

88. Notiz über mikrobiologische Umsetzungen mit *Halobacterium halobium*: Reduktion von 3-Oxobutansäure-ethylester und Hydrolyse von 3-Hydroxybutansäure-ethylester. Cooperative Effekte von Reduktase und Hydrolase

von Jürg Ehrler¹⁾ und Dieter Seebach*

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

(23.I.89)

Note on Biotransformations with *Halobacterium halobium*: Reduction of Ethyl 3-Oxobutanoate and Hydrolysis of Ethyl 3-Hydroxybutanoate. Cooperative Effects of Reductase and Hydrolase

The archaeobacterium *Halobacterium halobium*, growing in saturated NaCl solution, is tested for its ability to achieve biotransformations. We found that this microorganism does accept only a small variety of compounds as substrates. Ethyl acetoacetate (**1**) is reduced to ethyl (*S*)-3-hydroxybutanoate (**2**) of optical purity of 40–76%, but in low chemical yields. The reduction is accompanied by hydrolysis of the hydroxy-ester to 3-hydroxybutanoic acid (**3**). Hydrolysis of *rac*-ester **2** by *Halobacterium halobium* gives (*R*)-**2** of optical purity of up to 88%, depending upon reaction time, together with the almost racemic hydroxy-acid **3**, both in low chemical yields. Hopes that the 'extremist' *Halobacterium halobium* would be able to effect unique conversions were not fulfilled.

Die grosse Wirksamkeit von Biotransformationen in der asymmetrischen organischen Synthese ist in verschiedenen Übersichtsartikeln aufgezeigt worden [1–6]. Zu den gebräuchlichsten Mikroorganismen für präparative mikrobiologische Umsetzungen gehören die Eukaryonten (Hefen, Pilze) und die Eubakterien (z. B. Streptococcus, Escherichia, Clostridium oder Pseudomonas), während über den Einsatz von Archaeobakterien (Methanobakterien, Halobakterien, thermo-acidophile sowie Schwefel metabolisierende Archaeobakterien) unseres Wissens bis jetzt keine Veröffentlichungen erschienen. Die Archaeobakterien bilden das eigentliche Urreich der Mikroorganismen. Ihnen allen gemeinsam sind extreme Lebensbedingungen wie strikte Anaerobie, gesättigte NaCl-Lösung oder 80° heisse, saure Vulkanquellen [7] [8].

Halobacterium halobium benötigt für sein Wachstum äusserst hohe Salzkonzentrationen, wobei der intrazellulären Salzgehalt entspricht. Daneben gibt es noch weitere aussergewöhnliche Eigenschaften [9] [10]:

- Die Zellwände bestehen zum grössten Teil aus Proteinen; Kohlenhydrate sind nur in kleinen Mengen vorhanden.
- Unter gewöhnlichen Kulturbedingungen synthetisieren die Halobakterien keine Fettsäuren, so dass ihre Lipide aus Etherbindungen zu Glycerin bestehen.
- Die vorhandenen Enzyme benötigen die hohe Ionenstärke für ihre Aktivität und Stabilität. Dies wird durch einen grossen Anteil an sauren Aminosäuren erreicht.
- Bei tieferen Salzkonzentrationen oder in destilliertem H₂O lysieren die Zellen und der Zellinhalt wird freigesetzt.

Auf Grund der letztgenannten Eigenschaft, welche zur Isolierung eines Substrates einen leichten Aufschluss der Zellen ermöglichen sollte, sowie der relativ einfachen Kultivierung von *Halobacterium halobium* haben wir die Verwendbarkeit dieses Mikroorganismus für mikrobielle Transformation untersucht.

¹⁾ Teil der geplanten Dissertation von J. E., ETH Zürich.

