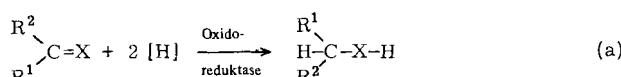


Elektro-enzymatische und elektro-mikrobielle stereospezifische Reduktionen^[**]

Von Helmut Simon, Helmut Günther, Johann Bader und Wilhelm Tischer^[+]

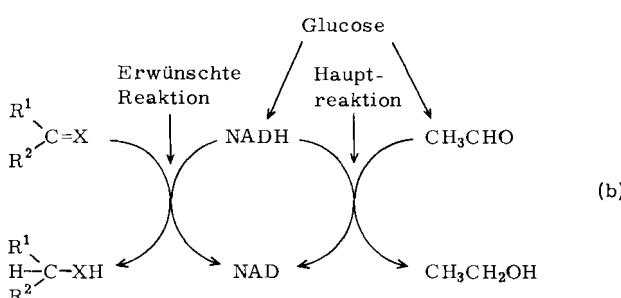
Professor Helmut Holzer zum 60. Geburtstag gewidmet.

In der Natur entstehen zahlreiche chirale Moleküle durch die Reduktion ungesättigter Verbindungen mit Oxioreduktasen, die eine relativ große Substratbreite bei volliger Stereospezifität aufweisen^[1] [Gl. (a)]. Die beiden Reduktionsäquivalente stammen häufig von NADH oder NADPH.

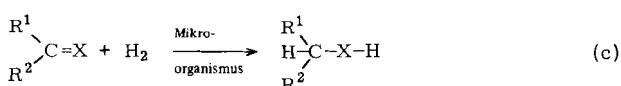


Präparative Umsetzungen verbieten sich wegen des Preises reduzierter Pyridinnucleotide. Daher muß NADH in katalytischen Mengen verwendet und regeneriert werden.

Als Cofermentationen werden solche Reaktionen seit vielen Jahrzehnten durchgeführt; sie haben den Nachteil, daß die gewünschte Reaktion prinzipiell nur eine Nebenreaktion sein kann. So wird z. B. von Hefe bei der Vergärung von Glucose (Elektronendonator) das meiste intermedial gebildete NADH durch die Reduktion von Acetaldehyd (Elektronenacceptor) reoxidiert [Gl. (b)].



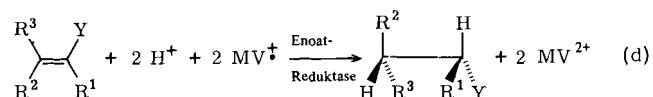
Wir verbesserten diese Situation, indem wir als Elektronendonator $H_2^{[2]}$ zusammen mit anaeroben Mikroorganismen, die über eine Hydrogenase verfügen, verwendeten [Gl. (c)].



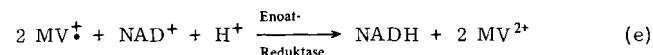
Eine solche Reaktion ist stark exergonisch, und Nebenreaktionen treten dabei kaum auf. Auf diesem Wege haben wir zahlreiche prochirale Verbindungen im präparativen Maßstab in chirale umgewandelt^[2b].

Verwendet man anstelle von Mikroorganismen mehr oder weniger reine Pyridinnucleotid-abhängige Reduktasen und regeneriert NAD(P)H, so hat man in der Regel für präparative Zwecke wenig geeignete Systeme mit je zwei Enzymen, Substraten und Produkten.

Wir isolierten das Enzym, das in Clostridien Enoate (Anionen α,β -ungesättigter Carbonsäuren) NADH-abhängig reduziert^[3] und entdeckten nun, daß dieses Enzym zwei weitere Reaktionen katalysiert [Gl. (d) und (e)].



$Y = COO^-$, CHO ;
 $R^1 = H$, Me, Et, OMe, NHCHO, F, Cl, Br;
 $R^2 = \text{Alkyl, Aryl, Alkoxykarbonyl}$ (kaum Beschränkungen);
 $R^3 = H$, Me, Et, etc.

