

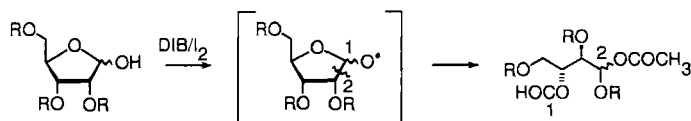
Autoren, die eine „Zuschrift“ veröffentlichen wollen, sollten vor der Abfassung ihres Manuskripts unbedingt die „Hinweise für Autoren“ lesen, die jeweils im Januarheft eines Jahrgangs nach dem Inhaltsverzeichnis gedruckt sind; auf Anforderung können sie auch von der Redaktion erhalten werden.

## Reagentien mit hypervalentem Iod: Herstellung chiraler Synthesebausteine durch Fragmentierung anomerer Kohlenhydrat-Alkoxyradikale\*\*

Von Pedro de Armas, Cosme G. Francisco und Ernesto Suárez\*

Die besondere Bedeutung von Kohlenhydraten beruht unter anderem auf ihrem Einsatz als chirale Templatvorstufen für viele komplexe Nichtkohlenhydratverbindungen<sup>[1]</sup>. In den letzten Jahren sind große Anstrengungen unternommen worden, neue und leistungsfähige Methoden zu entwickeln, die den Auf- oder Abbau von Asymmetriezentren mit chemischen Mitteln ermöglichen. Geeignete Reaktionen müssen unter Erhalt der während einer solchen Synthese verwendeten Schutzgruppen verlaufen. Die Herstellung chiraler C<sub>4</sub>-Bausteine des Threose- oder Erythrosetyps<sup>[2]</sup> wurde besonders intensiv untersucht, da diese Verbindungen für die Synthese einiger polyhydroxylierter Naturstoffe verwendet worden sind<sup>[3]</sup>.

In den vergangenen Jahren haben wir Reagentien mit hypervalentem Iod untersucht, mit denen Alkoxyradikale erzeugt werden können, die  $\beta$ -Fragmentierungsreaktionen beschleunigen<sup>[4]</sup>. Durch Umsetzung geeigneter oxabicyclischer Hemiacetale mit diesen Reagentien ist uns ein neuer Syntheseweg zu Spirolactonen und Lactonen mittlerer Ringgröße gelungen<sup>[5]</sup>. Als Fortsetzung dieser Arbeiten beschreiben wir hier die Synthese chiraler C<sub>4</sub>-Bausteine des D- und L-Erythrosetyps durch  $\beta$ -Fragmentierung der C1-C2-Kohlenstoffbindung von geeignet geschützter D- bzw. L-Arabinose, D-Ribose bzw. 2-Desoxy-D-ribose (Schema 1). Diese



Schema 1. DIB = (Diacetoxyiod)benzol.

Reaktion konnte durch  $\beta$ -Fragmentierung von D-Mannose- und D-Glucose-Derivaten auch auf die Herstellung chiraler C<sub>5</sub>-Bausteine übertragen werden.

Die Spaltung der C1-C2-Bindung in Kohlenhydraten kann auf unterschiedliche Weise erfolgen (z.B. Ruff-, Wohl-, Weer-

man-Abbau), doch haben all diese Methoden Nachteile wie Mehrstufigkeit, geringe Ausbeuten oder drastische Reaktionsbedingungen<sup>[6]</sup>. Obwohl Natriumperiodat und Bleitetraacetat routinemäßig zum Nachweis vicinaler Dirole verwendet werden<sup>[7]</sup>, sind diese Reagentien in der Synthese bisher nur begrenzt zur Spaltung der C1-C2-Bindung eingesetzt worden<sup>[8]</sup>.

Wir haben Kohlenhydratderivate mit (Diacetoxyiod)benzol (DIB) und Iod in Cyclohexan unter den in Tabelle 1 zusammengefaßten Reaktionsbedingungen umgesetzt. Die Re-

Tabelle 1.  $\beta$ -Fragmentierung anomerer Kohlenhydrat-Alkoxyradikale [a].

