]
2008	Inai et al.	Myriocin	[42]
2014	Namiki et al.	ent-Kauranoide	[43]
2014	Back et al.	BIRT-377	[44]

2015	Lehr et al.	Tularein C	[45]
2015	Fuchs et al.	Brefeldin A	[46,47]

Besondere Aufmerksamkeit ist den Anwendungen zuzubringen, welche im präparativen Labor-Maßstab (> 5 g Produkt) durchgeführt und publiziert wurden (Tabelle 3), da diese die praktikablen Anwendungen der PLE verdeutlichen. Außerdem können mithilfe dieser Protokolle bereits prozesstechnische und ökonomische Betrachtungen durchgeführt werden.

Tabelle 3 Einsatz der PLE in Reaktionen, bei denen mehr als 5 g Produkt erzeugt wurden.				
Jahr	Autor	Produktmenge	Produkt	Literatur
1984	Laumen et al.	8,6 g	(-)-(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-Hydroxy-2-cyclopentenylacetate (86 % ee)	[48]
1985	Laumen et al.	61,8 g	(-)-(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-Hydroxy-2-cyclopentenylacetate	[49]
1989	Kocienski et al.	40-70g	3-cyclohexene-1-carboxylic acid	[50]
1990	Kobayashi et al.	492,6 g	(1 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-6-Methoxycarbonyl-3-cyclohexene-1-carboxylic acid	[51]
1992	Canet et al.	13,7 g	(<i>R</i>)-2-Methoxycarbonyl-2-(4-methylphenyl)-propionic acid (> 96 % ee)	[32]
2005	de Maria et al.	11,2 g	(<i>R</i>)-2-Methyl-2-Phenylmalonsäure monomethylester (96 % ee)	[52]
2008	Zutter et al.	31,2 g	Tamiflu intermediat	[53]
2013	Banerjee et al.	6 g	(<i>R</i>)-2-(<i>N</i> -Methylphthalimido)-3-ethoxy-2-methyl-3-oxopropionic acid (52 % ee)	[54]
2015	Lehr et al.	32,1 g	(<i>R</i>)-5-Methoxy-3-methyl-5-oxopentanoic acid (93 % ee)	[47]

Diese Übersicht verdeutlicht die breite Nutzung der PLE als Biokatalysator in der organischen Synthese wobei sie sowohl in der Racematspaltung, als auch in Desymmetrisierungsreaktionen verwendet wurde. Neben den klassischen Synthesestrategien wurde die PLE bereits in einer Eintopfreaktion eingesetzt, in welcher eine chemische Katalyse mit der Biokatalyse kombiniert wurde.^[55]

Die Schweineleberesterase ist als Carboxylesterase klassifiziert und katalysiert auch die für diese Enzymklasse typischen Reaktionen. Zusätzlich verfügt sie über ein erweitertes Reaktionsspektrum, da sie ebenfalls Amide^[19], Ester tertiärer Alkohole^[56] und

Thioester^[57] spalten kann. Auch die promiskuitive Aktivität zu einer Micheal-Addition wurde bereits beschrieben.^[58]

Diese Vielzahl an bereits dargelegten Einsatzmöglichkeiten machen die PLE auch heute noch zu einem gefragten Biokatalysator für die akademische und industrielle Forschung.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Desymmetrisierung von Cyclohex-4-en-*cis*-1,2-dicarbonsäure-dimethylester (Artikel 1)

Die enantioselektive Desymmetrisierung von Cyclohex-4-en-*cis*-1,2-dicarbonsäure-dimethylester **2** erlaubt prinzipiell die Synthese des (1*S*,2*R*)-Monoester **3a** sowie des (1*R*,2*S*)-Monoester **3b** als zwei unterschiedliche Enantiomere. Die Synthese von Monoester **3a** über Schweineleberesterase-katalysierte Reaktionen wurde bereits in der Literatur beschrieben.^[59,51] Die durch ein aus Schweineleber extrahiertes Gemisch von PLE-Isoenzymen katalysierte Reaktion ist allerdings nicht vollständig enantioselektiv und ein unzureichender Enantiomerenüberschuss von 80 – 97 % ee wurde erreicht. Die relativ niedrige Enantioselektivität begründet sich in dem Vorhandensein mehrerer paralleler hydrolytischer Reaktionen, wobei jede unabhängig von verschiedenen Isoenzymen der PLE katalysiert wurde. Außerdem weisen verschiedene Leberextrakte eine variierende Zusammensetzung der Isoenzyme auf, wodurch die Schwankungen in den ee-Werten zustande kommen.^[21] Die Produkte von hoch enantioselektiven Isoenzymen werden dabei mit denen, weniger selektiver Isoformen vermischt. Daher erlaubt die Verwendung eines einzelnen, rekombinant hergestellten PLE Isoenzym die enantioselektive Synthese von Monoester **3a** (> 99,5 % ee). Das andere Enantiomer, Monoester **3b**, kann mit Hilfe der Lipase B aus *Candida antarctica* als immobilisierte Form Novozym 435 mit exzellenter Enantioselektivität (> 99,9 % ee) und Ausbeuten von bis zu 99,8 % erzeugt werden.^[60] Abbildung 9 stellt zwei biokatalytische Möglichkeiten der enantioselektiven Desymmetrisierung von Cyclohex-4-en-*cis*-1,2-dicarbonsäuredimethylester dar.

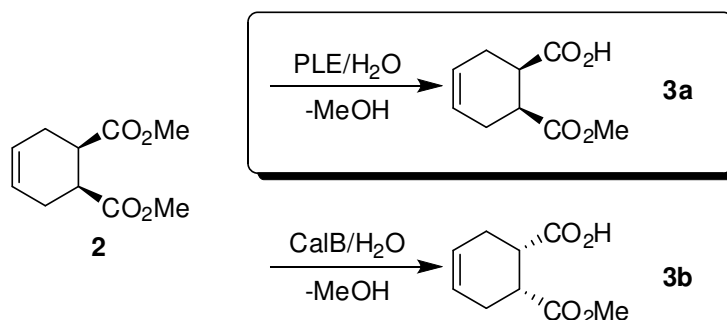


Abbildung 9. Enzymatische Desymmetrisierung von Cyclohex-4-en-*cis*-1,2-dicarbonsäuredimethylester.

3.1.1. Wahl des optimalen PLE Isoenzym

Die sechs, für die Enzymicals AG verfügbaren, PLE Isoenzyme wurden für die Produktion von (1*S*,2*R*)-Monoester **3a** durch Desymmetrisierung des Diesters **2** untersucht. Wie erwartet wurden deutliche Unterschiede bei der Aktivität und Selektivität zwischen den verschiedenen Isoenzymen experimentell festgestellt (Abbildung 10).

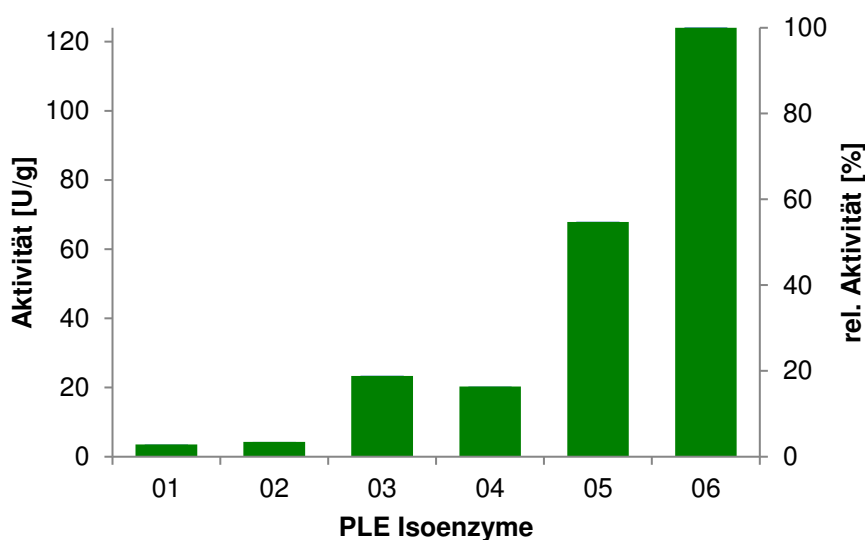


Abbildung 10. Vergleich der spezifischen Aktivitäten in der Hydrolyse von Cyclohex-4-en-*cis*-1,2-dicarbonsäuredimethylester **2**. *Bedingungen:* 25–50 mg PLE Isoenzym (Lyophilisat); 0.2 mmol **2**; 40 °C; 5 mL 5 mM Phosphatpuffer; pH 8,0; Titration mit 50 mM NaOH-Lösung.

PLE06 zeigte in pH-Stat Experimenten (5 mL Reaktionsvolumen) mit 124 U/g die höchste enzymatische Aktivität in der Desymmetrisierung von Cyclohex-4-en-*cis*-1,2-dicarbonsäuredimethylester **2**, welche als 100 % der relativen Aktivität gesetzt wurde. Eine Aktivität von rund 55 % wurde bei der PLE05 nachgewiesen, was im akzeptablen Bereich für die avisierte Umsetzung des Diesters lag. Die Aktivitäten der PLE03 und PLE04 waren mit 19 % bzw. 16 % signifikant niedriger, weshalb die Verwendung dieser Isoenzyme nicht weiter verfolgt wurde. Die verbleibenden Isoenzyme PLE01 und PLE02 zeigten eine kaum detektierbare Aktivität gegen Diester **2** (< 5 %) und wurden aus diesem Grund ebenfalls nicht tiefergehend untersucht.

Die Enantioselektivität der verfügbaren Isoenzyme und das damit einhergehende synthetische Potential wurden zusätzlich mit Biokatalysen im kleinen Maßstab (5 mL) untersucht, wobei hier ein gepuffertes System mit 10 mM Substratkonzentration genutzt wurde.

In Analogie zu den zuvor ermittelten Aktivitäten, zeigte die PLE06 die höchste Reaktivität bei den Umsetzungen im kleinen Maßstab (Abbildung 11). Nach 60 Minuten konnte ein Vollumsatz zusammen mit einem exzellenten Enantiomerenüberschuss von $> 99,5\%$ ee verzeichnet werden. Eine etwas geringere Umsatzrate zeigte die PLE05, was mit den vorigen Ergebnissen übereinstimmt. Außerdem wurde auch hier ein Vollumsatz nach 120 Minuten erreicht und ein Enantiomerenüberschuss von $> 99,5\%$ ee ermittelt. Interessanterweise erzeugte in diesem Experiment eine, bezogen auf die eingesetzte Aktivität (pNPA-Units), vergleichbare Menge „klassisch hergestellter“ PLE (aus dem tierischen Gewebe isoliert) eine signifikant reduzierte Umsatzrate im Vergleich zur PLE05 und PLE06. Nach 60 Minuten lag nur ein Umsatz von 15% vor, welcher sich nach insgesamt 120 Minuten auf lediglich 30% erhöhte.

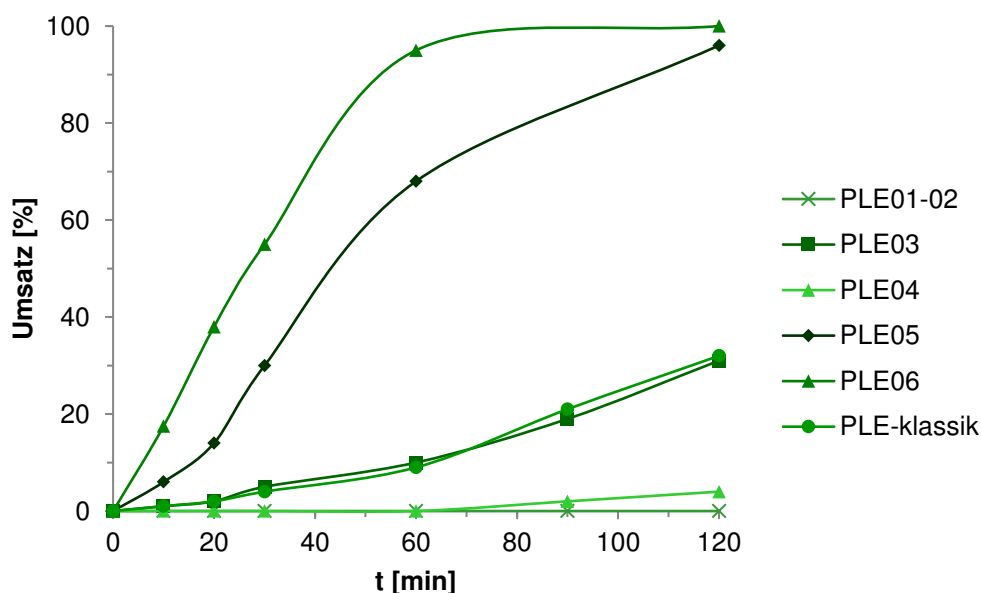


Abbildung 11. Desymmetrisierung von **2** zu **3a** in Abhängigkeit vom PLE-Isoenzym. *Bedingungen: 4 U/mL rekombinante PLE (bezogen auf den pNPA-Aktivitäts Assay); 10 mM 2; 23 °C; 100 mM TRIS-Puffer; pH 7,5. PLE-klassik: kommerzielles Enzym aus tierischem Gewebe.*

In Bezug auf die Enantioselektivität wurde festgestellt, dass aus Schweineleber hergestellte PLE (PLE-klassik) in dieser Reaktion mit 96% ee einen deutlich niedrigeren Enantiomerenüberschuss des Produkts erzielte als die rekombinanten Isoenzyme PLE05 und PLE06 mit jeweils $> 99,5\%$ ee (Tabelle 4).

Tabelle 4 Übersicht der erreichten Enantiomerenüberschüsse des Produkts 3a.							
PLE-Form	01	02	03	04	05	06	klassik
3a [% ee]	> 99,5	> 99,5	3	> 99,5	> 99,5	> 99,5	96

Diese bessere Selektivität illustriert den synthetischen Vorteil von rekombinanten PLEs im Vergleich zur PLE aus dem tierischen Gewebe. Weiterhin zeigten die PLE01 – 04 keinen synthetischen Nutzen für die geplante Umsetzung.

Bei der Anwendung von PLE03 konnte ein nahezu racemisches Produkt (3 % ee) bei 30 % Umsatz nach 120 min nachgewiesen werden. PLE01, PLE02 und PLE04 zeigten hier keinen signifikanten Umsatz. Zusätzliche Experimente mit wassermischbaren Lösungsmitteln, welche dafür bekannt sind die Selektivität der PLE zu beeinflussen^[61], führten zu keiner Verbesserung dieser biokatalytischen Reaktion.

Die rekombinante PLE zeigte im Rahmen dieser Anwendung beeindruckende Vorzüge im Vergleich zur klassischen Schweineleberesterase-Präparation. Sehr gute Reaktivität und exzellente Enantioselektivität wurden mit der PLE06 nachgewiesen, welche weiterführend für die geplante Maßstabsvergrößerung von **3a** (Monoester) ausgewählt wurde. Die geringere Reaktivität der klassischen PLE kann, wie zuvor bereits erwähnt, mit der Anwesenheit der verschiedenen Isoenzyme erklärt werden. Bei der klassischen Schweineleberesterase-Präparation beeinträchtigen somit vermutlich die Isoenzyme PLE01, PLE02 und PLE04 die hydrolytische Leistungsfähigkeit. Dagegen führt die Anwesenheit der PLE03, welche ein nahezu racemisches Produkt liefert, zu einem Verlust in der optischen Reinheit des Produkts. Deshalb kann mit der klassischen PLE nur eine geringere Reaktivität und erniedrigter Enantiomerenüberschuss für den Monoester **3a** erhalten werden.

3.1.2. Auswahl der Reaktionsbedingungen

Die relevantesten biochemischen Eigenschaften der rekombinanten PLE-Isoenzyme wurden bereits in der Literatur beschrieben.^[11] Allerdings waren zum Zeitpunkt dieser Forschungsarbeit keine Prozessdaten für die zu untersuchende Desymmetrisierung von Diester **2** zu Monoester **3a** verfügbar.

Um effiziente Prozessbedingungen für die PLE06 katalysierte Produktion von Monoester **3a** zu definieren, wurden daher zusätzliche Experimente durchgeführt. Für die

angestrebte Maßstabsvergrößerung waren hierbei insbesondere die Reaktionstemperatur und der pH-Wert der wässrigen Phase von Interesse. Der Einfluss der Reaktionstemperatur auf den Umsatz der Reaktion ist in Abbildung 12 exemplarisch für die PLE06 dargestellt.

Bei 10 °C Reaktionstemperatur wurde eine unzureichende Reaktivität mit einem nicht zufriedenstellenden Umsatz von < 10 % nach 30 Minuten festgestellt. Eine Temperaturerhöhung auf 25 °C verbesserte die Enzymaktivität, sodass sich ein Umsatz von 47 % ergab. Eine weitere Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 40 °C erzielte einen vollständigen Umsatz des eingesetzten Substrats (10 mM) nach 30 Minuten, wobei die vollständig enantioselektive Produktbildung erhalten blieb. Die Enzymreaktivität konnte durch eine weitere Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 60 °C nochmals deutlich verbessert werden. Da eine Verlängerung der Reaktionszeit in der Maßstabvergrößerung erwartet wurde und Daten über eine Langzeitstabilität der PLE-Isoenzyme bei > 50 °C nicht verfügbar waren, wurde eine Temperatur von 40 °C als robuste Prozesstemperatur ausgewählt. Bemerkenswerterweise wurden exzellente Enantiomerenüberschüsse (> 99,5 % ee) in allen untersuchten Reaktionen beobachtet, was eine robuste Stereoselektivität des Enzyms belegt.

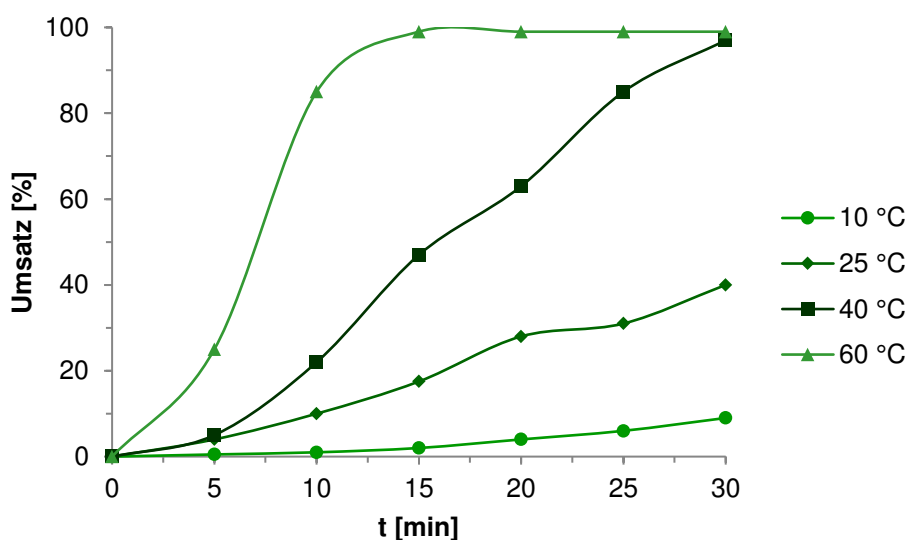


Abbildung 12. Einfluss der Reaktionstemperatur auf die PLE06 katalysierte Umsetzung von **2**. Bedingungen: 4 U/mL rekombinante PLE (bezogen auf den pNPA-Aktivitäts Assay); 10 mM **2**; 50 mM Phosphat-Puffer; pH 7,5.

Neben der Temperatur ist der pH-Wert der Reaktionsmischung ein relevanter Prozessparameter und daher wichtig in Hinsicht auf die Produktivität und den erhaltenen

Enantiomerenüberschuss des Produkts. Eine Auswahl repräsentativer Experimente bei verschiedenen pH-Werten ist in Abbildung 13 dargestellt.

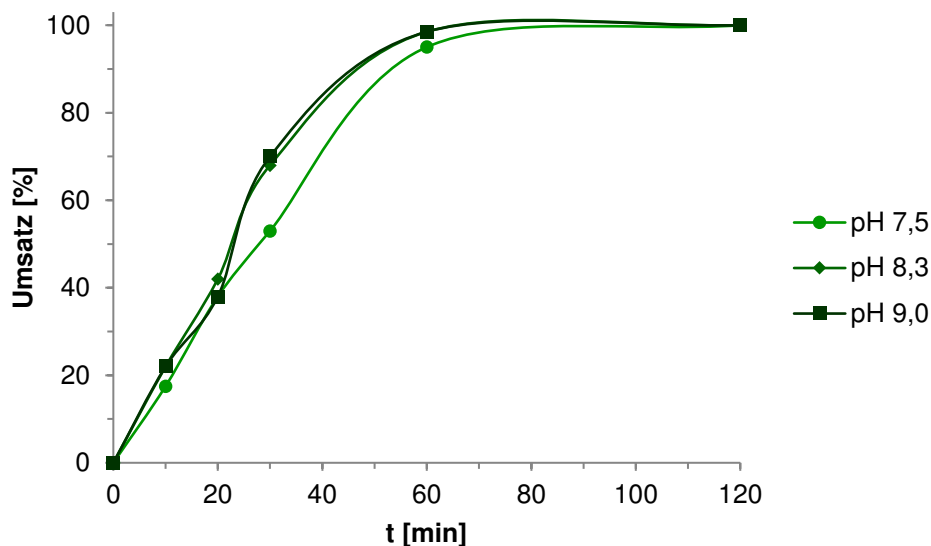


Abbildung 13. Einfluss des pH-Werts auf die PLE06 katalysierte Umsetzung von **2**.
Bedingungen: 4 U/mL rekombinante PLE (bezogen auf den pNPA-Aktivitäts Assay);
10 mM **2**; 23 °C; 50 mM Phosphat-Puffer.

Die Variation des pH-Werts zwischen 7,5 und 9,0 führte zu keinem signifikanten Unterschied im Einfluss auf die Produktivität des Enzyms. Ein Vollumsatz mit exzellentem Enantiomerenüberschuss (> 99,5 % ee) wurde bei pH 8,3 sowie pH 9,0 nach 60 Minuten erzielt, wogegen eine leicht längere Reaktionszeit bei pH 7,5 für dieses Ergebnis benötigt wurde. Vergleichbare, in der Literatur bekannte, Resultate mit einem breiten pH-Optimum von 7,5 bis 9,5 wurden mit rekombinanter Schweineleberesterase für die Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat berichtet.^[19] Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass eine pH-Wert Kontrolle bei pH 8,0 bis pH 9,0 ausreichend für die Synthese des Monoesters im großen Maßstab ist. Experimente ohne Enzym wurden als Kontrolle ebenfalls durchgeführt, um eine eventuell stattfindende Autohydrolyse des Diesters unter den gegebenen Bedingungen messen zu können. Es zeigte sich, dass der Ester von pH 7,5 bis pH 9,0 keine Autohydrolyse innerhalb der untersuchten Reaktionszeiten der PLE aufwies.

3.1.3. Maßstabsvergrößerung

Die im vorigen Kapitel dargestellten Experimente wurden mit einer Substratkonzentration von 10 mM durchgeführt. Diese ist für eine industrielle Anwendung zu gering und musste im Zuge der Prozessoptimierung und der Maßstabsvergrößerung erhöht werden. Daher wurden die nachfolgend beschriebenen Experimente mit einer Substratkonzentration von 100 mM durchgeführt, um das Potential der PLE06 diesbezüglich zu untersuchen.

Damit ausreichend Substrat zur Verfügung steht, welches für die vorigen Experimente aus kommerziellen Quellen bezogen wurde, erfolgte zunächst die Etablierung einer Substratsynthese. Hierfür wurde eine klassische Säure-katalysierte Veresterung der Disäure **1a** zum Diester **2** ausgewählt (Abbildung 14).

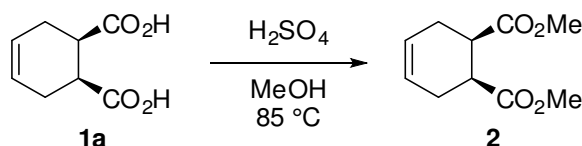


Abbildung 14. Synthese des Ausgangsmaterials für die biokatalytische Reaktion.

Die Reaktion wurde mit 5 M Edukttkonzentration in Methanol mit 5 % (v/v) Schwefelsäure durchgeführt. Mithilfe dieser Bedingungen konnten isolierte Ausbeuten bis 85 % erreicht werden. Die durchgeführte Maßstabsvergrößerung lieferte 495 g des Diesters, wodurch genügend Ausgangsmaterial für die experimentelle Optimierung der Biokatalyse zur Verfügung stand.

Da der entstehende Monoester aus der Biokatalyse ebenfalls eine Säure darstellt und durch die erhöhten Konzentrationen die Pufferkapazität der Reaktionslösung überstiegen wird, wurde mit einer Autobürette eine definierte Natronlauge-Lösung zur pH-Stabilisierung eingesetzt.

Die ersten Maßstabsvergrößerungen zu 20 mL bzw. 40 mL Reaktionsvolumen (bei 100 mM) lieferten innerhalb von vier Stunden Reaktionszeit zufriedenstellende isolierte Ausbeuten des Monoesters **3a** von 83 % mit einem Enantiomerenüberschuss von > 99,5 % ee. In Abbildung 15 ist beispielhaft eine Verlaufskurve der Reaktion im Maßstab von 40 mL dargestellt.

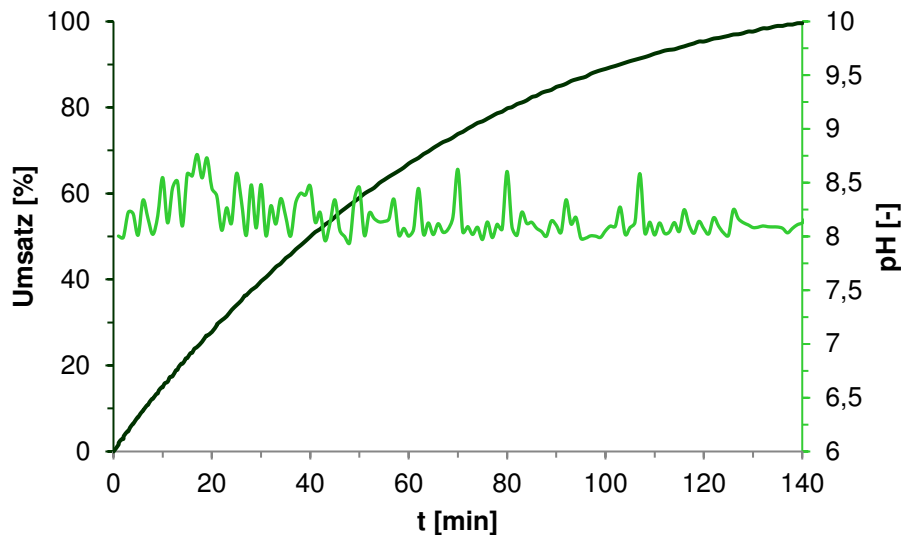


Abbildung 15. Umsatzkurve eines Titrationsexperiments und gemessener pH-Wert. *Bedingungen: Gesamtvolumen 0,04 L; 80 mM 2; 40 °C; pH Kontrolle mit 0,5 M NaOH-Lösung; pH-Messung nahe der Bürette; der Umsatz wurde auf Grundlage der verbrauchten NaOH-Lösung errechnet.*

Die in dieser Weise optimierten Protokolle wurden daraufhin in einen Maßstab von 0,63 L Reaktionsvolumen überführt. Leider konnte auch nach einer verlängerten Reaktionszeit auf acht Stunden kein Vollumsatz erreicht werden. Diese Beobachtung wurde auf die ineffiziente Durchmischung der Reaktionslösung zurückgeführt. Im Zuge der Maßstabsvergrößerung erfolgte ein Wechsel von Magnetrührer und Rundkolben (20 mL) auf einen Doppelwandreaktor mit KPG-Rührer. Der Einsatz der Autobürette im pH-Stat Modus wurde beibehalten und auf den vergrößerten Maßstab angepasst. Genaue Messungen des pH-Werts zeigten, dass im Reaktor im Vergleich zum Rundkolben wesentlich häufiger und höhere pH-Sprünge (pH-Hotspots) durch die Zugabe der Natronlauge über die Bürette auftraten (Abbildung 15). Dadurch wurde die PLE vermutlich partiell inaktiviert, wodurch die Gesamtaktivität über die Zeit signifikant abnahm, sodass innerhalb von acht Stunden kein Vollumsatz erreicht werden konnte.

Um das Problem der nicht optimalen Durchmischung zu umgehen, kann zum Beispiel ein effizienteres Rührsystem genutzt werden. Ein weiterer und in dieser Arbeit untersuchter Weg, um pH-Hotspots zu vermeiden, ist eine interne pH-Regulation. Hierfür eignen sich verschiedene anorganische Salze, wie Karbonate. Diese können die produzierte Säure neutralisieren und als Nebenprodukt entsteht Kohlenstoffdioxid. Für den erarbeiteten Prozess wurden Kalziumkarbonat, Natriumkarbonat und Natriumhydrogenkarbonat als ökonomisch sinnvolle „Säurefänger“ untersucht. Kalziumkarbonat entfiel aufgrund der

schlechten Löslichkeit in Wasser. Natriumkarbonat lieferte zwar eine sehr gute Löslichkeit, jedoch ist der erreichte pH-Wert einer gesättigten Lösung von 12,0 zu hoch für eine Anwendung mit der PLE in diesem Prozess. Natriumhydrogenkarbonat weist ebenso wie Natriumkarbonat eine sehr gute Löslichkeit in Wasser auf. Darüber hinaus erzeugt eine Lösung dieses Salzes einen stabilen pH-Wert von 8,0. Diese Bedingungen erwiesen sich als ideale Voraussetzungen für die untersuchte Umsetzung mit der PLE06.

Somit wurde anstatt des Phosphat-gepufferten Systems mit externer pH-Kontrolle eine gesättigte Natriumhydrogenkarbonat-Lösung als „Säurefänger“ eingesetzt. Dieses neue Reaktionssystem wurde im kleinen Maßstab (40 mL, 80 mM **2**) getestet. Da kein zusätzliches Volumen in die Reaktion eingetragen wird und zusätzlich die Aufarbeitung deutlich vereinfacht wurde, erwies sich das neue System als äußerst effizient im Vergleich zu einem Reaktionsansatz mit Puffer und externer pH-Regulation. Dies zeigt sich besonders im Vergleich der isolierten Ausbeuten zweier vergleichbarer Experimente (Tabelle 5, Einträge 3 und 6). Die erzielte Ausbeute mit externer pH-Regulation war, wie zuvor beschrieben, stabil bei 83 %. Durch den Einsatz der internen pH-Regulation mit NaHCO₃ konnte die isolierte Ausbeute weiter auf bis zu 91 % gesteigert werden. Tabelle 5 fasst diese Ergebnisse zusammen.

Tabelle 5 Vergleich der Reaktionsparameter in pH-Stat Experimenten und den Versuchen mit NaHCO ₃ .								
T [°C]	V [L]	Sub- strat [mM]	Reaktions- zeit [h]	Aktivi- tät ^a [U/mL]	Umsatz [%]	STY [g/(L·h)]	Aus- beute [%]	
pH-Stat								
1	25	0,02	100	10,0	3,8	> 99	1,8	n. b.
2	40	0,02	100	3,9	5,7	> 99	4,7	83
3	40	0,04	80	2,3	3,0	> 99	6,4	83
4	40	0,63	80	8,0	4,8	91	1,8	75
NaHCO ₃								
5	25	0,04	80	6,5	3,0	> 99	2,3	n. b.
6	40	0,04	80	1,2	6,1	> 99	12,3	91
7	40	0,04	200	1,2	15,2	> 99	30,7	74
8	40	8,80	200	4,0	5,5	> 99	9,2	82
^a Verwendete volumetrische Enzym-Aktivität; errechnet durch spezifische Aktivität [U/mg] bezogen auf den Standard Aktivitätsassay und die Enzymmenge [mg] pro Volumen [mL].								