Hohe Salzkonzentrationen verhindern das Wachstum der meisten gewöhnlichen Mikroorganismen [11], was das Züchten von *Halobacterium halobium* vereinfacht, da zum Beispiel auf eine Sterilisation des Nährmediums verzichtet werden kann. Das Nährmedium wurde nach Literaturangaben [10] mit sich auf einem Agar-Boden befindenden Bakterien oder einer Bakteriensuspension angeimpft und anschliessend bei 40° unter Bestrahlung (Neonröhre) mit 80 U/min geschüttelt. Nach vier bis fünf Tagen wurde die Lösung trübe und verfärbte sich purpur, wobei die optische Dichte bei 570 nm nicht mehr weiter zunahm. Je nach eingesetzter Menge Pepton konnten nach Zentrifugieren 3–5 g Zellen (Nassgewicht, aus 1 l Nährmedium) erhalten werden. Da sich direktes Einfrieren des Zentrifugates bei –20° sowie Gefriertrocknen zur Lagerung nicht eigneten, wurde eine Bakteriensuspension mit gesättigter NaCl-Lösung hergestellt und bei +4° gelagert. Damit konnten weitere Nährmedien angeimpft werden.

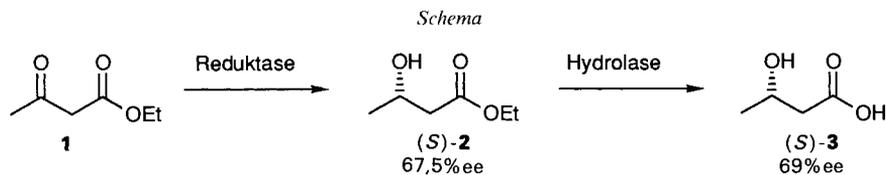
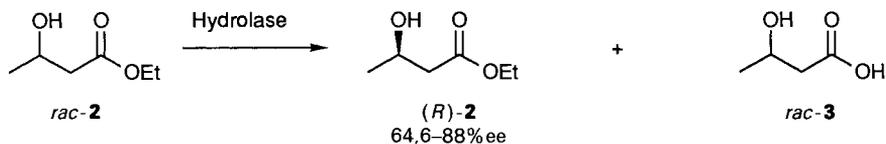
Es wurden verschiedene Substrate mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen untersucht. Dabei wurde das Substrat zu einer fast ausgewachsenen Bakterienkultur in 250 ml Nährmedium gegeben und eine mögliche Reaktion mit Hilfe von GC oder DC verfolgt. In *Tab. 1* sind die untersuchten Verbindungen aufgeführt. Bei allen Substraten –

Tab. 1. *Substrate, die auf eine mögliche Biotransformation mit Halobacterium halobium untersucht wurden*

4-Methylpent-3-en-2-on (Mesityl-oxid)
3-Methylcyclopent-2-enon
3-Chloro-4-ethoxy-2(5 <i>H</i>)-furanon
Anthracen
1-Chloro-2-methyl-3-nitropropan
4-Nitroacetophenon
4-Chloroacetessigsäure-methylester
2-Methylmaleinsäure (Citraconsäure)
4-Oxopentansäure-ethylester (Lävulinsäure-ethylester)
2-Oxocyclohexan-1-carbonsäure-ethylester
2,5-Dioxocyclohexan-1,4-dicarbonensäure-diethylester
2,2,6-Trimethylcyclohex-2-en-1-carbonsäure-methylester
3-Chloro-4-hydroxy-2(5 <i>H</i>)-furanon
Hexadienal
(<i>Z</i>)-3-Phenylprop-2-enal (Zimtaldehyd)
7-Chloro-3,4-dihydro-1(2 <i>H</i>)-naphthalinon (7-Chloro- α -tetralon)
2-Chloroacetessigsäure-ethylester
1-Chlorodecan
2-Oxobernsteinsäure-diethylester
3-Methyl-2-oxobuttersäure-ethylester
Acetessigsäure-ethylester (1)
3-Hydroxybuttersäure-ethylester (2)

ausser 3-Oxobutansäure-ethylester (1) und 3-Hydroxybutansäure-ethylester (2) – konnte nach 60–96 h jeweils nur das Edukt nachgewiesen werden. Von den Keto-estern konnten nach vier bis fünf Tagen nur noch geringe Mengen (10–15%) isoliert werden, während die anderen Verbindungen zum Teil nahezu quantitativ zurückgewonnen wurden.