Ansatz	Substrat [b]	DIB [mmol]	I <sub>2</sub> [mmol]	Zeit [h]	Produkt	Ausbeute [%]
1		1.2	1	3		84
2		1.2	0.1	24		36
3		1.2	0	24	keine Reaktion	
4		1.2	1	4		85
5		1.2	1	8		91
6		1.2	1	8		89
7		2.2	1	96		44
8		1.7	1	0.3 [c]		44
9		1.2	1	6		58
10		1.2	1	32		81
11		1.2	1	8		85

[a] 0.3 mmol-Maßstab, Raumtemperatur (20°C), Cyclohexan (30 mL mmol<sup>-1</sup>). [b] TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl, Bn = Benzyl. [c] Unter Rückfluß.

[\*] Prof. E. Suárez, Dr. P. de Armas, Dr. C. G. Francisco  
Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del C.S.I.C.  
Carretera de la Esperanza 2, 38206 La Laguna, Tenerife (Spanien)

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch das Forschungsprogramm Nr. PB87-0406 der Dirección General de Investigación Científica y Técnica gefördert.

aktionsbedingungen wurden mit dem leicht zugänglichen Substrat 5-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2,3-*O*-isopropyliden-D-ribofuranose **1**<sup>[9]</sup> untersucht. Bei der Umsetzung (Ansatz 1) entstand bevorzugt ein Stereoisomer an C1 des Erythrosederivats **2** (ca. 95:5). Die postulierte Konfiguration an C1 wurde aufgrund der *trans*-Kopplungskonstanten  $J(\text{H}_1, \text{H}_2) = 1.96 \text{ Hz}$  abgeleitet. Der Zusatz von Iod ist für den Ablauf der Reaktion notwendig (Ansatz 3); werden lediglich katalytische Mengen Iod eingesetzt, reduziert sich die Ausbeute (Ansatz 2). Wir vermuten, daß die Reaktion nach folgendem Mechanismus abläuft: Zunächst wird ein anomeres Alkoxyradikal erzeugt, danach folgt eine  $\beta$ -Fragmentierung und das dabei entstehende C1-Kohlenstoffradikal wird anschließend durch ein Acetoxylradikal des Reagens abgefangen. Der anomere Kohlenstoff ist nun Teil einer Formiatfunktion, die den Alkohol an C3 verestert (Schema 1).

Ein chiraler Erythrosebaustein mit anderen Schutzgruppen, **4**, wurde aus 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-D-ribofuranose **3** hergestellt<sup>[10]</sup> (Ansatz 4). Da Substrat **3** nicht wie Substrat **1** sterisch fixiert ist, wurde ein Gemisch der Stereoisomere an C1 erhalten (ca. 1:1).

Die Konfiguration an C2 scheint den Reaktionsverlauf nicht zu beeinflussen, denn D- und L-2,3,5-Tri-*O*-benzyl-arabinofuranose **5** bzw. **6** konnten analog zu Substrat **3** in ähnlich guter Ausbeute zu den D- bzw. L-Erythrosederivaten **4** bzw. **7** fragmentiert werden (vergleiche Ansatz 4 mit Ansatz 5 bzw. 6).

Durch  $\beta$ -Fragmentierung von 2-Desoxy-D-ribose in der Furanose- (**8**) und Pyranoseform (**10**) waren zwei potentiell interessante Synthesebausteine, nämlich die 1-Iod-2,3,4-trihydroxybutanderivate **9** bzw. **11**, zugänglich (Ansätze 7–9). Auch wenn die Ausbeuten in diesem Fall niedriger waren als bei den zuvor untersuchten Substraten, so eröffnet die For-

miatgruppe die Möglichkeit zu nachfolgenden selektiven Modifikationen dieser chiralen Bausteine.

Wie die Ansätze 10 und 11 zeigen, konnte die Reaktion auch auf Hexosen ausgeweitet werden. 2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-D-glucopyranose **12** und 2,3,5,6-Di-*O*-isopropyliden-D-mannofuranose **14** wurden zu den D-Arabinosederivaten **13** bzw. **15** umgesetzt. Im ersten Fall erhält man **13** als ein Gemisch der Stereoisomere bezüglich C1 (ca. 1:1), wobei die Formiatgruppe die Hydroxygruppe an C4 verestert. Im letzteren Fall entsteht ein einziges Stereoisomer mit der Formiatfunktion an C3 (die *trans*-Kopplungskonstante  $J(\text{H}_1, \text{H}_2)$  beträgt 2.1 Hz). Die spektroskopischen Daten der Verbindungen **2**, **9**, **11** und **15** sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Die Fragmentierungsreaktion ist unabhängig von der Ringgröße, da mit Furanose- und Pyranosesubstraten vergleichbare Ausbeuten erzielt wurden (vergleiche Ansätze 7 und 8 mit 9 sowie 10 mit 11).

