

49. Über die Depolymerisierung von Poly-(*R*)-3-hydroxy-buttersäureester (*PHB*)

von Dieter Seebach und Max Züger¹⁾

Laboratorium für Organische Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, ETH-Zentrum,
Universitätstrasse 16, CH-8092 Zürich (Schweiz)

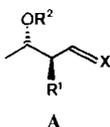
(28. XII. 81)

On the Depolymerization of Poly-(*R*)-3-hydroxy-butanoate (*PHB*)

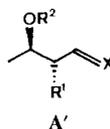
Summary

From cell-free *PHB* or from dried cells of *Alcaligenes eutrophus* H 16, which had been grown in an aqueous fructose solution, enantiomerically pure methyl, ethyl, butyl or β -methoxyethyl (*R*)-3-hydroxy-butanoates are obtained in yields ranging from 75–90% (0.1 to 70 g scale). The depolymerization is achieved by heating the *PHB*-containing materials to temperatures of 80–160° in the corresponding alcohol with or without the cosolvent dichloroethane in the presence of either sulfuric acid or tetraethoxytitanium catalyst. Since (*S*)-3-hydroxy-butanoates are also readily obtained (by yeast reduction of aceto-acetates), starting materials derived from 3-hydroxy-butyric acid now belong to the especially useful group of synthetic building blocks which are available in *both* enantiomeric forms.

Der Einsatz von chiralen, enantiomerenreinen Synthesebausteinen des Typus **A** hat sich vielfach bewährt [1], vor allem nachdem nicht nur Derivate **A** mit $R^1 = H$, sondern durch Alkylierung von doppelt deprotoniertem β -Hydroxy-buttersäureester (**1**) [2] auch solche mit $R^1 = \text{Alkyl}$, einfach herstellbar wurden. Bisher waren nur der (*S*)-konfigurierte β -Hydroxyester **1**, und damit die Bausteine **A** leicht zugänglich (Reduktion von Acetessigsäureäthylester von der *Re*-Seite der Ketogruppe mit



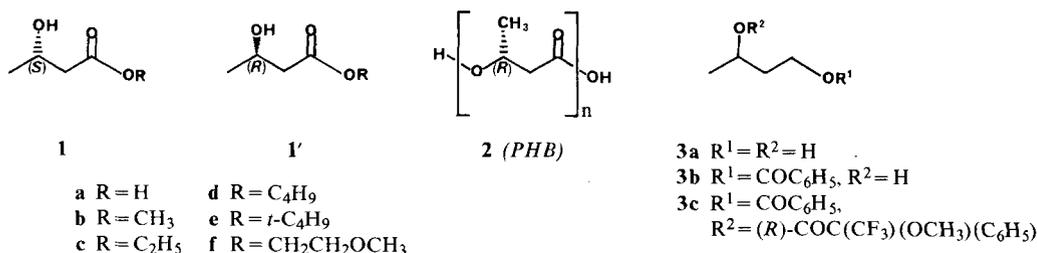
$R^1 = H$ oder Alkyl
 $R^2 = \text{Schutzgruppe}$



$X = \text{Halogen/H, OTs/H, O, MgX/H, PR}_3^3$

¹⁾ Teil der geplanten Dissertation von M.Z., ETH Zürich.

gärender Hefe nach Lemieux [3] und Ridley [4] [5-9] führt zu ca. 85% enantiomerenreinem (Enantiomerenverhältnis 93:7) Äthylester **1c**, der über einen kristallinen Dinitrobenzoesäureester weiter angereichert²⁾ werden kann [6]). Bausteine **A'** mit umgekehrtem Chiralitätssinn mussten bisher über mehrere Stufen aus Äpfelsäure hergestellt werden [6]. Auf der Suche nach einer guten Quelle für die (*R*)- β -Hydroxybuttersäure und ihre Derivate (**1'** und **A'**) bot sich uns zum einen die Möglichkeit der Hydrierung von Acetessigester von der *Si*-Seite mit anderen Mikroorganismen als Hefe, z.B. mit *Mucor Javanicus* [10] oder mit thermophilen Bakterien [11], zum anderen aber die Depolymerisierung des Polyesters aus **1'a**, des **PHB 2**, dem - neben dem Glykogen - häufigsten mikrobiologischen Energie-reservematerial [12]⁴⁾. Da es Mikroorganismen gibt, welche bei entsprechender «Fütterung» über 80% ihres Trockengewichtes als **PHB** speichern können, z.B. sog. «Knallgasbakterien», *Hydrogenomonas eutropha* [14]), und da **PHB** möglicherweise bald im industriellen Maßstab zur Verfügung stehen wird⁵⁾, erschien es uns angebracht, ein ergiebiges Verfahren zur Depolymerisierung von **PHB** auszuarbeiten.



Das **PHB**-Ausgangsmaterial haben wir aus *Alcaligenes eutrophus H 16* gewonnen, einem Mikroorganismus⁶⁾, den man beinahe ebenso leicht zum Fermentieren bringen kann [17] wie die Bäckerhefe. Eine ausführliche Vorschrift, nach der durch Fermentation 60-70 g getrocknetes Zellmaterial (**ZM**) mit ca. 60% **PHB**-Gehalt hergestellt werden kann, ist im *Experimentellen Teil* angegeben.

Das reine Polymere kann aus dem Zellmaterial als solches herausgelöst werden, es gelingt aber auch eine direkte Depolymerisierung zu monomeren β -Hydroxybuttersäureestern direkt aus dem Zellmaterial (**ZM-PHB**, siehe unten). Einige Depolymerisierungsversuche führten wir mit zwei verschiedenen formulierten **PHB**-Proben durch, einem feinen weissen Pulver oder einem ca. 5×2 mm Granulat⁷⁾.

2) Im *Experimentellen Teil* wird die Bestimmung (nach Mosher) der Enantiomerenreinheit beschrieben (siehe auch unten, Fig. 1).

3) In [9] wird über die Herstellung von **1** mit > 97% ee berichtet.

