

Von Charles J. Sih\* und Ching-Shih Chen

Die mikrobielle asymmetrische Reduktion von Ketonen wird sehr oft zur Herstellung chiraler Alkohole benutzt. Dieser Fortschrittsbericht beschäftigt sich mit den Gesetzmäßigkeiten, die der Enantioselektivität von Enzymen und intakten Zellen zugrundeliegen. Es werden Strategien zur Steuerung des stereochemischen Verlaufs mikrobieller Reduktionen und die Beziehung zwischen Substratstruktur und Enantioselektivität diskutiert.

### 1. Einleitung

Die mikrobielle asymmetrische Reduktion von Carbonylverbindungen – eine Methode, die nicht zum traditionellen Instrumentarium der chemischen Synthese gehört – hat sich inzwischen als ein sehr wertvolles Verfahren zur Herstellung chiraler Alkohole erwiesen. Da ein Mikroorganismus mehrere Oxidoreduktasen enthält, kann er eine Vielzahl unnatürlicher Ketone zu chiralen Alkoholen hoher optischer Reinheit reduzieren. In jüngster Zeit waren derartige Reduktionen wichtige Teilschritte bei zahlreichen Totalsynthesen<sup>[1]</sup>. Im Gegensatz dazu fanden „chemische“ Katalysatoren, z. B. metallorganische Verbindungen, für die enantioselektive Reduktion von Ketonen noch keine breite Anwendung in der asymmetrischen Synthese<sup>[2]</sup>. Dies röhrt daher, daß die Entwicklung solcher Katalysatoren schwierig ist und noch immer eines hohen Maßes chemischer Intuition und vieler Experimente bedarf.

In diesem Beitrag werden zuerst die grundlegenden Prinzipien der Enantioselektion für isolierte Enzymsysteme und intakte Zellen behandelt, da eine Diskussion der Abhängigkeit von Reaktionsgeschwindigkeit und Enantioselektivität von den strukturellen Eigenschaften der Substrate das Verständnis dieser mechanistischen Grundlagen erfordert, das zudem die sich anschließende Erörterung von Beispielen mikrobieller enantioselektiver Reduktionen achiraler Ketone erleichtert. Dieser kurze Überblick soll dem präparativ arbeitenden Chemiker nützliche Richtlinien an die Hand geben, diese einfache und zugleich leistungsfähige Technik, die einen zentralen Platz im Arsenal moderner Synthesemethoden einnimmt, anzuwenden.

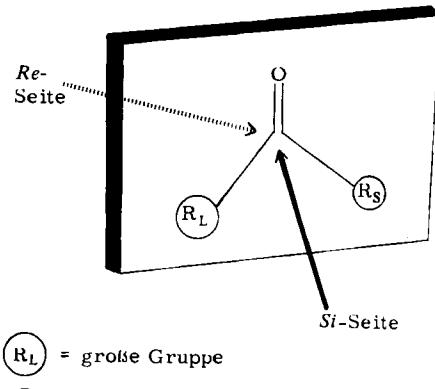
### 2. Theorie

Beim gegenwärtigen Wissensstand auf dem Gebiet der asymmetrischen Katalyse ist es noch nicht möglich, den Chiralitätssinn und den Grad der asymmetrischen Induktion für ein gegebenes Substrat vorauszusagen. Es gibt aber schon einige wichtige, wenn auch noch nicht ganz ausgereifte Vorstellungen über den Mechanismus der Enantioselektion, die Beachtung verdienben. Hervorgerufen wird die asymmetrische Katalyse dadurch, daß der chirale

Katalysator (Enzym) und das prochirale Substrat diastereomere Übergangszustände unterschiedlicher Energie bilden; die Größe ihres Energieunterschiedes,  $\Delta\Delta G^+$ , bestimmt den Enantiomerenüberschuß ee<sup>[3]</sup>. Diese Vereinfachung hat leider viele Chemiker davon abgehalten, die kinetischen Gesetzmäßigkeiten der asymmetrischen Induktion genauer zu studieren. Im folgenden werden wir die Ursache für die enantiosfaciale Selektivität am Beispiel enzymatischer Reaktionen diskutieren; die Prinzipien gelten allerdings für die asymmetrische Katalyse – sei sie enzymatisch oder nicht-enzymatisch – allgemein.

#### 2.1. Isolierte Enzymsysteme

Betrachten wir ein prochirales Keton mit den enantiotopen Seiten *Re* und *Si*, das zu einem chiralen Alkohol reduziert wird: Komplexierung durch den chiralen Katalysator, das Enzym, an der *Re*-Seite führt zu dem einen Enantiomer, während das andere Enantiomer mit gleicher Wahrscheinlichkeit über eine Komplexierung an der *Si*-Seite gebildet wird. Kann das Enzym nicht zwischen den beiden



Seiten unterscheiden, dann wird der resultierende Alkohol als Racemat erhalten. Hohe Enantioselektivität kann nur erzielt werden, wenn das Enzym zwischen den beiden enantiotopen Seiten unterscheidet. Die Enantioselektivität wird im allgemeinen durch den Enantiomerenüberschuß ee angegeben:

$$ee = ([R] - [S]) / ([R] + [S])$$

[R] und [S] sind die Anteile der beiden Enantiomere.

[\*] Prof. C. J. Sih, C.-S. Chen

School of Pharmacy, University of Wisconsin  
Madison, WI 53706 (USA)

Die Reduktion eines prochiralen Ketons mit einer isolierten Oxidoreduktase benötigt im allgemeinen NADH oder NADPH als Cofaktoren<sup>[4]</sup>; diese sind die eigentlichen „Reduktionsmittel“, die bei der Reaktion primär oxidiert werden. Unter der Annahme, daß ein geordneter Mechanismus vorliegt und NADH das Coenzym ist, bildet sich zuerst der Komplex Enz-NADH. Anschließend wird das prochirale Keton A/A' von diesem Komplex mit gleicher Wahrscheinlichkeit ( $k_1 = k'_1$ ) entweder von der *Re*- oder der *Si*-Seite unter Bildung zweier ternärer Komplexe (Schema 1) gebunden; die beiden Komplexe werden unterschiedlich fest zusammengehalten ( $k_{-1} + k'_{-1}$ ). Bei vereinfachter Betrachtungsweise folgt dann die katalytische Reduktion zu den (*S*)- und (*R*)-Enantiomeren, die noch immer an den Enzym-Cofaktor-Komplex gebunden sind (Schema 1).

Schema 1 enthält zwar viele Stufen, doch sind für die Enantioselektion nur die wichtig, die bis zum ersten irreversiblen Schritt führen, diesen eingeschlossen.  $k_{\text{kat}}/K$  beschreibt die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion des Enzyms mit dem Substrat A/A' bei unendlich kleiner Sub-

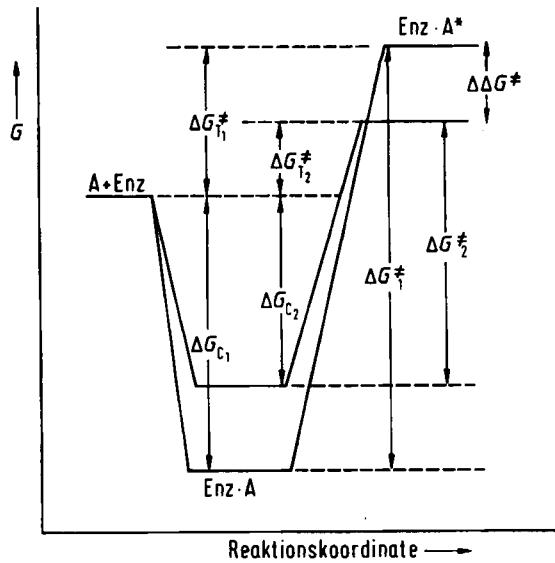
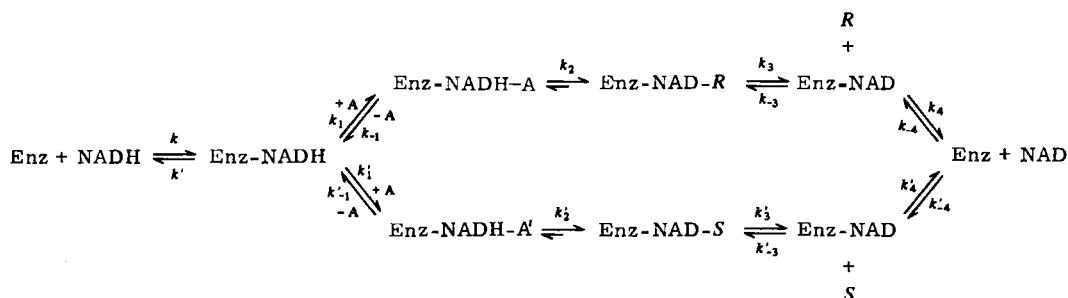


Abb. 1. Energieprofil einer hypothetischen enantioselektiven Reaktion.



