

Tabelle 1. Physikalische Daten von (4*RS*,6*S*)-2 und (2*RS*,4*S*)-5 [a].

2: IR (Film): $\bar{\nu}$ = 1735 cm⁻¹ (s); ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.60–2.00 (m, 17 H), 2.10–2.85 (m, 3 H); MS (70 eV): m/z 156 (*M*⁺, 0.3%), 127 (2), 99 (5), 86 (52), 71 (2), 69 (4), 57 (100), 43 (12), 41 (15); $[\alpha]_D^{25}$ = +10.3° (c = 4.90 in Pentan); K_p = 76–78°C/18 Torr (Kugelrohr)
5: IR (Film): $\bar{\nu}$ = 1710 cm⁻¹ (s); ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.80–2.10 (m, 14 H), 2.20–2.90 (m, 1 H), 12.25 (s, 1 H); MS (70 eV): m/z 144 (*M*⁺, 2%), 129 (2), 126 (4), 115 (23), 101 (24), 74 (100), 71 (98); $[\alpha]_D^{25}$ = +13.3° (c = 6.00 in CH₃OH); K_p = 81–83°C/0.5 Torr (Kugelrohr)

[a] Korrekte Elementaranalysen.

Daraus resultiert, daß Manicon 1 aus *M. rubida* an C-6 ebenfalls (*S*)-konfiguriert ist und somit als (4*E*,6*S*)-4,6-Dimethyl-4-octen-3-on vorliegt.

Eingegangen am 17. Februar 1987 [Z 2107]

- [1] H. J. Bestmann, A. B. Attygalle, J. Schwarz, O. Vostrowsky, W. Knauf, *J. Chem. Ecol.* 13 (1987), im Druck.
- [2] H. M. Fales, M. S. Blum, R. M. Crewe, J. M. Brand, *J. Insect Physiol.* 18 (1972) 1077.
- [3] A. B. Attygalle, O. Vostrowsky, H. J. Bestmann, E. D. Morgan, M. C. Cammaerts, *Proc. Int. Congr. Union Study Soc. Insects 10th* (1986), München, im Druck.
- [4] H. J. Bestmann, A. B. Attygalle, J. Glasbrenner, R. Riemer, O. Vostrowsky, M. G. Constantino, unveröffentlicht.
- [5] V. Schurig, *Chromatographia* 13 (1980) 263.
- [6] Packard United Technologies 438A, 25 m × 0.2 mm FSCC OV 101 mit 0.1% Nickel(II)-bis[3-heptafluorbutyryl-(1*R*)-campherat], 80°C isotherm. Retentionszeiten der vier Isomere von *rac*-2: 12.12, 12.47, 14.75 und 15.21 min. Wir danken Herrn Prof. V. Schurig (Tübingen) für die leihweise Überlassung der GC-Säule.
- [7] A. B. Attygalle, M. Herrig, O. Vostrowsky, H. J. Bestmann, *J. Chem. Ecol.* 13 (1987) 1299.
- [8] E. D. Morgan, L. J. Wadhams, *J. Chromatogr. Sci.* 10 (1972) 528.
- [9] A. B. Attygalle, E. D. Morgan, *Anal. Chem.* 55 (1983) 321.

Reduktion von 2-Enoaten und Alkanoaten mit Kohlenmonoxid oder Formiat, Viologenen und *Clostridium thermoaceticum* zu gesättigten Säuren und ungesättigten bzw. gesättigten Alkoholen**

Von Helmut Simon*, Hiltrud White, Herbert Lebertz und Iordanes Thanos

Alle bisher bekannten biologischen Reduktionen von Carboxylaten zu Aldehyden verlaufen über eine Aktivierung der Carboxygruppe. Das Paar Carboxylat/Aldehyd hat mit $E'_0 \approx -550$ mV ein stark negatives Redoxpotential. Die von Reduktasen üblicherweise verwendeten Cosubstrate oder prosthetischen Gruppen zeigen Redoxpotentiale von $E'_0 = -320$ mV (Pyridinnucleotide) oder bis zu $E'_0 = -400$ mV (einige Flavoenzyme oder Eisen-Schwefel-Cluster). Die Aktivierung besteht üblicherweise in der Bildung eines Thioesters, was in der Regel ein ATP erfordert. Diese Thioester sind mit NADH reduzierbar. Wir fanden nun ein vermutlich auch präparativ nutzbares System, das Carboxylate zu Alkoholen reduzieren kann. Aufgrund der pH-Abhängigkeit der Reduktion könnten auch die undissoziierten Säuren das Substrat sein. Die Säuren oder Carboxylate werden dabei anscheinend nicht aktiviert. Bei dieser Reaktion muß die Aldehydstufe durchlaufen werden.

