

45. Totalsynthese von natürlichem α -Tocopherol.

1. Mitteilung

Herstellung bifunktionaler, optisch aktiver Synthesebausteine für die Seitenkette mit Hilfe mikrobiologischer Umwandlungen

von Hans Georg Wilhelm Leuenberger, Walter Boguth, Richard Barner, Max Schmid und Reinhard Zell

Zentrale Forschungseinheiten der *F. Hoffmann-La Roche & Co. AG*, CH-4002 Basel

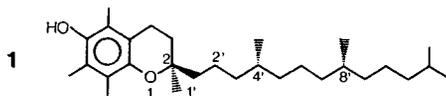
(27. XII. 78)

Total Synthesis of Natural α -Tocopherol. I. Preparation of Bifunctional Optically Active Precursors for the Synthesis of the Side Chain by Means of Microbiological Transformations

Summary

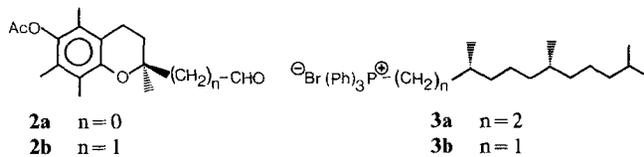
Our concept for a new total synthesis of natural α -tocopherol includes the synthesis of a corresponding (3*R*, 7*R*)-configured C_{15} side chain to be built up by using twice an optically active C_5 unit together with an achiral C_5 end part. (*S*)-3-methyl- γ -butyrolactone (**11**) and (*S*)-2-methyl- γ -butyrolactone (**9**) represent suitable bifunctional C_5 -precursors for this purpose. These two key compounds have been prepared by fermentative transformation including the enantioselective hydrogenation of the double bond of ethyl-4,4-dimethoxy-3-methylcrotonate (**5**) by bakers yeast (yielding **11** after ester hydrolysis and cyclization of the fermentation product) and (*E*)-3-(1',3'-dioxolan-2'-yl)-2-buten-1-ol (**8**) by the fungus *Geotrichum candidum* (yielding directly **9**).

1. Zur enantioselektiven Synthese von natürlichem α -Tocopherol. - Natürliches α -Tocopherol (= Vitamin E; **1**) enthält als Strukturelemente ein Chromanring-system und eine in Stellung 2 mit dem Chromanteil verknüpfte aliphatische Seitenkette, wobei den 3 Chiralitätszentren die (2*R*, 4'*R*, 8'*R*)-Konfiguration zukommt [1].

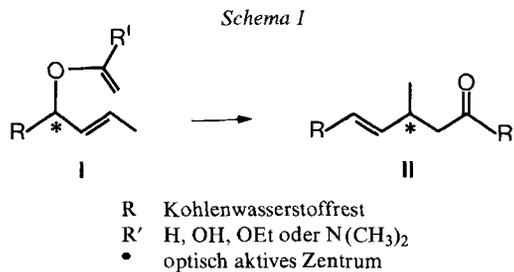


Die erste «formale» Totalsynthese von **1** wurde von Mayer *et al.* [2] beschrieben. Die Kondensation des Chromansystems **2a** mit der Seitenkette **3a** erfolgte dabei mit Hilfe der Wittig-Reaktion. Der optisch reine Aldehyd **2a** war durch Racematspaltung auf einer Carbonsäure-Vorstufe und **3a** durch Abbau von natürlichem Phytol¹⁾ erhalten worden.

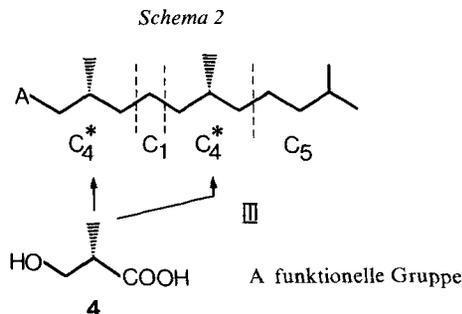
¹⁾ C(7) und C(11) sind im Phytol ebenfalls (*R*)-konfiguriert [3].



Der Aufbau der Seitenkette auf synthetischem Weg beinhaltet die Aufgabe, die beiden (*R*)-konfigurierten Asymmetriezentren mit den sekundären Methylgruppen einzuführen. In einer ersten Totalsynthese von *Saucy et al.* [4] wurde diese Aufgabe auf der Basis der «Chiralität-Übertragung» [5] gelöst. Dabei wird durch *Claisen*-Umlagerung ein durch *Racematspaltung* leicht zugängliches, optisch aktives (C–O)-Zentrum (I) in ein optisch aktives (C–C)-Zentrum (II) übergeführt, wobei das ursprüngliche Allylkohol-Derivat I zugleich um 2 C-Atome verlängert wird (*Schema 1*).

