

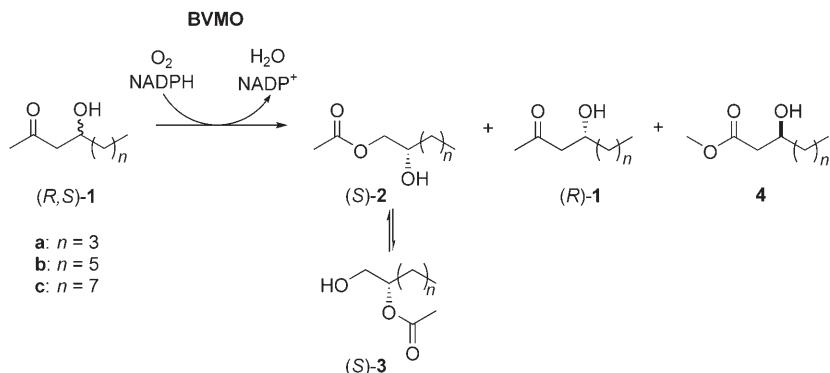
Katalytische kinetische Racematspaltung von 4-Hydroxy-2-ketonen durch eine Baeyer-Villiger-Monoxygenase**

Anett Kirschner und Uwe T. Bornscheuer*

Baeyer-Villiger-Monoxygenasen (BVMOs) gehören zur Klasse der Oxidoreduktasen und überführen aliphatische, arylaliphatische und cyclische Ketone in Ester bzw. Lactone unter Aktivierung von molekularem Sauerstoff.^[1,2] Die Reaktionen entsprechen der chemischen Baeyer-Villiger-Oxidation,^[3] die normalerweise durch Peroxosäuren katalysiert wird und über einen zweistufigen Mechanismus verläuft.^[4] Darüber hinaus sind BVMOs in der Lage, auch Heteroatomverbindungen zu oxidieren (S-, N- und P-Verbindungen).^[5] Insbesondere für enantioselektive Varianten der Baeyer-Villiger-Oxidation^[6] bieten sich BVMOs als eine vielversprechende Alternative zu metallbasierten chiralen Katalysatoren an.^[7] Während stereoselektive enzymatische Baeyer-Villiger-Oxidationen von prochiralen oder racemischen mono- und bicyclischen Ketonen^[8] sowie von racemischen aromatischen Ketonen bereits beschrieben wurden,^[2,9] war bisher kein Beispiel einer enantioselektiven BVMO-katalysierten Umsetzung von racemischen aliphatischen acyclischen Ketonen bekannt. Es wurde lediglich über ein 3-Chlor-2-butanon als Substrat einer 4-Hydroxyacetophenon-Monoxygenase berichtet, allerdings war der Umsatz sehr niedrig, und auf eine mögliche Enantioselektivität der Reaktion wurde nicht eingegangen.^[2] Eine chemische Baeyer-Villiger-Oxidation von β -Hydroxyketonen mit Peroxosäuren ergab acylierte Diole, aber die Reaktion verlief nicht enantioselektiv.^[10]

Wir berichten hier über die erste BVMO-katalysierte kinetische Racematspaltung von aliphatischen acyclischen Ketonen mit 4-Hydroxy-2-ketonen als Modellsubstraten. Grundlage dieser Studien war unsere Beobachtung, dass eine BVMO aus *P. fluorescens* DSM 50106, die wir rekombinant in *E. coli* exprimieren konnten, aliphatische 2-Ketone in die entsprechenden Acetate umsetzte, gegenüber cyclischen Ketonen aber kaum Aktivität zeigte.^[11] Es gelang uns, die racemischen 4-Hydroxy-2-ketone **1a-c** (synthetisiert nach Smith und Levenberg)^[12] mit zufriedenstellender Enantioselektivität

zu den Hydroxyalkylacetaten **2a-c** umzusetzen (Schema 1, Abbildung 1, Tabelle 1). Alle Oxidationsprodukte wurden in optischen Reinheiten > 90% ee und mit S-Konfiguration erhalten. *E*-Werte^[18] um 50 ermöglichen prinzipiell



Schema 1. Enzymatische Baeyer-Villiger-Oxidation von racemischen 4-Hydroxy-2-ketonen durch eine BVMO aus *P. fluorescens* DSM 50106, die in *E. coli* exprimiert wird.

