

Synthesen mit einem chiralen Baustein aus dem Citratzyklus: (2*R*,3*S*)-Isocitronensäure aus einer Fermentation mit Sonnenblumenöl**

Philipp Heretsch, Franziska Thomas, Andreas Aurich, Harald Krautscheid, Dieter Sicker und Athanassios Giannis*

Der Citratzyklus ist einer der wichtigsten Stoffwechselprozesse. Seit seiner Formulierung im Jahr 1937 durch H. A. Krebs wurden alle Intermediate im Multigramm-Maßstab zugänglich gemacht – mit einer Ausnahme: der (2*R*,3*S*)-Isocitronensäure (**1**, *D_S*-*threo*-Isocitronensäure). Dabei wäre sie als neuer Vertreter des chiralen Pools eine interessante Ausgangsverbindung für die organische Synthese. Diese chirale α -Hydroxytricarbonsäure kommt zwar häufig vergesellschaftet mit ihrem Konstitutionsisomer, der Citronensäure (**2**), vor, doch gelang bisher die Trennung von **1** und **2** nur in analytischem Maßstab.

Es wurden einige Versuche zur Synthese der *ent*-Isocitronensäure (*ent*-**1**) unternommen, aus denen aber auch nur Milligramm-Mengen hervorgingen.^[1] Wegen ihrer geringen Verfügbarkeit findet (2*R*,3*S*)-Isocitronensäure (**1**) praktisch keine Anwendung in der Synthese. In Datenbanken sind bisher nur der (2*R*,3*S*)-Isocitronensäuretrimethylester (**3**), der (2*R*,3*S*)-Isocitronensäurelacton-2,3-dicarbonsäuredimethylester (**5**), die (2*R*,3*S*)-Isocitronensäurelacton-2,3-dicarbonsäure (**6**) sowie das (2*R*,3*S*)-Isocitronensäurelacton-2,3-dicarbonsäureanhydrid (**7**) lückenhaft beschrieben.^[2]

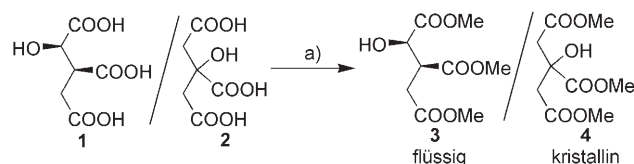
Erstaunlicherweise gab es bislang auch noch keinen Versuch einer fermentativen Gewinnung von **1**, obwohl eine Vielzahl an Hefen die Citronen- und (2*R*,3*S*)-Isocitronensäure in verschiedensten Verhältnissen aus langkettigen *n*-Alkanen oder Glucose produzieren und ausscheiden.^[3] Die Fermentation wurde bisher immer in Hinblick auf eine hohe Citratausscheidung optimiert.

Wir beschreiben hier eine Kombination aus umweltfreundlichen biotechnologischen und chemischen Verfahren, die Zugang zur enantiomerenreinen (2*R*,3*S*)-Isocitronensäure (**1**) und ihren Derivaten im Kilogramm-Maßstab bietet und

eine unverfälschte Anwendung des Konzepts der „weißen Biotechnologie für die grüne Chemie“ darstellt.^[4] Wir fanden, dass die thiaminauxotrophe Hefe *Yarrowia lipolytica* einen hohen Anteil an organischen Säuren erzeugt, wenn sie auf Pflanzenölen unter Thiaminüberschuss, stickstofflimitierten und aeroben Bedingungen wächst.^[5] Unser Ziel war ein möglichst hohes Isocitrat/Citrat-Verhältnis bei gleichzeitig hoher Isocitratkonzentration.

Es gelang uns, in einer Technikumskultivierung des Wildtypstammes *Y. lipolytica* EH59 auf raffiniertem Sonnenblumenöl eine Isocitratkonzentration von 93 g L⁻¹ bei einem 1/2-Verhältnis von 1.14:1 zu erhalten, ein zuvor unerreichtes Ergebnis; bemerkenswert ist auch, dass dieses Ergebnis auf der Basis nachwachsender Rohstoffe erzielt wurde. Nach Abfiltrieren der Biomasse erfolgte eine Elektrodialyse zur Überführung der erhaltenen Trinatriumsalze in die freien Säuren, bevor die Fermentationslösung unter vermindertem Druck entwässert wurde. Nun galt es, ein Verfahren zur Trennung der beiden Isomere zu finden.