Schema 1. Vereinfachter Reaktionsmechanismus der Enzymkatalyse.

stratkonzentration ( $[A] \rightarrow 0$ ). Die Enantioselektivität  $E'$  des in Schema 1 beschriebenen Systems hängt damit vom Verhältnis zweier  $k_{\text{kat}}/K$ -Werte ab [Gl. (a)].

$$E' = \frac{\left(\frac{k_{\text{kat}}}{K}\right)_A}{\left(\frac{k_{\text{kat}}}{K}\right)_{A'}} = \frac{k_1}{k'_1} \quad (a)$$

$$C_r = k_{-1}/k_2; C'_r = k'_{-1}/k'_2$$

Nach der Theorie des Übergangszustandes<sup>[5]</sup> ist die Gleichgewichtskonstante für das Gleichgewicht zwischen dem Übergangszustand Enz-A\* und den Edukten Enz + A proportional zu  $\Delta G_T^+$ , das mit  $\Delta G^+$ , der Aktivierungsenergie für die bindungsknüpfenden und -brechenden Schritte, und  $\Delta G_C$ , der (negativen) Komplexbildungsenergie, verknüpft ist [Gl. (b)].

$$\Delta G_T^+ = \Delta G^+ + \Delta G_C \quad (b)$$

Diese wechselseitigen Beziehungen sind in einem Energiediagramm dargestellt (Abb. 1).

Die kinetische Konstante  $k_{\text{kat}}/K$  ist mit dem thermodynamischen Ausdruck  $\Delta G_T^*$ <sup>[6]</sup> über Gleichung (c) verknüpft.

$$RT \ln \left( \frac{k_{\text{kat}}}{K} \right)_1 = RT \ln \left( \frac{kT}{h} \right) - \Delta G_T^* \quad (c)$$

$k$  ist die Boltzmann- und  $h$  die Planck-Konstante. Bei zwei unterschiedlichen Übergangszuständen läßt sich durch Subtraktion von Gleichung (d) von Gleichung (c) eine neue Beziehung [Gl. (e)] erhalten, die sich schließlich in die Gleichungen (f) und (g) umformen läßt.

$$RT \ln \left( \frac{k_{\text{kat}}}{K} \right)_2 = RT \ln \left( \frac{kT}{h} \right) - \Delta G_T^+ \quad (d)$$

$$RT \ln \frac{\left( \frac{k_{\text{kat}}}{K} \right)_1}{\left( \frac{k_{\text{kat}}}{K} \right)_2} = -(\Delta G_T^+ - \Delta G_T^*) = -\Delta \Delta G^+ \quad (e)$$

$$E' = \frac{\left( \frac{k_{\text{kat}}}{K} \right)_1}{\left( \frac{k_{\text{kat}}}{K} \right)_2} = \exp \left( -\frac{\Delta \Delta G^+}{RT} \right) \quad (f)$$

$$\Delta \Delta G^+ = -RT \ln E' \quad (g)$$

Die Abhängigkeit von  $E'$  und  $\Delta \Delta G^+$  von den Geschwindigkeitskonstanten (Höhe der Energiebarriere) konkurrierender Reaktionen zeigt Tabelle 1. Sie bietet einen nützlichen Überblick in welchem Ausmaß  $E'$  von Änderungen der Geschwindigkeitskonstanten beeinflußt wird.

Tabelle 1. Abhängigkeit der Enantioselektivität  $E'$  und des Unterschieds der freien Aktivierungsenergien  $\Delta\Delta G^\circ$  von den Geschwindigkeitskonstanten zweier Konkurrenzreaktionen (Annahme:  $k_1 = k'_1 = 10^6$ ).

Nr.	$k_{-1}$	$k_2$	$k'_{-1}$	$k'_2$	$C_r$	$C'_r$	$E'$	$-\Delta\Delta G^\circ$ (25°C) [cal/mol]
1	0.01	100	0.01	10	0.0001	0.001	1.00	—
2	0.1	100	0.1	10	0.001	0.01	1.01	5
3	10	100	10	10	0.1	1	1.81	354
4	100	100	100	10	1	10	5.50	1010
5	100	10	100	1	10	100	9.18	1313
6	10	1	100	1	10	100	9.18	1313
7	1000	100	10	0.1	10	100	9.18	1313
8	100	1	100	0.1	100	1000	9.91	1358
9	100	1	1000	0.1	100	10000	99.0	2721
10	100	10	1000	0.1	10	10000	909.0	4034

### 2.1.1. Hohe Enantioselektion

Wenn das Substrat ( $A$  und  $A'$ ) schnell und reversibel von dem Komplex Enz-NADH gebunden wird, ist  $k_2 \ll k_{-1}$  und  $k'_2 \ll k'_{-1}$  ( $C_r$  und  $C'_r \gg 1$ ); Gleichung (a) vereinfacht sich dann zu Gleichung (h).

$$E' = \frac{k_1 C'_r}{k'_1 C_r} = \frac{C'_r}{C_r} \quad (h)$$

$k_1$  ist die Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion zweiter Ordnung; sie liegt typischerweise für Substrate mit niedrigem Molekulargewicht im Bereich von  $10^6$  bis  $10^8$   $M^{-1} \cdot s^{-1}$ <sup>[7]</sup>; dies ist nahe den Werten für diffusionskontrollierte Prozesse. Wie fest ein Substrat gebunden ist, wird daher in den meisten Fällen durch den Wert von  $k_{-1}$  bestimmt. Da der Komplex Enz-NADH das Substrat  $A$  oder  $A'$  mit derselben Wahrscheinlichkeit ( $k_1 \approx k'_1$ ) bindet, hängt die Enantioselektivität  $E'$  hauptsächlich vom Verhältnis  $C_r/C'_r$  (ratio of the reverse commitment to catalysis) ab. Eine hohe Enantioselektion wird nur dann erzielt, wenn die gegenseitige Umwandlung der diastereomeren Enzym-Keton-Coenzym-Komplexe im Vergleich zur Geschwindigkeit des nachfolgenden katalytischen Schrittes schnell ist. Die Beispiele Nr. 1 und 4 in Tabelle 1 illustrieren dies.

### 2.1.2. Niedrige Enantioselektion

Wird das Substrat ( $A$  und  $A'$ ) fest an den Komplex Enz-NADH gebunden ( $k_2 \gg k_{-1}$ ,  $k'_2 \gg k'_{-1}$ ,  $C_r$  und  $C'_r \ll 1$ ), dann vereinfacht sich Gleichung (a) zu Gleichung (i).

$$E' = \frac{k_1}{k'_1} \quad (i)$$

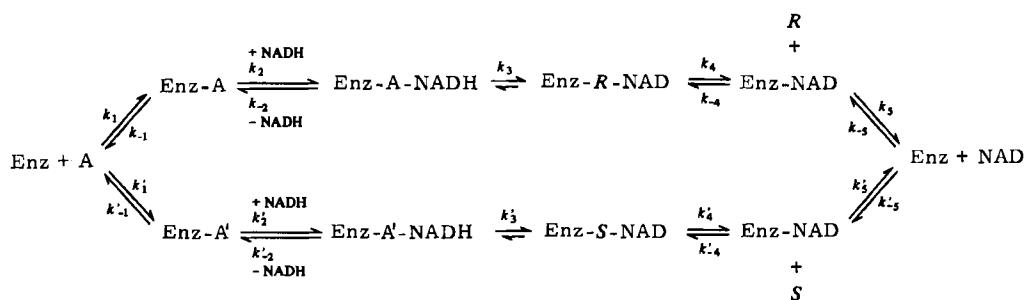
Die Enantioselektivität  $E'$  hängt nun nur vom Verhältnis  $k_1/k'_1$  ab. Intuitiv kann diese Bedingung wie folgt verstanden werden: Während des ersten Katalyzyclus durchläuft freies Enzym den oberen und unteren Weg in Schema 1 und bildet gleiche Mengen Enz-NADH-A und Enz-NADH-A'. Da  $k_2 > k'_2$  ist, wird der obere Weg effektiver als der untere bezüglich Regenerierung von freiem Enzym sein. In jedem der folgenden Cyclen bleibt ein geringer Anteil Enz-NADH-A' aus den vorhergehenden Cyclen übrig ( $k_2 > k'_2$ ); die Konzentration dieses Komplexes nimmt zu, bis ein Gleichgewichtszustand (steady state) erreicht wird, bei dem

$$[\text{Enz-NADH-A}] \cdot k_2 = [\text{Enz-NADH-A'}] \cdot k'_2$$

gilt. Deshalb wird für den Fall  $k_1 = k'_1$  der Fluß durch den oberen und unteren Reaktionsweg gleich sein<sup>[8]</sup>. In dieser Situation ist die Enantioselektion gering (Nr. 1 und 2 in Tabelle 1).

Für die meisten Oxidoreduktasen<sup>[9]</sup> gilt in der Tat, daß das größere NAD(P)H zuerst an das Enzym gebunden wird und dann erst das kleinere Substrat (Keton). In diesen Fällen ist die Enantioselektivität unabhängig von den Konzentrationen an NAD(P)H und Keton. Diese Betrachtung gilt auch für diejenigen Oxidoreduktasen, die dem Theorell-Chance-Mechanismus gehorchen<sup>[10]</sup>.

Ist das unnatürliche Keton größer, dann kann es fester vom Enzym gebunden werden, und der Mechanismus ist nicht mehr geordnet sondern statistisch, wie dies für einige andere Substrate bei der Hefe-Alkohol-Dehydrogenase gefunden wurde<sup>[11]</sup>. Zur Illustrierung sei diskutiert, was geschieht, wenn das Enzym zuerst das prochirale Keton  $A$  und dann erst NADH bindet (Schema 2).