Die verbesserte Aufarbeitung lässt sich mit der Umstellung von Phosphat-Puffer auf die NaHCO₃-Lösung erklären. Nach Beendigung der Reaktion wird die gesamte wässrige

Lösung auf einen pH-Wert $< 2,0$ eingestellt, um die produzierte Säure extrahieren zu können. Dabei wird die lösliche PLE denaturiert und fällt als Proteinniederschlag aus. In einem Phosphatpuffer-System bildet sich an diesem Punkt aus dem Protein und den Puffersalzen bei Zugabe eines Extraktionsmittels ein schwer trennbares Mehrphasengemisch, welches nur unter hohem Aufwand zielführend extrahiert werden kann. Wird das NaHCO_3 -System auf $\text{pH} < 2,0$ angesäuert, entweicht das Karbonat als CO_2 und es bleibt eine NaCl -Lösung mit gut sedimentiertem Protein zurück. Diese kann sehr einfach, wenn nötig, vor der Extraktion filtriert werden, um eine proteinreduzierte wässrige Lösung zur Extraktion zu erhalten.

Weiterführend wurde die Substratkonzentration sukzessive auf 200 mM erhöht, was zu einer exzellenten Raum-Zeit-Ausbeute von bis zu 30,7 g/(L·h) führte.

Dieses optimierte System wurde daraufhin in den 8,8 L Maßstab überführt, um die industrielle Anwendbarkeit des erstellten PLE-Prozesses zu demonstrieren. Aufgrund ökonomischer Betrachtungen, wurde in diesem Maßstab mit einer reduzierten Enzymmenge von 5,5 U/mL gearbeitet. Die Reaktionszeit verlängerte sich hierdurch auf vier Stunden. Abbildung 16 stellt den Zeitverlauf der maßstabsvergrößerten Reaktion grafisch dar.

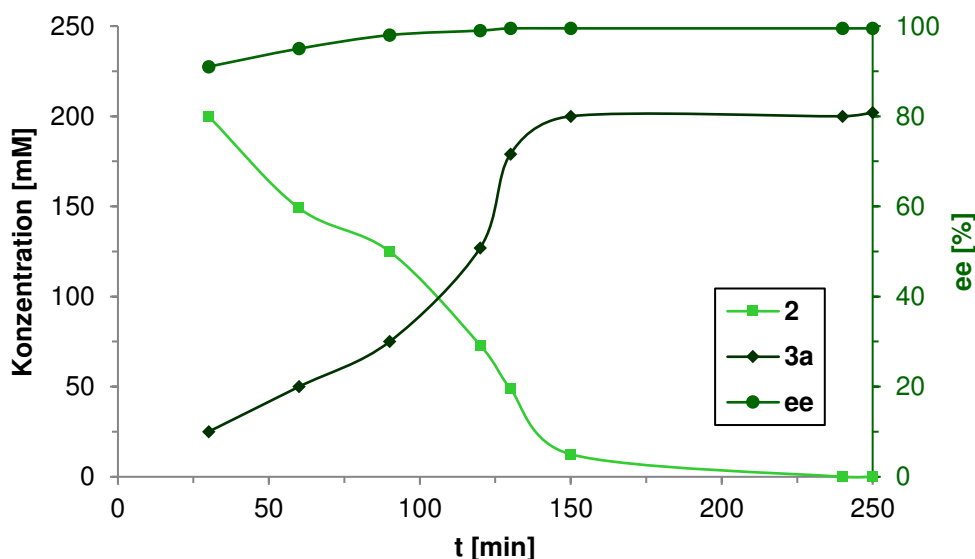


Abbildung 16. Reaktionsverlauf der Maßstabsvergrößerung der Desymmetrisierung. *Bedingungen: Volumen 8,8 L; 5,5 U/mL ECS-PLE06; 200 mM 2; 40 °C; Rührgeschwindigkeit 300 rpm; pH Kontrolle (8,3) durch „Säurefänger“ NaHCO_3 .*

Es ist zu erkennen, dass bereits nach zwei Stunden mehr als die Hälfte (127 mM) des Ausgangsmaterials **2** zum Produkt umgesetzt wurde. Der Kurvenverlauf zeigt eine beschleunigte Bildung des Produkts **3a** ab 90 Minuten. Es konnte nachträglich

experimentell bestätigt werden (nicht gezeigt), dass hierfür die bereits gebildete Menge Monoester, welcher als Emulgator für den verbliebenen Diester fungiert, verantwortlich ist. Dadurch wird der Massentransfer zwischen der organischen Substratphase und der wässrigen Phase verbessert und die PLE06 hat eine höhere Konzentration gelösten Substrats zur Verfügung. Es konnten 265 g kristallines Produkt **3a** isoliert werden. Die kritischen Prozessparameter Umsatz (99 %), Ausbeute (82 %) und Enantiomerenüberschuss (> 99,5 % ee) blieben stabil, was erneut die Prozessstabilität der PLE06 und deren Eignung als industriellen Katalysator aufzeigt.

Zusammenfassend wurde in diesem Teil der Arbeit ein industriell relevanter biokatalytischer Prozess mit Anwendung einer rekombinanten PLE etabliert, im Detail charakterisiert und erfolgreich skaliert. Darüber hinaus wurde eine Produktmenge von 265 g exemplarisch hergestellt. Weiterhin wurden sechs verfügbare Isoenzyme auf die Umsetzung von Diester **2** untersucht und das am besten geeignete Isoenzym (PLE06) für die Reaktion ausgewählt. Die Reaktionsparameter wurden anschließend sukzessive auf eine industrielle Anwendung optimiert, wobei sich NaHCO₃ als interner „Säurefänger“ aufgrund der hervorragenden Ergebnisse etabliert hat.

Diese Prozessoptimierung im Rahmen der Forschungsarbeit betrachtete dabei ausschließlich die Umsetzung des Diesters **2** zum Monoester **3a**.

3.2. Ökonomische Prozessoptimierung

(Artikel 2)

Im Verlauf der Arbeiten zur Synthese des Diesters **2** in **Artikel 1** wurde neben der qualitativen Optimierung des Produkts ein ökonomisches Optimierungspotential ersichtlich, welches durch eine zusätzliche Prozessmodifikation realisiert werden sollte.

Hierfür wurde in **Artikel 2** der Prozess zunächst hinsichtlich signifikanter Kostenfaktoren analysiert. Die daraus resultierenden Erkenntnisse bilden die Grundlage der Identifikation potentieller Einsparmaßnahmen und ermöglichten letztlich die Optimierung von maßgeblich auf die Prozesskosten einwirkenden Faktoren.

3.2.1. Substitution des Startmaterials

Der erste Optimierungspunkt wird ersichtlich, wenn der Gesamtprozess einschließlich Substratsynthese dargestellt wird. Der wie in **Artikel 1** beschriebene etablierte Prozess beginnt mit der Säure-katalysierten Veresterung der Disäure **1a** zur Herstellung des Diesters **2** als Substrat für die Biokatalyse mit der PLE06. Der zweite Prozessschritt stellt dann die biokatalytische Desymmetrisierung dar (Abbildung 17).

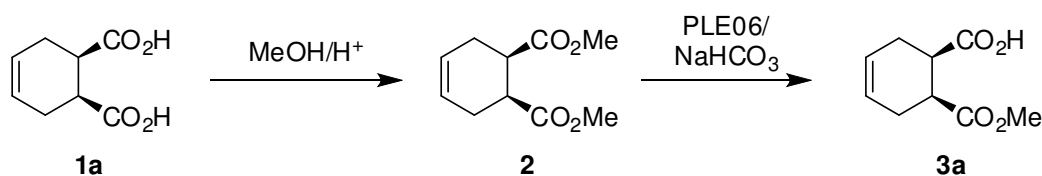


Abbildung 17. Gesamtprozess zur Herstellung von Monoester **3a**.

Es zeigte sich, dass die zuvor verwendete Disäure **1a** als Ausgangsmaterial prinzipiell durch das kommerziell erhältliche Anhydrid **1b** substituierbar ist (Abbildung 18).

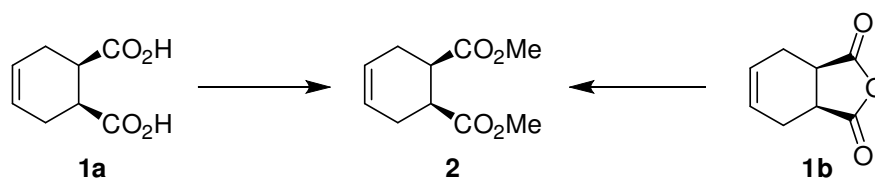


Abbildung 18. Reaktion von Disäure **1a** oder Anhydrid **1b** zum Diester **2**.

Zur Realisierung wurde das Protokoll für die Veresterung der Disäure auf das Anhydrid als Ausgangsmaterial angewendet, wobei keine signifikanten Veränderungen in der

Produktausbeute oder Reinheit des Diesters festgestellt wurden. Somit konnte auch mit dem Anhydrid eine Ausbeute von 85 % des Zielprodukts erreicht werden. Diese Umstellung des Startmaterials liefert einen deutlichen ökonomischen Vorteil, da das Anhydrid sowohl ~ 80 % geringere Kosten verursacht als auch in größeren Mengen verfügbar ist als die Disäure. Zusätzlich ist durch die Anwesenheit des Anhydrids eine wesentlich reaktivere Verbindung gegeben, welche sich effizienter in den Ester überführen lässt.^[62]

3.2.2. Etablierung einer Eintopfreaktion

Ein weiterer dominanter Kostenfaktor in chemischen Prozessen sind die intermediär notwendigen Aufarbeitungsschritte, um Zwischenprodukte zu isolieren. Diese Arbeitsschritte verbrauchen materielle, sowie personelle Ressourcen und sollten, wenn möglich, in ihrem Umfang soweit wie möglich minimiert werden. Im Falle des vorliegenden Prozesses sollte eine Eintopfsynthese etabliert werden, um die oben genannten Ressourcen einzusparen.

Damit eine Eintopfsynthese durchgeführt werden kann, müssen die unterschiedlichen Reaktionstypen mit ihren individuellen Bedingungen fein aufeinander abgestimmt werden. Der erste Prozessschritt zur Synthese von Diester **2** wurde in Methanol mit konzentrierter Säure durchgeführt. Diese Bedingungen sind nicht anwendbar für die PLE, da diese unter den gegebenen Bedingungen sofort denaturieren würde. Ebenso ist das wässrige Medium für den biokatalytischen zweiten Prozessschritt nicht geeignet, um den Diester **2** aus dem Anhydrid **1b** zu bilden. Aus diesen Gründen war das Prinzip einer sequenziellen Eintopfreaktion zielführend. Der Fokus lag in diesem Fall auf der Transformation der Reaktionsbedingungen von der Synthese des Diesters zur biokatalytischen Desymmetrisierung.

Die Veresterung des Anhydrids findet bei einer Substratkonzentration von 5 M und einer Säurekonzentration von 5 % (v/v) in Methanol statt. Die erhaltene, stark saure Diesterlösung musste auf die erforderlichen Bedingungen für die Biokatalyse angepasst werden. Diese benötigt eine Substratkonzentration von 0,2 M und einen pH-Wert von 8,0 in einem wässrigen Medium. Um die gewählten Bedingungen zu erreichen, konnte die Diesterlösung mit Wasser auf die gewünschte Konzentration eingestellt und durch den zuvor etablierten „Säurefänger“ NaHCO₃ der Überschuss an Schwefelsäure neutralisiert werden. Die so erhaltene Lösung entspricht den Bedingungen der zuvor entwickelten Biokatalyse mit einem zusätzlichen Anteil an Methanol von bis zu 5 % (v/v).

Eine Testreaktion zeigte die prinzipielle Durchführbarkeit, da im 5 g Maßstab ein Vollumsatz des Anhydrids zum Monoester erreicht werden konnte. Bei der Analyse wurde jedoch festgestellt, dass der Enantiomerenüberschuss des Produkts nur noch bei 89,3 % ee lag (Tabelle 6, Eintrag 1). Der verringerte ee-Wert des Produkts bewies die Anwesenheit des entgegengesetzten Enantiomers des Monoesters. Da dies in vorangegangenen Experimenten bisher nicht auftrat, konnte eine mangelnde Selektivität der PLE06 ausgeschlossen werden. Durch die Analyse einer Veresterungsreaktion zeigte sich, dass das unerwünschte Enantiomer aus einer nicht vollständigen Reaktion des Anhydrids zum Diester stammte. Die PLE hydrolysiert sehr selektiv und praktisch ausschließlich den Diester zum Monoester. Dabei kommt es jedoch niemals zur Bildung der Disäure aus dem Monoester. Somit kann, auch wenn die PLE06 eine ausgeprägte Selektivität für die pro *S* Estergruppe aufweist, diese in der Form des Monoesters nicht hydrolysieren. Wird also in der Reaktion racemischer Monoester gebildet, wird keines der beiden Enantiomere von der PLE06 hydrolysiert und diese finden sich im finalen Produkt wieder (Abbildung 19).

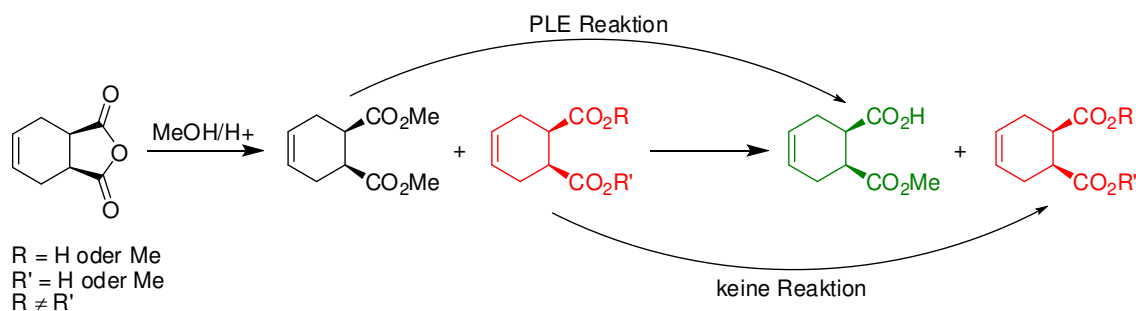


Abbildung 19. Eintopfreaktion mit racemischer Verunreinigung (rot).

Die Säure-katalysierte Veresterung des Anhydrids verläuft über die Stufe des racemischen Monoesters zum Diester. Dabei bildet der erste Teilschritt die Ringöffnungsreaktion des Anhydrids ab, welche quantitativ abläuft. Der zweite Schritt dieser Reaktion ist die klassische Säure-katalysierte Veresterung, bei der neben dem Ester ebenfalls Wasser als Produkt anfällt. Diese klassische Veresterung unterliegt einem Gleichgewicht, welches durch die Entfernung des Reaktionswassers in Richtung Produktbildung verschoben werden kann.

Um die Veresterung zu einem quantitativen Umsatz zu führen, der nötig ist, um ein enantiomerenreines Produkt **3a** zu erhalten, wurden verschiedene Trocknungsmittel in hohen Konzentrationen getestet. Keine der untersuchten Varianten führte zu einer signifikanten

Reduktion des racemischen Monoesters, wodurch ein neuer Lösungsansatz gefunden werden musste.

Um die Bildung des Reaktionswassers im zweiten Teilschritt der Veresterung zu vermeiden, wurde der racemische Monoester mithilfe von Thionylchlorid in sein Säurechlorid überführt, welches eine deutlich gesteigerte Reaktivität aufweist als die freie Disäure. Das Säurechlorid reagiert mit Methanol unter Freisetzung von HCl zum gewünschten Diester ohne Wasser freizusetzen, welches die Veresterung beeinträchtigen könnte. Gleichzeitig fungiert es als "Wasserfänger", indem es mit Wasser reagiert und zu SO₂ und HCl zerfällt. Durch die Verwendung des Thionylchlorids kann auf den Einsatz der Schwefelsäure verzichtet werden, da die Aktivierung der Säurefunktion über die Stufe des Säurechlorids verläuft, welches eine hohe Reaktivität aufweist. Zusätzlich nimmt die Lösung durch die freigesetzte HCl einen sauren pH-Wert an, was die Produktbildung weiter unterstützt.

Unter Anwendung der neuen Reaktionsbedingungen der Veresterung konnte ein quantitativer Umsatz des Anhydrids zum Diester erzielt werden.

Dieses Protokoll wurde abschließend in die sequenzielle Eintopfreaktion inkorporiert und mit der biokatalytischen Desymmetrisierung untersucht.

Tabelle 6 Maßstabsvergrößerung der sequenziellen Eintopfreaktion mit der PLE06.					
	Menge 1b [g]	Menge 3a [g]	Isolierte Ausbeute 3a [%]	ee [%]	Vol. biokat. Reaktion [L]
1 ^a	5,00	4,30	85	89,3	0,15
2 ^b	0,49	0,45	75	> 99,5	0,04
3 ^b	0,49	0,49	84	> 99,5	0,04
4 ^b	19,80	18,90	79	> 99,5	0,65

^a Erste Eintopfreaktion mit Säure-katalysierter Veresterung.
^b Veresterung in Anwesenheit von Thionylchlorid.

Der modifizierte Prozess lieferte zufriedenstellende isolierte Ausbeuten von bis zu 84 % und einen Enantiomerenüberschuss des Produkts von > 99,5 % ee (Tabelle 6). In den so durchgeführten Experimenten konnte kein racemischer Monoester nachgewiesen werden. Nach einer Detailoptimierung der Reaktionsparameter und der Aufarbeitung konnte der Prozess in den 0,65 L Maßstab überführt und 18,9 g enantiomerenreines Produkt **3a** aus dem Anhydrid ohne intermediäre Aufarbeitung erzeugt werden.

Mit der Optimierung von Prozess 1 konnten signifikante ökonomische Verbesserungen erzielt werden. Das zuvor kostenintensive Startmaterial wurde durch ein günstigeres,

besser verfügbares und reaktiveres Molekül ersetzt. Zusätzlich konnte durch die Einführung einer Eintopfreaktion die gesamte ressourcenintensive Aufarbeitungsprozedur des Zwischenprodukts eingespart werden, was den Einsatz von Lösungsmitteln und die im Prozess anfallenden Abfallmengen reduzierte. Darüber hinaus konnte durch die effizientere Prozessführung die Gesamtausbeute von 70 % auf 84 % gesteigert werden, wodurch eine weitere signifikante Kostenreduktion ermöglicht wurde.

3.3. Desymmetrisierung von *cis*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten (Artikel 3)

Die Erkenntnisse aus den **Artikeln 1 und 2** wurden auf einen weiteren avisierten Prozess angewendet. Dafür sollte die rekombinante Schweineleberesterase zur Herstellung von (1*S*,4*R*)-4-Hydroxy-2-cyclopentylacetat genutzt werden, da dieses Produkt ein gefragter Baustein zur Synthese von pharmazeutisch aktiven Verbindungen ist, wie z. B. Prostaglandin-Derivaten. Aus der Literatur ist dieser Prozess bereits mit der Schweineleberesterase aus dem Leberextrakt bekannt (Tabelle 3) und das Produkt konnte mit einem Enantiomerenüberschuss von 60 – 86 % ee isoliert werden.^[48,63] Auch die Isoenzyme wurden für die Desymmetrisierung von *cis*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten geprüft, wobei die PLE06 in diesen Untersuchungen nicht betrachtet wurde.^[11,63]

Im Folgenden wurde untersucht, ob es möglich ist mit der rekombinanten PLE diesen Prozess in einen industriell relevanten Maßstab zu überführen und gegebenenfalls durch Prozessoptimierung sogar eine Verbesserung der Enantiomerenreinheit des Produkts zu erreichen.

3.3.1. Wahl des optimalen PLE Isoenzym

Wie bereits in **Artikel 1** wurde zunächst das am besten geeignete Isoenzym für diese Desymmetrisierungsreaktion in einem Screening identifiziert.

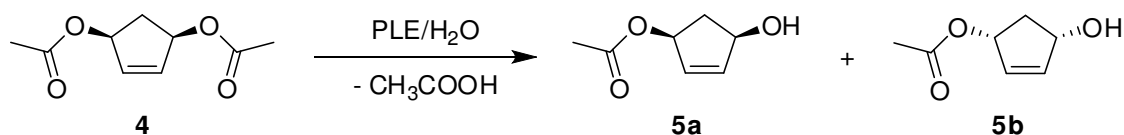


Abbildung 20. Desymmetrisierung von **4** mit rekombinanter PLE.

Im Rahmen der Versuche zur Desymmetrisierung von *cis*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten **4** wurden starke Unterschiede bezüglich der Aktivität und Selektivität der PLE-Isoenzyme festgestellt. Dabei zeigten PLE01, PLE02, PLE04 und PLE05 unzureichende spezifische Aktivitäten (Units pro Gramm Enzym) von 0,8 U/g, 2,0 U/g, 3,7 U/g sowie 10,0 U/g auf. Außerdem wurden nur moderate Enantioselektivitäten dieser Isoenzyme festgestellt (Abbildung 21). Eine Besonderheit gegenüber den anderen Isoenzymen zeigten PLE04 und PLE05, da diese eine entgegengesetzte Enantiopräferenz für das (1*R*,4*S*)-Produkt **5b** aufwiesen. Aufgrund ihrer geringen Aktivität und Selektivität wurden die

Isoenzyme PLE01, PLE02, PLE04 und PLE05 von den weiteren Experimenten zur Prozesserstellung ausgeschlossen. Demgegenüber standen die beiden vielversprechenden Kandidaten PLE03 und PLE06, welche spezifische Aktivitäten von 89 U/g bzw. 153 U/g für die Desymmetrisierung von **4** aufwiesen. Beide Isoenzyme erzeugten das Produkt **5a** in nahezu gleicher optischer Reinheit mit 81 % ee (PLE03) bzw. 83 % ee (PLE06).

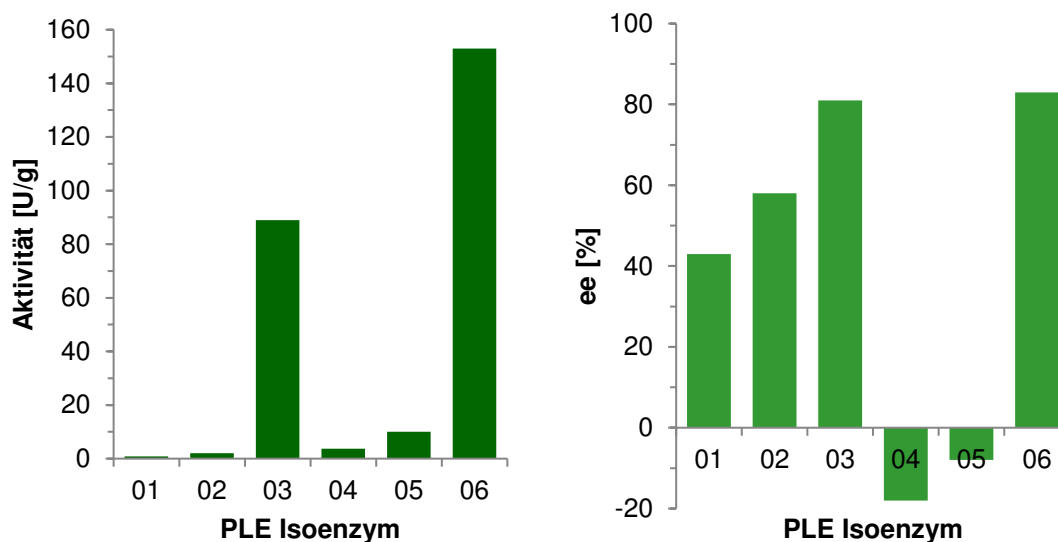


Abbildung 21. Vergleich der spezifischen Aktivität (links) und der erhaltenen Enantiomerenüberschüsse (rechts) für die sechs PLE Isoenzyme.

*Bedingungen: 0,25-15,0 mg/mL PLE Isoenzym (Lyophilisat); 2,5 mg (13,5 μ mol) **4**; 1,5 mL 100 mM Phosphat-Puffer; pH 7,5; 40 °C; 120 min. Ein negativer Enantiomerenüberschuss repräsentiert Selektivität für das Enantiomer **5b**.*

Um die ausgewählten Enzyme in die gewünschte Applikation zu führen, mussten in den nächsten Schritten die Stabilitäten der Isoenzyme für den gewünschten Prozess untersucht werden. Dafür wurden, wie bereits in **Artikel 1** beschrieben, Biokatalysen im Maßstab von 5 mL durchgeführt, um die jeweiligen Zeitkurven der Stabilität zu erhalten. Als Reaktionstemperatur wurde 50 °C gewählt und Proben der Enzymlösungen nach definierten Zeitabständen genommen. Es zeigte sich deutlich, dass die PLE03 nach kurzer Zeit ihre Aktivität bei dieser Temperatur verliert. Schon nach vier Stunden konnte nur noch eine Restaktivität von 19 % detektiert werden, was einer Halbwertszeit von 1,7 h entspricht. Eine deutlich bessere Stabilität konnte für die PLE06 festgestellt werden. Diese zeigte noch nach 168 h Inkubationszeit bei 50 °C eine Restaktivität von 24 %. Die Halbwertszeit liegt in diesem Fall bei 91 h. Somit wurde die PLE06 für die weitere Prozessoptimierung ausgewählt.

3.3.2. Auswahl der Reaktionsbedingungen

Wie in **Artikel 1** beschrieben wurden auch für diese Umsetzung Variationen der Prozessparameter pH-Wert, Temperatur und Co-Solventien untersucht.

Zunächst wurde der Einfluss des pH-Werts genauer betrachtet (Abbildung 21). Biokatalysen im Maßstab von 1,5 mL mit einer Konzentration von 10 mM *cis*-1,4-Diacetoxy-2-cyclopenten **4** wurden bei pH-Werten von 7,0 – 9,0 durchgeführt. Mit Ausnahme von pH 9,0 konnte der (1*S*,2*R*)-Monoester **5a** mit einem Enantiomerenüberschuss von 87 % ee hergestellt werden. Bei pH 9,0 wurde ein Enantiomerenüberschuss von 68 % ee detektiert. Dieser Einbruch der Enantiomerenreinheit ist auf die erhöhte Autohydrolyse des Diesters **4** unter den gegebenen Bedingungen zurückzuführen. Für die gewünschte Umsetzung wurde daher ein pH-Wert von 7,5 festgelegt, um die Autohydrolyse so gering wie möglich zu halten, aber die Aktivität der PLE06 nicht zu stark zu reduzieren (s. **Artikel 1**).

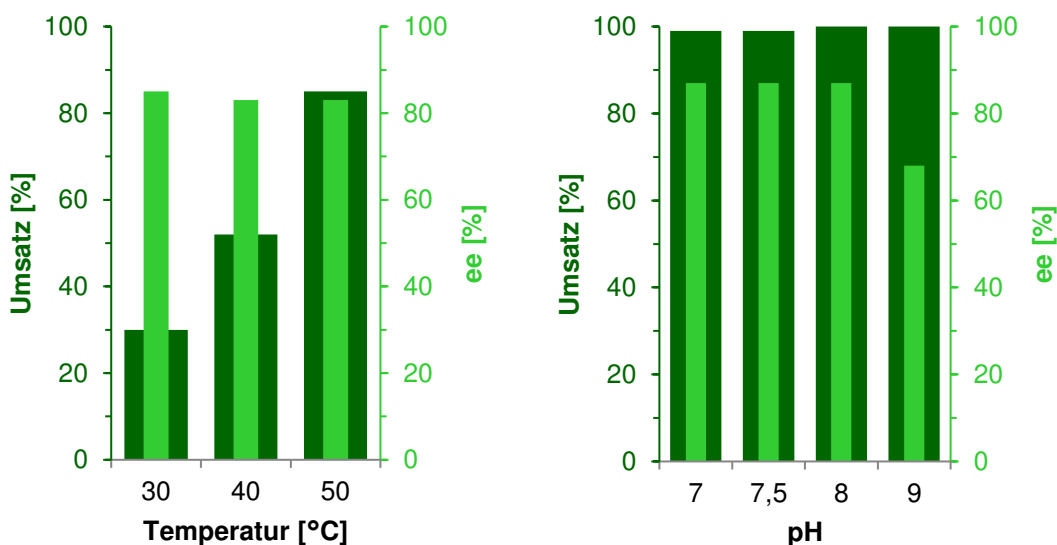


Abbildung 22. Temperatur- (links) und pH-Wertabhängigkeit (rechts) des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses der PLE06-katalysierten Synthese von **5a**.

*Bedingungen: 2 U/mL PLE06 (bezogen auf den pNPA-Aktivitäts Assay); 9,2 mg (50 μ mol) **4**; 25°C (für pH-Abhängigkeit); 1,5 mL 100 mM Phosphat-Puffer (pH 7,5 für Temperaturabhängigkeit); 120 min.*

Da die Temperatur, wie schon zuvor gezeigt, einen deutlichen Einfluss auf die Umsetzungen mit PLE hat, wurde diese ebenfalls betrachtet. Wie erwartet zeigte die PLE06 bei höheren Temperaturen gemäß der Analyse definierter Zeitproben wesentlich höhere Umsätze als bei niedrigeren Temperaturen. Besondere Beachtung sollte hierbei wiederum auf die Enantioselektivität gelegt werden, welche sich durch den Faktor Temperatur auch bei

dieser Umsetzung nicht veränderte. In allen Experimenten konnte ein gleichbleibender Enantiomerenüberschuss des Produkts von 83 % ee erhalten werden. Abbildung 22 stellt die Ergebnisse des Parameterscreenings grafisch dar.

Um die Möglichkeit des Einsatzes von Co-Solventien zu untersuchen, wurden ebenfalls Biokatalysen im Maßstab von 1,5 mL durchgeführt, welche mit verschiedenen wasser-mischbaren Lösungsmitteln (Methanol, Ethanol, 2-Propanol, *tert*-Butanol, DMSO, THF und 1,4-Dioxan) versetzt wurden. Ausgewählte Co-Solventien wurden dabei in Konzentrationen von jeweils 200 mM eingesetzt und die Umsätze sowie die erhaltenen Enantiomerenüberschüsse bestimmt (Abbildung 23). Im Vergleich zeigte sich, dass der Einsatz der gewählten Co-Solventien in der Umsetzung von **4** ausschließlich negative Effekte hatte. Diese Beobachtungen lassen sich mehrfach begründen. Einerseits können die Co-Solventien die Reaktion katalysiert durch PLE06 zum gewünschten Produkt hemmen bzw. das Enzym inaktivieren, andererseits führt der Einsatz der Lösungsmittel hier zu verringerten Enantiomerenüberschüssen von nur noch 57 % ee (in THF).

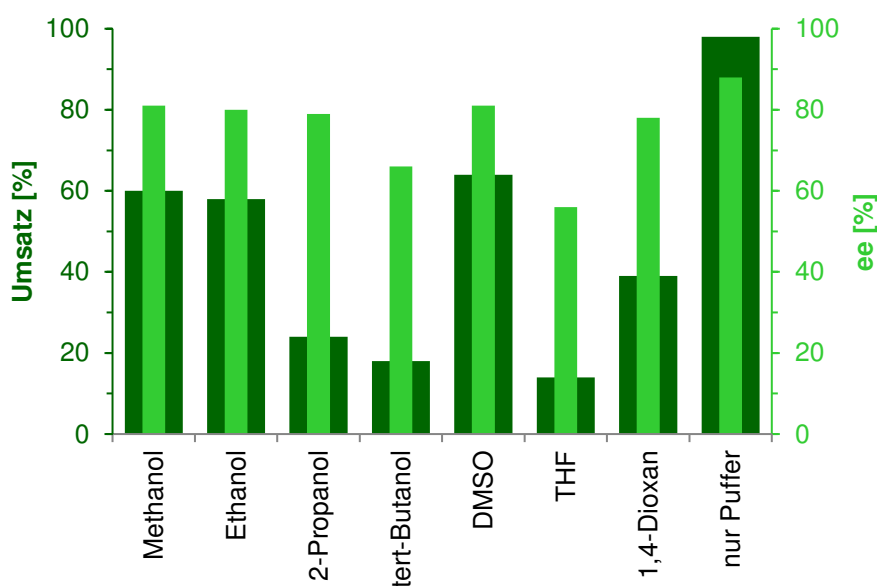


Abbildung 23. Einfluss verschiedener Co-Solventien (200 mM) auf den Umsatz und den Enantiomerenüberschuss der PLE06-katalysierten Biokatalysen.

