

CAPÍTULO VII

BIOCATÁLISIS APLICADA A LA SÍNTESIS DE FÁRMACOS (II) **ENZIMAS REDOX**

Andrés Rafael Alcántara León

RESUMEN

El empleo de enzimas redox para la obtención de sintones quirales permite al químico farmacéutico disponer de una poderosa herramienta a la hora de diseñar síntesis de fármacos más sostenibles y productivas. En este capítulo se abordará esta metodología, muy común dentro del ámbito de las Biotransformaciones, tanto para procesos de oxidación como de reducción, comentando las dos opciones disponibles (células enteras versus enzimas aisladas), en sus respectivas variantes. Finalmente, se presentarán y comentarán varios ejemplos industriales donde estas metodologías han sido implantadas.

Palabras clave: Biocatálisis; Fármacos; Oxidorreductasas; Enzimas aisladas; Regeneración de cofactores; Células enteras.

ABSTRACT

Biocatalysis applied to the synthesis of drugs (II) redox enzymes

The use of redox enzymes for the production of chiral building blocks is a powerful tool for helping chemists to design more sustainable and productive synthesis of drugs. This chapter will address this approach, very common in the field of Biotransformations, both for oxidation and reduction processes, commenting on the two options available (whole cells versus isolated enzymes) in their respective variants. Finally, we will present and discuss

several industrial examples where these methodologies have been implemented.

Keywords: Biocatalysis; Drugs; Redox enzymes; Isolated enzymes; Cofactor regeneration; Whole cells.

1. INTRODUCCIÓN

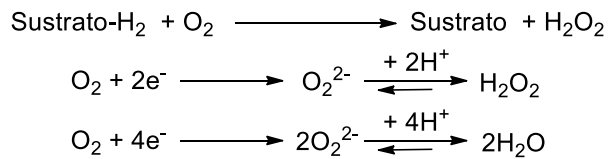
La Síntesis Asimétrica es una disciplina esencial en la obtención de productos de alto valor añadido, y muy especialmente en la síntesis de fármacos, pues más de la mitad de las moléculas necesarias para la producción de los mismos presentan al menos un centro estereogénico (1). Para sintetizar estas moléculas en condiciones respetuosas con el medio ambiente, los catalizadores juegan un papel esencial, siendo necesario el desarrollo de los mismos, tanto químicos como biológicos, debido a su complementariedad. Hoy día se estima que más de un 10% de los procesos industriales de obtención de fármacos precisa de biocatalizadores (2). Aunque probablemente sean las enzimas hidrolíticas las más utilizadas en Biotransformaciones (Ver Capítulo Anterior), no obstante existen otros muchos procesos que conducen a la síntesis de fármacos (o de sintones quirales intermedios), mediados por biocatalizadores de tipo no hidrolítico, que serán objeto de revisión en este capítulo.

2. BIOTRANSFORMACIONES CATALIZADAS POR OXIDORREDUCTASAS

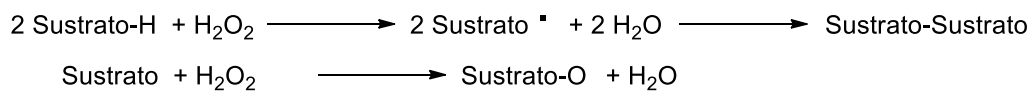
Uno de los retos sin duda más importantes de la Biocatálisis, en su afán de servir como una herramienta destacada dentro de la Química Sostenible (traducción del término “Green Chemistry” (3) y que puede definirse como el diseño de productos y procesos químicos que eliminen o reduzcan el uso y/o la generación de sustancias contaminantes), el desarrollo de oxidaciones y reducciones altamente regio y estereoselectivas, empleando para ello condiciones suaves, compatibles con los conocidos como 12 postulados de la Química Sostenible, definidos originalmente por Anastas y Warner (4). Por tanto, el empleo de oxidorreductasas constituye una alternativa muy atractiva desde el punto de vista medioambiental frente al empleo de catalizadores químicos, que generalmente contienen metales de transición (5). En este sentido, señalaremos que aproximadamente un 25% de las enzimas conocidas

a día de hoy pertenecen a la familia de las oxidorreductasas (6), y el número de las mismas que se encuentran disponibles comercialmente está en continuo incremento (7).

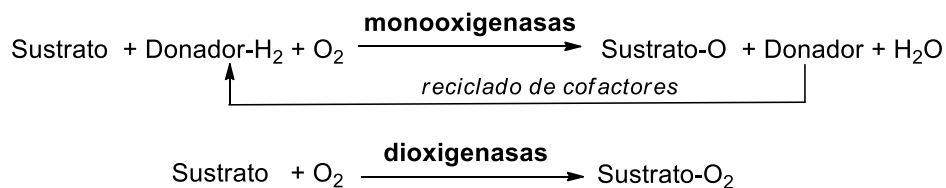
OXIDASAS



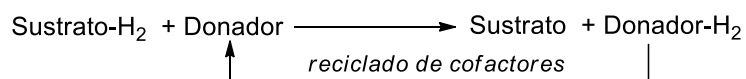
PEROXIDASAS



OXIGENASAS



DESHIDROGENASAS



Esquema 1.- Tipos de Oxidorreductasas.

Estas enzimas redox, catalizan un amplio espectro de reacciones de oxidación y de reducción, y han sido objeto de múltiples revisiones en la bibliografía actual (8); por otra parte, pueden ser divididas en dos grandes grupos, tal y como se refleja en el Esquema 1:

1. oxidasas y peroxidasas, que emplean oxígeno molecular como agente oxidante,
2. oxigenasas (mono y dioxigenasas) y deshidrogenasas, que requieren además el uso de coenzimas solubles complejas.

El principal inconveniente para el empleo industrial de estas últimas, sin duda las más atractivas, radica en el hecho de que precisan cofactores (bien libres, como los dinucleótidos de adenina y nicotinamida (NAD(P)⁺/ NAD(P)H), o bien unidos a la

enzima, como el dinucleótido de adenina y flavina (FAD), el mononucleótido de flavina (FMN) o la pirroloquinolinaquinona (PQQ)) para su actividad. Estos cofactores se consumen de manera equimolecular con el sustrato, por lo que, debido a su elevado precio, requieren el diseño de sistemas que permitan su reciclado (9). Debido a este hecho, se suelen utilizar en forma de células enteras(8d,10), puesto que de esta forma el propio metabolismo celular se encarga de la regeneración de los cofactores; el proceso resulta, por tanto, mucho más ventajoso desde el punto de vista económico, no sólo por este hecho, sino también porque se reducen los costes implicados en el aislamiento y purificación de la enzima.

No obstante, desde el punto de vista de la Química Sostenible, el empleo de células enteras presenta una serie de limitaciones, entre las que podemos señalar las siguientes (11):

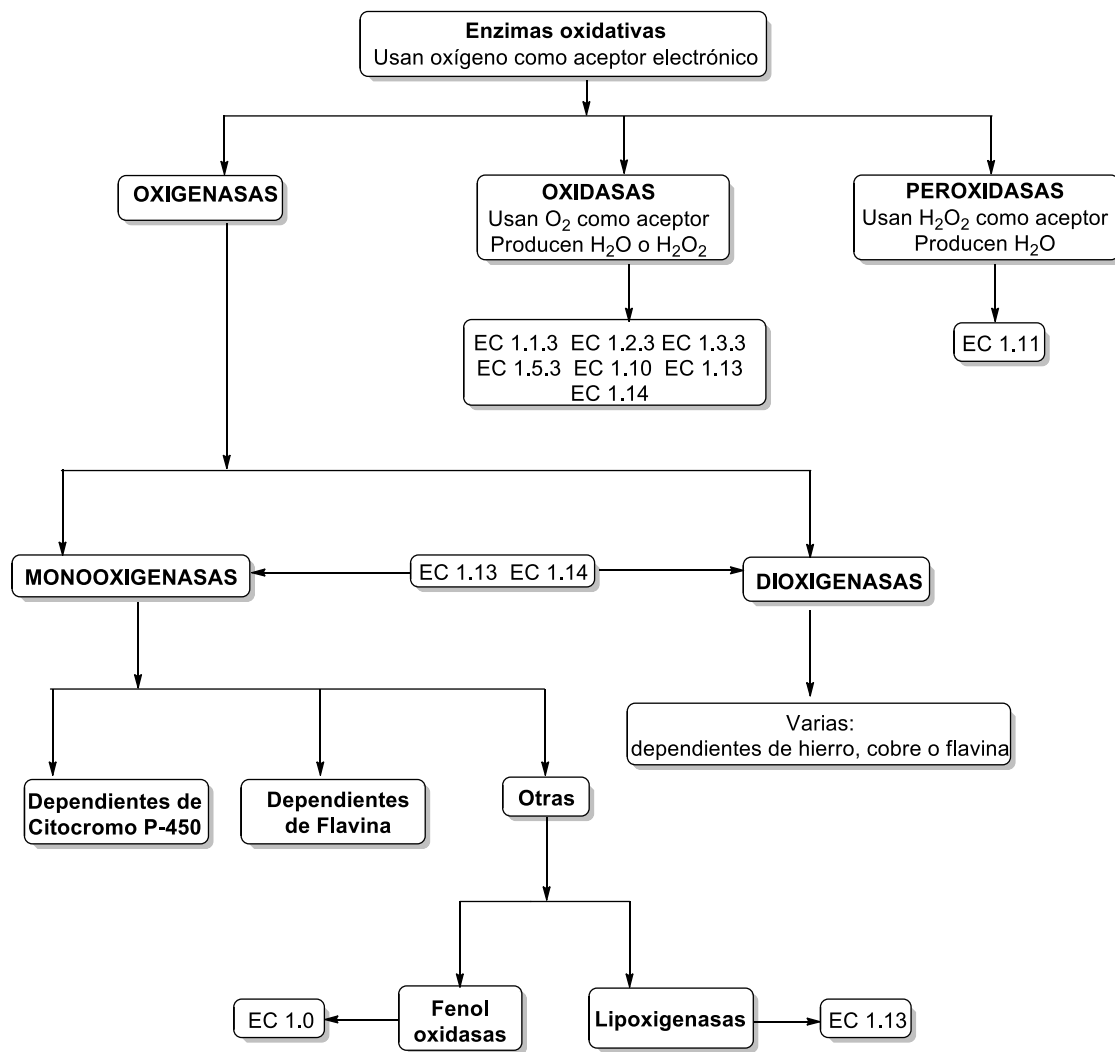
- Baja productividad global, debido al hecho de que los sustratos no naturales que deben transformarse suelen ser tóxicos para las células, y de manera general se toleran solamente en concentraciones bajas, entre el 0,1 y el 0,3 %.
- Bajos rendimientos globales, debido a la gran cantidad de biomasa presente en el medio de reacción, por lo que los procesos de purificación del producto final se hacen complicados. En este sentido, los valores del Factor Medioambiental E (12), un índice quimiométrico que cuantifica la masa de residuos producidos en relación a la masa final de productos, suelen ser bastantes elevados
- Transformaciones incompletas, debido al hecho de que existen diferentes enzimas dentro del sistema celular que pueden trabajar en sentidos opuestos, lo que se traduce en bajas conversiones y/o estereoselectividades. No obstante, el uso de técnicas recombinantes permite expresar solamente la enzima deseada, por lo que estos problemas pueden ser solventados (13).

A continuación, comentaremos una serie de ejemplos de procesos redox (tanto oxidaciones como reducciones) mediados por biocatalizadores tanto en forma de células enteras como de enzimas aisladas que conducen bien a la preparación de

fármacos, o más habitualmente, a sintones para la ulterior preparación de los mismos.

2.1. Oxidaciones catalizadas por oxidorreductasas

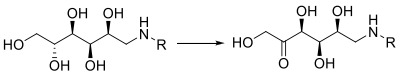
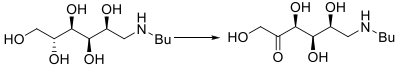
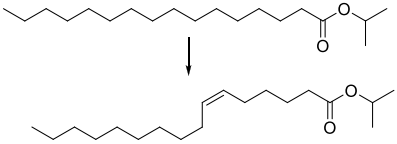
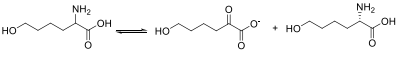
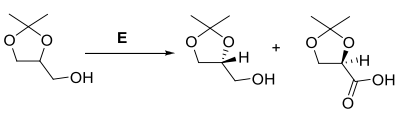
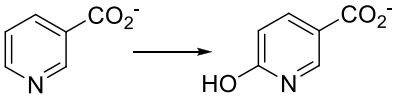
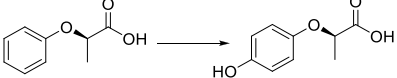
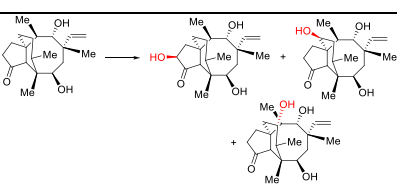
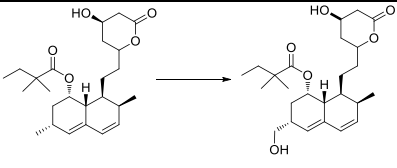
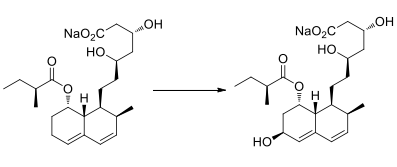
Las biooxidaciones constituyen hoy día una alternativa muy atractiva a los procesos químicos, puesto que permiten solventar problemas de falta de control y de predictibilidad inherentes a estos últimos (8b). La efectividad de los biocatalizadores oxidativos puede atribuirse parcialmente a sus altos potenciales redox, lo que les permite catalizar reacciones sobre sustratos estables, resistentes a oxidantes químicos, para la obtención de productos oxigenados de interés industrial (14), con altas regio y estereoselectividad. Los hidroxí- y oxo- compuestos así obtenidos son esenciales para la obtención de productos de alto valor añadido, por lo que las biooxidaciones proporcionan alternativas viables frente a los procesos químicos, de manera que las rutas biocatalíticas suelen ser mucho más sostenibles (15). En los seres vivos, las enzimas oxidativas pueden estar involucradas en procesos metabólicos primarios o secundarios, aunque requieren cofactores que sí son productos metabólicos primarios. En el Esquema 2, aparece la clasificación de las enzimas oxidativas atendiendo a la naturaleza del agente oxidante (el aceptor electrónico) y a los productos de reacción.

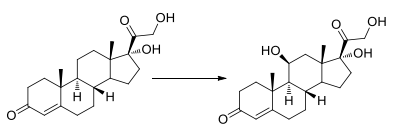
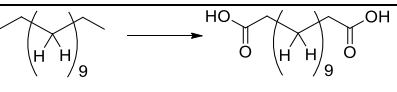
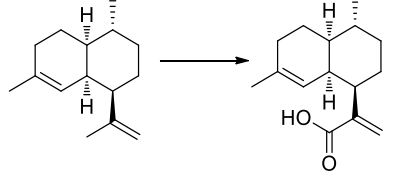
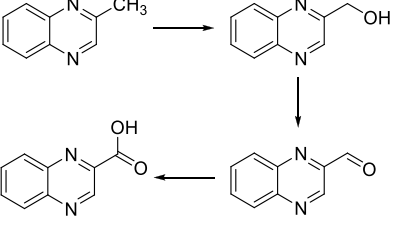
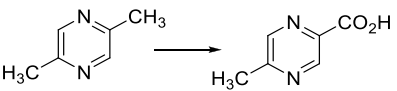
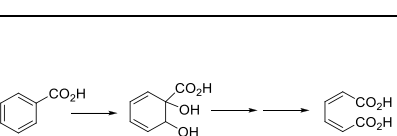
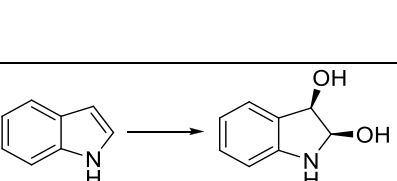
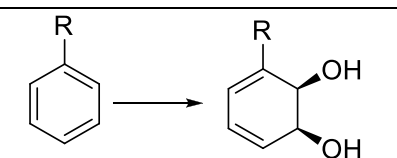
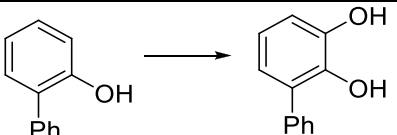
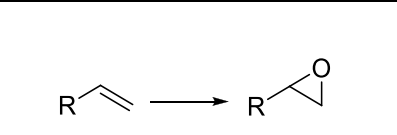


Esquema 2. Enzimas oxidativas

Algunos ejemplos industriales de aplicación de enzimas redox en proceso de oxidación aparecen reflejados en la Tabla I.

Tabla I. Biooxidaciones industriales, clasificadas en función del tipo de enzima.

Entr.	BIO-OXIDATION	RENDIMIENTO	BIOCATALIZADO ^a	COMPAÑÍA
DESHIDROGENASAS				
1		90%	<i>Gluconobacter oxidans</i> , EC 1.1.99.21	Bayer AG ¹⁶
2		58% (700 kg en 48 h)	<i>Gluconobacter oxidans</i> ATCC 621, EC 1.1.99.21	Pharmacia ¹⁷
3		97%	<i>Rhodococcus</i> sp. KSM-B-MT66 (mutante)	Kao Corporation ¹⁸
OXIDASAS				
4		50%	<i>Trigonopsis variabilis</i> ATCC 10679, EC 1.4.3.3	Bristol-Myers Squibb ¹⁹
5		50% (98 % ee alcohol, 90% ee ácido)	<i>Rhodococcus erythropolis</i> .	International BioSynthetic s, Inc. ²⁰
6		> 90%	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> , EC 1.17.1.5	Lonza AG ²¹
7		>99.5%	<i>Beauveria bassiana</i> LU 700	BASF AG ²²
OXIGENASAS				
8		77.9%	Células enteras vivas de <i>Streptomyces</i> sp. SC 1754 EC 1.14.13.XX	Bristol-Myers Squibb ²³
9		24%	<i>Nocardia autotropica</i>	Merck Sharp & Dohme ²⁴
10		> 70%	<i>Streptomyces</i> sp. Y-110	Sankyo Company/ Bristol-Myers Squibb ²⁵

11			<i>Curvularia lunata</i>	Pfizer Inc/Bayer Schering Pharma ²⁶
12			<i>Candida tropicalis</i>	Cognis Inc ²⁷
13			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Amyris Biotechnologies Inc ²⁸
14		86%	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 33015	Pfizer Inc ²⁹
15		> 99.5%	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 33.015 EC 1.14.13.X	Lonza Ag ³⁰
16		> 99%	<i>Arthrobacter</i> , EC 1.13.11.1	Mitsubishi Chemical Corporation ³ 1
17		n.r.	<i>Pseudomonas putida</i> , EC 1.13.11.11	Genencor International, Inc. ³²
18		n.r.	<i>Pseudomonas putida</i> , EC 1.14.12.20	ICI ³³
19		97%	<i>Escherichia coli</i> JM101, EC 1.14.13.44	Sigma Aldrich ³⁴
20			<i>Nocardia coralline</i> EC 1.14.14.1	Nippon Mining Holdings, Inc. ³⁵

21		92.7% (ee > 99%)	<i>Escherichia coli JM</i> 101 EC 1.14.13.69	DSM ³⁶
22		> 90%	<i>Pseudomonas</i> <i>oleovorans ATCC</i> 29347 EC 1.14.X.X	DSM ³⁷
23		92%	<i>Acinetobacter</i> <i>calcoaceticus</i> , EC 1.14.13.22	Sigma Aldrich ³⁸

^a Células en reposo excepto si se indica lo contrario.

