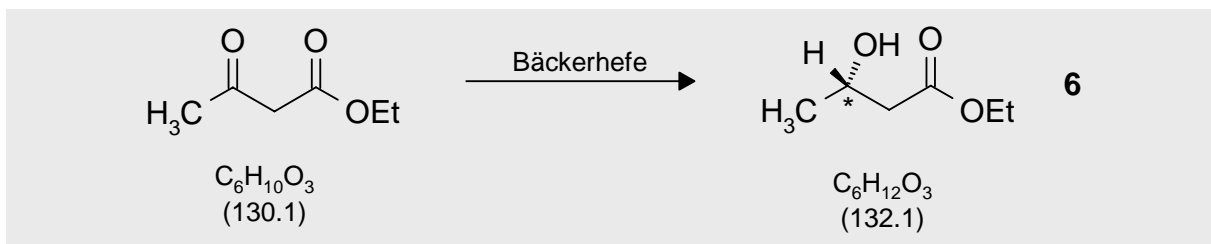


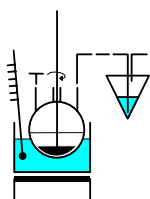
4.3.1.6 Enantioselektive Reduktion von Acetessigsäureethylester mit Bäckerhefe zu (S)-3-Hydroxybuttersäureethylester (6)



Arbeitsmethoden: Umwandlung funktioneller Gruppen mit Mikroorganismen, Zentrifugieren, Destillation, Drehwertbestimmung

Chemikalien

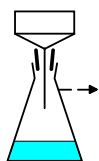
Acetessigsäureethylester	Sdp. 180 °C, $d = 1.03 \text{ g/ml}$.
Frische Bäckerhefe	Im Lebensmittelhandel erhältlich.
Saccharose	(Haushaltszucker).
<i>tert</i> -Butylmethylether	Sdp. 55 °C, $d = 0.74 \text{ g/ml}$, Dampfdruck bei 20 °C: 268 hPa.



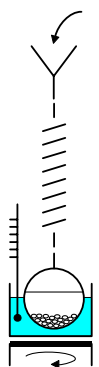
Durchführung

Vor Beginn **Betriebsanweisung** erstellen.

In einem 2 l-Dreihalskolben mit KPG-Rührer und Blasenzähler werden 150 g Saccharose in 800 ml Wasser gelöst und anschließend unter Rühren 100 g frische Bäckerhefe zugegeben. Die Mischung wird 1 h in einem 30 °C warmen Wasserbad gerührt, dann werden 77.0 mmol (10.0 g, 9.7 ml) Acetessigsäureethylester auf einmal zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt,¹ bevor nochmals eine 40 °C warme Lösung von 100 g Zucker in 500 ml Wasser zugegeben wird. Nach 1 h Rühren versetzt man die Mischung mit weiteren 77.0 mmol Acetessigsäureethylester und rührt etwa 60 h weiter. Bevor die Reaktionsmischung aufgearbeitet wird, muss auf Vollständigkeit der Umsetzung geprüft werden.



Dazu entnimmt man eine Probe der Reaktionsmischung (ca. 2–5 ml), Zentrifugiert von der Hefe ab und extrahiert die wässrige Phase mit 1 ml *tert*-Butylmethylether. Der Etherextrakt wird entweder direkt gaschromatographisch oder mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie analysiert: DC-Platten Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator, Laufmittel *tert*-Butylmethylether/Cyclohexan 1:1. In einer zweiten Spur entwickelt man Acetessigsäureethylester als Referenz. Wenn die Umsetzung noch nicht völlig abgeschlossen ist, werden nochmals 100 g Zucker zur Reaktionsmischung gegeben und weitere 24 h gerührt.



Isolierung und Reinigung

Die Reaktionsmischung wird abzentrifugiert ($\rightarrow \mathbf{E}_1$), die überstehenden Lösungen vereinigt und 5 x mit 250 ml *tert*-Butylmethylether extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abtrennen des Trockenmittels ($\rightarrow \mathbf{E}_2$) wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert ($\rightarrow \mathbf{R}_1$). Der flüssige Rückstand wird in einer kleinen Destillationsapparatur mit Vigreuxkolonne,

Spinne und tarierten Vorlagekölbchen bei vermindertem Druck fraktionierend destilliert, Destillationsprotokoll! (\rightarrow **E**₃). Die Ausbeute des destillierten Reinprodukts **6** wird bestimmt. Ausbeute an **6**: 55–65%, Sdp. 74–75 °C/20 hPa, $n_D^{20} = 1.4182$.