Das Bemerkenswerte der hier beschriebenen Reaktion ist unserer Ansicht nach: die milden Reaktionsbedingungen, die die in der Kohlenhydratchemie üblichen Schutzgruppen intakt lassen, die Regioselektivität der Fragmentierung und die Tatsache, daß der Reaktionsverlauf von der Konfiguration an C2, den vorhandenen Schutzgruppen und der Ringgröße unabhängig ist. Das Erzeugen der Formiatfunktion und der maskierten Aldehydfunktion ist von großem Wert, da diese Gruppen eine vielseitige Anwendung der chiralen Bausteine ermöglichen. Diese Umsetzung ist auch eine geeignete Methode, um Aldosereihen in Kohlenhydraten abzubauen, und ist mit den bekannten Methoden vergleichbar<sup>[6]</sup>.

#### Arbeitsvorschrift

Eine Lösung von 5-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2,3-*O*-isopropyliden-D-ribofuranose **1** [9] (100 mg, 0.33 mmol), (Diacetoxylod)benzol (127 mg, 0.39 mmol) und Iod (84 mg, 0.33 mmol) in wasserfreiem Cyclohexan (10 mL) wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend in Wasser gegossen und mit Ether extrahiert. Die organische Phase wurde mit wäßriger Natriumthiosulfat-Lösung und Wasser gewaschen. Nach chromatographischer Trennung des Rückstands (Chromatotron, Merck Kieselgel 60 PF 254, *n*-Hexan/Ethylacetat (9:1, v/v)) wurde **2** (99 mg, 84%) erhalten.

Eingegangen am 2. Dezember 1991 [Z 5049]

#### CAS-Registry-Nummern:

**1**, 68703-51-5; **2**, 141062-52-4; **3** ( $\alpha$ -Anomer), 89615-45-2; **3** ( $\beta$ -Anomer), 89361-52-4; **4**, 141062-53-5; **5**, 37776-25-3; **6**, 77870-89-4; **8**, 141062-54-6; **9**, 141062-55-7; **10**, 65236-75-1; **11**, 141062-56-8; **12**, 38768-81-9; **13**, 141062-57-9; **14**, 40036-82-6; **15**, 141062-58-0; (Diacetoxylod)benzol, 3240-34-4; Iod, 7553-56-2.

Tabelle 2. Spektroskopische Daten der Verbindungen **2**, **9**, **11** und **15**. IR ( $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR (200 bzw. 50.3 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS), Zuordnung durch DEPT,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY und  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HETCOR.

**2**:  $[\alpha]_D^{25} = -33$  ( $c = 0.18$ ,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$ -NMR:  $\delta = 0.05$  (s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.88 (s, 9H,  $\text{Si}(\text{C}(\text{CH}_3)_3)$ ), 1.45 (s, 3H, Isopropyliden- $\text{CH}_3$ ), 1.48 (s, 3H, Isopropyliden- $\text{CH}_3$ ), 2.09 (s, 3H, CO- $\text{CH}_3$ ), 3.78 (dd,  $J = 4.67$ , 11.32 Hz, 1H, C4- $\text{H}_a$ ), 3.85 (dd,  $J = 4.07$ , 11.35 Hz, 1H, C4- $\text{H}_b$ ), 4.42 (dd,  $J = 2.31$ , 5.30 Hz, 1H, C2- $\text{H}$ ), 5.09 (Pseudo-q, 1H, C3- $\text{H}$ ), 6.31 (d,  $J = 1.96$  Hz, 1H, C1- $\text{H}$ ), 8.10 (s, 1H, OCOH);  $^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta = -5.57$  und  $-5.49$  ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), 18.23 ( $\text{Si}(\text{C}(\text{CH}_3)_3)$ ), 21.18 (CO- $\text{CH}_3$ ), 25.82 ( $\text{Si}(\text{C}(\text{CH}_3)_3)$ ), 26.59 (Isopropyliden- $\text{CH}_3$ ), 27.22 (Isopropyliden- $\text{CH}_3$ ), 61.35 (C4), 72.75 (C3), 80.51 (C2), 95.90 (C1), 112.77 (Isopropyliden-C), 159.99 (OCO), 169.95 (CO- $\text{CH}_3$ ); IR:  $\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1}) = 1729$ . FAB-MS (NaI):  $m/z$  385 ( $[M + \text{Na}]^+$ , 15%).