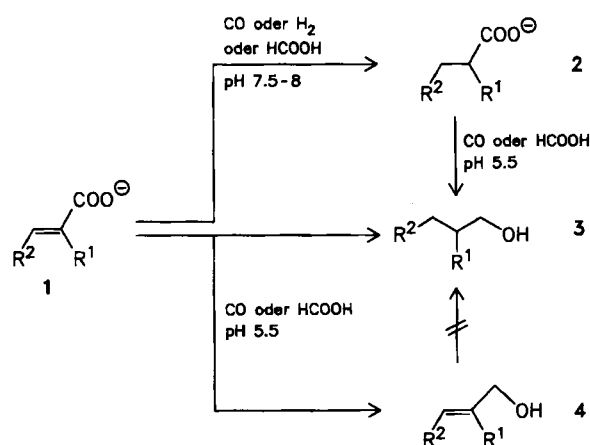
[*] Prof. Dr. H. Simon, Dr. H. White, Dr. H. Lebertz, Dr. I. Thanos
Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-8046 Garching

[**] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 145) und den Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken Herrn H. Leichmann für exzellente Mitarbeit und den Herren Dr. P. Rauschenbach und F. Wendling für HPLC-Analysen.

Der Übergang vom Aldehyd zum Alkohol wird vermutlich von einem anderen Enzym katalysiert. Da für die in *Clostridium thermoaceticum* vorkommende Kohlenmonoxid-Dehydrogenase, die die Reaktion



katalysiert, ein Redoxpotential von –560 mV angegeben wird^[1], haben wir ruhende Zellen dieses Organismus mit ungesättigten Verbindungen in einer CO-Atmosphäre inkubiert. Eine Reaktion war kaum zu beobachten. Setzt man solchen Systemen^[2] jedoch 1 mM Methylviologen zu, so wird Kohlenmonoxid verbraucht, und es werden gesättigte und ungesättigte Carboxylate sehr unterschiedlicher Struktur zu Alkoholen reduziert. Gibt man kein Carboxylat oder keinen sonstigen Elektronenacceptor dazu, so entsteht aus dem Kohlenmonoxid Methanol (siehe ^[4]). Bei 2-Enoaten kann die CC-Doppelbindung und/oder die Carboxylatgruppe reduziert werden.



a, R¹ = R² = CH₃; b, R¹ = CH₃, R² = C₆H₅;

c, R¹ = H, R² = CH₃-CH=CH

Tabelle 1. Substrate und ihre Reduktionsprodukte, die bei pH 5.5 unter den angegebenen Bedingungen [2] mit Kohlenmonoxid erhalten werden. v_{rel} = relative Geschwindigkeit.

Substrate	Produkte	v_{rel} [a]
Acetat	Ethanol	55
Propionat	1-Propanol	100
Butyrat	1-Butanol	65
(<i>E</i>)-2-Methyl-2-butenat 1a	2-Methyl-2-buten-1-ol 4a und 2-Methyl-1-butanol 3a [b]	60 110
(<i>R</i>)-2-Methylbutyrat 2a	(<i>R</i>)-2-Methyl-1-butanol 3a	—
(<i>R</i>)-2-Methyl-3-phenylpropionat 2b	(<i>R</i>)-2-Methyl-3-phenyl-1-propanol 3b [c]	—
(<i>R</i>)-Lactat	1,2-Propandiol [d]	10
(<i>S</i>)-Lactat	1,2-Propandiol [d]	7
Succinat	1,4-Butandiol	85
Glutarat	1,5-Pentandiol	106
Adipat	1,6-Hexandiol	175
Benzoat	Benzylalkohol	115
(<i>RS</i>)-2-Phenylbutyrat	(<i>S</i>)-2-Phenyl-1-butanol [e]	30
(<i>RS</i>)-3-Phenylbutyrat	3-Phenyl-1-butanol [f]	20
3-Butenoat	3-Buten-1-ol	15
Sorbinat 1c	Sorbinol 4c und (<i>E</i>)-4-Hexen-1-ol	—

[a] Zur besseren Vergleichbarkeit sind die relativen Geschwindigkeiten pro Elektronenpaar angegeben. Die Bildung von Ethanol erfordert zwei, die von 2-Methyl-1-butanol aus (*E*)-2-Methyl-2-butenat drei und die von 1,4-Butandiol aus Succinat vier Elektronenpaare. Ein Strich bei v_{rel} bedeutet: Nicht unter vergleichbaren Bedingungen gemessen. [b] Der gesättigte Alkohol kann auch quantitativ erhalten werden (siehe nächstes Beispiel). [c] 3b wurde mit den gleichen Zellen aus 1b und H₂ bei pH 7 erhalten; >95% ee, da stufenweise Reduktion 1b → 2b → 3b. [d] Enantiomerenüberschuß nicht bestimmt. [e] 62% ee. [f] Die Enantiomere wurden im Verhältnis 65:35 gebildet.