Schema 2.

Während Änderungen von  $k'_{-1}$  oder  $k'_2$  den Wert von  $E'$  beeinflussen, gilt es zu beachten, daß  $C_r$  (commitment to catalysis) unabhängig vom Energieniveau der Enzym-Substrat-Komplexe ist, d. h. werden  $k'_{-1}$  und  $k'_2$  so verändert, daß das Verhältnis ( $C'_r$ ) gleich bleibt, dann ändert sich der Wert von  $E'$  nicht (Nr. 6 und 7 in Tabelle 1).

Hohe Enantioselektion wird nur erzielt, wenn sich das Gleichgewicht zwischen den Enzym-Komplexen

$\text{Enz-A-NADH} \rightleftharpoons \text{Enz-A'-NADH}$   
schnell einstellt. In diesem Fall ist die Enantioselektivität

$E'$  mit den kinetischen Konstanten über Gleichung (j) verknüpft.

$$E' = \frac{\left(\frac{k_{\text{kat}}}{K}\right)_A}{\left(\frac{k_{\text{kat}}}{K}\right)_{A'}} = \frac{k_1}{k'_{-1}R + [\text{NADH}]} \quad (\text{j})$$

$$R = \frac{k_{-2} + k_3}{k_2 k_3}, \quad R' = \frac{k'_{-2} + k'_3}{k'_2 k'_3}$$

Ist die Konzentration von NADH sehr niedrig, dann vereinfacht sich Gleichung (j) zu Gleichung (k), und  $E'$  wird nicht mehr von der Konzentration an NADH beeinflußt.

$$E' = \frac{k_1 k'_{-1} R'}{k'_1 k_{-1} R} \quad (\text{k})$$

Die Enantioselektion nimmt jedoch mit steigender Konzentration an NADH ab, da dann  $C_r$  und  $C'_r$  (reverse commitment to catalysis) kleiner werden und sich Gleichung (j) zu Gleichung (i) vereinfacht. Die Enantioselektivität wird nicht von der Konzentration des prochiralen Ketons beeinflußt; die Konzentration an NADH sollte jedoch bei enzymatischen enantioselektiven Reduktionen im präparativen Maßstab relativ niedrig gehalten werden, besonders dann, wenn das unnatürliche Substrat in Größe oder Bindungsaffinität mit NADH konkurrieren kann.

## 2.2. Intakte Zellen

Eine Hauptschwierigkeit bei der Verwendung intakter Zellen für die katalytische Reduktion von Ketonen ist, daß die Prozesse oftmals nur geringe Enantioselektivität aufweisen. Zwei Interpretationen bieten sich an: 1. Das Keton wird von einer einzigen Oxidoreduktase reduziert; diese tritt mit beiden Seiten der Carbonylgruppe unter Bildung zweier diastereomerer Übergangszustände in Wechselwirkung, von denen einer mehr begünstigt wird als der andere. 2. Zwei oder mehrere konkurrierende Oxidoreduktasen erzeugen – in Abhängigkeit von  $v_{\text{max}}$  und  $K$  – Alkohole entgegengesetzter Konfiguration mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten kann leicht getroffen werden, indem die Reduktion bei verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt wird. Im ersten Fall ist die Enantioselektivität unabhängig von Änderungen der Substratkonzentration, im zweiten jedoch nicht<sup>[12]</sup>. Nach unserer Erfahrung ist geringe Enantioselektivität bei Reduktionen mit ganzen Zellen praktisch immer eine Folge der gleichzeitigen Einwirkung konkurrierender Enzyme entgegengesetzter Chiralität.

Trotz der vielen beschriebenen mikrobiellen Reduktionen von Ketonen wurde(n) in den meisten Fällen das (die) für die katalytische Reduktion verantwortliche(n) Enzym(e) noch nicht identifiziert. Folglich ist es heute noch nicht möglich, sowohl die Konfiguration als auch den Grad der asymmetrischen Induktion zuverlässig vorauszusagen. Es gibt allerdings mehrere Wege, den stereochemischen Verlauf mikrobieller Reduktionen von Ketonen zu lenken; der für den Synthetiker geeignetste wäre, Substrate mit großen Unterschieden in den kinetischen Konstanten (scheinbare  $v_{\text{max}}$  und  $K$  (Michaelis-Konstante)) für die Oxidoreduktasen maßzuschneidern. Theoretisch ist es möglich, durch Änderungen der strukturellen Eigen-

schaften der Substratmoleküle optisch reine Alkohole bei der Konfiguration herzustellen.

Bei der enantioselektiven Reduktion von Ketonen durch zwei oder mehrere konkurrierende Enzyme intakter Zellen gibt es drei den präparativ orientierten Chemiker interessierende Variablen:  $A_0$ , die Anfangskonzentration des Substrates,  $C$ , den Umsatz, und  $ee$ , den Enantiomerenüberschuß des Produktalkohols. Diese wichtigen Parameter sind mit den scheinbaren kinetischen Konstanten ( $v_{\text{max}}$  und  $K$ ) der Enzyme verknüpft. Für die Bestimmung von  $v_{\text{max}}$  und  $K$  stehen bei rohen Zellextrakten mit mehreren Enzymsystemen mehrere Methoden zur Verfügung. Die scheinbaren kinetischen Konstanten berücksichtigen jedoch nicht zusätzliche Variablen wie Anzahl, relative Konzentration und Kompartimentierung konkurrierender Enzyme, effektive Coenzym-Konzentration, Permeabilitätsfaktoren usw. Deshalb gelten die so erhaltenen scheinbaren Werte für  $v_{\text{max}}$  und  $K$  nicht für intakte Zellen. Wegen der Schwierigkeiten, bei intakten Zellen genaue Meßwerte für die Anfangsgeschwindigkeiten bei niedrigen Substratkonzentrationen, insbesondere für mit Wasser nicht mischbare Substrate, zu gewinnen, wurde zur Abschätzung der scheinbaren kinetischen Konstanten ( $K$  und  $v_{\text{max}}$ ) intakter Zellsysteme eine zeitunabhängige Methode entwickelt.

Die Beziehung zwischen den drei Parametern  $ee$ ,  $A_0$  sowie  $C$  und den scheinbaren kinetischen Konstanten  $v_{\text{max}}$  und  $K$  beschreibt Gleichung (l).

$$ee = 1 - 2 \frac{A_0 C + (K_R - x) \ln \frac{A_0 + x}{A_0(1 - C) + x}}{(1 + y) A_0 C} \quad (\text{l})$$

$$x = \frac{y K_S + K_R}{1 + y}, \quad y = \frac{v_{\text{max}}(R)}{v_{\text{max}}(S)}$$

wobei  $v_{\text{max}}(R)$ ,  $v_{\text{max}}(S)$ ,  $K_R$  und  $K_S$  die maximalen Geschwindigkeiten bzw. die Michaelis-Konstanten für  $R$ -Enzym(e) bzw.  $S$ -Enzym(e) sind. Bei der Ableitung von Gleichung (l) wurden zwei Annahmen gemacht<sup>[13]</sup>: Die Reaktion sei praktisch irreversibel, und es fehle eine Produktinhibierung. Beide Kriterien sind erfüllt. Die mikrobielle Reduktion von Ketonen ist im allgemeinen irreversibel, wenn reichlich Reduktionsäquivalente vorhanden sind, wie dies bei einer Cofermentation mit Sucrose oder Glucose der Fall ist. Zweitens wird bis zu einem sehr späten Stadium der Reaktion keine Produktinhibierung beobachtet. Nach experimenteller Bestimmung von  $ee$  und  $C$  bei verschiedenen Anfangskonzentrationen  $A_0$  können die drei Unbekannten  $y$ ,  $K_R$  und  $x$  mit Gleichung (l) errechnet werden. Man kann schließlich zwei nützliche dimensionslose Konstanten erhalten,

$$z = [(v_{\text{max}}(R)/K_R)/(v_{\text{max}}(S)/K_S)] \quad \text{und} \quad y = v_{\text{max}}(R)/v_{\text{max}}(S)$$

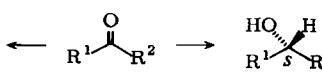
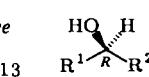
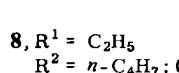
die den stereochemischen Verlauf der Reduktion bestimmen;  $z$  ist das Verhältnis der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung für die Bindung der Substrate an das Enzym für  $A_0 \ll K_R$  und  $K_S$ , und  $y$  ist ein Maß für das Verhältnis der Katalyse durch die konkurrierenden Enzym-Systeme.

Kennt man die Werte von  $v_{\text{max}}(R)/v_{\text{max}}(S)$ ,  $v_{\text{max}}(R)/K_R$  und  $v_{\text{max}}(S)/K_S$ , kann man  $ee$  für  $A_0 \rightarrow 0$  [Gl. (m)] und für  $A_0 \rightarrow \infty$  (Sättigung) [Gl. (n)] berechnen.

$$ee = \frac{\frac{v_{\max}(R)}{K_R} - \frac{v_{\max}(S)}{K_S}}{\frac{v_{\max}(R)}{K_R} + \frac{v_{\max}(S)}{K_S}} \quad (m)$$

$$ee = \frac{v_{\max}(R) - v_{\max}(S)}{v_{\max}(R) + v_{\max}(S)} \quad (n)$$

Diese Werte geben die Ober- und Untergrenzen der optischen Reinheit an, die für jedes Substrat theoretisch möglich sind. Darüber hinaus können Variationen der Sub-



stratstrukturen quantitativ mit Änderungen von z und y korreliert werden, die als Maß für die relativen Änderungen in Komplexierung und Katalyse konkurrierender Enzymsysteme dienen. Die Optimierung der Enantioselektivität erfordert eine Maximierung von z.