4) Übersichten über «The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms» und über «Pyrolysis of Bacterial Polyalkanoates» siehe [12] bzw. [13].

5) Schlagzeilen wie «ICI to make textiles from bacteria?» [15] oder «British route to polymer hinges on bacteria» [16] beziehen sich auf **PHB** (siehe auch letzten Abschnitt vor dem *Experimentellen Teil* und *Fussnote* 7).

6) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Nr.428, Göttingen, und American Type Culture Collection Nr. 17699.

7) Aus einer Pilot-Anlage zur Gewinnung von **PHB**, Imperial Chemical Industries, Great Britain; siehe auch *Fussnote* 5 und Dank vor dem *Experimentellen Teil*.

Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit von *PHB* aus *Alcaligenes eutrophus H16* reduzierten wir eine Probe mit Lithiumalanat (LAH) in Tetrahydrofuran (THF) zum Diol **3a** [18], dessen primäre OH-Gruppe benzyliert (\rightarrow **3b**) und dessen sekundäre OH-Gruppe mit dem Mosher-Reagenz [19] umgesetzt wurde (\rightarrow **3c**). In *Figur 1* ist das ^{19}F -NMR.-Spektrum der so erhaltenen Probe den Spektren von Proben anderer Herkunft (siehe *Exper. Teil*) gegenübergestellt. Wie man sieht, ist *PHB* nach dieser Analysenmethode aus enantiomerenreiner (*R*)-3-Hydroxybuttersäure aufgebaut⁸).

Das Diol (*R*)-**3a** ist ein leicht zugängliches Abbauprodukt des *PHB* und kann wie das (*S*)-Enantiomere [1] [6] als Ausgangsmaterial für Synthesen dienen [18]. Im Gegensatz zu der zu **3a** führenden reduktiven Depolymerisierung von *PHB* ist dessen Spaltung zu monomerer β -Hydroxybuttersäure oder ihren Estern **1'** im präparativen Maßstab schwierig: Die saure Hydrolyse zu β -Hydroxybuttersäure (**1'a**) gelingt gar nicht [21], die alkalische Hydrolyse z. B. mit Natriumcarbonat zum Natriumsalz von **1'a** gelingt nur schlecht [20], für alkalische oder saure Alkoholyse [17] oder Hydrazinolyse [21b] müssen lange Reaktionsdauer und/oder scharfe

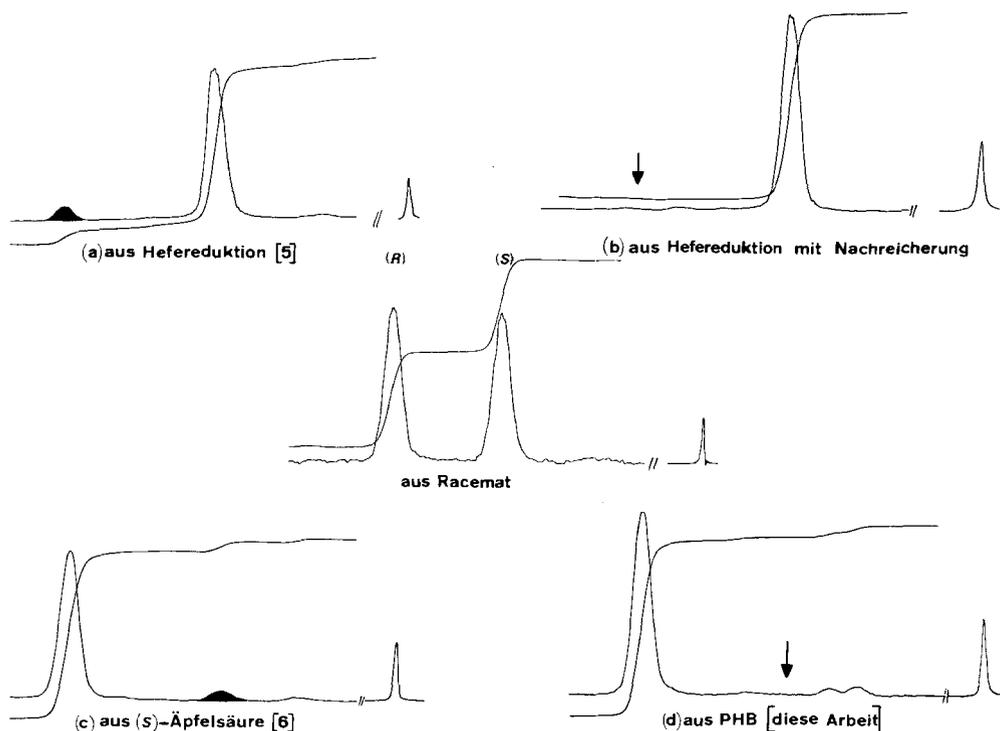


Fig. 1. ^{19}F -NMR.-Spektren von Proben von **3c** verschiedener Herkunft. Die Spektren wurden mit einem Varian XL100 Spektrometer bei 94,1 MHz aufgenommen. Referenzsignal: Trifluoressigsäure.

⁸) Das Natriumsalz der Säure **1'a** aus *PHB* wurde nach Umkristallisieren ebenfalls enantiomerenrein erhalten [20] [21].

Bedingungen wie erhöhte Temperatur oder Arbeiten unter Druck in Kauf genommen werden. Die Hauptkomplikation ist die «Crotonisierung» [20] [21], also Eliminierung beim Abbau oder Dehydratisierung des gebildeten Monomeren unter den Abbaubedingungen. Ausserdem kann durch Hydratisierung der gebildeten Crotonsäurederivate racemische β -Hydroxybuttersäure entstehen.