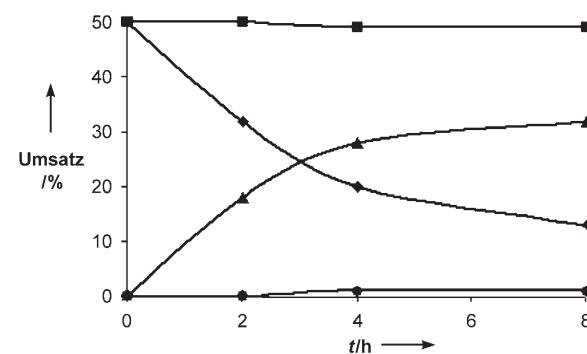


Abbildung 1. Zeitverlauf des Umsatzes von **1a** zu **2a** bei 30°C mit ruhenden *E.-coli*-Zellen, die die BVMO aus *P. fluorescens* DSM 50106 enthalten. ■: (R)-**1a**, ◆: (S)-**1a**, ▲: (S)-**2a**, ●: (R)-**2a**.

Tabelle 1: Ergebnisse der kinetischen Racematspaltung der 4-Hydroxy-2-ketone **1a-c**.^[a]

Substrat	t [h]	Umsatz [%] ^[b]	Enantiomerenüberschuss ^[c] [% ee _S] [% ee _P]	E ^[b]
1a	8	40	61	93
1b	4	48	84	91
1c	2	45	74	90

[a] Bei 30°C mit ruhenden *E.-coli*-Zellen, die die BVMO aus *P. fluorescens* DSM 50106 enthalten. [b] Berechnet nach Chen et al.^[18] [c] Durch GC-Analyse an chiraler Phase bestimmt.

auch die Isolierung des optisch aktiven nichtumgesetzten Substrats, wenn die Reaktion bis ca. 55% Umsatz weiterläuft. Wir beobachteten eine Acylwanderung von der primären zur sekundären Hydroxygruppe (Schema 1), die zu einer 4:1-Mischung der acylierten 1,2-Diole **2a-c** und **3a-c** führte (durch GC-MS-Analysen bestätigt). Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die optische Reinheit der Produkte. Über eine ähnliche Beobachtung berichteten Park und Kozikowski, die allerdings eine 7:3-Mischung fanden. Die unterschiedlichen

[*] Dipl.-Biochem. A. Kirschner, Prof. Dr. U. T. Bornscheuer
Institut für Biochemie
Abt. Biotechnologie und Enzymkatalyse
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Friedrich-Ludwig-Jahn-Straße 18c, 17487 Greifswald (Deutschland)
Fax: (+49) 3834-86-80066
E-Mail: uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de
Homepage: www.chemie.uni-greifswald.de/~biotech

[**] Wir danken dem Fonds der Chemischen Industrie und der Studienstiftung des Deutschen Volkes für Stipendien an A.K. sowie Anita Gollin für die Unterstützung bei der Synthese der β -Hydroxyketone.

Verhältnisse sind möglicherweise auf unterschiedliche Reaktionsbedingungen zurückzuführen.^[10] Geringe Mengen ($\leq 5\%$) des anderen möglichen Produkts der Baeyer-Villiger-Oxidation, des Hydroxsäuremethylesters **4**, wurden ebenfalls nachgewiesen.

