

Die Analysen wurden in unserm mikroanalytischen Laboratorium (Leitung W. MANSER) ausgeführt.

Zusammenfassung

Racemisches $\Delta^{4,9}$ -8-Methyl-hexahydro-indendon-(1,5) wird durch «ruhende» Kulturen von *Curvularia falcata* (TEHON) BOEDIJN stereospezifisch reduziert, unter Bildung von (1 S, 8 S)- $\Delta^{4,9}$ -1-Hydroxy-8-methyl-hexahydro-indenon-(5) (III). Das (8 R)-Enantiomere des Eduktes bleibt dabei grösstenteils unangegriffen. Wachsende und «adaptierte ruhende» Kulturen desselben Mikroorganismus greifen auch dieses letztere stereospezifisch, unter Bildung von (1 S, 8 R)- $\Delta^{4,9}$ -1-Hydroxy-8-methyl-hexahydro-indenon-(5) (IV), an. «Ruhende» Kulturen von *Aspergillus niger* VAN T. verhalten sich ähnlich, liefern jedoch teilweise racemische Hydroxy-ketone.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

159. Reaktionen mit Mikroorganismen

3. Mitteilung¹⁾

Reduktion von (\pm) - Δ^4 -9-Methyl-octalindion-(3,8) mit *Aspergillus niger*

von W. Acklin, D. Dütting und V. Prelog

(1. VII. 58)

Die wachsenden und «ruhenden»¹⁾ Kulturen von *Curvularia falcata* (TEHON) BOEDIJN reduzieren die Carbonyl-Gruppe in Stellung 8 der beiden enantiomeren Δ^4 -9-Methyl-octalindione-(3,8) I und II. Diese mikrobiologische Reduktion ist wenig selektiv in bezug auf das Edukt, von welchem das (9S)-Enantiomere etwas rascher reagiert. Sie verläuft dagegen *stereospezifisch in bezug auf das Produkt*, indem von den vier theoretisch möglichen stereoisomeren Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octalonen-(3) *ausschliesslich zwei* und zwar diejenigen mit (8S)-Konfiguration entstehen^{1) 2)}.

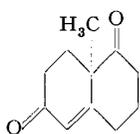
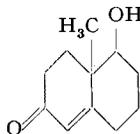
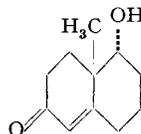
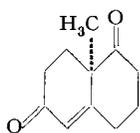
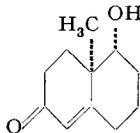
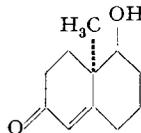
Bei der Fortsetzung unserer Versuche konnten wir feststellen, dass wachsende und «ruhende» Kulturen eines andern Mikroorganismus, des weitverbreiteten *Aspergillus niger* VAN T., die Δ^4 -9-Methyl-octalindione-(3,8) ebenfalls zu Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octalonen-(3) reduzieren. Der Verlauf der Reduktion ist jedoch ein anderer als bei *Curvularia falcata*. Die mikrobiologische Reduktion mit *Aspergillus niger* ist bedeutend langsamer und liefert folgende Produkte:

1. Eine optisch inaktive Verbindung $C_{11}H_{18}O_2$ vom Smp. 77–78°, deren IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform identisch ist mit demjenigen des früher beschriebenen (8S,9R)- Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octalons-(3) (V)¹⁾. Es

¹⁾ 2. Mitt. Helv. **41**, 1416 (1958).

²⁾ V. PRELOG & W. ACKLIN, Helv. **39**, 748 (1956).

liegt somit ein Racemat, bestehend aus den (8*S*,9*R*)- und (8*R*,9*S*)-Enantiomeren V und VI vor.

I (9*S*)-(+)III (8*S*,9*S*)-(+)VI (8*R*,9*S*)-(+)II (9*R*)-(-)IV (8*R*,9*R*)-(-)V (8*S*,9*R*)-(-)

2. Eine Verbindung $C_{11}H_{18}O_2$ vom Smp. 95,5–96°, $[\alpha]_D = +110^\circ$ (Benzol), mit demselben IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform wie die vorher erwähnte Verbindung. Es handelt sich demnach um das rechtsdrehende (8*R*,9*S*)- Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octalon-(3) (VI), dessen linksdrehendes Enantiomere (V), durch Reduktion mit *Curvularia falcata* entsteht²⁾.