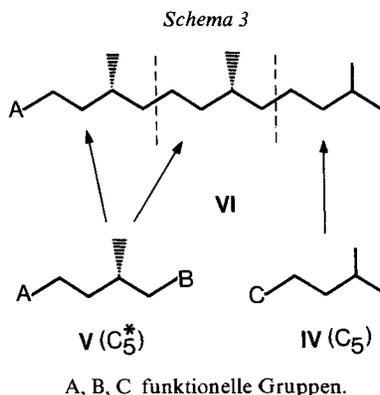


In einer weiteren Totalsynthese erfolgte der Aufbau einer isoprenoiden C₁₄-Seitenkette²⁾ III nach dem Prinzip C₅ + C₄^{*} + C₁ + C₄^{*} [7], wobei für das optisch aktive bifunktionelle C₄^{*}-Synthon (*S*)-β-Hydroxy-isobuttersäure (4) [8] als Ausgangsverbindung diente (*Schema 2*).



Das in den vorliegenden Mitteilungen 1–3 beschriebene neue Konzept zur Synthese der (3*R*, 7*R*)-konfigurierten C₁₅-Seitenkette VI ist in *Schema 3* dargestellt. Es basiert auf der zweimaligen Verwendung eines optisch aktiven bifunktionellen C₅-Synthons V zusammen mit einem achiralen monofunktionellen C₅-Baustein IV

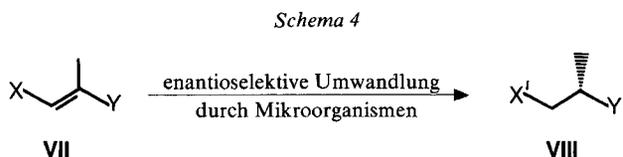
²⁾ Die *Wittig*-Reaktion der C₁₄-Seitenkette **3b** mit dem Chromaderivat **2b** [6] lieferte totalsynthetisches natürliches *α*-Tocopherol (I).



nach dem Aufbauprinzip: $C_5(IV) + C_5^*(V) + C_5^*(V)$, wobei das chirale C_5 -Synthon *beide* Asymmetriezentren mit den sekundären Methylgruppen liefert. Aus *Schema 3* ist zudem ersichtlich, dass mit V als Baustein, im Sinne einer Verallgemeinerung dieses Konzepts, isoprenoide Ketten (Homologe von VI wie z. B. Dolichole [9]) in einfacher Weise hergestellt werden können.

In der vorliegenden 1. Mitteilung wird gezeigt, wie mit Hilfe von Mikroorganismen Synthone vom Typ V aus achiralen Vorläufern gewonnen werden können. Der Aufbau der C_{15} -Seitenkette VI aus solchen C_5 -Synthonen V auf verschiedenen Wegen ist das Thema der 2. und 3. Mitteilung [10] [11], während in der 4. Mitteilung schliesslich eine «chiral ökonomische» [12] Totalsynthese des Chromanaldehyds 2a beschrieben wird [13].

2. Methode zur Herstellung der optisch aktiven C_5 -Bausteine. - Die für die Synthese der (3*R*, 7*R*)-konfigurierten C_{15} -Seitenkette VI geeigneten optisch aktiven C_5 -Synthone wurden mit Hilfe einer enantioselektiven, durch Mikroorganismen katalysierten Reduktion der Doppelbindung an bifunktionellen, olefinischen, in der (*E*)-Konfiguration vorliegenden Substraten gemäss *Schema 4* hergestellt. In *Schema 4* bedeuten X, Y, X' und Y' Carboxy-, Formyl-, Hydroxymethyl-Gruppen oder deren Derivate (Ester, Acetale, Äther).

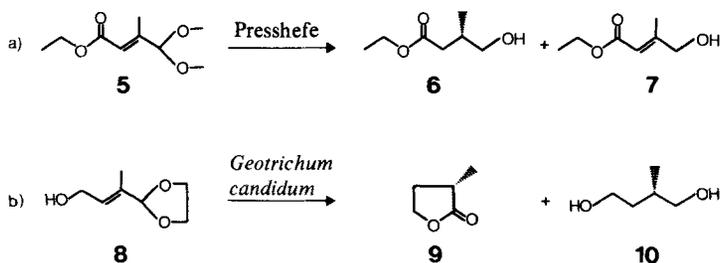


Insgesamt wurden etwa 50 ungesättigte Verbindungen vom Typ VII (*Schema 4*) mit unterschiedlichen Substituenten X und Y synthetisiert und auf enantioselektive Reduktion durch zwei ausgewählte Mikroorganismen, nämlich handelsübliche Presshefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und *Geotrichum candidum*, geprüft. Die Versuche wurden als Schüttelkulturen mit ruhenden Zellen (100 g Nassgewicht pro Liter) in einer gepufferten Glucoselösung (5 g/l Glucose; Phosphat-Puffer, 1/15 M, pH 6) mit einer Reaktandenkonzentration von 2 g/l angesetzt und bei 30° bebrütet.