Tabelle 1 zeigt die große Substratbreite der Reduktion von Carboxylaten. Es werden sowohl Mono- als auch Dicarboxylate reduziert und auch solche Monocarboxylate wie z. B. 2-Phenylbutyrat, deren 2-Position mit stark raumerfüllenden Gruppen besetzt ist. Die relativen Geschwindigkeiten in Tabelle 1 sind als ungefähre Angaben zu verstehen, da nicht alle Reduktionen in einer Serie von Parallelversuchen durchgeführt wurden. Die Geschwindigkeitsangabe 100 bedeutet, daß bei 40°C unter den angegebenen Bedingungen^[2] pro Stunde etwa 30 µmol 1-Propanol aus Propionat entstehen. Bei 50°C sind es etwa 40 µmol.

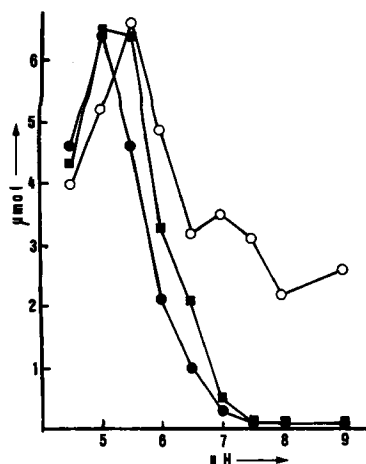


Abb. 1. pH-Abhängigkeit der Reduktion von (E)-2-Methyl-2-butenolat 1a (30 µmol) mit Kohlenmonoxid bei 40°C in Gegenwart von 1 mM Methylviologen. Nach 20 min wurden gebildet: 2a ○—○, 3a ●—● und 4a ■—■.

Mit *C. thermoaceticum* sind Reduktionen auch mit Wasserstoffgas oder Formiat als Elektronendonoren möglich. Abbildung 1 und Tabelle 2 zeigen, daß die Carboxylatgruppe von 1a bei pH 8.0 praktisch von keinem der drei Reduktionsmittel (CO, H₂, HCOOH) angegriffen wird. Aufgrund der unterschiedlichen pH-Abhängigkeit der Alkanoat- und der Enoat-Reduktion ist es z. B. möglich, ein Enoat 1 bei pH 7.5–8.0 mit Kohlenmonoxid zunächst zum Alkanoat 2 zu reduzieren. Nach pH-Verschiebung auf 5.5 kann aus 2 mit Formiat oder Kohlenmonoxid der gesättigte Alkohol 3 gewonnen werden. Auf diese Weise ließen sich (R)-2-Methyl-3-phenyl-1-propanol 3b und (R)-2-Methyl-1-butanol 3a mit ee-Werten >95% erhalten^[5].

Tabelle 2. Nach 20 min bei 40°C erhaltene Reduktionsprodukte [µmol] von (E)-2-Methyl-2-butenolat 1a (100 µmol) in Abhängigkeit von den Reduktionsmitteln Wasserstoffgas oder Formiat bei pH 5.0 oder 8.0 in Gegenwart von 80 mg (Trockengewicht) *C. thermoaceticum*. Gesamtvolumen 3.0 mL; 0.3 M Puffer.

Produkte pH	2a		4a		3a	
	5.0	8.0	5.0	8.0	5.0	8.0
Reduktionsmittel: H ₂	1.5	1.5	0.3	0.1	0.05	0.1
Formiat	7.0	1.7	7.0	0.1	4.0	0.05

Wird ein Enoat 1 bei pH 5.5 mit CO reduziert, so kommt es zu einer Reaktionsverzweigung, bei der ein gesättigter Alkohol 3 und ein Allylalkoholderivat 4 entstehen, das nicht weiter reduziert wird. Sorbinat 1c ließ sich unter den angegebenen Bedingungen^[2] zu über 80% zu Sorbinol 4c reduzieren; daraus geht die hohe Chemo-selektivität der Reduktion von Enoaten 1 hervor.