### 3. Enantioselektive Reduktionen

Viele der älteren Arbeiten zur mikrobiellen Reduktion von Ketonen, Ketosäuren und Ketoestern wurden schon ausführlich in Übersichtsartikeln beschrieben<sup>[14]</sup>. Die folgende Diskussion soll deshalb auf neuere Untersuchungen zur enantioselektiven Reduktion prochiraler Ketone beschränkt bleiben, wobei der Zusammenhang zwischen Substratstruktur und Enantioselektivität besonders berücksichtigt wird; diastereoselektive Reduktionen werden nicht behandelt.

#### 3.1. Alkanone

Die gereinigte NADPH-spezifische Dihydroxyacetone-Reduktase aus *Mucor javanicus*<sup>[15]</sup> – ein Enzym, das den Wasserstoff bei den meisten Substraten ausschließlich auf die Si-Seite der Carbonylgruppe überträgt – wurde von der Prelog-Schule sehr intensiv untersucht. Die einzigartige Struktur des aktiven Zentrums dieses Enzyms verleiht ihm nicht nur eine breite Substratspezifität, sondern auch eine hohe Enantioselektivität. Obgleich  $k_{\text{kat}}/K$  beim Substratwechsel von Dihydroxyaceton zu 2-Alkanonen, wie z. B. Aceton, deutlich abnimmt, wird die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Verlängerung der Alkylkette beträchtlich erhöht. Eine Produktanalyse ergab, daß mit Ausnahme von 2-Butanon, bei dem racemischer Alkohol entsteht, die höheren Homologen mit hoher Enantioselektivität (ee = 0.94) zu den (R)-Alkoholen – (R)-2-Pentanol, (R)-2-Hexanol und (R)-2-Octanol – reduziert werden. Daraus folgerte man, daß die Ethylgruppe in 2-Butanon zu kurz für die notwendigen hydrophoben Wechselwirkungen ist; bei 2-Butanon findet deshalb die Wasserstoffübertragung von der Si- und der Re-Seite gleich schnell statt.

Die erste systematische Untersuchung des stereochemischen Verlaufs der Reduktion acyclischer Ketone durch Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wurde von MacLeod

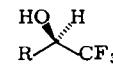
et al.<sup>[16]</sup> durchgeführt. Sie studierten eine Reihe von Ketonen mit allen Kombinationen der Substituenten Methyl, Ethyl, n-Propyl, n-Butyl und Phenyl. Bei den sekundären Alkoholen 1–7 überwogen jeweils die S-konfigurierten Isomere; einziger der aus Ethylbutylketon entstehende Alkohol **8** ist bevorzugt R-konfiguriert. Die sterisch gehinderten Ketone n-Butyl-n-propylketon, tert-Butyl-methylketon, Isobutyl-isopropylketon und n-Amyl-phenylketon wurden von Heft nicht reduziert. Ähnliche Befunde erhielten auch andere Arbeitsgruppen<sup>[16, 17]</sup>.

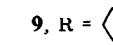
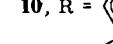
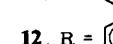
	ee
1, R <sup>1</sup> = CH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> :	0.67
2, R <sup>1</sup> = CH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> :	0.64
3, R <sup>1</sup> = CH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = i-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> :	0.90
4, R <sup>1</sup> = CH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> :	0.82
5, R <sup>1</sup> = CH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C≡CH:	0.99
6, R <sup>1</sup> = C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , R <sup>2</sup> = n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> :	0.12
7, R <sup>1</sup> = CH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> :	0.89

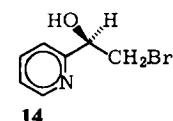
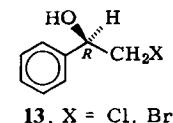
Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß der stereochemische Verlauf der Reduktion im Gegensatz zu dem mit Dihydroxyaceton-Reduktase aus *Mucor javanicus* durch eine Wasserstoffübertragung von der Re-Seite des prochiralen Ketons charakterisiert ist, wobei R<sub>S</sub> die kleinere und



R<sub>L</sub> die größere Gruppe repräsentiert. Dieser heute allgemein als Prelog-Regel<sup>[18]</sup> bekannte Sachverhalt wurde ursprünglich für die Reduktion von Decalonen mit *Curvularia falcata* aufgestellt. Die Regel fand jedoch seither breite Anwendung, um die Konfiguration der durch mikrobielle Reduktionen dargestellten Alkohole vorauszusagen. Die R-konfigurierten Trifluormethylalkohole **9–12**<sup>[19]</sup> werden – in Übereinstimmung mit dieser Regel – bevorzugt aus den entsprechenden Ketonen durch Reduktion mit Bäckerhefe erhalten. Die (R)-Halohydride **13** entstehen mit ee ≥ 0.80 aus den korrespondierenden Aryl-α-halogenmethylketonen<sup>[20]</sup>. Es scheint also, daß monosubstituierte Methylgruppen deutlich kleiner als ein Phenylring sind. Die Anwesenheit eines Heteroatoms im aromatischen System wie in **14** ändert den stereochemischen Verlauf der Reduktion nicht.



<b>9</b> , R = 	ee 0.99
<b>10</b> , R = 	0.44
<b>11</b> , R = 	0.66
<b>12</b> , R = 	0.60



Für die geringe Enantioselektivität der Reduktion von Ketonen mit fermentierender Hefe wurden zwei Erklärungen gegeben<sup>[16]</sup>. Die Hefe-Alkohol-Dehydrogenase (YADH) reduziert zwar die Ketone, doch ist sie bei unnatürlichen Substraten nur teilweise enantioselektiv. Es könnten jedoch auch mehr als eine Oxidoreduktase vor-

handen sein – einschließlich YADH und/oder einer bisher unbekannten Oxidoreduktase –, die Alkohole entgegengesetzter Konfiguration mit unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten produzieren. MacLeod et al.<sup>[16]</sup> bevorzugen die erste Erklärung, doch ist es noch nicht möglich, eine endgültige Entscheidung zu treffen. Kristalline YADH reduziert die meisten der diskutierten acyclischen Ketone mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten<sup>[27]</sup>; die aus diesen Substraten gebildeten Alkohole müssen jedoch noch isoliert und gereinigt, und ihre optische Reinheit muß erst bestimmt werden, bevor es möglich ist, Verallgemeinerungen über dieses komplexe System zu machen. Dies gilt um so mehr, als andere Enzyme der Hefe diese Ketone gleichfalls reduzieren könnten.

### 3.2. $\beta$ -Ketoester und $\beta$ -Ketosäuren

Die asymmetrische Reduktion von Ethylacetoacetat mit Bäckerhefe ist eine hervorragende Methode zur Darstellung des wertvollen chiralen Synthesebausteins (*S*)-Ethyl-3-hydroxybutyrat **15**,  $R^1 = OC_2H_5$ . Die Ausbeute (60–80%) und die optische Reinheit ( $ee = 0.85$ –0.97) des Produktes schwanken jedoch je nach Laboratoriumsvorschrift<sup>[21]</sup>. Die Enantioselektivität wird wegen der Anwesenheit konkurrierender Enzyme entgegengesetzter Chiralität am stärksten durch die Substratkonzentration beeinflußt. Die optische Reinheit des Produktes sinkt deutlich, wenn die Konzentration des Edukts auf mehr als 5 g/L erhöht wird<sup>[22]</sup>. Da jedoch das (*S*)-Enzym dank seines höheren  $v_{max}/K$ -Verhältnisses gegenüber dem (*R*)-Enzym im Vorteil ist, kann optisch reines (*S*)-Ethyl-3-hydroxybutyrat hergestellt werden, indem durch langsame kontinuierliche Substratzugabe die Konzentration an Ethylacetoacetat im Reaktionsmedium niedrig bleibt<sup>[22]</sup>. Wenn die scheinbaren Werte von  $y$ ,  $K_R$  und  $x$  bestimmt sind, kann man  $ee$  für jede Substratkonzentration berechnen [Gl. (I)]<sup>[13]</sup>; dies wiederum ermöglicht die Festlegung der optimalen Geschwindigkeit für die kontinuierliche Substratzugabe.

Während Ethylacetoacetat<sup>[21]</sup> und Acetessigsäure<sup>[23]</sup> hauptsächlich zu den entsprechenden (*S*)-(oder L-)Isomeren reduziert werden, findet bei Ethyl-3-oxopentanoat<sup>[24]</sup>, 3-Oxohexansäure<sup>[23]</sup>, 3-Oxoheptansäure<sup>[23]</sup> und 3-Oxo-6-heptensäure<sup>[1a]</sup> eine bevorzugte Reduktion zu den entsprechenden (*R*)-(oder D-)Isomeren **16**–**19** statt. Diese Befunde deuten darauf hin, daß durch eine Vergrößerung der Kohlenwasserstoffkette  $R^2$  des  $\beta$ -Ketocarbonyl-Moleküls der stereochemische Verlauf der Hefe-Reduktion von *S* nach *R* geändert werden kann. Die Reduktionen von Ethyl-4-chloracetoacetat zu (*S*)-Ethyl-4-chlor-3-hydroxybutyrat **20**<sup>[25]</sup> und von Ethyl-3-oxo-3-phenylpropionat zu

(*S*)-Ethyl-3-hydroxy-3-phenylpropionat **21**<sup>[26]</sup> sind ebenfalls in Übereinstimmung mit dieser Annahme. Die *S*-Konfiguration von **20** und **21** ist eine Folge der Sequenzregel.

