

sind kostenlos über [www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html](http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html) erhältlich (oder können bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: Cambridge Crystallographic Data Centre, 12, Union Road, Cambridge CB2 1EZ; Fax: (+44) 1223-336-033; oder deposit @ccdc.cam.ac.uk).

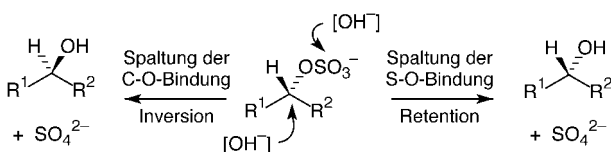
- [15] K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **1993**, *26*, 1787–1788.  
 [16] R. O'Dell, D. H. McConville, G. E. Hofmeister, R. R. Schrock, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3414–3423.  
 [17] R. R. Schrock, *Polyhedron* **1995**, *14*, 3177–3195.  
 [18] J. H. Oskam, R. R. Schrock, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7588–7590; J. H. Oskam, R. R. Schrock, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11831–11845.  
 [19] R. Schlund, R. R. Schrock, W. E. Crowe, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8004–8006; R. R. Schrock, W. E. Crowe, G. C. Bazan, M. DiMare, M. B. O'Regan, M. H. Schofield, *Organometallics* **1991**, *10*, 1832–1043.  
 [20] J. H. Oskam, H. H. Fox, K. B. Yap, D. H. McConville, R. O'Dell, B. J. Lichtenstein, R. R. Schrock, *J. Organomet. Chem.* **1993**, *459*, 185–197.

## Enantioselektive Stereoinversion in der kinetischen Racemattrennung von *rac-sec*-Alkylsulfatestern durch Hydrolyse mit Alkylsulfatase aus *Rhodococcus ruber* DSM 44541 liefert homochirale Produkte\*\*

Mateja Pogorevc, Wolfgang Kroutil, Sabine R. Wallner und Kurt Faber\*

Sulfatasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von Sulfatesterbindungen unter Freisetzung von anorganischem Sulfat und dem entsprechenden Alkohol.<sup>[1]</sup> Abhängig vom Enzymtyp und seines katalytischen Mechanismus, kann die enzymatische Hydrolyse von *sec*-Alkylsulfaten entweder unter Retention – unter Spaltung der S-O-Bindung – oder unter Inversion – unter Spaltung der C-O-Bindung – der Konfiguration am chiralen Kohlenstoffatom erfolgen (Schema 1).<sup>[2,3]</sup>

Die Fähigkeit von *sec*-Alkylsulfatasen, während der Katalyse ein Stereozentrum zu invertieren, macht sie zu idealen Kandidaten für den Einsatz in so genannten enantiokon-



Schema 1. Stereochemische Wege der enzymatischen Sulfatesterhydrolyse.

[\*] Prof. Dr. K. Faber, Mag. Dr. M. Pogorevc, Dipl.-Ing. Dr. W. Kroutil, Mag. S. R. Wallner  
 Institut für Organische und Bioorganische Chemie  
 Universität Graz  
 Heinrichstraße 28, A-8010 Graz (Österreich)  
 Fax: (+43) 316-380-9840  
 E-mail: Kurt.Faber@uni-graz.at

[\*\*] Wir danken der Degussa AG (Frankfurt) für die finanzielle Unterstützung und T. Riermeier und H. Trauthwein für ihre wertvollen Beiträge.

vergenten Prozessen.<sup>[4]</sup> Solche Prozesse ermöglichen die Transformation von Enantiomerenpaaren in gegenläufiger Stereochemie zu einem einzigen stereoisomerenreinen Produkt in 100 % theoretischer Ausbeute. Andere Enzyme, die diese Fähigkeit aufweisen, sind a) Epoxidhydrolasen,<sup>[5]</sup> b) Dehalogenasen<sup>[6]</sup> und c) Glycosidasen.<sup>[7]</sup> Bislang wurden einige wenige Alkylsulfatasen biochemisch untersucht und charakterisiert;<sup>[1]</sup> diese Enzyme fanden jedoch keine Anwendung in präparativen Biotransformationen.<sup>[8]</sup>