Als einzige Biotransformationen wurden die Reduktion von 3-Oxobutansäure-ethylester (1) und die Hydrolyse einiger 3-Hydroxycarbonsäure-ester gefunden (s. *Schema*). Bei allen Umsetzungen wurden die besten Resultate erzielt, wenn das Substrat 8–12 h nach dem Animpfen des Nährmediums der wachsenden Kultur zugegeben wurde.

*Halobacterium halobium*

Die Reduktion des Acetessigesters **1** verlief relativ langsam (s. *Tab. 2*) und in Konkurrenz zur Hydrolyse des gebildeten Hydroxy-esters **2** zur Säure **3**. Nach drei bis vier Tagen betrug das (Edukt/Produkt)-Verhältnis der Reduktion je nach Bakterienmenge ungefähr 1:2 und veränderte sich danach kaum mehr. Verantwortlich dafür ist die langsame, enzymatische Oxidation von **2** zurück zu **1** (s. unten). Nach fünf bis sechs Tagen konnte bei fast allen Umsetzungen mittels GC weder Edukt noch Produkt nachgewiesen werden. Die chemische Ausbeute an Hydroxy-ester **2** betrug je nach dem Zeitpunkt der Aufarbeitung zwischen 10 und 20%, die Enantiomerenreinheit zwischen 40 und 76% ee. In nicht allen Versuchen konnte die Säure **3** in so grossen Mengen isoliert werden, dass eine Überprüfung ihrer optischen Reinheit möglich war.

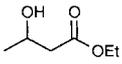
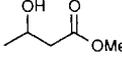
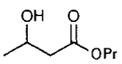
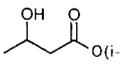
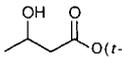
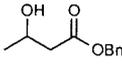
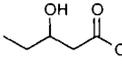
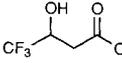
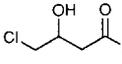
Tab. 2. Reduktionsgeschwindigkeit von 3-Oxobutansäure-ethylester (**1**) mit *Halobacterium halobium* ((Edukt/Produkt)-Verhältnis nach bestimmter Zeitdauer)

Reaktionsdauer [h]	16	28	40	64	136
Verhältnis 1/2	3:1	1:1	2:3	1:2	1:6

Auf Grund des Nachweises²⁾ der Säure **3** bei der Reduktion des Oxo-esters **1** wurde die Hydrolyse verschiedener 3-Hydroxycarbonsäure-ester mit *Halobacterium halobium* untersucht (s. *Tab. 3*). Schon eine geringe Variation der Säure- oder Alkohol-Komponente bewirkte einen Rückgang sowohl der Hydrolyse-Geschwindigkeit wie auch der Enantioselektivität. Die besten Resultate wurden mit 3-Hydroxybutansäure-ethylester (**2**) erzielt, wobei mit zunehmender Reaktionsdauer die optische Ausbeute stieg, die chemische Ausbeute hingegen stark abnahm (s. *Tab. 3, Nr. 1–5*). Gleichzeitig konnte auch das Oxidationsprodukt **1** nachgewiesen werden. Das Verhältnis von **1** zu **2** betrug nach 2,5 Tagen 1:10 und blieb dann konstant. Der Methylester **4**, die beiden Propylester **5** und

²⁾ Die bei der mikrobiologischen Verseifung gebildete Säure **3** ist nahezu racemisch. Dies sowie die zum Teil niedrigen chemischen Ausbeuten deuten darauf hin, dass die Säure im Metabolismus des Mikroorganismus 'verschwindet'.