Obwohl die BVMO aus *P. fluorescens* DSM50106 kurzketige aliphatische acyclische Ketone bevorzugt, wurden **1b** und **1c** deutlich schneller umgesetzt als **1a**. Unter Verwendung ruhender Zellen wurden nach 4 h fast 50% Umsatz festgestellt. Da BVMOs Flavin-abhängig sind (meist FAD) und NAD(P)H zur Katalyse dieser Reaktion benötigen, wurden die Biotransformationen mit rekombinanten ganzen *E. coli*-Zellen ausgeführt (entweder wachsend oder ruhend), die die BVMO aus *P. fluorescens* DSM50106 exprimierten.^[11] Damit waren Cofaktorregenerierung und in unserem Fall auch Enzymstabilität keine limitierenden Faktoren. Bei wachsenden Zellen wurde das Substrat zeitgleich zum Zeitpunkt der Induktion der BVMO-Expression zugesetzt, während bei ruhenden Zellen zunächst das Enzym exprimiert, die Zellen geerntet und vor der Biotransformation in Phosphatpuffer resuspendiert wurden.^[13] In diesem Fall wurde neben dem racemischen Substrat auch Glucose hinzugefügt, um eine wirksame Cofaktorregenerierung zu erzielen.^[14] Der große Vorteil beim Einsatz ruhender Zellen bestand darin, dass die Reaktionszeiten deutlich verkürzt waren und höhere Umsätze erzielt wurden. Außerdem können die ruhenden Zellen bis zu drei Wochen im Kühlschrank bei nur moderaten Aktivitätsverlusten (20–30%) aufbewahrt werden (Daten nicht gezeigt). Demgegenüber steht die Beobachtung, dass eine rekombinante Cyclohexanon-Monooxygenase in ruhenden *E. coli*-Zellen während der Biokatalyse aktiv abgebaut wurde.^[15]

Die kinetische Racematspaltung der Hydroxyketone ergibt zwei unterschiedliche chemische Spezies, die sich außerdem in ihrer Konfiguration unterscheiden. Neben dem zurückbleibenden Enantiomer des optisch aktiven Hydroxyketons (**1a–c**) wird als Produkt ein optisch aktives Acetat eines 1,2-Diols gebildet. Diese Eigenschaft macht diese Biotransformation besonders nützlich, da eine regio- und enantioselektive Reduktion eines 2,4-Diketons zu (*R*)-**1** eine hochspezifische Ketoreduktase benötigt, da vier Diastereomere entstehen können.^[16] Die alternative kinetische Racematspaltung eines 1,2-Diols mit einer Lipase oder Esterase scheitert an der sehr geringen Enantioselektivität,^[17] da diese Hydrolasen bevorzugt an der primären Hydroxygruppe spalten bzw. verestern. Folglich erweitert die hier beschriebene Reaktion nicht nur den Anwendungsbereich der Baeyer-Villiger-Monooxygenasen in der Synthese, sondern bietet auch eine nützliche Alternative zu Enzymreaktionen mit Hydrolasen und Ketoreduktasen.

Experimentelles

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich, Fisher Scientific, VWR, ABCR und Roth GmbH bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Die Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert. NMR-Spektren wurden in CDCl_3 an einem 300-MHz-Gerät (Bruker) aufgenommen.

Die bei der BVMO-katalysierten Reaktion erhaltenen Produkte wurden zu Vergleichszwecken separat synthetisiert. Die racemischen 4-Hydroxy-2-ketone **1a–c** wurden durch Aldolkondensation nach Smith und Levenberg hergestellt.^[12] Die Hydroxyalkylacetate **2a–c** wurden enzymatisch mit Lipase B aus *Candida antarctica* erhalten. Hierzu wurden 5 mg immobilisiertes Enzym (Chirazyme L-2, C-2, Roche) mit 300 μL Isooctan und 300 μL Vinylacetat in 2-mL-Glasfläschchen gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mg 1,2-Diol gestartet und bei 25°C in einem Thermoschüttler (Eppendorf) ca. 2 h inkubiert, bis die Umsetzung abgeschlossen war. Proben wurden direkt gaschromatographisch analysiert. NMR-Daten entsprachen den Literaturangaben.^[19] Die Hydroxsäuremethylester **4a,b** wurden ausgehend von den β -Ketosäuremethylestern durch Alkoholdehydrogenase-katalysierte Reduktion mit rekombinantem Enzym aus *P. fluorescens* DSM50106 erhalten.^[20] 5 mg Enzymlyophilisat wurden in 800 μL Phosphatpuffer (50 mM, pH 7.5), 200 μL Isopropylalkohol und 2 μL β -Ketosäuremethylester gelöst. Die Reaktion erfolgte bei 20°C für 24 h in einem Thermoschüttler. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend zweimal mit 500 μL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Stickstoffstrom eingeengt. Das Produkt wurde durch GC analysiert. β -Ketosäuremethylester, die nicht kommerziell erhältlich waren, wurden nach Oikawa et al. synthetisiert.^[21]