**9**:  $[\alpha]_D^{25} = -25$  ( $c = 0.24$ ,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$ -NMR:  $\delta = 2.07$  (s, 3H, CO- $\text{CH}_3$ ), 2.13 (s, 3H, CO- $\text{CH}_3$ ), 3.31 (dd,  $J = 6.29$ , 11.17 Hz, 1H, C1- $\text{H}_a$ ), 3.44 (dd,  $J = 4.25$ , 11.19 Hz, 1H, C1- $\text{H}_b$ ), 4.22 (dd,  $J = 5.84$ , 12.4 Hz, 1H, C4- $\text{H}_a$ ), 4.37 (dd,  $J = 3.24$ , 12.45 Hz, 1H, C4- $\text{H}_b$ ), 5.01 (m, 1H, C2- $\text{H}$ ), 5.35 (m, 1H, C3- $\text{H}$ ), 8.08 (s, 1H, OCOH);  $^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta = 2.25$  (C1), 20.54 (CO- $\text{CH}_3$ ), 20.69 (CO- $\text{CH}_3$ ), 61.34 (C4), 69.98 (C2), 71.18 (C3), 159.26 (OCO), 169.41 (CO- $\text{CH}_3$ ), 170.24 (CO- $\text{CH}_3$ ); IR:  $\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1}) = 1737$ . FAB-MS (Glycerin, NaCl, NaI):  $m/z$  345 ( $[M + \text{H}]^+$ , 24%).

**11**:  $[\alpha]_D^{25} = -22$  ( $c = 0.16$ ,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$ -NMR:  $\delta = 1.39$  (s, 3H, Isopropyliden- $\text{CH}_3$ ), 1.50 (s, 3H, Isopropyliden- $\text{CH}_3$ ), 3.18 (dd,  $J = 6.37$ , 10.6 Hz, 1H, C1- $\text{H}_a$ ), 3.25 (dd,  $J = 7.15$ , 10.22 Hz, 1H, C1- $\text{H}_b$ ), 4.16–4.55 (m, 4H, C2- $\text{H}$ , C3- $\text{H}$ , C4- $\text{H}_a$ ), 8.11 (s, 1H, OCOH);  $^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta = 0.67$  (C1), 25.43 (Isopropyliden- $\text{CH}_3$ ), 27.97 (Isopropyliden- $\text{CH}_3$ ), 61.71 (C4), 74.77 (C3), 77.55 (C2), 109.95 (Isopropyliden-C), 160.38 (OCO); IR:  $\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1}) = 1725$ ; FAB-MS (NaI):  $m/z$  323 ( $[M + \text{Na}]^+$ , 40%).

**15**:  $[\alpha]_D^{25} = -47$  ( $c = 0.18$ ,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$ -NMR:  $\delta = 1.25$  (s, 3H, Isopropyliden- $\text{CH}_3$ ), 1.35 (s, 3H, Isopropyliden- $\text{CH}_3$ ), 1.50 (s, 6H, 2  $\times$  Isopropyliden- $\text{CH}_3$ ), 2.09 (CO- $\text{CH}_3$ ), 3.86 (dd,  $J = 5.79$ , 8.76 Hz, 1H, C5- $\text{H}_a$ ), 4.06 (dd,  $J = 6.15$ , 8.73 Hz, 1H, C5- $\text{H}_b$ ), 4.27 (Pseudo-q, C4- $\text{H}$ ), 4.48 (dd,  $J = 2.82$ , 2.55 Hz, 1H, C2- $\text{H}$ ), 5.29 (dd,  $J = 3.22$ , 6.92 Hz, 1H, C3- $\text{H}$ ), 6.11 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, C1- $\text{H}$ ), 8.15 (s, 1H, OCOH);  $^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta = 21.08$  (CO- $\text{CH}_3$ ), 25.21 (Isopropyliden- $\text{CH}_3$ ), 26.43 (Isopropyliden- $\text{CH}_3$ ), 26.70 (Isopropyliden- $\text{CH}_3$ ), 27.03 (Isopropyliden- $\text{CH}_3$ ), 66.15 (C5), 71.05 (C3), 74.04 (C4), 81.29 (C2), 96.67 (C1), 109.72 (Isopropyliden-C), 113.58 (Isopropyliden-C), 159.91 (OCO), 170.06 (CO- $\text{CH}_3$ ); IR:  $\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1}) = 1732$ . FAB-MS (Glycerin, NaCl):  $m/z$  317 ( $[M - \text{H}]^+$ , 8%).