Wir fanden jetzt, dass die auch mit anderen empfindlichen funktionellen Gruppen verträgliche [22], in der Patentliteratur schon vor vielen Jahren beschriebene [23] Methode der Umesterung unter Titanatkatalyse erfolgreich auf *PHB* angewendet werden kann: Beim Erhitzen einer Mischung aus *PHB*, Äthanol und Tetraäthyltitanat *ca.* 2.5:40:1 (Gew. Verh.) im Autoklaven auf 115–160° entsteht der Äthylester **1'c**, der ohne wässrige Aufarbeitung durch Destillation des Gemisches in hoher Ausbeute isoliert werden kann. Drehwertvergleich mit authentischen Proben [6] zeigt, dass der (*R*)-konfigurierte Ester in optisch reiner Form anfällt. Die Depolymerisierung zum Äthylester gelingt auch direkt mit dem getrockneten, *PHB*-haltigen Zellmaterial. Um die für die Umesterung unter Monomerisierung notwendige Temperatur ohne Druckgefäss zu erreichen, testeten wir auch andere Alkohole⁹⁾ als Äthanol. In siedendem Butanol erhielten wir aus zellfreiem *PHB* – und nur aus diesem – den Butylester **1'd** nach 25 Stunden in 75% Ausbeute. Vorteil der Titanatmethode ist, dass sie ohne wässrige Aufarbeitung auskommt, Nachteil bei der Herstellung des Äthylesters **1'c** ist die Notwendigkeit der Durchführung der Reaktion im Druckgefäss.

Die Schwefelsäure-katalysierte Depolymerisierung von *PHB* in Chloroform/Methanol bei 100°, ein *analytisches* Verfahren von *Lafferty et al.* [17] zur Bestimmung von *PHB* in Biomasse, erfordert ebenfalls ein Druckgefäss. Wir fanden in Dichloräthan ein Lösungsmittel, in dem *PHB* oder *PHB*-haltiges Zellmaterial auch im präparativen Maßstab ohne Druckgefäss unter Schwefelsäure-Katalyse mit Alkoholen wie Methanol, Äthanol oder 2-Methoxyäthanol durch Erhitzen unter Rückfluss und wässrige Aufarbeitung zu den enantiomerenreinen Estern **1'b**, **1'c**, bzw. **1'f** in Ausbeuten um 85% abgebaut werden kann.

Mit den im *Experimentellen Teil* angegebenen Vorschriften werden die Ester der (*R*)-konfigurierten 3-Hydroxybuttersäure und damit die chiralen Synthesebausteine **A'** ebenso leicht zugänglich wie bisher nur die (*S*)-konfigurierten Enantiomeren. Die 3-Hydroxybuttersäure reiht sich damit in die Gruppe der einfachen, in *beiden* enantiomeren Formen als Ausgangsmaterialien leicht zugänglichen Hydroxycarbonsäuren (*R*)-¹⁰⁾ und (*S*)-Milchsäure, (*R*)- und (*S*)-Mandelsäure, (*R*)-[6] and (*S*)-Äpfelsäure, (*R*)- und (*S*)-2-Hydroxyglutarsäure¹¹⁾ und (*R*, *R*)- und (*S*, *S*)-Weinsäure [1] ein.

Wir danken Herrn Professor Dr. *R.M. Lafferty* und Dr. *G. Braunegg* von der Technischen Universität Graz für die Hilfe beim Erlernen der Fermentationstechnik. Herrn Dr. *L.F. Wright* von der *Agricultural Division* der *ICI* in Billingham (England) danken wir für die Überlassung grösserer Mengen von *PHB*. – Der *Sandoz AG* (Basel) sind wir für die finanzielle Unterstützung unserer Arbeit zu Dank verpflichtet, Herrn Dipl. Chem. *R. Weber* für die Hilfe bei der Ausarbeitung einer Vorschrift.

⁹⁾ Methanol kann für diese Umesterung wegen der Schwerlöslichkeit von $(\text{CH}_3\text{O})_4\text{Ti}$ prinzipiell nicht verwendet werden; auch *t*-Butylester sind so bisher nicht zugänglich [22].

¹⁰⁾ Der Isobutylester der (*R*)-Milchsäure wird neuerdings von der *BASF AG* (Ludwigshafen) produziert.

¹¹⁾ Aus den beiden Glutaminsäuren in einem Schritt zugänglich [24].

Experimenteller Teil

1. Allgemeine Bemerkungen. S. [25] und frühere Mitteilungen. Zusätzlich: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden mit *Varian-EM-390*, UV./VIS.-Spektren mit *Beckmann UV.* bzw. Visible Spectrophotometer Modell *DB* aufgenommen.

2. Hefereduktion von Acetessigestern zu (S)-3-Hydroxybuttersäureestern. - 2.1. *Herstellung von (S)-3-Hydroxybutansäurebutylester (1d) aus Acetessigsäurebutylester.* In einem 2-l-Dreihalskolben mit Blasenähler und mechanischem Rührer wurden 125 g Bäckerhefe (*Kliffel & Co. S.A., Rheinfelden*) mit einer 30° warmen Lösung von 160 g Saccharose in 800 ml frischem Leitungswasser aufgeschlämmt, mit 10 g (63 mmol) Acetessigsäurebutylester [22] versetzt und 1 Tag bei 30° gerührt. Das Gemisch wurde mit weiteren 100 g Saccharose in 100 ml Wasser versetzt und 3 Tage bei 30° gerührt. Zur Aufarbeitung wurden 50 g *Celite* zugegeben und das Gemisch über eine Glasfilternutsche G4 \varnothing 17 cm filtriert. Nach Zugabe von 170 g NaCl wurde 4mal mit je 250 ml Äther extrahiert. (Zur Zerstörung von Emulsionen wurde die wässrige Phase bis zur Emulsionsgrenze abgelassen, wenig Wasser zugegeben und gut geschüttelt.) Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und i. RV. bei 35° Badtemp. i.V. eingedampft. Destillation über eine 5-cm-*Vigreux*-Kolonnen ergab 5,84 g (58%) **1d** als farblose Flüssigkeit vom Sdp. 89-95°/11 Torr, $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +30,8^\circ$ ($c=1$, CHCl_3). Die hier eingesetzte Menge Butylacetessigesters ist - bezogen auf das Fermentationsvolumen - nur ca. die Hälfte der beim Äthylester üblichen Menge [5]. Zugabe von mehr Acetessigsäurebutylester brachte die Fermentation zum Stillstand und führte zu unvollständiger Reduktion.

Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit wurde **1d** durch Umesterung nach der Titanatmethode [22] [23] in **1b** übergeführt, dessen spezifischer Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +39,1^\circ$ ($c=1$, CHCl_3) einem Enantiomerenüberschuss von 90% entspricht [6].

2.2. *Herstellung von (S)-3-Hydroxybutansäure-*t*-butylester (1e) aus Acetessigsäure-*t*-butylester.* Analog der für den Äthylester angegebenen Vorschrift [5]. Eingesetzt wurden 160 g Bäckerhefe (*Kliffel & Co. S.A., Rheinfelden*), 250 g Saccharose in 1,3 l frischem Leitungswasser, 8 g (51 mmol) Acetessigesters, dann weitere 150 g Zucker in 200 ml Wasser. Destillation des Rohproduktes ergab 4,97 g (61%) **1e** als farblose Flüssigkeit vom Sdp. 74-79°/11 Torr, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +30,8^\circ$ ($c=1$, CHCl_3). Die hier eingesetzte Menge Acetessigsäure-*t*-butylester ist - bezogen auf das Fermentationsvolumen - nur ca. ein Drittel der beim Äthylester üblichen Menge [5]. Zugabe von mehr *t*-Butylester führte zu unvollständiger Reduktion.

Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit wurde **1e** durch Umesterung nach der Titanatmethode [22] [23] in den Äthylester **1b** übergeführt, dessen spezifischer Drehwert von $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +37,0^\circ$ ($c=1$, CHCl_3) einem Enantiomerenüberschuss von 85% entspricht [6].

3. Mikrobiologische Herstellung von PHB (2). Im folgenden wird eine von uns ausgearbeitete und von verschiedenen Mitarbeitern insgesamt fünfmal durchgeführte Vorschrift zur Fermentation von *Alcaligenes eutrophus H16* beschrieben, vgl. dazu [14] [17] [20].

3.1. *Herstellung von Schräg-Agar.* Eine Lösung von 0,22 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,04 g KH_2PO_4 , 0,07 g NH_4Cl , 0,3 g Fructose und 0,1 g *Bacto Nutrient Broth* pH 6,8 (*Difco*, Detroit) in 50 ml Leitungswasser wird mit 0,9 g Agar-Agar versetzt, im 85° warmen Wasserbad erhitzt und auf 8 Reagenzgläser verteilt. Diese wurden mit Watte verschlossen, mit Alufolie abgedeckt und 15 Min. in einem Sterilisierungsautoklaven¹²⁾ bei 120° sterilisiert. Beim Abkühlenlassen wurden die Reagenzgläser schräg gestellt, um eine möglichst grosse Agaroberfläche zu erreichen.

3.2. *Überimpfen.* Eine Impföse aus rostfreiem Stahl wurde in einer Bunsenbrennerflamme ausgeglüht. Die Öffnungen eines der Schräg-Agar-Reagenzgläser und des Reagenzglases mit dem Bakterienmaterial wurden abgeflammt. Ein Teil des Bakterienmaterials wurde mit der Impföse entnommen und in einer Schlangenlinie über die Agar-Oberfläche verstrichen. Die Öffnungen der so erhaltenen 8 beimpften Schräg-Agar-Reagenzgläser wurden abgeflammt und mit Watte verschlossen. Die Reagenzgläser wurden senkrecht für 5 Tage bei 30° im thermostatierten Wasser- oder Ölbad gehalten, wobei sich weissgelbe Kolonien auf den Agar-Oberflächen bildeten.

3.3. *Fermentation.* Die in *Figur 2* gezeigte Apparatur wurde ohne den Blasenähler A und ohne den Glasflussmeter 1 bei 120° sterilisiert¹²⁾. Zugleich wurden in höchstens halbgefüllten *Erlenmeyer-*

¹²⁾ Es standen uns ein 10-l-Sterilisierungsautoklav und ein 1000-l-*Gettinge*-Autoklav Typ GE1000 zur Verfügung.

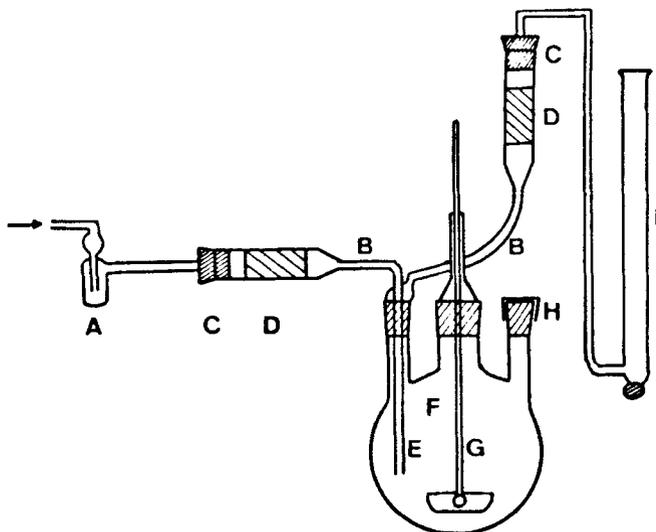


Fig. 2. Fermentationsapparatur.