3. Das (8*S*,9*S*)- Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octalon-(3) (III), isoliert als p-Nitrobenzoyl-Derivat $C_{18}H_{19}O_5N$, vom Smp. 195–196°, $[\alpha]_D = +156^\circ$ (Benzol), das früher bei der Reduktion mit *Curvularia falcata* erhalten worden war.

4. Aus den Mutterlaugen der letzterwähnten Verbindung konnte ein isomeres p-Nitrobenzoyl-Derivat vom Smp. 159–160,5°, $[\alpha]_D = +74^\circ$ (Benzol), isoliert werden, das seinem IR.-Absorptionsspektrum nach offenbar ein partielles Racemat der p-Nitrobenzoyl-Derivate von (8*S*,9*S*)- und (8*R*,9*R*)-Enantiomeren III und IV darstellt.

Der sterische Verlauf der mikrobiologischen Reduktion des Δ^4 -9-Methyl-octalindions-(3,8) mit *Aspergillus niger* ist somit dadurch charakterisiert, dass alle vier theoretisch möglichen stereoisomeren Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octalone-(3) (III bis VI) entstehen. Das (9*S*)-Enantiomere I des Eduktes wird etwas rascher angegriffen; die Produkt-Stereospezifität ist im Gegensatz zu der Reduktion mit *Curvularia falcata* gering.

Der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT in Basel danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit. Den HH. Dr. A. WETTSTEIN und Dr. E. VISCHER von derselben Firma verdanken wir viele technische Einzelheiten über mikrobiologische Reaktionen.

Experimenteller Teil³⁾

1. Mikrobiologische Reaktionen. – 1.1. Versuche mit wachsenden Kulturen. Impfkulturen à 200 ml wurden in 500 ml ERLLENMEYER-Kolben 2 Tage auf einer PETERSON-Nährlösung⁴⁾ gezüchtet. Für den Hauptansatz wurden 8 Schüttelenten mit je 4 l Bier-

³⁾ Alle Smp. sind korrigiert. Das optische Drehungsvermögen wurde im 1-dm-Rohr bestimmt. Die IR.-Absorptionsspektren wurden mit dem PERKIN-ELMER-Double-Beam-Spectrograph, Modell 21, aufgenommen.

⁴⁾ D. H. PETERSON, H. C. MURRAY, S. H. EPPSTEIN, L. M. REINECKE, A. WEINTRAUB, P. D. MEISTER & H. M. LEIGH, J. Amer. chem. Soc. **74**, 5933 (1952).

würze-Nährlösung folgender Zusammensetzung beschickt: 700 ml ungehopfte, helle Vorderwürze, 300 ml Leitungswasser und 1 ml Spurenelement-Lösung nach BRIAN. Nach Sterilisierung (pH = 5,5) und Zugabe von 0,25 ml Antifoam-A-Emulsion (DOW CHEMICALS) zu jeder Schüttelente, wurde mit dem Inhalt je eines ERLÉNMEYER-Kolbens geimpft. Nachdem die Kulturen 57 Std. gewachsen waren, gab man pro Schüttelente 1 g (\pm)- Δ^4 -9-Methyl-octalindion-(3,8) in 2 ml Aceton zu und liess 110 Std. unter Belüftung schütteln.

Die Kulturflüssigkeit wurde dann vom Mycel abgenutscht, letzteres mit 2 l Aceton und 3 l Äthylacetat gewaschen und das Filtrat und die Waschflüssigkeit mit etwa 36 l Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetat-Auszüge engte man in einem Dünnschichtverdampfer auf 2 l ein. Die eingeeengte Lösung wurde mit Wasser, verd. Natriumcarbonat-Lösung, verd. Salzsäure und Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Beim Abdestillieren des Äthylacetats fiel zuerst ein flockiger Niederschlag aus, der abfiltriert und verworfen wurde. Das Filtrat hinterliess beim Eindampfen 9,47 g eines öligen Rückstandes, welchen man in Benzol-Lösung an 570 g Aluminiumoxyd (Akt. III) chromatographierte. Es wurden dabei 47 Fraktionen à 500 ml aufgefangen. Die Benzol-Eluate (5,60 g) enthielten, wie die Papierchromatogramme zeigten, das Edukt. Durch Umkristallisieren einer kristallinen Fraktion (0,48 g) aus Äther-Petroläther erhielt man das Racemat vom Smp. 51–52°, $[\alpha]_D = 0^\circ$ ($c = 2,60$, Benzol), dessen IR.-Absorptionsspektrum in CHCl_3 identisch mit demjenigen des Ausgangsmaterials war. Die öligen Fraktionen wiesen ein $[\alpha]_D = -36^\circ$ ($c = 2,995$, Benzol) auf.