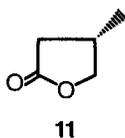
Der Verlauf der mikrobiologischen Umwandlung wurde nach Extraktion mit Methylenchlorid durch Gas-Chromatographie verfolgt. Er zeigte sich in hohem Masse abhängig von der Wahl der Substituenten X und Y. In vielen Fällen wurde die erwünschte enantioselektive Reduktion beobachtet. Bei mehreren Substraten wurden aber daneben auch Veränderungen an den Substituenten X und Y festgestellt, indem Schutzgruppen hydrolysiert und/oder die Oxydationsstufe freier Substituenten verändert wurden. Wo keine Nebenreaktionen der genannten Art stattfinden, sind in *Schema 4* X und X' bzw. Y und Y' identisch.

3. Die bevorzugten Umwandlungen. - Die beiden Umwandlungen, die in höchster Ausbeute einen brauchbaren Synthesebaustein für die Seitenkette von natürlichem α -Tocopherol liefern, sind in *Schema 5* dargestellt. Die Umwandlung a) wird

Schema 5



durch Presshefe bewirkt. Bei der Bildung des erwünschten Hauptproduktes **6** aus 4,4-Dimethoxy-3-methylcrotonsäure-äthylester (**5**) wird neben der Reduktion der Doppelbindung die Acetalgruppierung hydrolysiert und der freie Aldehyd zum Alkohol reduziert. Das gesättigte Fermentationsprodukt **6** wird bei der Produktisolierung durch Destillation des Rohextraktes mit Spuren von *p*-Toluolsulfonsäure hydrolysiert und zum (*S*)-3-Methyl- γ -butyrolacton (**11**) cyclisiert. Kleine Mengen



des Lactons **11** bilden sich bereits während der Fermentation und werden bei der Produktisolierung ebenfalls erfasst (unter unseren Bedingungen 2-5%). Als unerwünschtes Nebenprodukt entsteht 4-Hydroxy-3-methylcrotonsäure-äthylester (**7**), dessen Doppelbindung auch bei verlängerter Bebrütungsdauer kaum mehr hydriert wird. Offenbar verläuft die Hydrierung der Doppelbindung bevorzugt vor oder während der Reduktion des Aldehyds zum Alkohol.

Bei der Umwandlung b) wird durch Einwirken des Pilzes *Geotrichum candidum* auf (*E*)-3-(1',3'-Dioxolan-2'-yl)-2-buten-1-ol (**8**) einerseits die Doppelbindung reduziert und andererseits der nach Hydrolyse des Acetals frei werdende Aldehyd bevorzugt oxydiert (*Schema 5*). Durch Ringschluss ergibt diese Fermentation als Hauptprodukt das (*S*)-2-Methyl- γ -butyrolacton (**9**). Als Hauptnebenprodukt ent-

steht durch Reduktion des Aldehyds nach der Hydrierung der Doppelbindung (*S*)-2-Methyl-1,4-butandiol (**10**)³).

4. Optische Reinheit und absolute Konfiguration der Fermentationsprodukte. - Das aus der Gärbrühe der Umwandlung a) durch Destillation unter hydrolytischen Bedingungen isolierte (*S*)-3-Methyl- γ -butyrolacton (**11**) weist eine spezifische Drehung $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -24,7^\circ$ ($c=4$, Methanol) auf. Ihm wurde die (*S*)-Konfiguration auf dem folgenden Weg zugeordnet: **11** wurde mit Lithiumaluminiumhydrid zum 2-Methyl-1,4-butandiol reduziert, dessen Enantiomere in der Literatur beschrieben sind [14] [15]. Dieses Reduktionsprodukt hat eine spezifische Drehung $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -14,4^\circ$ ($c=0,6$, Methanol). Die (*S*)-Konfiguration folgt aus dem Literaturvergleich und gilt somit auch für das fermentativ hergestellte Lacton **11**. Die genaue Bestimmung der optischen Reinheit gelang mit Hilfe der ¹H-NMR.-Spektroskopie in Gegenwart von Eu(hfc)₃ als chiralem Verschiebungsreagens am (*S*)-4-Brom-3-methylbuttersäure-äthylester, einem direkten Folgeprodukt aus dem fermentativ hergestellten Lacton **11** und ist in [10] beschrieben. Bei einer Nachweisbarkeitsgrenze von 1,5% wurde nur ein Enantiomeres nachgewiesen, so dass die optische Reinheit des Fermentationsproduktes mindestens 97% beträgt.

Die spezifische Drehung des nach der Umwandlung b) erhaltenen (*S*)-2-Methyl- γ -butyrolactons (**9**) beträgt $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -22,9^\circ$ ($c=2$, Äthanol). Dieses Lacton ist in optisch aktiver Form bereits bekannt [16], so dass unserem Produkt durch direkten Literaturvergleich die (*S*)-Konfiguration zugeordnet werden konnte. Die hohe optische Reinheit liess sich am Lacton **9** selber wiederum anhand des in Gegenwart von Eu(hfc)₃ aufgenommenen ¹H-NMR.-Spektrums nachweisen.