Die Veresterung des sirupartigen Konzentrates beider Tricarbonsäuren lieferte ein Gemisch beider Triester, aus dem der Citronensäuretrimethylester **4** als farbloser Feststoff auskristallisierte. Der (2*R*,3*S*)-Isocitronensäuretrimethylester (**3**) kristallisierte jedoch nicht, da er unter Standardbedingungen flüssig ist. Diese bisher unbekannte Eigenschaft nutzten wir zur einfachen Trennung der isomeren Ester **3** und **4**, indem wir **4** von **3** abfiltrierten (Schema 1). Mit Blick auf



Schema 1. Veresterung des Fermentationskonzentrates: a) MeOH, 2,2-Dimethoxypropan, 10 Mol-% Trimethylsilylchlorid, 3 d, RT, 80–88 %.

die geplante Anwendung von **1** in der stereoselektiven Synthese sollte nun durch einfache Transformationen eine Vielzahl unterschiedlicher Synthesebausteine zugänglich gemacht werden. Dazu wurden zunächst die Möglichkeiten zur Differenzierung der drei Carboxygruppen untersucht. Die Bildung der Lactonstruktur in **5** und **6** gelang direkt aus **3**. Sowohl aus **5** wie auch aus **6** ließ sich die freie (2*R*,3*S*)-Isocitronensäure (**1**) als Stammverbindung gewinnen (Schema 2).

Das Anhydrid **7** von **6** erwies sich als Schlüsselverbindung in den nachfolgenden Transformationen. Eine selektive Öff-

[*] P. Heretsch, F. Thomas, Prof. Dr. D. Sicker, Prof. Dr. A. Giannis

Institut für Organische Chemie, Universität Leipzig
Johannisallee 29, 04103 Leipzig (Deutschland)

Fax: (+49) 341-973-6599

E-Mail: giannis@uni-leipzig.de

Prof. Dr. H. Krautscheid

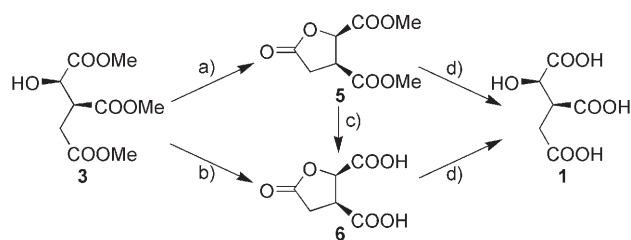
Institut für Anorganische Chemie, Universität Leipzig
Johannisallee 29, 04103 Leipzig (Deutschland)

Dr. A. Aurich

Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ
Umwelt- und Biotechnologisches Zentrum (UBZ)
Permoserstraße 15, 04318 Leipzig (Deutschland)

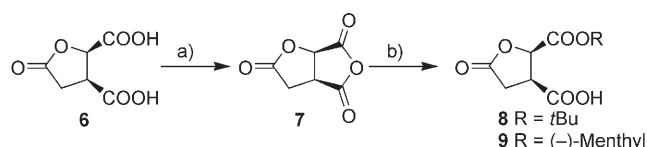
[**] P.H. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Promotionsstipendium.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



Schema 2. Umsetzung von **3**: a) 10 Mol-% *para*-Toluolsulfonsäure, Toluol, Rückfluss, 80 %; b) 4.0 M HCl, Rückfluss, 8 h, quant.; c) 1.0 M HCl, Rückfluss, 4 h, quant.; d) 3 Äquiv. NaOH, Amberlite IR-120, quant.

nung ausschließlich zu den an der C2-Position monoveresterten Derivaten **8** und **9** ermöglichte die differenzierte Modifizierung der Carboxygruppen (Schema 3). Der kristalline



Schema 3. Bildung von regioselektive Öffnung von **7**: a) Ac_2O , 160 °C, 15 min, 85 %; b) für **8**: wasserfreies *t*BuOH, Rückfluss, 15 h, quant.; für **9**: (1*R*,2*S*,5*R*)-(-)-Menthol, 100 °C, 36 h, 27 %.