Die Reduktionsgeschwindigkeiten von (RS)-2a und (S)-2a in einer CO-Atmosphäre verhalten sich wie 1.6 : 1.0. Bei (R)- und (S)-Lactat beträgt das Verhältnis 1.4 : 1.0.

Das heißt, die Reduktion von Enoaten 1 mit CO, die bisher auch noch nicht beschrieben wurde, zeigt in hohem Maße Produkt-Enantioselektivität für die Bildung der Alkanoate 2. Die Reduktion eines racemischen Alkanoats vom Typ 2a oder 2b zum Alkohol 3 zeigt dagegen keine hohe Stereoselektivität.

Das Besondere der beschriebenen Reduktion liegt darin, daß bisher weder chemische noch biokatalysierte Reaktionen bekannt sind, die es ermöglichen, in wäßriger Lösung Carboxylate zu reduzieren. Bei den bisherigen Beispielen^[6–9] ist es entweder bekannt, daß die Carboxylate intermediär aktiviert werden, oder die Aktivierung ist aufgrund der angewendeten Bedingungen wahrscheinlich.

Daß die Carboxylate vor der Reduktion nicht in üblicher Weise aktiviert werden, läßt sich aus folgenden Befunden schließen: 1) Die Reaktion findet mit gewaschenen, ruhenden Zellen auch in phosphatfreien Puffern statt, wobei 80 mg Zellen (Trockengewicht) über 430 µmol Propionat zu 1-Propanol reduzieren. Auch dann bleibt die Reaktion vermutlich nur deshalb stehen, weil durch die gleichzeitige Bildung von Ameisensäure der pH-Wert, trotz des Puffers, auf 4.2 gesunken ist. Wird der pH-Wert zwischendurch wieder auf 5.5 gebracht, so lassen sich bis zu 1520 µmol 1-Propanol gewinnen. Würde die Aktivierung durch Abbau von endogenem Material erfolgen, müßte schon bei der Bildung von 430 µmol 1-Propanol mehr als die Hälfte der Zellen z. B. aus Kohlenhydraten bestehen, und es wären entsprechende Mengen an Acetat zu erwarten. Ein solcher Versuch ergab jedoch weniger als 5% des dann zu erwartenden Acetats. Auch die für die Aktivierung nötigen Enzyme wurden nicht gefunden. 2) Verwendet man einen dialtrafiltrierten Rohextrakt, von dem alle Verbindungen mit einem Molekulargewicht kleiner 5000 zu mehr als 95% abgetrennt sind, so ergibt sich fast die gleiche Geschwindigkeit der Reduktion. Auch Lipidmembranen sind nicht erforderlich, da die Carboxylatgruppe nach zweimaliger Säulenchromatographie des Rohextrakts noch reduziert wird. Folglich handelt es sich nicht um eine Reduktion von Acyl-CoA wie bei der Bildung von 1-Butanol aus Butyrat z. B. durch *Clostridium acetobutylicum*^[6–8]. Die Substratbreite dieser Acyl-CoA-Reduktase ist auch sehr gering^[6]. Die kürzlich beobachtete Erhöhung der Butanolbildung aus Butyrat durch *C. acetobutylicum* in Gegenwart von CO ist durch die Hemmwirkung von CO auf die Hydrogenase zu erklären. Da die Reduktionsäquivalente somit nicht als H₂ abgegeben werden können, werden sie vermehrt zur Reduktion von Acyl-CoA benutzt^[8]. Von uns gereinigte Kohlenmonoxid-Reduktase zeigt keine Alkanoat- und Enoatreduktaseaktivität. Folglich scheint die Reduktion von Carboxylaten sehr verschiedener Struktur eine bisher nicht bekannte Enzymreaktion zu sein. Die von Howe et al.^[9] beschriebene Reduktion von 2-(4-Chlorphenyl)thiazol-4-yllessigsäure zum entsprechenden Alkohol durch verschiedene Mikroorganismen wird mit wachsenden Zellen durchgeführt. Die Autoren vermuten dabei einen Mechanismus, der dem der Bildung von Zimtalkohol entspricht, d. h. durch die Sequenz Cinnamat → Cinnamoyl-CoA → Zimtaldehyd → Zimtalkohol. Im übrigen verlaufen die von Howe et al.^[9] beschriebenen Reduktionen etwa mit 1% der Geschwindigkeit, mit der z. B. 2-Phenyl-1-butanol durch ruhende Zellen von *C. thermoaceticum* aus 2-Phenylbutyrat ohne Zusatz von energieliefernden Substraten gebildet wird.

Eingegangen am 2. März,
ergänzte Fassung am 1. April 1987 [Z 2120]