Somit sind die beiden durch mikrobiologische Umwandlung zugänglichen, optisch aktiven Lactone **11** und **9** als Bausteine für die Synthese der Seitenkette von (2*R*,4'*R*,8'*R*)-*a*-Tocopherol gemäss dem in *Schema 3* dargestellten Konzept geeignet. Sie enthalten ein Asymmetriezentrum mit sekundärer Methylgruppe in der gewünschten absoluten Konfiguration und nach Ringöffnung zwei unterschiedliche funktionelle Gruppen an den Kettenenden, die eine gezielte Synthese der Seitenkette vom Typ VI erlauben (s. [10] [11]).

5. Herstellung von (*S*)-3-Methyl- γ -butyrolacton (11**) im Fermenter.** - Im Bestreben, ein einfaches und möglichst ergiebiges Verfahren zur Herstellung von **11** zu erarbeiten, wurden die Reaktionsbedingungen im Fermenter systematisch variiert. Für die gewünschte Umsetzung des Substrates **5** erwiesen sich die folgenden Bedingungen als am geeignetsten: Die mikrobiologische Umwandlung kann in einem Fermenter unter nicht-sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Störende Fremdfektionen wurden nie beobachtet. Als Medium genügt eine Saccharose-Lösung von 50 g/l in ionenfreiem Wasser. Eine Presshefe-Konzentration von 100 g/l ist ausreichend. Höhere Hefekonzentrationen steigern die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr wesentlich. Die optimale Reaktionstemperatur ist 30°. Der pH-Wert sinkt zu Beginn der Fermentation schnell ab in den Bereich zwischen 3 und 4, in welchem die Umwandlung gut abläuft. Massnahmen zur Regelung des pH-Wertes im sauren Bereich bringen keine Vorteile. Bei hohem pH wird die Reaktion gehemmt. Belüftung und intensives Rühren sind notwendig. Hohe Umsätze werden noch mit einer Konzentration an **5** von 10-12 g/l erzielt. Bei höheren Konzentrationen wird die Reaktion gehemmt. Durch halbkontinuierliches oder kontinuierliches Zusetzen ist es jedoch möglich, im gleichen Ansatz auch wesentlich grössere Mengen von **5** umzusetzen.

³) Die absolute Konfiguration wurde an diesem fermentativ gebildeten Nebenprodukt nicht überprüft. In Analogie zum Hauptprodukt **9** ist jedoch anzunehmen, dass **10** (*S*)-Konfiguration besitzt.

In einem typischen Experiment unter den im exper. Teil beschriebenen Bedingungen beobachten wir den in *Figur 1* dargestellten Reaktionsverlauf. Nach einer Reaktionsdauer von 56 Std. wurden im GC. 49,2% gesättigter Hydroxyester **6** und 46,9% unerwünschtes Nebenprodukt **7** nachgewiesen.

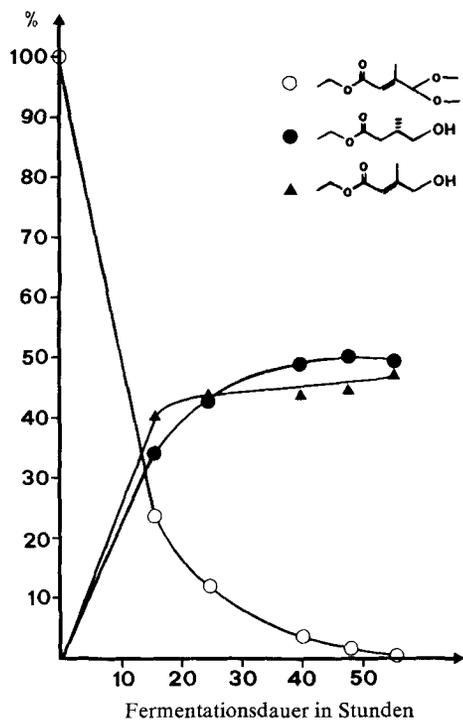


Fig. 1. Fermentative Umwandlung von 4,4-Dimethoxy-3-methylcrotonsäure-äthylester (**5**) durch Presshefe. Die prozentualen Anteile von **5** und der beiden Hauptprodukte **6** und **7** sind in Abhängigkeit der Fermentationsdauer dargestellt

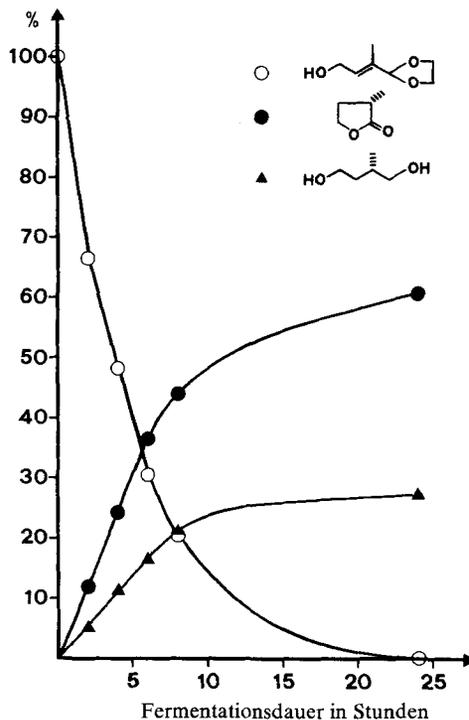


Fig. 2. Fermentative Umwandlung von (E)-3-(1',3'-Dioxolan-2'-yl)-2-buten-1-ol (**8**) durch *Geotrichum candidum*. Die prozentualen Anteile von **8** und der beiden Hauptprodukte **9** und **10** sind in Abhängigkeit der Fermentationsdauer dargestellt