Bedingungen: 0,25 U/mL PLE06 (bezogen auf den *p*NPA-Aktivitäts Assay); 2,5 mg (13,5 μ mol) **4**; 200 mM Co-Solvent; 50 °C; 1,5 mL 100 mM Phosphat-Puffer; pH 7,5; 120 min.

Aufgrund dieser Eigenschaften wurde im Prozess auf den Einsatz von Co-Solventien verzichtet und ausschließlich mit Puffer und Substrat gearbeitet. Die beschriebenen

Experimente führten somit zu dem Ergebnis, dass für die angestrebte Maßstabsvergrößerung die Reaktionsbedingungen 50 °C, pH 7,5 und ein Puffersystem ohne Co-Solventien ausgewählt wurden.

3.3.3. Maßstabsvergrößerung

Im Rahmen der Maßstabsvergrößerung wurden verschiedene weitere Parameter wie die Substratkonzentration und die Enzymmenge variiert, um bei diesem optimierten Prozess auch die ökonomischen Potentiale auszuschöpfen. Zusätzlich musste aufgrund der stark erhöhten Substratmenge im Vergleich zu den initialen Experimenten und infolge der vermehrten Akkumulation der frei werdenden Säure, eine Autobürette zur Stabilisierung des pH-Werts eingeführt werden. Tabelle 7 fasst die erzielten Ergebnisse der durchgeführten Variationen zusammen.

Tabelle 7 Übersicht der Versuche zur Optimierung und Maßstabsvergrößerung der Synthese von 5a.							
	V [L]	Substrat ^a [mM]	Aktivität ^b [U/mL]	Reaktions- zeit [min]	ee [%]	Umsatz [%]	STY [g/(L·h)]
1	0,02	100	20,0	11,0	88	98	76,0
2	0,02	100	10,0	36,7	89	> 99	23,0
3	0,10	100	10,0	37,5	87	97	22,1
4	0,02	100	5,0	36,7	85	95	22,1
5	0,02	100	2,5	75,0	83	90	10,2
6	0,02	200	5,0	110,0	84	91	14,1
7	0,02	500	10,0	240,0	84	63 ^c	11,2
8	2,40	230	5,0	240,0	91	94	7,7

^a Das Substrat war in hohen Konzentrationen nicht löslich und es bildete sich eine Emulsion.

^b Verwendete volumetrische Enzym-Aktivität; errechnet durch spezifische Aktivität [U/mg] bezogen auf den Standard pNPA-Aktivitätsassay und die Enzymmenge [mg] pro Volumen [mL].

^c Durch die extreme Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit wurde die Reaktion nach 240 min abgebrochen.

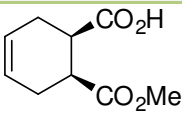
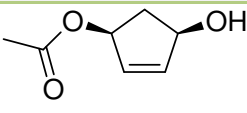
In allen Versuchen wurden sehr gute Enantiomerenüberschüsse der Produkte von bis zu 91 % ee erhalten und ebenfalls hohe Raum-Zeit-Ausbeuten erzielt. Substratkonzentrationen von 100 – 200 mM konnten ohne negative Effekte zum gewünschten Produkt umgesetzt werden (Tabelle 7, Eintrag 1-6). Dagegen führte eine Konzentration von 500 mM zu einer verringerten Umsatzrate der PLE06 (Tabelle 7, Eintrag 7). Die Ergebnisse dieser

Versuche wurden in die Maßstabsvergrößerung in den Liter-Maßstab integriert. Hierbei wurden 230 mM **4** umgesetzt, wobei das Produkt **5a** mit 91 % ee isoliert wurde. Diese präparative Biokatalyse führte zu 42 g **5a** und einer Raum-Zeit-Ausbeute von 7,7 g/(L·h) (Tabelle 7, Eintrag 8).

Zusammenfassend wurde ein zweiter industriell relevanter biokatalytischer Prozess mit rekombinanter PLE etabliert. Die PLE06 zeigte in der Umsetzung erneut das beste Potential im Vergleich zu den ebenso untersuchten Isoenzymen und sie synthetisierte das Produkt mit einem Enantiomerenüberschuss von > 83 % ee. Hierbei wurde eine Produktmenge von 42 g (1*S*,4*R*)-4-Hydroxy-2-cylopentylacetat demonstrativ hergestellt. Zusätzlich wurde das Produkt einer enantioselektiven Kristallisation durch den Projektpartner Dr. Jan von Langermann (Universität Rostock) unterzogen, wodurch enantiomerenreines Produkt **5a** isoliert werden konnte.

4. Zusammenfassung

In dieser Dissertation wurden Prozesse zur Herstellung von zwei Feinchemikalien mit rekombinanter Schweineleberesterase schrittweise etabliert und jeweils bis in einen produktionstechnisch relevanten Maßstab überführt. Dabei wurden die ausgewählten Isoenzyme auf ihre Eignung untersucht, die optimalen Parameter im Reaktionsprozess identifiziert, der Maßstab sukzessive vergrößert, die Produkte hergestellt und den Zielspezifikationen entsprechend isoliert und aufgearbeitet. Die Prozessdaten sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8 Zusammenfassung der Prozessparameter.		
	Prozess 1	Prozess 2
	 <p>3a</p>	 <p>5a</p>
Produkt	(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1-(Methoxy-carbonyl)cyclohex-4-en-2-carbonsäure	(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-Hydroxy-2-cyclopentylacetat
Isoenzym	PLE06	PLE06
Substratkonzentration	200 mM	230 mM
Volumen	8,8 L	2,4 L
pH-Wert	8,0	7,5
Temperatur	40 °C	50 °C
Umsatz	> 99 %	94 %
ee-Produkt	> 99,5 % ee	91 % ee
STY	9,2 g/(L·h)	7,7 g/(L·h)
Isolierte Ausbeute	265 g (82 %)	42 g (54 %)

Als Besonderheit konnte für den etablierten Prozess 1 ein verbessertes Synthesedesign entwickelt werden. Der optimierte Prozess stellt eine sequenzielle chemoenzymatische Eintopfreaktion dar. Es wurde ein ökonomisch vorteilhafteres Ausgangsmaterial eingeführt, welches unter identischen Synthesebedingungen im Prozess umgesetzt werden konnte. Die zuvor rein Säure-katalysierte Veresterung zum Diester wurde auf eine Thionylchlorid Reaktion umgestellt, um in der ersten Reaktion einen Vollumsatz zu erzielen. Durch den Einsatz des „Säurefängers“ NaHCO₃ war es wiederum möglich, ohne Aufarbeitung direkt das Reaktionsmedium der Veresterung in das für die biokatalytische Umsetzung benötigte wässrige Reaktionssystem zu transformieren. Dadurch konnte im Vergleich zum Einzelschritt-Prozess die Ausbeute von 70 % auf bis zu 84 % gesteigert

und zusätzlich Ressourcen für eine intermediäre Aufarbeitung eingespart werden. Der Eintopfprozess wurde ebenfalls in den präparativen Maßstab überführt, wobei 18,9 g Produkt hergestellt werden konnten.

Da die PLE06 das Produkt in Prozess 2 mit einem Enantiomerenüberschuss von 84 - 91 % ee synthetisierte, musste eine ergänzende Methode zur Herstellung des enantiomerenreinen Produkts entwickelt werden. Diese Methode wurde durch den Projektpartner Dr. Jan von Langermann (Institut für Chemie, Universität Rostock) durch eine enantioselektive Kristallisation des Rohprodukts der PLE06-katalysierten Reaktion etabliert. Die Anwendung dieser zusätzlichen Kristallisation erzeugte das gewünschte Produkt mit einem Enantiomerenüberschuss von > 99,5 % ee.

Die beiden untersuchten und optimierten Synthesewege zur Herstellung enantiomerenreiner Produkte über Desymmetrisierungsreaktionen mit rekombinanter PLE bieten deutliche Anwendungspotentiale. Der besondere Vorteil zeigt sich durch die theoretische Ausbeute von 100 %, die sehr hohe Selektivität der ausgewählten Biokatalysatoren, aber auch durch die vereinfachte Aufarbeitung, da kein Nebenprodukt isoliert und aufgereinigt werden muss.

Die zwei in dieser Arbeit etablierten und veröffentlichten Prozesse zeigen erstmalig die industrielle Verwendbarkeit der rekombinanten PLE06 zur Herstellung von zwei Feinchemikalien. Durch die Aufnahme der Parameter Katalysatorbeladung, Substratkonzentration und Raum-Zeit-Ausbeute wurde evaluiert, ob die rekombinanten PLE-Isoenzyme in eine industriell sinnvolle Anwendung eingebettet werden können. Es konnte gezeigt werden, dass die rekombinante PLE ein äußerst effizienter industrieller Biokatalysator ist und großes Potential zum Einsatz in weiteren Prozessen aufweist. Durch den Einsatz der rekombinanten PLE kann eine stabile optische Reinheit der Produkte garantiert werden, was zuvor mit der Schweineleberesterase aus dem Leberextrakt nicht möglich war. Außerdem werden regulatorische Hürden bei Verwendung von Material aus tierischem Gewebe von vorn herein ausgeschlossen.

Eine weiterführende Prozessoptimierung unter Variation der Prozessparameter Substratkonzentration oder Reaktordesign bieten das Potential die aktuellen Prozesse noch effizienter zu gestalten.

5. Literaturverzeichnis

- [1] P. Pollak, *Fine chemicals. The industry and the business*, 2. Aufl., J. Wiley & Sons, Hoboken, N. J., **2011**.
- [2] E. Francotte, W. Lindner (Hrsg.) *Methods and principles in medicinal chemistry*, v. 33, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [3] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, 485, 185.
- [4] a) J. Tao, R. J. Kazlauskas (Hrsg.) *Biocatalysis for green chemistry and chemical process development*, John Wiley & Sons, Hoboken, N. J., **2011**; b) E. M. Carreira, H. Yamamoto (Hrsg.) *Comprehensive Chirality*, Elsevier Science, Amsterdam., **2012**.
- [5] a) R. Wohlgemuth, *Curr Opin Microbiol* **2010**, 13, 283; b) R. Wohlgemuth, *Curr Opin Biotech* **2010**, 21, 713; c) K. M. Koeller, C. H. Wong, *Nature* **2001**, 409, 232; d) D. Muñoz Solano, P. Hoyos, M. J. Hernáiz, A. R. Alcántara, J. M. Sánchez-Montero, *Bioresour Technol* **2012**, 115, 196.
- [6] a) H. E. Schoemaker, D. Mink, M. G. Wubbolts, *Science (New York, N.Y.)* **2003**, 299, 1694; b) R. N. Patel, *Curr Opin Drug Discov Devel* **2006**, 9, 741; c) R. N. Patel, *ACS Catal* **2011**, 1, 1056.
- [7] W. Aehle, *Enzymes in Industry. Production and Applications*, Wiley-VCH, Hoboken, **2008**.
- [8] Zhibin Liu, Roland Weis, A. Glieder, *Food Technol Biotechnol* **2004**, 237.
- [9] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, **2005**.
- [10] a) M. López-Iglesias, V. Gotor-Fernández, *Chem Rec* **2015**, 15, 743; b) C. Orellana-Coca, U. Törnvall, D. Adlercreutz, B. Mattiasson, R. Hatti-Kaul, *Biocatal Biotransfor* **2009**, 23, 431.
- [11] A. Hummel, E. Brüsehauer, D. Böttcher, H. Trauthwein, K. Doderer, U. T. Bornscheuer, *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, 46, 8492.
- [12] J. McMurry, *Organic chemistry*, 7. Aufl., Cengage Brooks/Cole, Belmont, CA, **2010**.
- [13] P. D. de María, B. Kossmann, N. Potgrave, S. Buchholz, H. Trauthwein, O. May, H. Gröger, *Synlett* **2005**, 1746.
- [14] a) Y. Hayashi, *Chemical science* **2016**, 7, 866; b) C. A. Denard, J. F. Hartwig, H. Zhao, *ACS Catal* **2013**, 3, 2856.

- [15] W. Junge, E. Heymann, *Eur J Biochem* **1979**, *95*, 519.
- [16] E. Heymann, W. Junge, *Eur J Biochem* **1979**, *95*, 509.
- [17] L. K. P. Lam, J. B. Jones, *J Org Chem* **1988**, *53*, 2637.
- [18] N. Öhrner, A. Mattson, T. Norin, K. Hult, *Biocatal Biotransfor* **1990**, *4*, 81.
- [19] S. Lange, A. Musidlowska, C. Schmidt-Dannert, J. Schmitt, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 576.
- [20] a) D. Böttcher, E. Brüsehauer, K. Doderer, U. T. Bornscheuer, *Appl Microbiol Biotechnol* **2007**, *73*, 1282; b) E. Brüsehauer, D. Böttcher, A. Musidlowska-Persson, D. Albrecht, M. Hecker, K. Doderer, U. T. Bornscheuer, *Appl Microbiol Biotechnol* **2007**, *76*, 853.
- [21] M. Hermann, M. U. Kietzmann, M. Ivancić, C. Zenzmaier, R. G. M. Luiten, W. Skranc, M. Wubbolts, M. Winkler, R. Birner-Gruenberger, H. Pichler et al., *Journal of Biotechnology* **2008**, *133*, 301.
- [22] Q. Zhou, W. Sun, X. Liu, X. Wang, Y. Xiao, D. Bi, J. Yin, D. Shi, *PloS one* **2016**, *11*, e0163295.
- [23] U. T. Bornscheuer, *FEMS Microbiol Rev* **2002**, *26*, 73.
- [24] S. Werten, G. J. Palm, L. Berndt, W. Hinrichs, *Pig liver esterase 5 (PLE5)*, **2017**.
- [25] M. Gall, R. Kourist, M. Schmidt, U. T. Bornscheuer, *Biocatal Biotransfor* **2010**, *28*, 201.
- [26] a) E. Henke, J. Pleiss, U. T. Bornscheuer, *Angew Chem Int Ed Engl* **2002**, *41*, 3211; b) E. Henke, U. T. Bornscheuer, R. D. Schmid, J. Pleiss, *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* **2003**, *4*, 485.
- [27] H. D. Dakin, *The Journal of Physiology* **1905**, *32*, 199.
- [28] a) L.-M. Zhu, M. Catriona Tedford, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 6587; b) C. Tamm, *Pure and Applied Chemistry* **1992**, *64*.
- [29] P. D. de María, C. A. García-Burgos, G. Bargeman, R. W. van Gemert, *Synthesis* **2007**, 1439.
- [30] M. Born, C. Tamm, *Helv Chim Acta* **1990**, *73*, 2242.
- [31] S. Kobayashi, J. Shibata, M. Shimada, M. Ohno, *Tetrahedron Letters* **1990**, *31*, 1577.
- [32] A. Fadel, J.-L. Canet, J. Salaün, *Tetrahedron, asymmetry* **1993**, *4*, 27.
- [33] R. M. Borzilleri, S. M. Weinreb, M. Parvez, *J Am Chem Soc* **1995**, *117*, 10905.
- [34] J. E. Baldwin, R. M. Adlington, M. B. Mitchell, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5193.
- [35] M. I. Colombo, E. A. Rúveda, *J Braz Chem Soc* **1998**, *9*, 303.

- [36] J. P. Michael, *Nat Prod Rep* **2000**, *17*, 603.
- [37] M. S. Yu, I. Lantos, Z.-Q. Peng, J. Yu, T. Cacchio, *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 5647.
- [38] M. Müller, K. Lamottke, E. Löw, E. Magor-Veenstra, W. Steglich, *J Chem Soc, Perkin Trans I* **2000**, 2483.
- [39] M. Toyota, K. Matsuura, M. Yokota, M. Kimura, M. Yonaga, H. Sugimoto, M. Ihara, *Chem Pharm Bull* **2004**, *52*, 1153.
- [40] B. G. Vong, S. H. Kim, S. Abraham, E. A. Theodorakis, *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43*, 3947.
- [41] D. P. O'Malley, K. Li, M. Maue, A. L. Zografos, P. S. Baran, *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 4762.
- [42] M. Inai, T. Goto, T. Furuta, T. Wakimoto, T. Kan, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2771.
- [43] Y. Namiki, T. Fujii, M. Nakada, *Tetrahedron: Asymmetry* **2014**, *25*, 718.
- [44] A. Johnson, M. J. Saunders, T. G. Back, *Organic & biomolecular chemistry* **2015**, *13*, 1463.
- [45] M. Fuchs, A. Fürstner, *Angew Chem Int Ed Engl* **2015**, *54*, 3978.
- [46] K. Lehr, R. Mariz, L. Leseurre, B. Gabor, A. Fürstner, *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50*, 11373.
- [47] K. Lehr, S. Schulthoff, Y. Ueda, R. Mariz, L. Leseurre, B. Gabor, A. Fürstner, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2015**, *21*, 219.
- [48] K. Laumen, M. Schneider, *Tetrahedron Letters* **1984**, *25*, 5875.
- [49] K. Laumen, E. H. Reimerdes, M. Schneider, H. Görisch, *Tetrahedron Letters* **1985**, *26*, 407.
- [50] P. Kociński, M. Stocks, D. Donald, M. Perry, *Synlett* **1990**, *1990*, 38.
- [51] S. Kobayashi, K. Kamiyama, M. Ohno, *Chem Pharm Bull* **1990**, *38*, 350.
- [52] S. Wallert, K. Drauz, I. Grayson, H. Gröger, P. Domínguez de María, C. Bolm, *Green Chem.* **2005**, *7*, 602.
- [53] U. Zutter, H. Iding, P. Spurr, B. Wirz, *The Journal of organic chemistry* **2008**, *73*, 4895.
- [54] S. Banerjee, W. J. Wiggins, J. L. Geoghegan, C. T. Anthony, E. A. Woltering, D. S. Masterson, *Organic & biomolecular chemistry* **2013**, *11*, 6307.
- [55] K. Tenbrink, M. Seßler, J. Schatz, H. Gröger, *Adv Synth Catal* **2011**, 353, 2363.
- [56] R. Kourist, U. T. Bornscheuer, *Appl Microbiol Biotechnol* **2011**, *91*, 505.

- [57] R. Bel-Rhlid, Y. Fleury Rey, D. Welti, R. Fumeaux, D. Moine, *Yeast (Chichester, England)* **2015**, *32*, 115.
- [58] T. Kitazume, T. Ikeya, K. Murata, *J Chem Soc, Chem Commun* **1986**, 1331.
- [59] H. A. Sousa, C. A. M. Afonso, J. P. B. Mota, J. G. Crespo, *Ind Eng Chem Res* **2003**, *42*, 5516.
- [60] A. Goswami, T. P. Kissick, *Org Process Res Dev* **2009**, *13*, 483.
- [61] M. E. Smith, S. Banerjee, Y. Shi, M. Schmidt, U. T. Bornscheuer, D. S. Master-son, *ChemCatChem* **2012**, *4*, 472.
- [62] P. Knochel, G. A. Molander, *Comprehensive Organic Synthesis*, 2. Aufl., Elsevier Science, Burlington, **2014**.
- [63] E. Brüsehauer, D. Böttcher, K. Liebeton, J. Eck, C. Naumer, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 730.

Artikel 1

Scale-up of a Recombinant Pig Liver Esterase-Catalyzed Desymmetrization of Dimethyl Cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate

*Philipp Süß,^{1,3} Sabine Illner,² Jan von Langermann,² Sonja Borchert,¹ Uwe T. Bornscheuer,³
Rainer Wardenga,^{1,*} and Udo Kragl^{2,*}*

¹ Enzymicals AG, Walther-Rathenau-Str. 49a, 17489 Greifswald, Germany

² University of Rostock, Institute of Chemistry, Albert-Einstein-Str. 3a, 18059 Rostock, Germany

³ University of Greifswald, Institute of Biochemistry, Felix-Hausdorff-Str. 4, 17487 Greifswald, Germany

ABSTRACT.

A recombinant isoenzyme of pig liver esterase was used for the highly enantioselective desymmetrization of dimethyl cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate. The selected recombinant esterase showed a significant advantage in enantioselectivity over the commonly used esterase from the mammalian source. The process was scaled-up to yield 265 g product with a simplified pH control and the target molecule was obtained with an enantiopurity of >99.5% e.e..

KEYWORDS. Biocatalysis, Enzyme, Enantioselective, Hydrolysis

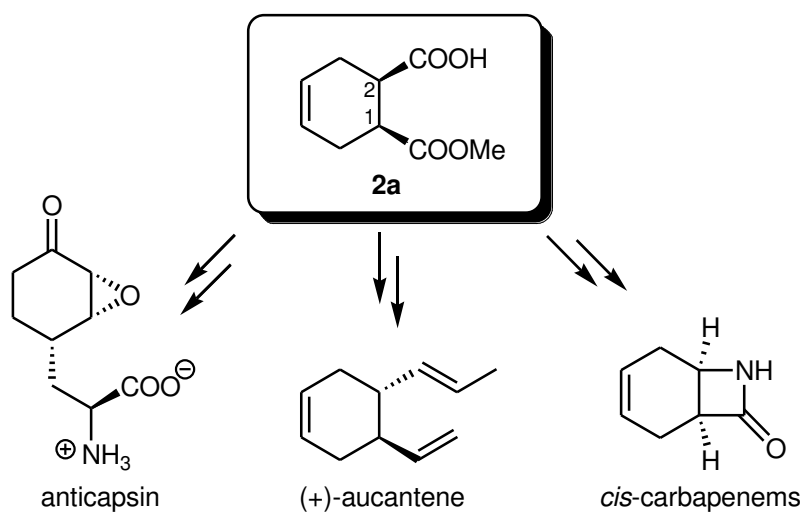
1. INTRODUCTION

The preparation of enantiopure building blocks gained significant relevance in the industrial production of important pharmaceuticals and agrochemicals during the last decades. For example, about 39% of worldwide sold drugs in 2002 were provided in an enantiomerically pure form.¹ Originally the separation of the enantiomers from the chemically synthesized racemic mixture was preferred, e.g. by preparative chromatography and (enantio)selective crystallization, which obviously limits the maximum yield to 50% and results in low atom efficiency and a significant waste problem. Asymmetric synthesis processes on the other side allow a maximum theoretical yield of 100% and thus an impressive variety of chemical and biocatalytical processes was developed over the past years.² Biocatalysis has proven multiple times that higher enantio- and regioselectivities were achieved at particularly mild reaction conditions, facilitating a suppression of unwanted side reactions, e.g. isomerization and racemization.³⁻⁶ For this purpose the enzyme can be utilized in different forms: as (partially) purified enzymes, free or in an immobilized enzyme-preparation, with cross-linking techniques or even as whole cells. The eventually applied enzyme form strongly depends on the chosen specific process specifications.⁷ In addition, protein stability, substrate specificity and enantioselectivity of the biocatalyst itself can be improved by molecular biology techniques.⁸

From the available pool of biocatalysts various enzymes have repeatedly proven their value for the synthesis of chiral synthons, especially at industrial scale.⁹⁻¹¹ One major example is the esterase from porcine liver, typically referred to as pig liver esterase (PLE). PLE as a relatively low-cost enzyme shows a good stability and hydrolyzes a large range of esters.^{12,13} Examples include the synthesis of precursors of β 3-receptor agonists, pyrethroids (from chrysanthemic acid esters), the growth hormone secretagogue and the anti-HIV-drug (-)-FTC.^{7,12,14}

Another major synthon is the target molecule (1*S*,2*R*)-1-(methoxycarbonyl)cyclohex-4-ene-1-carboxylic acid **2a** ((1*S*,2*R*)-monoester), which is a valuable intermediate for the synthesis of many biologically active products, e.g. anticapsin, (+)-aucantene and *cis*-carbapenems (Scheme 1).¹⁵ Further potential applications are the creation of ligands for DC-SIGN (useful in treatment of HIV-

infection), synthesis of β -polypeptides against cytomegalovirus (Herpes) and the synthesis of Tri-cyclic Core of Platencin (antibiotic to MRSA).¹⁶⁻¹⁸



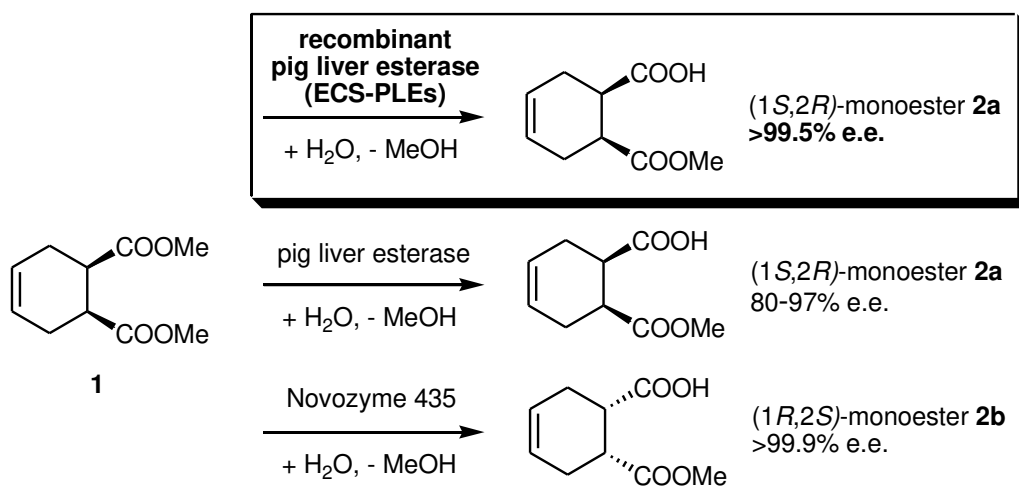
Scheme 1. The target molecule (1*S*,2*R*)-monoester **2a** is a very useful intermediate for the production of various pharmaceutically relevant products.

Unfortunately, the classical preparation of pig liver esterase includes an extraction from the animal tissue, which yields varying mixtures of several isoenzymes.^{19,20} All these isoforms exhibit different enzyme characteristics, including different stabilities, pH-dependencies and may also result in opposite enantioselectivities, depending on the substrate.²¹⁻²³ In addition, differences in the isoenzyme ratio may occur between PLE production batches. Consequently the observed enantiomeric excess of a reaction represents only a sum parameter and is not always easily reproducible, which can cause problems in large scale applications. The very unattractive presence of several different PLE isoenzymes was ultimately overcome by cloning and recombinant expression in safe non-mammalian producer strains.²⁴ Various authors reported the expression in *P. pastoris* and in *E. coli*, which allows the use of the full potential of selected isoenzymes, including high enantioselectivity, but without side activities and regulatory issues.²⁵⁻²⁸ In this contribution we report the successful application of a recombinant pig liver esterase for the desymmetrization reaction of dimethyl cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate **1** (Scheme 2). From the available six recombinant pig liver esterases (ECS-PLE01-06) the most valuable isoenzyme and the optimal reaction

conditions were chosen. The characteristic properties of the recombinant biocatalysts were compared with its natural equivalent from the porcine liver extract. Finally, the reaction was transformed into 250 g-scale, proving again the strong potential and large scale applicability of recombinant pig liver esterases. Furthermore, a simplified pH-control concept was used for this reaction, which requires no additional equipment, e.g. titrator and pH electrode. This self-regulating concept requires only standard laboratory equipment, thus keeping overall costs low.

2. RESULTS AND DISCUSSION

Desymmetrization of dimethyl cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate **1** allows the synthesis of two different enantiomers. (1*R*,2*S*)-monoester **2b** can be achieved with the lipase B from *Candida antarctica* as immobilized form Novozym[®] 435 with excellent enantioselectivity (>99.9%) and a yield of up to 99.8%.²⁹ The other enantiomer, (1*S*,2*R*)-monoester **2a**, was repeatedly synthesized *via* a pig liver esterase-catalyzed reaction. Unfortunately the reaction is not entirely enantioselective and a lower enantiomeric excess of 80–97% e.e. was obtained (Scheme 2).^{12,30-36} The reduced enantioselectivity results from the presence of several parallel hydrolytic reactions, each independently catalyzed by different isoenzymes of pig liver esterase. The products of highly enantioselective isoenzymes are hereby mixed with products from less selective enzymes. Thus the use of a single, recombinantly expressed PLE isoenzyme allows a highly enantioselective synthesis of **2a** (>99.5% e.e.).



Scheme 2. Comparison of differing enzyme preparations for the desymmetrization of dimethyl cyclohex-4-ene-cis-1,2-dicarboxylate **1**.

2.1 Choice of optimal PLE isoenzyme

Consequently the available six PLE isoenzymes (ECS-PLEs from Enzymicals AG) were screened for the production of (1*S*,2*R*)-monoester **2a** *via* desymmetrization from diester **1**. As expected, strong differences in activity and selectivity were found between the isoenzymes (Figure 1).

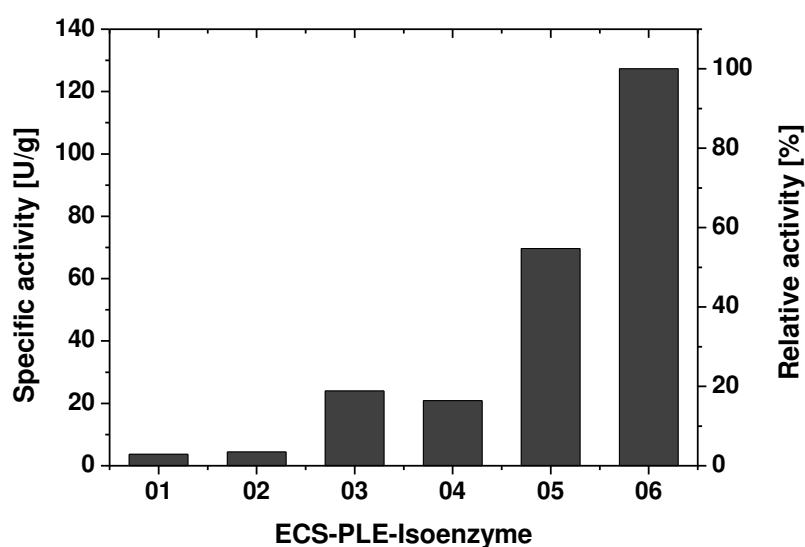


Figure 1. Comparison of the specific activity towards dimethyl cyclohex-4-ene-cis-1,2-dicarboxylate **1** (hydrolysis reaction); *Conditions:* 25–50 mg PLE isoenzyme (lyophilizate), 0.2 mmol **1**, 40 °C, 5 mL 5 mM phosphate buffer, pH 8, titration with 50 mM NaOH solution.

ECS-PLE06 exhibits the highest enzymatic activity for the desymmetrization of dimethyl cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate, indicated as 100% relative activity. A reduced activity of approximately 55% was found for ECS-PLE05, which is still considerable high for the favored conversion of **1**. The activities of ECS-PLE03 and 04 are significantly lower and were therefore excluded due to economic reasons. The remaining isoenzymes ECS-PLE01 and 02 showed hardly any activity towards **1** and were not favored as well. The enantioselectivity of the available isoenzymes

and thus the resulting synthetic potential was additionally investigated with conversion experiments on small scale (Figure 2).

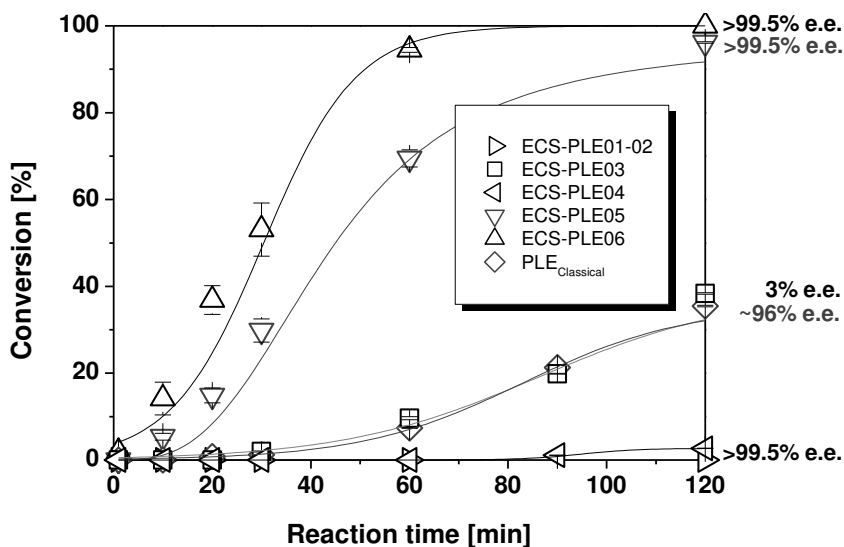


Figure 2. Desymmetrization of dimethyl cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate **1** to (1*S*,2*R*)-monomer **2a** depending on the used pig liver esterase isoenzyme; *Conditions*: 23 °C, 100 mM TRIS buffer pH 7.5, 10 mmol/L substrate; 4 U/mL recombinant PLE (according to the standard activity assay).

In analogy to the results from the apparent reactivity the ECS-PLE06 exhibited the highest reactivity in the conversion experiments. After 120 minutes full conversion together with an excellent enantiomeric excess of >99.5% was obtained. A slightly lower rate of conversion was found for ECS-PLE05, which is also in accordance with the previous results, Figure 1. However, almost full conversion was also achieved after 120 minutes and an enantioselectivity of >99.5% was identified, which is identical to ECS-PLE06. Interestingly, based on the enzyme activity assay with *p*-nitrophenyl acetate, a similar amount of the classical pig liver esterase (PLE_{Classical}) yields a significantly reduced reaction rate in comparison to ECS-PLE05 and ECS-PLE06. After 60 minutes only 15% conversion was possible, which was increased to only about 30% after 120 minutes. Most importantly, an enantiomeric excess of nearly 96% e.e. was observed for the production of **2a** in this reaction, which is of course lower than the results obtained with ECS-PLE05 and ECS-

PLE06. This fact illustrates conclusively the high synthetic advantage of recombinant PLEs. Furthermore, the other recombinant pig liver esterases showed no synthetic value. The use of ECS- PLE03 yields only an almost racemic product (3% e.e.) with 30% conversion after 120 minutes and the other recombinant PLEs showed no significant conversion. Additional experiments with low amounts of water-miscible solvents, which are known to alter the characteristics of recombinant PLEs, were not successful for the improvement of this catalytic reaction.³⁷

In conclusion, recombinant PLEs show impressive advantages in comparison to the classical pig liver esterase preparation. The highest reactivities and excellent enantioselectivities were found for ECS-PLE06, which was consequently chosen for the intended large scale-production of **2a**. The lower reactivity of the classical PLE is explainable by the presence of different isoenzymes, as mentioned above. Here the recombinant PLEs 1, 2 and 4 diminish the synthetic performance and the presence of PLE 3, which yields only a racemic product, causes a loss in enantioselectivity. Thus only a lowered reactivity and enantiomeric excess can be obtained with the classical pig liver esterase.¹²

2.2 Choice of reaction conditions

The main enzyme characteristics of recombinant PLEs were already reported earlier in literature.^{20,22,25} Unfortunately, specific process data for the desymmetrization of **1** to **2a** were not available prior to this study. Thus additional experiments were conducted to define efficient process conditions for the ECS-PLE06-catalyzed synthesis of **2a**. In particular reaction temperature and pH of the aqueous phase were of interest for the attempted scale-up. The influence of reaction temperature is exemplarily shown for ECS-PLE06 in Figure 3.

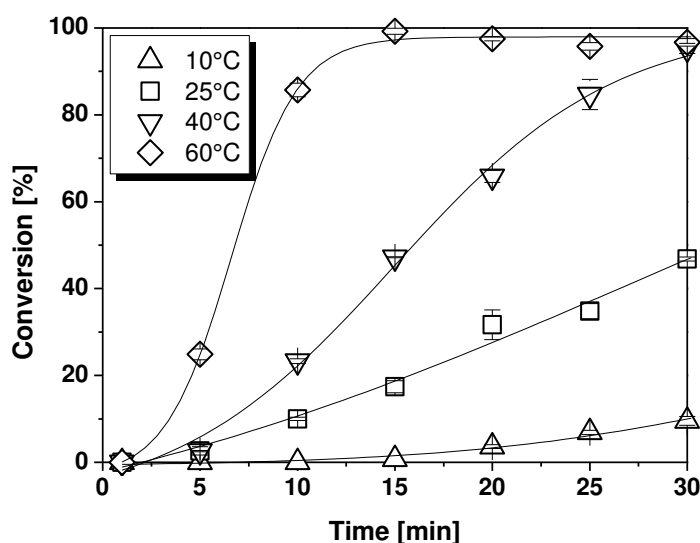


Figure 3. Effect of reaction temperature at the ECS-PLE06-catalyzed conversion of dimethyl cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate; *Conditions:* 50 mM phosphate buffer pH 7.5, 10 mM substrate; 4 U/mL recombinant PLE (according to the standard activity assay)

At 10 °C only an insufficient reactivity with an unsatisfactory conversion of <10% after 30 min was observed. A temperature increase to 25 °C partially improves the apparent enzyme activity to a conversion of 47%. A further increase of the reaction temperature to 40 °C yields full conversion after 30 min, which includes a fully enantioselective product formation. Enzyme reactivity can be further improved with an increase of reaction temperature to 60 °C. However, such high temperatures are not recommended for applications with higher substrate concentrations and longer reaction times, because the recombinant PLEs are less stable at >50 °C and above.²⁵ Consequently, 40 °C was chosen as the optimal process temperature. Noteworthy, excellent enantiomeric excess (>99.5% e.e.) were found within all investigated reactions, which represent a robust selectivity of the enzyme.

Aside temperature, the pH of the reaction mixture is a relevant parameter and therefore important in terms of productivity and obtained enantiomeric excess. A selection of representative experiments at different pH is shown in Figure 4.

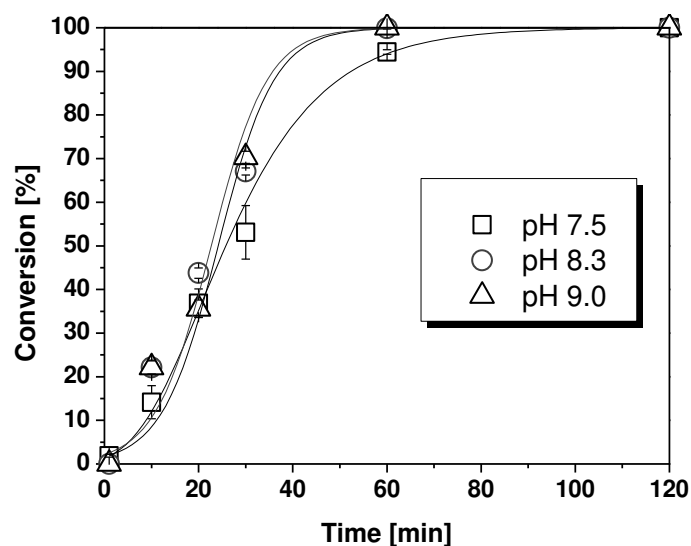


Figure 4. Effect of pH at the ECS-PLE06-catalyzed conversion of dimethyl cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate; *Conditions*: 50 mM phosphate buffer, 23 °C, 10 mM substrate; 4 U/mL enzyme (according to standard activity assay);

It is clearly shown that the process is very robust with respect to pH. No significant differences were found between pH 7.5, 8.3 and 9.0. Full conversion with excellent enantiomeric excess (>99.5% e.e.) were achieved at pH 8.3 and 9.0 after 60 minutes and only a slightly longer reaction time was required at pH 7.5. Similar results with a broad pH optimum between 7.5 and 9.5 were reported by Lange *et al.* with a recombinant pig liver esterase for the hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate.²⁵ Thus a relatively stable pH control at pH 8–9 will be sufficient for a large scale synthesis of **2a**.

2.3 Scale-up

Based on the initial experiments, the scale of the reaction was gradually increased to facilitate the desymmetrization of **1** at higher substrate concentrations. Unfortunately, such an increase yields the formation of a stoichiometric amount of **2a**, which is an acid and lowers the pH in the aqueous solution. Thus an efficient pH-adjustment-technique is essential to maintain optimal reaction conditions for the biocatalyst throughout the reaction, typically by an external addition of a base solution. Table 1, entries 1–4, show exemplarily the results *via* external pH controller (pH-stat titration using NaOH solution). Reaction volumes from 20 to 630 mL with substrate concentration of 80–100 mM were tested and high conversions with excellent enantioselectivities were obtained. Experiments at smaller scale (20–40 mL) demonstrated clearly that the reaction allows full conversion after 3.9 hours at 25 °C, which can be further decreased to 2.3 hours at 40 °C, representing a maximum space-time yield of 5.5 g/(L·h). Unfortunately the application of larger volumes (0.63 L) requires also larger amounts of NaOH for pH adjustment, which may result in a decrease of enzyme stability due to local high pH-hot spots. For example only 91% conversion was obtained at 630 mL-scale, even with a prolonged reaction time of 8 h. Apparently an insufficient mixing of the reaction solution with the aqueous base for pH-adjustment at larger scale causes strong fluctuation of pH and thus local enzyme denaturation with a loss of enzyme activity. An adjustment of the reactor geometry and base dosing may minimize this problem, but will require further investigations and still needs higher and therefore uneconomic enzyme loadings to overcome these limitations. The fluctuation of pH, especially at the early stage of the reaction, is exemplarily shown in Figure 5.

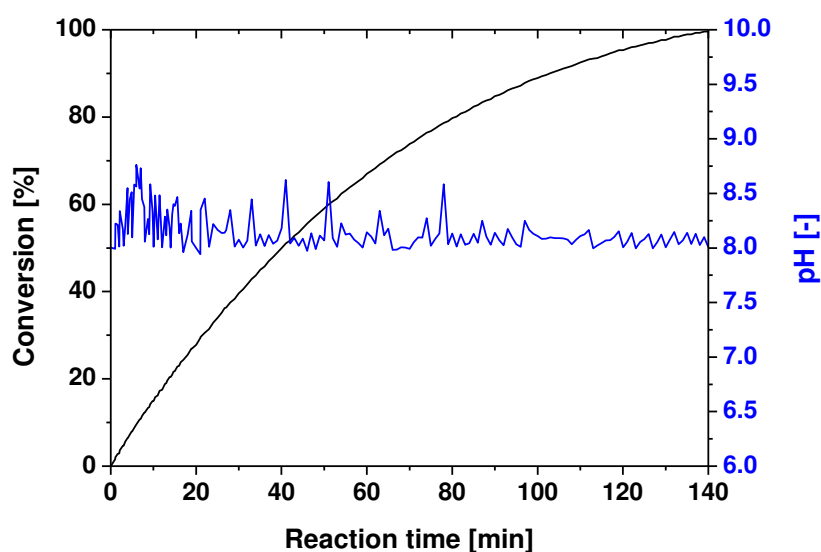


Figure 5. A pH dependent addition of a base solution causes fluctuations of the pH, depending on the reactor geometry, especially during the beginning of the reaction; *Conditions:* total volume: 0.04 L, 80 mM substrate, 40 °C, pH control with 0.5 M NaOH solution, pH measurement near the burette; conversion was calculated from NaOH consumption.

As an alternative other techniques for internal pH control were evaluated, to overcome the limitations based on pH-fluctuation. High concentration buffers were excluded since very high buffer concentrations would be required, which is impractical due to costs and limited salt solubility. Fortunately, weak bases such as CaCO_3 or NaHCO_3 were found to be compatible with the enzymatic reaction. The highest potential showed sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3), which exhibits a sufficient solubility in aqueous systems and maintains an optimal pH slightly above 8.³⁸ Formed monoester **2a**, a monocarboxylic acid, is rapidly neutralized by sodium hydrogen carbonate. The formation of gaseous carbon dioxide (CO_2) can be visualized with a bubble counter and represents also a rudimental reaction control. With this technique optimal reaction conditions are easily maintained without any further addition of secondary reactants (base solution). As shown in Table 1, entries 5–8, higher substrate concentrations of up to 200 mM were successfully applied and allowed full conversion at even shorter reactions times in comparison to the classical

technique. A maximum space-time yield of 30.7 g/(L·h) was found, which is a 5.6-fold increase over the best example with a classical pH-adjustment *via* addition of a base solution.

Table 1. Desymmetrization of dimethyl cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate at larger scale with pH-adjustment by an external base solution or the acid scavenger NaHCO₃.

pH-stat								
Entry	T [°C]	V [L]	Substrate [mM]	Reaction time [h]	Activity ^a [U/mL]	Conversion [%]	STY [g/(L·h)]	Isolated yield [%]
1	25	0.02	100	10.0	3.8	>99	1.8	-
2	25	0.02	100	3.9	5.7	>99	4.7	83
3	40	0.04	80	2.3	3.0	>99	6.4	83
4	40	0.63	80	8.0	4.8	91	1.8	75
NaHCO₃								
5	25	0.04	80	6.5	3.0	>99	2.3	-
6	40	0.04	80	1.2	6.1	>99	12.3	91
7	40	0.04	200	1.2	15.2	>99	30.7	74
8	40	8.80	200	4.0	5.5	>99	9.2	82

^a Used volumetric enzyme activity; calculated from specific activity [U/mg] according to standard activity assay and enzyme amount [mg] per volume [mL].

A preparative synthesis at larger scale was performed at 350 g substrate scale (1.77 mol) with the prior defined optimal reaction conditions, but with a slightly more economic enzyme usage (entry 8). The required pH control was herein facilitated with the presented simplified NaHCO₃-protocol and allowed full conversion of **1** to **2a** after approximately 240 minutes (Figure 6).

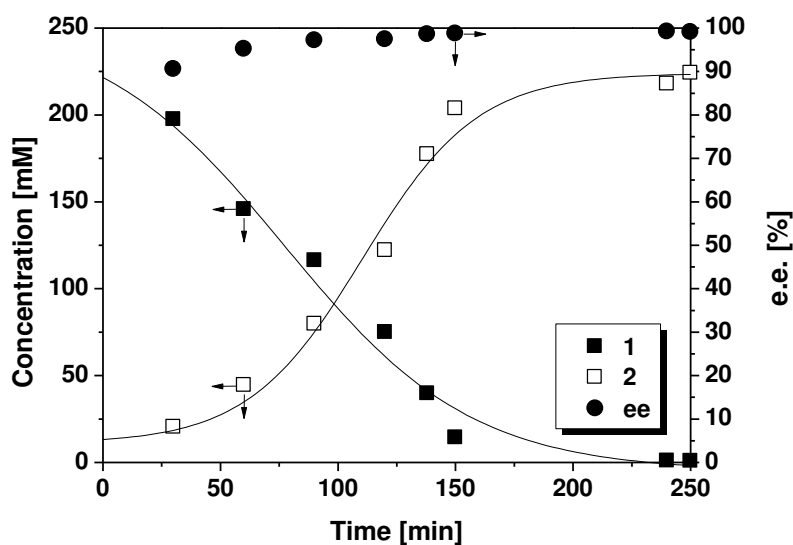


Figure 6. Scaled up desymmetrization of dimethyl cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate; **left:** temperature controlled bioreactor with a total capacity of 10 L; **right:** time course of concentration of reagent **1** (■), concentration of product **2** (□) and ee (●) as determined by GC analysis; *Conditions:* 200 mM substrate, 5.5 U/mL ECS-PLE06, total volume: 8.8 L, stirrer speed: 300 rpm, 40°C, pH control *via* acid scavenger NaHCO₃.

Interestingly, initially produced **2a** was obtained with lower enantiomeric excess and slowly reached an excellent enantiomeric excess of >99.5% e.e. when full conversion was achieved. The initial presence of small amounts of racemic product **2**, from a non-enzymatic hydrolysis prior the enzymatic reaction experiment, reduces the initial enantiomeric excess to ~91% (30 min). With the continuous progression of the fully enantioselective biocatalytic reaction the enantiomeric excess slowly increased to >99.5 e.e..

The pH remained stable slightly above 8 throughout the whole experiment. Formed CO₂ from the acid-induced decomposition of NaHCO₃ was captured and visualized with a gas bubble counter. After the full conversion was achieved, the reaction was stopped with an excess of hydrochloric acid and subjected to work-up. In total 265 g (82% yield) of enantiopure (1*S*,2*R*)-monoester **2a** was obtained, which corresponds to a space time yield of 9.1 g/(L·h).

3. CONCLUSION

A novel and efficient process for the recombinant pig liver esterase-catalyzed desymmetrization of **1** to (1*S*,2*R*)-1-(methoxycarbonyl)cyclohex-4-ene-1-carboxylic acid **2a** was presented. For this purpose six commercially available recombinant isoenzymes of pig liver esterase were investigated within this study and the most potent isoenzyme ECS-PLE06 chosen. Optimal reaction conditions were determined and eventually transferred for scale-up enabling very high space-time yield. A simplified pH control, applying NaHCO₃ as an acid scavenger, was used, which stabilizes the pH at slightly above 8 and requires no further equipment for dosing of a base. A large scale synthesis yielded 265 grams of enantiopure (1*S*,2*R*)-1-(methoxycarbonyl)cyclohex-4-ene-1-carboxylic acid **2a**. Further optimization may include even higher substrate concentrations or enhanced enzyme formulation. In addition, the presented pH regulation concept with sodium hydrogen carbonate NaHCO₃ can be easily transferred to similar processes.

As shown in this study, recombinant pig liver isoenzymes can be easily used at larger scales with high substrate concentrations. The enhanced enantiomeric excess of the target substance **2a** shows a significant advantage over the use of classical preparations of pig liver esterases from mammalian sources.

4. EXPERIMENTAL SECTION

General

All chemicals and solvents were purchased from Alfa Aesar (Ward Hill, USA), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) and Carl Roth GmbH & Co KG. (Karlsruhe, Germany) and used as received. Deionized water was used throughout this study.

Synthesis of dimethyl cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate 1

A 4 L round-bottom flask was charged with 500 g (2.9 mol) of *cis*-cyclohex-4-ene-1,2-dicarboxylic acid, 2.4 L methanol, a magnetic stir bar and a reflux condenser. Subsequently 125 mL concentrated sulphuric acid (98%) were added dropwise to the stirred suspension. The reaction mixture was heated to reflux and stirred for 48 hours. The resulting solution was partially evaporated under reduced pressure to volume of 1 L. The concentrate was extracted three times with 1 L MTBE. The combined organic layers were washed with deionized water, neutralized with a concentrated aqueous sodium hydrogen carbonate solution and washed again with deionized water. The ether was removed under reduced pressure to give 495 g (yield 85%) of the clear oil **1**. Details are given in the Supporting Information.

Enzymes

Recombinant pig liver esterases, ECS-PLE01 to ECS-PLE06, are commercially available (as lyophilizate) from Enzymicals AG (Greifswald, Germany) and the esterase from porcine liver (mixture of isoenzymes as crude protein powder) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Standard activity assay

The activity of PLEs was determined using *p*-nitrophenyl acetate (*p*NPA, 10 mM dissolved in DMSO) with spectrophotometric quantification of the *p*-nitrophenolate release over 100 s at 401 nm ($\epsilon_{30^\circ\text{C}} = 17\,759 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$) containing 850 μL phosphate buffer (pH 7.5, 50 mM), 50 μL enzyme solution and 100 μL 30 mM *p*-nitrophenyl acetate in DMSO. One unit (U) of esterase activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of *p*-nitrophenolate per minute under standard assay conditions. In order to detect changes in absorbance we used a UV/Vis-spectrometer (Specord 50[®], Analytic Jena AG, Jena and Helios Alpha UV/Vis-spectrophotometer, Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Germany) equipped with a reference cell including equal solutions without enzyme. Data are reported as the mean \pm standard deviation of triplicate measurements.

Isoenzyme screening

Enzyme activity screening was executed with a TitroLine 7000 from SI-analytics (Mainz, Germany) in pH-Stat mode. 100 mg ECS-PLE01-06 (lyophilized) was suspended in 15 mL 5 mM sodium phosphate buffer pH 8.0 at 40 °C. The reaction was started by adding 45 mg (0.2 mmol) of diester **1**. The activity of the enzyme was calculated based on the consumption of 50 mM sodium hydroxide solution. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 μ mol dimethyl cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate **1** per minute under the mentioned assay conditions.

Small scale desymmetrization experiments were carried out in 5 mL glass vials with 10 mg of the respective isoenzyme in 4 mL of a buffered solution (0.1 M phosphate buffer, pH 7–8) with 10 mM diester **1**. The enzymatic hydrolysis was conducted at 10 °C, room temperature and 40 °C. Samples (100 μ L) were taken in intervals, acidified with 5 μ l 6 M HCl (pH 2) and extracted with EtOAc (200 μ L). Conversion and enantiomeric excess of the enzymatic reactions were obtained from analysis with gas chromatography (see below).

Small-scale biocatalysis with ECS-PLE06 (pH-stat)

A 100 mL round-bottom flask was charged with 40 mL deionized water, ECS-PLE06 and a magnetic stir bar. The suspension was set to 40 °C and pre-titrated to pH 8. The reaction was started by adding 0.6 g (3.2 mmol) of **1** to the reaction mixture containing 50 mM sodium phosphate buffer pH 8.0. The solution was kept constant at pH 8 by addition of 0.5 M sodium hydroxide solution *via* an autoburette. After the addition of the required NaOH solution, the reaction was stopped by addition of concentrated hydrochloric acid (adjusted to pH 1–2). The precipitated protein was spun down and the aqueous layer extracted three times with 40 mL ethyl acetate. The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated under reduced

pressure to give 0.56 g of **2** as yellowish oil (95% yield). After crystallization the product was isolated as 0.49 g white crystals with 83% yield and excellent enantiomeric excess (>99.5% e.e.).

Small-scale biocatalysis with ECS-PLE06 (sodium hydrogen carbonate)

A 100 mL round-bottom flask with an integrated CO₂-bubble counter was charged with 40 mL saturated sodium hydrogen carbonate solution, ECS-PLE06 and a magnetic stirrer. The reaction was started by adding 0.6 g (3.2 mmol) of **1** to the reaction mixture and stirred at 40 °C temperature. The process was monitored by TLC and monitored by a bubble counter. After 70 min (TLC-analysis indicated full conversion) the reaction was stopped by adding concentrated hydrochloric acid to pH 1–2, precipitated protein was removed by centrifugation and the resulting aqueous layer was extracted three times with 40 mL MTBE. The combined organic phases were dried over anhydrous MgSO₄ and evaporated under reduced pressure to give 0.53 g crystalline product (91% yield, >99.5% e.e.).

Large-scale biocatalysis with ECS-PLE06 (sodium hydrogen carbonate)

A stirred-tank reactor (STR) was charged with 8.5 L deionized water, 500 g sodium hydrogen carbonate and ECS-PLE06. The suspension was heated to 40 °C and the reaction was started by adding 350 g (1.77 mol) of **1** to the stirring solution. The pH was kept constant at 8 during the whole process. After 4 hours the reaction-mixture was heated to 95 °C to denature the protein. Afterwards the suspension was acidified with concentrated hydrochloric acid to pH 1. The precipitated protein was spun down and the aqueous layer extracted three times with 8.8 L MTBE (Cryofuge 8500i, Thermo Scientific, Schwerte, Germany). The combined organic phases were dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure to give 265 g crystalline monoester **2** (82% yield, >99.5% e.e.); m.p. 65 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} +12.5^{\circ}$ (*c* 1.0, methanol). Analytical details are given in the Supporting Information.

Analytical methods

Conversion and the corresponding enantiomeric excess of **2** were quantified by GC-FID using a CP3800 equipped with an autosampler CP8400 (all formerly Varian, now Agilent, Santa Barbara, USA) and a Chrompack Chiralsil Dex-CB column (25x0.25x0.25 μm). The injector temperature was set to 220 $^{\circ}\text{C}$, the detector temperature to 250 $^{\circ}\text{C}$. Temperature gradient: 130 $^{\circ}\text{C}$ for 12 min, rise with 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 170 $^{\circ}\text{C}$ and hold for 20 min. Retention times: 23.9 min (1*R*,2*S*)-1-(methoxycarbonyl)cyclohex-4-ene-1-carboxylic acid **2b** and 24.8 min (1*S*,2*R*)-1-(methoxycarbonyl)cyclohex-4-ene-1-carboxylic acid **2a**. The reactions were monitored by TLC, if required (cyclohexane/2-propanol, 95:5; Rf diester **1**: 0.6, monoester **2**: 0.3, diacid: 0.2). Plates were stained with KMnO_4 -solution (3 g KMnO_4 , 20 g K_2CO_3 , 5 mL 5% NaOH, 300 mL H_2O). Melting points were determined using a Mettler Toledo FP 90/82 HT with a Leitz microscope and are uncorrected. High sensitive differential scanning calorimetry (DSC, Mettler Toledo DSC 823e) was used for determination of oxidation stability and melting behavior of the crystals. Optical rotations for solutions in a 1 dm cell were obtained with an automatic polarimeter (Polar L- μP , IBZ).

NMR analysis

^1H NMR and ^{13}C NMR-spectra were recorded with a Bruker AVANCE (250 II) in CDCl_3 or DMSO-d_6 . Chemical shifts are reported in parts per million relative to the solvent peak or TMS as an internal reference. Splitting patterns are indicated as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; m, multiplet.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail Rainer Wardenga (Enzymicals AG): rainer.wardenga@enzymicals.com and Udo Kragl (University of Rostock): udo.kragl@uni-rostock.de

¹ Enzymicals AG, Walther-Rathenau-Str. 49a, 17489 Greifswald, Germany

³ University of Rostock, Institute of Chemistry, Albert-Einstein-Str. 3a, 18059 Rostock, Germany

Acknowledgments

We thank Dr. Ulf Menyes (Enzymicals AG) for useful discussions and Sebastian Heim for his help in the experimental work.

Funding Sources

Financial support is gratefully acknowledged by the Central Innovation Program SME (Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand – ZIM) by the Federal Ministry for Economic Affairs and Energy (Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie - BMWi), grant number: KF2622302AJ2.

Abbreviations

TLC, thin layer chromatography; (–)-FTC, (–)-2',3'-dideoxy-5-fluoro-3'-thiacytidine; DC-SIGN, dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin; MRSA - methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

REFERENCES

- (1) Caner, H.; Groner, E.; Levy, L.; Agranat, I. *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 105-110.
- (2) Breuer, M.; Ditrich, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Keßeler, M.; Stürmer, R.; Zelinski, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 788-824.
- (3) Wohlgemuth, R. *Curr. Opin. Microbiol.* **2010**, *13*, 283-292.
- (4) Wohlgemuth, R. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 713-724.
- (5) Koeller, K. M.; Wong, C. H. *Nature* **2001**, *409*, 232-240.
- (6) Munoz Solano, D.; Hoyos, P.; Hernaiz, M. J.; Alcantara, A. R.; Sanchez-Montero, J. M. *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 196-207.
- (7) Liu, Z.; Weis, R.; Glieder, A. *Food Technol. Biotechnol.* **2004**, *42*, 237-249.
- (8) Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K. *Nature* **2012**, *484*, 185-194.

- (9) Schoemaker, H. E.; Mink, D.; Wubbolts, M. G. *Science* **2003**, *299*, 1694-1697.
- (10) Patel, R. N. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2006**, *9*, 741-764.
- (11) Patel, R. N. *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1056-1074.
- (12) de Maria, P. D.; Garcia-Burgos, C. A.; Bargeman, G.; van Gemert, R. W. *Synthesis* **2007**, 1439-1452.
- (13) Gais, H.-J.; Lukas, K. L.; Ball, W. A.; Braun, S.; Lindner, H. J. *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 687-716.
- (14) Tao, J.; Kazlauskas, R. *Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development*; John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey, 2011.
- (15) Boland, W.; Niedermeyer, U.; Jaenicke, L.; Goerisch, H. *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 2062-73.
- (16) Andreini, M.; Doknic, D.; Sutkeviciute, I.; Reina, J. J.; Duan, J.; Chabrol, E.; Thepaut, M.; Moroni, E.; Doro, F.; Belvisi, L.; Weiser, J.; Rojo, J.; Fieschi, F.; Bernardi, A. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5778-5786.
- (17) Compton, T.; Gellmann, S. H.; English, E. P.; Chumanov, R. S. WO2006/099170A2, 2006.
- (18) Yun, S. Y.; Zheng, J. C.; Lee, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 6201-6203.
- (19) Brüsehabe, E.; Böttcher, D.; Bornscheuer, U. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7878-7883.
- (20) Brüsehabe, E.; Böttcher, D.; Musidlowska-Persson, A.; Albrecht, D.; Hecker, M.; Doderer, K.; Bornscheuer, U. T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 853-859.
- (21) Hasenpusch, D.; Bornscheuer, U. T.; Langel, W. *J. Mol. Model.* **2011**, *17*, 1493-1506.
- (22) Hummel, A.; Brüsehabe, E.; Böttcher, D.; Trauthwein, H.; Doderer, K.; Bornscheuer, U. T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 8492-8494.
- (23) Lam, L. K. P.; Brown, C. M.; De Jeso, B.; Lym, L.; Toone, E. J.; Jones, J. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4409-4411.
- (24) Wells, A. S.; Finch, G. L.; Michels, P. C.; Wong, J. W. *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 1986-1993.

- (25) Lange, S.; Musidłowska, A.; Schmidt-Dannert, C.; Schmitt, J.; Bornscheuer, U. T. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 576-582.
- (26) Hermann, M.; Kietzmann, M. U.; Ivancic, M.; Zenzmaier, C.; Luiten, R. G. M.; Skranc, W.; Wubbolts, M.; Winkler, M.; Birner-Gruenberger, R.; Pichler, H.; Schwab, H. *J. Biotechnol.* **2008**, *133*, 301-310.
- (27) Böttcher, D.; Brüsehauer, E.; Doderer, K.; Bornscheuer, U. T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *73*, 1282-1289.
- (28) Musidłowska-Persson, A.; Bornscheuer, U. T. *Protein Eng.* **2003**, *16*, 1139-1145.
- (29) Goswami, A.; Kissick, T. P. *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13*, 483-488.
- (30) Sousa, H. A.; Afonso, C. A. M.; Crespo, J. G. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2000**, *75*, 707-714.
- (31) Sousa, H. A.; Afonso, C. A. M.; Mota, J. P. B.; Crespo, J. G. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2003**, *42*, 5516-5525.
- (32) Sousa, H. A.; Afonso, C. A. M.; Mota, J. P. B.; Crespo, J. G. *Chem. Eng. Res. Des.* **2005**, *83*, 285-294.
- (33) Sousa, H. A.; Crespo, J. G.; Afonso, C. A. M. *Tetrahedron Asymmetr.* **2000**, *11*, 929-934.
- (34) Sousa, H. A.; Crespo, J. P. S. G. In *Progress in Biotechnology*; Elsevier: 1998; Vol. 15, p 673-678.
- (35) Hamilton, G. S.; Scios Nova Inc. : US WO9210099A1, 1992.
- (36) Kobayashi, S.; Kamiyama, K.; Ohno, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 350-354.
- (37) Smith, M. E.; Banerjee, S.; Shi, Y.; Schmidt, M.; Bornscheuer, U. T.; Masterson, D. S. *ChemCatChem* **2012**, *4*, 472-475.
- (38) Berger, B.; Rabiller, C. G.; Königsberger, K.; Faber, K.; Griengl, H. *Tetrahedron Asymm.* **1990**, *1*, 541-546.