Las **deshidrogenasas** catalizan reacciones de reducción de cetonas, aminaciones reductoras, reducciones de alquenos, y oxidación de alcoholes y aldehidos (39); aunque pueden emplearse en ambos sentidos del proceso redox, generalmente se emplean principalmente en el sentido de reducción de enlaces C=O o C=C, como se verá más adelante, puesto que este proceso implica la creación de la menos un estereocentro en el producto de reacción. Cuando se utilizan en el sentido de oxidación, se suele buscar un proceso regioselectivo de oxidación de una función determinada sin alterar otras similares. Como ejemplos industriales, las oxidaciones regioselectivas del 1-amino-*D*-sorbitol *N*-protegido (entrada 1) y de la *N*-butilglucamina (entrada 2) catalizadas por células enteras de *Gluconobacter oxydans* ilustran perfectamente la exquisita regioselectividad en la oxidación del grupo OH en la posición C5; los productos de reacción (derivados de sorbosa) son intermedios en la síntesis de inhibidores de la α -glucosidasa por vía oral, activos para el tratamiento de problemas metabólicos asociados con los carbohidratos (16) o contra infecciones retrovirales (17). Otro ejemplo de deshidrogenación regioselectiva es el proceso desarrollado por Kao Corporation (entrada 3) para la deshidrogenación del palmitato de isopropilo y otros ésteres de ácidos grasos empleando una desaturasa modificada por ingeniería genética, para la obtención de alquenos *cis* con un doble enlace ubicado a 9 átomos de carbono de distancia respecto al metilo terminal (18); los *cis*-alquenos obtenidos se usan posteriormente para la preparación de fármacos de aplicación dermatológica.

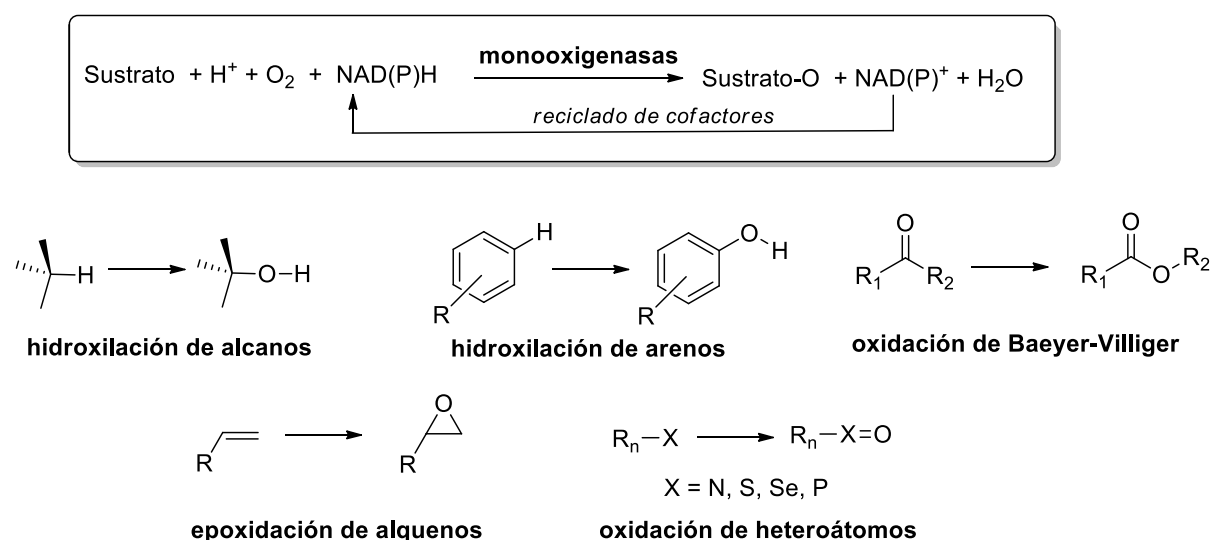
Por otra parte, las **oxidadas** pueden catalizar una gran variedad de reacciones de oxidación, tales como la oxidación de aminas (oxidadas de aminoácidos), la oxidación de alcoholes (por ejemplo, en hidratos de carbono), el

cierre del anillo oxidativo, descarboxilación oxidativa, y las reacciones de hidroxilación. Sin embargo, este último proceso no es típico de oxidasas, ya que el O_2 sólo sirve como receptor de electrones y no como donante de oxígeno. Algunos ejemplos industrialmente relevantes de la utilización de las oxidasas se muestran en la Tabla 1. La resolución cinética de la 6 hidroxinorleucina racémica (entrada 4) se lleva a cabo a través de la oxidación enantioselectiva (actividad *D*-aminoácido-oxidasa) del enantiómero *R*, y conduce al enantiómero *S*, el cual es un intermedio quiral en la síntesis de inhibidores de vasopeptidasa y de inhibidores de metaloproteasas, con acción antihipertensiva (19). Una oxidación de alcoholes catalizada por células enteras se ejemplifica con otra resolución cinética, en este caso del isopropilidenglicerol (entrada 5), permitiendo la obtención de dos compuestos (*R*-isopropilidenglicerol y ácido *R*-isopropilidenglicérico), muy útiles como materiales de partida para la síntesis de diferentes productos biológicamente activos (20). Por otra parte, la hidroxilación de niacina a 6 hidroxinicotinato (entrada 6), precursor de diversos insecticidas (21), o la para-hidroxilación del ácido *R*-2-fenoxipropiónico (POPS, entrada 7)) para la obtención del HOPS (precursor de diferentes herbicidas) (22), son otros ejemplos de hidroxilaciones mediadas por oxidasas.

Las **oxigenasas** son, sin lugar a dudas, los biocatalizadores de oxidación más interesantes. Estas enzimas catalizan la introducción específica de uno o dos átomos de oxígeno en el sustrato a partir de O_2 , en condiciones de reacción muy suaves. Estos procesos transcurren de forma muy específica, y suponen una estrategia sintética de oxifuncionalización muy interesante, puesto que por norma general no existe una alternativa por vía química (40). La gran variedad de oxigenasas existente, y su alta capacidad para introducir específicamente átomos de oxígeno directamente a partir de O_2 , así como la no necesidad de utilizar peróxidos como sustratos (reactivos altamente desestabilizadores de las enzimas), ha hecho que su empleo a nivel industrial se haya extendido (41). Tal y como comentamos con anterioridad (ver Esquema 1), las monooxigenasas y dioxigenasas introducen uno o dos átomos de oxígeno en el sustrato, obteniéndose un equivalente de agua como co-producto en el caso de las monooxigenasas. Estas enzimas son activas sobre una gran variedad de sustratos, debido a la diferente naturaleza de los tipos de compuestos que deben detoxificar y degradar; es por ello por lo que no es de

extrañar que estén descritos en la bibliografía numerosos ejemplos de empleo de estas enzimas en Biotransformaciones (41a, 42).

Como se indica en el Esquema 3, las **monooxigenasas** catalizan la introducción de un átomo de oxígeno en una molécula de sustrato, generalmente usando NADH o NADPH como cofactor para lograr el potencial reductor que aporte los electrones al sustrato. Estos sistemas pueden ser dependientes de grupos hemo, flavina o metales, siendo sin duda los sistemas dependientes de citocromo P-450 los mejor caracterizados, y permiten llevar a cabo los procesos indicados en el Esquema 3.



Esquema 3.- Reacciones catalizadas por monooxigenasas.

Algunas aplicaciones industriales de oxigenasas se muestran en la Tabla I. Como ejemplos de hidroxilación en sistemas C(sp³)-H, citaremos la monohidroxilación de la mutilina (entrada 8) para producir (2S)-, (8S)- y (7S)-hidroximutilina, que son análogos del antibiótico tiamulina (23), la 6β-Monohidroxilación de la simvastatina (entrada 9) para producir un metabolito con mayor actividad anticolesterolémica (24), o la biotransformación de la compactina para la obtención de la pravastina (25) (entrada 10), también con propiedades anticolesterolémicas. La hidroxilación de esteroides es un campo muy tradicional en las biotransformaciones (8d,43); en este sentido, un ejemplo clásico es la transformación del 11-desoxicortisol (sustancia S de Reichstein, 17α, 21

dihidroxiprogesterona) en hidrocortisona, descrita por Pfizer en 1965 utilizando células *Curvularia lunata* (entrada 11) (26) .

Por lo que respecta a las hidroxilaciones de sistemas C(sp³)-H alílicos y bencílicos, estos procesos normalmente no se detienen en el paso de inserción del OH-, sino que suelen conducir a ácidos carboxílicos. Como ejemplo de oxidación alílica citaremos la producción del medicamento antipalúdico artemisinina (entrada 13) a partir de sustratos baratos y renovables. En este sentido, la *S. cerevisiae* ha sido modificada para trabajar sobre un terpenoide endógeno en dos etapas, catalizadas por una amorfadieno sintasa y una monooxigenasa (CYP71AV1), de manera que se produce una hidroxilación en tres pasos (28). Otros ejemplos de oxidaciones bencílicas son la oxidación de la 2-metilquinoxalina al ácido quinoxalina 2-carboxílico, que se utiliza en la síntesis de una variedad de compuestos biológicamente activos (entrada 14) (29), o la producción del ácido 5-metilpirazina-2-carboxílico, precursor del antipolítico acipimox y del hipoglucemiante glipicida (entrada 15) (30). Por otro lado, la oxidación de un grupo metilo hasta CO₂H también es posible en simples carbonos alquílicos, como se demuestra en la biooxidación del *n*-tridecano hasta ácido α,ω -tridecanóico (entrada 12) (27), donde el empleo de una estrategia de control optimizado del pH durante el cultivo de una cepa mutante de *Candida tropicalis* en condiciones *fed-batch* ha permitido la producción de ácidos dicarboxílicos a partir de alcanos en concentraciones que pueden llegar hasta 166 g l⁻¹.

En otro orden de cosas, las hidroxilaciones aromáticas constituyen unos procedimientos muy útiles para obtener algunos productos muy interesantes. Así, la producción de ácido *cis*, *cis*-mucónico (entrada 16, intermedio en la síntesis de distintos fármacos y productos agroquímicos (31)), de 2,3-dihidro-1*H*-indol-2 ,3-diol (entrada 17, precursor del colorante azul índigo (32)), o del 1,2-deshidrocatecol (33) (precursor de fármacos antivirales de tipo β -lactámico) son buenos ejemplos de un proceso (hidroxilación con rotura de la estructura aromática) muy difícil de obtener por métodos puramente químicos: sin embargo, también es posible obtener catecoles, como lo demuestra el proceso indicado en la entrada 19, ilustrativo de cómo se pueden obtener catecoles con un sustituyente en la posición 3, precursores de distintos fármacos (34).

Por último, otros procesos muy atractivos mediados por monooxigenasas son las epoxidaciones de alquenos (entradas 20-22) y las oxidaciones Baeyer-Villiger (entrada 23). De hecho, los epóxidos son materias primas muy valiosas para la producción de muchos compuestos útiles, especialmente cuando la biooxidación conduce a oxiranos quirales, tales como los procedimientos aplicados por DSM y que se especifican en las entradas 21 y 22. Por su parte, la oxidación de Baeyer-Villiger es una excelente manera de producir ésteres o lactonas a partir de cetonas; una vez más, las monooxigenasas son los biocatalizadores que son capaces de mediar en esta reacción (44), y Sigma Aldrich (entrada 23) ha demostrado que esta biotransformación puede ser escalada hasta producción industrial (38).

2.2. Reducciones catalizadas por oxidorreductasas

A lo largo de los últimos años, la demanda de compuestos enantiopuros ha crecido de forma sustancial, principalmente dentro del ámbito de las industrias de aromas y agroquímica, y de forma aún más destacada en la industria farmacéutica (45). De forma general, los compuestos enantiopuros obtenidos a nivel industrial deben cumplir una serie de requisitos (46):

1. Los compuestos deben ser moléculas polifuncionales, sintones intermedios en procesos posteriores de síntesis orgánica.
2. La producción se lleva a cabo en escalas relativamente pequeñas (entre 1-1000 toneladas al año para productos farmacéuticos).
3. Los procesos de producción deben llevar a compuestos con alta pureza (>99%).
4. Los compuestos obtenidos deben tener un alto valor añadido.

En este sentido, la reducción estereoselectiva de un carbonilo proquiral (C=O) en un alcohol que posee un centro estereogénico (*CH-OH) es un proceso de gran importancia dentro del ámbito de la Síntesis Asimétrica, puesto que supone un proceso directo que transcurre con gran economía atómica (47) para la obtención de alcoholes enantioméricamente puros. En 2002, la producción de alcoholes quirales supuso unas ventas de 7 billones de dólares, estimándose un aumento de hasta 14,9 billones para el 2009 (48). Debido a la enorme importancia de este tipo de compuestos en la síntesis de fármacos y moléculas bioactivas, la reducción estereoselectiva de cetonas ha adquirido un enorme interés industrial, y a este

efecto se han descrito numerosas rutas catalíticas; así, la hidrogenación asimétrica de cetonas catalizada por metales (49) o el empleo de boranos (50) constituyen procesos que han sido descritos de manera eficiente a escala industrial. No obstante, se suelen precisar condiciones poco compatibles con la Química Sostenible (3,4-51) tales como temperaturas elevadas y el empleo de disolventes y/o reactivos tóxicos.

De forma complementaria a estos procesos quimio-catalíticos, la reducción estereoselectiva de cetonas empleando biocatalizadores (biorreducción (48)) constituye una alternativa muy eficiente y atractiva, que opera en condiciones de pH y temperatura mucho más suaves. En efecto, esta tecnología ha conseguido salir del ámbito puramente académico (52) hasta convertirse en una plataforma tecnológica perfectamente viable a nivel industrial (53). Así, la excelente eficacia catalítica, unida a la alta estereoselectividad que se puede obtener, son los grandes avales de los procesos de biorreducción a nivel industrial, por lo que no es de extrañar que su aplicabilidad industrial, en particular para la producción de alcoholes enantioméricamente puros como intermedios de fármacos, haya sido claramente demostrada a través de un amplio abanico de aplicaciones tecnológicas en las industrias química y farmacéutica (54).

Las enzimas que catalizan los procesos de biorreducción son oxidorreductasas, clasificadas como E.C.1, según el NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biotechnology and Molecular Biology) (55). Una posterior clasificación de las mismas las distingue en función del sustrato que reducen (u oxidan, dada la reversibilidad de la reacción). De manera paralela, las oxidorreductasas han sido organizadas en superfamilias, según la similitud de su secuencia primaria y el tipo de plegamiento de su estructura secundaria, por lo que estas superfamilias se solapan entre sí al considerar el tipo de sustrato sobre el que actúan. Las superfamilias descritas para la biorreducción de compuestos carbonílicos son:

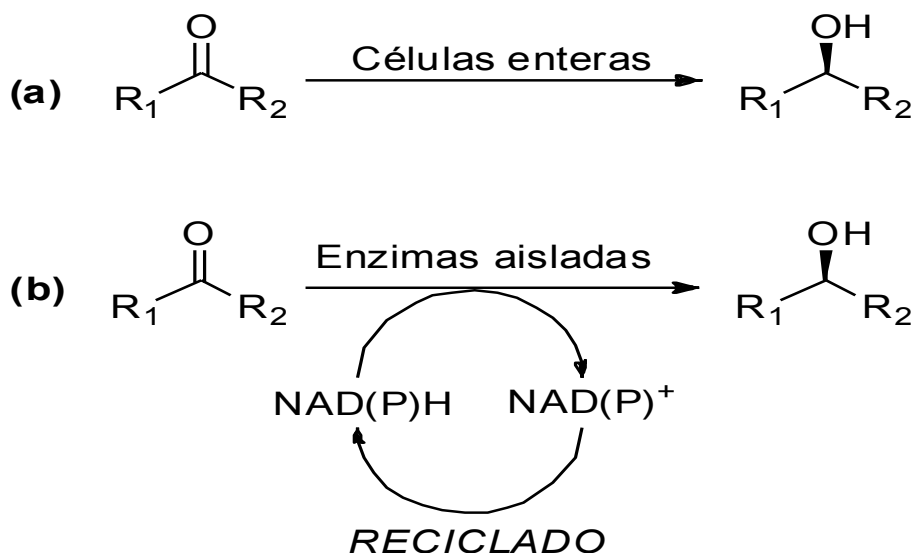
Deshidrogenasas/Reductasas de cadena corta (SDRs, *short-chain dehydrogenases/reductases*). Son enzimas monoméricas pequeñas, de aproximadamente 250 residuos aminoacídicos, que divergen mucho en su secuencia primaria, presentando entre sí una similitud de entre un 15-30% (56). No

obstante, todas se caracterizan por tener un plegamiento de Rossmann (57) (un motivo estructural clásico de proteínas de unión a nucleótidos, particularmente el cofactor NAD, compuesto por tres o más láminas beta paralelas unidas por dos hélices alfa en el orden topológico de beta-alfa-beta-alfa-beta), y un centro activo compuesto por una tétrada altamente conservada formada por Asn, Ser, Tyr y Lys (58). Su preferencia por el cofactor depende de su origen: en levaduras, las SDRs dependen de NADPH, mientras que para humanos, plantas o ratones la distribución entre las que dependen de NADPH y las que lo hacen de NADH es bastante más equilibrada (59). Estas enzimas pueden reducir aldehídos, cetonas, dicetonas y oxoésteres.

Deshidrogenasas/Reductasas de cadena media (MDRs, *medium-chain dehydrogenases/reductases*). Son muy divergentes en su secuencia primaria (59c, 60) (aunque su estructura tridimensional es similar, con un requerimiento general de una tirosina en el centro activo), por lo que estudios filogenéticos las dividen en subfamilias, familias y macrofamilias (61). Todas ellas usan NADH o NADPH, y el centro activo de algunas posee un átomo de zinc, que está involucrado en la transferencia de electrones hasta la molécula aceptora. Al igual que las SDRs, pueden reducir aldehídos, cetonas, dicetonas y oxoésteres.

Aldo-ceto reductasas (*Aldo-Keto Reductases*, **AKRs).** Esta superfamilia se caracteriza por una tétrada conservada (His, Tyr, Asp, Lys) de residuos en el centro activo (62). Son enzimas monoméricas, de entre 34 y 37 KDa, dependientes de NADPH o NADH (algunas AKRs pueden aceptar ambos, aunque con diferente constante de afinidad (63). Existe una página web (64) dedicada a esta superfamilia, donde se presentan diferentes miembros de la misma, caracterizados por una estructura tridimensional tipo $(\alpha\beta)_8$, llamada barril TIM (65), motivo estructural de proteínas muy conservado que consiste en ocho hélices alfa y ocho láminas beta paralelas que se alternan en el esqueleto de la proteína. Al igual que las SDRs y las MDRs, pueden reducir aldehídos, cetonas, dicetonas y oxoésteres.