6. Herstellung von (S)-2-Methyl- γ -butyrolacton (9**) im Fermenter.** - Auch für die Herstellung von (S)-2-Methyl- γ -butyrolacton (**9**) gemäss der Umwandlung b) wurden die Fermentationsbedingungen optimiert. Daraus resultierte das folgende Verfahren: Die mikrobiologische Umwandlung kann mit ruhenden Zellen unter nicht-sterilen Bedingungen in einem Medium, das nur 10-20 g/l Saccharose in ionenfreiem Wasser enthält, erfolgreich durchgeführt werden. In dieses Medium werden als Biokatalysator pro Liter 100 g abfiltrierte Zellen von *Geotrichum candidum* eingesetzt. Hohe Umsätze zum gewünschten Produkt werden noch mit Konzentrationen an **8** bis maximal 20 g/l erzielt. Die Reaktion verläuft optimal bei einer Temperatur von 30°, und der für die Umsetzung günstige pH-Wert von ca. 4 stellt sich von selbst in der Gärbrühe ein, so dass keine pH-Regulierung notwendig ist. Der Fermenter muss geführt und belüftet werden.

Den Reaktionsverlauf einer typischen Umsetzung (s. exper. Teil) zeigt die *Figur 2*. Nach 24 Std. wurden im Rohextrakt nach GC. 61,1% (S)-2-Methyl- γ -butyrolacton (**9**) und 27,2% des Nebenproduktes 2-Methyl-1,4-butandiol (**10**) nachgewiesen. Als weitere Nebenprodukte entstanden in kleinen Mengen 2-Methyl-2-buten-1,4-diol (5,6%) und 3-Methyl-2(5H)-furanon (3,3%).

Experimenteller Teil

Allgemeine Bemerkungen. Siehe [10].

1. *Mikroorganismen*. Als Biokatalysatoren wurden handelsübliche Presshefe (Fa. Klipfel, Rheinfelden, Schweiz) oder *Geotrichum candidum* (CBS 233.76) eingesetzt. Die Bioumwandlungen wurden mit ruhenden Zellen ausgeführt.

2. *Herstellung der Biomasse von Geotrichum candidum*. Die Anzucht von *Geotrichum candidum* (CBS 233.76) erfolgte in einem sterilisierten Medium der folgenden Zusammensetzung: 20 g (+)-D-Glucose (Monohydrat), 10 g Yeast-Extract (*Difco*), 16 g KH_2PO_4 und 2,6 g Na_2HPO_4 gelöst in 1 l ionenfreiem Wasser (pH 6). Der Mikroorganismus wurde von einer Schrägagarkultur in einen 1-l-Erlenmeyerkolben mit 500 ml sterilem Medium eingepflegt. Dieser Ansatz wurde mit einem «Steri-Stopfen» verschlossen, 48 Std. auf einer Rundschüttelmaschine in einem thermostatisierten Raum bei 30° bebrütet und zur Beimpfung eines Laborfermenters (Firma *Eschweiler*, Kiel; Gesamtvolumen 31 l) verwendet, der 20 l steriles Anzuchtmedium der gleichen Zusammensetzung enthielt. Diese Brühe wurde im Fermenter unter Rühren (900 U/Min.) und Belüften (10 l/Min.) bei konstanter Temp. (30°) 24 Std. inkubiert. Durch Filtration wurde anschliessend ca. 1 kg feuchte Biomasse geerntet, die bis zum Einsatz im Umwandlungsexperiment bei 4° gelagert wurde.

3. *Synthese von 4,4-Dimethoxy-3-methylcrotonsäure-äthylester (5)*. Die Umsetzung von 59,0 g (0,5 mol) Methylglyoxal-dimethylacetal mit 112 g (0,5 mol) Triäthylphosphonoacetat wurde in einer *Horner*-Reaktion in Analogie zu der von *Takahashi et al.* [17] beschriebenen Methode (Natriumamid, Tetrahydrofuran⁴) vorgenommen. Nach Destillation des Rohproduktes im Wasserstrahlpumpenvakuum bei ca. 110° wurden 51,2 g (54,5%) farbloses Öl erhalten, das laut ¹H-NMR. und GC. neben 5 als Hauptkomponente 10-15% *cis*-Isomeres enthielt. Durch fraktionierte Destillation über eine Füllkörperkolonne bei 90-110°/11 Torr wurde die leichterflüchtige *cis*-Verbindung abgetrennt und die gewünschte *trans*-Verbindung 5 weitgehend rein erhalten (*cis*-Gehalt < 1%), Sdp. ca. 104°/11 Torr. - IR.: 1723, 1226 (Ester); 1605 (C=C); 1111, 1065 (Acetal). - ¹H-NMR.: 1,27 (*t*, *J* = 7, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$); 2,10 (*d*, *J* = 1,5, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(3)$); 3,28 (*s*, 2 $\text{CH}_3\text{O}-\text{C}(4)$); 4,17 (*qa*, *J* = 7, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$); 4,56 (*s*, $\text{H}-\text{C}(4)$); 6,0 (*d* \times *qa*, $\text{H}-\text{C}(2)$).