Die Enantioselektivität der Hefe-Reduktion von  $\beta$ -Ketocarbonyl-Verbindungen wird auch sehr stark von Strukturänderungen der Carboxy-Substituenten ( $R^1$ ) beeinflußt. In der homologen Reihe der  $C_1$ - bis  $C_{12}$ -Ester der 4-Chloracetessigsäure als Substrate wurde bei zunehmender Größe der Estergruppe eine drastische Änderung in der Stereochemie der entsprechenden Alkohole gefunden

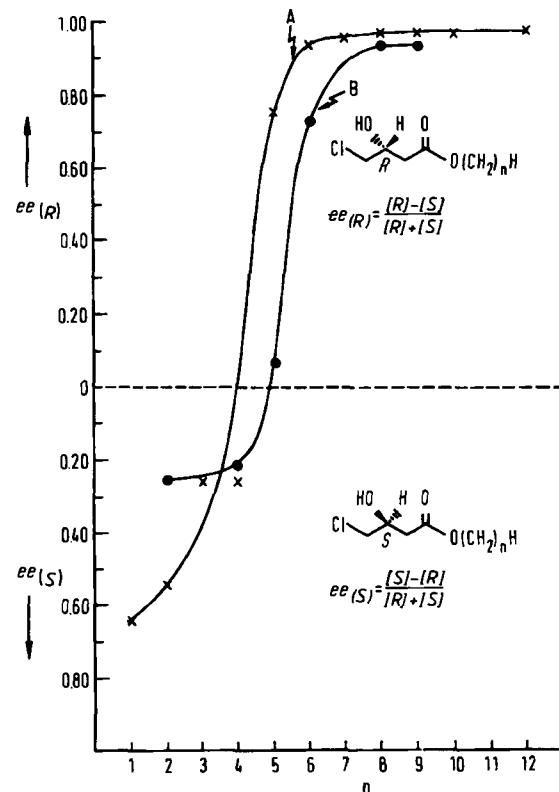
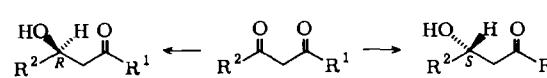


Abb. 2. Enantiomerenüberschuß ( $ee$ ) als Funktion der Größe der Estergruppe des 4-Chlor-3-oxobutyrats. Substratkonzentration Kurve A: 0.045 M; Kurve B: 0.135 M. Siehe auch Text.

(Abb. 2). Die Kurve A zeigt eindrucksvoll, daß der Methyl-ester zum entsprechenden (*S*)-Enantiomer ( $ee_{(S)} = 0.65$ ), der Octylester dagegen zum (*R*)-Enantiomer ( $ee_{(R)} = 0.97$ ) reduziert wurde. Bemerkenswerterweise sank der  $ee_{(R)}$ -Wert des Pentylesters von 0.76 auf 0.07 bei einer Erhöhung der Konzentration des Substrats von 0.045 M auf 0.135 M (Kurve B)<sup>[25]</sup>. Ganz analog wurden Octyl-3-oxopentanoat

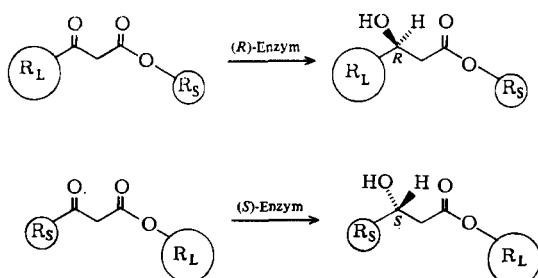
	$ee$
<b>16</b> , $R^1 = OC_2H_5$ , $R^2 = CH_2CH_3$ :	0.40
<b>17</b> , $R^1 = OH$ , $R^2 = CH_2CH_2CH_3$ :	$\approx 1.0$
<b>18</b> , $R^1 = OH$ , $R^2 = CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ :	$\approx 1.0$
<b>19</b> , $R^1 = OH$ , $R^2 = CH_2CH_2CH=CH_2$ :	0.99
<b>20</b> , $R^1 = OC_2H_5$ , $R^2 = CH_2Cl$ :	0.55
<b>21</b> , $R^1 = OC_2H_5$ , $R^2 = C_6H_5$ :	$\approx 1.0$



	$ee$
<b>15</b> , $R^1 = OH$ , $OC_2H_5$ , $R^2 = CH_3$ :	0.95
<b>22</b> , $R^1 = OC_8H_{17}$ , $R^2 = CH_2CH_3$ :	0.99
<b>23</b> , $R^1 = OC_8H_{17}$ , $R^2 = CH_2CH_2CH_3$ :	0.71
<b>24</b> , $R^1 = H$ , $R^2 = CH_2Cl$ :	0.97

und Octyl-3-oxohexanoat überwiegend zu den entsprechenden (S)-Isomeren 22 bzw. 23 reduziert<sup>[27]</sup>.

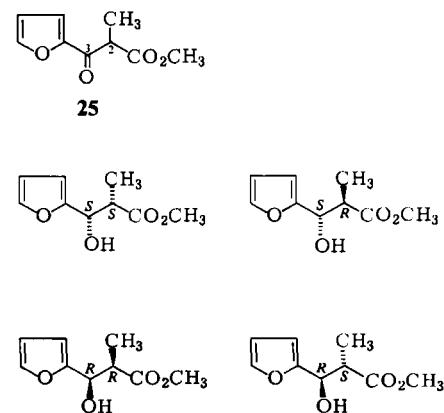
Substrate mit aromatischen Substituenten am Carboxy-Ende ( $R^1$ ) werden von Bäckerhefe ebenfalls bevorzugt in Alkohole mit ( $R$ )-Konfiguration überführt. *N*-Phenyl-4-chlor-3-oxobutyramid (3 mg/mL) wurde zu ( $R$ )-*N*-Phenyl-4-chlor-3-hydroxybutyramid 24 ( $ee_{(R)}=0.97$ ) reduziert; bei 8 mg/mL sank die optische Reinheit des Alkohols jedoch sehr stark ( $ee_{(R)}=0.04$ )<sup>[27]</sup>. Der stereochemische Verlauf der Hefe-Reduktion von  $\beta$ -Ketocarbonsäure-Derivaten wird somit von Substituenten an beiden Enden des Moleküls beeinflußt. Während die enantioselektiven Reduktionen vom Verhältnis der scheinbaren  $v_{max}/K$ -Werte der beiden Typen konkurrierender Enzyme abhängen, scheint das Enzym (oder die Enzyme), das (*S*)-(oder *L*)-Alkohole liefert, große hydrophobe Substituenten am Carboxy-Ende ( $R^1$ ), das (*R*)-Enzym dagegen solche am Kohlenwasserstoff-Ende ( $R^2$ ) zu bevorzugen. Diese Hypothese wird von kürzlich publizierten Befunden gestützt<sup>[28]</sup>.



Es gibt viele Oxidoreduktasen in Bäckerhefe, die für die katalytische Reduktion dieser  $\beta$ -Ketocarbonsäure-Derivate verantwortlich sein könnten. Kristalline YADH I (EC 1.1.1.1.) und gereinigte Hefe-L-LDH (EC 1.1.1.27) waren jedoch nicht in der Lage, Ethyl- und Octyl-4-chloracetoacetat zu reduzieren<sup>[27]</sup>.  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase aus Schweineherz (EC 1.1.1.35)<sup>[29]</sup> – ein Enzym, das am Abbau von Fettsäuren beteiligt ist – reduzierte hingegen beide Ketoester in Gegenwart von NADH zu den entsprechenden (*R*)-4-Chlor-3-hydroxybutyraten ( $ee=0.98$ )<sup>[27]</sup>. Zudem fanden wir kürzlich, daß gereinigte Fettsäure-Synthetase aus Bäckerhefe<sup>[30]</sup> sowohl Ethyl- als auch Octyl-4-chloracetoacetat in Gegenwart von NADPH schnell zu den entsprechenden (*S*)-4-Chlor-3-hydroxybutyraten ( $ee=0.98$ ) reduziert<sup>[31]</sup>. Die Reinigung der  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase aus Bäckerhefe ist Gegenstand laufender Untersuchungen. Diese beiden Enzyme sind wahrscheinlich in erster Linie für die Reduktion der unnatürlichen  $\beta$ -Ketocarbonsäureester verantwortlich, denn die natürlichen physiologischen Substrate der  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase – ein mitochondriales Enzym – und der  $\beta$ -Keto-Reduktase-Komponente der Fettsäure-Synthetase sind die strukturanalogen Acetessigsäurethiolester. Überdies erzeugt das eine Enzym Alkohole mit *S*- und das andere solche mit *R*-Konfiguration. Säugertier-Fettsäure-Synthetase<sup>[32]</sup> scheint eine breite Substratspezifität zu haben, denn die Keto-Reduktase-Komponente dieses Komplexes reduziert auch cyclische Ketone.