Tab. 3. Mikrobiologische Umsetzung von 3-Hydroxyalkansäure-estern mit *Halobacterium halobium*

Edukt	Nr.	Ansatzgrösse [ml]	Reaktionsdauer [d]	Isolierter Ester ^{a)}			Isolierte Säure ^{b)}			
				Ausbeute [%]	ee [%]	Konfiguration	Ausbeute [%]	ee [%]	Konfiguration	
	2	1	250	3	27 ^{c)}	31 ^{c)}	R	–	–	–
		2	250	9	12	88	R	–	26	R
		3	1000	9	14,4 ^{c)}	88 ^{c)}	R	31	7	R
		4	1000	6	24 ^{c)}	74,5 ^{c)}	R	–	–	–
		5	1000	5	22,5 ^{c)}	64,6 ^{c)}	R	16	3	S
	4	6	250	4	45	15	R	–	–	–
		7	1000	6	14 ^{c)}	54 ^{c)}	R	10	22	R
	5	8	250	6	82	^{d)}	–	–	–	–
	6	9	250	7	45 ^{c)}	^{e)}	–	21,5	–	–
	7	10	250	7	46	^{f)}	–	47	–	–
	8	11	250	6	94	^{g)}	–	–	–	–
	9	12	250	6	78	7	R	24	–	–
	10	13	250	6	66	11	S	43	–	–
	11	14	250	6	71	4	S	–	–	–

a) Die chemische und optische Ausbeute wurden jeweils nach Reinigung durch Kugelrohr-Destillation bestimmt.

b) Die chemische Ausbeute bezieht sich auf das Rohprodukt; die optische Ausbeute wurde nach Veresterung mit CH_2N_2 zum 3-Hydroxybuttersäure-methylester bestimmt.

c) Die chemische Ausbeute wurde nach zusätzlicher Reinigung durch Säulenchromatographie bestimmt.

d) $[\alpha]_D = -0,7$.

e) $[\alpha]_D = -4,5$.

f) $[\alpha]_D = < \pm 0,5$.

g) $[\alpha]_D = < \pm 0,5$.

6, der (*tert*-Butyl)ester 7 und der Benzylester 8 wurden nur sehr langsam oder überhaupt nicht verseift, was sich in geringen Enantiomerenüberschüssen sowie zum Teil hohen Ausbeuten bei der Rückgewinnung der eingesetzten Ester zeigte. Ähnlich verhielten sich auch die an der Säurekette modifizierten Ester 9–11.

Mit diesen Ergebnissen – Reduktion von 1 und Verseifung von 2 – ist im Mikroorganismus *Halobacterium halobium* je mindestens eine Oxido-Reduktase und eine Hydrolase nachgewiesen. Die Hydrid-Übertragung der Oxido-Reduktase erfolgt wie bei der Hefe-Reduktion von der *Re*-Seite der (C=O)-Gruppe. Die Aktivität der Hydrolase scheint gegenüber jener der Oxido-Reduktase relativ hoch zu sein³⁾. Der durch die Reduktase

³⁾ Die hohe Hydrolaseaktivität könnte daher rühren, dass Archaeobakterien keine Ester-, sondern Etherlipide besitzen und somit im Zellinnern stärkere Hydrolasen vorhanden sind.