Die absoluten Konfigurationen der Hydroxyalkylacetate **2a–c** wurden durch Vergleich mit (*R*)-Essigsäure-2-hydroxydecylester (*(R)*-**2c**) ermittelt, der aus (*R*)-1,2-Decandiol durch Lipase-katalysierte Umesterung erhalten wurde. Die Ergebnisse belegen, dass bevorzugt das *S*-Enantiomer von **1a–c** durch die BVMO oxidiert wird.

Biokatalyse mit ruhenden Zellen: Die Expression der BVMO in *E. coli* JM109 pGro7 pJOE4072.6 + HT^[11] wurde in 200 mL LB_{cm+amp}-Medium mit Zusatz von 0.5 mg mL⁻¹ L-Arabinose bei 30°C ausgeführt. Die Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte von 0.5–0.6 bei 600 nm gezüchtet, und die BVMO-Expression wurde durch Zugabe von L-Rhamnose (0.2% (w/v) Endkonzentration) induziert. Nach weiterem Wachstum für 4 h wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und mit sterilem Phosphatpuffer (50 mM, pH 7.5) gewaschen. Für Biokatalysen im kleinen Maßstab wurden die Zellen im gleichen Puffer zu einer optischen Dichte von etwa 40 resuspendiert, und 1 mL Aliquote dieser Zellsuspension wurden in 2-mL-Reaktionsgefäß (Eppendorf) mit 5 μmol **1a–c** und 10 μL einer sterilen 1M Glucoselösung gemischt. Die Gefäße wurden mit luftdurchlässigen Deckeln (Lid_{Bac}, Eppendorf) verschlossen und bei 30°C in einem Thermoschüttler bei 1400 Upm inkubiert. In bestimmten Zeitabständen wurden Proben (300 μL) entnommen, zweimal mit Essigsäureethylester extrahiert und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Überschüssiges Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom entfernt, und die Proben wurden durch GC analysiert.

Die GC-Analysen wurden an einem Shimadzu-GC-14A-Gaschromatographen an einer chiralen β -Cyclodextrinsäule (Hydrodex- β -3P, Macherey-Nagel) ausgeführt (Tabelle 2). Injektions- und De-

Tabelle 2: GC-Analysen der Verbindungen **1a–c** und **2a–c**.^[a]

Verb.	Heizprogramm (Säule)	t_R [min] S/R ^[b]
1a	20 min, 90°C//20°C min ⁻¹ //110°C, 15 min	17.8/18.6
1b	15 min, 120°C//20°C min ⁻¹ //130°C, 15 min	12.7/13.3
1c	20 min, 135°C//20°C min ⁻¹ //145°C, 15 min	18.3/19.1
2a	20 min, 90°C//20°C min ⁻¹ //110°C, 15 min	23.3/24.1
2b	15 min, 120°C//20°C min ⁻¹ //130°C, 15 min	23.3/24.1
2c	20 min, 135°C//20°C min ⁻¹ //145°C, 15 min	22.4/23.2

[a] Chirale β -Cyclodextrinsäule (Hydrodex- β -3P). [b] t_R = Retentionszeit. Die Elutionsreihenfolge „S vor R“ wurde mit (*R*)-**2c** als Standard bestimmt.

tektionstemperaturen wurden auf 220 °C eingestellt. GC-MS-Analysen wurden mit einem Shimadzu QP-2010 ausgeführt, das mit der gleichen Säule ausgestattet war.