A Blasen­zähler	D Wattefilter	G Mechanischer Rührer (Rührblatt 9 cm)
B Mit Schlauchbriden gesicherter Silikonschlauch	E Gaseinleitungsrohr ohne Fritte	H Serumstopfen
C Gummistopfen	F 6-l-3-Halskolben	I Gasflussmeter

Kolben, verschlossen mit Wattestopfen und Alufolie darüber, während 20 Min. folgende 9 Lösungen sterilisiert: 36 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ und 6 g KH_2PO_4 in 0,5 l Leitungswasser; 11,2 g NH_4Cl in 0,5 l Leitungswasser; 0,8 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und 0,08 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 0,5 l Leitungswasser; 120 g Fructose in 0,5 l Leitungswasser (vorher gelöst im Wasserbad); 1,5 l Leitungswasser; 20 ml Wasser zu dem nach der Sterilisierung bei RT. 1 Tropfen konz. Schwefelsäure, 0,04 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und 2 Tropfen CHCl_3 gegeben wurden; 1 ml Polypropylenglykol 2000 in 10 ml Wasser als Antischaummittel; 100 ml, 10proz. NaOH-Lösung für die spätere pH-Korrektur; 120 g Fructose in 0,5 l Leitungswasser für die Nachreicherung und ein Teflonschlauch (1,5 m \times 0,5 cm). Nach der Sterilisierung wurden eine der beiden Fructoselösungen, die NaOH-Lösung und die Polypropylenglykolemulsion weggestellt. Mit dem Teflonschlauch wurden die restlichen auf RT. abgekühlten Lösungen in die Apparatur transferiert. Es wurde für 2 Min. Luft eingeleitet. Die Kolben- und die jeweiligen Schräg-Agar-Reagenzglasöffnung wurden abgeflammt, die Impföse ausgeglüht und der gesamte Bakterienbelag der 5 am dichtesten bewachsenen Schräg-Agar-Kulturen überimpft. Der Kolbenhals wurde wieder mit der Serumkappe verschlossen und die Luftzufuhr (Pressluft) auf 2 l/Min. eingestellt. Gleichzeitig wurde mit einer Drehzahl von ca. 500 Umdrehungen/Min. gerührt, wobei feinverteilte Blasen sichtbar waren, sowie mit einem Wasserbad auf 30° geheizt. Nach 3 Tagen war die Lösung trüb mit Schaum, und es wurden 8 ml der 10proz. Polypropylenglykolemulsion (s.o.) zugegeben. Einen Tag später hatte die optische Dichte¹³⁾ bei 420 nm 30–50 erreicht. Der pH wurde mit etwa 50 ml 10proz. NaOH-Lösung auf pH 7,0 korrigiert, und die zweite Lösung von 120 g Fructose in 0,5 l Wasser wurde zugegeben. Nach einem weiteren Tag wurde die Luft auf 1 l/Min. reduziert. Die Fermentation wurde nach insgesamt 8 Tagen bei einer optischen Dichte¹³⁾ bei 420 nm von etwa 120 beendet.

3.4. Aufarbeitung. Die Fermentationslösung wurde in einem 10-l-Erlenmeyer-Kolben mit 3,5 l Aceton vereinigt, kurz umgerührt und über Nacht stehengelassen. Das Zellmaterial setzte sich ab und

¹³⁾ Hierzu wurde 1 ml Fermentationslösung mit H_2O auf 200 ml verdünnt und in einer 1 cm Küvette die Extinktion E bei 420 nm gemessen; die optische Dichte der Fermentationslösung ist dann $200 \times E$.

die überstehende Lösung konnte bis auf 1,3 l abdekantiert werden. Wiederum wurden 2 l Aceton zugegeben, stehengelassen und abdekantiert. Die verbliebene breiige Masse wurde auf einer Saugflasche mit einer Glasfilternutsche G4 \varnothing 17 cm filtriert. Zum Filterkuchen wurden 250 ml Aceton gegeben, aufgeschlämmt, 5 Min. stehengelassen und wieder abgesaugt. Das Zellmaterial wurde 2 Std. bei 60° i.RV. und anschliessend 5 Std. i.HV. getrocknet. Es resultierten 65-75 g Zellmaterial mit einem *PHB*-Gehalt von 60-70% (*ZM-PHB*).

3.5. *Extraktion von PHB aus ZM-PHB*. In einer Soxhlet-Apparatur wurden 10 g *ZM-PHB* für 3 Tage mit CHCl_3 extrahiert. Die Lösung wurde i.RV. auf 100 ml eingengt und durch Zugabe von 500 ml Äther unter starkem Rühren das *PHB* gefällt. Nach dem Abfiltrieren und nach der Befreiung vom Lösungsmittel i.RV. sowie 5 Std. i.HV. resultierten 6-7 g **2** (*PHB*).

Die im folgenden beschriebenen Reaktionen wurden entweder mit zellhaltigem Material (*ZM-PHB*) oder mit dem wie oben erhaltenen zellfreien Produkt (*PHB*) oder aber mit pulvrigem (*P-PHB*) oder granuliertem (2×5 mm, *G-PHB*) von der ICI zur Verfügung gestellten Proben⁵⁾ durchgeführt.

4. **Reduktive Depolymerisierung von PHB mit LAH**. - 4.1. *Herstellung von (R)-1,3-Butandiol (3a) aus P-PHB (2)*. Zu einer Suspension von 10 g (0,264 mmol) LiAlH_4 in 460 ml THF wurden unter Eisbadkühlung bei 15° 30 g (0,349 mmol) **2** (*P-PHB*) in 40 Min. gegeben. Das Gemisch wurde 90 Min. bei RT. gerührt, 5 Std. unter Rückfluss erhitzt, über Nacht bei RT. gerührt und dann bei 0° durch vorsichtiges Zutropfen von 10 ml Wasser, 30 ml 10proz. NaOH-Lösung und 30 ml Wasser hydrolysiert. Der gebildete weisse Niederschlag wurde abfiltriert, 2mal mit je 150 ml CH_2Cl_2 je 0,5 Std. ausgekocht, abfiltriert und mit 100 ml CH_2Cl_2 gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und i.RV. eingedampft. Der Rückstand wurde destilliert: 26,55 g (85%) **3a**, Sdp. 98-102°/11 Torr; ($d_4^{25} = 0,995$ g/cm³); $[\alpha]_D^{25} = -30,2^\circ$ ($c = 1$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), $[\alpha]_D^{25} = -30,87^\circ$ (*pur.*) ($[\alpha]_D^{25} = -31^\circ$ ($c = 1,5$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), [26]: $[\alpha]_D^{25} = -31,6^\circ$ ($c = 1$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)). - ¹H-NMR. (90 MHz, CDCl_3): 1,21 (*d*, $J = 6$, 3 H, 3 H-C(4)); 1,55-1,78 (*m*, 2 H, 2 H-C(2)); 3,53-4,17 (*m*, 5 H, 2 HO, 2 H-C(1) und 1 H-C(3)).