bevorzugt gebildete (*S*)-Ester **2** wird von der Hydrolase schneller gespalten als der im Unterschuss erzeugte (*R*)-Ester **2**, d. h. die Enantiomerenreinheit der isolierten Probe ist geringer als die Enantioselektivität der Reduktase-Reaktion. Bei dem weitaus am häufigsten für enantioselektive Reduktionen verwendeten Mikroorganismus *Saccharomyces cerevisiae*, der Bäckerhefe, ist die Reduktase-wesentlich grösser als die Hydrolase-Aktivität. Es ist zwar schon lange bekannt [12] [13], dass Bäckerhefe für Verseifungen von Estergruppen verwendet werden kann, andererseits enthalten zahlreiche mit Erfolg eingesetzte Substrate für Hefereduktionen gleichzeitig Estergruppen [14], was nur selten [15] zu ernsthaften Schwierigkeiten⁴⁾ mit konkurrierender enzymatischer Verseifung führt [12] [17] [18]. Es ist denkbar, dass bei den zahlreichen Reduktionen von Keto-estern mit den verschiedensten Mikroorganismen [5], wo die Ausbeuten selten über 90% liegen, in vielen Fällen gute – wie auch schlechte – optische Ausbeuten durch das Zusammenarbeiten von Reduktase(n) und Hydrolase(n) zustandekommen. Dies wurde unseres Wissens bisher noch nicht systematisch untersucht.

Die hier beschriebenen Resultate zeigen, dass sich nur wenige Substrate für eine Biotransformation mit *Halobacterium halobium* eignen.

Wir danken Herrn Prof. Dr. Th. Leisinger von der Mikrobiologischen Abteilung und Herrn Dr. I. Brunner vom Institut für Biochemie der ETH Zürich für Literaturhinweise bzw. die Überlassung einer Stammkultur von *Halobacterium halobium* sowie für die Einweisung in die entsprechende Fermentationstechnik.

Experimenteller Teil

Allgemeines. Zur Kultivierung von *Halobacterium halobium* wurde eine Inkubationsschüttelmaschine *RS-1 T* (Firma *Infors AG*, Bottmingen) und zum Zentrifugieren eine *Du-Pont-RC 5-Superspeed Refrigerated Centrifuge* (7000 U/min, 20 min) verwendet. DC: DC-Plastikfolien Kieselgel *60 F-254 (Merck)*; sichtbarmachen durch UV-Licht (254 nm) oder I₂-Dampf. Säulenchromatographie: Kieselgel *60* Korngrösse 0,040–0,063 mm (*Fluka*). GC: Kapillar-Säule *Pluronic L 64* (19 m; Film-Dicke 0,17 µm) in einem *Carlo-Erba-Fraktovap 4160 HR GC*; das Heizprogramm ist in Klammern angeführt. [α]_D: *Perkin-Elmer-241*-Polarimeter, 1-dm-Zelle. ¹H-NMR-Spektren: in CDCl₃ auf *Varian-EM-390*-Spektrometer (90 MHz); chemische Verschiebungen in δ-Werten relativ zu TMS als internem Standard (δ = 0 ppm), Kopplungskonstanten *J* in Hz. Optische Dichte: *Kontron-Uvikon-860*-UV/VIS-Spektrometer (λ = 570 nm).

Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV 1): Züchtung von *Halobacterium halobium* (nach [10]). Für die Züchtung von *Halobacterium halobium* wurde folgendes Medium verwendet: 250 g NaCl, 20 g MgSO₄·7 H₂O, 2 g KCl, 3 g Trinatriumcitrat-2-hydrat, 10 g *Pepton (Oxoid Bacteriological Peptone)*, mit dest. H₂O auf 1000 ml aufgefüllt. In einem 2000-ml-Erlenmeyer-Kolben mit Schikane wurden 1000 ml Nährmedium mit einer Suspension von *Halobacterium halobium* in ges. NaCl-Lsg. (50% w/w) oder mit 50 bis 100 ml einer wachsenden oder ausgewachsenen *Halobacterium-halobium*-Kultur angeimpft, mit einer Alufolie zugedeckt und bei 40° unter Lichtbestrahlung mit 80 U/min geschüttelt. Nach Erreichen einer konstanten optischen Dichte wurde die Lsg. zentrifugiert, das Zentrifugat in der gleichen Gewichtsmenge gesättigter NaCl-Lsg. aufgenommen und im Kühlschrank bei +4° gelagert. Diese Bakteriensuspension wurde zum Animpfen weiterer Nährmedien verwendet.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV 2). Hydrolyse von rac-3-Hydroxyalkansäure-ester mit *Halobacterium halobium* im 1000-ml-Maßstab. In einem 2000-ml-Erlenmeyer-Kolben mit Schikane wurden 1000 ml Nährmedium (vgl. *AAV 1*) bei 40° mit 5 ml einer Suspension von *Halobacterium halobium* in ges. NaCl-Lsg. (50% w/w) angeimpft und unter Lichtbestrahlung mit 80 U/min bei 40° geschüttelt. Nach 10 bis 15 h wurden 2.0 g des entsprechenden 3-Hydroxyalkansäure-esters zugegeben. Nach einer bestimmten Zeit wurde die Lsg. abgekühlt