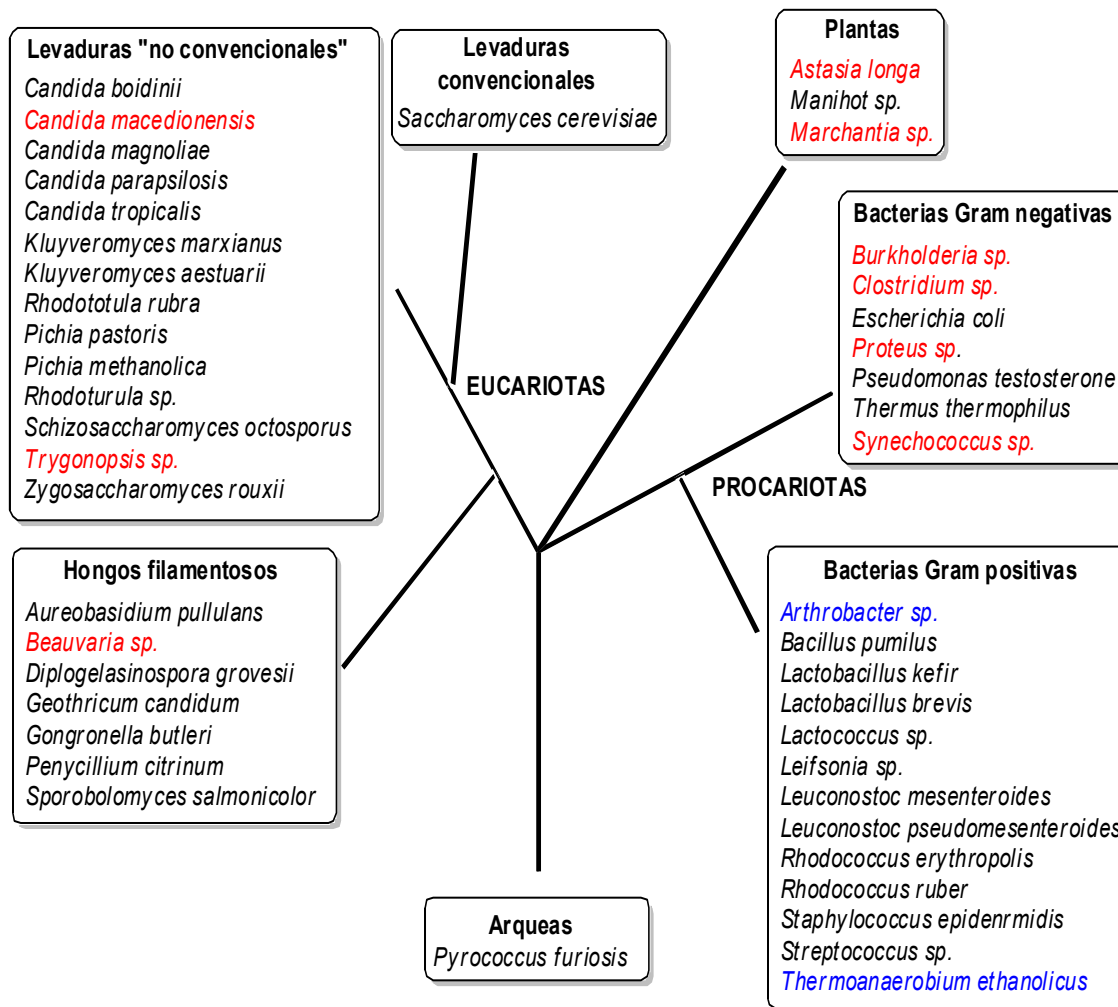
Superfamilia de reductasas dependientes de mononucleótido de flavina (FMN). Estas enzimas se conocen como las “**viejas enzimas amarillas**” (**OYE**, *old yellow enzymes*), debido a su color asociado al cofactor de flavina. Son enoato reductasas (EC 1.3 o EC 1.6), que son capaces de reducir dobles enlaces C=C (66)



Esquema 4.- Procesos de Biorreducción de compuestos carbonílicos.

La biorreducción de compuestos carbonílicos puede ser catalizada bien por células enteras **(a)** o enzimas aisladas **(b)**, como se indica en el Esquema 4. Puesto que, tal y como indicamos anteriormente, tanto las SDRs como las MDRs y las AKRs pueden catalizar la reducción de compuestos carbonílicos, utilizaremos el término genérico de **Carbonil Reductasas (CRs)** (48) para referirnos a ellas.

En la bibliografía, se han descrito una gran variedad de enzimas y de microorganismos de múltiples géneros, desde arqueas hasta plantas capaces de catalizar reacciones de reducción (54b, 67); en el Esquema 5 se recogen diferentes microorganismos usados para procesos redox, mientras que la Tabla II presenta las CRs habitualmente usadas como enzimas aisladas. En una excelente revisión recientemente publicada (48), se recogen las principales CRs disponibles, siguiendo como criterios los siguientes: que permitan obtener algún producto con un exceso enantiomérico mayor de 98%, que hayan sido descritas en reacciones con volúmenes al menos de 10 mL y que la enzima responsable de la reducción asimétrica haya sido caracterizada.



Esquema 5.- Origen de las principales oxidorreductas descritas para la reducción estereoselectiva de compuestos carbonílicos (negro), alquenos (rojo) y aminación reductiva de oxoácidos (azul).

El uso de enzimas aisladas a escala preparativa y a nivel industrial ha sido objeto de recientes revisiones (68). De forma general, las enzimas que se emplean en las industrias alimentarias, farmacéutica, agroquímica, son catalizadores que permiten alcanzar unos incrementos en las velocidades de reacción de hasta 10^7 veces comparados con los catalizadores químicos, y trabajando a condiciones mucho más suaves de presión y temperatura (69), y de hecho están consideradas como los biocatalizadores más selectivos de los que se dispone (70). Actualmente, existen en el mercado diferentes "kits" de CRs, donde se comercializan distintas enzimas que pueden ser chequeadas para la reducción de un determinado compuesto carbonílico (por ejemplo, de evocatal GmbH, <http://www.biocatal.com/upload/file/12-adh-kit-1-1-100.pdf>, o de Daicel, <http://www.daicelchiral.com/en/contents/chiralscreen/>).

Tabla II. Principales Carbonil Reductasas (CRs) habitualmente usadas.

Carbonil Reductasa	Especificidad*	Cofactor	Referencias
ADH de levadura	Prelog	NADH	⁷¹
ADH de hígado de caballo	Prelog	NADH	⁷²
ADH de <i>Thermoanaerobium brockii</i>	Prelog	NADPH	⁷³
Hidroxiesteroides DH	Prelog	NADH	⁷⁴
ADH de <i>Candida parapsilosis</i>	Prelog	NADH	⁷⁵
ADH de <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Prelog	NADH	⁷⁶
ADH de <i>Lactobacillus kefir</i>	Anti-Prelog	NADPH	⁷⁷
ADH de <i>Pseudomonas sp.</i>	Anti-Prelog	NADH	⁷⁸

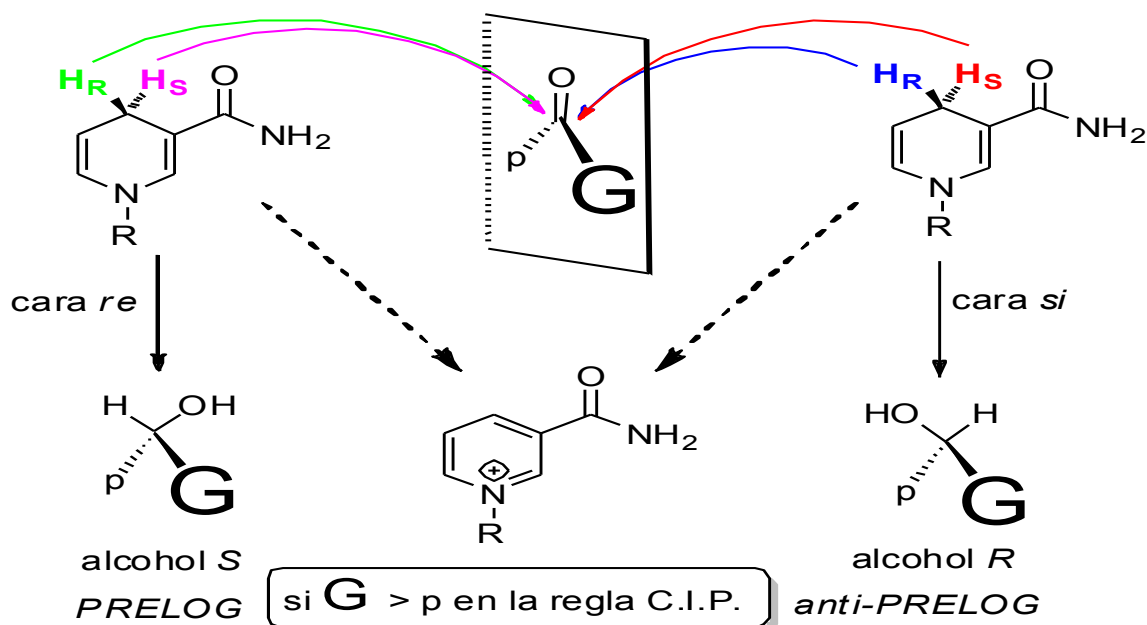
*Ver Esquema 6.

El uso de enzimas aisladas a escala preparativa y a nivel industrial ha sido objeto de recientes revisiones (68). De forma general, las enzimas que se emplean en las industrias alimentarias, farmacéutica, agroquímica, son catalizadores que permiten alcanzar unos incrementos en las velocidades de reacción de hasta 10^7 veces comparados con los catalizadores químicos, y trabajando a condiciones mucho más suaves de presión y temperatura (69), y de hecho están consideradas como los biocatalizadores más selectivos de los que se dispone (70). Actualmente, existen en el mercado diferentes “kits” de CRs, donde se comercializan distintas enzimas que pueden ser chequeadas para la reducción de un determinado compuesto carbonílico (por ejemplo, de evocatal GmbH, <http://www.biocatal.com/upload/file/12-adh-kit-1-1-100.pdf>, o de Daicel, <http://www.daicelchiral.com/en/contents/chiralscreen/>).

En sistemas donde se emplean células enteras (8D), la estereoselectividad de la reacción viene marcada por la que determine la reductasa que predomine dentro

del microorganismo, puesto que pueden existir más de una enzima que presente dicha capacidad (71b). De hecho, ésta suele ser la causa de que a veces la estereoselectividad obtenida con células enteras sea baja, pues esas enzimas pueden tener estereopreferencias opuestas (79). No obstante, el hecho de que existan muchas colecciones de microorganismos comercialmente disponibles (ATCC, NCTC, DSMZ o CCUG (69)) constituye una gran ventaja respecto al empleo de enzimas aisladas, puesto que el número de las mismas al cual se puede acceder comercialmente es mucho más limitado (48,68a). Por otra parte, citaremos que las células enteras pueden ser utilizadas en procesos de biorreducción en diferentes estados (80): en reposo (81), en crecimiento (82), permeabilizadas (83) o liofilizadas (84), aunque generalmente suele ser el primer tipo el más frecuente. Aunque, como hemos señalado anteriormente, la mayoría de los procesos industriales se llevan a cabo empleando células enteras, desde el punto de vista de la Química Sostenible, el uso de enzimas aisladas (o células enteras muertas) es preferible, porque esto permite que no se genere mucha biomasa derivada del crecimiento celular (85) En efecto, una característica habitual de los procesos catalizados por células enteras es su baja productividad, debido a que los sustratos que se desea reducir suelen ser tóxicos para el microorganismo, siendo tolerados de manera general a concentraciones entre el 0,1 y el 0,3% (11). Por ello, la existencia de una gran cantidad de biomasa en el medio de reacción conduciría a bajos rendimientos globales y dificultaría la purificación del sustrato. En este sentido, el parámetro quimiométrico Factor E (cociente (en masa) de productos de desecho respecto a producto final en un esquema sintético) (12b,c, 47) es muy alto para estos procesos

En cualquier caso, las oxidorreductasas responsables de estos procesos, ya sean en forma de enzimas aisladas o células enteras, precisan de cofactores tipo NAD(P)H para suministrar el equivalente de hidruro necesario para la biorreducción, tal y como se indica en el Esquema 6.



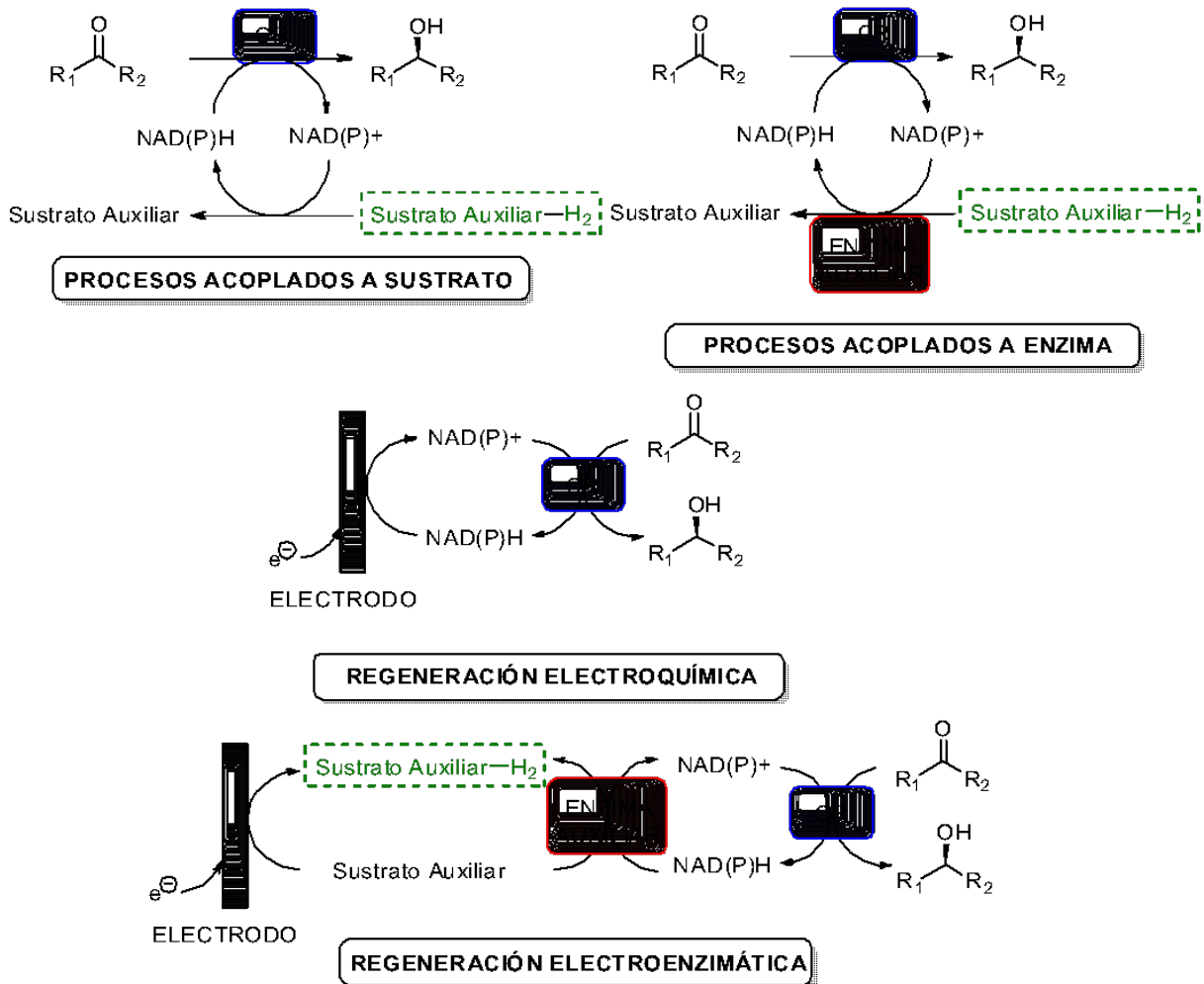
Esquema 6.- Especificidad en la biorreducción de cetonas por CRs.

Durante el curso de la reacción, dicho equivalente se transfiere a través de la cara *re* o la cara *si* de la cetona para originar bien el alcohol *S* o el alcohol *R*. Para la mayoría de los casos, el curso estereoquímico de la reacción puede preverse atendiendo al tamaño relativo de los sustituyentes (*p*, pequeño; *G*, grande) del carbono sp^2 de la cetona, en lo que se conoce como la regla de Prelog (86). En este sentido, y siempre que el tamaño de los sustituyentes se corresponda con la prioridad asignada por las reglas C.I.P. de secuencia, aquellos biocatalizadores que ceden el hidruro por la cara *re* para originar el alcohol *S* reciben el nombre de “Prelog”, mientras que cuando la transferencia de hidruro se realiza por la cara *si* (para originar el alcohol *R*) se habla de CRs “anti-Prelog”. En la Tabla 2 se recoge las preferencias estereoquímicas de las principales CRs comercialmente disponibles.

Por otra parte, hay que considerar que en la reacción de reducción de un compuesto carbonílico hasta el correspondiente alcohol (Esquema 6) se consume un equivalente de cofactor (NAD(P)H) por cada equivalente de sustrato convertido, generando un equivalente de cofactor oxidado (NAD(P)⁺). Debido a este hecho, cuando se emplean enzimas aisladas es necesario desarrollar un sistema de regeneración de cofactor, pues de otra manera el proceso sería económicamente muy desfavorable. Por ello, no es de extrañar que aproximadamente un 75% de los

procesos de biorreducciones industriales empleen células enteras (87), pues en estos casos el microorganismo posee la maquinaria metabólica requerida para la regeneración del cofactor. Existen diferentes formas para llevar a cabo esta regeneración (9b, 88), recogidos en el Esquema 7; los procesos más habituales son aquellos que implican un sustrato auxiliar (procesos acoplados a sustrato), un sustrato auxiliar y una enzima auxiliar (procesos acoplados a enzima), o bien procesos electroquímicos y/o electroenzimáticos, usados a nivel de laboratorio, pero que aún no han encontrado aplicación industrial (88a). De todos ellos, son los acoplados a enzima y/o sustrato los más empleados a nivel industrial (9b,54b,88a).

