

- [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.

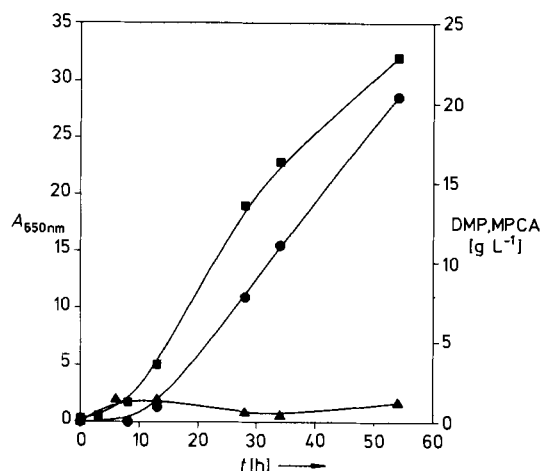


Abb. 1. Mikrobielle Oxidation von 2,5-Dimethylpyrazin (DMP) zu 5-Methylpyrazin-2-carbonsäure (MPCA). Absorption der Zellsuspension bei 650 nm ■; Konzentration von DMP ▲ und MPCA ●. Nach 52 h Wachstum wurde 100 % *p*-Xylol als Wachstumssubstrat eingesetzt.

Um zu prüfen, ob diese biologische Oxidationsmethode industriell anwendbar ist, wurden Biotransformationen bis zu einem Volumen von 1000 L mit einem leicht abgeänderten Fermentationsprozess durchgeführt. Die höchste Produktkonzentration betrug  $24 \text{ g L}^{-1}$  MPCA (bei einer Ausbeute > 95 %). Die Konzentration von DMP nach Beendigung der Fermentation lag bei  $< 0.1 \text{ g L}^{-1}$ . Es konnten keine Stoffwechselprodukte von *p*-Xylol im Medium festgestellt werden, die die Reinigung des Produktes erschweren hätten.

Zusammenfassend zeigen unsere Experimente, daß *P. putida* als Biokatalysator für die selektive Oxidation von Methylgruppen an Heteroarenen geeignet ist. Die Ausbeuten an entsprechenden Monocarbonsäuren und die Reaktionsbedingungen wurden nur im Falle von 2,5-Dimethylpyrazin optimiert. Um einen allgemein anwendbaren Prozeß zur biologischen Oxidation von Methylgruppen an aromatischen Heterocyclen zu entwickeln, konzentrieren wir uns nun auf die Gewinnung von Mutanten, die einen Defekt im Xylolabbauweg aufweisen, um somit einen weiteren Abbau von bestimmten Heteroarenen zu verhindern. Weiterhin soll eine Inaktivierung der Benzylalkohol-Dehydrogenase erreicht werden, um auch hydroxymethylierte Verbindungen herstellen zu können.

#### Experimentelles

Startkulturen von *P. putida* wurden in 300 mL-Erlenmeyerkolben mit 100 mL Mineralsalzmedium (H. G. Kulla, F. Klausener, U. Meyer, B. Lüdeke, T. Leisinger, *Arch. Microbiol.* **1983**, *135*, 1-7) angezogen. In den Kolben wurde ein 10 mL-Polypropylenröhrchen mit 1 mL *p*-Xylol als Kohlenstoffquelle gestellt. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C auf einem Schüttler. Das unter diesen Bedingungen verdampfende Xylol war für das Zellwachstum ausreichend. Für Fermentationen im größeren Maßstab (20–1000 L) wurde Xylol direkt zum Medium zugegeben. Die Xylolkonzentration im Fermenter wurde durch Absorptionsmessung der Fermenterabluft bei 214 nm (ISCO UA 5 Absorptionsdetektor; ISCO, P.O. Box 5347, Lincoln, NE 68505, USA) bestimmt. Das elektronische Signal des Detektors wurde mit einer Dosierpumpe für Xylol so gekoppelt, daß die Konzentration des Wachstumssubstrates im Bereich von 0.1 mM lag. Die besten Transformationsraten wurden unter substratlimitierenden Bedingungen beobachtet. Für Biotransformationen im kleinen Maßstab wurden mit *p*-Xylol gezogene Zellen von *P. putida* in 20 mL Mineralsalzmedium ( $A_{650 \text{ nm}} = 10$ ) bis zu einer Konzentration von 10 mM mit den entsprechenden Heterocyclen versetzt und in verschlossenen 300 mL-Erlenmeyerkolben inkubiert, so daß die leichtflüchtigen Verbindungen nicht entweichen konnten. Die Inkubation erfolgte während 16 h bei 30 °C auf einem Schüttler. Für die Biotransformation wurde kein Xylol zugesetzt. Die Konzentration der Oxidationsprodukte im zellfreien Überstand wurde dünnstichtchromatographisch bestimmt. Bei unvollständigen Umsetzungen konnte in den meisten Fällen außer dem Oxidationsprodukt nur das Ausgangsmaterial nachgewiesen werden.

Eingegangen am 4. Dezember 1991 [Z 5057]

CAS-Registry-Nummern:

2,5-Dimethylpyrrol, 625-84-3; 3,5-Dimethylpyrazol, 67-51-6; 2,5-Dimethylfuran, 625-86-5; 3-Methylthiophen, 616-44-4; 4-Methylthiazol, 693-95-8; 3-Methylpyridin, 108-99-6; 2-Chlor-6-methylpyridin, 18368-63-3; 2-Chlor-3-ethyl-6-methylpyridin, 138538-40-6; 2,4-Dimethylpyridin, 108-47-4; 2,5-Dimethylpyrazin, 123-32-0; 2,3,6-Trimethylpyrazin, 14667-55-1; 3-Chlor-2,5-dimethylpyrazin, 95-89-6; 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure, 3757-53-7; 5-Methylpyrazol-3-carbonsäure, 402-61-9; 5-Methylfuran-2-carbonsäure, 1917-15-3; Thiophen-3-carbonsäure, 88-13-1; Thiazol-4-carbonsäure, 3973-08-8; Pyridin-3-carbonsäure, 59-67-6; 6-Chlorpyridin-2-carbonsäure, 4684-94-0; 6-Chlor-5-ethylpyridin-2-carbonsäure, 138538-41-7; 2-Methylpyridin-4-carbonsäure, 4021-11-8; 4-Methylpyridin-2-carbonsäure, 4021-08-3; 5-Methylpyrazin-2-carbonsäure, 5521-55-1; 5,6-Dimethylpyrazin-2-carbonsäure, 13515-06-5; 6-Chlor-5-methylpyrazin-2-carbonsäure, 138538-39-3.

- [1] K. Kieslich, *Microbial Transformations*, Thieme, Stuttgart, **1976**, S. 292–523.
- [2] D. T. Gibson, *Microbial Degradation of Organic Compounds*, Marcel Dekker, New York, **1984**.
- [3] S. Harayama, M. Rekik, M. Wubbolds, K. Rose, R. A. Leppik, K. N. Timmis, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 5048–5055.
- [4] J. P. Shaw, S. Harayama, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *191*, 705–714.
- [5] S. J. Assinder, P. A. Williams, *Adv. Microb. Physiol.* **1990**, *31*, 1–69.
- [6] M.-A. Abril, C. Michan, K. N. Timmis, J. L. Ramos, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 6782–6790.
- [7] M. G. Wubbolds, K. N. Timmis, *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 569–571.
- [8] N. Mermod, S. Harayama, K. N. Timmis, *Biotechnology*, **1986**, *4*, 321–324.
- [9] P. P. Lovisolo, G. Briatico-Vangosa, G. Orsini, R. Ronchi, R. Angelucci, *Pharmacol. Res. Commun.* **1981**, *13*, 151–161.
- [10] G. P. Borsotti, M. Foa, N. Gatti, *Synthesis*, **1990**, 207–208.

#### Ursache der Stabilisierung von Vinylidiazonium-Ionen durch $\beta$ -Substitution; erste Kristallstrukturanalyse einer aliphatischen Diazoniumverbindung: $\beta,\beta$ -Diethoxyethendiazonium-hexachloroantimonat\*\*

Von Rainer Glaser\*, Grace Shiahuy Chen und Charles L. Barnes

Professor Andrew Streitwieser zum 65. Geburtstag gewidmet

Aliphatische Diazonium-Ionen sind im Gegensatz zu aromatischen Diazonium-Ionen hochreaktive Zwischenstufen, die zur spontanen  $\text{N}_2$ -Abspaltung neigen<sup>[1,2]</sup>, was ihre vollständige Charakterisierung sehr erschwert. Aliphatische Diazonium-Ionen sind in superaciden Medien<sup>[3]</sup> und in der Gasphase<sup>[4]</sup> beobachtet worden. Alkandiazonium-Ionen konnten auch durch Übergangsmetalle stabilisiert werden, jedoch sind die Diazonium-Ionen in diesen Komplexen gewinkelt und von den freien Ionen völlig verschieden<sup>[5]</sup>. Bott fand, daß  $\beta,\beta$ -disubstituierte Ethendiazonium-Ionen im Gegensatz zur Stammverbindung<sup>[2]</sup> außergewöhnlich beständig sind<sup>[6]</sup>, was auf die Resonanzstabilisierung durch die  $\beta$ -Substituenten zurückgeführt wurde. Bertrand et al. haben kürzlich über die Alkylierung eines Diazomethylenphosphorans berichtet, bei der stabile  $\text{C}_\beta$ -P-Analoga von Ethendiazonium-Ionen entstehen, die sich am besten als Phosphoniumsubstituierte Diazoalkane beschreiben lassen<sup>[7]</sup>.

Wir berichten nun über die erste Kristallstrukturanalyse eines aliphatischen Diazonium-Ions, des  $\beta,\beta$ -Diethoxyethendiazonium-Ions **1** in  $1\text{-SbCl}_6$ . Diese experimentellen Daten ermöglichen nun zum ersten Mal, die Qualität berechneter

[\*] Prof. Dr. R. Glaser, G. S. Chen, Dr. C. L. Barnes  
Department of Chemistry, University of Missouri  
Columbia, MO 65211 (USA)

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Petroleum Research Fund der American Chemical Society und vom Research Council der University of Missouri (92-RC-023-BR) gefördert. Die Beschaffung der Röntgengeräte und des Bruker-500 MHz-NMR-Spektrometers wurde durch Mittel der National Science Foundation (CHE 90-11804 und CHE 89-08304) ermöglicht.