- [1] S. Hanessian, *Total Synthesis of Natural Products. The Chiron Approach*, Pergamon, Oxford, **1983**; S. Hanessian, G. Rauncourt, *Pure Appl. Chem.* **1977**, *49*, 1201; B. Fraser-Reid, T. F. Tom, K. M. Sun in *Organic Synthesis, Today and Tomorrow* (Hrsg.: B. M. Trost, C. R. Hutchinson), Pergamon, Oxford, **1981**; T. D. Inch, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 3161–3213; K. L. Bhat, S.-Y. Chen, M. M. Joullie, *Heterocycles* **1985**, *23*, 691–729; *Trends in Synthetic Carbohydrate Chemistry* (Hrsg.: D. Horton, L. D. Hawkins, G. J. McGarvey), American Chemical Society, Washington, **1989**.
- [2] T. Hudlicky, H. Luna, J. D. Price, F. Rulin, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4053–4054; B. R. Baker, K. Hewson, *J. Org. Chem.* **1957**, *22*, 966; A. S. Perlin, *Methods Carbohydr. Chem.*, Vol. 1, **1962**, S. 67; M. Kiso, A. Hasegawa, *Carbohydr. Res.* **1976**, *52*, 95; C. E. Ballou, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 165; T. Mukaiyama, K. Suzuki, T. Yamada, F. Tabusa, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 265–276; T. Mukaiyama, K. Suzuki, T. Yamada, *Chem. Lett.* **1982**, 929–932.
- [3] D. R. Williams, F. D. Klingler, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2134–2136; G. Stork, S. Raucher, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1583–1584; P. T. Ho, *Can. J. Chem.* **1980**, *58*, 858–860.
- [4] R. Freire, R. Hernández, M. S. Rodríguez, E. Suárez, A. Perales, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 981–984; C. G. Francisco, R. Freire, M. S. Rodríguez, E. Suárez, *ibid.* **1987**, *28*, 3397–3400; R. Hernández, J. J. Marrero, E. Suárez, *ibid.* **1988**, *29*, 5979–5982; R. Hernández, J. J. Marrero, D. Melián, E. Suárez, *ibid.* **1988**, *29*, 6661–6664; R. Hernández, J. J. Marrero, E. Suárez, *ibid.* **1989**, *30*, 5501–5504.
- [5] R. Freire, J. J. Marrero, M. S. Rodríguez, E. Suárez, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 383–387; M. T. Arencibia, R. Freire, A. Perales, M. S. Rodríguez, E. Suárez, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 3349–3360.

- [6] L. Hough, A. C. Richardson in *The Carbohydrates*, Vol. 1A (Hrsg.: W. Pigman, D. Horton), 2. Aufl., Academic Press, San Diego, 1972, S. 127–138.
- [7] A. S. Perlin in *The Carbohydrates* Vol. 1B (Hrsg.: W. Pigman, D. Horton), 2. Aufl., Academic Press, New York, 1980, S. 1167–1215.
- [8] Y. Nakahara, K. Beppu, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 3197–3200; M. Kinoshita, A. Hagiwara, S. Aburaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1975**, 48, 570; M. Kinoshita, S. Mariyama, *ibid.* **1975**, 48, 2081; S. Aburaki, N. Konishi, M. Kinoshita, *ibid.* **1975**, 48, 1254; H. R. Schuler, K. Slessor, *Can. J. Chem.* **1977**, 55, 3280; J. P. H. Verheyden, A. C. Richardson, R. S. Bhatt, B. D. Grant, W. L. Fitch, J. G. Moffatt, *Pure Appl. Chem.* **1978**, 51, 1363.
- [9] B. Kaskar, G. L. Heise, R. S. Michalak, B. R. Vishnuvajjala, *Synthesis* **1990**, 1031–1032.
- [10] L. Chan, G. Just, *Tetrahedron* **1990**, 46, 151–162.
- [11] E. J. Corey, A. Marfat, G. Goto, F. Brion, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 7984–7985.