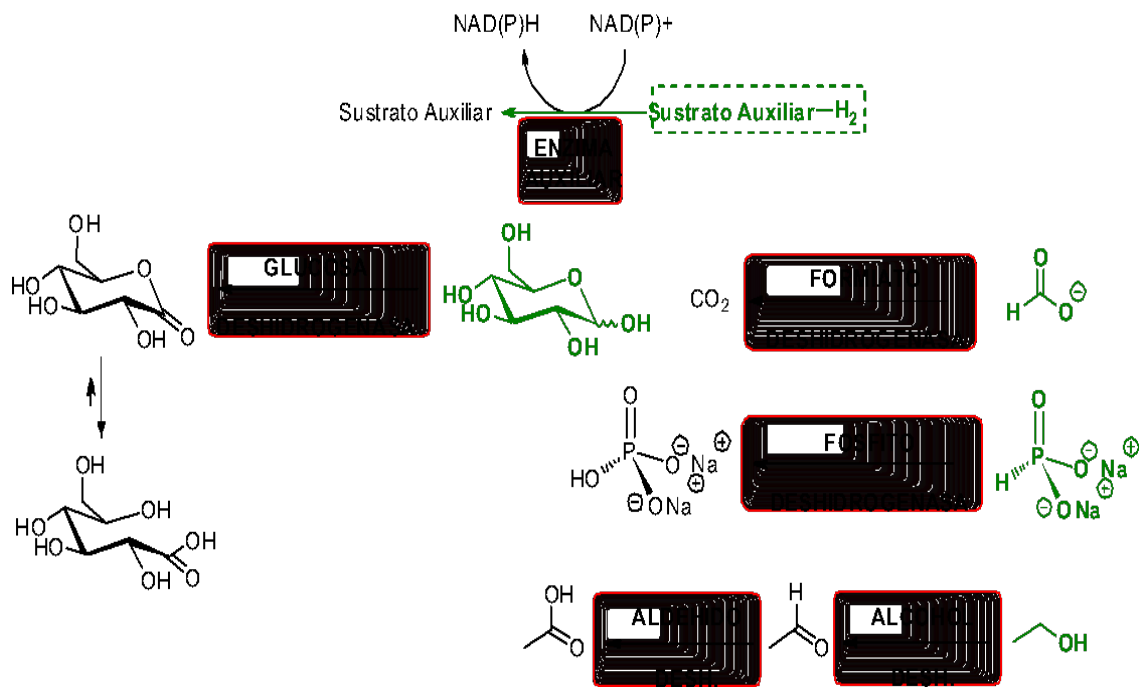
Entre ellos, el segundo método implica que una sola enzima debe encargarse de los dos procesos, la reducción del sustrato de interés y la oxidación del sustrato auxiliar. En la mayoría de los casos (68a), este sustrato auxiliar es *isopropanol*, el cual tiene la doble misión de actuar como sustrato auxiliar por un lado, y por el otro ayudar a solubilizar el sustrato principal. Como desventaja, citaremos principalmente dos: por un lado, el hecho de que la misma enzima tenga que ocuparse de los dos procesos reduce la actividad específica del biocatalizador; por otra parte, ninguna de las dos reacciones acopladas es irreversible, de manera que la máxima conversión obtenida vendría dictada por la concentración alcanzada en equilibrio.



Esquema 7.- Procesos de regeneración de cofactor.

Por tanto, se precisa actuar sobre la reacción de oxidación de *isopropanol*, bien añadiendo un exceso del mismo o bien eliminando la acetona a medida que se va formando, para poder tener un proceso que conduzca a altas conversiones. Asimismo, aunque como hemos comentado anteriormente el empleo de células enteras hace innecesaria la regeneración del cofactor, en muchos casos (89) se emplea esta estrategia de usar el *isopropanol* cuando se trabaja con este tipo de biocatalizadores, tanto por temas de solubilidad de sustrato como para ayudar a la reacción principal de reducción.

En los llamados procesos acoplados a enzima, tal y como se ha comentado anteriormente, se precisan dos enzimas y dos sustratos. Los procesos más habituales aparecen representados en el Esquema 8.



Esquema 8.- Principales sistemas de enzimas y sustratos auxiliares empleadas en biorreducciones.

Cuando se emplea formiato como sustrato auxiliar, la enzima auxiliar empleada es la formiato deshidrogenasa (FDH), que transforma dicho sustrato en dióxido de carbono. Puesto que este paso es irreversible en las condiciones habituales de reacción, debido a la naturaleza gaseosa del dióxido de carbono, el equilibrio del proceso de reducción de la cetona deseada (Esquema 8) está completamente desplazado hacia el producto final, lo que supone una gran ventaja y permite obtener conversiones elevadas (en torno al 99-100%). Asimismo, el formiato es un co-sustrato bastante barato, por lo que este sistema es sin duda uno de los más empleados, a pesar de la baja estabilidad de la FDH, lo que obliga a aplicar procesos de inmovilización-estabilización (una descripción detallada de este proceso, así como de todos los demás sistemas empleados, se puede encontrar en la reciente revisión publicada por Berenguer-Murcia y Fernández-Lafuente (88a)). Señalaremos que, a nivel industrial, el empleo de FDH de *Candida boidinii* es el único descrito hasta ahora, siendo empleado por la compañía Degussa para la obtención de *L-tercleucina* a nivel de multi-toneladas año (54b, 90). La desventaja de que esta enzima sólo funcione con el NAD⁺ se ha solventado recientemente gracias

a las técnicas de ingeniería genética (91), lo que ha permitido obtener una enzima capaz de regenerar igualmente el NADP⁺.

El otro sistema clásico de regeneración es el empleo de glucosa y glucosa deshidrogenasa (GDH), enzima que cataliza su oxidación hasta *D*-gluconolactona. La irreversibilidad de este proceso viene marcada por la apertura espontánea de la misma hasta ácido *D*-glucónico, el cual es subsecuentemente neutralizado mediante la adición de una base para originar la correspondiente sal. Al igual que sucede con el *isopropanol*, también está descrito el uso de glucosa como sustrato auxiliar cuando se emplean células enteras(81d,92). Alternativamente, se ha descrito el uso de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) empleando como sustrato auxiliar glucosa 6-fosfato(68a), aunque el alto precio del sustrato auxiliar hace necesario el empleo de técnicas de mutación de la enzima para permitir el uso de glucosa como sustrato(9b). Por otra parte, el uso de etanol (como sustrato auxiliar) y alcohol deshidrogenasa como enzima auxiliar presenta como desventaja el bajo potencial redox del sistema, así como la necesidad de emplear otra enzima (aldehído deshidrogenasa) para llegar hasta el ácido y lograr la deseada irreversibilidad.(11)

Una alternativa reciente es el uso del sistema de fosfito y fosfito deshidrogenasa (PTDH) (93), interesante desde el punto de vista del bajo precio del sustrato auxiliar, del nulo efecto de toxicidad del fosfito y el fosfato sobre las enzimas, y del alto grado de irreversibilidad obtenido. No obstante, aún no existen aplicaciones a nivel comercial.

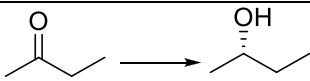
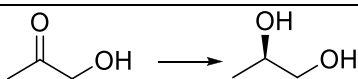
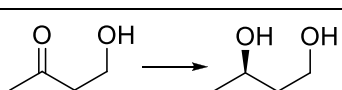
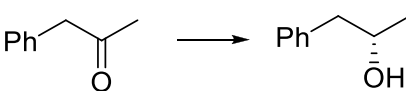
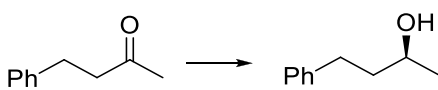
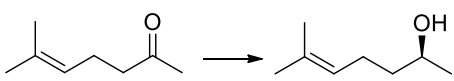
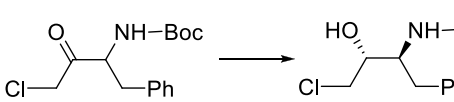
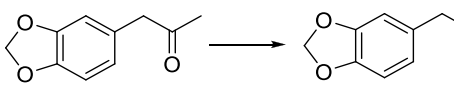
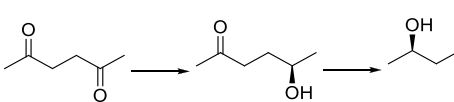
En cualquier caso, para medir la efectividad del proceso de biorreducción con enzimas aisladas y reciclado de cofactor, se suele emplear el llamado Número Total de Recambio (*Total Turnover Number*, TTN), que cuantifica el número de moles de sustrato convertidos por unidad de tiempo y por mol de cofactor (94). Así, para reacciones a escala de laboratorio, valores de TTN entre 10^3 y 10^5 son adecuados, mientras que para procesos a nivel industrial se requieren valores superiores (11).

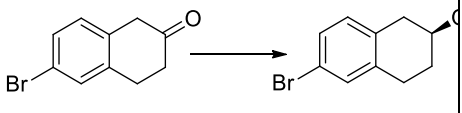
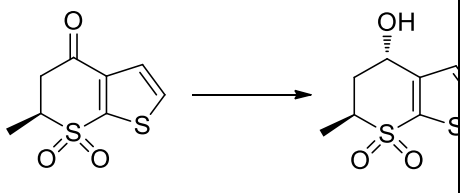
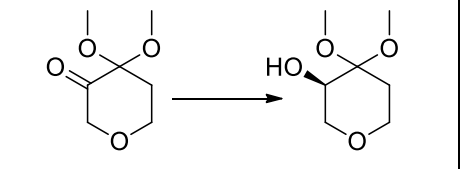
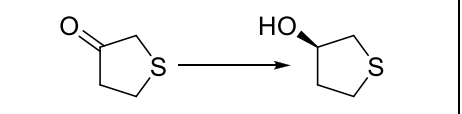
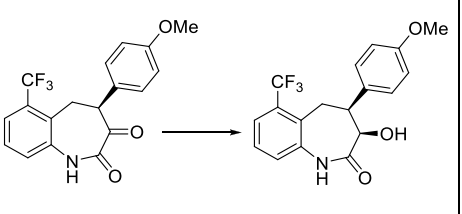
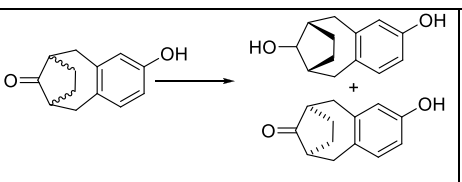
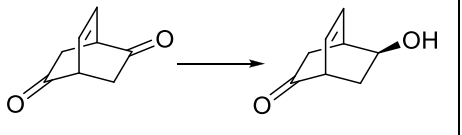
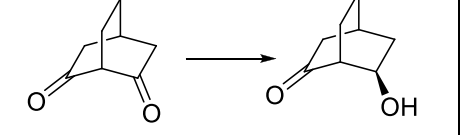
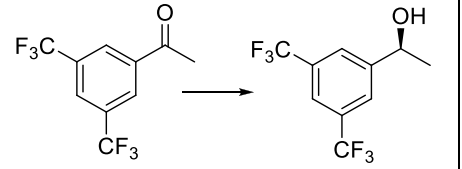
Finalmente, indicaremos que existen descritos en la bibliografía cientos de ejemplos de biorreducciones a nivel de laboratorio, recogidos en diferentes revisiones que se han citado a lo largo de este capítulo (7-8,8d,48,52,53b,c,54a,67-68,70,87,92c,95). Sería, pues, de todo punto imposible comentar todos y cada uno de los ejemplos ahí mencionados. Solamente nos limitaremos a citar aquellos casos

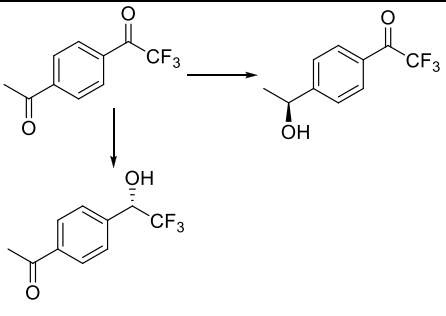
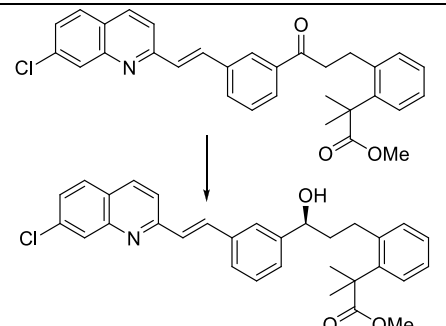
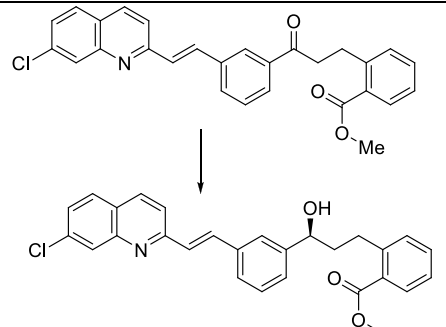
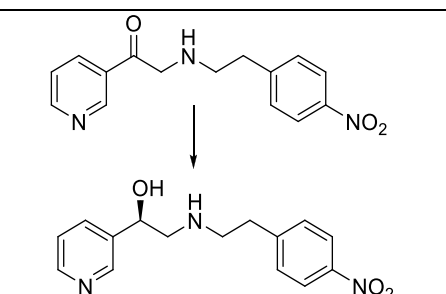
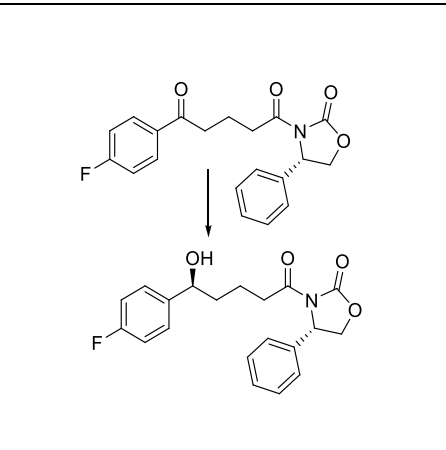
en los cuales la biorreducción se ha escalado a nivel industrial, los cuales están recogidos en la Tabla III.

Como puede verse de la Tabla III, la producción a nivel industrial de alcoholes se ha llevado a cabo en compañías tales como Merck & Co. Inc. Rahway, Bristol–Myers Squibb, Kaneka, Lonza, Astra Zeneca, y otras, en escalas que oscilan entre gramos y toneladas, con buenas purezas ópticas (97–99%).

Tabla III. Biorreducciones a escala preparativa o industrial, clasificadas según el tipo de sustrato.

Prod.	BIORREDUCCIÓN	COMENTARIOS	ESCALA	PUREZA ÓPTICA	BIOCATALIZADOR	COMPañÍA REF.
CETONAS ALIFÁTICAS LINEALES						
(S)-2-butanol		Sintones quirales de gran utilidad en múltiples procesos	10 kg	98.4% ee	Cetorreductasa de <i>Candida parapsilosis</i>	IEP GmbH ⁹⁶
(R)-1,2-propanodiol			400 g	98,2% ee	Células enteras de <i>S. cerevisiae</i> .	Kometani y cols. ⁹⁷
(R)-1,3-butanodiol			250 g	99% ee	ADH de <i>Leifsonia</i> sobreexpresada en células de <i>E. coli</i> ,	Itoh y cols. ⁹⁸
(S)-1-fenil-2-propanol		Intermedio en la síntesis de anfetaminas	N.R.	> 99 % ee	Enzima soluble de <i>Rhodococcus erythropolis</i> / FDH de <i>C. boidinii</i> / Formiato	Forschungszentrum Jülich GmbH ^{54b}
(S)-4-fenil-2-butanol-ol		Precursor de fármacos antihipertensivos (labetalol, bufenode) o espasmolíticos (bromuro de emepronio)	N.R.	> 99 % ee	Enzima soluble de <i>Rhodococcus erythropolis</i> / FDH de <i>C. boidinii</i> / Formiato	Forschungszentrum Jülich GmbH ^{54b}
(S)-6-metil-5-hepten-2-ol		(S)-(+)-Sulcatol, feromona del escarabajo de ambrosía <i>Gnathotrichus sulcatus</i> / <i>Gnathotrichus retusus</i>	N.R.	> 99 % ee	Enzima soluble de <i>Rhodococcus erythropolis</i> / FDH de <i>C. boidinii</i> / Formiato	Forschungszentrum Jülich GmbH ^{54b}
(2S,3R)-4-cloro-3-hidroxi-1-fenil-2-butil carbamato de <i>terc</i> butilo		Intermedio en la síntesis del Atazanavir (inhibidor de la proteasa del VIH)	N.R.	99.4 % ee	Células enteras de <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Bristol-Myers Squibb ⁹⁹
(S)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-propanol		Intermedio en la síntesis de benzodiazepinas	Escala de kg	>99.9 % ee	Células enteras de <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Eli Lilly and Company ^{54b, 100}
DICETONAS ALIFÁTICAS LINEALES						
(2R,5R)-hexanodiol		Auxiliares quirales, intermedios para la síntesis de ligandos quirales	N.R.	99.5 % ee	Células enteras de <i>Lactobacillus kefir</i> .	Jülich Chiral Solutions ¹⁰¹

CETONAS ALIFÁTICAS CÍCLICAS							
(S)-bromo-β-tetralol		Precursor en la síntesis de bloqueantes de canales de calcio	N.R.	>99 % ee	Células enteras de <i>Trichosporon capitatum</i>	Merck & Co. Inc. ¹⁰²	
(4S, 6S)-5,6-dihidro-4-hidroxi-6-metil-4H-tieno[2,3-b]tiopiran-7,7-dioxido		Intermedio en la síntesis del Trusopt® (antiglaucoma)	Multi toneladas	>99 % ee	Células enteras de <i>Neurospora crassa</i>	Astra Zeneca ^{54b, 103}	
(R)-4,4-dimetoxitetrahidro-2H-piran-3-ol		Intermedio quiral para la síntesis de un inhibidor de receptores de quimiocina	80 kg	>99 % ee	Cetorreductasa recombinante	Merck & Co. Inc. ¹⁰⁴	
(R)-tetrahidrotiofen-3-ol		Intermedio quiral para la síntesis del antibacteriano Sulopenem.	100 kg	>99 % ee	Cetorreductasa recombinante de <i>Lactobacillus kefir</i> .	Codexis, Inc. ¹⁰⁵	
(3R,4S)-3-hidroxi-4-(4-metoxifenil)-6-(trifluorometil)-4,5-dihidro-1H-benzo[b]azepin-2(3H)-ona		Intermedio en la síntesis de bloqueantes de canales de calcio	N.R.	99.8 % ee	Células enteras de <i>Nocardia salmonicolor</i>	Bristol-Myers Squibb ^{54b, 106}	
CETONAS ALIFÁTICAS BICÍCLICAS							
(6S,9R)-11-oxo-5,6,7,8,9,10-hexahidro-6,9-metanobenzocicloocteno		Intermedio en la síntesis de fármacos	1 kg	>99 % ee	Cetorreductasa comercial, Glucosa y GDH para reciclar del cofactor	Merck & Co. Inc. ¹⁰⁷	
DICETONAS ALIFÁTICAS CÍCLICAS							
(1S,4S,5S)-5-hidroxiciclo[2.2.2]7-octen-2-one			5 g	>99 % ee	Células enteras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Friberg y cols. ¹⁰⁸	
(1R,4S,6R)-6-hidroxiciclo[2.2.2]2-octanona			100g	97 % de, >99 % ee	Células enteras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Johanson y cols. ¹⁰⁹	
ARIL ALQUIL CETONAS							
(S)-3,5-bis(trifluorometil)feniletanol		Intermedio en la síntesis de antagonistas del receptor NK1 (antidepresivos, ansiolíticos, antieméticos)	25 kg	98 % ee	Enzima purificada de <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Merck & Co. Inc. ^{53a, 102}	