Eingegangen am 25. Juli 2006
Online veröffentlicht am 2. Oktober 2006

Stichwörter: β -Hydroxyketone · Baeyer-Villiger-Monoxygenasen · Enantioselektivität · Enzymkatalyse · Kinetische Racematspaltung

- [19] a) A. Lethbridge, R. O. C. Norman, C. B. Thomas, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1974**, 1929; b) S. Uemura, K. Ohe, S.-I. Fukuzawa, S. R. Patil, N. Sugita, *J. Organomet. Chem.* **1986**, 316, 67.
- [20] P. Hildebrandt, A. Musidowska, U. T. Bornscheuer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 59, 483.
- [21] Y. Oikawa, K. Sugano, O. Yonemitsu, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2087.

- [1] M. D. Mihovilovic, B. Müller, P. Stanetty, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3711.
- [2] N. M. Kamerbeek, J. J. Olsthoorn, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 419.
- [3] a) C. Walsh, Y. C. J. Chen, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 342; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 333; b) A. Baeyer, V. Villiger, *Ber. Dtsch. Chem. Dtsch.* **1899**, 32, 3625.
- [4] R. Criegee, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1948**, 560, 127.
- [5] a) G. Carrea, B. Redigolo, S. Riva, S. Colonna, N. Gaggero, E. Battistel, D. Bianchi, *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, 3, 1063; b) G. de Gonzalo, D. E. Torres Pazmino, G. Ottolina, M. W. Fraaije, G. Carrea, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, 17, 130.
- [6] M. D. Mihovilovic, F. Rudroff, B. Grötzl, *Curr. Org. Chem.* **2004**, 8, 1057.
- [7] G. Strukul, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1256; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1199.
- [8] a) M. D. Mihovilovic, F. Rudroff, B. Grötzl, P. Kapitan, R. Snajdrova, J. Rydz, R. Mach, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 3675; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3609; b) M. J. Taschner, D. J. Black, Q. Z. Chen, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, 4, 1387; c) M. J. Taschner, L. Peddada, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 1384; d) M. J. Taschner, D. J. Black, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6892; e) A. J. Carnell, S. M. Roberts, V. Sik, A. J. Willetts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1991**, 2385; f) V. Alphand, R. Furstoss, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 1306; g) A. Carnell, A. Willets, *Biotechnol. Lett.* **1992**, 14, 17; h) R. Gagnon, G. Grogan, M. S. Levitt, S. M. Roberts, P. W. H. Wan, A. J. Willetts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1994**, 2537; i) M. T. Bes, R. Villa, S. M. Roberts, P. W. H. Wan, A. Willets, *J. Mol. Catal. B* **1996**, 1, 127; j) J. D. Stewart, K. W. Reed, C. A. Martinez, J. Zhu, G. Chen, M. M. Kayser, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3541; k) M. D. Mihovilovic, P. Kapitan, J. Rydz, F. Rudroff, F. H. Ogink, M. W. Fraaije, *J. Mol. Catal. B* **2005**, 32, 135; l) M. D. Mihovilovic, F. Rudroff, B. Grötzl, P. Stanetty, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 809.
- [9] V. Alphand, R. Furstoss, *J. Mol. Catal. B* **2000**, 9, 209.
- [10] P. Park, A. P. Kozikowski, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 6703.
- [11] A. Kirschner, J. Altenbuchner, U. T. Bornscheuer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, DOI: 10.1007/s00253-006-0556-6.
- [12] A. B. Smith, P. A. Levenberg, *Synthesis* **1981**, 567.
- [13] A. Z. Walton, J. D. Stewart, *Biotechnol. Prog.* **2002**, 18, 262.
- [14] T. Endo, S. Koizumi, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, 343, 521.
- [15] A. Z. Walton, J. D. Stewart, *Biotechnol. Prog.* **2004**, 20, 403.
- [16] a) G.-J. Shen, Y.-F. Wang, C. Bradshaw, C.-H. Wong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 677; b) A. Fauve, H. Veschambre, *Biocatalysis* **1990**, 3, 95.
- [17] a) F. Theil, J. Weidner, S. Ballschuh, A. Kunath, H. Schick, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 305; b) F. Theil, S. Ballschuh, A. Kunath, H. Schick, *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, 2, 1031; c) A. J. M. Janssen, A. J. H. Klunder, B. Zwanenburg, *Tetrahedron* **1991**, 47, 7409.
- [18] C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 7294.