## Enzymatische Oxidation von Methylgruppen an Heteroarenen: eine vielseitige Methode zur Herstellung heteroaromatischer Carbonsäuren\*\*

Von Andreas Kiener\*

Die chemische Oxidation von Heteroarenen, die mit einer oder mehreren Methylgruppen substituiert sind, zur industriellen Herstellung von heteroaromatischen Monocarbonsäuren führt oft zur Bildung unerwünschter Nebenprodukte. Um dieses Problem zu umgehen, waren wir an der Entwicklung einer biologischen Oxidationsmethode interessiert. Obwohl enzymatische Oxidationen an Alkylseitenketten von Heteroarenen mit Bakterien und Pilzen bekannt sind<sup>[1]</sup>, wurden bisher keine dieser Biotransformationen zur Herstellung von Heteroarencarbonsäuren oder deren Hydroxymethylderivaten angewendet. Hier wird eine vielseitige enzymatische Methode zur selektiven Oxidation einer einzelnen Methylgruppe an Heteroarenen beschrieben, die schon im Pilotmaßstab durchgeführt werden konnte.

In unseren Experimenten wurde der Wildtypstamm *Pseudomonas putida* ATCC 33015 als Biokatalysator verwendet. Dieser Mikroorganismus kann auf Toluol, *p*-Xylol oder *m*-Xylol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen<sup>[2]</sup>. Der Xylolabbau wurde sowohl biochemisch<sup>[3, 4]</sup> als auch genetisch<sup>[5, 6]</sup> eingehend untersucht. *p*-Xylol beispielsweise wird durch die Xylol-Monooxygenase zu 4-Methylbenzylalkohol oxidiert. Anschließend findet eine Weiteroxidation zu 4-Methylbenzoesäure statt; diese Reaktion wird durch die Benzylalkohol- und Benzylaldehyd-Dehydrogenase katalysiert. Diese aromatische Carbonsäure wird durch die Toluat-Dioxygenase und die Dihydroxycyclohexadiencarboxylat-Dehydrogenase in 4-Methylbrenzcatechin überführt, bevor die Catechol-Dioxygenase den aromatischen Ring spaltet. Das Spaltprodukt wird anschließend zu Zwischenverbindungen des Krebs-Cyclus umgewandelt und dort eingeschleust. Untersuchungen zur Substratspezifität der Schlüsselenzyme des Xylolabbaues konzentrierten sich hauptsächlich auf substituierte aromatische Kohlenstoffverbindungen<sup>[7]</sup>. Nur wenige Arbeiten befaßten sich mit der Oxidation von Heteroarenen. Als Beispiel sei die bakterielle Bildung von Indigo durch Hydroxylierung von Indol genannt, welche durch die Xylol-Monooxygenase<sup>[8]</sup> katalysiert wird.

[\*] Dr. A. Kiener  
Forschungsabteilung Biotechnologie  
Lonza AG  
CH-3930 Visp (Schweiz)

[\*\*] Ich danke R. Glöckler und K. Heinzmann für Mitarbeit und Dr. M. Bockel und Dr. M. Hauck für die Analysen der Oxidationsprodukte. Fermentationen im Pilotmaßstab wurden von Dr. M. Rohner durchgeführt.