(-)-Menthylester **9** diente außerdem zur Absicherung der absoluten Konfiguration des Fermentationsproduktes mittels Röntgenkristallstrukturanalyse (Abbildung 1).^[6] Die Reduk-

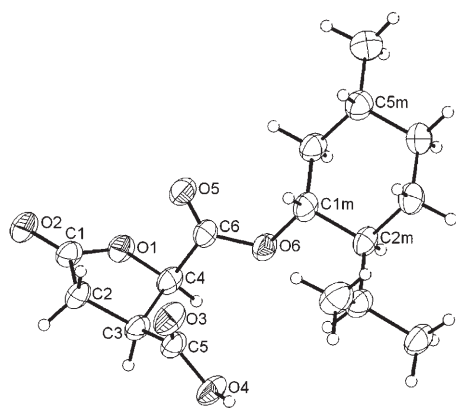
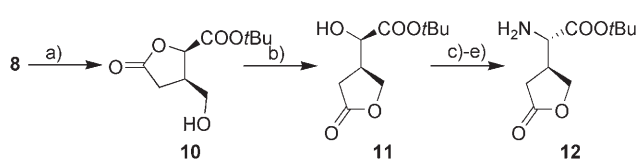


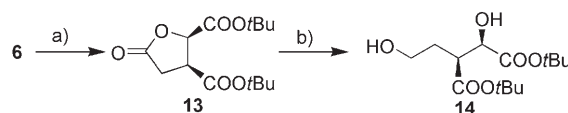
Abbildung 1. Struktur von **9** im Kristall.^[6]

tion des Mono-*tert*-butylesters **8** lieferte den Alkohol **10**, der sich zu **11** umlagert. In drei weiteren Schritten konnte die nicht natürlich vorkommende Lacton-Aminosäure **12** hergestellt werden, was einen Zugang zur Klasse der Aminosäuren eröffnete (Schema 4). Eine gezielte Reduktion der Lactonfunktion gelang ausgehend von **13** und führte zum Bernsteinäurederivat **14** (Schema 5).

Zum Abschluss wurde die Möglichkeit untersucht, weitere Stereoisomere der Isocitronensäure verfügbar zu machen. An der unsymmetrisch veresterten Verbindung **15** wurde ein schonendes Verfahren zur ausschließlichen Inver-

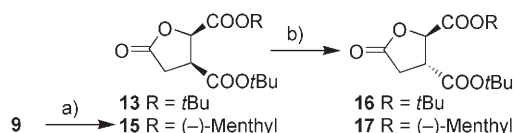


Schema 4. Umsetzung und Umlagerung von **8**: a) BH_3/THF , THF, 0 °C \rightarrow RT, 5 h, 88 %; b) H^+ , 78 %; c) Methansulfonylchlorid, Pyridin, CH_2Cl_2 , 24 h; d) NaN_3 , DMF, 47 % über zwei Stufen; e) Pd/C , H_2 , EtOAc, 8 h, 90 %.



Schema 5. Umsetzung von **6**: a) 2-Methylpropen, kat. H_2SO_4 , CH_2Cl_2 , 5 d, 88 %; b) $\text{Ca}(\text{BH}_4)_2$, THF/*i*PrOH, 84 %.

sion der Konfiguration des C3-Zentrums ohne Racemisierung an der C2-Position erarbeitet und auf den leicht erhältlichen Di-*tert*-butylester **13** angewendet, womit sich schließlich ein Zugang zu Derivaten der nicht natürlich auftretenden (-)-*allo*-Isocitronensäure eröffnete (Schema 6).