⁴⁾ Bei der Reduktion von Acetessigester mit Bäcker-Hefe in einem Phosphatpuffer-Medium wurde die enzymatische Verseifung des gebildeten 3-Hydroxybuttersäure-ethylesters beobachtet [16], wobei die Selektivität der Reduktion in diesem Fall unterstützt wird.

und 3mal mit Et₂O extrahiert. Die vereinigte org. Phase wurde getrocknet (MgSO₄), eingedampft, mittels Kugelrohr-Destillation sowie anschliessender 'flash'-Chromatographie (Et₂O/Pentan 1:1) gereinigt.

Die H₂O-Phase wurde mit conc. HCl auf pH 2 angesäuert und während 12 bis 16 h mit Et₂O kontinuierlich extrahiert. Die org. Phase wurde getrocknet (MgSO₄) und eingedampft. Der Rückstand wurde in 5 ml Et₂O gelöst, mit CH₂N₂ verestert, vorsichtig eingedampft und mittels Kugelrohr-Destillation gereinigt.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV 3). Hydrolyse von rac-3-Hydroxyalkansäure-ester mit Halobacterium halobium im 250-ml-Maßstab. In einem 500-ml-Erlenmeyer-Kolben mit Schikane wurden 250 ml Nährmedium (vgl. AAV 1) bei 40° mit 5 ml einer Suspension von *Halobacterium halobium* in ges. NaCl-Lsg. (50% w/w) angeimpft und unter Lichtbestrahlung mit 80 U/min bei 40° geschüttelt. Nach 10 bis 15 h wurden 500 mg des entsprechenden 3-Hydroxyalkansäure-esters zugegeben. Nach einer bestimmten Zeit wurde die Lsg. abgekühlt und 3mal mit Et₂O extrahiert. Die vereinigte org. Phase wurde getrocknet (MgSO₄) und eingedampft. Die H₂O-Phase wurde mit conc. HCl auf pH 2 angesäuert und während 12 bis 16 h mit Et₂O kontinuierlich extrahiert. Die org. Phase wurde getrocknet (MgSO₄) und eingedampft.

Reduktion von 3-Oxobutansäure-ethylester (1) mit Halobacterium halobium. Aus 2,0 g (15,4 mmol) 1 erhielt man nach 5 Tagen analog AAV 2 335 mg (16,5%) einer farblosen Flüssigkeit (2). [α]_D = +29,5 (*c* = 1,3, CHCl₃), 67.5% ee ([20]: [α]_D = -43,6 (*c* = 1,2, CHCl₃), 100% ee). Die spektroskopischen Daten stimmen mit jenen in [19] überein.

Tab. 4. *Hydrolyse von rac-3-Hydroxyalkansäure-estern mit Halobacterium halobium.* Von den bekannten Hydroxy-estern wurden Drehwert und ¹H-NMR-Spektren mit Literaturangaben verglichen. ¹H-NMR-Daten bisher nicht beschriebener Hydroxy-ester sind in den zugehörigen Fussnoten angegeben.