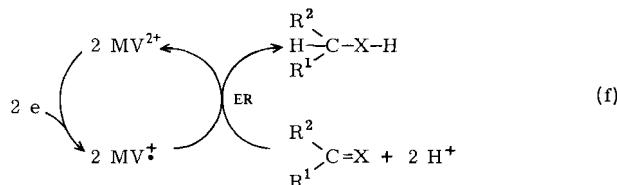


$MV^\ddagger = \text{Methylviologen-Radikalkation}$

$MV^{2+} = \text{Methylviologen-Dikation}$
 $(1,1'-\text{Dimethyl}-4,4'-\text{bipyridinium-Dikation})$

Das Dikation des billigen und stabilen Methylviologens läßt sich kontinuierlich an einer Elektrode reduzieren^[4]. Damit ergibt sich insgesamt das in Gl. (f) skizzierte System.

Eine 0.3 mM Lösung von MV^\ddagger zeigt bei pH 6.4 bereits eine halbmaximale Geschwindigkeit der in Gl. (d) beschriebenen Reaktion.



$e = \text{Elektronen von einer Kathode}$; ER = Enoat-Reduktase;
 $\begin{array}{c} R^1 \\ | \\ R^1-C=X \\ | \\ R^2 \end{array}$ bedeutet die in Gl. (d) angegebenen Substrate oder NAD^+

Die Enoat-Reduktase kann nach Gl. (f) als solche angewendet werden (*elektro-enzymatische Reduktion*) oder in Form von Bakterienzellen (*elektro-mikrobielle Reduktion*). Die Herstellung von (2R)-2-Methyl-3-phenylpropionat mit Enoat-Reduktase aus *Clostridium* La 1 gelingt so in 95% Ausbeute. Analog kann man mit ganzen Zellen (50 mg Trockengewicht) oder z. B. mit in Polyurethan immobilisierten Zellen hydrieren. Die Initialgeschwindigkeiten sinken jedoch auf ca. 40% bzw. 25% der Initialgeschwindigkeit der Reaktion mit reinem Enzym; diese Verlangsamung beruht im wesentlichen auf unterschiedlichen Diffusionsvorgängen.

Es können nicht nur Substrate der Enoat-Reduktase stereospezifisch reduziert werden, sondern solche aller NAD-abhängigen Enzyme [Gl. (e)], die in den verwendeten Zellen außer Enoat-Reduktase vorkommen.

Bisher haben wir Enoat-Reduktase in drei Clostridien nachgewiesen^[5]. Mit ganzen Zellen von *Clostridium sporogenes* (ATCC 3584) haben wir auf diesem Wege z. B. Phenylpyruvat zu (2R)-Phenyllactat und α -Ketosäuren durch reduktive Aminierung in Aminosäuren umgewandelt. Die Umsetzung von Phenylpyruvat läßt sich auch mit *Proteus*

[*] Prof. Dr. H. Simon [+], Dr. H. Günther, Dr. J. Bader
Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-8046 Garching

Dr. W. Tischer
Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica Werk Tutzing 1
Bahnhofstraße 9, D-8132 Tutzing

[+] Korrespondenzautor.

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.
Frau C. Frank danken wir für technische Assistenz.

mirabilis (DSM 30115) erreichen. In zu diesem Zweck gezüchteten Zellen besteht 1–2% des Proteins aus Enoat-Reduktase^[6] und in einem Arbeitstag können 400–500 Einheiten des Enzyms gewonnen werden, da die Isolierungs methode^[3] vereinfacht wurde. 1 mg Enoat-Reduktase reduziert bei 25 °C und pH 6.4 in Gegenwart von 2 mM MV⁺ pro min ca. 10–12 µmol (*E*)-2-Methylcinnamat. Die Geschwindigkeit für zahlreiche andere Enoate liegt im Bereich von 5–20 µmol/min.

Interessant erschien die Frage, ob auch in Aerobiern Enzyme vorkommen, die die Umsetzung nach Gl. (e) katalysieren. Wir fanden, daß *Enterobacter agglomerans*^[7] (CDC 1461–67) eine NADH-abhängige Fumarat-Reduktase, die sich auch durch MV⁺ reduzieren läßt, enthält.

Voraussetzung für die elektro-enzymatische und elektromikrobielle Reduktion ist, daß die ungesättigten Verbindungen weder spontan an der Elektrode noch mit dem reduzierten Mediator Methylviologen reagieren. Diese Voraussetzung, die sich durch Aufnahme von Cyclovoltogrammen oder spektralphotometrisch leicht prüfen läßt, scheint meistens gegeben zu sein.

Wir glauben, daß das Verfahren, das wesentliche Nachteile der Cofermentationen und der Anwendung von isolierten Enzymen mit NAD(P)H-Regenerierung nicht hat, es ermöglicht, zahlreiche chirale Verbindungen zu gewinnen. Mit ganzen Zellen und Wasserstoffgas wurden z. B. 21 Verbindungen reduziert^[3]. Durch Verwendung von ²H₂O-Puffer lassen sich leicht Verbindungen stereospezifisch deuterieren. Bei Cofermentationen haben die Quotienten Gramm Glucose/Äquivalent isoliertes Reduktionsprodukt bzw. Gramm Katalysator (z. B. Mikroorganismen)/Äquivalent isoliertes Reduktionsprodukt Werte zwischen 500 und 10 000^[8]; die mit unserem Verfahren erreichten Werte sind 10–100mal besser.

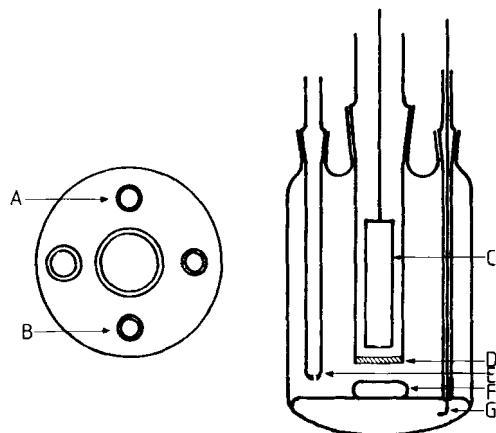


Abb. 1. Ansicht (rechts) und Aufsicht (links) eines für elektro-enzymatische und elektro-mikrobielle Reduktionen geeigneten Reaktionsgefäßes; Volumen 25–160 mL. A = Einlaßrohr, B = Auslaßrohr und Probenentnahme, C = Pt-Anode, D = Diaphragma, E = Referenzelektrode, F = Rührer, G = Hg-Kathode.

Arbeitsvorschrift:

Im Kathodenraum einer elektrochemischen Zelle (Abb. 1) wird eine Lösung von 85 mL, die 0.1 mol/L Phosphatpuffer (pH 6.4), 0.1 mmol/L EDTA, 2.5 mmol/L MV²⁺ sowie 40 mg Rinderserumalbumin (bei Versuchsdauer < 20 h nicht erforderlich) und 1.12 g Natrium-(*E*)-2-methylcinnamat enthält, durch Einleiten von Stickstoff sauerstofffrei gemacht. Der Anodenraum ist durch einen Polyacrylamidpropf vom Kathodenraum getrennt und mit ca. 2 mL 0.1 M Phosphatpuffer (pH 9) gefüllt. Bei –800 mV Kathodenpotential, gemessen gegen eine 0.1 M KCl-Kalomel-Re-

ferenzelektrode, wird MV²⁺ vorreduziert, und es werden 0.5 mg Enoat-Reduktase zugegeben. Bei kontrolliertem Kathodenpotential verläuft die Reaktion wie in Abbildung 2 dargestellt. Der pH-Wert des Katholyten wird mehrmals mit H₃PO₄/H₂O (1:1) neu eingestellt. (Bei Verwendung

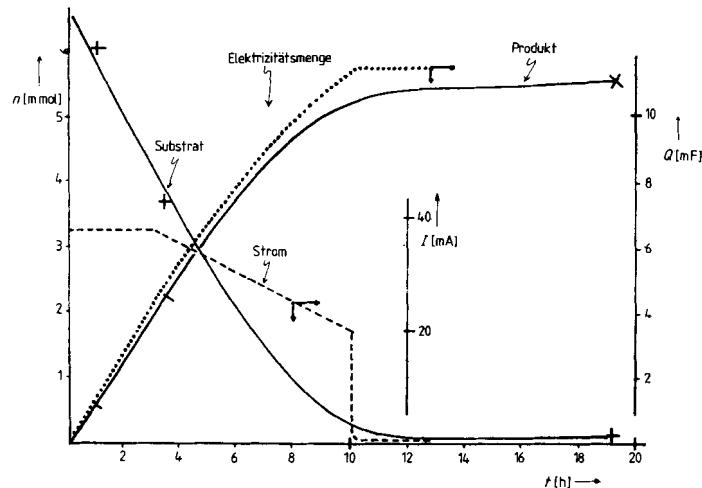


Abb. 2. Zeitverlauf der elektro-enzymatischen Reduktion von (*E*)-2-Methylcinnamat, katalysiert durch Enoat-Reduktase in Gegenwart von elektrochemisch kontinuierlich regeneriertem Methylviologen-Radikalkation.

von Vycor-Tips als Diaphragma kann der Anodenraum mit 0.1 M K₂SO₄-Lösung gefüllt werden, und das Nachjustieren des pH-Wertes ist nicht nötig.) Der Ablauf der Reaktion kann an der Stromkurve oder durch quantitative Hochdruckflüssigkeitschromatographie verfolgt werden (Abb. 2). Nach der Reaktion wird angesäuert, mit Ether extrahiert und (*R*)-2-Methyl-3-phenylpropionsäure isoliert (Ausb. 95%), [α]^D–23.5; für die reinen Enantiomere wurden [α]^D+20.4 und [α]^D–24.6^[9] angegeben.

Eingegangen am 20. März 1981 [Z 861]

- [1] J. B. Jones, J. F. Beck in J. B. Jones, C. J. Sih, D. Perlman: Applications of biochemical systems in organic chemistry, (Techn. Chem. Vol. X) Wiley, New York 1976, Part 1, S. 236.
- [2] a) H. Simon, B. Rambeck, H. Hashimoto, H. Günther, G. Nohynek, H. Neumann, Angew. Chem. 86, 675 (1974); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 13, 608 (1974); b) H. Simon, J. Bader, B. Rambeck, E. Kreuzdorn, W. Tischer in H. W. Dellweg: 4. Symp. Techn. Mikrobiol., Berlin 1979, S. 325.
- [3] W. Tischer, J. Bader, H. Simon, Eur. J. Biochem. 97, 103 (1979).
- [4] E. Steckhan, Th. Kuwana, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 78, 253 (1974).
- [5] M. Bühl, H. Giesel, W. Tischer, H. Simon, FEBS Lett. 109, 244 (1980).
- [6] J. Bader, H. Simon, Arch. Microbiol. 127, 279 (1980).
- [7] R. Holländer, Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1: Orig. Reihe C 1, 243 (1980).
- [8] V. E. Althouse, D. M. Feigl, W. A. Sanderson, H. S. Mosher, J. Am. Chem. Soc. 88, 3595 (1966); H. G. Leuenberger, W. Boguth, R. Barner, M. Schmid, R. Zell, Helv. Chim. Acta 62, 455 (1979); S. F. Lee, G. Barth, C. Djerassi, J. Am. Chem. Soc. 103, 295 (1981).
- [9] M. B. Watson, G. W. Youngson, J. Chem. Soc. C 1968, 258; A. W. Schrekker, J. Org. Chem. 22, 33 (1957).

Neue Reaktionen von λ⁵-Phosphorinen und deren Tricarbonylchrom-Komplexen

Von Karl Dimroth und Hans Kaletsch^[*]

Professor Siegfried Hünig zum 60. Geburtstag gewidmet

2,4,6-Trisubstituierte λ⁵-Phosphorine vom Typ (1)^[1] sind keine „nichtklassischen“ 6π-Heteroarene, sondern cyclische Phosphor-Ylide, deren negative Ladung auf dem Pen-

[*] Prof. Dr. K. Dimroth, H. Kaletsch
Fachbereich Chemie der Universität
Hans-Meerwein-Straße, D-3550 Marburg