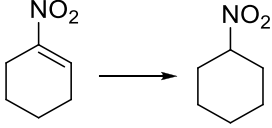
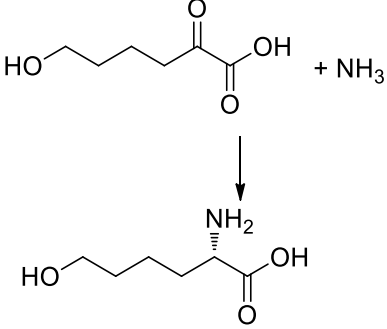
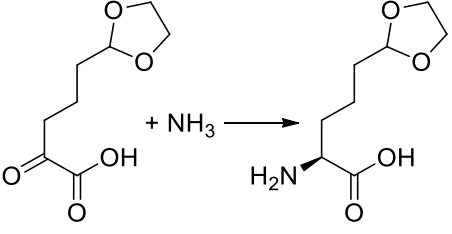
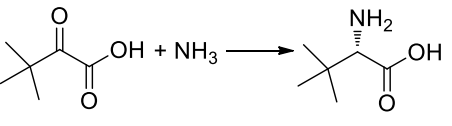
<p>(S)-2,2,2-trifluoro-1-(4-(1-hidroxi)etil)fenil) etanona + (S)-1-(4-(2,2,2-trifluoro-1-hidroxi)etil)fenil) etanona</p>		<p>Sintones quirales</p>	<p>100 mg</p>	<p>> 98% % ee</p>	<p>Cetorreductasas recombinantes</p>	<p>Merck & Co. Inc.¹¹⁰</p>
<p>(S,E)- 2-metil-2-(2-(3-(3-(2-(7-cloroquinolin-2-il)vinil)fenil)-3-hidroxi)propil)fenil)-propionato de metilo</p>		<p>Intermedio en la síntesis del antiasmático Montelukast</p>	<p>gramos</p>	<p>>99 % ee</p>	<p>Células enteras de <i>Microbacterium campoquemadoensis</i></p>	<p>Merck & Co. Inc.¹¹¹</p>
<p>(S,E)-2-(3-(3-(2-(7-cloroquinolin-2-il)vinil)fenil)-3-hidroxi)propil)benzoato de metilo</p>		<p>Intermedio en la síntesis del antiasmático Montelukast</p>	<p>>200 kg</p>	<p>>99.9 % ee</p>	<p>Alcohol deshidrogenasas modificadas genéticamente</p>	<p>Codexis¹¹²</p>
<p>(R)-2-(4-nitrofenilamino)-1-(piridin-3-il)etanol</p>		<p>Intermedio en la síntesis de antagonistas B-3</p>	<p>Multi kilogramos</p>	<p>>99.9 % ee</p>	<p>Células enteras de <i>Candida sorbophila</i></p>	<p>Merck & Co. Inc.¹¹³</p>
<p>(S)-3-((S)-5-(4-fluorofenil)-5-hidroxi)pentanoil)-4-feniloxazolidin-2-ona</p>		<p>Precursor en la síntesis de Ezetimiba (anticolectorémico)</p>	<p>gramos</p>	<p>100 % ed.</p>	<p>Células enteras de <i>Schizosaccharomyces octosporus</i></p>	<p>Schering Co.¹¹⁴</p>

DIARILCETONAS

(S)-diaril metanoles		Sintones quirales para la obtención de diferentes fármacos	1 g	98 % ee	Cetorreductasa comercial, glucosa como sustrato auxiliar	Merck & Co, Inc. ¹¹⁵
				95% ee		
				> 99% ee		
				91 % ee		
				>99 % ee		
				>99 % ee	Alcohol deshidrogenasa de <i>L. kéfir</i> .	
(S)-(3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil)(fenil) metanol		Sintón quiral para la obtención de un fármaco antiasma inhibidor de la fosfodiesterasa A	16 g	>96 % ee	Células enteras de <i>Rhodotorula pilimanae</i>	Merck & Co, Inc. ¹¹⁶
α-OXO ÁCIDOS						
Ácido 2R-2-hidroxi-4-fenilbutírico (2-HPBA)		Precursor de fármacos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE)	6.3 gramos	99,9 % ee	Lactato deshidrogenasa de <i>Staphylococcus epidermis</i>	Ciba Spezialität-chemie AG ¹¹⁷
			82 g	99,9% ee	Células inmovilizadas de <i>Proteus vulgaris</i>	

α-OXO ESTERES						
(2R)-hidroxi-2-(1',2',3',4'-tetrahidro-1',1',4',4'-tetrametil-6'-naftalenil) acetato de etilo		Intermedio en la síntesis de receptores del ácido retinóico	N.R.	97%	Células enteras de <i>Aureobasidium pullulans</i>	Bristol-Myers Squibb ^{54b} , 118
Ácido (R)-3-(4-fluorofenil)-2-hidroxi-propanoico		Intermedio en la síntesis del Rupintrivir, inhibidor irreversible de la proteasa 3C del rinovirus humano (HRV)	N.R.	> 99.9%	D-lactato deshidrogenasa de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Bristol-Myers Squibb ^{54b} , 101c, 119
β-OXO ESTERES						
(S)-3-hidroxi-butanato de etilo		Sintones quirales para la obtención de diferentes fármacos, pesticidas y fragancias.	50 g.	> 98 %	Alcohol deshidrogenasa de <i>S. cerevisiae</i> expresada en células de <i>E. coli</i>	Walton y cols. ¹²⁰
			600 g.	99.3%	Células enteras de <i>S. cerevisiae</i> .	Kometani y cols. ^{97a}
(R)-3-hidroxi-butanato de etilo		Sintón quiral	35 toneladas	99.8%	Enzima soluble de <i>Lactobacillus brevis</i>	Jülich Chiral Solutions. Wacker Chemie ^{54b} , 101c
(R)-3-hidroxi-butanato de metilo			700 g L ⁻¹ d ⁻¹	> 99 %	Cetorreductasa de <i>Lactobacillus brevis</i> expresada en células de <i>E. coli</i>	Forschungszentrum Jülich GmbH ¹²¹
(2R, 3S)-2-cloro-3-hidroxi-butanato de etilo			4 g	98% ee	ADH de <i>P. finlandica</i> expresada en células de <i>E. coli</i>	Kaneka Co. ¹²²
(S) 4-cloro-3-hidroxi-butanato de etilo		Sintón quiral para la obtención de fármacos anticolesterolémicos (atorvastatina)	N.R.	99%	Células enteras de <i>E. coli</i>	Kaneka Co. ¹²³
			232.61 g	> 99.5%	Enzima aislada recombinante, glucosa y GDH para reciclar NADH	Codexis Inc. ¹²⁴
(S) 4-cloro-3-hidroxi-butanato de metilo		Multi kg.	9 % ee	Células enteras de <i>Geotrichum candidum</i> SC 5469	Bristol-Myers Squibb ¹²⁵	
(R)-4,4,4-trifluoro-3-hidroxi-butanato de etilo		Sintón quiral para la obtención de beflotaxona, antidepresivo.	N.R.	99% ee	Cetorreductasa de <i>Sporobolomyces salmonicolor</i> y GDH de <i>B. megaterium</i> expresadas en células de <i>E. coli</i> .	Lonza ¹²⁶

(S)-3-hidroxi-3[(R)-1-tercbutoxicarbonil-4-hidroxipirrolidin-2-il] propanoato de tercbutilo		Intermedio en la síntesis de antibióticos tipo carbapenem	12.5 kg	98%	Células enteras de <i>Mortierella alpina</i>	Merck & Co, Inc. Rahway ¹²⁷
(2S,3R)-3-hidroxi-2-((2-oxo-2-fenilamino)metil) butanoato de metilo		Intermedio en la síntesis de antibióticos tipo carbapenem.	25 gramos	> 60%	KREDs recombinantes	Codexis Inc ¹²⁸
OTROS OXO ESTERES						
(S)-5-hydroxihexanoato de etilo		Sintón quirál	Preparativa	> 99.5%	Células enteras de <i>Pichia methanolica</i>	Bristol-Myers Squibb ¹²⁹
(3R,5S)-6-(benciloxi)-3,5-dihidroxihexanoato de etilo		Intermedio quirál para la síntesis de fármacos anticolsterolémicos	1 L	99%	Enzima soluble de <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .	Bristol-Myers Squibb ¹³⁰
ALDEHIDOS						
Alcohol cinámico		Para la producción de fragancias	miligramos	-----	Extracto celular de <i>Manihot sp.</i>	Machado y cols. ¹³¹
2,5-dihidroxi metil furano		Detoxificación de hidrolizados lignocelulósicos	gramos	-----	Células enteras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Petterson y cols. ¹³²
(R)-2-metilpentanol		Intermedio en la producción de fármacos y de cristales líquidos	342 g	98,5% ee	Cetrorreductasa de <i>E. coli</i> mejoradas por evolución dirigida	Pfizer ¹³³
ALQUENOS						
R-citronelal		Sintones quirales	Escala de gramos	98% ee	Enoato reductasa de <i>Pichia stipitis</i> OYE 2.6	Bougiouk ou y cols ¹³⁴
S-citronelal				> 99 %	Enoato reductasa de <i>E. coli</i> Nema	
(6R)-levodiona		Intermedio en la producción de zeoxantina, protector de la retina	5 g	NR	Células enteras recombinantes de <i>Escherichia coli</i> donde se sobreexpresa la enzima de <i>Candida macedoniensis</i>	Hoffmann - LaRoche. ¹³⁵

Nitrociclohexano			miligramos	-----	Enzima purificada de <i>S. cerevisiae</i> .	Meah y Massey ¹³⁶
AMINACIÓN REDUCTIVA de OXOÁCIDOS						
L-6-hidroxi norleucina		Intermedio en la síntesis del antihipertensivo omapatrilato, y de azeponas sustituidas en C-7	N.R.	99 % ee	Enzima purificada de hígado de ternera	Bristol-Myers Squibb ¹³⁷
Ácido (S)-2-amino-5-(1,3-dioxolan-2-il)pentanoico		Intermedio en una síntesis alternativa del antihipertensivo omapatrilato	197 kg	98% ee	Enzima de <i>Sporosarcina sp</i> expresada en células de <i>Escherichia coli</i>	Bristol-Myers Squibb ^{137b} , 138
L-terc-leucina		Para la síntesis de peptidomiméticos con actividad antitumoral o anti VIH.	1 tonelada	99,5 % ee	Enzima de <i>Thermoactinomyces intermedius</i> expresada en células de <i>E. coli</i>	Degussa AG ¹⁰⁶

A continuación, comentaremos algunos ejemplos interesantes recogidos en dicha Tabla, en primer lugar usando enzimas aisladas.

- a) Así, como primer caso, la síntesis de un intermedio de antagonistas de receptores K-1, el (S)-3,5-bistrifluorometilfenil etanol, ha sido puesta a punto a través de la reducción asimétrica de la 3,5-bistrifluorometil acetofenona (Tabla 3). El biocatalizador, una alcohol deshidrogenasa de *Rhodococcus erythropolis*, fue seleccionado en un proceso de cribado, y se purificó previamente a su uso industrial, el cual se optimizó usando glucosa deshidrogenasa (GDH 103, de la casa Biocatalytics Inc.), como sistema auxiliar para regenerar el cofactor; esta enzima es más termoestable que la FDH inicialmente elegida. De esta forma, la biorreducción funciona con una conversión del 98%, y un exceso enantiomérico del 99%, en un proceso en planta piloto que se lleva a cabo en tanque agitado de 250 L con 25 kg (53^a, 101).

- b) Por otra parte, el antiasmático Montelukast (Singulair) requiere como intermedio un alcohol enantioméricamente puro, el cual se obtiene en Merck a través de la biorreducción de una cetona precursora. De esta forma, tras un cribado inicial de 80 microorganismos, se detectó la actividad deseada en cepas de *Microbacterium campoquemadoensis* y *Mucor hiemalis*, obteniendo el alcohol intermedio deseado trabajando a una concentración de 500 mg/L, para obtener un e.e >95% tras 280 horas de reacción (111); no obstante, la baja solubilidad en agua de la cetona de partida limita la productividad volumétrica del proceso (<2 mg/L.hr), por lo que su aplicabilidad a nivel industrial se descartó, y se optó por una reducción química empleando un exceso (1,8 equivalentes) de (-)-DIP-Cl (β -clorodiisopinocanfenilborano) en THF at -25°C. Recientemente, la compañía Codexis ha desarrollado recientemente un proceso alternativo, mucho más sencillo y sostenible, usando una cetorreductasa recombinante, con una conversión de >99%, y un excelente exceso enantiomérico de >99,9%. Este proceso se lleva a cabo a 45°C, con una concentración inicial de sustrato de 100 g/L en una mezcla de isopropanol (que cumple también el papel de sustrato auxiliar para la regeneración del cofactor), agua y tolueno, lo que favorece la solubilidad de la cetona de partida y hace que el alcohol enantioméricamente puro así obtenido se purifique por una simple filtración (112). De esta forma, el proceso biocatalítico ha sido escalado hasta 200 kg (Arch Phamlabs), lo que demuestra su gran potencialidad.
- c) La obtención de moléculas quirales de pequeño tamaño suele ser más dificultosa que en aquellos otros casos donde la diferencia de tamaño de los sustituyentes en torno al carbonilo es mayor. Así, la obtención de (S)-2-butanol o (R)-tetrahidrotiofen-3-ol ejemplifican de manera excelente casos donde la obtención de una buena estereoselección es un reto para el biocatalizador. En este último caso (105), la enzima nativa permitía obtener solamente un 65% de exceso enantiomérico para el producto deseado; no obstante, el empleo de técnicas de evolución dirigida han permitido la obtención del alcohol con un valor de ee superior al 99%, a escala de multikilogramos

Tal y como se comentó con anterioridad, la mayoría de las biorreducciones industriales se llevan a cabo con células (aproximadamente 3 de cada 4 casos (87)). En la Tabla III aparecen reflejados varios ejemplos, alguno de los cuales comentaremos ahora.

- a) La biorreducción del ácido (1S)-[3-cloro-2-oxol-(fenilmetil)propil] carbámico empleando células enteras de *R. erythropolis* SC13854 (99) permite la producción de un alcohol intermediario en la síntesis del Atazanavir, un inhibidor de la proteasa del VIH, con un rendimiento del 95% y una estereoselectividad del 99,4%.
- b) Como ejemplo de biorreducción de dicetonas, citaremos el proceso de Jülich Chiral Solutions, donde la 2,5-hexadiona es reducida para obtener el (2R,5R)-hexanodiol, un sintón quiral de gran importancia, empleando células de *Lactobacillus kéfir* (101). Este proceso utiliza glucosa como cosustrato en un simple reactor tipo tanque agitado (el sistema más empleado industrialmente por su gran sencillez de manejo), a una escala de 0,25 toneladas al año, con un rendimiento del 90% y una estereoselectividad del 99,5%. Asimismo, este microorganismo es capaz de reducir eficientemente otras dicetonas como la 2,4-pentanodiona, 3,6-octanodiona, 2,7-dimetil-3,6-octanodiona y 2,6-heptanodiona (54b).
- c) Ya indicamos con anterioridad que una característica habitual de los procesos catalizados por células enteras es su baja productividad, debido a que los sustratos que se desea reducir suelen ser tóxicos para el microorganismo, siendo tolerados de manera general a concentraciones entre el 0,1 y el 0,3% (11). Por ello, a escala industrial es necesario el desarrollo de diferentes metodologías para aumentar la productividad hasta valores aceptables; entre ellas, una alternativa interesante consiste en el empleo de biorreactores retroalimentados (*fed-batch*), donde se limita la concentración efectiva de sustrato en las inmediaciones de la célula. Como ejemplo, citaremos el proceso de AstraZeneca (54b,103) para la producción de un intermedio del Trusopt®, fármaco para el tratamiento del glaucoma. Otra posibilidad consiste en la inmovilización del sustrato en un soporte no tóxico, de manera que se vaya liberando de manera controlada al medio de reacción: es el caso del proceso desarrollado por Eli Lilly(54b,100) utilizando células de *Z. rouxii* para

la obtención de un intermedio en la síntesis de una benzodiazepina activa por vía oral. También pueden utilizarse sistemas bifásicos para minimizar la inhibición por sustrato; como ejemplos, citaremos la biorreducción de Kaneka (122) para la obtención de (2R, 3S)-2-cloro-3-hidroxi-butanoato de etilo con células recombinantes de *Escherichia coli* con sobreexpresión de una cetorreductasa de *Pichia finlandica* y FDH de *Mycobacterium sp.* Otro ejemplo de esta metodología: el proceso desarrollado por Lonza para la obtención de (R)-4,4,4-trifluoro-3-hidroxi-butanoato de etilo, empleando un sistema bifásico agua/acetato de butilo, y dos enzimas, una cetorreductasa de *Sporobolomyces salmonicolor* y glucosa deshidrogenasa de *B. megaterium* expresadas en células de *E. coli*.

- d) En otros casos, el empleo de sistemas en continuo permite la obtención de excelentes resultados. Por ejemplo, Itoh y cols. (98) utilizaron un reactor de lecho empacado de 10 ml conteniendo 1 gramo de células de *E. coli* con ADH de *Leifsonia* sobreexpresada para producir en 500 horas 250 gramos de (R)-1,3-butanodiol con alta pureza óptica (99% ee), empleando 2-propanol para regenerar los cofactores. Asimismo, utilizando huéspedes distintos de *E. coli* (53c) se espera aumentar la productividad espaciotemporal hasta valores de $3,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Por otra parte, la reducción de acetoacetato de metilo con células de *E. coli* donde se ha sobreexpresado una cetorreductasa de *L. brevis* condujo a la producción del correspondiente b-hidroxiéster en altos rendimientos y pureza ($700 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) usando un sistema de reactor en continuo con retención del biocatalizador mediante una membrana de ultrafiltración (121). Empleando un diseño similar, pero añadiendo un sistema de pervaporación para eliminar la acetona producida como consecuencia de la oxidación del isopropanol, Schoer y Lutz (139) han descrito muy altas productividades ($> 170 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) en la obtención de (R,R)-2,5-hexanodiol por biorreducción de la correspondiente dicetona de partida.

3. CONCLUSIÓN Y PROGNOSIS

Dada la gran complejidad y variedad en las estructuras de los fármacos, el empleo de enzimas redox supone una alternativa más sostenible y ecoamigable frente a los tradicionales métodos químicos para la obtención de los pertinentes

sintones quirales que conduzcan a los diferentes principios activos. La necesidad de utilizar cofactores, que podría significar un escollo para su utilización a nivel industrial, ha sido solventada de forma eficiente mediante el empleo de sistemas adecuados para su reciclado, empleando sustratos auxiliares y/o enzimas auxiliares. Por otra parte, el uso de herramientas de ingeniería genética (mutagénesis dirigida o evolución dirigida) para mejorar la eficacia catalítica de las enzimas redox, así como un adecuado diseño del medio de reacción y del biorreactor, han permitido la implementación de numerosos procesos industriales con altas productividades.