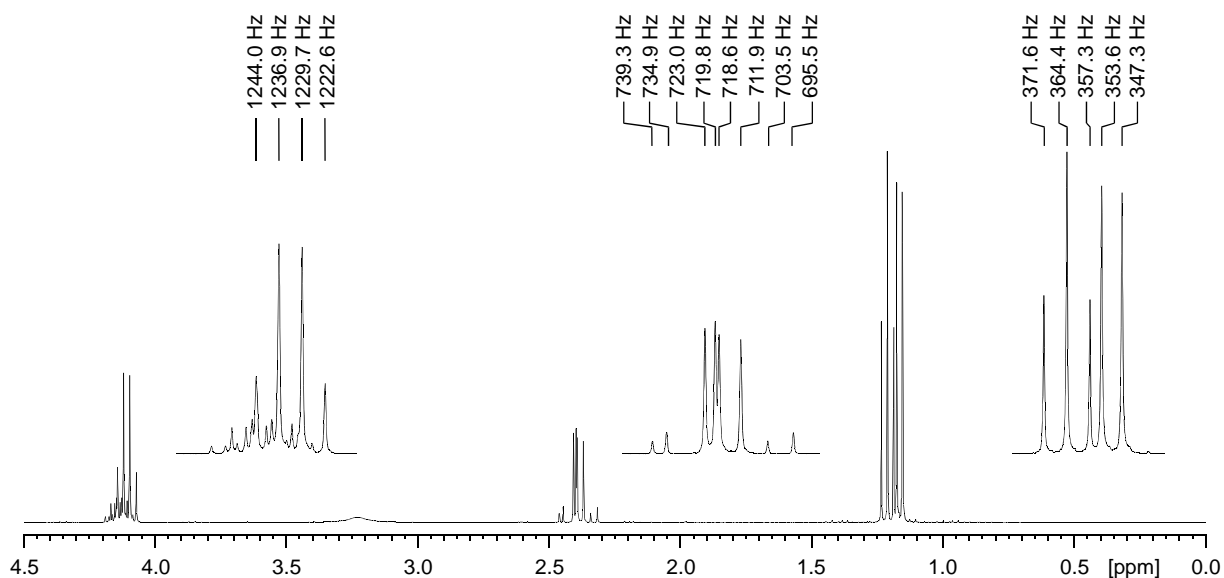
¹ Informieren Sie sich über die Natur und Struktur des Reduktionsmittels in der Zelle.

Hinweise zur Entsorgung (E), Recycling (R) der Lösungsmittel

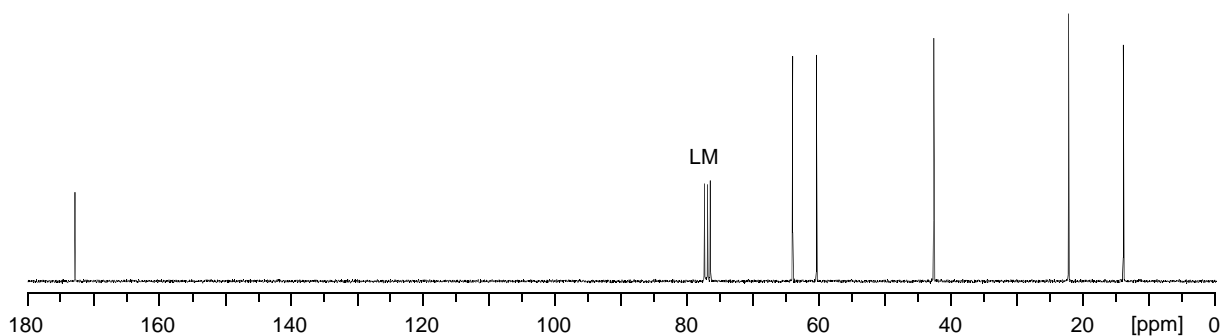
- E**₁: Fester Rückstand aus der Zentrifugation \rightarrow Normaler Abfall (Hausmüll).
E₂: Trockenmittel \rightarrow Entsorgung (Anorg. Feststoffe).
E₃: Destillationsrückstand und verunreinigte Fraktionen in wenig Aceton aufnehmen \rightarrow Entsorgung (RH).
R₁: Abdestilliertes Lösungsmittel \rightarrow Recycling (*tert*-Butylmethylether).