Schema 6. a) 2-Methylpropen, kat. H_2SO_4 , CH_2Cl_2 , 48 h, quant.; b) Inversion der Konfiguration an C3 für **16**: DBU, CH_2Cl_2 , 50 °C, 30 min, 80 % bezogen auf reisiolierte Ausgangsverbindung; für **17**: DBU, CH_2Cl_2 , 50 °C, 1 h, 89 % bezogen auf reisiolierte Ausgangsverbindung. DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en.

Damit ist es erstmals gelungen, (2*R*,3*S*)-Isocitronensäure, eine bisher nur analytisch untersuchte Verbindung aus dem Citratzyklus, im kg-Maßstab fermentativ aus Sonnenblumenöl herzustellen und zu isolieren. Sie konnte anschließend in eine Reihe chiraler Derivate umgewandelt werden. Diese sind vielversprechend für die Totalsynthese komplexerer Naturstoffe und als gut zugängliche Startmaterialien in der pharmazeutisch-chemischen Industrie.

Eingegangen am 29. Oktober 2007

Online veröffentlicht am 31. Januar 2008

Stichwörter: Chiraler Pool · Citratzyklus · Grüne Chemie · Isocitronensäure

- [1] a) J. D. Aebi, M. A. Sutter, D. Wasmuth, D. Seebach, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 12, 2114–2126; b) C. Schmitz, A.-C. Rouanet-Dreyfuss, M. Tueni, J.-F. Biellmann, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 1817–1821.
- [2] a) M. Tori, Y. Sono, Y. Nakashiba, N. Hamada, M. Sono, Y. Asakawa, M. Suganuma, S. Okabe, H. Fujiki, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 3095–3098; b) J. P. Greenstein, N. Izumiya, M. Winitz, S. M. Birnbaum, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 707–716; c) R. Carrington, G. Halek, Ger. Offen. DE226473, **1973**.

- [3] a) G. Barth, C. Gaillardin in *Nonconventional Yeasts in Biotechnology* (Hrsg.: K. Wolf) Springer, Berlin, Heidelberg, New York **1996**, S. 313–388; b) T. V. Finogenova, I. G. Morgunov, S. V. Kamzolova, O. G. Chernyavskaya, *Appl. Biochem. Microbiol.* **2005**, *41*, 418–425.
- [4] U. Stottmeister, A. Aurich, H. Wilde, J. Andersch, S. Schmidt, D. Sicker, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *32*, 651–664.
- [5] A. Aurich, A. Förster, S. Mauersberger, G. Barth, U. Stottmeister, *Biotechnol. Adv.* **2003**, *21*, 454–455.
- [6] Daten zur Strukturanalyse von $C_{16}H_{24}O_6$: Stoe-IPDS-2T-Diffraktometer, $M_m = 312.35 \text{ g mol}^{-1}$, Kristallabmessungen $0.1 \times 0.4 \times 0.9 \text{ mm}^3$, monoklin, Raumgruppe $P2_1$ (Nr. 4), $a = 821.95(9)$, $b = 561.50(4)$, $c = 1760.2(2) \text{ pm}$, $\beta = 97.141(9)^\circ$, $V = 806.07(14) \times 10^6 \text{ pm}^3$, $Z = 2$, $T = 180(2) \text{ K}$, $\rho_{\text{ber.}} = 1.287 \text{ g cm}^{-3}$, $\mu = 0.098 \text{ mm}^{-1}$, $\lambda = 71.073 \text{ pm}$ ($\text{MoK}\alpha$), 10207 gemessene, 2805 unabhängige Reflexe, $R_{\text{int}} = 0.073$, davon 2608 mit $I > 2\sigma(I)$, 207 Parameter, H-Atome auf idealisierten Positionen, R_1 (beobachtete Reflexe) = 0.051, wR_2 (alle Reflexe) = 0.15, max./min. Restelektronendichte $0.21/-0.20 \text{ e} \times 10^6 \text{ pm}^{-3}$; Strukturlösung und Verfeinerung mit SHELX97 (G. M. Sheldrick, SHELXS-97, Programm zur Lösung von Kristallstrukturen, Universität Göttingen, **1997**). CCDC 665724 enthält die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos beim Cambridge Crystallographic Data Centre über www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif erhältlich.