Substrat	AAV	Zeit [d]	Isolierter Ester			Isolierte Säure	
			Sdp. [°/18–20 mbar]	Ausbeute [%]	[α] _D ; <i>c</i> (CHCl ₃)	Ausbeute [%] (roh)	Veresterung mit CH ₂ N ₂ [α] _D ; <i>c</i> (CHCl ₃)
2	2	5	110	22,5 ^{a)}	-28,2; 1,6 ^{b)}	20,5	+1,75; 1,85 ^{c)}
4	2	6	75	14 ^{d)}	-26,0; 1,48 ^{c)}	–	-10,5; 1,55 ^{c)}
5	3	6	120	82 ^{e)}	-0,69; 5,2	–	–
6	3	7	f)	45 ^{e)}	-4,57; 1,05	21,5	–
7	3	7	140	46 ^{b)}	0,0; 0,98 ^{b)}	47	–
8	3	6	130–140	94 ^{b)}	0,0; 4,7	–	–
9	3	6	130	78 ^{a)}	-2,3; 5,43 ^{k)}	24	–
10	3	6	110–130	66 ^{l)}	-1,88; 1,43 ^{m)}	43	–
11	3	6	100–110 ⁿ⁾	71 ^{e)}	-1,0; 1,4 ^{p)}	–	–

^{a)} Spektroskopische Daten vgl. [19].

^{b)} [20]: [α]_D = -43,6 (*c* = 1,2, CHCl₃), 100% ee.

^{c)} [21]: [α]_D = -48,8 (*c* = 0,99, CHCl₃), 100% ee.

^{d)} Spektroskopische Daten vgl. [22].

^{e)} ¹H-NMR: 0,95 (*t*, *J* = 8, CH₃CH₂CH₂O); 1,2 (*d*, *J* = 7, 3H-C(4)); 1,45–1,75 (*m*, CH₃CH₂CH₂O); 2,45 (*m*, 2H-C(2)); 3,0 (*br. s.*, OH); 4,05 (*t*, *J* = 7, CH₃CH₂CH₂O); 4,0–4,35 (*m*, H-C(3)).

^{f)} Nur Säulenchromatographie.

^{g)} ¹H-NMR: 1,2 (*d*, *J* = 7, 3H-C(4)); 1,25 (*d*, *J* = 7, (CH₃)₂CHO); 2,45 (*m*, 2H-C(2)); 2,85 (*br. s.*, OH); 4,0–4,3 (*m*, H-C(3)); 4,8–5,2 (*m*, (CH₃)₂CHO).

^{h)} Spektroskopische Daten vgl. [23].

ⁱ⁾ [21]: [α]_D = +30,8 (*c* = 1, CHCl₃), 100% ee.

^{j)} Spektroskopische Daten vgl. [24].

^{k)} [25]: [α]_D = -34,6 (*c* = 5, CHCl₃), 100% ee.

^{l)} Spektroskopische Daten vgl. [26].

^{m)} [26]: [α]_D = +17,8 (*c* = 1,2, CHCl₃), 100% ee.

ⁿ⁾ 0,05 Torr.

^{o)} ¹H-NMR: 2,5–2,7 (*m*, 2H-C(2)); 3,25 (*br. s.*, OH); 3,55–3,65 (*m*, 2H-C(4)); 3,7 (*s.*, CH₃O); 4,05–4,35 (*m*, H-C(3)).

^{p)} [21]: [α]_D = +21,2 (*c* = 1, CHCl₃), 89% ee.