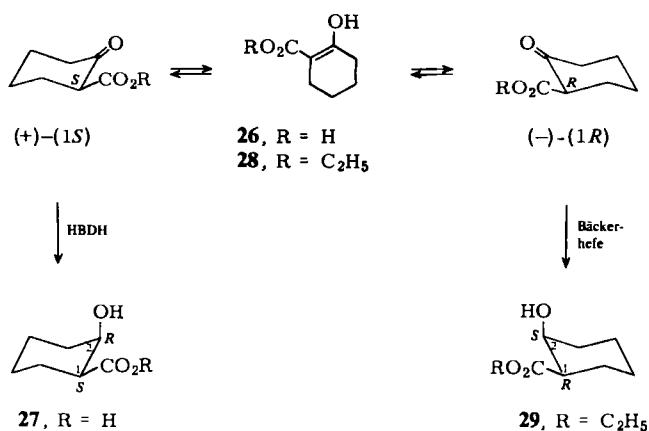
Die Reduktion von Ethylacetoacetat mit *Geotrichum candidum* liefert mit einer Gesamtausbeute von 36% (*R*)-Ethyl-3-hydroxybutyrat von guter optischer Reinheit

( $ee=0.89$ )<sup>[22]</sup>. Diese Reaktion hängt jedoch in hohem Maße vom metabolischen Zustand der Zelle ab, und die optische Ausbeute ist nur schlecht reproduzierbar. Dies läßt auch in diesem Fall auf die Anwesenheit konkurrierender Enzyme schließen, wobei hier der (*R*)-Typ dominiert. Benötigt man (*R*)-Ethyl-3-hydroxybutyrat in kleinem Maßstab, so empfiehlt sich die Verwendung der Di-hydroxyaceton-Reduktase aus *Mucor javanicus* oder der kommerziell erhältlichen D- $\beta$ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.30) aus *Pseudomonas lemoignei*<sup>[27]</sup>. Beide Enzyme katalysieren die Reduktion von Ethylacetoacetat in Gegenwart eines NADH-Regenerationssystems<sup>[33]</sup> mit hoher Enantioselektivität ( $ee>0.97$ ).



Da viele Naturstoffe ein  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -hydroxycarbonsäure-Strukturelement enthalten, sind  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -ketocarbonsäureester wichtige Substrate für asymmetrische Reduktionen. Methyl-3-(2-furyl)-2-methyl-3-oxopropionat 25 wurde mit vielen Mikroorganismen reduziert<sup>[34]</sup>. Wahl des geeigneten Mikroorganismus ermöglicht die Synthese aller vier in Frage kommender Stereoisomere. Mit den meisten Mikroorganismen erhielt man eine Mischung aus (2*R*,3*R*)-( $ee=0.49$  bis  $0.90$ ) und (2*S*,3*R*)-Ester ( $ee=0.23$  bis  $0.91$ ) im Verhältnis von 1:1 bis 4:6. Einzig mit *Candida albicans* KSY-36 entstand ausschließlich der (2*S*,3*R*)-Ester ( $ee=0.99$ ), allerdings in nur 23% Ausbeute. Im Gegensatz dazu wurde mit *Kloeckera saturnus* KSY-7 in 29% Ausbeute eine 1:1-Mischung aus (2*S*,3*S*)- ( $ee=0.68$ ) und (2*R*,3*S*)-Ester ( $ee=0.46$ ) gebildet. Ethyl- $\alpha$ -methylacetoacetat wurde von Bäckerhefe in 65% Ausbeute zu einer 9:91-Mischung aus (2*R*,3*S*)- und (2*S*,3*S*)-Estern, Ethyl- $\alpha$ -allylacetoacetat dagegen in 84% Ausbeute zu einer 96:4-Mischung der (2*R*,3*S*)- und (2*S*,3*S*)-Ester reduziert<sup>[35]</sup>. Mit Bäckerhefe gelingt auch die bevorzugte Reduktion mehrerer Ethyl- $\alpha$ -methyl-3-oxopropionate zu den (–)-(*R*)-Estern ( $ee=0.60$  bis  $0.65$ ), die durch Kristallisation der entsprechenden 3,5-Dinitrobenzoate enantiomerrein erhalten werden können<sup>[36]</sup>.

Da 2-Oxocyclohexancarbonsäure als Analogon von Acetoacetat mit eingefrorener Konformation zu betrachten ist, kann man erwarten, daß solche Analoga ebenfalls Substrate für diejenigen Enzyme sind, die Acetoacetat reduzieren. Tatsächlich reduziert gereinigte D-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (HBDH) aus *Rhodopseudomonas sphaeroides* 2-Oxocyclohexancarbonsäure 26 in Gegenwart von NADH ausschließlich zu *cis*-(1*S*,2*R*)-2-Hydroxycyclohexancarbonsäure 27 in 77% Ausbeute, was auf eine selektive Reduktion hindeutet.



tive Umwandlung des (+)-(1*S*)-Enantiomers durch HBDH hindeutet<sup>[37]</sup>. Im Gegensatz dazu würde man von der Bäckerhefe, die Ethylacetacetat zu (*S*)-Ethyl-3-hydroxybutyrat reduziert, eine selektive Transformation des (−)-(1*R*)-Enantiomers erwarten. In der Tat wurde 2-Oxocyclohexan-carbonsäure-ethylester **28** zum (1*R*,2*S*)-Isomer **29** in 69% Ausbeute reduziert. Ganz analog gewann man aus 2-Oxocyclopentancarbonsäure in 80% Ausbeute das entsprechende (1*R*,2*S*)-Isomer<sup>[26]</sup>. Ähnliche Resultate wurden mit Tetrahydrothiophen-Derivaten erhalten<sup>[38]</sup>. Die alternative Möglichkeit einer stereospezifischen Reduktion der im Gleichgewicht vor allem vorliegenden Enolform ist im Lichte der Befunde zur Reduktion verwandter Verbindungen<sup>[39]</sup> unwahrscheinlich.

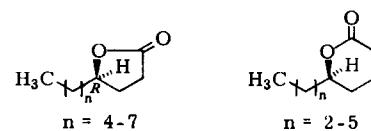
### 3.3. Andere Ketoester und Ketosäuren

2-Aryl-2-oxoessigsäure-Derivate werden von Bäckerhefe im allgemeinen mit befriedigenden Ausbeuten zu optisch reinen  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren (**30–33**) reduziert<sup>[26]</sup>. So gab Methyl-2-oxo-2-phenylacetat (−)-(R)-Methyl-2-hydroxy-2-phenylacetat **30** in 59%, 2-Oxo-2-phenylacetamid (−)-(R)-2-Hydroxy-2-phenylacetamid **31** in 70% und Ethyl-2-oxo-2-thienylacetat (−)-(S)-Ethyl-2-hydroxy-2-thienylacetat **33** in 49% Ausbeute. Die Reduktion von Methyl-2-oxo-3-phenylpropionat führte hingegen nur zu racemischem Methyl-2-hydroxy-3-phenylpropionat **34**, und auch aus 2-Oxoalkansäureestern wurden keine optisch reinen Alkohole erhalten. Ethylpyruvat wurde zu (+)-L-Ethyllactat (*ee* = 0.92) reduziert; das Produkt racemisierte jedoch im Reaktionsmedium, was auf die Anwesenheit einer Racemase hindeutet. Die Reduktion dieser  $\alpha$ -Ketosäure-Derivate wurde enzymologisch noch nicht untersucht. Es ist jedoch bekannt, daß Bäckerhefe L- und D-Lactat-Dehydrogenasen enthält, die mit  $\alpha$ -Hydroxysäuren reagieren. Zudem reduzierte gereinigte Hefe-Alkohol-Dehydro-

		<i>ee</i>
<b>30</b> , R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> :		≈ 1.0
<b>31</b> , R <sup>1</sup> = NH <sub>2</sub> , R <sup>2</sup> = C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> :		≈ 1.0
<b>32</b> , R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> =	:	0.92
<b>33</b> , R <sup>1</sup> = OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , R <sup>2</sup> =	:	hoch
<b>34</b> , R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> :		0.0

genase (YADH) Pyruvat in Gegenwart von NADH zu (−)-D-Lactat<sup>[40]</sup>. In mehreren Anaerobiern wurde eine NADH-abhängige 2-Oxocarboxylat-Reduktase gefunden; dieses Enzym produziert (2*R*)-Hydroxysäuren<sup>[41]</sup>.

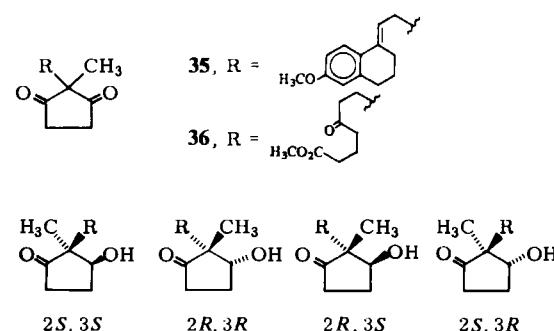
Aus  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketosäuren können sehr leicht optisch aktive Hydroxysäuren durch Reduktion mit Hefe hergestellt werden; dabei isoliert man (+)-Lactone. Mit dem Bakterium *Sarcina lutea* und dem Pilz *Cladosporium butyri* erhielt man durch Reduktion von 5-Oxohexansäure das entsprechende (−)-Lacton<sup>[42]</sup>. Dem (−)- $\gamma$ -Valerolacton wurde die (*S*)-Konfiguration zugeordnet, denn das (+)-Lacton sollte (*R*)-konfiguriert sein<sup>[43]</sup>.