NMR. der *cis*-Verbindung: 1,88 anstelle von 2,10 für $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(3)$ und 5,97 anstelle von 4,56 für $\text{H}-\text{C}(4)$, übrige Verschiebungen gleich.

cis/trans-Isomerisierung. Die Lösung von 29,3 g *cis/trans*-Gemisch (ca. 50% *cis*) aus der destillativen Reinigung der *trans*-Verbindung in 125 ml Hexan wurde portionsweise mit ca. 0,6 g Natriumhydrid versetzt. Nach Abklingen der Wasserstoffentwicklung wurde unter magnetischem Rühren 2 Std. unter Rückfluss gekocht, wobei eine schwache Braunfärbung der Lösung eintrat. Das Natriumhydrid wurde über eine Fritte abfiltriert und aus dem Filtrat nach üblicher Aufarbeitung 28,8 g 5 als farbloses Öl erhalten (*cis*-Gehalt ca. 13%).

4. *Synthese von (E)-3-(1',3'-Dioxolan-2'-yl)-2-buten-1-ol (8)*. 4.1. (*E*)-Essigsäure-[3-(1',3'-dioxolan-2'-yl)-2-butenyl]ester. Durch ein Gemisch von 75,2 g (0,40 mol) γ -Acetoxy-tigllinaldehyd-dimethylacetal (Herstellung nach [20]), 29,8 g (0,48 mol) Äthylenglycol und 32 mg (0,4 mmol) NH_4NO_3 als Katalysator wurde bei 60° unter Rühren ein kräftiger Argon-Strom geleitet. Nach ca. 2,5 Std. waren 98% (GC.) des Dimethylacetals umgesetzt. Das auf RT. abgekühlte Gemisch wurde in 400 ml Benzol gelöst und wie üblich aufgearbeitet. Destillation des Rückstandes über eine kurze *Vigreux*-Kolonne bei 74°/0,2 Torr lieferte 68,0 g (91,3%) (*E*)-Essigsäure-[3-(1',3'-dioxolan-2'-yl)-2-butenyl]ester als farbloses Öl in einer Reinheit von 99,4% (GC.). - ¹H-NMR. (100 MHz): 1,70 (*d*, *J* = 1 mit zusätzlicher Fernkopplung, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(3)$); 2,05 (*s*, CH_3CO); 3,96 (*m*, 2 $\text{H}-\text{C}(4')$, 2 $\text{H}-\text{C}(5')$); 4,66 (*d*, *J* = 6,5, 2 $\text{H}-\text{C}(1)$); 5,13 (*s*, $\text{H}-\text{C}(2')$); 5,79 (ca. *t*, *J* = 6,5 mit zusätzlicher Fernkopplung, $\text{H}-\text{C}(2)$).

4.2. *Zur Überführung in 8* wurden zu einer Lösung von 18,6 g (0,10 mol) (*E*)-Essigsäure-[3-(1',3'-dioxolan-2'-yl)-2-butenyl]ester in 50 ml trockenem Methanol unter Argonbegasung und Rühren 27,5 ml 4N NaOH getropft, wobei durch Kühlen mit Eis 20° eingehalten wurde. Nach beendeter Zugabe war der

⁴) Vgl. auch die beschriebenen Synthesen von 4,4-Diäthoxy-3-methylcrotonsäure-äthylester [18] und 4,4-Diäthoxy-3-methylcrotonsäure-methylester [19] durch *Horner*-Reaktion.

Umsatz laut GC. vollständig. Das Gemisch wurde mit NaCl gesättigt und 3mal mit Methylchlorid extrahiert. Übliches Aufarbeiten sowie Trocknen i.HV. ergab 14,4 g (100%) **8** als farbloses Öl, Reinheit nach GC. 98,3%. - $^1\text{H-NMR}$. (100 MHz): 1,63 (*ca. d*, $J \approx 1,5$ mit zusätzlicher Fernkopplung, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(3)$); 2,98 (*br.*, HO); 3,95 (*m*, 2 H-C(4'), 2 H-C(5')); 4,19 (*d*, $J \approx 6,5$, 2 H-C(1)); 5,10 (*s*, H-C(2')); 5,80 (*ca. t*, $J \approx 6,5$ mit zusätzlicher Fernkopplung, H-C(2)).