Auswertung des Versuchs

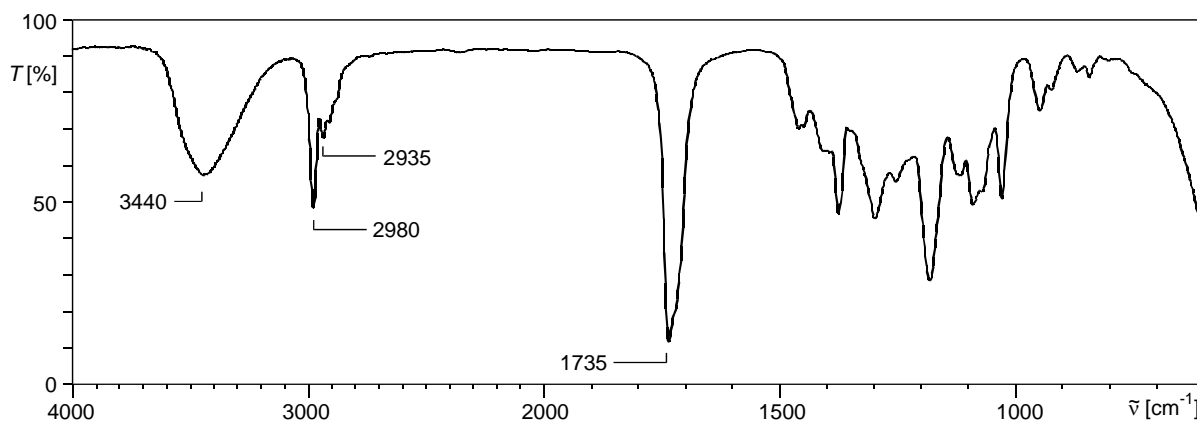
¹H-NMR-Spektrum von **6** (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.17$ (3 H), 1.21 (3 H), 2.31–2.46 (2 H), 3.23 (1 H), 4.07–4.19 (3 H).



¹³C-NMR Spektrum von **6** (75.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 14.12$ (CH₃), 22.43 (CH₃), 42.84 (CH₂), 60.60 (CH₂), 64.20 (CH), 172.84 (C).

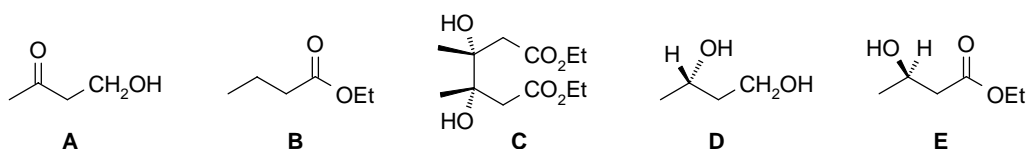


IR-Spektrum von 6 (Film):



- * Formulieren Sie den zu **6** führenden formalen Reaktionsmechanismus (nicht den biochemischen Reaktionsablauf).
- * Die enzymatische Reduktion des Acetessigesters verläuft stereospezifisch (Asymmetrische Synthese!), bestimmen Sie den spezifischen Drehwert von **6** (Lit.: $[\alpha]_D^{20} = 41-43^\circ$ ($c = 1.0$ in Chloroform)), formulieren Sie für **6** die *R*- und die *S*-Konfiguration. Bestimmen Sie den Enantiomerenüberschuss (*ee*).

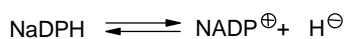
Weitere denkbare Reaktionsprodukte:



- * Mit welchen spektroskopischen Daten lassen sich **A–E** ausschließen?
- * Diskutieren Sie die denkbaren formalen Reaktionsmechanismen.

Literatur, allgemeine Anwendbarkeit der Methode

Mit Hefe lassen sich auch andere β -Ketoester, α -Ketoester, α -Ketoalkohole und α -Ketophosphate stereoselektiv reduzieren. Das eigentliche reduzierende Agens ist das in der Hefe (wie in allen Organismen) enthaltene Enzym Reduktase, dessen Coenzym NADPH das reduzierende Hydridion liefert:



Wie alle Enzymreaktionen sind auch diese Reduktionen absolut stereoselektiv. Die erreichbaren chemischen Ausbeuten und die in vitro erreichte Stereoselektivität hängen dabei vom Substrat ab.^[1] In Gegenwart von organischen Schwefelverbindungen (z.B. L-Cystein) in Diethylether/Wasser bei Raumtemperatur (Reaktionszeit 2–5 h) werden β -Ketocarbonsäureester ($\text{R}^1\text{CH}_2\text{-CO-CH}_2\text{-CO}_2\text{R}$, $\text{R}^1 = \text{H, Et}$) in 50–80% Ausbeute mit 90–98% *ee* reduziert.^[2]

- [1] D. Seebach, M.A. Sutter, R.H. Weber, M.F. Züger in *Organic Synthesis Coll. Vol. 7* (Hrsg. J. P. Freeman), J. Wiley & Sons, New York, **1990**, S. 215; L.Y. Jayasinghe, A.J. Smallridge, M.A. Trehwella, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 3949–3950.
- [2] R. Hayakawa, K. Nozawa, M. Shimizu, T. Fujisawa, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 67–70; siehe auch C.-H. Wong, G.M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon Verlag, **1994**.