Das für die Reduktion von 5-Oxodecansäure verantwortliche Enzym der Hefe befindet sich in der mitochondrialen Fraktion. Es ist NADPH-abhängig, und die Reaktion wird durch Zugabe von ATP und Mg<sup>2+</sup> stark stimuliert, in geringerem Umfang auch durch Coenzym A<sup>[44]</sup>. Es ist nicht bekannt, ob es sich bei diesem Enzym um 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase handelt – auch wenn dieses Enzym NADH-abhängig ist.

### 3.4. Cyclische Diketone

Die asymmetrische Reduktion 2,2-dialkylsubstituierter 1,3-Cyclopentandione wurde in mehreren Laboratorien detailliert untersucht<sup>[45]</sup>, da diese Reaktion bei der industriellen Totalsynthese von Steroidhormonen Anwendung fand. Der stereochemische Verlauf dieser Reduktion hängt von der relativen Größe der 2,2-Dialkylsubstituenten und von den Mikroorganismen ab; die Umsetzung läßt sich hochenantioselektiv durchführen.

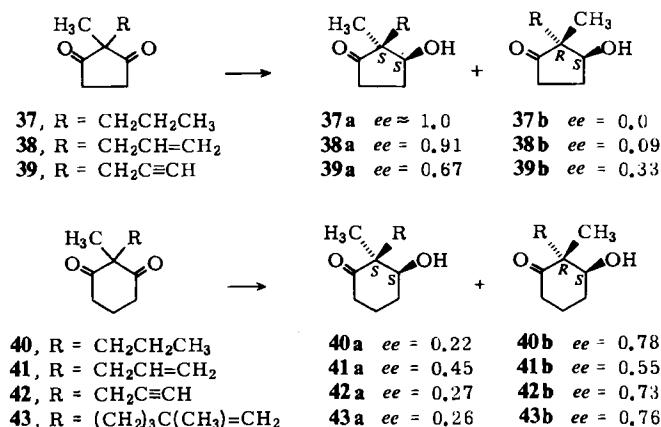


Mit *Saccharomyces uvarum* (CBS 1508) konnte **35** in 74% Ausbeute zum (2*R*,3*S*)-Isomer reduziert werden, das von geringen Anteilen des (2*S*,3*S*)-Isomers begleitet war; mit dem Bakterium *Bacillus thuringiensis* entstand dagegen aus **35** in 87% Ausbeute das (2*S*,3*S*)-Isomer als Hauptprodukt. Mit den meisten Mikroorganismen werden 3*S*-konfigurierte Alkohole erhalten, obgleich einige Stämme von *Kloeckera* Alkohole mit *R*-Konfiguration bilden<sup>[45]</sup>.

Ähnlich überführen Hefen der Gattungen *Schizosaccharomyces* und *Saccharomyces* **36** hauptsächlich in das

(2R,3S)-Isomer mit dem (2S,3S)-Isomer als einzigmem Nebenprodukt. Bemerkenswerterweise sind eine Reihe von  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylverbindungen, wie z. B. Acrolein, Methylvinylketon, Ethynylmethylketon, 2-Cyclohexen-1-on sowie Allylalkohol in der Lage, Geschwindigkeit und Ausmaß der Bildung des (2R,3S)-Isomers zu erhöhen und die des (2S,3S)-Isomers zu erniedrigen<sup>[46]</sup>. Die Wirkungsweise dieser „Verstärker“ ist noch unbekannt. Eine mögliche Erklärung wäre, daß sie „Suicide-Substrate“ für diejenige Oxidoreduktase sind, die das unerwünschte (2S,3S)-Isomer bildet. Von Allylalkohol weiß man, daß er ein „Suicide-Substrat“ für die Hefe-Alkohol-Dehydrogenase (YADH) ist<sup>[47]</sup>.

In jüngster Zeit führten Brooks et al.<sup>[48]</sup> Untersuchungen mit dem Ziel durch, eine Beziehung zwischen der Enantioselektivität und dem Größenunterschied der beiden Alkylsubstituenten in 2-Position zu finden. Wie erwartet hängt die Enantioselektivität der Reaktion sehr stark sowohl von den Alkylsubstituenten als auch von der Ringgröße ab, wobei sowohl beim Fünfring- als auch beim Sechsring-System (S)-Alkohole erhalten wurden. Während in der Cyclopantan-Reihe die (2S,3S)-Isomere 37a-39a jeweils als Hauptprodukt entstehen, überwiegen in der Cyclohexan-Serie die (2R,3S)-Isomere 40b-43b.



#### 4. Ausblick

Die mikrobielle enantioselektive Reduktion von Ketonen hat sich inzwischen zu einer überaus wertvollen Methode zur Synthese chiraler Alkohole entwickelt. Da der stereochemische Verlauf der Reduktion von der Art der Substituenten abhängt, die der Carbonylgruppe benachbart sind, wurde die Prelog-Regel mit einem Erfolg zur Voraussage des stereochemischen Ergebnisses benutzt. Verwendet man jedoch intakte Zellen als Reduktionsmittel, dann kann das Keton Substrat konkurrierender Oxidoreduktasen entgegengesetzter Chiralität sein; damit hängen die Geschwindigkeiten der Bildung enantiomerer Alkohole von den kinetischen Parametern  $K$  und  $v_{\max}$  der konkurrierenden Enzyme ab. Der stereochemische Verlauf der Reduktion läßt sich steuern, indem man geeignete Substrate mit signifikanten Unterschieden in  $v_{\max}$  und/oder  $K$  für die jeweiligen Enzymsysteme maßschneidert.

Es ist anzunehmen, daß schon bald große Anstrengungen zur Isolierung und Charakterisierung der wichtigsten Oxidoreduktasen unternommen werden; dann könnte man

die Substratstruktur mit den kinetischen Parametern  $v_{\max}$  und  $K$  dieser Enzyme korrelieren. Es sollte so nicht nur möglich werden, die Komplexität mikrobieller Reduktionen von Ketonen zu verstehen, sondern auch neue Strategien zur Steuerung der Enantioselektivität zu entwerfen. Selektive Inhibitoren, wie z. B. „Suicide-Substrate“, könnten zur Blockierung des am stärksten störenden Enzyms entwickelt werden. Es sollten dann durch Verwendung verschiedener Mutanten, die durch Züchten oder durch Protein-Engineering erhalten werden könnten, chirale Alkohole beider Konfigurationen mit hoher optischer Reinheit leicht in größeren Mengen zugänglich werden.

Eingegangen am 4. April 1984 [A 501]  
Übersetzt von Priv.-Doz. Dr. Hans-Joachim Gais, Darmstadt