5. *Analytische Überwachung der Fermentationsansätze*. Proben von je 5 ml wurden 2mal mit der 5-fachen Menge Methylchlorid extrahiert. Die vereinigten Methylchloridphasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und i.V. eingedampft. Der Rückstand wurde in soviel Dioxan aufgenommen, dass bezüglich des eingesetzten Reaktanden eine 1proz. Lösung entstand. Die Dioxanlösungen wurden auf einem programmierbaren Gas-Chromatographen unter folgenden Bedingungen analysiert: Glassäule (Länge 2 m), beschickt mit 12% Carbowax 20 M; Starttemp. 100° , Temperaturanstieg $4^\circ/\text{Min.}$, Endtemp. 220° .

6. *Fermentative Umwandlung von 4,4-Dimethoxy-3-methylcrotonsäure-äthylester (5) und Isolierung von (S)-3-Methyl- γ -butyrolacton (11)*. In einen sauberen, jedoch nicht sterilisierten Fermenter (Firma Eschweiler, Kiel) mit einem Gesamtvolumen von 31 l wurde eine Lösung von 550 g Zucker in 9,9 l ionenfreiem Wasser eingefüllt und darin 1,1 kg Presshefe suspendiert. Dann wurden 133 g **5** und zur Schaumbekämpfung 10 ml Polypropylynglycol-monobutyläther zugesetzt. Dieser Ansatz wurde bei einer geregelten Temp. von 30° unter Rühren (1000 U/Min.) und Belüften (600 l/Std.) inkubiert. Der Reaktionsverlauf wurde durch gas-chromatographische Analyse verfolgt (s. Fig. 1). Nach einer Fermentationsdauer von 56 Std. war das Ausgangsmaterial weitgehend in die Produkte **6** (49,2%) und **7** (46,9%) umgewandelt. Die Fermentation wurde abgebrochen, die Brühe mit NaCl gesättigt und 4 Tage kontinuierlich mit Diäthyläther extrahiert. Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen ergab 122 g Rohextrakt, welcher mit 100 mg *p*-Toluolsulfonsäure versetzt und in einer N_2 -Atmosphäre i.V. destilliert wurde. Das dabei gebildete **11** destillierte bei $86-88^\circ/14$ Torr (Badtemp. $125-140^\circ$). Aus mehreren Fraktionen wurden 26,2 g (34,4%) **11** (durchschnittliche Reinheit nach GC. 93%) erhalten. Eine 97,2% **11**enthaltende Fraktion ergab die folgenden Daten: Sdp. $88-89^\circ/14$ Torr ([21]: $76^\circ/11$ Torr für (\pm)-**11**), $[\alpha]_D^{20} = -24,7^\circ$ ($c = 4,0$, CH_3OH). - IR.: identisch mit demjenigen von (\pm)-**11** [21]. - $^1\text{H-NMR}$.: 1,17 (*d*, $J = 6$, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(4)$); 1,8-2,9 (*m*, H-C(4), 2 H-C(3)); 3,6-4,6 (*AB*-Teil eines *ABM*-Systems, 2 H-C(5)).

7. *(S)-2-Methyl-1,4-butandiol aus 11*. In üblicher Weise wurden 188 mg (1,81 mmol) **11** ($[\alpha]_D^{20} = -24,54^\circ$; Reinheit nach GC. 97%) mit LiAlH_4 in Äther reduziert. Die Extraktion des Diols mit Äther erfolgte kontinuierlich (*Kutscher-Steudel*). Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand im Kugelrohr bei $60^\circ/0,04$ Torr ([22]: $126-127^\circ/4$ Torr für (\pm)-2-Methyl-1,4-butandiol) destilliert: 100 mg (51%) (*S*)-2-Methyl-1,4-butandiol in einer Reinheit von 98% (GC.: 10% Squalan, 3 m), $[\alpha]_D^{20} = -14,4^\circ$ ($c = 0,6$, CH_3OH); [15]: $[\alpha]_D^{20} = +13,69$ für (+)-**11** ($c = 4,38$). - IR.: 3346, 1062, 1042 (OH). - $^1\text{H-NMR}$.: 0,9 (*d*, $J = 6$, $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(2)$); 1,4-2,1 (*m*, 3 H, H-C(2), 2 H-C(3)); 3,2-4,0 (*m*, 6 H, 2 H-C(1), 2 H-C(4), 2 HO).