Überführung des Diols (R)-(-)-3a über Benzoesäure-[(R)-3-hydroxybutyl]ester (3b) in (R)-2-Methoxy-2-trifluormethylphenyllessigsäure-[(R)-4-benzoyloxy-2-butyl]ester (3c) Bestimmung der Enantiomerenreinheit nach Mosher. Nach [6] wurden aus 86 mg (0,95 mmol) **3a** 144 mg (78%) **3b** vom Siedepunkt (Kugelrohr) 130°/0,01 Torr und mit einer spezifischen Drehung $[\alpha]_D^{20} = -18,9^\circ$ ($c = 1$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) erhalten.

Nach den Angaben von Mosher *et al.* [19] wurden in ein trockenes Glühröhrchen mit Magnetrührer und Serumstopfen mit Hilfe von Spritzen in der angegebenen Reihenfolge gegeben: 600 μl Pyridin, 52 μl (0,28 mmol) (+)-(*S*)-*a*-Methoxy-*a*-trifluormethylphenyllessigsäurechlorid (*Fluka AG*), 600 μl CCl_4 und 38,7 mg (0,2 mmol) **3b**. Nach Rühren über Nacht bei RT. wurden 48 μl N,N-Dimethyl-1,3-propandiamin zugefügt und nach 5 Min. mit Äther verdünnt, 3mal mit kalter 1N HCl, einmal mit ges. Na_2CO_3 -Lösung, 3mal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, i.RV. eingedampft und noch 15 Min. i.HV. von Lösungsmittelresten befreit. - ¹H-NMR. (90 MHz, CDCl_3): 1,38 (*d*, $J = 6$, 3 H, 3 H-C(1)); 1,95-2,20 (*m*, 2 H, 2 H-C(3)); 3,53 (*br. s.*, 3 H, CH_3O); 4,07-4,57 (*m*, 2 H, 2 H-C(4)); 5,20-5,53 (*m*, 1 H, H-C(2)); 7,27-7,70 (*m*, 8 H, arom. H); 8,03-8,13 (*m*, 2 H, arom. H). - ¹⁹F-NMR. (94,1 MHz, CCl_4 , Referenz CF_3COOH , nicht entkoppelt): 5,00 (*br. s.*, 3 F-C). Das CF_3 -Signal des (*R,S*)-Diastereomeren **3c** ist im Spektrum nicht zu entdecken (siehe auch *Fig. 1d*).

In *Figur 1* sind auch die ¹⁹F-NMR.-Spektren von **3c** anderer Herkunft gezeigt. Die entsprechenden Proben wurden folgendermassen erhalten: *a*) Verbindung **1c** vom $[\alpha]_D^{20} = +35,3^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3) aus Hefereduktion wurde wie oben für *PHB* beschrieben zu (+)-(*S*)-**3a** reduziert, das in **3c** überführt wurde; *b*) Wie in [6] beschrieben, wurde **1c** aus der Hefereduktion über das kristalline 3,5-Dinitrobenzoesäureester zu einer Probe von $[\alpha]_D^{20} = +43,5^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3) angereichert, die dann ebenfalls in **3c** übergeführt wurde; *c*) Das aus (*S*)-Äpfelsäure hergestellte Diol **3a** [6] vom $[\alpha]_D^{25} = -31^\circ$ ($c = 1,5$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) lieferte nach Umwandlung in **3c** das entsprechende Spektrum in *Figur 1*. Aus den Integrationen der ¹⁹F-NMR.-Spektren folgen für die enantiomerenreine Verbindung **1c** ($d_4^{25} = 1,001$ g/cm³) spezifische Drehwerte von $[\alpha]_D^{25} = -19,05^\circ$ (*pur.*) oder $[\alpha]_D^{25} = -43,6^\circ$ ($c = 1,2$, CHCl_3), für das Diol **3a** ($d_4^{25} = 0,995$ g/cm³) von $[\alpha]_D^{25} = -30,87^\circ$ (*pur.*) oder $[\alpha]_D^{25} = -30,2^\circ$ ($c = 1$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$).

5. **Depolymerisierung von PHB durch Titanat-katalysierte Umesterung**. - 5.1. *Herstellung von (R)-3-Hydroxybutansäureäthylester (1c) aus ZM-PHB*. In einen 1-l-Hubmagnet-Autoklaven (*A. Hofer*, D-Müllheim/Ruhr) wurden 30 g *ZM-PHB* (70proz. an **2**, 245 mmol), 600 ml absolutes Äthanol und

12 g Tetraäthyltitanat gegeben und unter ständigem Durchmischen 2 Std. auf 160° und 32 Std. auf 115° Innentemperatur erhitzt. Das Gemisch wurde über eine Glasfilternutsche (G4, \varnothing 12 cm) filtriert, der Filterkuchen mit 100 ml Äthylalkohol gewaschen und das Filtrat i.R.V. bei einer Badtemp. von 30° eingedampft. Der Rückstand wurde in einer Kurzwegdestillationsapparatur unter Magnetrührung bei 72-73°/11 Torr rasch destilliert, das Tetraäthyltitanat (Sdp. 110-115°/0,1 Torr) verbleibt als Rückstand. Das Destillat besteht aus 25,4 g (78%) **1'c** vom $[\alpha]_D^{25} = -42,0^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3). Alle spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturangaben [5] [6] überein.

5.2. *Verbindung 1'c aus G-PHB*. Analog zu 5.1. wurden aus 25 g G-PHB 24,2 g (63%) **1'c** erhalten, $[\alpha]_D^{25} = -42,0^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3). Die geringere Ausbeute lässt darauf schliessen, dass während der Destillation in Gegenwart des Tetraäthyltitanats zum Teil Crotonisierung oder «Repolymerisierung» eintritt.