Es konnte nun gezeigt werden, daß *P. putida* nach Anzucht auf *p*-Xylol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle methylierte fünf- und sechsgliedrige Heteroarene zur entsprechenden Monocarbonsäure oxidiert (Tabelle 1). Die Oxidationsprodukte wurden im Fermentationsüberstand angereichert und anschließend isoliert. In den meisten Fällen wurde die heteroaromatische Carbonsäure nicht weiter abgebaut, was darauf hinweist, daß aromatische Heterocyclen ungenügende Substrate für die Toluat-Dioxygenase sind (kein Heterocyclus diente *P. putida* als Wachstumssubstrat). Wie in Tabelle 1 gezeigt wird, waren die Biotransformationen an 2,3,6-Trimethylpyrazin und 3-Chlor-2,5-dimethylpyrazin regiospezifisch. Dies war nicht unerwartet, da bekannt ist, daß Substituenten in *ortho*-Position die Methylgruppe vor einer Hydroxylierung durch die Xylol-Monooxygenase schützen<sup>[6]</sup>. Das Oxidationsprodukt von 2,4-Dimethylpyridin setzte sich hingegen aus einer Mischung von 2-Methylpyridin-4- und 4-Methylpyridin-2-carbonsäure zusammen. Die Bildung von 6-Chlor-5-ethylpyridin-2-carbonsäure aus 2-Chlor-3-ethyl-6-methylpyridin zeigte, daß die enzymatische Oxidation für die Methylgruppe spezifisch ist. Bei allen Versuchen konnte weder die Bildung von Dicarbonsäuren noch die direkte Hydroxylierung des heteroaromatischen Rings beobachtet werden.

Tabelle 1. Bildung von heteroaromatischen Carbonsäuren aus methylierten Heteroarenen mit *p*-Xylol-gezogenen Zellen von *Pseudomonas putida* ATCC 33015.

Ausgangsverbindungen	Produkte	Ausb. [%]
2,5-Dimethylpyrrol	5-Methylpyrrol-2-carbonsäure	40
3,5-Dimethylpyrazol	5-Methylpyrazol-3-carbonsäure	80
2,5-Dimethylfuran	5-Methylfuran-2-carbonsäure	40
3-Methylthiophen	Thiophen-3-carbonsäure	70
4-Methylthiazol	Thiazol-4-carbonsäure	80
3-Methylpyridin	Pyridin-3-carbonsäure	50
2-Chlor-6-methylpyridin	6-Chlorpyridin-2-carbonsäure	90
2-Chlor-3-ethyl-6-methylpyridin	6-Chlor-5-ethylpyridin-2-carbonsäure	10
2,4-Dimethylpyridin	2-Methylpyridin-4-carbonsäure (90%) 4-Methylpyridin-2-carbonsäure (10%)	40
2,5-Dimethylpyrazin	5-Methylpyrazin-2-carbonsäure	90
2,3,6-Trimethylpyrazin	5,6-Dimethylpyrazin-2-carbonsäure	90
3-Chlor-2,5-dimethylpyrazin	6-Chlor-5-methylpyrazin-2-carbonsäure	90

Die Leistungsfähigkeit dieses Biokatalysators wurde im Detail mit 2,5-Dimethylpyrazin (DMP) untersucht. Das Oxidationsprodukt, 5-Methylpyrazin-2-carbonsäure (MPCA), ist ein Zwischenprodukt zur Herstellung von 5-Methylpyrazin-2-carbonsäure-4-oxid, ein Medikament mit antipolytischer Wirkung<sup>[9]</sup>. Die chemische Oxidation von DMP zu MPCA verläuft unbefriedigend<sup>[10]</sup>. Zellsuspensionen nicht wachsender Zellen, die mit mehr als 30 mM (3.2 g L<sup>-1</sup>) DMP versetzt wurden, zeigten eine Anhäufung von 2-Hydroxymethyl-5-methylpyrazin, welches nur teilweise zur entsprechenden Säure oxidiert wurde. Hingegen lieferten Biotransformationen mit wachsenden Zellen hohe Produktkonzentrationen bei guten Ausbeuten. Dazu wurde für präparative Ansätze eine Mischung von 75% (v/v) *p*-Xylol und 25% (v/v) DMP als Wachstumssubstrat vorgelegt. Abbildung 1 zeigt die Bildung von bis zu 20 g L<sup>-1</sup> MPCA während einer Wachstumszeit von 54 Stunden im 20 L-Maßstab. In der früheren Fermentationsphase wurde 2-Hydroxymethyl-5-methylpyrazin nachgewiesen. Die Biotransformation war beim Übergang des bakteriellen Wachstums in die stationäre Phase beendet (MPCA-Konzentrationen > 15 g L<sup>-1</sup> hemmen das Wachstum von *P. putida*). Bei Fermentationsende konnte MPCA als einziges Oxidationsprodukt von DMP durch HPLC im zellfreien Medium nachgewiesen werden.