8. *Fermentative Umwandlung von (E)-3-(1',3'-Dioxolan-2'-yl)-2-buten-1-ol (8) zum (S)-2-Methyl- γ -butyrolacton (9)*. In einen sauberen, jedoch nicht sterilisierten Laborfermenter (Firma Eschweiler, Kiel; Gesamtvolumen 31 l) wurde eine Lösung von 200 g Zucker in 18 l ionenfreiem Wasser eingefüllt. In dieser Zuckerlösung wurden 2 kg Biomasse von *Geotrichum candidum* suspendiert und dann 350 g **8** zugesetzt. Das Gemisch wurde 24 Std. bei einer geregelten Temp. von 30° gerührt (900 U/Min.) und belüftet (600 l/Std.). Der Reaktionsverlauf wurde gas-chromatographisch verfolgt (s. Fig. 2). Nach 24 Std. war **8** vollständig umgesetzt, und der Rohextrakt enthielt nach GC. 61,1% **9**. Die Brühe wurde filtriert. Filtrat und Rückstand wurden getrennt aufgearbeitet. Das Filtrat wurde 2mal mit je 40 l CH_2Cl_2 gerührt und der Rückstand 2mal mit je 5 l CH_2Cl_2 ausgeschüttelt. Die vereinigten Lösungsmittelphasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und i.V. eingedampft: 248 g Rohextrakt. Durch Destillation des Rohextraktes bei $81-84^\circ/14-15$ Torr (Badtemp. $105-115^\circ$) wurden in mehreren Fraktionen 107,8 g (42%) Produkt erhalten, das nach GC. zu 95% aus **9** bestand. Sdp. $82-83^\circ/14$ Torr ([16]: $92,5^\circ/20$ Torr), $[\alpha]_D^{20} = -22,9^\circ$ ($c = 2$, Äthanol) ([16]: $-21,5^\circ$ ($c = 5,5$, Äthanol)). In dem unter Zusatz von $\text{Eu}(\text{hfc})_3$ aufgenommenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum war nur das (*S*)-Enantiomere sichtbar.

Wir danken Frau Dr. *M. Grosjean* für die Bestimmung der optischen Drehungen, den Herren Dr. *G. Englert* und Dr. *W. Arnold* für die Aufnahme und Interpretation der NMR.-Spektren sowie den Herren Dr. *M. Vecchi* und *G. Oesterheld* für die vielen gas-chromatographischen Analysen. Unser Dank gebührt auch Herrn *M. Uschmann* für perfekte technische Assistenz bei den mikrobiologischen Umwandlungen und Herrn *A. Kormann* für die Isolierung der Fermentationsprodukte.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *H. Mayer, P. Schudel, R. Rüegg & O. Isler*, *Helv.* **46**, 963 (1963).
- [2] *H. Mayer, P. Schudel, R. Rüegg & O. Isler*, *Helv.* **46**, 650 (1963).
- [3] *J. W. K. Burrell, L. M. Jackman & B. C. L. Weedon*, *Proc. chem. Soc.* **1959**, 263.
- [4] *K. Chan, N. Cohen, J. P. de Noble, A. C. Specian, jr. & G. Saucy*, *J. org. Chemistry* **41**, 3497 (1976);
N. Cohen, W. F. Eichel, R. J. Lopresti, Ch. Neukom & G. Saucy, *J. org. Chemistry* **41**, 3512 (1976).
- [5] *D. Seebach & H. O. Kalinowski*, *Nachr. chem. Techn.* **24**, 415 (1976).
- [6] *J. W. Scott, F. T. Bizzarro, D. P. Parrish & G. Saucy*, *Helv.* **59**, 290 (1976).
- [7] *N. Cohen, W. F. Eichel, R. J. Lopresti, Ch. Neukom & G. Saucy*, *J. org. Chemistry* **41**, 3505 (1976).
- [8] *C. T. Goodhue & J. R. Schaeffer*, *Biotechnol. Bioeng.* **13**, 203 (1971).
- [9] *F. W. Hemming*, in 'Natural Substances Formed Biologically from Mevalonic Acid', T. W. Goodwin, Ed., Academic Press London & New York 1970, S. 105.
- [10] *M. Schmid & R. Barner*, *Helv.* **62**, 464 (1979).
- [11] *R. Zell*, *Helv.* **62**, 474 (1979).
- [12] *A. Fischli*, *Chimia* **30**, 4 (1976).
- [13] *R. Barner & M. Schmid*, *Helv.* in Vorbereitung.
- [14] *T. Kaneko, H. Katsura, H. Asano & K. Wakabayashi*, *Chemistry & Ind.* **1960**, 1187.
- [15] *R. Rossi, P. Diversi & G. Ingrosso*, *Gazz. chim. Ital.* **98**, 1391 (1971).
- [16] *T. Kaneko, K. Wakabayashi & H. Katsura*, *Bull. chem. Soc. Japan* **35**, 1149 (1962).
- [17] *H. Takahashi, K. Fujiwara & M. Ohta*, *Bull. chem. Soc. Japan* **35**, 1498 (1962).
- [18] *W. Stilz & H. Pommer*, *Germ. Pat.* 1.109.671 (1961); *Chem. Abstr.* **56**, 8571 (1962).
- [19] *G. Pattenden & B. C. L. Weedon*, *J. Amer. chem. Soc.* **90**, 1984 (1968).
- [20] *H. Pommer & A. Nürrenbach*, *Pure appl. Chemistry* **43**, 527 (1975); Vgl. auch: *H. Mayer & O. Isler*, in 'Carotenoids', O. Isler, Ed., Birkhäuser-Verlag, Basel und Stuttgart 1971, S. 394-397.
- [21] *C. F. Seidel & M. Stoll*, *Helv.* **42**, 1830 (1959).
- [22] *R. K. Hill & W. R. Schaerer*, *J. org. Chemistry* **27**, 921 (1962).