- [1] a) M. Hirama, M. Uei, *J. Am. Chem. Soc.* **104** (1982) 4251; b) C. LeDrian, A. E. Greene, *ibid.* **104** (1982) 5473; c) C. T. Hsu, N. Y. Wang, L. H. Latimer, C. J. Sih, *ibid.* **105** (1983) 593; d) D. W. Brooks, P. G. Grothaus, J. T. Palmer, *Tetrahedron Lett.* **23** (1982) 4187; e) A. I. Meyers, R. A. Amos, *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 870.
- [2] a) H. Kagan in G. Wilkinson, F. G. A. Stone, E. W. Abel: *Comprehensive Organometallic Chemistry*, Vol. 8, Pergamon Press, Oxford 1982, S. 463; b) B. Bosnich, M. D. Fryzuk in G. L. Geoffroy: *Topics in Inorganic and Organometallic Stereochemistry*, Wiley, New York 1981, S. 119.
- [3] J. D. Morrison, H. S. Mosher: *Asymmetric Organic Reactions*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA 1972, S. 40.
- [4] C. Walsh: *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Freeman, San Francisco 1979, S. 334.
- [5] H. Eyring, *Chem. Rev.* **17** (1935) 65.
- [6] A. Fersht: *Enzyme Structure and Mechanism*, Freeman, San Francisco 1977.
- [7] G. G. Hammes: *Enzyme Catalysis and Regulation*, Academic Press, New York 1982, S. 101.
- [8] D. B. Northrop, *Biochemistry* **20** (1981) 4056.
- [9] H. R. Mahler, E. H. Cordes: *Biological Chemistry*, 2. Aufl., Harper and Row, New York 1971, S. 290.
- [10] H. Theorell, B. Chance, *Acta Chem. Scand.* **5** (1951) 1127.
- [11] F. M. Dickinson, G. P. Monger, *Biochem. J.* **131** (1973) 261.
- [12] C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **104** (1982) 7294.
- [13] C. S. Chen, B. N. Zhou, G. Girdaukas, W. R. Shieh, F. Van Middlesworth, A. S. Gopalan, C. J. Sih, *Bioorg. Chem.* **12** (1984) 98.
- [14] C. Neuberg, *Adv. Carbohydr. Chem.* **4** (1949) 75; K. Kieslich, *Synthesis* **1969**, 147; A. Fischli in R. Scheffold: *Modern Synthetic Methods*, Vol. 2, Salle & Sauerländer, Aarau und Frankfurt am Main 1980.
- [15] E. Hochuli, K. E. Taylor, H. Dutler, *Eur. J. Biochem.* **75** (1977) 433.
- [16] R. MacLeod, H. Prosser, L. Fikentscher, J. Lanyi, H. S. Mosher, *Biochemistry* **3** (1964) 838.
- [17] O. Cervinka, L. Hub, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **31** (1966) 2615; D. D. Ridley, M. Stralow, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1975**, 400; K. Kubato, M. Imuta, E. S. Kempner, H. Ziffer, *J. Org. Chem.* **43** (1978) 2357.
- [18] V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **9** (1964) 119.
- [19] M. Bucciarelli, A. Forni, I. Moretti, G. Torre, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1978**, 456; *Synthesis* **1983**, 897.
- [20] M. Imuta, K. I. Kawai, H. Ziffer, *J. Org. Chem.* **45** (1980) 3352.
- [21] K. Mori, *Tetrahedron* **37** (1981) 1341, zit. Lit.
- [22] B. Wipf, E. Kupfer, R. Bertazzi, H. G. W. Leuenberger, *Helv. Chim. Acta* **66** (1983) 485.
- [23] R. U. Lemieux, J. Giguere, *Can. J. Chem.* **29** (1951) 678.
- [24] V. G. Frater, *Helv. Chim. Acta* **62** (1979) 2829.
- [25] B. N. Zhou, A. S. Gopalan, F. Van Middlesworth, W. R. Shieh, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **105** (1983) 5925.
- [26] B. S. Deol, D. D. Ridley, G. W. Simpson, *Aust. J. Chem.* **29** (1976) 2459.
- [27] C. J. Sih, B. N. Zhou, A. S. Gopalan, W. R. Shieh, F. Van Middlesworth in W. Bartmann, B. Trost: *Selectivity—a Goal for Synthetic Efficiency*, Workshop Conferences Hoechst Vol. 14, Verlag Chemie, Weinheim 1983, S. 251.
- [28] M. Hirama, M. Shimizu, M. Iwashita, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 599.
- [29] R. A. Bradshaw, B. E. Noyes, *Methods Enzymol.* **35** (1975) 122.
- [30] F. Lynen, *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **20** (1961) 941.
- [31] W. R. Shieh, C. J. Sih, unveröffentlicht.
- [32] H. Dutler, A. Kull, R. Mislin, *Eur. J. Biochem.* **22** (1971) 203.
- [33] G. M. Whitesides, C. H. Wong, A. Pollak in E. L. Eliel, S. Otsuka: *Asymmetric Reactions and Processes in Chemistry*, ACS Symp. Ser. **185**, Am. Chem. Soc., Washington D.C. 1982, S. 205; I. J. Jokovac, H. B. Goodbrand, K. P. Lok, J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **104** (1982) 4659.

- [34] K. Horikoshi, A. Furuchi, H. Koshiji, H. Akita, T. Oishi, *Agric. Biol. Chem.* 1983, 435; H. Akita, A. Furuchi, H. Koshiji, K. Horikoshi, T. Oishi, *Tetrahedron Lett.* 23 (1982) 4051.  
[35] G. Fräter, *Helv. Chim. Acta* 62 (1979) 2825.  
[36] M. F. Züger, D. Seebach, *Angew. Chem.* 95 (1983) 1024; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 1012.  
[37] S. A. Benner, T. H. Morton, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 991.  
[38] R. W. Hoffmann, W. Helbig, W. Ladner, *Tetrahedron Lett.* 23 (1982) 3479.  
[39] C. J. Sih, J. P. Rosazza in J. B. Jones, C. J. Sih, D. Perlman: *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry, Part 1*, Wiley, New York 1976, Kapitel 3.  
[40] J. V. Eys, N. O. Kaplan, *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 2782.  
[41] H. Giesel, H. Simon, *Arch. Microbiol.* 135 (1983) 51.  
[42] G. T. Muys, B. Van der Ven, A. P. De Jorge, *Appl. Microbiol.* 11 (1963) 389.  
[43] R. Bentley: *Molecular Asymmetry in Biology*, Vol. 2, Academic Press, New York 1970, S. 44.  
[44] A. Francke, *Biochem. J.* 95 (1965) 633.  
[45] K. Kieslich: *Microbial Transformations of Non-Steroid Cyclic Compounds*, Thieme, Stuttgart 1976, S. 29; zit. Lit.  
[46] R. P. Lanzilotta, D. G. Bradley, C. C. Beard, *Appl. Microbiol.* 29 (1975) 427.  
[47] R. R. Rando, *Biochem. Pharmacol.* 23 (1974) 2328.  
[48] D. W. Brooks, P. G. Grothaus, W. L. Irwin, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 2820; D. W. Brooks, H. Mazdiyasni, S. Chakrabarti, *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 1241.

## Quecksilber(II)- und Palladium(II)-katalysierte [3.3]-sigmatrope Umlagerungen

Von Larry E. Overman\*

Quecksilber(II)- und Palladium(II)-salze haben als Katalysatoren für [3.3]-sigmatrope Umlagerungen, bei denen C–O-, C–N-, C–S- und C–C- $\sigma$ -Bindungen geknüpft werden, breite Anwendung gefunden. Dabei wird oft eine rasante Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor  $10^{10}$ – $10^{14}$  beobachtet (bei 1 M Katalysator-Konzentration), so daß viele schwierige Umwandlungen bei oder nahe Raumtemperatur durchgeführt werden können, oft mit bemerkenswerter Zunahme der Stereoselektivität und Abnahme der Bildung unerwünschter Nebenprodukte. Bei vielen der solcherart katalysierten Umlagerungen deuten die Befunde auf einen cyclisierungsinduzierten Mechanismus hin.

**Neue synthetische Methoden (46)**

### 1. Einführung

[3.3]-sigmatrope Umlagerungen<sup>[1,2]</sup> (Schema 1) gehören zu den wichtigeren Reaktionen im Arsenal der modernen Synthese<sup>[3]</sup>. Sie ermöglichen die Vertauschung der Funktionalitäten X und Y (1 → 2) und erzeugen die neugebildete Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung mit oft hoher Kontrolle der Stereoselektivität<sup>[3c, 4]</sup>.



Schema 1. Die neu geknüpfte C–Y-Bindung ist fett gezeichnet.

Es ist nicht überraschend, daß man sich intensiv bemüht hat, Katalysatoren<sup>[5]</sup> für diese wichtigen Umwandlungen zu finden<sup>[6]</sup>. Am sorgfältigsten untersucht wurde bisher die Säure-Base-Katalyse, welche die Anwesenheit eines Substituenten mit einem sauren oder basischen Heteroatom voraussetzt. Die bedeutendsten Umwandlungen dieses Typs sind die Brønstedt- oder Lewis-Säure-katalysierten aromatischen Claisen-, aromatischen Amino-Claisen- und Cope-Umlagerungen sowie die basekatalysierte Oxy-Cope-Umlagerung und die Claisen-Umlagerung von Allyl-

estern<sup>[6]</sup>. Auch die Katalyse von [3.3]-sigmatropen Umlagerungen durch Metalle und Organometall-Reagentien ist bekannt<sup>[6]</sup>. Eine repräsentative, jedoch sicherlich nicht vollständige Liste von Metall-„Katalysatoren“<sup>[5]</sup> umfaßt Ni<sup>0</sup>, Pd<sup>0</sup>, Ag<sup>I</sup>, Ni<sup>II</sup>, Pd<sup>II</sup>, Pt<sup>II</sup>, Hg<sup>II</sup> und Al<sup>III</sup>.

Die vielleicht vielseitigsten Metallkatalysatoren sind Salze der „weichen“<sup>[7]</sup> Metalle Hg<sup>II</sup> und Pd<sup>II</sup>. Sie katalysieren eine Vielzahl von [3.3]-sigmatropen Umlagerungen, in welchen C–O-, C–N-, C–S- und C–C-Bindungen geknüpft werden (C–Y, Schema 1). Solche katalysierten Reaktionen laufen unter extrem milden Bedingungen ab (bei neutralem pH-Wert und bei oder nahe Raumtemperatur) und ergeben oft Ausbeuten und Regio- sowie Stereoselektivitäten, welche diejenigen der thermischen Varianten bei weitem übertreffen.

In diesem Beitrag sollen kurz die Fortschritte bei der Katalyse [3.3]-sigmatoper Reaktionen mit Hg<sup>II</sup>- und Pd<sup>II</sup>-Salzen zusammengefaßt werden. Nicht berücksichtigt wurden die vielen nützlichen [3.3]-sigmatropen Umlagerungen, die mit Pd<sup>0</sup>-Komplexen ausgeführt werden können<sup>[6, 8, 9]</sup>.

### 2. Allylester-Umlagerungen

Overman und Campbell berichteten 1976 als erste über die katalytische Wirkung von Quecksilber(II)-Salzen bei der Äquilibrierung von Allylestern<sup>[10, 11]</sup>. Bei Allylcarbamaten verlief die Gleichgewichtseinstellung schneller als bei

[\*] Prof. Dr. L. E. Overman  
Department of Chemistry, University of California  
Irvine, CA 92717 (USA)