5.3. *Verbindung 1'c aus PHB mit wässriger Aufarbeitung*. Nach der Depolymerisierung von 15 g PHB nach 5.1. wurde zur Aufarbeitung i.R.V. bei 30° Badtemp. auf ca. 60 ml eingengt und 60 ml 1N HCl zugegeben. Nach 10 Min. wurde mit NaCl gesättigt und 3mal mit Äther (400, 250, 250 ml) extrahiert. Die organischen Phasen wurden 2mal mit einem Gemisch von je 50 ml ges. NaCl- und 10 ml ges. NaHCO_3 -Lösung, einmal mit 50 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert, eingedampft, und der Rückstand i.V. destilliert. Ausbeute 17,7 g (77%) **1'c** vom $[\alpha]_D^{25} = -41,5^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3).

5.4. *Herstellung von 1'c aus ZM-PHB mit wässriger Aufarbeitung*. Analog zu 5.3 wurden aus 30 g ZM-PHB (51proz. an **2**) - nach Abfiltrieren des Zellmaterials vor der wässrigen Aufarbeitung - 20,9 g (89%) **1'c**, $[\alpha]_D^{25} = -43,5^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3).

5.5. *Herstellung von (R)-3-Hydroxybutansäurebutylester (1'd) aus P-PHB und Butanol ohne Autoklav*. In einem 100-ml-Rundkolben mit Rückflusskühler und Trockenrohr wurden 1,5 g (17 mmol) PHB, 70 ml Butanol und 1,5 g Tetraäthyltitanat gegeben und 27 Std. unter Rückfluss erhitzt. Danach wurden 50 ml 1N HCl zugegeben, 5 Min. gerührt und 3mal mit je 100 ml Äther extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit einem Gemisch von 7 ml ges. NaHCO_3 -Lösung und 35 ml ges. NaCl-Lösung, danach mit 35 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und i.R.V. eingedampft (55° Badtemp.). Das Rohprodukt wurde in einer Mikrodestillationsapparatur mit 5-cm-Vigreux-Kolonnen destilliert: 2,07 g (74%) **1'd**, $[\alpha]_D^{25} = -35,2^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3).

6. Säurekatalysierter Abbau von PHB zu monomeren Estern. - 6.1. *Herstellung von (R)-3-Hydroxybutansäuremethylester (1'b) aus P-PHB*. In einen 100-ml-Rundkolben wurden 5 g P-PHB, 25 ml einer Lösung von 0,75 ml konz. Schwefelsäure in abs. Methanol und 25 ml 1,2-Dichloräthan gegeben und 24 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT. wurden 10 ml halbverdünnte NaCl-Lösung zugegeben und einmal mit 50 ml und 3mal mit je 20 ml Äther extrahiert. Die organischen Phasen wurden je einmal mit 10 ml ges. NaHCO_3 - und 10 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und i.R.V. bei 30° Badtemp. eingedampft. Kurzwegdestillation ergab 5,78 g (84%) **1'b** als farblose Flüssigkeit, $d_4^{25} = 1,045$ g/cm³, $[\alpha]_D^{25} = -48,6^\circ$ ($c = 1,3$, CHCl_3), $[\alpha]_D^{25} = -23,50$ (pur.) ([27]; $[\alpha]_D^{20} = -21,09^\circ$).

6.2. *Herstellung von 1'b aus ZM-PHB*. Analog zu 6.1. wurden aus 20 g ZM-PHB (61proz. an **2**) in einer Mischung aus 100 ml abs. Methanol, 3 ml konz. Schwefelsäure und 100 ml 1,2-Dichloräthan nach 48 Std. Erhitzen unter Rückfluss 13,7 g (82%) **1'b** erhalten, $d_4^{20} = 1,049$ g/cm³, $[\alpha]_D^{25} = -48,4^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3), $[\alpha]_D^{20} = -23,23^\circ$ (pur.).

6.3. *Herstellung von (R)-3-Hydroxybutansäureäthylester (1'c) aus P-PHB*. Analog zu 6.2. wurde ein Gemisch aus 5 g (60 mmol) P-PHB, 36 ml einer Lösung von 1,1 ml konz. Schwefelsäure in abs. Äthanol und 36 ml 1,2-Dichloräthan für 37 Std. unter Rückfluss erhitzt und aufgearbeitet: 5,97 g (78%) **1'c**, $d_4^{24} = 1,001$ g/cm³, $[\alpha]_D^{24} = -43,6^\circ$ ($c = 1,2$, CHCl_3), $[\alpha]_D^{24} = -19,05^\circ$ (pur.).

6.4. *Herstellung von 1'c aus ZM-PHB*. Analog zu 6.3. ergaben 5 g ZM-PHB (61proz. an **2**) in 36 ml einer Lösung von 1,1 ml konz. Schwefelsäure in abs. Äthylalkohol und 36 ml 1,2-Dichloräthan nach dem Erhitzen unter Rückfluss für 51 Std. 3,86 g (82%) **1'c**, $[\alpha]_D^{25} = -43,3^\circ$ ($c = 1,0$, CHCl_3).

6.5. *Herstellung von (R)-3-Hydroxybutansäure-(2-methoxyäthyl)ester (1'f) aus P-PHB*. In einem 500-ml-Rundkolben mit Rückflusskühler und Trockenrohr wurden 5 g P-PHB (60 mmol), 150 ml einer Lösung von 4,5 ml konz. Schwefelsäure in 2-Methoxyäthanol und 150 ml 1,2-Dichloräthan 28 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT. wurden 40 ml Wasser zugegeben und die wässrige Phase einmal mit 150 ml 1,2-Dichloräthan und 2mal mit je 200 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Die organischen Phasen wurden je einmal mit 40 ml ges. NaHCO_3 - und 80 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und eingengt. Der Rückstand wurde kurzwegdestilliert. Es resultierten 8,12 g

(86%) **1f**, $[\alpha]_D^{25} = -32,5^\circ$ ($c=1$, CHCl_3). - IR. (CHCl_3): 2540 ν , 2970 m , 2930 m , 2890 m , 1720 s , 1450 m , 1400 m , 1375 m , 1320 m , 1125 s , 1055 m , 1033 m . - $^1\text{H-NMR}$. (90 MHz, CDCl_3): 1,22 (d , $J=6$, 3 H-C(4)); 2,43-2,55 (m , 2 H-C(2)); 3,03 ($br. s$, 1 H, HO); 3,40 (s , 3 H, CH_3O); 3,53-3,73 (m , 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$); 4,03-4,37 (m , 3 H, $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_4$ und H-C(3)).