Im Rahmen eines Bakterienscreenings der Gattung *Actinomyces* mit *rac*-2-Octylsulfat als Substrat<sup>[9]</sup> wurden sieben aktive Stämme identifiziert, die das Substrat unter Bildung von 2-Octanol und anorganischem Sulfat hydrolysieren. Die Alkylsulfataseaktivität des aktivsten Stammes – *Rhodococcus ruber* DSM 44541 – wurde genauer untersucht:

- 1) Die *sec*-Alkylsulfataseaktivität war konstitutiv in Bezug auf Substratinduktion und war in ruhenden Zellen vorhanden, die auf einem komplexen Medium gezüchtet wurden.<sup>[5a]</sup>
- 2) Die Aktivität konnte durch Lyophilisieren aus Tris-HCl-Puffer (pH 7.5, 10 mM) und Aufbewahrung bei +4 °C über mehrere Monate aufrechterhalten werden.
- 3) Die Reaktion wurde von einem löslichen, monomeren Protein (genannt RS2) katalysiert, unabhängig von einem bekannten Cofaktor.<sup>[10]</sup>
- 4) Die Sulfatesterhydrolyse erfolgte unter Inversion des chiralen Zentrums. Mit enantiomerenreinem (*R*)-2- und (*R*)-3-Octylsulfat als Substrat wurden (*S*)-2- bzw. (*S*)-3-Octanol ohne Racemisierung mit einem Enantiomerenüberschuss > 99 % erhalten.
- 5) Um die Stereo- und Enantioselektivität dieser biokatalytischen Aktivität zu ermitteln, wurden sowohl Substrattoleranz als auch Enantioselektivität untersucht. Die Daten in Tabelle 1 zeigen einen klaren Trend: Das Enzym zeigte ausgezeichnete Regioselektivität bei *rac-sec*-Alkylsulfaten *rac*-**1a–d**<sup>[9]</sup> mittlerer Kettenlänge. Im Unterschied zur schnellen Umsetzung von *sec*-Alkylsulfaten konnte bei dem *prim*-Sulfatester **1e** keine Reaktion beobachtet werden. Die Enantioselektivität für Substrat **1b** – ausgedrückt als „Enantiomeric Ratio“ (*E*-Wert<sup>[11]</sup>) – war gut, da aufgrund des signifikanten Größenunterschiedes der Sub-

Tabelle 1. Stereoselektivitäten der enzymatischen Sulfatesterhydrolyse

Substrat	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Umsatz [%]	ee <sub>P</sub> [%]	Enantioselektivität ( <i>E</i> ) <sup>[11]</sup>
<i>rac</i> - <b>1a</b>	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	CH <sub>3</sub>	3.6	– <sup>[a]</sup>	–
<i>rac</i> - <b>1b</b>	<i>n</i> -C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	CH <sub>3</sub>	46	82	21
<i>rac</i> - <b>1c</b>	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	38	52	4.3
<i>rac</i> - <b>1d</b>	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	68	9	< 2
<b>1e</b>	<i>n</i> -C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	H	0	–	–
<i>rac</i> - <b>1c</b>	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	33	74	9.5 <sup>[b]</sup>
<i>rac</i> - <b>1c</b>	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	25	90	30 <sup>[c]</sup>
<i>rac</i> - <b>1c</b>	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	9	99	> 200 <sup>[d]</sup>

[a] Sehr langsame Reaktion. [b] Teilgereinigtes Enzym RS2 in Gegenwart von DEAE-Dextran (5 % (w/v)). [c] In Gegenwart von Cetyltrimethylammoniumbromid (0.2 % (w/v)). [d] In Gegenwart von Fe<sup>III</sup> (5 mM).

stituenten  $R^1$  und  $R^2$  der chirale Erkennungsprozess erleichtert ist. Etwas niedrigere Selektivitäten wurden bei der Verschiebung der funktionellen Gruppen in Richtung des Molekülzentrums beobachtet, wodurch die Ähnlichkeit der relativen Größe der Substituenten  $R^1$  und  $R^2$  immer mehr zunahm, und somit quasi-symmetrische Substrate **rac-1c,d** erhalten wurden.

- 6) Die Stereopräferenz war im Allgemeinen *R*, das bedeutet, dass *R*-konfigurierte Substratanantiomere unter Inversion der Konfiguration in die entsprechenden *S*-Alkohole überführt wurden, während *S*-Sulfatester unangetastet blieben.

Fast identische Resultate wurden mit lyophilisierten ganzen Zellen als Biokatalysatoren erhalten. Daraus konnte geschlossen werden, dass keine konkurrierende Alkylsulfatase (mit unterschiedlicher Enantioselektivität oder gegenläufiger Stereopräferenz) gegenwärtig ist. Um die niedrige Enantioselektivität für **rac-1c** ( $E=4.3$ ) zu erhöhen, wurden eine Reihe von Additiven getestet (wie Metallionen, Kohlenhydrate oder Detergentien), von denen bekannt ist, dass sie einen positiven Einfluss auf die chirale Erkennung von Enzymen ausüben können.<sup>[12]</sup> Modifizierte Polysaccharide (DEAE-Dextran,  $E=9.5$ ) und Detergentien (Cetyltrimethylammoniumbromid,  $E=30$ ) zeigten zwar einen positiven, aber begrenzten Effekt. Die Zugabe von Metallionen brachte hingegen den gewünschten Durchbruch: Eine drastische Selektivitätssteigerung wurde in Gegenwart von  $Fe^{III}$  (5 mM) erhalten. Der  $E$ -Wert von **rac-1c** stieg somit von 4.3 auf  $>200$ , allerdings begleitet von einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in *Rhodococcus ruber* DSM 44541 eine stereoselektive *sec*-Alkylsulfatase gefunden wurde, die unter Inversion der Konfiguration arbeitet. Die außergewöhnliche Eigenschaft dieser Biotransformation liegt in der Tatsache, dass – im Unterschied zu Lipase-, Esterase- und Protease-katalysierten Reaktionen – die Absolutkonfigurationen des gebildeten Produktes und des zurückbleibenden nicht-umgesetzten Substrates identisch sind und dieser Prozess ausgehend von einem Racemat zu homochiralen *S*-konfigurierten Produkten führt. Dies ist ein wichtiger Schritt zur Deracemisierung von *sec*-Alkoholen mittels stereo- und enantioselektiver Biohydrolyse der entsprechenden Sulfatester.

### Experimentelles

Substratsynthese: Alkylsulfate **1a–e** wurden durch Sulfatierung des entsprechenden Alkohols mit  $NEt_3SO_3$  nach einer bekannten Vorschrift hergestellt.<sup>[9]</sup> Auf gleiche Weise wurden (*R*)-2- und (*R*)-3-Octylsulfat aus (*R*)-2- bzw. (*R*)-3-Octanol hergestellt.

Screening nach Alkylsulfatase-Aktivität: Lyophilisierte Zellen (50 mg)<sup>[5a]</sup> wurden in Tris-Puffer (pH 7.5, 0.1 M, 0.6 mL) 0.5 h lang rehydratisiert, **rac**-2-Octylsulfat-Lösung wurde zugegeben (Endkonzentration 22 mM, Gesamtvolumen 0.8 mL) und die Reaktionsgefäße wurden 5 Tage bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Umsatz wurde mit GC-Analyse nach Extraktion des gebildeten Alkohols mit Ethylacetat und unter Verwendung von Menthol als internen Standard bestimmt. Die Abwesenheit von nicht-enzymatischer Spontanhydrolyse wurde durch Blindexperimente – unter Abwesenheit des Enzyms – für alle Substrate bestätigt. Bei der Verwendung von ganzen Zellen wurden aufgrund der biochemischen Oxidation von 2-Octanol kleine Mengen 2-Octanon als Nebenprodukt gebildet.

Bestimmung der Enantiomerenzusammensetzung: Die Alkohole **2a–d** wurden als entsprechende Trifluoracetat-Derivate  $[(CF_3CO)_2O/EtOAc/60^\circ C/20\text{ min}]$  mit GC [Chrompack CP7500 (Cyclodextrin-B-2, 25 m  $\times$  0.25 mm, 25  $\mu$ m film); Chirasil-Dex CB/G-PN (Propionyl- $\gamma$ -cyclodextrin, 30 m  $\times$  0.32 mm;  $H_2$ )] analysiert. Die Absolutkonfiguration wurde durch Koinjektion einer unabhängigen Referenzprobe bestimmt.

Teilweise Reinigung der *Rhodococcus*-Sulfatase (RS2): Nach Aufbrechen der Zellen mittels Zelmühle wurden die zellfreien Extrakte mittels HIC-Säule (Phenyl Sepharose, Pharmacia) über einen Stufengradienten fraktioniert. Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt und lyophilisiert.

Eingegangen am 17. Januar 2002,  
veränderte Fassung am 16. Juli 2002 [Z18535]

- [1] K. S. Dodgson, G. F. White, J. W. Fitzgerald, *Sulfatases of Microbial Origin*, CRC Press, Boca Raton, **1982**.
- [2] B. Spencer, *Biochem. J.* **1958**, *69*, 155–159.
- [3] B. Bartholomew, K. S. Dodgson, G. W. J. Matcham, D. J. Shaw, G. F. White, *Biochem. J.* **1977**, *165*, 575–580.
- [4] K. Faber, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 5004–5010.
- [5] Zur Deracemisierung von Epoxiden: a) W. Kroutil, M. Mischitz, K. Faber, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 3629–3636; b) R. V. A. Orru, S. F. Mayer, W. Kroutil, K. Faber, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 859–874.
- [6] Zu stereochemischen Aspekten der Katalyse von Dehalogenasen: D. J. Hardman, *Crit. Rev. Biotechnol.* **1991**, *11*, 1–40.
- [7] Zu invertierenden Glycosidasen: M. L. Sinnott, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1171–1202.
- [8] Zur Anwendung einer Arylsulfatase an achiralen Substraten: G. Pelsy, A. M. Klivanov, *Biotechnol. Bioeng.* **1983**, *25*, 919–928.
- [9] G. F. White, V. Lillis, D. J. Shaw, *Biochem. J.* **1980**, *187*, 191–196.
- [10] M. Pogorevc, K. Faber, *Biochem. J.*, eingereicht.
- [11] Berechnet aus dem Enantiomerenüberschuss des Produktes ( $ee_p$ ) und dem Umsatz ( $c$ ); C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294–7299.
- [12] Übersichtsartikel zur Selektivitäts-Steigerung von biokatalytischen Reaktionen: K. Faber, G. Ottolina, S. Riva, *Biocatalysis* **1993**, *8*, 91–132.

## Ein neuer Syntheseweg zu enantiomerenreinen Jasmonoiden\*\*

Martin Ernst und Günter Helmchen\*

Professor Volker Jäger zum 60. Geburtstag gewidmet

12-Oxophytodiensäure (12-OPDA) **1** ist der im Pflanzenreich ubiquitäre Biosynthesevorläufer für die Jasmonoide **2–7**, die in der so genannten Octadecanoid-Kaskade aus **1** gebildet werden und als Signalstoffe an vielen Prozessen im pflanzlichen Organismus beteiligt sind.<sup>[1]</sup> 12-OPDA **1** selbst wird aus Linolensäure durch oxidative Cyclisierung gebildet. 1997 wurde mit Dinoroxophytodiensäure **8** ein Hexadecanoid gefunden, das analog **1** aus Hexadecatriensäure entsteht und ebenfalls ausgeprägte biologische Aktivität zeigt.<sup>[2]</sup>

[\*] Prof. Dr. G. Helmchen, M. Ernst  
Organisch-Chemisches Institut der Universität Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 271, 69120 Heidelberg  
Fax: (+49) 6221-54-4205  
E-mail: g.helmchen@urz.uni-heidelberg.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie durch Sachmittel und ein Kekulé-Stipendium für M.E. unterstützt. Kerstin Brödner danken wir für engagierte Mitarbeit. Biologische Tests wurden im Arbeitskreis von Prof. E. Weiler, Bochum, von Dipl.-Biol. C. Bockelmann durchgeführt, wofür wir uns bedanken.