Sin duda, pues, nos encontramos ante una estrategia que puede cobrar un inusitado auge en los próximos años. Así por ejemplo, el uso industrial de biocatalizadores provenientes de organismos extremófilos puede suponer un gran avance a la hora de diseñar procesos aún más eficaces, y que conducirán de manera segura a procesos industriales aún más eficientes.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Carey, J. S.; Laffan, D.; Thomson, C.; Williams, M. T., Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules. *Org Biomol Chem* **2006**, 4 (12), 2337-2347.
2. Patel, R. N., Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, 252 (5-7), 659-701.
3. (a) Tucker, J. L., Green Chemistry: Cresting a Summit toward Sustainability. *Org Process Res Dev* **2010**, 14 (2), 328-331; (b) Anastas, P.; Eghbali, N., Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39 (1), 301-312.
4. Anastas, P. T.; Warner, J. C., *Green chemistry: theory and practice*. Oxford University Press: Oxford, 1998.
5. Sheldon, R. A.; Arends, I.; Hanefeld, U., *Green Chemistry and Catalysis*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007.
6. Enzyme Nomenclature. Academic Press: New York, 1992.
7. Matsuda, T.; Yamanaka, R.; Nakamura, K., Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20 (5), 513-557.
8. (a) Leonida, M. D., Redox enzymes used in chiral syntheses coupled to coenzyme regeneration. *Curr Med Chem* **2001**, 8 (4), 345-369; (b) Burton, S. G., Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends*

- Biotechnol* **2003**, *21* (12), 543-549; (c) Meyer, D.; Bu"hler, B.; Schmid, A.; Allen I. Laskin, S. S.; Geoffrey, M. G., Process and Catalyst Design Objectives for Specific Redox Biocatalysis. In *Adv. Appl. Microbiol.*, Academic Press: 2006; Vol. Volume 59, pp 53-91; (d) Carballeira, J. D.; Quezada, M. A.; Hoyos, P.; Simeó, Y.; Hernaiz, M. J.; Alcantara, A. R.; Sinisterra, J. V., Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions. *Biotechnology Advances* **2009**, *27*, 686-714.
9. (a) Lu, J.; Lazzaroni, M. J.; Hallett, J. P.; Bommarius, A. S.; Liotta, C. L.; Eckert, C. A., Tunable Solvents for Homogeneous Catalyst Recycle. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2004**, *43* (7), 1586-1590; (b) Liu, W. F.; Wang, P., Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. *Biotechnol Adv* **2007**, *25* (4), 369-384.
10. Carballeira, J. D.; Fernandez-Lucas, J.; Quezada, M. A.; Hernaiz, M. J.; Alcantara, A. R.; Simeó, Y.; Sinisterra, J. V., Biotransformations. In *Encyclopedia of Microbiology*, Moselio, S., Ed. Academic Press: Oxford, 2009; pp 212-251.
11. Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry. A textbook*. 5th ed.; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2004; p 454.
12. (a) Sheldon, R. A., Organic Synthesis: Past, present and future. *Chem Ind-London* **1992**, (23), 903-906; (b) Sheldon, R. A., The E factor: fifteen years on. *Green Chem.* **2007**, *9* (12), 1273-1283; (c) Sheldon, R. A., E factors, green chemistry and catalysis: an odyssey. *Chem. Commun.* **2008**, (29), 3352-3365.
13. Kayser, M. M., 'Designer reagents' recombinant microorganisms: new and powerful tools for organic synthesis. *Tetrahedron* **2009**, *65* (5), 947-974.
14. Woodley, J. M., New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26* (6), 321-327.
15. Molinari, F., Oxidations with Isolated and Cell-Bound Dehydrogenases and Oxidases. *Curr Org Chem* **2006**, *10* (11), 1247-1263.
16. Hughes, A. B.; Rudge, A. J., Deoxynojirimycin - synthesis and biological-activity. *Nat Prod Rep* **1994**, *11* (2), 135-162.
17. Landis, B. H.; McLaughlin, J. K.; Heeren, R.; Grabner, R. W.; Wang, P. T., Bioconversion of N-Butylglucamine to 6-Deoxy-6-butylamino Sorbose by *Gluconobacter oxydans*. *Org Process Res Dev* **2002**, *6* (4), 547-552.
18. Takeuchi, K.; Koike, K.; Ito, S., Production of cis-unsaturated hydrocarbons by a strain of *Rhodococcus* in repeated batch culture with a phase-inversion, hollow-fiber system. *J Biotechnol* **1990**, *14* (2), 179-186.
19. Patel, R. N., Enzymatic synthesis of chiral intermediates for drug development. *Adv Synth Catal* **2001**, *343* (6-7), 527-546.

20. Bertola, M. A. A.; Koger, H. S. G.; Phillips, G. T.; Marx, A. F.; Claassen, V. P.; Bertola, M. A.; Koger, H. S.; Phillips, G. T. R-1,3-dioxolane-4-methanol prepn. - comprises contacting RS-mixt. with microorganism for stereoselective consumption of S-isomer. EP244912-A1; EP244912-A; AU8772538-A; NO8701903-A; ZA8703274-A; FI8702018-A; DK8702315-A; JP63094986-A; PT84830-A; EP244912-B; DE3763408-G; ES2019618-B; IL82416-A; US5190867-A; FI90092-B; CA1334082-C.
21. Glockler, R.; Roudit, J. P., Industrial bioprocesses for the production of substituted aromatic heterocycles. *Chimia* **1996**, *50* (9), 413-415.
22. Dingler, C.; Ladner, W.; Krei, G. A.; Cooper, B.; Hauer, B., Preparation of (R)-2-(4-hydroxyphenoxy) propionic acid by biotransformation. *Pestic. Sci.* **1996**, *46* (1), 33-35.
23. (a) Springer, D. M.; Sorenson, M. E.; Huang, S.; Connolly, T. P.; Bronson, J. J.; Matson, J. A.; Hanson, R. L.; Brzozowski, D. B.; LaPorte, T. L.; Patel, R. N., Synthesis and activity of a C-8 keto pleuromutilin derivative. *Bioorg Med Chem Lett* **2003**, *13* (10), 1751-1753; (b) Hanson, R. L.; Matson, J. A.; Brzozowski, D. B.; LaPorte, T. L.; Springer, D. M.; Patel, R. N., Hydroxylation of mutilin by *Streptomyces griseus* and *Cunninghamella echinulata*. *Org Process Res Dev* **2002**, *6* (4), 482-487.
24. Gbewonyo, K.; Buckland, B. C.; Lilly, M. D., Development of a large-scale continuous substrate feed process for the biotransformation of simvastatin by *Nocardia sp.* *Biotechnol Bioeng* **1991**, *37* (11), 1101-1107.
25. Park, J. W.; Lee, J. K.; Kwon, T. J.; Yi, D. H.; Kim, Y. J.; Moon, S. H.; Suh, H. H.; Kang, S. M.; Park, Y. I., Bioconversion of compactin into pravastatin by *Streptomyces sp.* *Biotechnol Lett* **2003**, *25* (21), 1827-1831.
26. Zuidweg, M. H. J., Hydroxylation of Reichstein's compound S with cell-free preparations from *Curvularia lunata*. *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, *152* (1), 144-&.
27. (a) Picataggio, S.; Rohrer, T.; Deanda, K.; Lanning, D.; Reynolds, R.; Mielenz, J.; Eirich, L. D., Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the production of long-chain dicarboxylic-acids. *Bio-Technol* **1992**, *10* (8), 894-898; (b) Liu, S. C.; Li, C.; Fang, X. C.; Cao, Z. A., Optimal pH control strategy for high-level production of long-chain alpha-,omega-dicarboxylic acid by *Candida tropicalis*. *Enzyme Microb Tech* **2004**, *34* (1), 73-77.
28. Ro, D. K.; Paradise, E. M.; Ouellet, M.; Fisher, K. J.; Newman, K. L.; Ndungu, J. M.; Ho, K. A.; Eachus, R. A.; Ham, T. S.; Kirby, J.; Chang, M. C. Y.; Withers, S. T.; Shiba, Y.; Sarpong, R.; Keasling, J. D., Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* **2006**, *440* (7086), 940-943.
29. Wong, J. W.; Watson, H. A.; Bouressa, J. F.; Burns, M. P.; Cawley, J. J.; Doro, A. E.; Guzek, D. B.; Hintz, M. A.; McCormick, E. L.; Scully, D. A.; Siderewicz, J. M.; Taylor, W. J.; Truesdell, S. J.; Wax, R. G., Biocatalytic oxidation of 2-methylquinoxaline to 2-quinoxalinecarboxylic acid. *Org Process Res Dev* **2002**, *6* (4), 477-481.

30. (a) Petersen, M.; Kiener, A., Biocatalysis - Preparation and functionalization of N-heterocycles. *Green Chem* **1999**, *1* (2), 99-106; (b) Shaw, N. M.; Robins, K. T.; Kiener, A., Lonza: 20 years of biotransformations. *Adv Synth Catal* **2003**, *345* (4), 425-435.
31. Yoshikawa, N.; Ohta, K.; Mizuno, S.; Ohkishi, H., Production of cis,cis-muconic acid from benzoic acid. *Bioprocess Technol* **1993**, *16*, 131-47.
32. Murdock, D.; Ensley, B. D.; Serdar, C.; Thalen, M., Construction of metabolic operons catalyzing the *de novo* biosynthesis of indigo in *Escherichia coli*. *Bio-Technol* **1993**, *11* (3), 381-386.
33. Taylor, S. C. Fermentative prodn. of 1,2-dihydroxy-3,5-cyclohexadiene cpds. using mutant strain of *Pseudomonas putida*. EP76606-B1; EP76606-A; EP76606-B, 1983.
34. Held, M.; Schmid, A.; Kohler, H. P. E.; Suske, W.; Witholt, B.; Wubbolts, M. G., An integrated process for the production of toxic catechols from toxic phenols based on a designer biocatalyst. *Biotechnol Bioeng* **1999**, *62* (6), 641-648.
35. (a) Furuhashi, K.; Takagi, M., Optimization of a medium for the production of 1,2-epoxytetradecane by *Nocardia corallina* B-276. *Appl Microbiol Biot* **1984**, *20* (1), 6-9; (b) Furuhashi, K.; Shintani, M.; Takagi, M., Effects of solvents on the production of epoxides by *Nocardia Corallina* B-276. *Appl Microbiol Biot* **1986**, *23* (3-4), 218-223.
36. (a) Panke, S.; Wubbolts, M. G.; Schmid, A.; Witholt, B., Production of enantiopure styrene oxide by recombinant *Escherichia coli* synthesizing a two-component styrene monooxygenase. *Biotechnol Bioeng* **2000**, *69* (1), 91-100; (b) Panke, S.; Held, M.; Wubbolts, M. G.; Witholt, B.; Schmid, A., Pilot-scale production of (S)-styrene oxide from styrene by recombinant *Escherichia coli* synthesizing styrene monooxygenase. *Biotechnol Bioeng* **2002**, *80* (1), 33-41; (c) Buhler, B.; Bollhalder, I.; Hauer, B.; Witholt, B.; Schmid, A., Chemical biotechnology for the specific oxyfunctionalization of hydrocarbons on a technical scale. *Biotechnol Bioeng* **2003**, *82* (7), 833-842; (d) Hollmann, F.; Lin, P. C.; Witholt, B.; Schmid, A., Stereospecific biocatalytic epoxidation: The first example of direct regeneration of a FAD-dependent monooxygenase for catalysis. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (27), 8209-8217; (e) Hofstetter, K.; Lutz, J.; Lang, I.; Witholt, B.; Schmid, A., Coupling of biocatalytic asymmetric epoxidation with NADH regeneration in organic-aqueous emulsions. *Angew Chem Int Edit* **2004**, *43* (16), 2163-2166; (f) Park, J. B.; Buehler, B.; Habicher, T.; Hauer, B.; Panke, S.; Witholt, B.; Schmid, A., The efficiency of recombinant *Escherichia coli* as biocatalyst for stereospecific epoxidation. *Biotechnol Bioeng* **2006**, *95* (3), 501-512.
37. Kieslich, K., Biotransformations of industrial use. *Acta Biotechnol* **1991**, *11* (6), 559-570.
38. Baldwin, C. V. F.; Wohlgemuth, R.; Woodley, J. M., The First 200-L Scale Asymmetric Baeyer-Villiger Oxidation Using a Whole-Cell Biocatalyst. *Org Process Res Dev* **2008**, *12* (4), 660-665.
39. Blank, L. M.; Ebert, B. E.; Buehler, K.; Buhler, B., Redox Biocatalysis and Metabolism: Molecular Mechanisms and Metabolic Network Analysis. *Antioxid Redox Sign* **2010**, *13* (3), 349-394.

40. Bollinger Jr, J. M.; Broderick, J. B., Frontiers in enzymatic C-H-bond activation. *Curr Opin Chem Biol* **2009**, *13* (1), 51-57.
41. (a) Bühler, B.; Schmid, A., Process implementation aspects for biocatalytic hydrocarbon oxyfunctionalization. *J Biotechnol* **2004**, *113* (1-3), 183-210; (b) Julsing, M. K.; Cornelissen, S.; Bühler, B.; Schmid, A., Heme-iron oxygenases: powerful industrial biocatalysts? *Curr Opin Chem Biol* **2008**, *12* (2), 177-186.
42. (a) Urlacher, V. B.; Schmid, R. D., Recent advances in oxygenase-catalyzed biotransformations. *Curr Opin Chem Biol* **2006**, *10* (2), 156-161; (b) Park, J. B., Oxygenase-based whole-cell biocatalysis in organic synthesis. *J Microbiol Biotechnol* **2007**, *17* (3), 379-392; (c) Leak, D. J.; Sheldon, R. A.; Woodley, J. M.; Adlercreutz, P., Biocatalysts for selective introduction of oxygen. *Biocatal. Biotransform.* **2009**, *27* (1), 1-26.
43. Pellissier, H. L.; Santelli, M., Chemical and biochemical hydroxylations of steroids. A review. *Org. Prep. Proced. Int.* **2001**, *33* (1), 1-58.
44. Mihovilovic, M. D., Enzyme Mediated Baeyer-Villiger Oxidations. *Curr Org Chem* **2006**, *10* (11), 1265-1287.
45. (a) Nuñez, M. C.; García-Rubiño, M. E.; Conejo-García, A.; Cruz-López, O.; Kimatrai, M.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Campos, J. M., Homochiral Drugs: A Demanding Tendency of the Pharmaceutical Industry. *Curr Med Chem* **2009**, *16* (16), 2064-2074; (b) Davies, I. W.; Welch, C. J., Looking Forward in Pharmaceutical Process Chemistry. *Science* **2009**, *325* (5941), 701-704.
46. Blaser, H.-U.; Pugin, B.; Spindler, F., Progress in enantioselective catalysis assessed from an industrial point of view. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2005**, *231* (1-2), 1-20.
47. Sheldon, R. A., Atom utilisation, E factors and the catalytic solution. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIC - Chemistry* **2000**, *3* (7), 541-551.
48. Hiroaki, Y., Carbonyl Reductase. In *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology.*, Flickinger, M. C., Ed. John Wiley and sons, Inc.: 2010.
49. Noyori, R., Asymmetric catalysis: Science and opportunities (Nobel lecture). *Angew Chem Int Edit* **2002**, *41* (12), 2008-2022.
50. (a) Ma, J.-A.; Cahard, D., Towards Perfect Catalytic Asymmetric Synthesis: Dual Activation of the Electrophile and the Nucleophile. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2004**, *43* (35), 4566-4583; (b) Burkhardt, E. R.; Matos, K., Boron Reagents in Process Chemistry: Excellent Tools for Selective Reductions. *Chem Rev* **2006**, *106* (7), 2617-2650.
51. (a) Anastas, P. T., Green chemistry as applied to solvents. In *Clean Solvents - Alternative Media for Chemical Reactions and Processing*, Abraham, M. A.; Moens, L., Eds. 2002; Vol. 819, pp 1-9; (b)

Anastas, P. T., Perspective on Green Chemistry: The most challenging synthetic transformation. *Tetrahedron* **2010**, *66* (5), 1026-1027.

52. Nakamura, K.; Matsuda, T., Biocatalytic reduction of carbonyl groups. *Curr Org Chem* **2006**, *10* (11), 1217-1246.

53. (a) Pollard, D. J.; Woodley, J. M., Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol* **2007**, *25* (2), 66-73; (b) De Wildeman, S. M. A.; Sonke, T.; Schoemaker, H. E.; May, O., Biocatalytic reductions: From lab curiosity to "first choice". *Accounts Chem. Res.* **2007**, *40* (12), 1260-1266; (c) Huisman, G. W.; Liang, J.; Krebber, A., Practical chiral alcohol manufacture using ketoreductases. *Curr Opin Chem Biol* **2010**, *14* (2), 122-129.

54. (a) Chartrain, M.; Greasham, R.; Moore, J.; Reider, P.; Robinson, D.; Buckland, B., Asymmetric bioreductions: application to the synthesis of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2001**, *11* (4-6), 503-512; (b) Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C., *Industrial Biotransformations*. 2nd ed.; John Wiley and sons, Inc. Verlag GmbH & Co, kGaA.: Weinheim, 2006.

55. Moss, G. NC-IUBMB, Nomenclature Committee of the International Union of Biotechnology and Molecular Biology. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.

56. (a) Oppermann, U.; Filling, C.; Hult, M.; Shafqat, N.; Wu, X.; Lindh, M.; Shafqat, J.; Nordling, E.; Kallberg, Y.; Persson, B.; Jörnvall, H., Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem-Biol Interact* **2003**, *143-144*, 247-253; (b) Persson, B.; Kallberg, Y.; Bray, J. E.; Bruford, E.; Dellaporta, S. L.; Favia, A. D.; Duarte, R. G.; Jörnvall, H.; Kavanagh, K. L.; Kedishvili, N.; Kisiela, M.; Maser, E.; Mindnich, R.; Orchard, S.; Penning, T. M.; Thornton, J. M.; Adamski, J.; Oppermann, U., The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chem Biol Interact* **2009**, *178* (1-3), 94-8.

57. Rao, S. T.; Rossmann, M. G., Comparison of super-secondary structures in proteins. *J Mol Biol* **1973**, *76* (2), 241-250.

58. Gani, O. A. B. S. M.; Adekoya, O. A.; Giurato, L.; Spyrakis, F.; Cozzini, P.; Guccione, S.; Winberg, J.-O.; Sylte, I., Theoretical Calculations of the Catalytic Triad in Short-Chain Alcohol Dehydrogenases/Reductases. *Biophysical Journal* **2008**, *94* (4), 1412-1427.

59. (a) Kallberg, Y.; Oppermann, U.; Jörnvall, H.; Persson, B., Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs) - Coenzyme-based functional assignments in completed genomes. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269* (18), 4409-4417; (b) Persson, B.; Kallberg, Y.; Oppermann, U.; Jörnvall, H., Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem-Biol Interact* **2003**, *143-144*, 271-278; (c) Persson, B.; Hedlund, J.; Jörnvall, H., Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cell Mol Life Sci* **2008**, *65* (24), 3879-3894.