$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_4$ (162,19) Ber. C 51,84 H 8,70% Gef. C 51,52 H 9,01%

7. Hydrolyse von 1c zu (R)-3-Hydroxybutansäure (1a). - In Analogie zu [28] wurden in einem 250-ml-Rundkolben 90 ml eisgekühlte 1N KOH (90 mmol) und 10 g (76 mmol) **1c** gegeben, kurz gerührt und bei 0° 24 Std. stehengelassen. Zum Gemisch wurden ca. 90 ml wässriges 1N HCl bis pH ca. 1 gegeben. Extraktion mit Äther in einem Kutscher-Stuedel-Extraktor (24 Std.), Eindampfen und Destillation lieferten 7,32 g (93%) **1a** als farblose Flüssigkeit vom Sdp. 85-87°/0,08 Torr, $[\alpha]_D^{25} = -24,7^\circ$ ($c=5$, H_2O), ([29]: $[\alpha]_D^{25} = -24,5^\circ$ ($c=5$, H_2O)).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] D. Seebach & E. Hungerbühler, «Modern Synthetic Methods 1980», Herausgeber: R. Scheffold, Salle + Sauerländer-Verlag, Frankfurt und Aarau 1980.
- [2] M. Züger, T. Weller & D. Seebach, Helv. Chim. Acta 63, 2005 (1980); D. Seebach & D. Wasmuth, Helv. Chim. Acta 63, 197 (1980); D. Wasmuth, D. Arigoni & D. Seebach, Helv. Chim. Acta 65, 344 (1982); G. Fräter, Tetrahedron Lett. 1981, 425; und darin zit. frühere Arbeiten dieser Gruppe.
- [3] R. V. Lemieux & J. Giguere, Can. J. Chem. 29, 678 (1951).
- [4] B. S. Deol, D. D. Ridley & G. W. Simpson, Aust. J. Chem. 29, 2459 (1976).
- [5] B. Seuring & D. Seebach, Liebigs Ann. Chem. 1978, 2044; B. Seuring & D. Seebach, Helv. Chim. Acta 60, 1175 (1977).
- [6] E. Hungerbühler, D. Seebach & D. Wasmuth, Helv. Chim. Acta 64, 1467 (1981).
- [7] H. Gerlach, K. Oertle & A. Thalman, Helv. Chim. Acta 60, 2860 (1977).
- [8] G. Fräter, Helv. Chim. Acta 63, 1383 (1980); R. W. Hoffmann, W. Ladner, K. Steinbach, W. Massa, R. Schmidt & G. Snatzke, Chem. Ber. 114, 2786 (1981).
- [9] A. J. Meyers & R. A. Amos, J. Am. Chem. Soc. 102, 870 (1980).
- [10] V. Prelog, Z. Kis & E. Hochuli, Dissertationen Nr. 3682, 5284, ETH Zürich (1965 bzw. 1974).
- [11] R. J. Lamed, E. Keinan & J. G. Zeikus, Enzyme and Microbial Technology 3, 144 (1981).
- [12] E. A. Dawes & P. J. Senior, Adv. in Microbial Physiology 10, 203 (1973).
- [13] H. Morikawa & R. H. Marchessault, Can. J. Chem. 59, 2306 (1981).
- [14] H. G. Schlegel, H. Kaltwasser & G. Gottschalk, Arch. Microbiol. 38, 209 (1961).
- [15] S. Yanchinski, New Scientist 89, 723 (1981).
- [16] J. H. Mannon, Chem. Eng. (N.Y.) 88, 41 (1981).
- [17] B. Sonnleitner, E. Heinzle, G. Braunnegg & R. M. Lafferty, Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 7, 1 (1979); G. Braunnegg, B. Sonnleitner & R. M. Lafferty, ibid. 6, 29 (1978).
- [18] H. Gerlach (Universität Bayreuth), Privatmitteilung 1980.
- [19] J. A. Dale & H. S. Mosher, J. Am. Chem. Soc. 95, 512 (1973); J. A. Dale, D. L. Dull & H. S. Mosher, J. Org. Chem. 34, 2543 (1969).
- [20] C. P. Lenoël, Bull. Soc. Chim. Biol. 31, 1562 (1949).
- [21] a) M. Lemoigne & N. Roukheiman, Annales des Fermentations 5, 527 (1939/40); b) J. H. Ottaway, Biochem. J. 84, 11 (1962).
- [22] D. Seebach, E. Hungerbühler, R. Naef, P. Schnurrenberger, B. Weidmann & M. Züger, Synthesis 1982, 138.
- [23] Du Pont: CA 52, 18964a (1958); Distillers Co.: CA 61: 4223f (1964); ICI: CA 66, 85608g (1967); Chemische Werke Witten: CA 73, 120354x (1970).
- [24] A. T. Austin & J. Howard, J. Chem. Soc. 3278 (1961).
- [25] D. Seebach, M. Pohmakotr, Ch. Schregenberger, B. Weidmann, R. S. Mah & S. Pohmakotr, Helv. Chim. Acta 65, 419 (1982).
- [26] S. Murakami, T. Harada & A. Tai, Bull. Chem. Soc. Jpn. 53, 1356 (1980).
- [27] E. Fischer & H. Scheibler, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 42, 1219 (1909).
- [28] K. Serck-Hanssen, S. Ställberg-Stenhagen & E. Stenhagen, Arkiv Kemi 5, 203 (1953).
- [29] H. T. Clarke, J. Org. Chem. 24, 1610 (1959).