Supporting information

Scale-up of a Recombinant Pig Liver Esterase-catalyzed Desymmetrization of Dimethyl Cyclohex-4-ene-cis-1,2-dicarboxylate

Philipp Süß, Sabine Illner, Jan von Langermann, Sonja Borchert, Uwe T. Bornscheuer, Rainer Wardenga, and Udo Kragl**

* **E-mail:** Rainer Wardenga (Enzymicals AG): rainer.wardenga@enzymicals.com

and Udo Kragl (University of Rostock): udo.kragl@uni-rostock.de

Figure SI-1.	Identification of the absolute configuration of (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-1-Methyl cis-1,2,3,6-tetrahydrophthalate by GC-FID.	Page 2
Figure SI-2.	Results of the GC-calibration for 1 and 2a .	Page 3
Figure SI-3	Comparison of substrate 1 . pink: synthesized and red: commercial standard from SigmaAldrich.	Page 3
Figure SI-4	DSC-result of (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-monoester.	Page 4
Figure SI-5	¹ H-NMR of (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-monoester 2a . According to literature data a chemical pure product was obtained. ^[1]	Page 5
Figure SI-6	¹³ C-NMR of (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)-monoester 2a . According to literature data a chemical pure product was obtained. ^[1]	Page 6
Figure SI-7	¹ H-NMR of dimethyl cyclohex-4-ene-cis-1,2-dicarboxylate 1 .	Page 7
Figure SI-8	¹³ C-NMR of dimethyl cyclohex-4-ene-cis-1,2-dicarboxylate 1 .	Page 8

GC/FID data

The chromatographic analysis of racemic monomethylester **2** shows two peaks representing the two absolute configurations (1*R*,2*S*)-monester **2b** and (1*S*,2*R*)-monoester **2a** at the respective retention times of 23.9 and 24.8 min (Figure SI-1 (A)). Based on the measurement with a reference sample (C) the absolute configurations were confirmed. Within this study synthesized (1*S*,2*R*)-monoester **2a** is shown in Figure SI-1 (B).

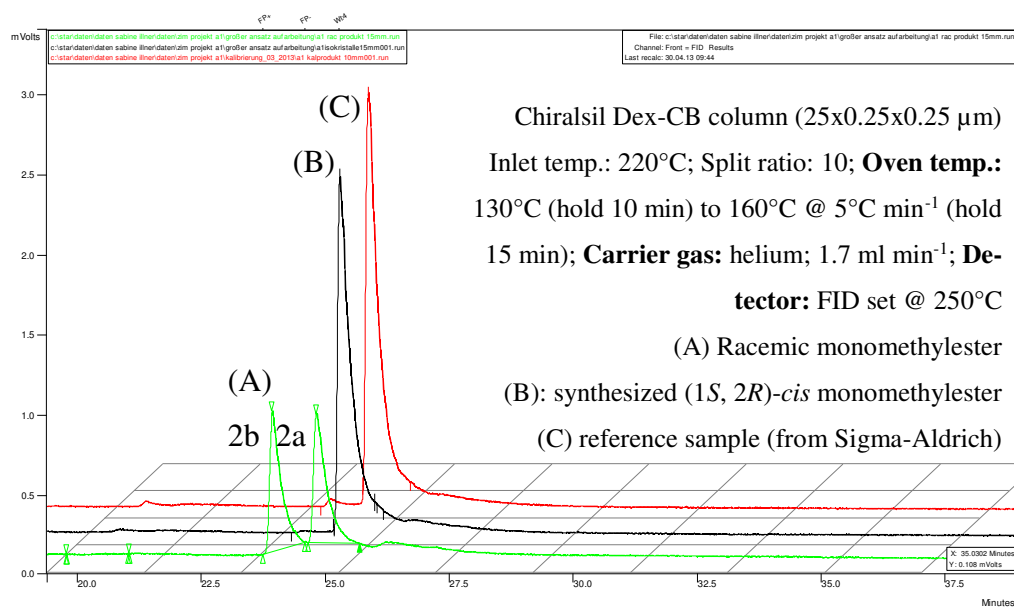


Figure SI-1. Identification of the absolute configuration of (1*S*,2*R*)-1-Methyl *cis*-1,2,3,6-tetrahydrophthalate by GC-FID.

The developed GC-method provided a high resolution of the enantiomeric compounds **2a**, **2b** (see Figure SI-2) in a calibration range of 1 - 10 mM.

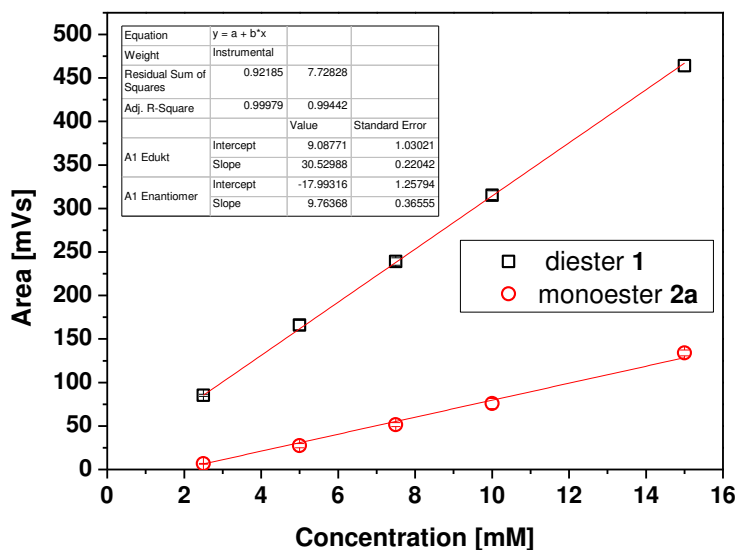


Figure SI-2. Results of the GC-calibration for **1** and **2a**.

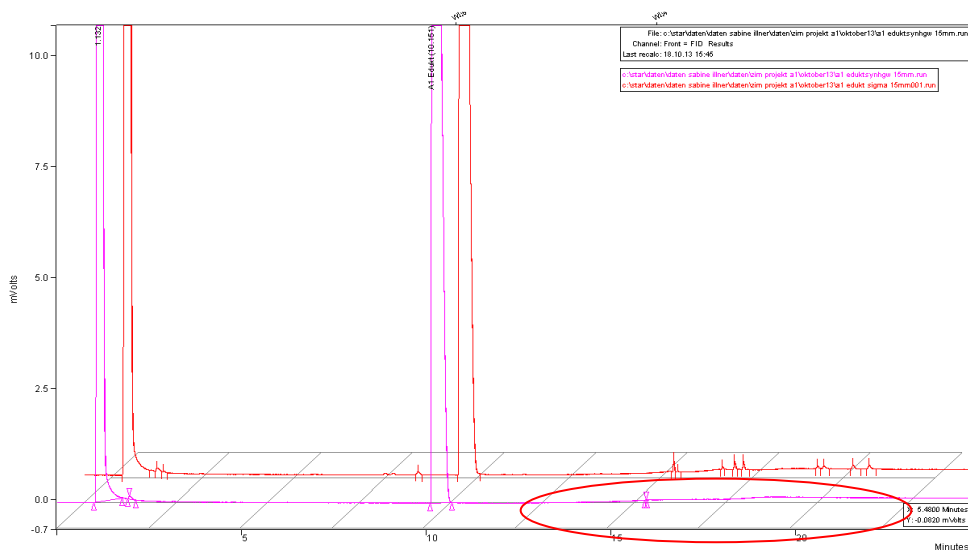


Figure SI-3. Comparison of substrate **1**. **pink**: synthesized and **red**: commercial standard from Sigma. The red circle highlights the fact that fewer impurities were found in the synthesized substance.

A DSC-analysis was performed to investigate the melting behavior of (1*S*,2*R*)-monomethyl ester (Figure SI-4). A melting point of 67.70 °C was found (peak 66.55°C) with a melting enthalpy of 312.47 J·g⁻¹. Decomposition was not found within the investigated temperature range.

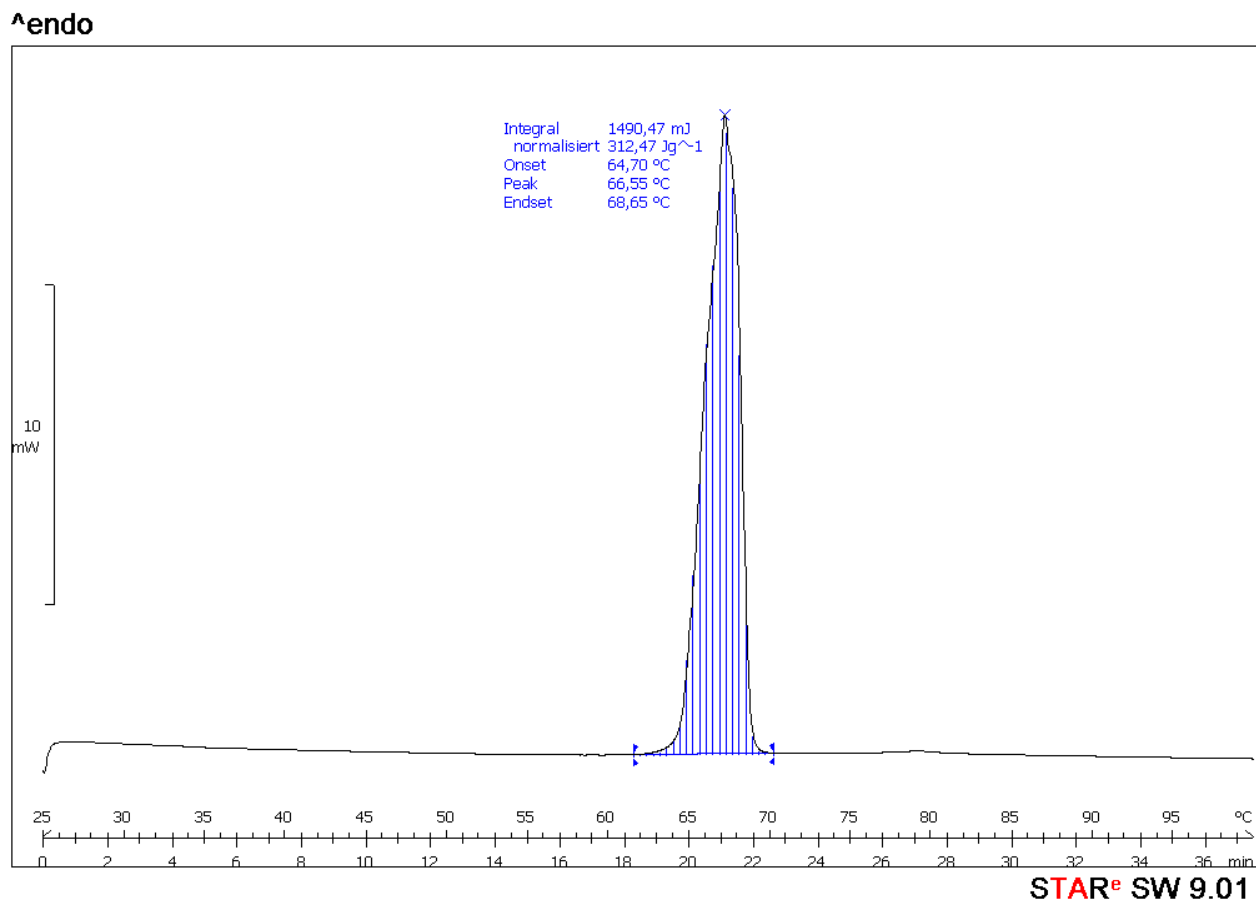


Figure SI-4. DSC-result of (1*S*,2*R*)-monomethyl ester.; m.p. 64.7°C.

NMR data

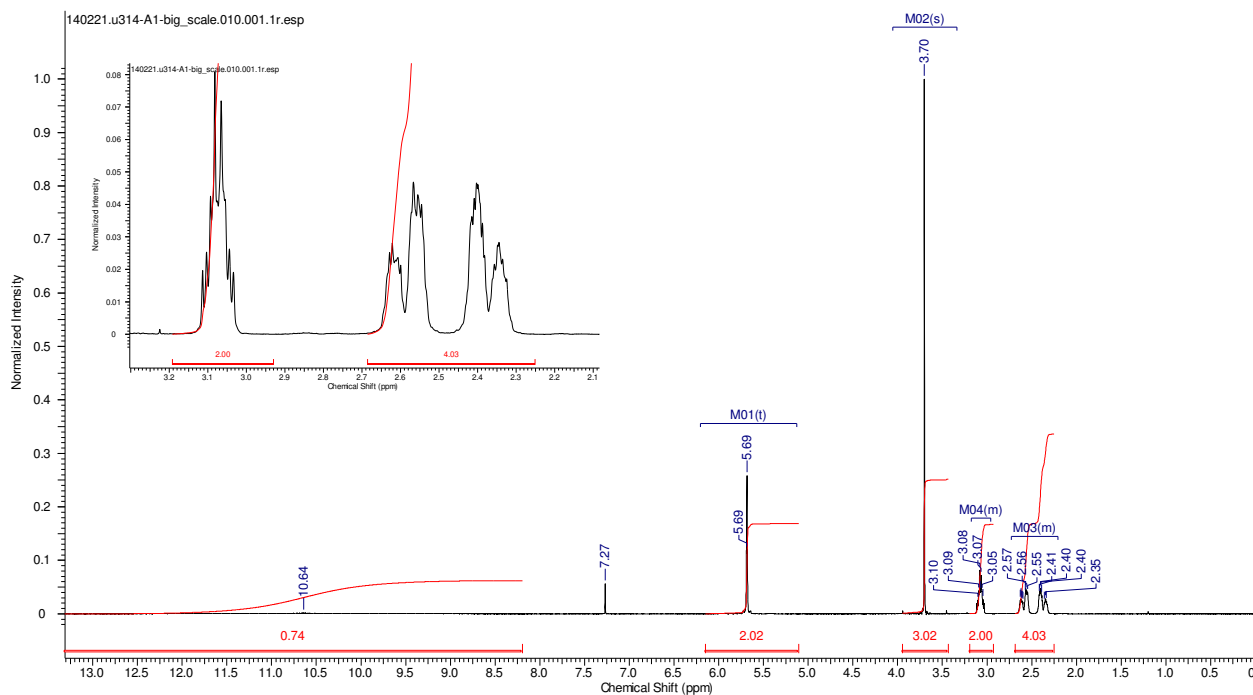


Figure SI-5. ¹H-NMR of (1*S*,2*R*)-monoester **2a**. According to literature data a pure product was obtained.^[1]

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 10.64 (br s, 1H), 5.69 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.07 (m, 2H), 2.63-2.55 (m, 2H), 2.42-2.34 (m, 2H).

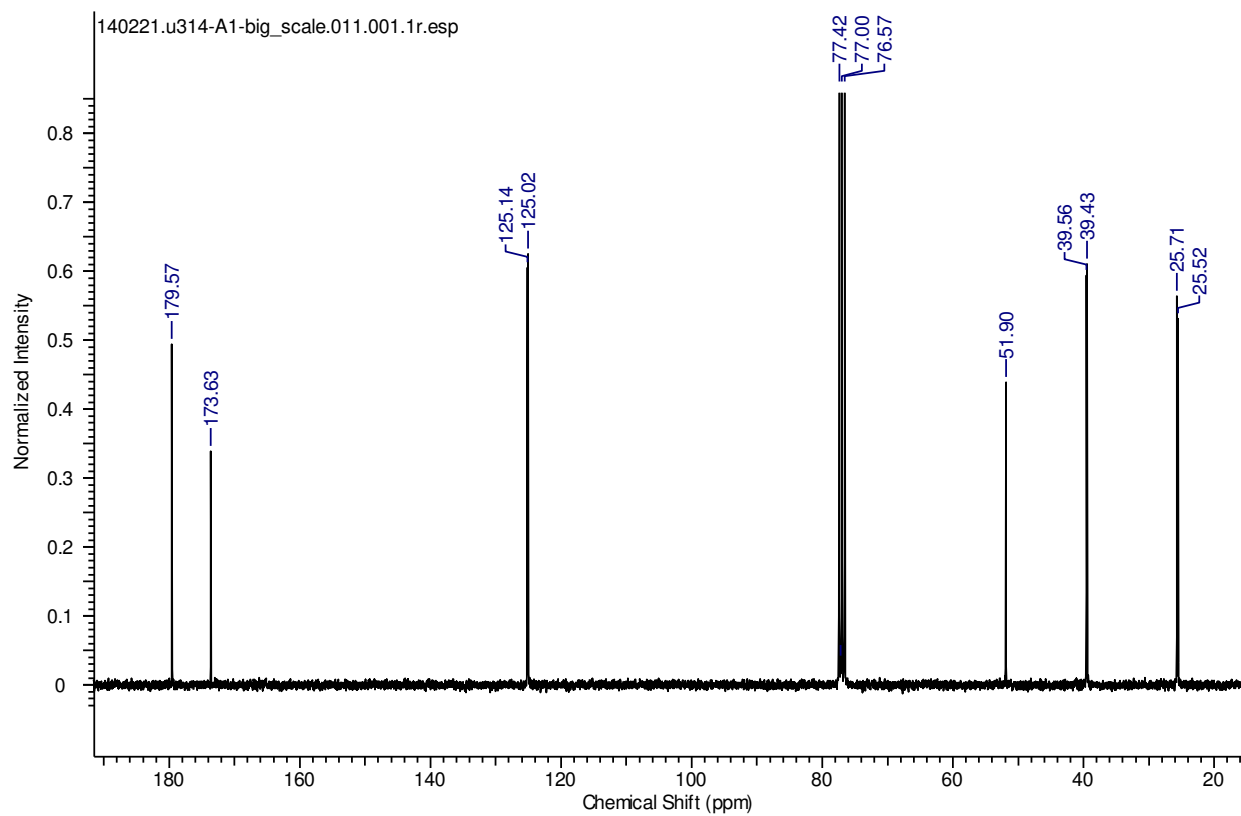


Figure SI-6. ¹³C-NMR of target (1*S*,2*R*)-monoester **2a**. According to literature data an enantiopure product was obtained.^[1]

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 179.6 (C), 173.6 (C), 125.1 (CH), 125.0 (CH), 51.9 (CH₃), 39.6 (CH), 39.4 (CH), 25.7 (CH₂), 25.5 (CH₂).

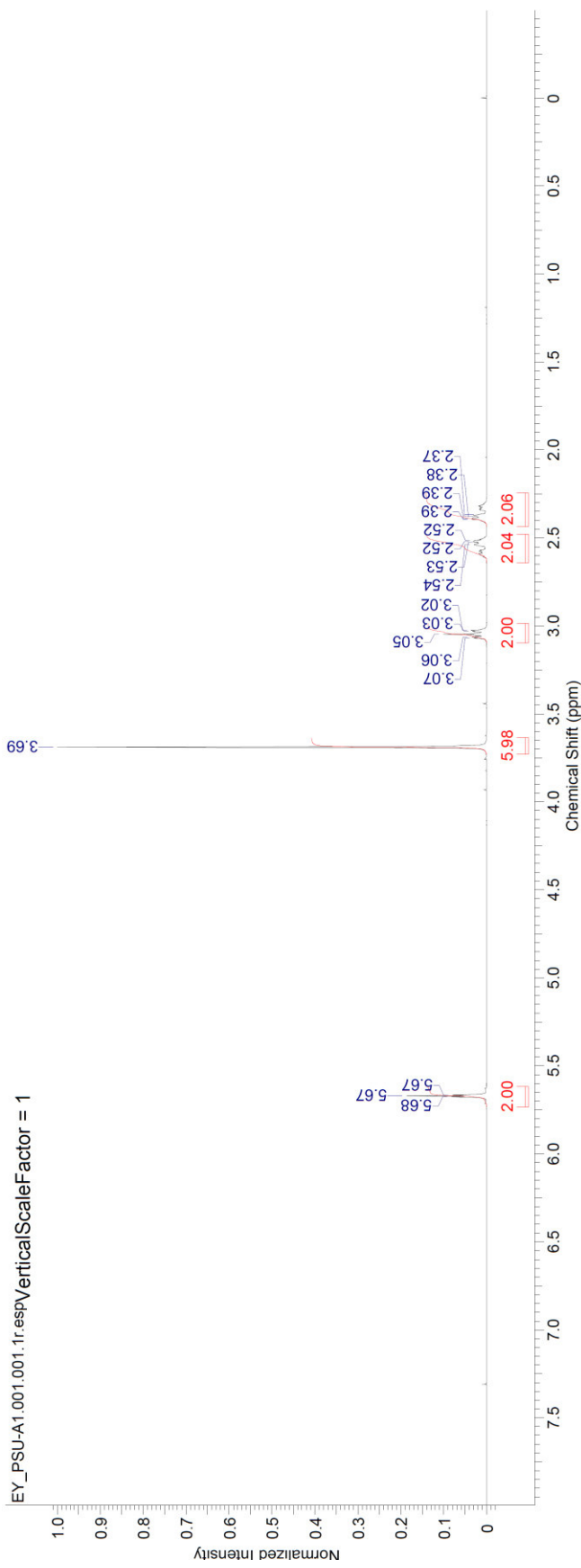


Figure SI-7. $^1\text{H-NMR}$ of dimethyl cyclohex-4-ene-cis-1,2-dicarboxylate **1**.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 5.67 (t, $J = 1.51$ Hz, 2H), 3.69 (s, 6H), 3.02-3.07 (m, 2H), 2.51-2.61 (m, 2H), 2.32-2.41 (m, 2H).

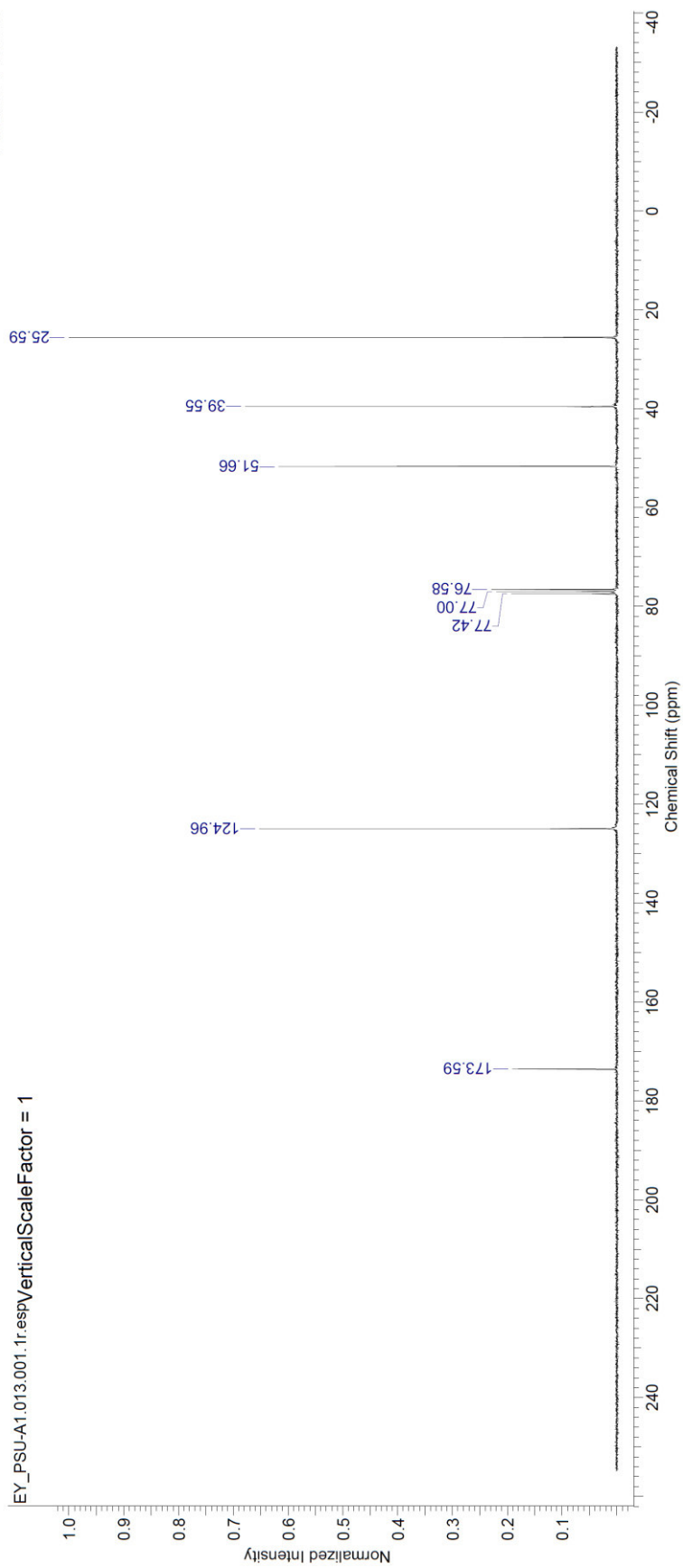


Figure SI-8. ^{13}C -NMR of dimethyl cyclohex-4-ene-cis-1,2-dicarboxylate **1**.

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 173.6, 125.0, 51.7, 39.6, 25.6.

[1] Gellman, Samuel H.; Hayen, Ahlke; Schmitt, Margaret A.; Ngassa, Felix N.; US2004/116654; (2004).

Artikel 2

Chemoenzymatic sequential multistep one-pot reaction for the synthesis of (1*S*,2*R*)-1-(methoxycarbonyl)cyclohex-4-ene-2-carboxylic acid with recombinant pig liver esterase

Philipp Süß^{†§}, Sonja Borchert[†], Janine Hinze[‡], Sabine Illner^{‡#}, Jan von Langermann[‡], Udo Kragl[‡], Uwe T. Bornscheuer^{§} and Rainer Wardenga^{*†}*

[†] Enzymicals AG, Walther-Rathenau-Str. 49a, 17489 Greifswald, Germany

[‡] Institute of Chemistry, University of Rostock, Albert-Einstein-Str. 3a, 18059 Rostock, Germany

[§] Institute of Biochemistry, University of Greifswald, Felix-Hausdorff-Str. 4, 17487 Greifswald, Germany

Corresponding Author

*E-mail: uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de

*E-mail: rainer.wardenga@enzymicals.com

Insert Table of Contents Graphic and Synopsis Here

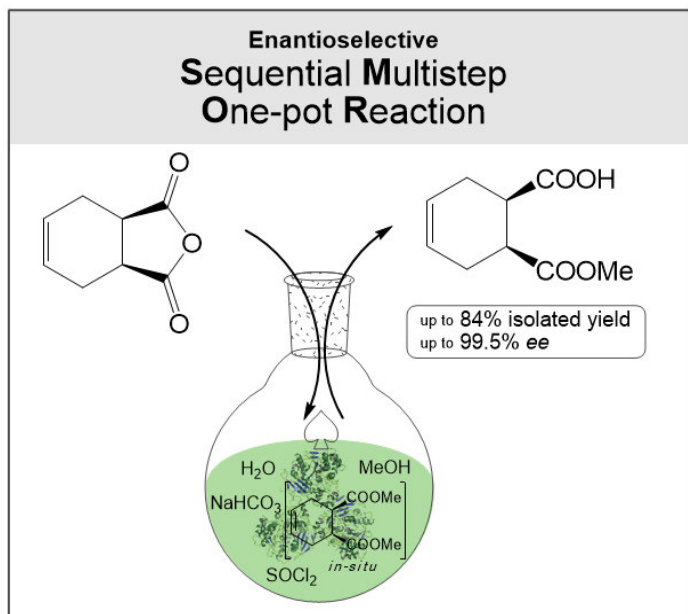


Table of Contents Graphic

ABSTRACT: In this work the development of a chemoenzymatic process for the production of (1*S*,2*R*)-1-(methoxycarbonyl)cyclohex-4-ene-2-carboxylic acid by ECS-PLE06 (recombinant pig liver esterase) is presented. Herein an optimized esterification protocol, starting from the economically favored *meso*-anhydride **1b**, was established and combined with the highly selective ECS-PLE06-catalyzed desymmetrization reaction. Both reactions proceed under mild reaction conditions and the excellent selectivity of ECS-PLE06 results in an enantiomeric excess of $\geq 99.5\%$ *ee*. Furthermore, the presented one-pot synthesis facilitates higher isolated yields of up to 84% in comparison to the classical two step synthesis route (70% isolated yield), which requires more expensive starting materials and two separate work-up steps.

KEYWORDS: Biocatalysis, hydrolysis, enzyme, esterification, desymmetrization.

Introduction

Chiral building blocks with at least one chiral center, especially ones synthesized from readily available starting materials, are gaining importance in pharmaceutical and fine chemical industry.¹ During the last decades, an increasing number of these chiral compounds were produced by different synthetic chiral technologies; while the number of compounds derived from the chiral pool decreased significantly.² This development emphasizes the importance of the extension of the synthesis toolbox to gain more efficient pathways to deliver selected chiral target compounds. Here, biocatalytic options became a powerful component of this synthetic toolbox.^{3,4}

One of the most prominent catalysts in biocatalysis is pig liver esterase (PLE). Until 2015 over 400 compounds could be obtained with excellent enantioselectivities.^{5,6} Pig liver esterase formulations obtained from animal tissue are unfortunately always an undefined mixture of isoenzymes, largely dependent on the diet of the animal.^{7,8} The PLE-isoenzymes differ only slightly in their structure, but show very remarkable differences in their substrate scope and selectivity.⁹ In addition, differences in the isoenzyme ratio may occur between PLE production batches. Consequently the observed enantiomeric excess of a reaction represents only a sum parameter and is not always easily reproducible, which can cause problems in large scale applications. In 2001, the first isoenzyme of PLE was recombinantly produced which demonstrated enhanced selectivity compared to PLE from animal tissue.¹⁰ In the following years, further isoenzymes were functionally expressed in different host organisms and characterized.^{11,12,9} Since then, these commercially available single isoenzymes became easily applicable for organic synthesis applications.^{13,14,15} In comparison to classical preparations of PLE, the use of recombinantly produced PLE leads to a controlled selectivity in the desired reaction, better yields and reproducible optical purity of the product.¹⁶

Moreover, recent advantages in organic synthesis demonstrate that chemoenzymatic one-pot reactions exhibit the opportunity to set up very efficient and resource saving processes. Herein, the combination of organic synthesis and biocatalysis as chemoenzymatic one-pot reactions bears a

huge advantage for novel pathway combinations and hence, products. In this concept, pig liver esterase was already successfully used in an one-pot approach, in which a metathesis reaction was combined with PLE in an aqueous reaction medium.^{17,18} Other successful applications of organic synthesis and other biocatalysts were reported, which demonstrates the huge potential of this reaction mode.^{19,20,21,22}

The recently published biocatalytic process for the desymmetrization of dimethyl cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate **2** demonstrated the remarkable potential of recombinant pig liver esterases (ECS-PLE) as a part of the chiral technologies in organic synthesis.¹⁶ In order to develop an efficient process, the combination of both techniques in a chemoenzymatic process was investigated here with respect to a one-pot reaction including optimized reaction time and resources.

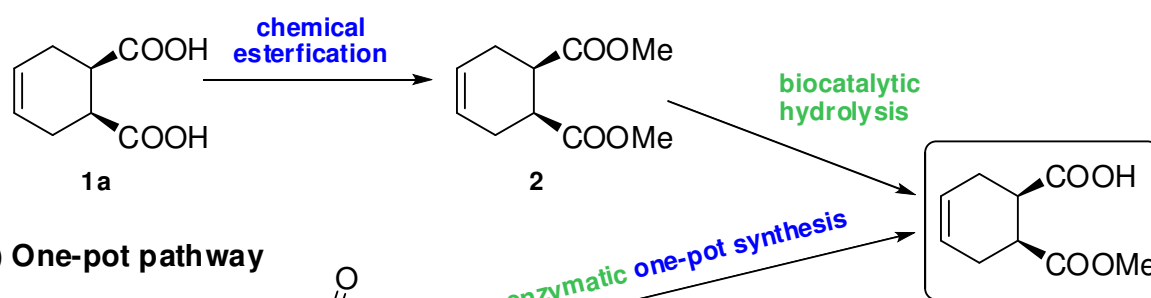
Result and Discussion

Recently the biocatalytic process for the production of (1*S*,2*R*)-1-(methoxycarbonyl)cyclohex-4-ene-2-carboxylic acid **3**, catalyzed by ECS-PLE06, was intensively investigated.¹⁶ This process consists of two separate reaction steps: the chemical synthesis of *meso*-diester **2** from the corresponding diacid **1a**, followed by a ECS-PLE06-catalyzed desymmetrization of **2** (Scheme 1, pathway A). Product **3** was eventually isolated with an excellent enantiomeric excess of $\geq 99.5\%$ and an overall isolated yield of 70%.¹⁶ Although each reaction gives moderate to good yields, further improvement of the overall process starting from the esterification of the starting material **1a** is highly desirable. Thus, in this study several relevant points for a novel one-pot reaction were investigated including the use of appropriate and cheap raw materials, less solvent usage and reduced time consuming work up steps.