- Aufarbeitung der angesäuerten H₂O-Phase analog *AAV 2* lieferte 167 mg einer farblosen Flüssigkeit (**4**).
 $[\alpha]_{\text{D}} = +33,4$ ($c = 1,32$, CHCl₃), 69% ee ([21]: $[\alpha]_{\text{D}} = -48,8$ ($c = 0,99$, CHCl₃), 100% ee).
 Analog erhielt man in einem zweiten Versuch nach Reinigung mittels Chromatographie 474 mg (23,6%) **2**.
 $[\alpha]_{\text{D}} = +33,3$ ($c = 1,88$, CHCl₃), 76,3% ee.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. G. W. Leuenberger, in 'Biotechnology', Eds. H.-J. Rehm und G. Reed, Verlag Chemie, Weinheim, 1984, Vol. 6a, S. 5–29; H. G. W. Leuenberger, K. Kieslich, in 'Handbuch der Biotechnologie', Eds. P. Präve, U. Faust, W. Sittig und D. A. Sukatsch, Verlag Oldenbourg, München–Wien, 1984, S. 454–482.
- [2] C. J. Sih, C.-S. Chen, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 556; *ibid. Int. Ed.* **1984**, *23*, 570.
- [3] F. S. Sariaslani, J. P. N. Rosazza, *Enzyme Microb. Technol.* **1984**, *6*, 242.
- [4] G. M. Whitesides, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 617; *ibid. Int. Ed.* **1985**, *24*, 617.
- [5] D. Seebach, S. Roggo, J. Zimmermann, in 'Stereochemistry of Organic and Bioorganic Transformations', Eds. W. Bartmann und K. B. Sharpless, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987, S. 85–126.
- [6] H. Yamada, S. Shimizu, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 640; *ibid. Int. Ed.* **1988**, *27*, 622.
- [7] C. R. Woese, *Scient. Am.* **1981**, *244*, 94.
- [8] R. Schnabel, *Chemie in unserer Zeit* **1984**, *18*, 121.
- [9] T. Torsvik, I. Dunas, in 'Methods in Enzymology, Biomembranes I', Ed. L. Packer, Academic Press, New York, 1982, Vol. 88, S. 361.
- [10] D. Oesterheld, W. Stoerkenius, in 'Methods in Enzymology, Biomembranes', Part A, Eds. S. Fleischer und L. Packer, Academic Press, New York, 1974, Vol. 31, S. 667.
- [11] J. K. Lanyi, *Bacteriol. Rev.* **1974**, *38*, 272.
- [12] L. Mamoli, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1938**, *71*, 2696.
- [13] B. I. Glänzer, K. Faber, H. Griengl, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4293; *Tetrahedron* **1987**, *43*, 771; *ibid.* **1987**, *43*, 5791; *Enzyme Microb. Technol.* **1988**, *10*, 689.
- [14] D. Seebach, M. A. Sutter, R. H. Weber, M. F. Züger, *Org. Synth.* **1984**, *63*, 1.
- [15] K. Nakamura, K. Inone, K. Ushio, S. Oka, A. Ohno, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2589.
- [16] T. Pietzonka, Diplomarbeit, ETH Zürich, 1988.
- [17] W. P. Schneider, H. C. Murray, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 397.
- [18] C. J. Sih, R. G. Salomon, P. Price, R. Sood, G. Peruzzotti, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 857.
- [19] D. Seebach, F. Giovannini, B. Lamatsch, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 958.
- [20] D. Seebach, M. F. Züger, *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 495.
- [21] M. F. Züger, Dissertation Nr. 7514, ETH Zürich, 1984.
- [22] St. G. Davies, I. M. Dordor-Hedgecock, P. Warner, R. H. Jones, K. Prout, *J. Organomet. Chem.* **1985**, *285*, 213.
- [23] T. Itoh, T. Sato, T. Fujisawa, *Nippon Kagaku Kaishi* **1987**, 1414.
- [24] D. Seebach, U. Brändli, P. Schnurrenberger, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 155.
- [25] D. Seebach, M. F. Züger, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2747.
- [26] D. Seebach, Ph. Renaud, W. B. Schweizer, M. F. Züger, *Helv. Chim. Acta* **1984**, *67*, 1843.