60. (a) Jornvall, H.; Hoog, J. O.; Persson, B., SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Lett* **1999**, *445* (2-3), 261-4; (b) Jornvall, H.; Shafqat, J.; Persson, B., Variations and constant patterns in eukaryotic MDR enzymes - Conclusions from novel structures and characterized genomes. *Chem-Biol Interact* **2001**, *130* (1-3), 491-498.
61. Riveros-Rosas, H.; Julian-Sanchez, A.; Villalobos-Molina, R.; Pardo, J. P.; Pina, E., Diversity, taxonomy and evolution of medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270* (16), 3309-3334.
62. (a) Jez, J. M.; Flynn, T. G.; Penning, T. M., A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem Pharmacol* **1997**, *54* (6), 639-47; (b) Jez, J. M.; Bennett, M. J.; Schlegel, B. P.; Lewis, M.; Penning, T. M., Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem J* **1997**, *326* (Pt 3), 625-36; (c) Penning, T. M.; Drury, J. E., Human aldo-keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Arch Biochem Biophys* **2007**, *464* (2), 241-250.
63. Verduyn, C.; Vankleef, R.; Frank, J.; Schreuder, H.; Vandijken, J. P.; Scheffers, W. A., Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Biochem J* **1985**, *226* (3), 669-677.
64. Hyndman, D.; Penning, T. M.; Jin, Y.; Drury, J.; Mindnich, R.; Spitzer, S. H.; Peña, A. AKR Suprefamily. <http://www.med.upenn.edu/akr/>.
65. Wierenga, R. K., The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *Febs Lett* **2001**, *492* (3), 193-198.
66. Stuermer, R.; Hauer, B.; Hall, M.; Faber, K., Asymmetric bioreduction of activated C=C bonds using enoate reductases from the old yellow enzyme family. *Curr Opin Chem Biol* **2007**, *11* (2), 203-213.
67. Kataoka, M.; Kita, K.; Wada, M.; Yasohara, Y.; Hasegawa, J.; Shimizu, S., Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols. *Appl Microbiol Biot* **2003**, *62* (5), 437-445.
68. (a) Gröger, H.; Borchert, S.; Krauber, M.; Hummel, W., Enzyme-catalyzed asymmetric reduction of ketones. In *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology.*, Flickinger, M. C., Ed. John Wiley and sons, Inc.: 2010; (b) Goldberg, K.; Schroer, K.; Lutz, S.; Liese, A., Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols - part I: processes with isolated enzymes. *Appl Microbiol Biot* **2007**, *76* (2), 237-248.
69. Drauz, K.; Waldmann, H., *Enzyme catalysis in organic synthesis*. 2nd ed.; Wiley-VCH: 2002.
70. Moore, J. C.; Pollard, D. J.; Kosjek, B.; Devine, P. N., Advances in the enzymatic reduction of ketones. *Accounts Chem. Res.* **2007**, *40* (12), 1412-1419.

71. (a) Klinman, J. P., Probes of mechanism and transition-state structure in the alcohol dehydrogenase reaction. *CRC Crit Rev Biochem* **1981**, *10* (1), 39-78; (b) Leskovac, V.; Trivic, S.; Pericin, D., The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **2002**, *2* (4), 481-94; (c) Smidt, O. d.; Preez, J. C. d.; Albertyn, J., The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *Fems Yeast Res* **2008**, *8* (7), 967-978.

72. (a) Ryzewski, C. N.; Pietruszko, R., Kinetic mechanism of horse liver alcohol dehydrogenase SS. *Biochemistry-U.S.* **1980**, *19* (21), 4843-8; (b) Eklund, H.; Plapp, B. V.; Samama, J. P.; Branden, C. I., Binding of substrate in a ternary complex of horse liver alcohol dehydrogenase. *J Biol Chem* **1982**, *257* (23), 14349-58; (c) Cedergren-Zeppezauer, E., Crystal-structure determination of reduced nicotinamide adenine dinucleotide complex with horse liver alcohol dehydrogenase maintained in its apo conformation by zinc-bound imidazole. *Biochemistry-U.S.* **1983**, *22* (25), 5761-72; (d) Dahl, K. H.; Eklund, H.; McKinley-McKee, J. S., Enantioselective affinity labelling of horse liver alcohol dehydrogenase. Correlation of inactivation kinetics with the three-dimensional structure of the enzyme. *Biochem J* **1983**, *211* (2), 391-6; (e) Eklund, H., Structural studies of horse liver alcohol dehydrogenase: coenzyme, substrate and inhibitor binding. *Pharmacol Biochem Behav* **1983**, *18 Suppl 1*, 73-81; (f) Foucaud, B.; Biellmann, J. F., Properties of horse liver alcohol dehydrogenase modified by the affinity label 3-chloroacetylpyridine-adenine dinucleotide. *Biochim Biophys Acta* **1983**, *748* (3), 362-6; (g) Jones, J. B., An illustrative example of a synthetically useful enzyme: horse liver alcohol dehydrogenase. *Ciba Found Symp* **1985**, *111*, 3-21; (h) Eklund, H., Coenzyme binding in alcohol dehydrogenase. *Biochem Soc Trans* **1989**, *17* (2), 293-6; (i) Plapp, B. V., Conformational changes and catalysis by alcohol dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* **2010**, *493* (1), 3-12; (j) Eklund, H.; Ramaswamy, S., Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cell Mol Life Sci* **2008**, *65* (24), 3907-3917.

73. (a) Olofsson, L.; Nicholls, I. A.; Wikman, S., TBADH activity in water-miscible organic solvents: correlations between enzyme performance, enantioselectivity and protein structure through spectroscopic studies. *Org Biomol Chem* **2005**, *3* (5), 750-755; (b) Jonsson, A.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B., Thermodynamic and kinetic aspects on water vs. organic solvent as reaction media in the enzyme-catalysed reduction of ketones. *Bba-Protein Struct M* **1999**, *1430* (2), 313-322; (c) Peretz, M.; Bogin, O.; TelOr, S.; Cohen, A.; Li, G. S.; Chen, J. S.; Burstein, Y., Molecular cloning, nucleotide sequencing, and expression of genes encoding alcohol dehydrogenases from the thermophile *Thermoanaerobacter brockii* and the mesophile *Clostridium beijerinckii*. *Anaerobe* **1997**, *3* (4), 259-270; (d) Ford, J. B.; Askins, K. J.; Taylor, K. B., Kinetic-Models for Synthesis by a Thermophilic Alcohol-Dehydrogenase. *Biotechnol Bioeng* **1993**, *42* (3), 367-375; (e) Peretz, M.; Burstein, Y., Amino acid sequence of alcohol dehydrogenase from the thermophilic bacterium *Thermoanaerobium brockii*. *Biochemistry-U.S.* **1989**, *28* (16), 6549-55.

74. Hoffmann, F.; Maser, E., Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the shortchain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metab. Rev.* **2007**, *39* (1), 87-144.

75. (a) Zhang, R. Z.; Xu, Y.; Sun, Y.; Zhang, W. C.; Xiao, R., Ser67Asp and His68Asp Substitutions in *Candida parapsilosis* Carbonyl Reductase Alter the Coenzyme Specificity and Enantioselectivity of Ketone Reduction. *Appl Environ Microb* **2009**, *75* (7), 2176-2183; (b) Zhang, R. Z.; Zhu, G. Y.; Zhang, W. C.; Cao, S.; Ou, X. J.; Li, X. M.; Bartlam, M.; Xu, Y.; Zhang, X. C.; Rao, Z. H., Crystal structure of a carbonyl reductase from *Candida parapsilosis* with anti-Prelog stereospecificity. *Protein Sci* **2008**, *17* (8), 1412-1423; (c) Nie, Y.; Xu, Y.; Mu, X. Q.; Wang, H. Y.; Yang, M.; Xiao, R., Purification, characterization, gene cloning, and expression of a novel alcohol dehydrogenase with anti-prelog stereospecificity from *Candida parapsilosis*. *Appl Environ Microb* **2007**, *73* (11), 3759-3764; (d) Yamamoto, H.; Kawada, K.; Matsuyama, A.; Kobayashi, Y., Cloning and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for a secondary alcohol dehydrogenase from *Candida parapsilosis*. *Biosci Biotech Bioch* **1999**, *63* (6), 1051-1055; (e) Peters, J.; Minuth, T.; Kula, M. R., A Novel NADH-Dependent Carbonyl Reductase with an Extremely Broad Substrate Range from *Candida-Parapsilosis* - Purification and Characterization. *Enzyme Microb Tech* **1993**, *15* (11), 950-958.

76. (a) Jaeger, E., Purification of coniferyl alcohol-dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* *Methods Enzymol.* **1988**, *161*, 301-306; (b) Ludwig, B.; Akundi, A.; Kendall, K., A long-chain secondary alcohol-dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* ATCC-4277. *Appl Environ Microb* **1995**, *61* (10), 3729-3733; (c) Nagy, I.; De Mot, R., Sequence analysis of the oxidase/reductase genes upstream of the *Rhodococcus erythropolis* aldehyde dehydrogenase gene *thcA* reveals a gene organisation different from *Mycobacterium tuberculosis*. *DNA Sequence* **1999**, *10* (1), 61-66; (d) Schenkels, P.; Duine, J. A., Nicotinoprotein (NADH-containing) alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 1069: an efficient catalyst for coenzyme-independent oxidation of a broad spectrum of alcohols and the interconversion of alcohols and aldehydes. *Microbiol-Sgm* **2000**, *146*, 775-785; (e) Abokitse, K.; Hummel, W., Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of the gene encoding a (S)-specific alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 43297. *Appl Microbiol Biot* **2003**, *62* (4), 380-386.

77. (a) Bradshaw, C. W.; Hummel, W.; Wong, C. H., *Lactobacillus kefir* alcohol-dehydrogenase - a useful catalyst for synthesis. *J Org Chem* **1992**, *57* (5), 1532-1536; (b) Bradshaw, C. W.; Wong, C. Hydride ion transfer to or from pro-R face of NADPH or NADP|is catalysed by *Lactobacillus kefir* alcohol dehydrogenase used to prepare labelled NADPH or alcohol. US5342767-A, 1994; (c) Chen, Q.; Hu, Y.; Zhao, W.; Zhu, C.; Zhu, B., Cloning, Expression, and Characterization of a Novel (S)-Specific Alcohol Dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*. *Appl Biochem Biotech* **2010**, *160* (1), 19-29; (d) Weckbecker, A.; Hummel, W., Cloning, expression, and characterization of an (R)-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*. *Biocatal. Biotransform.* **2006**, *24* (5), 380-389.

78. (a) Riermeier, T.; Bornscheuer, U.; Altenbuchner, J.; Hildebrandt, P. Selective sec. S-alcohol prodn. from ketone. EP1241263-A; EP1241263-A1; JP2002306189-A; DE10112401-A1; US2003171544-A1, 2003; (b) Prod. of NAD plus dependent alcohol dehydrogenase|by culturing *Pseudomonas* sp. microorganisms, used in prodn. of aldehyde(s). JP7313153-A, 1996; (c) Britt, A. J.; Bruce, N. C.; Lowe, C. R., Purification and characterisation of an NAD(+)-dependent secondary

alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas maltophilia* MB11L. *FEMS Microbiol Lett* **1992**, *72* (1), 49-55.

79. (a) Besse, P.; Bolte, J.; Fauve, A.; Veschambre, H., Bakers-Yeast Reduction of Alpha-Diketones - Investigation and Control of the Enzymatic Pathway. *Bioorg Chem* **1993**, *21* (3), 342-353; (b) Matsuda, T.; Harada, T.; Nakajima, N.; Nakamura, K., Mechanism for improving stereoselectivity for asymmetric reduction using acetone powder of microorganism. *Tetrahedron Lett* **2000**, *41* (21), 4135-4138; (c) Matsuda, T.; Harada, T.; Nakajima, N.; Itoh, T.; Nakamura, K., Two classes of enzymes of opposite stereochemistry in an organism: One for fluorinated and another for nonfluorinated substrates. *J Org Chem* **2000**, *65* (1), 157-163.

80. Presecki, A. V.; Findrik, Z.; Zelic, B., Modeling of the biotransformation processes. *Chem Biochem Eng Q* **2006**, *20* (3), 227-241.

81. (a) Martinez, F.; Del Campo, C.; Sinisterra, J. V.; Llama, E. F., Preparation of halohydrin beta-blocker precursors using yeast-catalysed reduction. *Tetrahedron-Asymmetr* **2000**, *11* (23), 4651-4660; (b) Soni, P.; Banerjee, U. C., Biotransformations for the production of the chiral drug (S)-Duloxetine catalyzed by a novel isolate of *Candida tropicalis*. *Appl Microbiol Biot* **2005**, *67* (6), 771-777; (c) Ernst, M.; Kaup, B.; Muller, M.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H., Enantioselective reduction of carbonyl compounds by whole-cell biotransformation, combining a formate dehydrogenase and a (R)-specific alcohol dehydrogenase. *Appl Microbiol Biot* **2005**, *66* (6), 629-634; (d) Heuser, F.; Schroer, K.; Lutz, S.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H., Enhancement of the NAD(P)(H) pool in *Escherichia coli* for biotransformation. *Eng Life Sci* **2007**, *7* (4), 343-353; (e) Marques, M. P. C.; Carvalho, F.; Magalhaes, S.; Cabral, J. M. S.; Fernandes, P., Screening for suitable solvents as substrate carriers for the microbial side-chain cleavage of sitosterol using microtitre plates. *Process Biochem* **2009**, *44* (5), 556-561; (f) Nie, Y.; Xu, Y.; Hu, Q. S.; Xiao, R., A New Strategy to Improve the Efficiency and Sustainability of *Candida parapsilosis* Catalyzing Deracemization of (R,S)-1-Phenyl-1,2-Ethanediol Under Non-Growing Conditions: Increase of NADPH Availability. *J Microbiol Biotechnol* **2009**, *19* (1), 65-71.

82. (a) Barbieri, C.; Caruso, E.; D'Arrigo, P.; Fantoni, G. P.; Servi, S., Chemo-enzymatic synthesis of (R)- and (S)-3,4-dichlorophenylbutanolide intermediate in the synthesis of sertraline. *Tetrahedron-Asymmetr* **1999**, *10* (20), 3931-3937; (b) Kaluzna, I.; Andrew, A. A.; Bonilla, M.; Martzen, M. R.; Stewart, J. D., Enantioselective reductions of ethyl 2-oxo-4-phenylbutyrate by *Saccharomyces cerevisiae* dehydrogenases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2002**, *17* (2), 101-105; (c) Rodriguez, J. D. C.; Garcia-Burgos, C.; Alvarez, M. A. Q.; Ruiz, E. A.; Gago, J. V. S., *Willippsis californica*, *Willippsis saturnus*, and *Pachysolen tannophilus*: Novel microorganisms for stereoselective oxidation of secondary alcohols. *Biotechnol Bioeng* **2004**, *87* (5), 632-640.

83. Zhang, W.; O'Connor, K.; Wang, D. I. C.; Li, Z., Bioreduction with efficient recycling of NADPH by coupled permeabilized microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **2009**, *75* (3), 687-94.

84. Hoyos, P.; Sansottera, G.; Fernández, M.; Molinari, F.; Sinisterra, J. V.; Alcántara, A. R., Enantioselective monoreduction of different 1,2-diaryl-1,2-diketones catalysed by lyophilised whole cells from *Pichia glucozyma*. *Tetrahedron* **2008**, *64* (34), 7929-7936.
85. Sheldon, R. A.; Arends, I.; Hanefeld, U., Catalytic reductions. In *Green Chemistry and Catalysis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2007; pp 91-131.
86. (a) Prelog, V., Specification of the stereospecificity of some oxido-reductases by diamond lattice sections. *Pure Appl Chem* **1964**, *9* (1), 119-130; (b) Prelog, V., Chirality in chemistry - Nobel Lecture (Reprinted from *Croatica Chemica Acta*, 1975). *Croat Chem Acta* **2006**, *79* (3), XLIX-LVII.
87. Parachin, N. S.; Carlquist, M.; Gorwa-Grauslund, M. F., Bioreduction. In *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology.*, Flickinger, M. C., Ed. John Wiley and sons, Inc.: 2010.
88. (a) Berenguer-Murcia, A.; Fernandez-Lafuente, R., New Trends in the Recycling of NAD(P)H for the Design of Sustainable Asymmetric Reductions Catalyzed by Dehydrogenases. *Curr Org Chem* **2010**, *14*, 1000-1021; (b) Hussain, W.; Pollard, D. J.; Truppo, M.; Lye, G. J., Enzymatic ketone reductions with co-factor recycling: Improved reactions with ionic liquid co-solvents. *J Mol Catal B-Enzym* **2008**, *55* (1-2), 19-29; (c) Wichmann, R.; Vasic-Racki, D., Cofactor regeneration at the lab scale. *Adv Biochem Eng Biot* **2005**, *92*, 225-260; (d) Adlercreutz, P., Cofactor regeneration in biocatalysis in organic media. *Biocatal. Biotransform.* **1996**, *14* (1), 1-30.
89. (a) Goldberg, K.; Edegger, K.; Kroutil, W.; Liese, A., Overcoming the thermodynamic limitation in asymmetric hydrogen transfer reactions catalyzed by whole cells. *Biotechnol Bioeng* **2006**, *95* (1), 192-198; (b) Schroer, K.; Tacha, E.; Lutz, S., Process intensification for substrate-coupled whole cell ketone reduction by in situ acetone removal. *Org Process Res Dev* **2007**, *11* (5), 836-841; (c) Lavandera, I.; Holler, B.; Kern, A.; Ellmer, U.; Glieder, A.; de Wildeman, S.; Kroutil, W., Asymmetric anti-Prelog reduction of ketones catalysed by *Paracoccus pantotrophus* and *Comamonas* sp cells via hydrogen transfer. *Tetrahedron-Asymmetr* **2008**, *19* (16), 1954-1958; (d) Lavandera, I.; Kern, A.; Ferreira-Silva, B.; Glieder, A.; de Wildeman, S.; Kroutil, W., Stereoselective bioreduction of bulky-bulky ketones by a novel ADH from *Ralstonia* sp. *J Org Chem* **2008**, *73* (15), 6003-6005; (e) Wallner, S. R.; Lavandera, I.; Mayer, S. F.; Öhrlein, R.; Hafner, A.; Edegger, K.; Faber, K.; Kroutil, W., Stereoselective anti-Prelog reduction of ketones by whole cells of *Comamonas testosteroni* in a 'substrate-coupled' approach. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2008**, *55* (3-4), 126-129.
90. Wandrey, C., Biochemical reaction engineering for redox reactions. *Chem Rec* **2004**, *4* (4), 254-265.
91. Tishkov, V. I.; Popov, V. O., Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomol. Eng* **2006**, *23* (2-3), 89-110.
92. (a) Blank, L. M.; Ebert, B. E.; Buhler, B.; Schmid, A., Metabolic capacity estimation of *Escherichia coli* as a platform for redox biocatalysis: Constraint-based modeling and experimental verification.

Biotechnol Bioeng **2008**, *100* (6), 1050-1065; (b) Schroer, K.; Mackfeld, U.; Tana, I. A. W.; Wandrey, C.; Heuser, F.; Bringer-Meyer, S.; Weckbecker, A.; Hummel, W.; Dausmann, T.; Pfaller, R.; Liese, A.; Lutz, S., Continuous asymmetric ketone reduction processes with recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **2007**, *132* (4), 438-444; (c) Goldberg, K.; Schroer, K.; Lutz, S.; Liese, A., Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols - part II: whole-cell reductions. *Appl Microbiol Biot* **2007**, *76* (2), 249-255.

93. (a) Vrtis, J. M.; White, A. K.; Metcalf, W. W.; Donk, W. A. v. d., Phosphite Dehydrogenase: A Versatile Cofactor-Regeneration Enzyme. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2002**, *41* (17), 3257-3259; (b) Relyea, H. A.; van der Donk, W. A., Mechanism and applications of phosphite dehydrogenase. *Bioorg Chem* **2005**, *33* (3), 171-189; (c) Johannes, T. W.; Woodyer, R. D.; Zhao, H., Efficient regeneration of NADPH using an engineered phosphite dehydrogenase. *Biotechnol Bioeng* **2007**, *96* (1), 18-26.

94. Wong, C. H.; Whitesides, G. M., *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*. Pergamon: Trowbridge, 1994.

95. Nakamura, K.; Yamanaka, R.; Matsuda, T.; Harada, T., Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14* (18), 2659-2681.

96. Gupta, A. K.; Tschentscher, A.; Bobkova, M. 2-butanol production method. US7371903, 2008.

97. (a) Kometani, T.; Yoshii, H.; Kitatsuji, E.; Nishimura, H.; Matsuno, R., Large-scale preparation of (S)-ethyl 3-hydroxybutanoate with a high enantiomeric excess through baker's yeast-mediated bioreduction. *J Ferment Bioeng* **1993**, *76* (1), 33-37; (b) Kometani, T.; Yoshii, H.; Matsuno, R., Large-scale production of chiral alcohols with baker's yeast. *J Mol Catal B-Enzym* **1996**, *1* (2), 45-52.

98. Itoh, N.; Nakamura, M.; Inoue, K.; Makino, Y., Continuous production of chiral 1,3-butanediol using immobilized biocatalysts in a packed bed reactor: promising biocatalysis method with an asymmetric hydrogen-transfer bioreduction. *Appl Microbiol Biot* **2007**, *75* (6), 1249-1256.

99. Patel, R. N.; Chu, L.; Mueller, R., Diastereoselective microbial reduction of (S)-[3-chloro-2-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]carbamic acid, 1,1-dimethylethyl ester. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14* (20), 3105-3109.

100. Anderson, B. A.; Hansen, M. M.; Harkness, A. R.; Henry, C. L.; Vicenzi, J. T.; Zmijewski, M. J., Application of a Practical Biocatalytic Reduction to an Enantioselective Synthesis of the 5h-2,3-Benzodiazepine Ly300164. *J Am Chem Soc* **1995**, *117* (49), 12358-12359.

101. (a) Haberland, J. r.; Hummel, W.; Dausmann, T.; Liese, A., New Continuous Production Process for Enantiopure (2R,5R)-Hexanediol. *Org Process Res Dev* **2002**, *6* (4), 458-462; (b) Haberland, J.; Kriegesmann, A.; Wolfram, E.; Hummel, W.; Liese, A., Diastereoselective synthesis of optically active (2R,5R)-hexanediol. *Appl Microbiol Biot* **2002**, *58* (5), 595-599; (c) Hilterhaus, L.; Liese, A., Building blocks. In *White Biotechnology*, 2007; Vol. 105, pp 133-173; (d) Tan, A. W. I.; Fischbach, M.; Huebner, H.; Buchholz, R.; Hummel, W.; Dausmann, T.; Wandrey, C.; Liese, A., Synthesis of enantiopure (5

- R)-hydroxyhexane-2-one with immobilised whole cells of *Lactobacillus kefir*. *Applied Microbiology & Biotechnology* **2006**, *71* (3), 289-293; (e) Katzberg, M.; Wechler, K.; Muller, M.; Dunkelmann, P.; Stohrer, J.; Hummel, W.; Bertau, M., Biocatalytical production of (5S)-hydroxy-2-hexanone. *Org Biomol Chem* **2009**, *7* (2), 304-314.
102. Pollard, D.; Truppo, M.; Pollard, J.; Chen, C. Y.; Moore, J., Effective synthesis of (S)-3,5-bistrifluoromethylphenyl ethanol by asymmetric enzymatic reduction. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17* (4), 554-559.
103. Rasor, J. P.; Voss, E., Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. *Applied Catalysis A: General* **2001**, *221* (1-2), 145-158.
104. Kosjek, B.; Nti-Gyabaah, J.; Telari, K.; Dunne, L.; Moore, J. C., Preparative asymmetric synthesis of 4,4-dimethoxytetrahydro-2H-pyran-3-ol with a ketone reductase and in situ cofactor recycling using glucose dehydrogenase. *Org Process Res Dev* **2008**, *12* (4), 584-588.
105. (a) Liang, J.; Jeene, S. J.; Mundorff, E.; Voladri, R.; Lalonde, J.; Huisman, G. Improved ketoreductase polypeptides for the stereoselective production of (R)-3-hydroxythiolane. WO2009029554, 2009; (b) Liang, J.; Mundorff, E.; Voladri, R.; Jenne, S.; Gilson, L.; Conway, A.; Krebber, A.; Wong, J.; Huisman, G.; Truesdell, S.; Lalonde, J., Highly Enantioselective Reduction of a Small Heterocyclic Ketone: Biocatalytic Reduction of Tetrahydrothiophene-3-one to the Corresponding (R)-Alcohol. *Org Process Res Dev* **2010**, *14* (1), 188-192.
106. Patel, R. N., Biocatalytic synthesis of intermediates for the synthesis of chiral drug substances. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12* (6), 587-604.
107. Truppo, M. D.; Kim, J.; Brower, M.; Madin, A.; Sturr, M. G.; Moore, J. C., A novel resolution of a pharmaceutically important bridged bicyclic ketone intermediate via selective enzymatic reduction with a commercially available ketoreductase. *J Mol Catal B-Enzym* **2006**, *38* (3-6), 158-162.
108. Friberg, A.; Johanson, T.; Franzen, J.; Gorwa-Grauslund, M. F.; Frejd, T., Efficient bioreduction of bicyclo[2.2.2]octane-2,5-dione and bicyclo[2.2.2]oct-7-ene-2,5-dione by genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Org Biomol Chem* **2006**, *4* (11), 2304-2312.
109. Johanson, T.; Carlquist, M.; Olsson, C.; Rudolf, A.; Frejd, T.; Gorwa-Grauslund, M. F., Reaction and strain engineering for improved stereo-selective whole-cell reduction of a bicyclic diketone. *Appl Microbiol Biot* **2008**, *77* (5), 1111-1118.
110. Grau, B. T.; Devine, P. N.; DiMichele, L. N.; Kosjek, B., Chemo- and enantioselective routes to chiral fluorinated hydroxyketones using ketoreductases. *Org Lett* **2007**, *9*, 4951-4954.
111. Shafiee, A.; Motamedi, H.; King, A., Purification, characterization and immobilization of an NADPH-dependent enzyme involved in the chiral specific reduction of the keto ester M, an intermediate in the synthesis of an anti-asthma drug, Montelukast, from *Microbacterium campoquemadoensis* (MB5614). *Appl Microbiol Biot* **1998**, *49* (6), 709-717.

112. Liang, J.; Lalonde, J.; Borup, B.; Mitchell, V.; Mundorff, E.; Trinh, N.; Kochrekar, D. A.; Cherat, R. N.; Pai, G. G., Development of a Biocatalytic Process as an Alternative to the (-)-DIP-Cl-Mediated Asymmetric Reduction of a Key Intermediate of Montelukast. *Org Process Res Dev* **2010**, *14* (1), 193-198.
113. Chartrain, M.; Roberge, C.; Chung, J.; McNamara, J.; Zhao, D. L.; Olewinski, R.; Hunt, G.; Salmon, P.; Roush, D.; Yamazaki, S.; Wang, T.; Grabowski, E.; Buckland, B.; Greasham, R., Asymmetric bioreduction of (2-(4-nitro-phenyl)-N-(2-oxo-2-pyridin-3-yl-ethyl)-acetamide) to its corresponding (R) alcohol [(R)-N-(2-hydroxy-2-pyridin-3-yl-ethyl)-2-(4-nitro-phenyl)-acetamide] by using *Candida sorbophila* MY 1833. *Enzyme Microb Tech* **1999**, *25* (6), 489-496.
114. Homann, M. J.; Previte, E. Stereoselective microbial reduction of 5-fluorophenyl-5-oxo-pentanoic acid and a phenyloxazolidinone condensation product thereof US 5618707, 1997.
115. Truppo, M. D.; Pollard, D.; Devine, P., Enzyme-catalyzed enantioselective diaryl ketone reductions. *Org Lett* **2007**, *9*, 335-338.
116. Chartrain, M.; Lynch, J.; Choi, W. B.; Churchill, H.; Patel, S.; Yamazaki, S.; Volante, R.; Greasham, R., Asymmetric bioreduction of a bisaryl ketone to its corresponding (S)-bisaryl alcohol, by the yeast *Rhodotorula pilimanae* ATCC 32762. *J Mol Catal B-Enzym* **2000**, *8* (4-6), 285-288.
117. (a) Schmidt, E.; Ghisalba, O.; Gyax, D.; Sedelmeier, G., Optimization of a process for the production of (R)-2-hydroxy-4-phenylbutyric acid - an intermediate for inhibitors of angiotensin converting enzyme. *J Biotechnol* **1992**, *24* (3), 315-327; (b) Schmidt, E.; Blaser, H. U.; Fauquex, P. F.; Sedelmeier, G.; Spindler, F., Comparison of chemical and biochemical reduction methods for the synthesis of (R)-2-hydroxy-4-phenylbutyric acid. *Microbial Reagents in Organic Synthesis* **1992**, *381*, 377-388; (c) Ghisalba, O.; Gyax, D.; Lattmann, R.; Schar, H. P.; Schmidt, E.; Sedelmeier, G.; Schaer, H. Optically active alpha-hydroxy-carboxylic acid prepn. from racemate|by stereospecific redn. of 2-oxo-4-phenyl-butyrac acid with lactate dehydrogenase enzyme. EP347374-A1; PT90747-A; DK8902712-A; FI8902702-A; JP2039893-A; US5098841-A; IL90527-A; EP347374-B1; DE58906409-G; ES2059817-T3; IE63497-B; CA1336081-C; FI95047-B; JP2873236-B2; DK172667-B; KR165102-B1, 1989.
118. Patel, R. N.; Chu, L.; Chidambaram, R.; Zhu, J.; Kant, J., Enantioselective microbial reduction of 2-oxo-2-(1', 2', 3', 4'-tetrahydro-1', 1', 4', 4'-tetramethyl-6'-naphthalenyl) acetic acid and its ethyl ester. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13* (4), 349-355.
119. (a) Tao, J. H.; McGee, K., Development of a continuous enzymatic process for the preparation of (R)-3-(4-fluorophenyl)-2-hydroxy propionic acid. *Org Process Res Dev* **2002**, *6* (4), 520-524; (b) Tao, J. H.; McGee, K., Continuous enzymatic process for a practical synthesis of (R)-3-(4-fluorophenyl)-2-hydroxypropionic acid. *Abstr Pap Am Chem S* **2001**, *221*, 326-ORGN.
120. Walton, A. Z.; Stewart, J. D., Understanding and Improving NADPH-Dependent Reactions by Nongrowing *Escherichia coli* Cells. *Biotechnol Progr* **2004**, *20* (2), 403-411.

121. Schroer, K.; Mackfeld, U.; Tan, I. A. W.; Wandrey, C.; Heuser, F.; Bringer-Meyer, S.; Weckbecker, A.; Hummel, W.; Daußmann, T.; Pfaller, R.; Liese, A.; Lütz, S., Continuous asymmetric ketone reduction processes with recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **2007**, *132* (4), 438-444.
122. Kaluzna, I. A.; Feske, B. D.; Wittayanan, W.; Ghiviriga, I.; Stewart, J. D., Stereoselective, biocatalytic reductions of α -chloro- β -keto esters. *J Org Chem* **2005**, *70* (1), 342-345.
123. Kizaki, N.; Yasohara, Y.; Hasegawa, J.; Wada, M.; Kataoka, M.; Shimizu, S., Synthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes. *Appl Microbiol Biot* **2001**, *55* (5), 590-595.
124. Ma, S. K.; Gruber, J.; Davis, C.; Newman, L.; Gray, D.; Wang, A.; Grate, J.; Huisman, G. W.; Sheldon, R. A., A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate. *Green Chem* **2010**, *12* (1), 81-86.
125. (a) Patel, R. N., Stereoselective biotransformations in synthesis of some pharmaceutical intermediates. In *Advances in Applied Microbiology*, Vol 43, 1997; Vol. 43, pp 91-140; (b) Patel, R. N.; McNamee, C. G.; Banerjee, A.; Howell, J. M.; Robison, R. S.; Szarka, L. J., Stereoselective reduction of β -keto-esters by *Geotrichum candidum*. *Enzyme Microb Tech* **1992**, *14* (9), 731-738.
126. Shaw, N.; Robins, K.; Kiener, A., Lonza: 20 Years of Biotransformations. *Adv Synth Catal* **2003**, *345* (4), 425-435.
127. (a) Chartrain, M.; Armstrong, J.; Katz, L.; Keller, J.; Mathre, D.; Greasham, R., Asymmetric bioreduction of a [beta]-ketoester to (R)-[beta]-hydroxyester by the fungus *Mortierella alpina* MF 5534. *J Ferment Bioeng* **1995**, *80* (2), 176-179; (b) Zaks, A.; Dodds, D. R., Application of biocatalysis and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals. *Drug Discov Today* **1997**, *2* (12), 513-531.
128. Borup, B.; Campapiano, O.; Mundorff, E.; Voladri, R.; Campopiano, O. New ketoreductase polypeptide capable of converting methyl-2-benzamidomethyl-3-oxobutyrate as substrate, to product 2S,3R-methyl-2-benzamidomethyl-3-hydroxybutyrate, with specific percent stereomeric excess. WO2009046153-A1; US2009162909-A1; WO2009046153-A4; KR2010065387-A; EP2205727-A1; IN201002450-P4, WO2009046153-A1 09 Apr 2009 C12N-009/04 200929.
129. Nanduri, V. B.; Hanson, R. L.; Goswami, A.; Wasyluk, J. M.; LaPorte, T. L.; Katipally, K.; Chung, H. J.; Patel, R. N., Biochemical approaches to the synthesis of ethyl 5-(S)-hydroxyhexanoate and 5-(S)-hydroxyhexanenitrile. *Enzyme Microb Tech* **2001**, *28* (7-8), 632-636.
130. (a) Patel, R. N.; McNamee, C. G.; Banerjee, A.; Szarka, L. J. 3,5-Dioxo ester stereospecific microbiological redn. for enantiomeric intermediates - by treating diketo ester with reductase supplying microorganism, for cholesterol lowering agent, esp. cpd. with P-fluorophenyl rings using single or two stage fermentation. EP569998-A; EP569998-A2; CA2094191-A; JP6030783-A; US5324662-A; EP569998-A3; EP569998-B1; DE69329719-E; ES2152234-T3; CA2094191-C; JP3476860-B2,

EP569998-A EP569998-A2 18 Nov 1993 C12P-007/62 199346; (b) Patel, R. N.; Banerjee, A.; McNamee, C. G.; Brzozowski, D.; Hanson, R. L.; Szarka, L. J., Enantioselective microbial reduction of 3,5-dioxo-6-(benzyloxy) hexanoic acid, ethyl-ester. *Enzyme Microb Tech* **1993**, *15* (12), 1014-1021.

131. Machado, L. L.; Souza, J. S. N.; de Mattos, M. C.; Sakata, S. K.; Cordell, G. A.; Lemos, T. L. G., Bioreduction of aldehydes and ketones using *Manihot* species. *Phytochemistry* **2006**, *67* (15), 1637-1643.

132. Petersson, A.; Almeida, J. R. M.; Modig, T.; Karhumaa, K.; Hahn-Hägerdal, B.; Gorwa-Grauslund, M. F.; Lidén, G., A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. *Yeast* **2006**, *23* (6), 455-464.

133. Gooding, O. W.; Voladri, R.; Bautista, A.; Hopkins, T.; Huisman, G.; Jenne, S.; Ma, S.; Mundorff, E. C.; Savile, M. M.; Truesdell, S. J.; Wong, J. W., Development of a Practical Biocatalytic Process for (R)-2-Methylpentanol. *Org Process Res Dev* **2010**, *14* (1), 119-126.

134. Bougioukou, D. J.; Walton, A. Z.; Stewart, J. D., Towards preparative-scale, biocatalytic alkene reductions. *Chem Commun* **2010**, *46* (45), 8558-8560.

135. Kataoka, M.; Kotaka, A.; Thiwthong, R.; Wada, M.; Nakamori, S.; Shimizu, S., Cloning and overexpression of the old yellow enzyme gene of *Candida macedoniensis*, and its application to the production of a chiral compound. *J Biotechnol* **2004**, *114* (1-2), 1-9.

136. Meah, Y.; Massey, V., Old Yellow Enzyme: Stepwise reduction of nitro-olefins and catalysis of aci-nitro tautomerization. *P Natl Acad Sci USA* **2000**, *97* (20), 10733-10738.

137. (a) Hanson, R. L.; Schwinden, M. D.; Banerjee, A.; Brzozowski, D. B.; Chen, B. C.; Patel, B. P.; McNamee, C. G.; Kodersha, G. A.; Kronenthal, D. R.; Patel, R. N.; Szarka, L. J., Enzymatic synthesis of L-6-hydroxynorleucine. *Bioorgan Med Chem* **1999**, *7* (10), 2247-2252; (b) Patel, R. N., Enzymatic synthesis of chiral intermediates for Omapatrilat, an antihypertensive drug. *Biomol. Eng* **2001**, *17* (6), 167-182.

138. Hanson, R. L.; Shi, Z.; Brzozowski, D. B.; Banerjee, A.; Kissick, T. P.; Singh, J.; Pullockaran, A. J.; North, J. T.; Fan, J.; Howell, J.; Durand, S. C.; Montana, M. A.; Kronenthal, D. R.; Mueller, R. H.; Patel, R. N., Regioselective enzymatic aminoacylation of lobucavir to give an intermediate for lobucavir prodrug. *Bioorgan Med Chem* **2000**, *8* (12), 2681-2687.

139. Schroer, K.; Lutz, S., A Continuously Operated Bimembrane Reactor Process for the Biocatalytic Production of (2R,5R)-Hexanediol. *Org Process Res Dev* **2009**, *13* (6), 1202-1205.