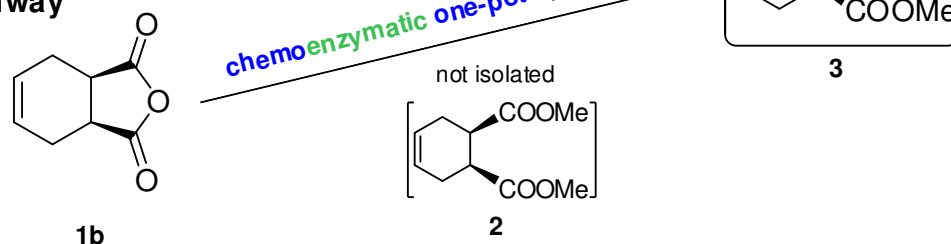
First, *meso*-anhydride **1b** was introduced as an alternative starting material to optimize the process from an economical point of view (Scheme 1, pathway B). Compound **1b** offers herein three main advantages in comparison to the diacid **1a**: cheap, readily available in very large quantities

and an acyclic anhydride moiety, which facilitates an increased reactivity within the esterification.²³ The lower commercial price of **1b** compared to the diacid **1a** belongs to the fact that the starting material for the common synthesis of the diacid is the *meso*-anhydride **1b** and costs for the conversion from the anhydride to the diacid are omitted.

(A) Classical pathway



(B) One-pot pathway



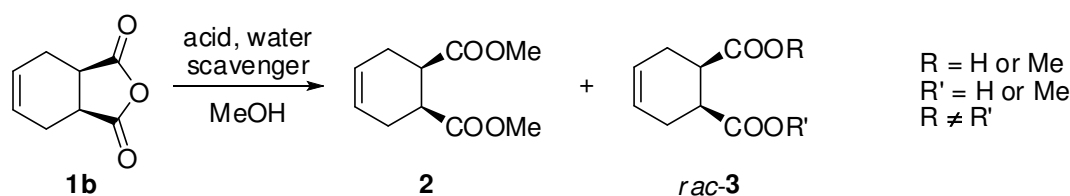
Scheme 1. General reaction scheme of both pathways.

The anhydride **1b** was successfully converted to diester **2** in the presence of methanol and sulfuric acid with an isolated yield of $\geq 80\%$ (Table 1, entry 1). Thus the esterification procedure described for diacid **1a**, could be transferred to the conversion of the cheaper *meso*-anhydride **1b** with similar isolated yields.¹⁶ The overall process was further optimized by using a sequential multistep one-pot reaction to reduce reaction time and additional resource consuming work-up steps. The one-pot reaction starts with the esterification of anhydride **1b** to form *meso*-diester **2**, which is subsequently selectively hydrolyzed by ECS-PLE06 to **3**. In this reaction pathway, each reaction requires a specific set of operational conditions. The esterification proceeds in methanol at a substrate concentration of up to 5 M and is acid-catalyzed. Unfortunately, these conditions are not directly compatible to the final biocatalytic desymmetrization. It requires a water-based reaction medium with neutral to slightly basic conditions. Thus, the reaction conditions were adjusted

prior to the enzyme-catalyzed reaction with the previously reported acid-scavenger sodium hydrogen carbonate as an aqueous solution, which was also found to represent an optimal reaction medium for ECS-PLE06.¹⁶

Unfortunately, initial experiments of the one-pot reaction, starting from the anhydride **1b**, followed by desymmetrization with ECS-PLE06 gave good isolated yields of up to 85% but a surprisingly low enantiomeric excess of product **3** of ca. 89% *ee* (Table 2, Entry 1).

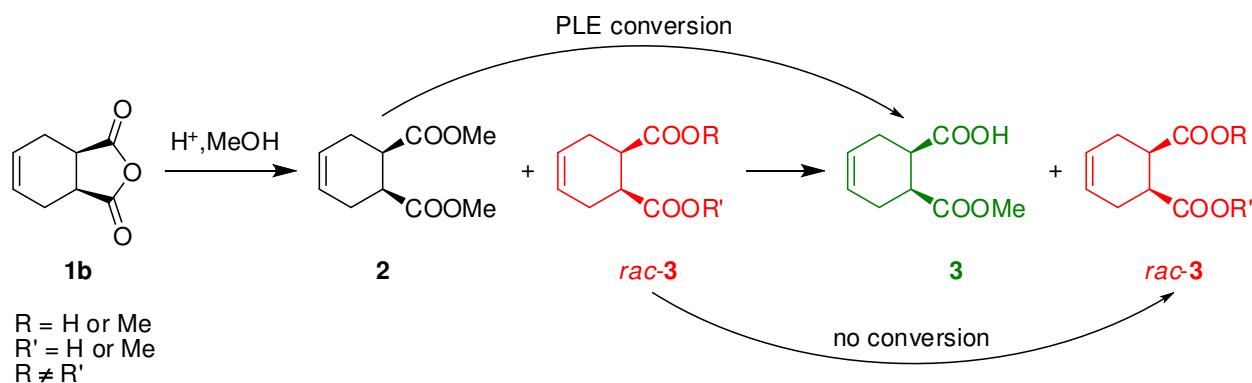
Table 1. Comparison of different water scavengers for the esterification of **1b**



Entry	Water scavenger	Amount of water scavenger	Conversion of 1b ^{a)}	Formation of 2 ^{a)}	Formation of <i>rac-3</i> ^{a)}
1	–	–	> 95%	≤ 90 % ^{b)}	≥ 10%
2	MgSO ₄	170 g/L	> 95%	≤ 90 %	≥ 10%
3	Molecular sieve 3Å	170 g/L	> 95%	≤ 90 %	≥ 10%
4	Silica gel	170 g/L	> 95%	≤ 90 %	≥ 10%
5	Dimethoxypropane	10% (v/v)	> 95%	≤ 90 %	≥ 10%

^{a)} Determined by TLC; ^{b)} ≥80% isolated yield of product **2**

Further investigations revealed that the enantiomeric purity of monoester **3** indirectly decreased by an incomplete conversion of substrate **1b** to diester **2**. Due to residual water, the reaction medium of the acid-catalyzed esterification of **1b** also yields small amounts of racemic monoester *rac-3*, which accumulates in parallel to the highly selective ECS-PLE06-catalyzed conversion of *meso*-diester **2** to (1*S*,2*R*)-monoester **3**.²⁴ Consequently traces of racemic monoester *rac-3* have a negative influence on the optical purity of the final product **3** (see Scheme 2).



Scheme 2. One-pot reaction with racemic impurity *rac-3*, caused by incomplete esterification of anhydride **1b** into diester **2**.

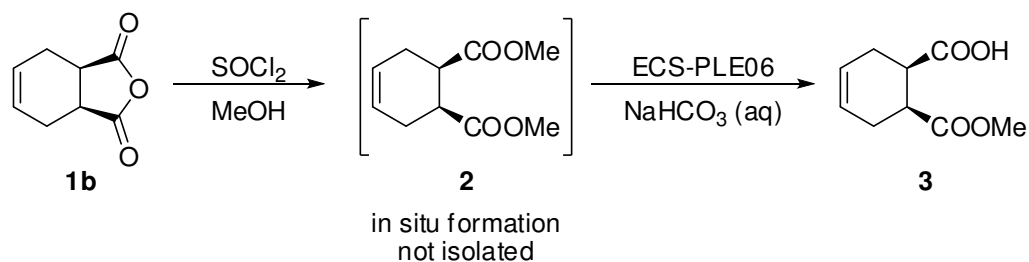
In order to obtain an excellent enantiomeric excess of the product **3** of $\geq 99.5\%$ *ee*, as described before, it is necessary to start the biocatalytic desymmetrization from the diester **2** without impurities (racemic monoester *rac-3*). Thus an improvement of the esterification reaction towards the diester **2** was investigated. First, different strategies to remove the water in order to shift the reaction equilibrium were examined. Hence, the water scavengers MgSO_4 , molecular sieves, silica gel or dimethoxypropane were added to the reaction (Table 1, entries 2-5). Unfortunately, in the presence of an acid catalyst, none of the tested water scavengers led to more than 90% conversion of diester **2**. In every case, a critical amount of monoester was still detected in the reaction mixture.

As the presented results illustrate, the classical acid-catalyzed esterification is not sufficient to obtain full conversion of **1b** to diester **2**. As an alternative, the conversion of *meso*-anhydride **1b** in the presence of methanol and thionyl chloride was investigated. This modified reaction protocol generates an acid chloride from the monoester, which easily reacts with methanol forming the desired diester **2**. Furthermore, other reaction products of the thionyl chloride mediated esterification of **1b** are in gaseous form, which leads to further advantages: e.g. the gaseous sulfur dioxide leaves the reaction mixture and leads to a shift of the reaction equilibrium towards the product side. The final esterification protocol with thionyl chloride gives full conversion ($> 99\%$) of **1b** into the *meso*-diester **2**. The subsequent incorporation of the optimized formation of pure *meso*-diester **2** into the intended one-pot reaction with the modified esterification of **1b** gave excellent

isolated yields of up to 84% and an excellent enantiomeric excess of $\geq 99.5\%$ *ee* (see Table 2, entry 2 and 3). No formation of *rac-3* was found within the experiments.

The robust reaction concept was eventually executed at larger scale (0.65 L) to highlight its synthetic potential. During the upscaling procedure it was recognized that the addition of aqueous sodium hydrogen carbonate solution, which is needed to adjust the pH and substrate concentration for the biocatalytic reaction, leads to a more extensive formation of carbon dioxide what should be controlled at larger scales. To get a more controlled evolution of gas, the quenching was adjusted to perform first the addition of water to dilute the substrate and the acid reaction medium and second stepwise addition of sodium hydrogen carbonate. By this stepwise quenching procedure it was possible to adequately control the gas formation without any foaming.

Product **3** was isolated with good isolated yield (79%) and excellent enantiomeric excess of $\geq 99.5\%$ *ee* (Table 2, entry 4). Although the isolated yield was somewhat lower compared to small scale experiments; this limitation can be overcome by an optimized reactor design. Eventually also on large scale product **3** will be isolated in $\geq 84\%$ yield with an excellent enantiomeric excess of $\geq 99.5\%$.

Table 2. Scale-up of sequential multistep one-pot reaction with ECS-PLE06

entry	m 1b [g]	m 3 [g]	isol. yield 3 [%]	<i>ee</i> [%]	vol. biocat. reaction [L]
1 ^{a)}	5.00	4.3	85	89.3	0.15
2 ^{b)}	0.49	0.45	75	≥ 99.5	0.04
3 ^{b)}	0.49	0.49	84	≥ 99.5	0.04
4 ^{b)}	19.80	18.90	79	≥ 99.5	0.65

^{a)} First one-pot reaction with acid-catalyzed esterification; ^{b)} esterification in the presence of thionyl chloride

Conclusions

A straightforward design of a chemoenzymatic process by means of a sequential multistep one-pot reaction was investigated. Previously used diacid **1a** could easily be substituted by the economic alternative anhydride **1b** for the synthesis of diester **2**. The established protocol (acid-catalyzed in methanol) was successfully included in this new approach and the product was isolated in comparable high yields of 80%. However, this original esterification protocol was not sufficient for the one-pot reaction, which is reflected in the decreased enantiopurity of 89% *ee* of monoester **3**. This lower enantiomeric excess originates from an incomplete conversion of **1b** into *meso*-diester **2**, which could not be overcome with addition of water-scavengers. Fortunately, the combination of chemical esterification in the presence of thionyl chloride with biocatalytic desymmetrization in a sequential multistep one-pot reaction gave the product **3** with excellent enantiomeric excess of $\geq 99.5\%$ *ee* and good yields of up to 84%. Time consuming work-up steps could be reduced, but also the overall yield of the process (over two steps) was improved from 70% to 84%.

This new established sequential multistep one-pot reaction with ECS-PLE06 represents a powerful process for organic synthesis.

Materials and Methods

General.

All chemicals and solvents were purchased from abcr GmbH (Karlsruhe, Germany), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany) and Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Germany) and used as received. Deionized water was used throughout this study.

Synthesis of dimethyl cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate (2) (procedure 1)

A 50 mL round-bottom flask equipped with a reflux condenser, was charged with 1 g (6.6 mmol) *cis*-cyclohex-4-ene-1,2-dicarboxylic anhydride and 5.3 mL methanol. Subsequently 0.28 mL concentrated sulfuric acid (98%) was added dropwise to the stirred suspension. The reaction mixture was heated to 70 °C and refluxed for 48 h. The resulting solution was partially evaporated under reduced pressure. The concentrate was extracted three times with 5 mL MTBE. The combined organic layers were washed with deionized water, neutralized with a concentrated aqueous sodium hydrogen carbonate solution, and washed again with deionized water. The organic phase was dried over anhydrous magnesium sulfate and removed under reduced pressure to give 0.98 g (yield 75 %) of the clear oil dimethyl cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate **2**.

Synthesis of dimethyl cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate (2) (procedure 2)

A 50 mL round-bottom flask was charged with 2.5 g (16.4 mmol) *cis*-cyclohex-4-ene-1,2-dicarboxylic anhydride and 3.25 mL methanol. The suspension was stirred until a homogenous solution was achieved (appr. after 12 h). After that, the reaction mixture was cooled to 0 °C with an ice-bath and subsequently 1.2 mL thionyl chloride was added over 15 min. The reaction was allowed

to warm to room temperature and stirred overnight at room temperature. The resulting solution was partially evaporated to approximately 3 mL and extracted 3 times with 3 mL of MTBE. The combined organic layers were washed with deionized water, neutralized with a concentrated aqueous sodium hydrogen carbonate solution, and washed again with deionized water. The organic phase was dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure to give 2.49 g (13.0 mmol; 77 %) of the dimethyl cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate **2** as colorless oil.

Sequential multistep one-pot synthesis of (1*S*,2*R*)-1-(methoxycarbonyl)cyclohex-4-ene-1-carboxylic acid (Small-scale).

A 50 mL round-bottom flask was charged with 0.49 g (3.2 mmol) *cis*-cyclohex-4-ene-1,2-dicarboxylic anhydride, 0.63 mL (15.6 mmol) of methanol and a magnetic stirrer. The suspension was stirred until a homogenous solution was achieved (appr. after 12 h). After that, the reaction mixture was cooled to 0 °C with an ice-bath and subsequently 0.234 mL (3.23 mmol) thionyl chloride was added over 15 min. The reaction was allowed to warm up to RT and stirred until full conversion to the diester was observed (TLC). To this solution 39 mL deionized water and sodium hydrogen carbonate was added, until the mixture reached a pH of 8.3. Then, 220 U (5.5 U/mL) of ECS-PLE06 was added to the stirring solution and the temperature maintained to 40 °C. After all diester was hydrolysed by ECS-PLE06 (controlled by TLC), the reaction was heated to 95 °C for 10 min and acidified with hydrochloric acid to pH 1. The reaction mixture was centrifuged at 6000 x g for 10 min to precipitate the denaturated protein. The remaining aqueous layer was extracted with three portions of 40 mL MTBE. The combined organic layers were dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure to give 0.49 g (2.7 mmol, 84 %) of enantiopure crystalline (1*S*,2*R*)-1-(methoxycarbonyl)cyclohex-4-ene-1-carboxylic acid.

Sequential multistep one-pot synthesis of (1*S*,2*R*)-1- (methoxycarbonyl)cyclohex-4-ene-1-carboxylic acid (Scale-up).

A 1 L jacked glass reactor with overhead stirrer was charged with 19.8 g (0.13 mol) of *cis*-cyclohex-4-ene-1,2-dicarboxylic anhydride and 25.8 mL (0.64 mol) methanol. The suspension was stirred at RT until a homogenous solution resulted (appr. after 12 h). After that, the reaction mixture was cooled to 0 °C and subsequently 9.5 mL (0.131 mmol) thionyl chloride was added over 120 min. The reaction was allowed to warm up to RT and stirred until full conversion to the diester was observed (TLC). To this solution 595 mL deionized water and sodium hydrogen carbonate was added, until the mixture reached a pH of 8.3. Then 3.5 kU (5.5 U/mL) of ECS-PLE06 was added to the stirring solution and the temperature was maintained at 40°C. After all diester was hydrolyzed by PLE06 (controlled by TLC), the reaction was heated to 95 °C for 10 min and acidified with hydrochloric acid to pH 1. The reaction mixture was centrifuged at 6000 x g for 10 min to precipitate the denaturated protein. The remaining aqueous layer was extracted with three portions of 650 mL of MTBE. The combined organic layers were dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure to give 18.9 g (0.103 mol, 79 %) of enantiopure crystalline (1*S*,2*R*)-1- (methoxycarbonyl)cyclohex-4-ene-1-carboxylic acid.

Enzymes.

Recombinant pig liver esterase ECS-PLE06 is commercially available as lyophilized powder from Enzymicals AG (Greifswald, Germany).

Standard Activity Assay.

The activity of PLE was determined using *p*-nitrophenyl acetate (pNPA, 30 mM dissolved in DMSO) with spectrophotometric quantification of the *p*-nitrophenolate release over 60 s at 401 nm ($\epsilon_{30\text{ °C}} = 17\,759\text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$) containing 850 μL phosphate buffer (pH 7.5, 50 mM), 50 μL enzyme solution, and 100 μL 30 mM *p*-nitrophenyl acetate in DMSO. One unit (U) of esterase

activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol *p*-nitrophenolate per minute under standard assay conditions. In order to detect changes in absorbance a UV–vis spectrometer (Helios Alpha UV–vis spectrophotometer, Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Germany) was used.

Analytical Methods.

Gas chromatography

Conversion and the corresponding enantiomeric excess of **3** were quantified by GC-FID using a CP3800 equipped with an autosampler CP8400 (all formerly Varian, now Agilent, Santa Barbara, USA) and a Chrompack ChiralsilDex-CB column (25 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm). The injector temperature was set to 220 $^{\circ}\text{C}$, the detector temperature to 250 $^{\circ}\text{C}$. Temperature gradient: 130 $^{\circ}\text{C}$ for 12 min, rise with 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 170 $^{\circ}\text{C}$ and hold for 20 min. Retention times: 23.9 min (1*R*,2*S*)-1-(methoxycarbonyl)-cyclohex-4-ene-2-carboxylic acid **3** and 24.8 min (1*S*,2*R*)-2-(methoxycarbonyl)cyclohex-4-ene-1-carboxylic acid.

Thin layer chromatography

The reactions were monitored by TLC, if required (cyclohexane:2-propanol, 95:5) **R_F**: diester **2**, 0.6; monoester **3**, 0.3; diacid **1a** or anhydride **1b**, 0.2. Plates were stained with KMnO_4 solution (3 g KMnO_4 , 20 g K_2CO_3 , 5 mL 5% NaOH , 300 mL H_2O).

AUTHOR INFORMATION

Present Addresses

Institute for Biomedical Engineering, Rostock University Medical Center, Friedrich-Barnewitz Str. 4, 18119 Rostock, Germany

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding Sources

The authors gratefully acknowledge financial support by the Central Innovation Program SME (Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand, ZIM) of the Federal Ministry for Economic Affairs and Energy (Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie, BMWi), grant number KF2622302AJ2.

ABBREVIATIONS

ECS-PLE, recombinant pig liver esterase; TLC, thin layer chromatography.

REFERENCES

- (1) Federsel, H.-J., in *Chirality in Drug Research*, Wiley-VCH 2006; pp 27-65.
- (2) Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K., *Nature* **2012**, *485*, 185-194.
- (3) Kazlauskas, R. J.; Kim, B.-G., in *Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development*, John Wiley & Sons, Inc.: 2011; pp 1-22.
- (4) Cossy, J. R., in *Comprehensive Chirality*, Carreira, E. M.; Yamamoto, H., Eds. Elsevier: Amsterdam, 2012; pp 1-7.
- (5) Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J., in *Hydrolases in Organic Synthesis*, Wiley-VCH 2006; pp 141-183.
- (6) Paravidino, M.; Böhm, P.; Gröger, H.; Hanefeld, U., in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-VCH 2012; pp 249-362.
- (7) Heymann, E.; Junge, W., *Eur. J. Biochem.* **1979**, *95*, 509-518.
- (8) Junge, W.; Heymann, E., *Eur. J. Biochem.* **1979**, *95*, 519-525.
- (9) Hummel, A.; Brüsehauer, E.; Böttcher, D.; Trauthwein, H.; Doderer, K.; Bornscheuer, U. T., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8492-8494.

- (10) Musidłowska, A.; Lange, S.; Bornscheuer, U. T., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2851-2853.
- (11) Brüsehaber, E.; Böttcher, D.; Musidłowska-Persson, A.; Albrecht, D.; Hecker, M.; Doderer, K.; Bornscheuer, U. T., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 853-859.
- (12) Böttcher, D.; Brüsehaber, E.; Doderer, K.; Bornscheuer, U. T., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *73*, 1282-1289.
- (13) Wardenga, R.; Liebelt, U.; Menyes, U., Enzymicals Portfolio, Enzymicals AG, Greifswald, 2015
- (14) Smith, M. E.; Banerjee, S.; Shi, Y.; Schmidt, M.; Bornscheuer, U. T.; Masterson, D. S., *ChemCatChem* **2012**, *4*, 472-475.
- (15) Romano, D.; Bonomi, F.; de Mattos, M. C.; de Sousa Fonseca, T.; de Oliveira, M. d. C. F.; Molinari, F., *Biotechnol. Adv.* **2015**.
- (16) Süß, P.; Illner, S.; von Langermann, J.; Borchert, S.; Bornscheuer, U. T.; Wardenga, R.; Kragl, U., *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*, 897-903.
- (17) Tenbrink, K.; Seßler, M.; Schatz, J.; Gröger, H., *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2363-2367.
- (18) Denard, C. A.; Hartwig, J. F.; Zhao, H., *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2856-2864.
- (19) Borchert, S.; Burda, E.; Schatz, J.; Hummel, W.; Gröger, H., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *84*, 89-93.
- (20) Sato, H.; Hummel, W.; Gröger, H., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4488-4492.
- (21) Gröger, H.; Hummel, W., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 171-179.
- (22) Mayer, S. F.; Kroutil, W.; Faber, K., *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 332-339.
- (23) Siengalewicz, P.; Mulzer, J.; Rinner, U., in *Comprehensive Organic Synthesis II (Second Edition)*, Knochel, P., Ed. Elsevier: Amsterdam, 2014; pp 355-410.
- (24) Noguchi, N.; Tsuna, K.; Nakada, M., *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 357-361.

Artikel 3

Recombinant pig liver esterase-catalyzed synthesis of (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate combined with subsequent enantioselective crystallization

Janine Hinze,¹ Philipp Süß,^{2,3} Silja Strohmaier,^{1,4} Uwe T. Bornscheuer,³ Rainer Wardenga^{2,} and Jan von Langermann^{1,*}*

¹ University of Rostock, Institute of Chemistry, Albert-Einstein-Str. 3a, 18059 Rostock, Germany

² Enzymicals AG, Walther-Rathenau-Str. 49a, 17489 Greifswald, Germany

³ University of Greifswald, Institute of Biochemistry, Felix-Hausdorff-Str. 4, 17487 Greifswald, Germany

⁴ School of Chemistry and Molecular Biosciences, The University of Queensland, Brisbane, Qld 4072, Australia

ABSTRACT.

The recombinant pig liver esterase catalyzed hydrolysis of *cis*-1,4-diacetoxy-2-cyclopentene forming (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate was investigated and realized at preparative scale. Relevant reaction conditions were examined and optimized to achieve full conversion with an enantiomeric excess of about 86%e.e. Enantiopure product was then obtained after

enantioselective crystallization, which required further studies of the solid phase behavior, including its binary melting point phase diagram.

KEYWORDS. hydrolase, industry, enzyme, biocatalysis

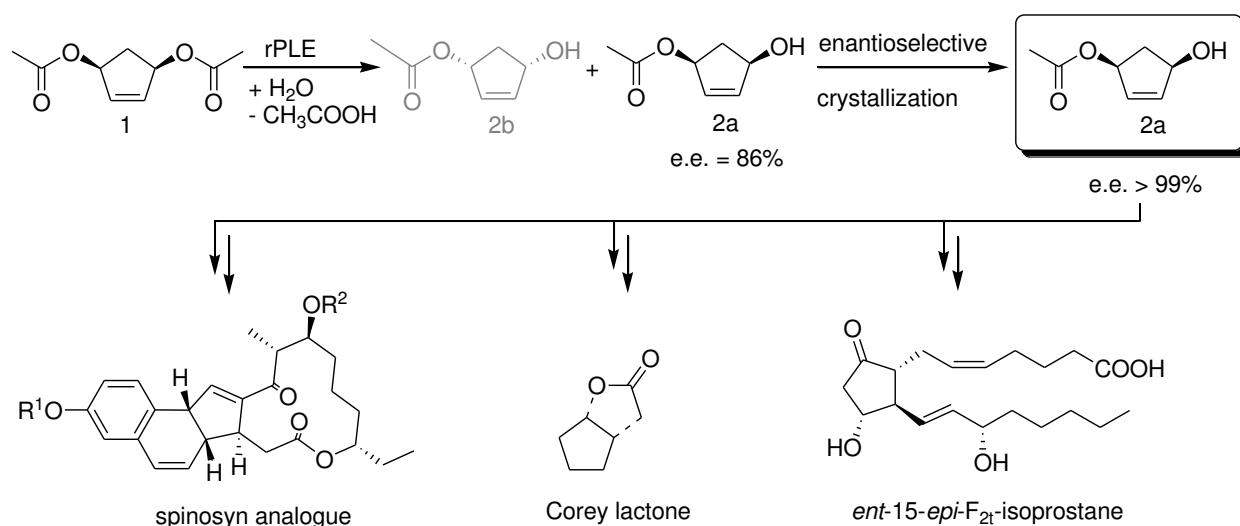
5. INTRODUCTION

In the past decades biotransformations became a highly valuable technique for the production of important chemicals on industrial scale. Major examples include the synthesis of (bio)ethanol¹, high fructose corn syrup (HFCS)², acrylamide³, different classes of antibiotics and numerous other fine chemicals.⁴ Within these systems the use of biocatalysts offers several significant advantages in comparison to classical chemical processes, e.g. milder reaction conditions, less toxic reagents and the use of water as solvent. Typically moderate to high regio- and enantioselectivities are achieved with such biocatalysts including high atom efficiencies and simplified downstream processing. The biocatalysts itself can also be further improved by modern molecular biology techniques to optimize the entire production process.⁵ In comparison, classical resolutions of racemic mixtures e.g. by crystallization or chromatographic methods facilitates only a maximum yield of $\leq 50\%$ including even lower atom efficiencies and high waste streams.^{2, 6-8}

Within the group of industrially relevant enzymes pig liver esterase (PLE, esterase from porcine liver) is one of the most frequently used esterases in synthetic chemistry. The broad substrate range of PLE allows diverse applications of regio- and stereoselective hydrolytic reactions in asymmetric synthesis and kinetic resolution processes.⁹⁻¹² Unfortunately the natural source of this enzyme yields a preparation-dependent variable mixture of various PLE isoenzymes with significantly different substrate specificities, which consequently result in a mixture of enzymatic activities and thus limits the usability of PLE for production purposes. Moreover, regulatory issues may prevent the use of such a PLE-preparation for product synthesis. Fortunately, the use of recombinant PLEs (rPLEs) overcomes such problems and allows the utilization in synthesis with specific, reproducible characteristics.¹³⁻¹⁵ A recent example highlights the desymmetrization of dimethyl cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate yielding (1*S*,2*R*)-1-(methoxycarbonyl)cyclohex-4-ene-2-carboxylic acid. Herein classical PLE from its natural sources achieves only an enantiomeric excess between 80 and 97%e.e., due to contrary enantioselectivities of the respective isoenzymes, as mentioned

above. In contrast, the use of a recombinant isoenzyme preparations facilitates the direct synthesis of the enantiopure product (>99.5% e.e.).^{16, 17}

In this contribution we present the successful combination of a partially enantioselective rPLE-catalyzed hydrolysis of *cis*-1,4-diacetoxy-2-cyclopentene **1** and a subsequent enantioselective crystallization at preparative scale. The resulting product (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate **2a** is an important chiral building block for the preparation of prostaglandins and other active natural products, such as cyclopentanoids (Figure 1). Reaction temperature, pH and co-solvent influence were investigated and optimized to facilitate full conversion of the enzymatic reaction with the highest achievable product enantiomeric excess of 86%e.e.



Scheme 1. rPLE-catalyzed synthesis of enantiopure (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate and potential products (spinosyn analogue¹⁸, Corey lactone¹⁹ and *ent*-15-*epi*-F_{2t}-isoprostane²⁰)

In addition, the solid phase behavior of the target substrate **2a** was determined with respect to its binary melting point phase diagram (BPD) and X-ray powder diffraction (XRPD) to ensure optimal enantiomeric purity after enantioselective crystallization. Herein enantiomeric substances exhibit in general three basic types of phase behavior: racemic compound (true racemate), conglomerate (simple eutectic) and pseudoracemates (solid solutions). Target compound **2a** belongs to the group of racemic compounds and thus exhibits a crystalline racemate with both enantiomers in equal and ordered quantities in its crystal structure. Within the binary melting point diagram of

such systems two symmetrical eutectics are found, as shown in Figure 1A. Enantioselective crystallization is herein thermodynamically only feasible from a supersaturated enantioenriched solution within the two-phase-region at the respective side of the enantiomer, highlighted red and blue in Figure 1B. Consequently the enantiomeric excess of the original enzyme-derived solution needs to be higher than the respective eutectic of **2a** to facilitate the formation of pure solid enantiomer (Figure 1).^{21, 22}

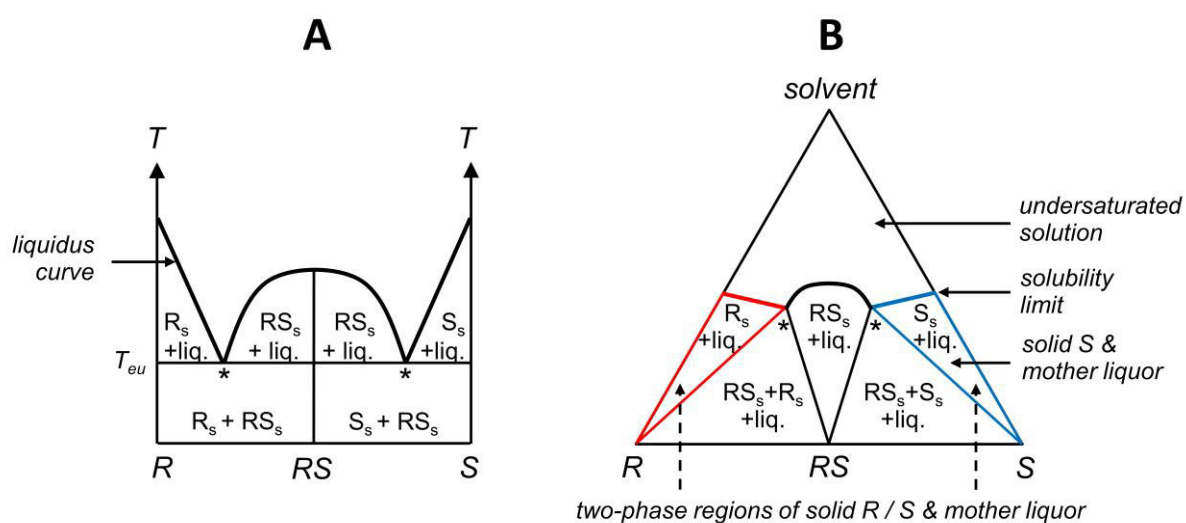


Figure 1. Schematic representation of the binary (A) and ternary (B) phase diagram of a racemic compound behavior; * - eutectic(s), R_s – solid (R)-enantiomer, S_s – solid (S)-enantiomer, RS_s – solid racemic mixture, liq – liquid

6. RESULTS AND DISCUSSION

From *cis*-1,4-diacetoxy-2-cyclopentene **1** the undesired counterenantiomer (1*R*,4*S*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate can be obtained with high enantiomeric excess by hydrolysis with immobilized *Candida antarctica* lipase B (CalB).¹⁸ In contrast, pig liver esterase converts **1** to the desired enantiomer (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate **2a** with an enantiomeric excess of 86%e.e.^{19, 23} For full enantiopurity a subsequent enantioselective crystallization step is required (Scheme 1).

2.4 Choice of optimal PLE isoenzyme

In this study six commercially available isoenzymes (ECS-PLE01–06 from Enzymicals AG) were investigated towards their specific activity and enantioselectivity for the hydrolysis of *cis*-1,4-diacetoxy-2-cyclopentene **1** (Figure 2).

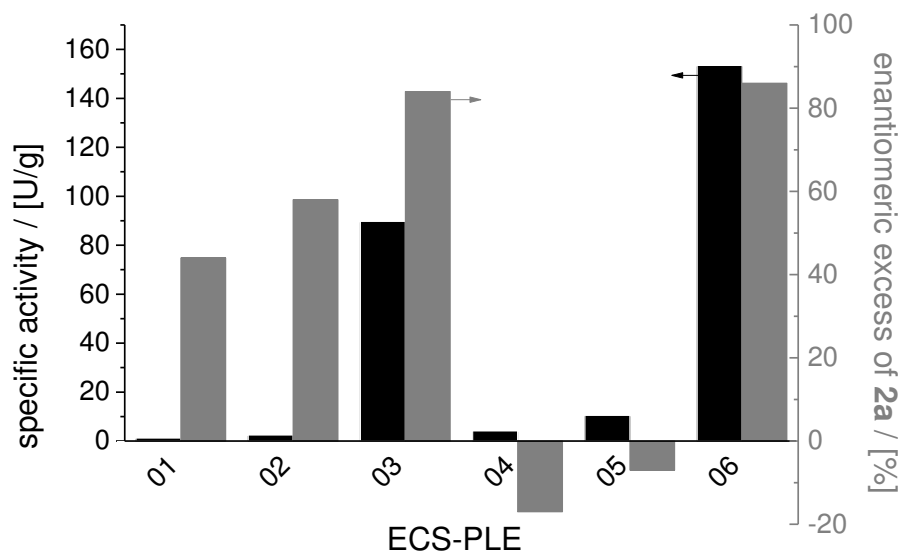


Figure 2. Comparison of specific activities (black) and the obtained enantiomeric excesses (grey) of the six ECS-PLE isoenzyme preparations. *Reaction conditions:* 0.25-15.5 mg/mL PLE isoenzyme (lyophilizate), 2.5 mg (13.5 μ mol) **1**, 1.5 mL 100 mM phosphate buffer pH 7.5, 40 $^{\circ}$ C, 120 min., Negative enantiomeric excesses represents the enantioselectivity towards the other enantiomer **2b**.

Significant differences between the individual isoenzymes were found for the selective hydrolysis of *cis*-1,4-diacetoxy-2-cyclopentene **1**. This behavior is based on different sequences and the respective structures of the proteins, which were already reported in detail.^{24, 25} ECS-PLE01, 02, 04 and 05 exhibit very poor specific activities of 0.8, 2.0, 3.7 and 10.0 U/g, respectively. For all these enzymes only moderate enantioselectivities were found, including a reverse enantioselectivity using ECS-PLE04 and 05 towards (1*R*,4*S*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate. Thus these four isoenzymes with their insufficient substrate specificity and selectivity were excluded from further experiments. Noteworthy, excellent enantioselectivities were observed for some of these isoenzymes for the conversion of other substrates. For example, ECS-PLE05 demonstrates satisfying enzymatic activity for the conversion of cyclohex-4-ene-*cis*-1,2-dicarboxylate.¹⁶ In this presented case ECS-PLE03 (89 U/g) and ECS-PLE06 (153 U/g) exhibited the highest specific activity for

the intended hydrolysis of **1** with similarly high enantiomeric excesses of about 81%e.e and 83%e.e. Aside specific activity and enantioselectivity, the stability of the chosen isoenzymes is very important for future application. Consequently enzyme activity was investigated over time to ensure sufficient catalyst stability within a preparative process (Figure 3).

As shown herein, ECS-PLE06 possesses at 50 °C a consistent stable enzyme activity over 23 h and a remaining activity of 24% after 168 h, which translates to half life stability of 91 h. In contrast, ECS-PLE03 lost activity significantly faster with a remaining activity of 19% after only 4 h, which converts to a very low half life stability of only 1.7 h. This reason for the different stabilities is currently unknown. Consequently isoenzyme ECS-PLE06 was preferred in this study for the hydrolysis of **1**. Nevertheless, ECS-PLE03 with its high activity and selectivity could be favored for other substrates.

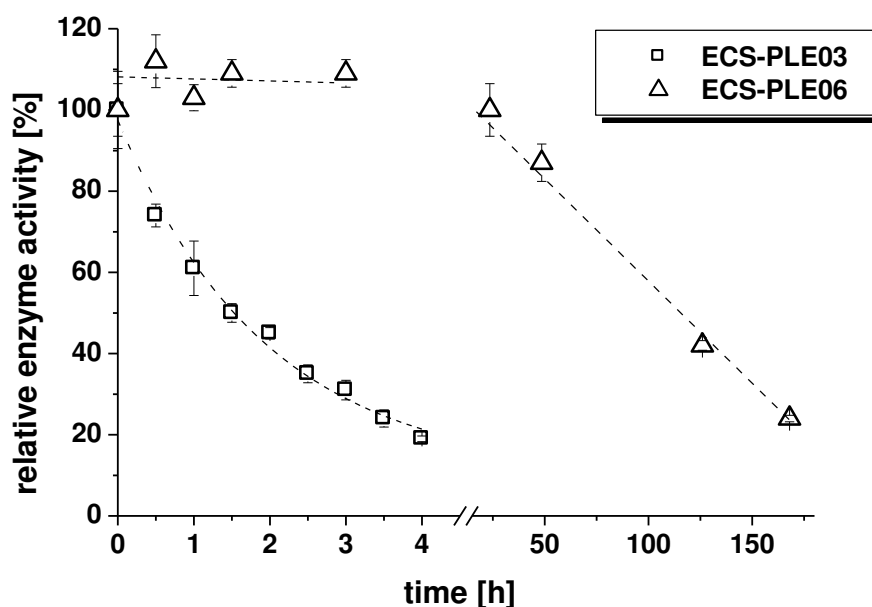


Figure 3. Comparison of the remaining relative enzyme activity of ECS-PLE03 (squares) and ECS-PLE06 (triangles) at 50 °C. *Experimental conditions:* ECS-PLE03 and ECS-PLE06 were stored in 100 mM phosphate buffer pH 7.5 at 50 °C, activity was determined via *p*-NPA standard assay, activity at 0 h was set to 100%.

2.5 Reaction conditions

Several changes of enantioselectivity and reaction velocity by modification of the reaction media were reported for pig liver esterase. In order to obtain optimal parameter for the enzymatic hydrolysis of **1** the influence of pH, reaction temperature and co-solvents on the performance of the investigated rPLEs were examined. The results are summarized in Figures 4 and 5.

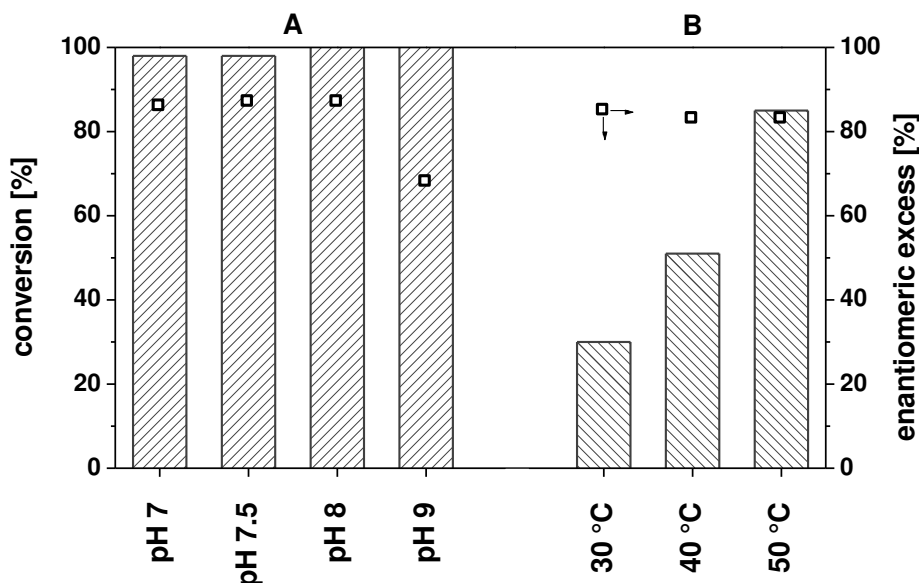


Figure 4. Effect of pH (A) and reaction temperature (B) on conversion (graph) and enantiomeric excess (squares) for the ECS-PLE06-catalyzed hydrolysis of *cis*-1,4-diacetoxy-2-cyclopentene **1**. *Reaction conditions:* (A) 2 U/mL ECS-PLE06 (as lyophilizate, according to the standard activity assay), 9.2 mg (50 μ mol) **1**, 5 mL 100 mM phosphate buffer, 25 °C, 120 min. (B) 0.25 U/mL ECS-PLE06 (as lyophilizate, according to the standard activity assay), 2.5 mg (13.5 μ mol) **1**, 1.5 mL 100 mM phosphate buffer pH 7.5, 120 min.

First, the pH-dependence (Figure 4) was investigated at different pH levels. At pH 7, pH 7.5 and pH 8 similar conversions and enantiomeric excesses were found. In all cases (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate **2a** was formed with 87%e.e., except for pH 9 with a much lower e.e. of 68%. This effect is caused by the auto-hydrolysis of the substrate at elevated pH conditions. To avoid the unintended auto-hydrolysis the pH level was set to pH 7.5 for all further experiments, which is relatively similar to an early report of Brüsehaber *et al.*²³ In addition, the effect of reaction

temperature (Figure 4B) was examined at lower enzyme concentration, since the influence of higher temperatures on ECS-PLE06 has already been reported.¹⁶ As shown in Figure 4B, an increase of reaction temperature improves as expected the conversion of **1** to **2a**. At 30 °C only one third of the substrate was hydrolyzed after 2 h, while >80% conversion was achieved at 50 °C. Most importantly, a relative high enantiomeric excess of 83% remains nearly constant at all reaction temperatures. Furthermore, ECS-PLE06 shows a constant relative enzyme activity over 24 h at this temperature (Figure 3). Consequently, a reaction temperature of 50 °C was chosen for all following experiments within this study.

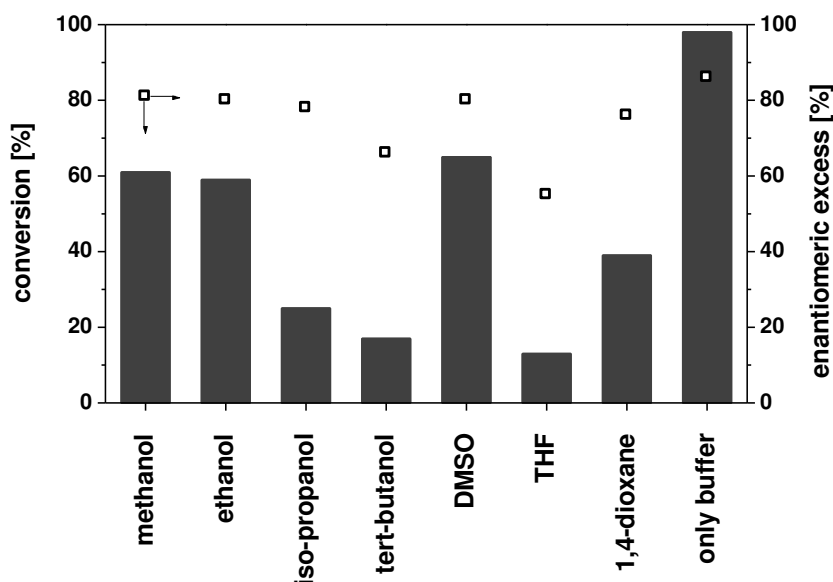


Figure 5. Effect of co-solvents on the ECS-PLE06-catalyzed on conversion (graph) and enantiomeric excess (squares) for the ECS-PLE06-catalyzed hydrolysis of *cis*-1,4-diacetoxy-2-cyclopentene **1**. *Reaction conditions:* 0.25 U/mL ECS-PLE06 (lyophilizate, according to the standard activity assay), 2.5 mg (13.5 μ mol) **1**, 200 mM co-solvent, 1.5 mL 100 mM phosphate buffer pH 7.5, 50 °C, 120 min.

Moreover, the effects of co-solvents were also considered in this study since positive effects of certain solvents were recently reported, e.g. Smith *et al.* found an improved enantioselectivity for PLE isoenzymes by applying a selection of co-solvents.²⁶ However, in the present study only negative effects were found for the hydrolysis of **1**. Drastic losses of enantioselectivity and enzyme

activity of ECS-PLE06 were detected using THF, *iso*-propanol and *tert*-butanol as co-solvents with very low conversions of 30% and below. Methanol, ethanol, DMSO and 1,4-dioxane gave only moderate conversions of up to 65% (DMSO) with a maximum enantiomeric excess of 81% (methanol). In conclusion, a usage of organic co-solvents was not applicable for the scale-up of the investigated ECS-PLE06 catalyzed process.

2.6 Scale-up

After the selection of the catalyst isoenzyme ECS-PLE06 and the optimal process conditions of pure phosphate buffer pH 7.5 and 50 °C the hydrolysis of **1** was scaled-up. Due to the higher substrate amount and therefore higher acid formation an efficient pH-adjustment by an external base solution was required.

Table 1. rPLE-catalyzed hydrolysis of *cis*-1,4-diacetoxy-2-cyclopentene at larger scale with pH-adjustment by an external base solution.

En-try	V [L]	Substrate ^a [mM]	Activi-ty ^b [U/mL]	Reaction time [min]	e.e. [%]	Conver-sion [%]	STY [g/(L·h)]
1	0.02	100	20.0	11.0	88	98	76.0
2	0.02	100	10.0	36.7	89	>99	23.0
3	0.1	100	10.0	37.5	87	97	22.1
4	0.02	100	5.0	36.7	85	95	22.1
5	0.02	100	2.5	75.0	83	90	10.2
6	0.02	200	5.0	110.0	84	91	14.1
7	0.02	500	10.0	240.0	84	63 ^c	11.2
8	2.4	230	5.0	240.0	91	94	7.7

^a The substrate was not soluble at higher concentrations and thus an emulsion was formed. ^b Used volumetric enzyme activity; calculated from specific activity [U/mg] according to standard activity assay and enzyme amount [mg] per volume [mL]. ^c Due to an extremely slowing down of the reaction velocity, the reaction was interrupted after 240 minutes.

To optimize the process regarding substrate concentration and enzyme activity several parameters were investigated and the conducted reactions at larger scale are summarized in Table 1. In all cases enantiomeric excesses up to 91%e.e. were achieved with excellent space-time-yields.

Substrate concentrations between 100–200 mM were successfully converted with high conversion (entries 1-6), while even higher concentrations of 500 mM significantly inhibited ECS-PLE06 (entry 7). A multigram-scale was eventually performed at 230 mM to ensure optimal efficiency of the biocatalyst (entry 8, see also Experimental Section for the detailed preparation) with an enantiomeric excess of 91%e.e. and a space-time-yield of 7.7 g/(L·h).

2.7 Enantioselective crystallization

Solid phase behavior

Since only an unsatisfactory enantiomeric excess was obtained from the enzyme-catalyzed preparation of **2a**, a further enantioselective crystallization step was necessary for the preparation of the enantiopure compound. For this purpose more details about the solid phase behavior of the chiral target substance were required to understand and optimize the subsequent crystallization process. Especially the binary phase diagram of 4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate **2** is herein important since it highlights the eutectics of the investigated chiral system. Consequently solid mixtures of different mole fractions of **2** between the racemic mixture and the pure enantiomer were investigated by differential scanning calorimetry (DSC) and the results were used to construct the binary phase diagram (Figure 6). A racemic compound behavior was found (further details about this solid phase behavior are mentioned in the introduction) with a eutectic at a mole fraction of 0.725 (45%e.e.). Since such chiral systems are symmetrically with respect to the racemic mixture, the other eutectic is positioned at 0.275 towards the other undesired enantiomer (not shown in Figure 7). Moreover, the theoretical calculation of the liquidus curve applying the simplified equations of Schröder-van-Laar and Prigogine-Defay (see equations 1 and 2 in the Experimental Section) gave a relatively good agreement with the experimental values.

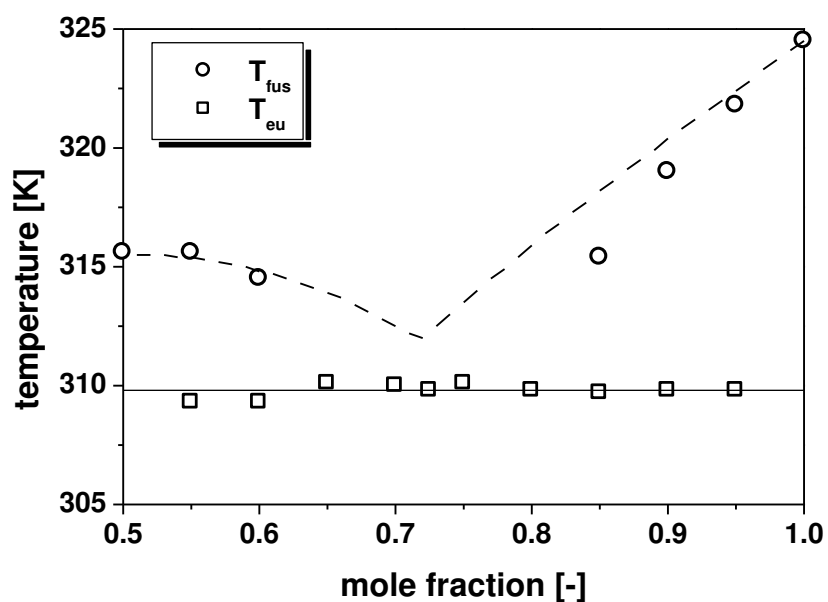


Figure 6. Binary phase diagram (BPD) of 4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate **2**.

The position of the eutectic is relevant for the intended crystallization, because it represents the lower limit of the final crystallization process. Enantioselective crystallization is only feasible until the eutectic composition is reached in the depleted mother liquor. Below this point the racemic mixture crystallizes, which obviously reduces the enantiopurity of the desired solid product (see also Figure 1).

In addition, the racemic compound behavior was also confirmed by X-ray powder diffraction (XRPD) (Figure 7). Characteristic diffraction angles of the pure enantiomer are circa 15, 18, 23 and 24° and for the racemate at about 22, 25, 27 and 28°. In the measured diffractograms no additional signals were found within all investigations of the pure materials and mixtures under any circumstances, thus significant polymorphism of **2** is fortunately not present. Furthermore, no solvate behavior of any kind was found in this study. Additional XRPD-results are presented in the supplementary material file (Figure SI-4).

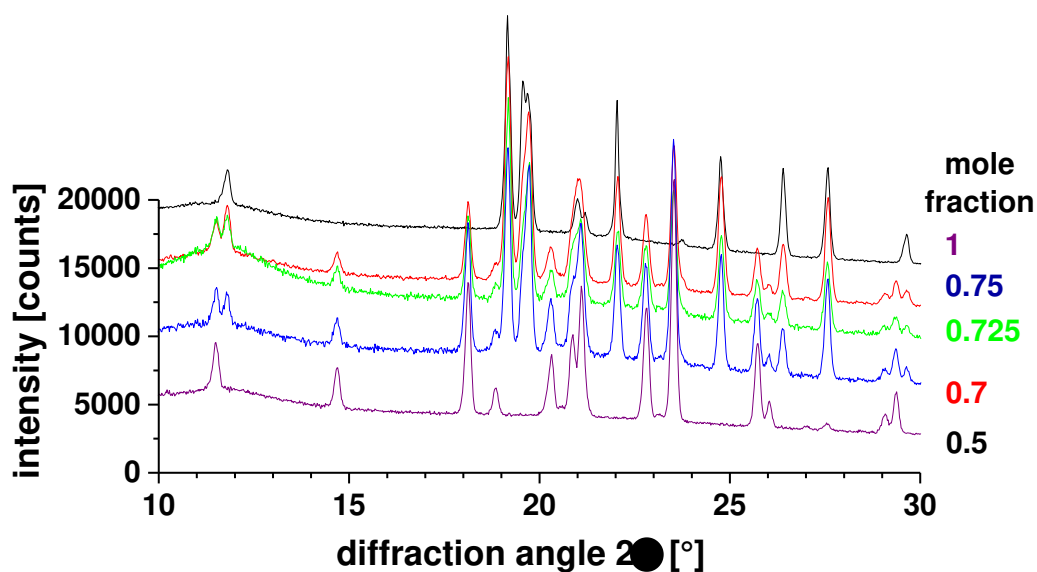


Figure 7. XRPD-results of enantiopure (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate **2a**, racemic 4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate and their mixtures close to the eutectic of 0.725.

Crystallization of enantiopure (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate

In total, three enantioselective crystallizations were performed to improve the enantiomeric excess of **2**. For the first crystallization entry 5 and 6 of the scale-up reactions were used. Scale-up 1 to 4 and 7 were merged and crystallized in a second experiment. The crude product (Table 1 Entry 8) of the multigram-scale was crystallized in a third experiment. Data and results of the three crystallizations are shown in Table 2.

Table 2. Enantioselective crystallization of (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate **2a**.

Entry	Initial e.e. [%]	Final e.e. [%]	Remaining e.e. [%]	Theoretical max. yield [%]	Practical yield [%]
1	83	≥99.5	71.0	69	33
2	86	98	54.0	75	65

With an initial enantiomeric excess of 83% the first crystallization facilitated pure (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate **2a** (e.e.≥99.5%) with a moderate yield of 33% (entry 1). Since an enantiomeric excess of 71%e.e. remained in the mother liquor this process was terminated too soon and the theoretical maximum yield of 66% was not achieved. In comparison, the second crystallization started with an enantiomeric excess of 86%e.e. yielding **2** with an enantiomeric excess of 98%e.e. at an adequate yield of 63% (theoretical maximum of 75%). The crystallization of crude product **2** (42 g, see also Experimental Section for details in implementation) required an additional recrystallization step to remove unreacted substrate **1** and a significant amount of protein impurities. Consequently only 44%, based on the mass of the crude product, were obtained from the enantioselective crystallization. Nevertheless, the subsequent enantioselective crystallization was successful and an enantiomeric excess of 99%e.e. was achieved (entry 3). Further studies will target an improved purification strategy from the reaction solution.

7. CONCLUSION

In this contribution the successful desymmetrization of *cis*-1,4-diacetoxy-2-cyclopentene by recombinant pig liver esterase isoenzyme was investigated at larger scale. 50 °C and pH 7.5 were found to be the optimal reaction conditions and a desymmetrization reaction at preparative scale was performed. Herein recombinant pig liver esterase isoenzymes provide a powerful and more reproducible alternative to classical pig liver esterase preparations.

For the subsequent enantioselective crystallization the solid phase behavior of 4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate was determined including its binary phase diagram. The subsequent enantioselective crystallizations yielded several gram of enantiopure (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate **2a**.

8. EXPERIMENTAL SECTION

General

Cis-1,4-diacetoxy-2-cyclopentene **1** was purchased from Chiracon (Luckenwalde, Germany), (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate **2a** and all applied solvents were purchased from Sigma-Aldrich (Munich, Germany). All chemicals were used as received. Deionized water was used throughout this study.

Enzymes

The recombinant pig liver esterases, ECS-PLE01 to ECS-PLE06, are commercially available (as lyophilisate) from Enzymicals AG (Greifswald, Germany). Classical pig liver esterase (mixture of isoenzymes from the natural source, crude protein powder) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Standard activity assay

The activity of recombinant and classical PLEs was determined from the hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate (*p*NPA, 30 mM dissolved in DMSO) with spectrophotometric quantification of *p*-nitrophenolate release over 120 s at 30 °C and 400 nm ($\epsilon_{25^\circ\text{C}} = 13190 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$). The assay solution contained 850 μL 50 mM phosphate buffer pH 7.5, 50 μl enzyme solution and 100 μl 30 mM *p*-nitrophenyl acetate in DMSO. One unit (U) of esterase activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of *p*-nitrophenolate per minute under standard assay conditions. In order to detect changes in absorbance the UV/Vis-spectrometer Specord 50 (Analytic Jena AG, Jena, Germany) and Helios Alpha UV/Vis-spectro-photometer (Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Germany) were used. All measurements were executed with a reference cell including an equal solution without enzyme. Data are reported as mean \pm standard deviation of triplicate measurements.

Isoenzyme screening

0.25 mg to 15.5 mg ECS-PLE01-06 (lyophilized) or commercial available PLE were suspended in 1.5 mL 100 mM phosphate buffer pH 7.5 at 40 °C. The reaction was started by adding 2.5 mg (13.5 μmol) of **1**. After 2 h the resulting reaction mixture was extracted with ethyl acetate and conversion and enantiomeric excess of the enzymatic reactions obtained from analysis with gas chromatography (see also below). Small scale desymmetrization experiments were carried out with the respective isoenzyme (0.25 U/mL) in 1.5 mL of a buffered solution (100 mM phosphate buffer) with 2.5 mg (13.5 μmol) **1**. The enzymatic hydrolysis was conducted at pH 7, pH 7.5, pH 8 and pH 9 at 25 °C. pH measurements were examined with a pH 3210 pH-meter from WTW (Weilheim, Germany), using a pH glass electrode model IJ44C and calibrated with technical buffer from WTW. The reaction was examined at 30 °C, 40 °C and 50 °C at pH 7.5. Co-solvents (methanol, ethanol, *iso*-propanol, *tert*-butylalcohol, 1,4-dioxane, DMSO and THF) were determined at pH 7.5 and 50 °C. After 2 h the reaction was stopped by extracting the reactants with ethyl acetate.

Conversion and enantiomeric excess of the enzymatic reactions were obtained from analysis with gas chromatography (see below).

Small-scale biocatalysis with ECS-PLE06

A 100 mL round-bottom flask was charged with 20 mL 100 mM phosphate buffer pH7.5, ECS-PLE06 and a magnetic stir bar. The suspension was set to 50 °C. The reaction was started by adding 368 mg (2 mmol) of **1** to the reaction mixture. The solution was kept constant at pH 7.5 by addition of 0.5 M sodium hydroxide solution *via* an autoburette. After the addition of the required NaOH solution, the reaction was stopped by extraction with twice volume of ethyl acetate. The precipitated protein was removed by filtration of both phases and the aqueous layer extracted three to five times with 20 mL ethyl acetate. The combined organic layers were evaporated under reduced pressure to give (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate **2a** (e.e. = 86%).

Crystallization

Crude product **2a** was dissolved in *n*-heptane, conditioned to 50 °C and continuously cooled to 35 °C with 10 K/min. Seed crystals were added until crystal growth occurred. Afterwards the solution temperature was lowered to 10 °C with 20 K/min. The obtained product was filtered off and dried yielding (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate with excellent enantiomeric excess (> 99%e.e.).

Multigram-scale

For the preparation of enantiopure (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate **2a** at multigram-scale 78 g (0.4 mol) of **1** were converted with 5 U/mL ECS-PLE06 in 2.4 L 100 mM phosphate buffer pH 7.5 at 50 °C. The solution was kept constant at pH 7.5 by addition of 0.5 M potassium hydroxide solution *via* an autoburette. The reaction was followed *via* TLC (cyclohexane:2-propanol 90:10 v/v stained with KMnO₄). The reaction was stopped by adding 5 L of ethyl acetate and to precipitate the protein 1.5 L of an acetone:2-propanol mixture (2:1 v/v) was added. The whole mixture was stirred for 15 min afterwards treated with celite545 to become a well filterable solid. The solid precipitate was filtered off and remaining aqueous layer was extracted twice with 2.5 L

ethyl acetate. The organic layers were combined and dried over MgSO₄. The solvent was removed under reduced pressure to give 42 g of a brown crude product. The crude product was recrystallized in 400 mL *n*-heptane:ethyl acetate (80:20 v/v) to give 20 g of **2a**. For the enantioselective crystallization crude product **2a** was dissolved in 400 mL *n*-heptane:ethyl acetate (90:10 v/v) and conditioned to 50 °C. Subsequent the solution was continuously cooled from 50 °C to 10 °C with 10 K/min. Seed crystals were added until crystal growth occurred. The obtained product was filtered off and dried yielding 16.7 g of (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate with an enantiomeric excess of 99%.

Analytical methods

Conversion and the corresponding enantiomeric excess of **2a** were quantified by GC-FID using a Thermo Scientific Trace 1310 gas chromatograph fitted with a Chrompack Chiralsil-Dex-CB column (25 m x 0.25 mm x 0.25 μm). Injector temperature: 250 °C, detector temperature: 250 °C, temperature gradient: start at 67 °C, rise with 10 °C/min to 150 °C and hold for 2 min, rise with 15 °C/min to 200 °C and hold for 3 min. Retention times: 8.4 min (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate **2a**, 8.6 min (1*R*,4*S*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate and 8.8 min *cis*-1,4-diacetoxy-2-cyclopentene **1** (see also supporting information).

NMR analysis

¹H NMR and ¹³C NMR-spectra were recorded with a Bruker AVANCE (300 MHz) in CDCl₃. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million relative to the solvent peak. Splitting patterns are indicated as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; m, multiplet; quint, quintet, dt, double triplet; dd, double doublet.

Differential scanning calorimetry (DSC) measurements

DSC experiments were performed on a Mettler Toledo DSC 823°. The start temperature was 25 °C, the final temperature was 130 °C, and a heating rate of 2 K/min was applied. In order to produce controlled mixtures for phase diagram determination, weighed amounts of enantiomer were mixed and dissolved in acetone, and after evaporation of the solvent the solid was grounded to a fine powder. Ten to fifteen milligrams of the respective mixtures were used for DSC experiments.

X-ray powder diffraction (XRPD) measurements

Solid samples were analyzed by X-ray powder diffraction to identify the present solid phase. A Stoe StadiP PSD from STOE & Cie GmbH (Darmstadt, Germany) with a copper anode was used. Measurements covered a 2Θ range from 5° to 40° with a step size of 0.02°.

Binary phase diagram

The shown liquidus curves of the enantiomer and the racemate were calculated according to the simplified equations of Schröder-van-Laar and Prigogine-Defay (eq 1 and eq 2) with x - mole fraction, R - gas constant, T_{f,E}, T_{f,R} – melting temperature of enantiomer and racemic compound, ΔH_{f,E}, ΔH_{f,R} – enthalpy of fusion of enantiomer and racemic compound (see also supporting information). The theoretical eutectic was calculated from the intersection of the liquidus lines. Polymorphism of the target compound was not found within this study.

$$\ln x = \frac{\Delta H_{f,E}}{R} \left(\frac{1}{T_{f,E}} - \frac{1}{T_f} \right) \quad (\text{eq 1})$$

$$\ln 4x(1-x) = \frac{2\Delta H_{f,R}}{R} \left(\frac{1}{T_{f,R}} - \frac{1}{T_f} \right)$$

(eq 2)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail Rainer Wardenga (Enzymicals AG): rainer.wardenga@enzymicals.com and Jan von Langermann (University of Rostock): jan.langermann@uni-rostock.de

¹ University of Rostock, Institute of Chemistry, Albert-Einstein-Str. 3a, 18059 Rostock, Germany

² Enzymicals AG, Walther-Rathenau-Str. 49a, 17489 Greifswald, Germany

Acknowledgments

The authors thank Prof. Dr. Udo Kragl (University of Rostock) and Dr. Ulf Menyes (Enzymicals AG) for useful discussions as well as Philipp Thiele (University of Rostock) for the implementation of XRPD measurements.