Die Benzol-Äther-Eluate wogen insgesamt 3,55 g. In den ersten Fraktionen konnte papierchromatographisch eine im nahen UV. nicht absorbierende Verbindung mit R (Propylenglykol-Toluol) = 0,30 nachgewiesen werden, die wegen Materialmangel nicht weiter untersucht wurde. Spätere Fraktionen enthielten die Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octalone-(3) [Rf (Propylenglykol-Toluol) = 0,15, Rf (BUSH C) = 0,56]. Wie eine eingehendere Untersuchung einzelner Chromatogramm-Fraktionen zeigte, handelt es sich um ein Gemisch aller vier theoretisch möglichen Stereoisomeren (vgl. 2. Produkte der mikrobiologischen Umsetzungen), die sich papierchromatographisch nicht unterscheiden.

1.2. *Versuche mit «ruhenden» Kulturen.* Die «ruhenden» Kulturen von *Aspergillus niger* wurden nach der in der vorhergehenden Mitteilung¹⁾ angegebenen Vorschrift bereitet. 27 g feuchtes, abgenutztes Mycel wurden in 500 ml Phosphat-Pufferlösung pH = 7 mit 1,5 g Calciumcarbonat, 5 g Glucose und 1,0 g (\pm)- Δ^4 -9-Methyl-octalindion-(3,8) versetzt und 43 Std. im rotierenden 2-l-Rundkolben umgesetzt. Das Mycel wurde dann abgenutscht, mit 300 ml Wasser gewaschen und die Filtrate mit Äther im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat erschöpfend extrahiert. Nach dem Eindampfen der mit Natriumsulfat getrockneten ätherischen Auszüge blieben 1,006 g eines hellgelben Öls zurück, das in Benzol an 60 g Aluminiumoxyd (Akt. II–III) chromatographiert wurde. Aus den Benzol-Eluaten konnten 642 mg kristallines, schwach linksdrehendes Δ^4 -9-Methyl-octalindion-(3,8), $[\alpha]_D = -28^\circ$ (Benzol) zurückgewonnen werden. Die ersten Benzol-Äther-Eluate ergaben 183 mg eines Gemisches von diastereomeren Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octalone-(3). Durch nochmalige Chromatographie an 110 g Aluminiumoxyd (Akt. II) wurden aus diesem Gemisch 90 mg des öligen (+)-(8S,9S)- Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octalone-(3), $[\alpha]_D = +173^\circ$ (Benzol) und 90 mg eines Gemisches der kristallinen Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octalone-(3) isoliert. Die späteren Benzol-Äther-Eluate des ersten Chromatogramms gaben weitere 156 mg desselben kristallinen Gemisches. Durch fraktionierte Kristallisation liessen sich darauf 88 mg des optisch reinen (+)-(8R,9S)-Enantiomeren und 11 mg des entsprechenden (8R,9S), (8S,9R)-Racemates isolieren.

Eine Umsetzung während 72 Std., bei welcher 27 g feuchtes Mycel und 0,5 g Edukt zur Anwendung kamen und bei der ungefähr die Hälfte des Ausgangsmaterials reagierte, ergab 240 mg Δ^4 -9-Methyl-octalindion-(3,8), $[\alpha]_D = -13,5^\circ$ (Benzol), 65 mg eines Gemisches der öligen Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octalone-(3): (8S,9S) und (8R,9R), $[\alpha]_D = +70,5^\circ$ (Benzol) und 60 mg eines Gemisches der kristallinen Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octalone-(3): (8R,9S) und (8S,9R), $[\alpha]_D = +46^\circ$ (Benzol).

2. Produkte der mikrobiologischen Umsetzungen. – 2.1. (+)-(8R,9S)- Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octalone-(3) (VI). Durch Umkristallisieren aus Äther-Petroläther der

Chromatogramm-Fractionen 29–32 (Benzol-Äther-Eluate) des Umsetzungsproduktes mit wachsenden Kulturen (77 mg) wurden farblose Kristalle vom Smp. 95,5–96°, $[\alpha]_D = +104^\circ$ ($c = 1,233$, Benzol), erhalten. Zur Analyse wurde im Hochvakuum getrocknet.