Funding Sources

Financial support is gratefully acknowledged by the Central Innovation Program SME (Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand – ZIM) by the Federal Ministry for Economic Affairs and Energy (Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie - BMWi), grant number: KF2622302AJ2.

Abbreviations

BPD, binary phase diagram; DSC, differential scanning calorimetry; ECS-PLE, recombinant pig liver esterase produced by Enzymicals AG (Greifswald, Germany); XRPD, X-ray powder diffraction

REFERENCES

- (1) Angarita, J. D.; Souza, R. B. A.; Cruz, A. J. G.; Biscaia, E. C.; Secchi, A. R., *Biochem. Eng. J.* **2015**, *104*, 10-19.
- (2) DiCosimo, R.; McAuliffe, J.; Poulouse, A. J.; Bohlmann, G., *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6437-6474.
- (3) Kobayashi, M.; Nagasawa, T.; Yamada, H., *Trends Biotechnol.* **1992**, *10*, 402-408.
- (4) Wenda, S.; Illner, S.; Mell, A.; Kragl, U., *Green Chem.* **2011**, *13*, 3007-3047.
- (5) Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K., *Nature* **2012**, *485*, 185-194.
- (6) Choi, J. M.; Han, S. S.; Kim, F. S., *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1443-1454.
- (7) Noguchi, N.; Tsuna, K.; Nakada, M., *Tetrahedron-Asymmetry* **2013**, *24*, 357-361.
- (8) Bornscheuer, U. T.; Buchholz, K., *Eng. Life Sci.* **2005**, *5*, 309-323.
- (9) Romano, D.; Bonomi, F.; de Mattos, M. C.; Fonseca, T. D.; de Oliveira, M. D. F.; Molinari, F., *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 547-565.
- (10) Zhu, L. M.; Tedford, M. C., *Tetrahedron* **1990**, *46*, 6587-6611.
- (11) Bornscheuer, U. T., *Fems Microbiol. Rev.* **2002**, *26*, 73-81.
- (12) de Maria, P. D.; Garcia-Burgos, C. A.; Bargeman, G.; van Gemert, R. W., *Synthesis* **2007**, *10*, 1439-1452.
- (13) Brüsehaber, E.; Schwiebs, A.; Schmidt, M.; Bottcher, D.; Bornscheuer, U. T., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *86*, 1337-1344.

- (14) Hermann, M.; Kietzmann, M. U.; Ivancic, M.; Zenzmaier, C.; Luiten, R. G. M.; Skranc, W.; Wubbolts, M.; Winkler, M.; Birner-Gruenberger, R.; Pichler, H.; Schwab, H., *J. Biotechnol.* **2008**, *133*, 301-310.
- (15) Böttcher, D.; Brüsehaber, E.; Doderer, K.; Bornscheuer, U. T., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *73*, 1282-1289.
- (16) Süß, P.; Illner, S.; von Langermann, J.; Borchert, S.; Bornscheuer, U. T.; Wardenga, R.; Kragl, U., *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*, 897-903.
- (17) Süß, P.; Borchert, S.; Hinze, J.; Illner, S.; von Langermann, J.; Kragl, U.; Bornscheuer, U. T.; Wardenga, R., *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 2034-2038.
- (18) Tietze, L. F.; Stadler, C.; Bohnke, N.; Brasche, G.; Grube, A., *Synlett* **2007**, *3*, 485-487.
- (19) Laumen, K.; Schneider, M., *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5875-5878.
- (20) Shizuka, M.; Snapper, M. L., *Synthesis* **2007**, *15*, 2397-2403.
- (21) Seidel-Morgenstern, A.; Lorenz, H.; Perlberg, A.; Sapoundjiev, D.; Elsner, M. P., *Chem. Eng. Process.* **2006**, *45*, 863-873.
- (22) Lorenz, H.; Seidel-Morgenstern, A., *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2014**, *53*, 1218-1250.
- (23) Brüsehaber, E.; Böttcher, D.; Liebeton, K.; Eck, J.; Naumer, C.; Bornscheuer, U. T., *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 730-732.
- (24) Smith, M. E.; Fibinger, M. P. C.; Bornscheuer, U. T.; Masterson, D. S., *ChemCatChem* **2015**, *7*, 3179-3185.
- (25) Hummel, A.; Brüsehaber, E.; Böttcher, D.; Trauthwein, H.; Doderer, K.; Bornscheuer, U. T., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8492-8494.
- (26) Smith, M. E.; Banerjee, S.; Shi, Y.; Schmidt, M.; Bornscheuer, U. T.; Masterson, D. S., *ChemCatChem* **2012**, *4*, 472-475.

Supporting information

Recombinant pig liver esterase-catalyzed synthesis of (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate combined with subsequent enantioselective crystallization

Janine Hinze, Philipp Süß, Silja Strohmaier, Uwe T. Bornscheuer, Rainer Wardenga and Jan von Langermann

*E-mail Rainer Wardenga (Enzymicals AG): rainer.wardenga@enzymicals.com and Jan von Langermann (University of Rostock): jan.langermann@uni-rostock.de

Figure SI-1.	Separation and identification of <i>cis</i> -1,4-diacetoxy-2-cyclopentene 1 (substrate), (1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate 2 (product) and (1 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate by GC-FID.	Page 2
Figure SI-2.	Chromatograms (GC) after enantioselective crystallization.	Page 2
Figure SI-3	DSC-result of (1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate 2 after enantioselective crystallization. Page 3	
Figure SI-4	XRPD-results of (1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate 2 and (1 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate in mixture.	Page 3
Figure SI-5	¹ H-NMR of (1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate 2 . Page 4	
Figure SI-6	¹³ C-NMR of (1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate 2 . Page 5	
Figure SI-7	¹ H-NMR of <i>cis</i> -1,4-diacetoxy-2-cyclopentene 1 .	Page 6
Figure SI-8	¹³ C-NMR of <i>cis</i> -1,4-diacetoxy-2-cyclopentene 1 .	Page 7

GC-FID data

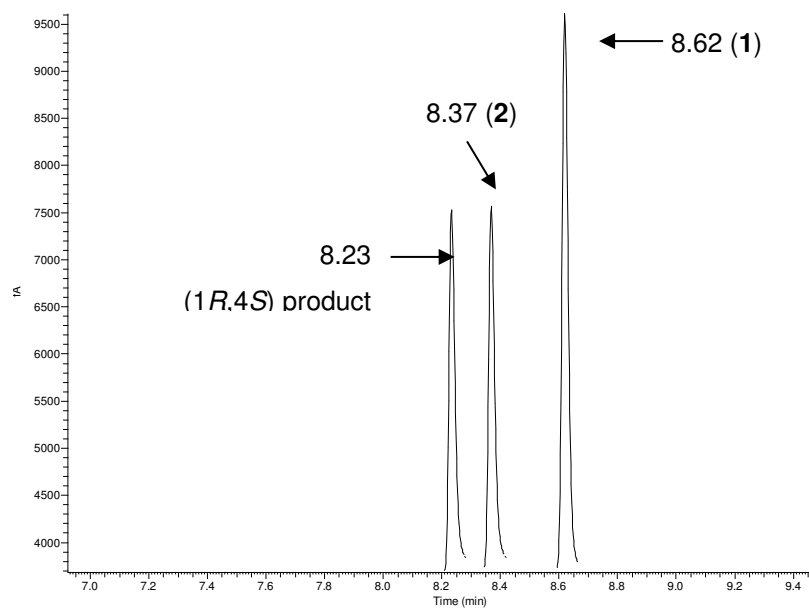


Figure SI-1. Separation and identification of *cis*-1,4-diacetoxy-2-cyclopentene **1** (substrate), (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate **2** (product) and (1*R*,4*S*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate by GC-FID.

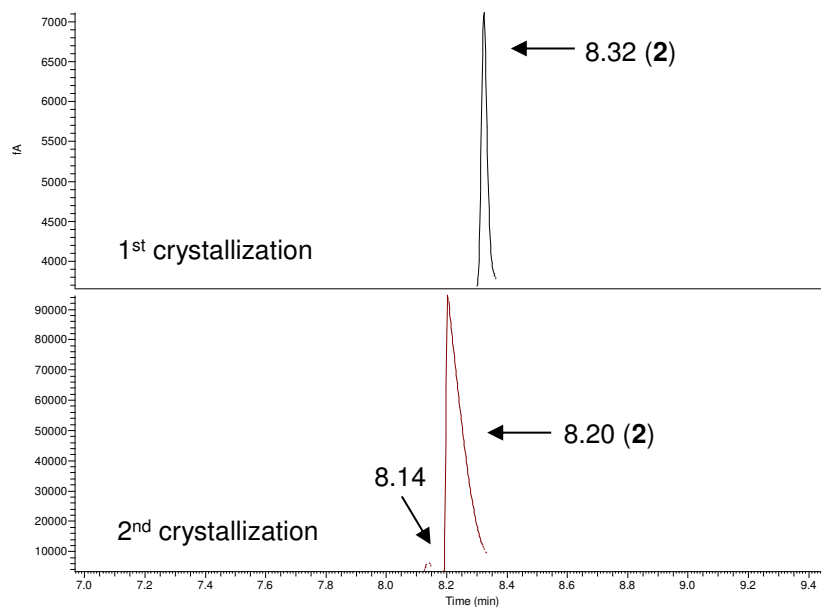


Figure SI-2. Chromatograms (GC) after enantioselective crystallization.

DSC measurements

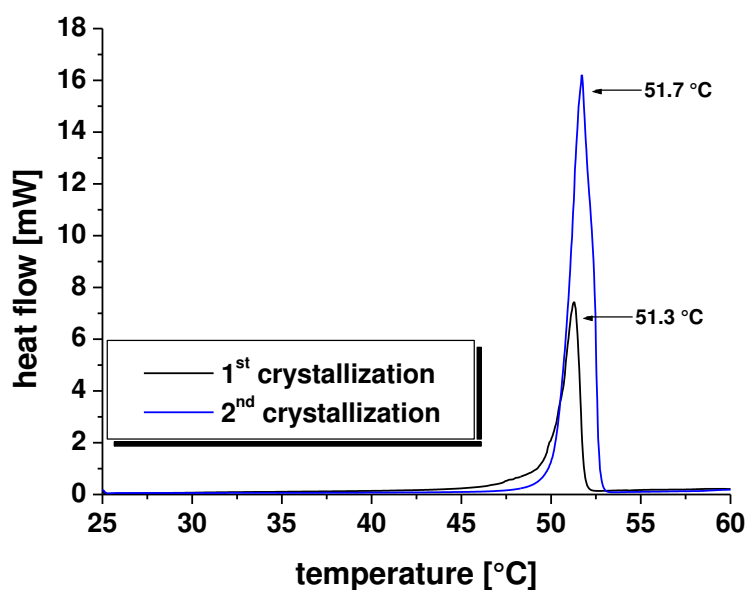


Figure SI-3. DSC-result of (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate **2** after enantioselective crystallization

XRPD measurements

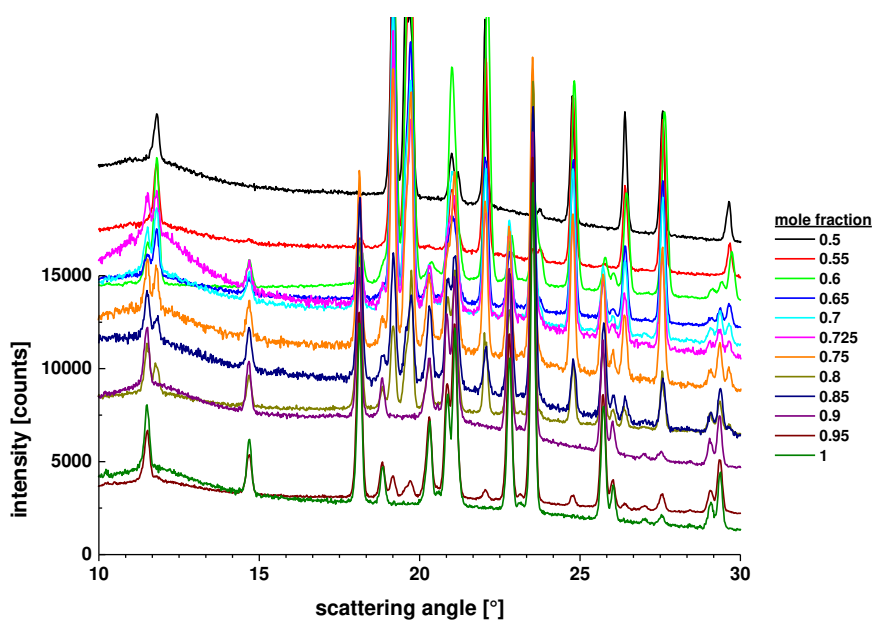


Figure SI-4. XRPD-results of (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate **2** and (1*R*,4*S*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate in mixture.

NMR data

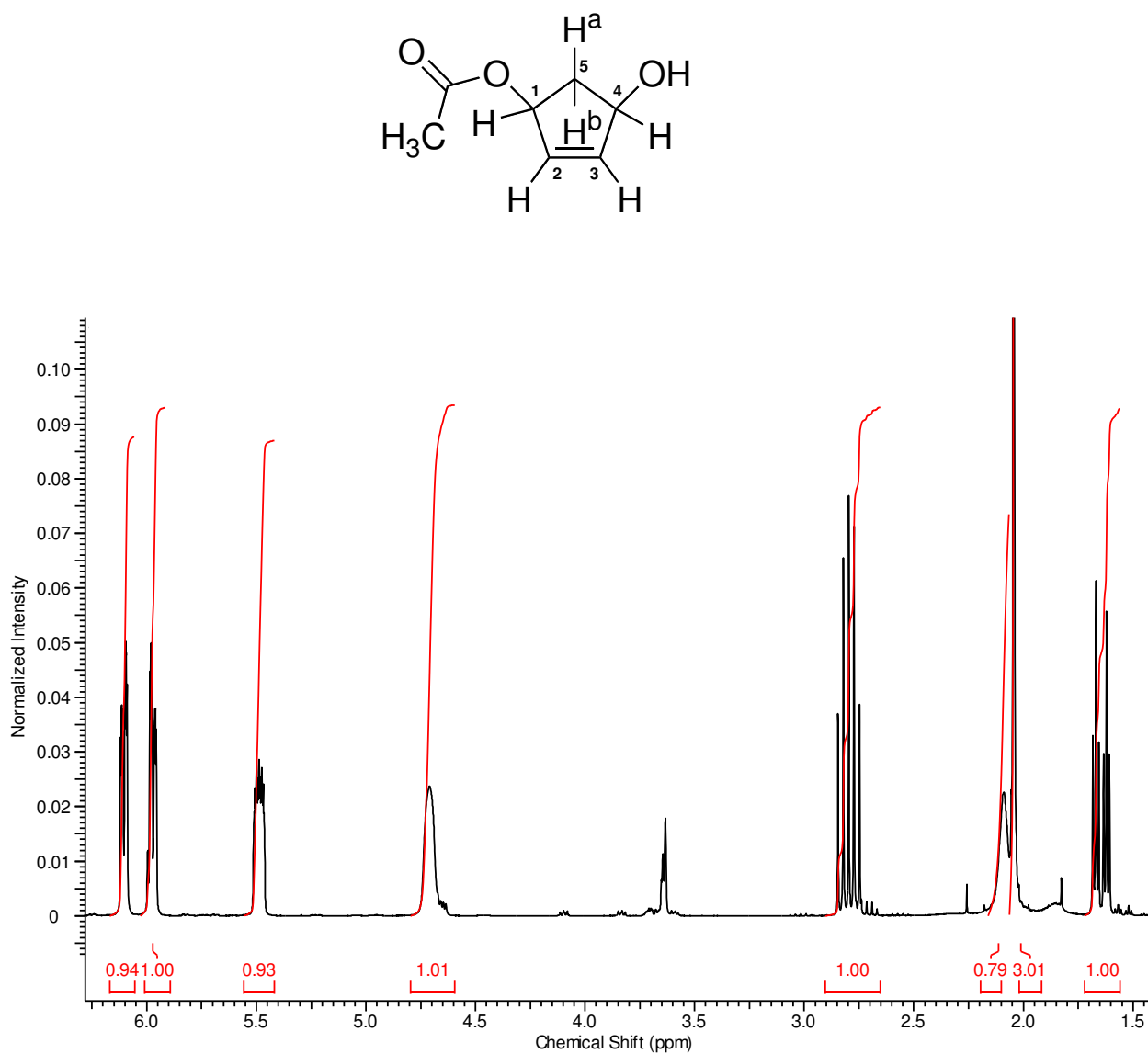


Figure SI-5. ¹H-NMR of (1S,4R)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate **2**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ_H: 1.65 (dt, ³J = 14.5, 4.0 Hz, 1 H, 5-H_A), 2.05 (s, 3 H, CH₃), 2.09 (s, 1 H, OH), 2.80 (quint, J = 7.4 Hz, 1 H, 5-H_B), 4.68-4.74 (m, 1 H, 4-H), 5.46-5.52 (m, 1 H, 1-H), 5.95-6.00 (m, 1 H, 2-H), 6.08-6.13 (m, 1 H, 3-H).

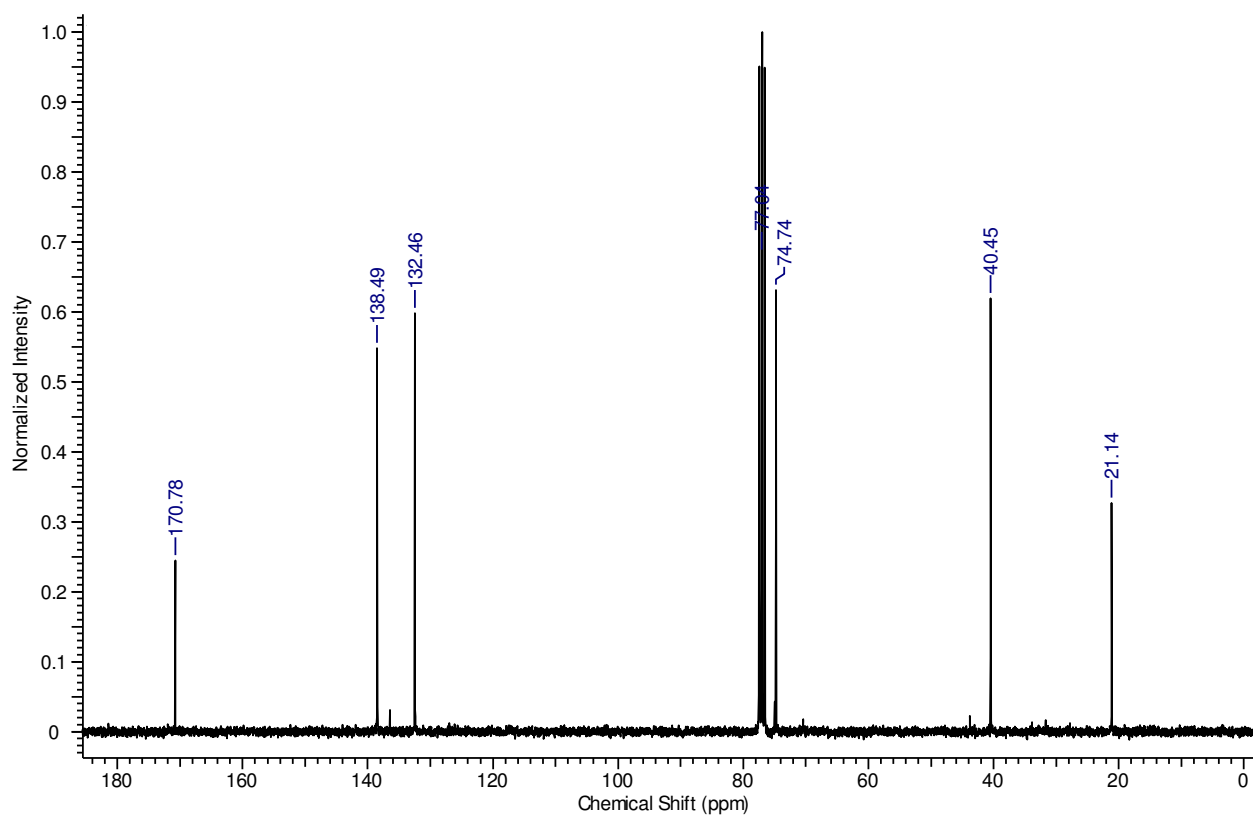


Figure SI-6. ¹³C-NMR of (1*S*,4*R*)-4-hydroxy-2-cyclopentenyl acetate **2**.

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ_c: 21.1 (COCH₃), 40.5 (5-C), 74.7 (4-C), 77.0 (1-C), 132.5 (2-C), 138.5 (3-C), 170.8 (OCOCH₃).

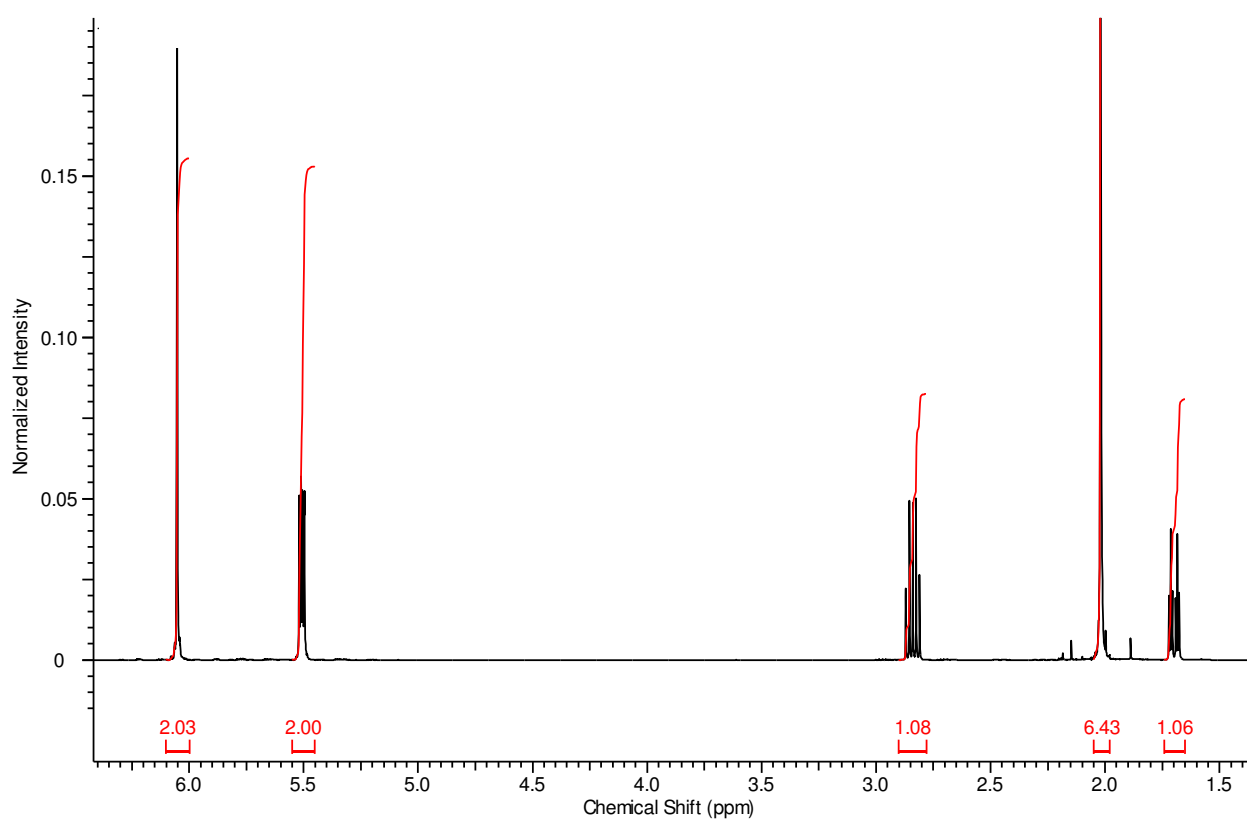
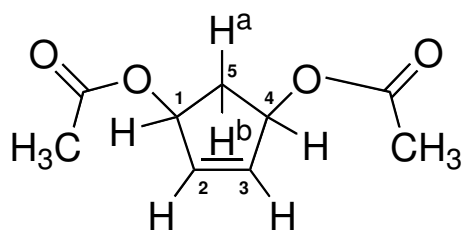


Figure SI-7. $^1\text{H-NMR}$ of *cis*-1,4-diacetoxy-2-cyclopentene **1**.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ_{H} : 1.65 (dt, $^3J = 14.5, 4.0$ Hz, 1 H, 5- H_A), 2.02 (s, 6 H, 2 \times CH_3), 2.84 (quint, $J = 7.4$ Hz, 1 H, 5- H_B), 5.48-5.53 (m, 2 H, 1-H, 4-H), 6.05 (s, 2 H, 2-H, 3-H).

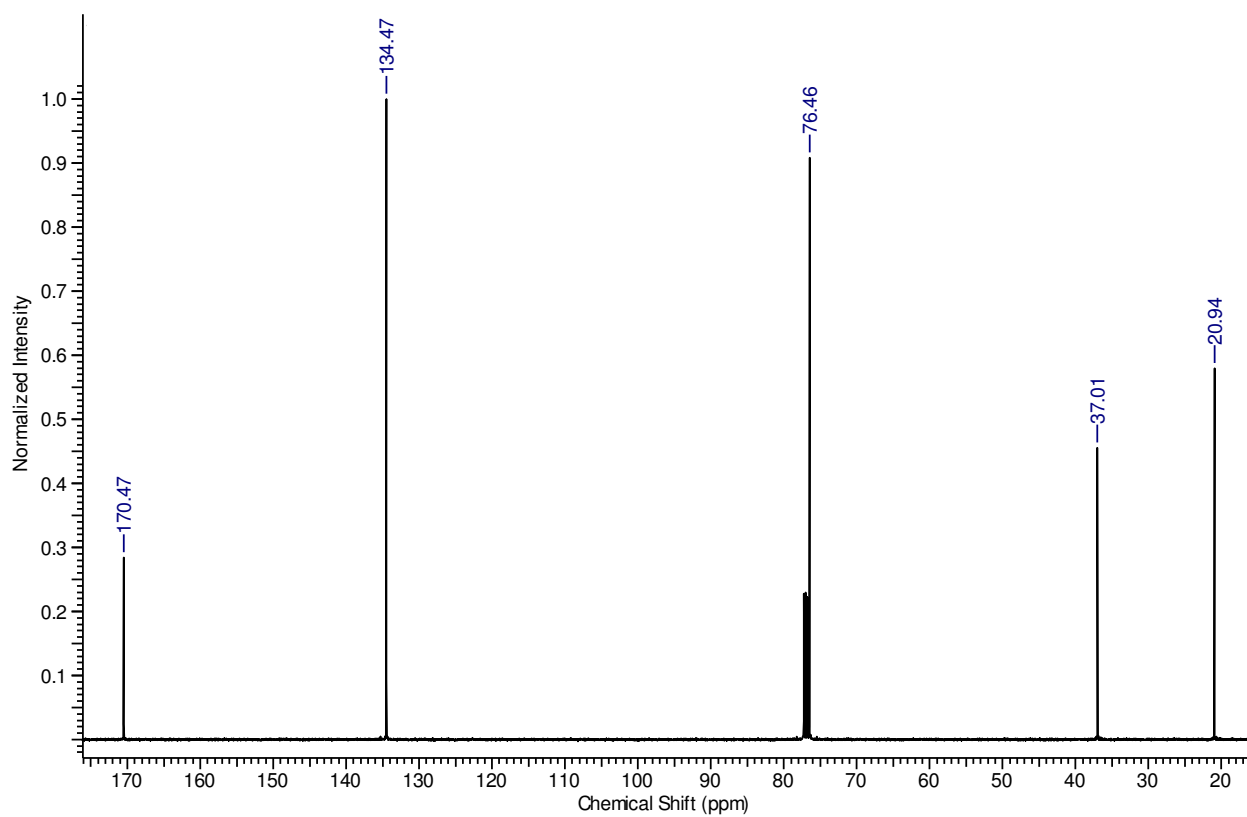


Figure SI-8. ^{13}C -NMR of *cis*-1,4-diacetoxy-2-cyclopentene **1**.

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ_{C} : 20.9 (2x COCH_3), 37.0 (5-C), 76.5 (1-C, 4-C), 134.5 (2-C, 3-C), 170.5 (2x OCOCH_3).

Anteil der Autoren an den Veröffentlichungen

Artikel 1 **Scale-Up of a Recombinant Pig Liver Esterase-Catalyzed Desymmetrization of Dimethyl Cyclohex-4-ene-cis-1,2-dicarboxylate**

Süss, P., Illner, S., v. Langermann, J., Borchert, S., Bornscheuer, U.T., Wardenga, R., Kragl, U. (2014) *Org. Process Res. Dev.*, **18**, 897–903. DOI: 10.1021/op500129e

UK und RW initiierten das Projekt. SI und PS entwickelten und führten die Experimente mit Unterstützung von JvL und SB durch. JvL und PS schrieben das Manuskript und alle Autoren lasen und überarbeiteten das Manuskript.

Artikel 2 **Chemoenzymatic Sequential Multistep One-Pot Reaction for the Synthesis of (1S,2R)-1-(Methoxycarbonyl)cyclohex-4-ene-2-carboxylic Acid with Recombinant Pig Liver Esterase**

Süss P., Borchert S., Hinze J., Illner S., v. Langermann J., Kragl U., Bornscheuer U.T., Wardenga R., (2015) *Org. Process Res. Dev.*, **19**, 2034–2038. DOI: 10.1021/acs.oprd.5b00294

UK und RW initiierten das Projekt. PS entwickelte und führte die Experimente mit Unterstützung von SB, JH, und SI durch. PS schrieb das Manuskript und alle Autoren lasen und überarbeiteten das Manuskript.

Artikel 3 **Recombinant Pig Liver Esterase-Catalyzed Synthesis of (1S,4R)-4-Hydroxy-2-cyclopentenyl Acetate Combined with Subsequent Enantioselective Crystallization**

Hinze J., Süss P., Strohmaier S., Bornscheuer U. T., Wardenga R., v. Langermann J., (2015) *Org. Process Res. Dev.*, **20**, 1258–1264. DOI: 10.1021/acs.oprd.6b00093

JvL und RW initiierten das Projekt. HJ entwickelte und führte die Experimente mit Unterstützung von PS und SS durch. JH und JvL schrieben das Manuskript und alle Autoren lasen und überarbeiteten das Manuskript.

Philipp Süss

Prof. Uwe T. Bornscheuer

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.

Philipp Süß

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Dr. Rainer Wardenga und Dr. Ulf Menyes von der Enzymicals AG für die Bereitstellung dieses spannenden und industrienahen Themas bedanken, sowie für die Möglichkeit die praktischen Arbeiten bei der Enzymicals AG durchzuführen.

Prof. Dr. Uwe T. Bornscheuer möchte ich für die wissenschaftliche Betreuung und die Bereitschaft diese Arbeit als Doktorvater zu begleiten danken.

Ein herzliches Dankeschön geht natürlich an Sonja und Jan die mich in meiner Arbeit immer sehr unterstützt haben und natürlich auch Sabine und Janine, ohne die unsere gemeinsame Arbeit kam möglich gewesen wäre.

Die volle Unterstützung des Teams der Enzymicals AG hat natürlich für die besten Arbeitsbedingungen gesorgt und durch intensives Brainstorming bei dem einen oder anderen Kaffee konnten so manche Hürden überwunden werden. An dieser Stelle möchte ich Ute nochmals für das Korrekturlesen danken.

Wer wäre ich wohl ohne meine Familie und meine Freunde. In allen Lebenslagen kann ich mich auf euch verlassen und möchte DANKE sagen für die viele Unterstützung. Besonderer Dank gilt natürlich meiner Mutter und meinem Bruder: Mami, Falco - Danke dafür das ihr einfach immer da sein und ich weiß, dass ich immer auf euch zählen kann.

Diese Arbeit wäre nie fertiggestellt worden wäre meine wunderbare Frau Rebekka nicht gewesen. Danke für das Verständnis, die vielen übernommenen Aufgaben, die Stunden des Lesens und natürlich für unsere Tochter Emma.