$C_{11}H_{16}O_2$ Ber. C 73,30 H 8,95% Gef. C 73,14 H 8,91%

Die gleiche Verbindung wurde durch Umkristallisieren des kristallinen Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octalon-(3)-Gemisches aus den Versuchen mit «ruhenden» Kulturen erhalten, $[\alpha]_D = +110^\circ$ ($c = 1,255$, Benzol).

Die IR.-Absorptionsspektren in KBr und $CHCl_3$ waren identisch mit denjenigen des (8*S*, 9*R*)-Enantiomeren.

2.2. (\pm)-(8*R*, 9*S*), (8*S*, 9*R*)- Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octalon-(3) (VI, V). Die kristallinen Chromatogramm-Fractionen 25–28 sowie 33–35 (Benzol-Äther-Eluate) des Umsetzungsproduktes mit wachsenden Kulturen (490 mg) gaben beim Umlösen aus Äther-Petroläther eine Verbindung Smp. 77–78°, $[\alpha]_D = +1^\circ$ ($c = 2,325$, Benzol). Zur Analyse wurde im Hochvakuum getrocknet.

$C_{11}H_{16}O_2$ Ber. C 73,30 H 8,95% Gef. C 73,35 H 8,90%

Das IR.-Absorptionsspektrum in $CHCl_3$ war identisch mit denjenigen der optisch reinen Enantiomeren.

2.2. *p*-Nitrobenzoyl-Derivat des (+)-(8*S*, 9*S*)- Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octalons-(3) (III). Die öligen Chromatogramm-Fractionen 15–22 (Benzol-Äther-Eluate) des Umsetzungsproduktes mit wachsenden Kulturen wurden auf übliche Weise mit *p*-Nitrobenzoylchlorid und Pyridin in Benzol in die rohen, kristallinen *p*-Nitrobenzoyl-Derivate übergeführt. Nach achtmaligem Umlösen aus Benzol-Petroläther wurde daraus ein *p*-Nitrobenzoyl-Derivat, Smp. 194,5–195,5°, $[\alpha]_D = +156^\circ$ ($c = 2,193$, Benzol) isoliert.

$C_{18}H_{19}O_5N$ Ber. C 65,64 H 5,82% Gef. C 65,61 H 5,91%

Das IR.-Absorptionsspektrum in $CHCl_3$ war identisch mit demjenigen des früher mit *Curvularia falcata* erhaltenen *p*-Nitrobenzoyl-Derivates des (+)-(8*S*, 9*S*)- Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octalons-(3). Die beiden Präparate zeigten keine Smp.-Erniedrigung.

Aus den Mutterlaugen der optisch reinen Verbindung kristallisierte ein weiteres *p*-Nitrobenzoyl-Derivat, das bei 159–160,5° schmolz, $[\alpha]_D = +74,5^\circ$ ($c = 1,150$, Benzol).

$C_{18}H_{19}O_5N$ Ber. C 65,64 H 5,82% Gef. C 65,63 H 6,02%

Das IR.-Absorptionsspektrum in $CHCl_3$ war praktisch identisch mit demjenigen der optisch reinen Verbindung. Es handelt sich hier sehr wahrscheinlich um ein partielles Racemat 3:1 aus (8*S*, 9*S*)- und (8*R*, 9*R*)-Enantiomeren.

Die Analysen wurden in unserem Mikrolaboratorium (Leitung W. MANSER) ausgeführt.

Zusammenfassung

(\pm)- Δ^4 -9-Methyl-octalindion-(3, 8) (I, II) gibt bei der Umsetzung mit wachsenden und «ruhenden» Kulturen von *Aspergillus niger* VAN T. alle vier theoretisch möglichen Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octalone-(3) (III–IV). Die Enantiomeren mit (9*S*)-Konfiguration und besonders das bisher unbekannte (8*R*, 9*S*)-Stereoisomere VI entstehen dabei im Überschuss. *Aspergillus niger* zeigt demnach in diesem Falle eine geringe Edukt-Selektivität und eine schwache Produkt-Stereospezifität.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich