

CCA-354

542.941:547.636

Originaler wissenschaftlicher Beitrag

## Reaktionen mit Mikroorganismen. XIII. Mitteilung\*. Über die stereospezifische Reduktion von Benzoin und Benzil mit *Curvularia falcata*

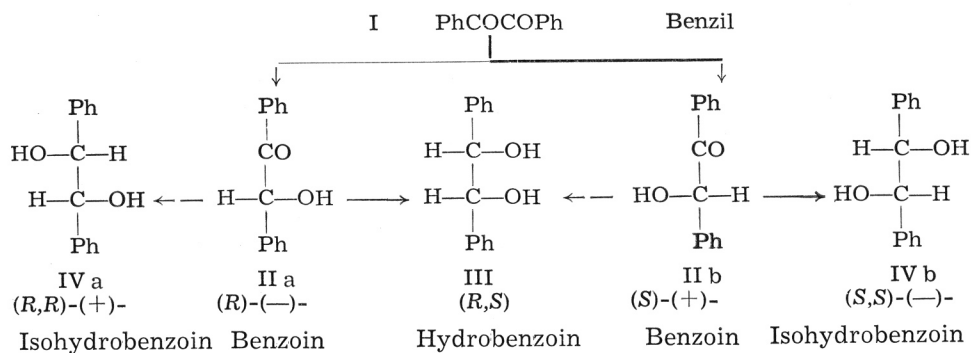
W. Acklin, Z. Kis und V. Prelog\*\*

*Organisch-chemisches Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule,  
Zürich, Schweiz*

Eingegangen am 12. März 1965.

Wachsende Kulturen des Mikroorganismus *Curvularia falcata* (Tehon) Boedijn reduzieren stereospezifisch das (*R*)-Benzoin (IIa) zu Hydrobenzoin (III) und das (*S*)-Benzoin (IIb) zu (*S,S*)-Isohydrobenzoin (IVb). Das Benzil wird zunächst zu einem Gemisch der beiden Benzoinen reduziert, in welchem das (*S*)-Enantiomere stark überwiegt. Die weitere stereospezifische Reduktion liefert dann die diastereomeren Diole III und IVb.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die mikrobiologische Reduktion von Carbonyl-Verbindungen mit dem Mikroorganismus *Curvularia falcata* (Tehon) Boedijn<sup>1</sup> haben wir auch das Benzil (I) und das racemische Benzoin (IIa und b) mit wachsenden Kulturen dieses Mikroorganismus im präparativen Masstab umgesetzt. Die Untersuchung der Reaktionsprodukte ergab, dass bei längeren Inkubationszeiten (5 Tage) in beiden Fällen als Haupt-



produkte die diastereomeren Diole, das Hydrobenzoin (III) und das linksdrehende, optisch fast reine Isohydrobenzoin (IVb), welches 98% des (*S,S*)-Enantiomeren\*\*\* enthält, entstehen. Bei der Reduktion des racemischen

\* XII. Mitteilung: W. Acklin, V. Prelog und B. Serdarević, *Helv. Chim. Acta* **46** (1963) 2440.

\*\* Herrn Prof. V. Njegovan zum 80. Geburtstag gewidmet.

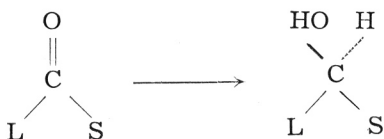
\*\*\* Die absolute Konfiguration der enantiomeren Benzoinen ist durch Verknüpfung mit Mandelsäure<sup>2</sup> eindeutig bestimmt worden: das rechtsdrehende Enantiomere besitzt die (*S*)-Konfiguration IIb. Die Isohydrobenzoinen sind ebenfalls mit Mandelsäure

Benzoinen wurden die beiden Diolen in ungefähr gleichen Mengen isoliert, das Benzil lieferte das (*S,S*)-Isohydrobenzoin in grossem Überschuss.

Bei kurzen Inkubationszeiten liess sich aus dem Produkt der mikrobiologischen Umsetzung von Benzil mit *Curvularia falcata* ein stark rechtsdrehendes Benzoin isolieren, mit etwa 78% des (*S*)-Enantiomeren\*. Offenbar verläuft die mikrobiologische Reduktion von Benzil zu Benzoin viel weniger stereospezifisch als diejenige der Benzoinen zu den Diolen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass das (*S*)-Benzoin (IIb) von *Curvularia falcata* stereospezifisch zum (*S,S*)-Isohydrobenzoin (IVb) und das (*R*)-Benzoin (IIa) zum Hydrobenzoin (III) reduziert wird. Die Reduktion von Benzil (I) liefert ein Gemisch der enantiomeren Benzoinen, in dem das (*S*)-Enantiomere (IIb) stark überwiegt. Dieses letztere wird stereospezifisch zum (*S,S*)-Isohydrobenzoin (IVb) reduziert, während das in geringerer Menge entstehende (*R*)-Benzoin (IIa) das Hydrobenzoin (III) gibt.

Der sterische Verlauf der erwähnten mikrobiologischen Reduktionen steht somit im Einklang mit dem für analoge Reduktionen früher<sup>1</sup> aufgestellten Schema:



nach welchem die räumliche Beanspruchung der Reste *L* (gross) und *s* (klein) in der unmittelbaren Nachbarschaft des Carbonyls die Produktstereospezifität bestimmt. Die Reihenfolge der Reste



erklärt sowohl die Produktstereospezifität der Reduktion der Benzoinen zu den Diolen, als auch die relativ geringe Stereospezifität der Reduktion des Benzils zu den Benzoinen, indem sich die beiden planaren Reste  $\text{PhCO—} > \text{Ph—}$  im Benzil offenbar in ihrer Raumbeanspruchung wenig unterscheiden.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

Alle Smp. sind korrigiert. Die IR.-Absorptionsspektren wurden mit einem Perkin-Elmer Double-Beam-Spectrograph. Modell 21, aufgenommen. Das optische Drehvermögen wurde im 1-dm Rohr bestimmt. Für Aluminiumoxid-Chromatogramme verwendete man »Aluminiumoxid Woelm, alkalifrei (annähernd neutral)«, für Kieselgelchromatogramme »Kieselgel Merck, Korngrösse unter 0,08«. Für die Dünnschichtchromatographie (DS) wurde Kieselgel G, Merck, verwendet. Die Entwicklung erfolgte bei Kammerfüllung und wurde nach einer Laufstrecke von 12 cm unterbrochen. Für die Sichtbarmachung der Flecken wurde hintereinander mit 2,4-Dinitrophenyl-

verknüpft worden: dem linksdrehenden Enantiomeren wurde die (*S,S*)-Konfiguration zugesprochen<sup>3</sup>. Diese Zuordnung konnte von uns durch partielle Oxydation des linksdrehenden Enantiomeren mit Salpetersäure zum (*S*)-Benzoin gesichert werden.

\* Es sei in diesem Zusammenhang erwähnt, dass nach Angaben von Neuberg und Nord<sup>4</sup> die gärende Hefe das Benzil nur bis zur Stufe des Benzoinen reduziert. Die Hauptmenge des entstandenen Benzoinen war racemisch, aus den Mutterlaugen wurde ein schwach linksdrehendes Präparat erhalten.

hydrazin- und Phosphormolybdänsäure-Lösung besprüht und anschliessend auf 110—120° erhitzt.

Das käufliche Benzil wurde aus Hexan umkristallisiert, das käufliche Benzoin einmal aus Äthanol und zweimal aus Benzol-Hexan.

Hydrobenzoin und ( $\pm$ )-Isohydrobenzoin wurden durch Reduktion von Benzil mit Lithiumaluminiumhydrid hergestellt<sup>5</sup> und durch Chromatographie an Aluminiumoxid voneinander getrennt. DS in den Systemen Chloroform-Äthanol 98:2 (a) und Methylchlorid-*n*-Propanol 95:5 (b). Hydrobenzoin zeigte Smp. 136—138°,  $R_f$  (a) 0,23,  $R_f$  (b) 0,60. Isohydrobenzoin zeigte Smp. 121°,  $R_f$  (a) 0,17,  $R_f$  (b) 0,51. Die IR.-Absorptionsspektren der beiden Diastereomeren sind in Chloroform wie auch in KBr deutlich voneinander verschieden.

Vorversuche mit kleinen Mengen zeigten bei der DS-Analyse, dass wachsende Kulturen von *Curvularia falcata* sowohl Benzil als auch Benzoin rasch reduzieren: nach 1—2 Tagen sind die Edukte verschwunden. Aus Benzil hat sich Benzoin und Isohydrobenzoin gebildet, aus Benzoin Hydrobenzoin und Isohydrobenzoin. Während die Diole bei längerer Inkubationszeit unverändert bleiben, wird das aus Benzil primär gebildete Benzoin rasch zu Hydrobenzoin und Isohydrobenzoin weiterreduziert, wobei letzteres stark überwiegt.

#### 1. Umsetzung von Benzil mit wachsenden Kulturen von *Curvularia falcata*

a) Zu 4 Schüttelenten, die je 4 L einer 24 Std. alten Kultur\* von *Curvularia falcata* enthielten, gab man je 2 g feinpulverisiertes Benzil. Unter schwacher Luftzufuhr wurde 48 Std. geschüttelt, darauf das Mycel abfiltriert und hintereinander mit 3 L Wasser und 1 L Äther gewaschen. Das Filtrat und die Waschlösungen wurden vereinigt und in einem Kutscher-Steedel-Apparat erschöpfend mit Äther extrahiert. Trocknen über Natriumsulfat und Eindampfen lieferte 8,67 g rötlich gefärbten kristallinen Rückstand. DS zeigte die Anwesenheit von Isohydrobenzoin neben kleinen Mengen Benzil, Benzoin und Hydrobenzoin. Nun wurde der Rohextrakt zweimal aus der zehnfachen Menge Benzol umkristallisiert, das Kristallinat in Aceton gelöst, mit Aktivkohle entfärbt und durch Zugabe von Hexan zur heissen Lösung kristallisiert. Man erhielt so 4,65 g chemisch und optisch reines (—)-(S,S)-Isohydrobenzoin, Smp. 148—149°,  $[\alpha]_D = -93^\circ$  ( $c = 1,205$ , Feinsprit). Zur Analyse wurde bei 110°/0,02 Torr sublimiert.

Anal.  $C_{14}H_{14}O_2$  (214,26) Ber.: C 78,48; H 6,59%  
Gef.: C 78,40; H 6,52%

Die IR.-Spektren in Chloroform und KBr waren identisch mit jenen von authentischem ( $\pm$ )-Isohydrobenzoin.

Die vereinigten Mutterlaugen wogen 3,701 g. Sie wurden an 255 g. Aluminiumoxid (Akt. II) chromatographiert. Chloroform-Äthanol 99:1 eluierte nacheinander 1072 mg eines Gemisches von Benzil und Benzoin, 816 mg Hydrobenzoin und 177 mg eines Gemisches von Hydrobenzoin und Isohydrobenzoin. Chloroform-Äthanol-Gemische 9:1 bis 7:3 eluierten noch 762 mg reines Isohydrobenzoin. Es zeigte nach Sublimation  $[\alpha]_D = -59^\circ$  ( $c = 1,17$ , Feinsprit), enthält also 18,2% oder 140 mg (+)-(R,R)-Isohydrobenzoin. Unter Vernachlässigung der kleinen Mischfraktion von 177 mg lässt sich aus diesen Zahlen berechnen, dass das im Rohextrakt vorhandene Isohydrobenzoin zu ca. 98% aus dem (—)-(S,S)-Enantiomeren bestand.

b) Zu 2 Schüttelenten, die je 4 L einer 24 Std. alten Kultur von *Curvularia falcata* enthielten, gab man je 1 g feinpulverisiertes Benzil. Nach 5 Std. Inkubation wurde das Mycel abgetrennt, mit Wasser gewaschen und die vereinigten Filtrate im Kutscher-Steedel mit Äther extrahiert. Trocknen der Ätherlösung über Natriumsulfat und Eindampfen ergab 4,87 g Rohextrakt, der laut DS ca. 70% aus Benzil und 30% aus Benzoin bestand. Chromatographie an der 100 fachen Menge Kieselgel mit Hexan-Benzol-Gemischen lieferte reines Benzoin, das nach Sublimation bei 70°/0,05 Torr  $[\alpha]_D = +67,6^\circ$  zeigte ( $c = 1,02$ , Aceton). Diese Drehung entspricht einem Gehalt von 78% (S)-Benzoin.

\* Die Züchtung erfolgte auf die übliche, in den früheren Mitteilungen dieser Reihe<sup>1,6</sup> beschriebene Weise.

## 2. Umsetzung von Benzoin mit wachsenden Kulturen von *Curvularia falcata*

2 Schüttelenten die je 4 L einer 24 Std. alten Kultur von *Curvularia falcata* enthielten, wurden mit je 1 g Benzoin versetzt und nach einer Inkubationszeit von 24 Std. wie üblich aufgearbeitet. Man erhielt 3,29 g Rohextrakt, der laut DS ungefähr gleiche Mengen an Hydrobenzoin und Isohydrobenzoin enthielt. Er wurde zunächst durch Chromatographie an 60 g Kieselgel in Methylenchlorid vorgereinigt, die Diol-Fractionen vereinnigt (1,97 g) und an 80 g Aluminiumoxid (Akt. II) chromatographiert. Methylenchlorid und Methylenchlorid-Äther-Gemische eluierten 857 mg reines Hydrobenzoin. Methylenchlorid-Äthanol-Gemische und schliesslich reines Äthanol eluierten nach einer kleinen Mischfraktion (34 mg) 960 mg Isohydrobenzoin, das aber noch Spuren hochpolarer Pilzmetabolite enthielt. Bei der nochmaligen Chromatographie an 30 g Aluminiumoxid (Akt. II—III) konnte mit Methylenchlorid reines Isohydrobenzoin eluiert werden. Es zeigte nach Sublimation  $[\alpha]_D = -90^\circ$  ( $c = 2,87$ , Feinsprit), enthielt also 98,4% an (S,S)-Enantiomerem.

## 3. Oxydation von (—)-(S,S)-Isohydrobenzoin

500 mg optisch reines (—)-Isohydrobenzoin (gewonnen durch mikrobiologische Reduktion und Kristallisation bis zur konstanten Drehung) wurden pulverisiert, mit 5 ml 65 proz. Salpetersäure ( $d = 1,4$ ) übergossen und mit einem Vibromischer 90 Min. bei Zimmertemperatur gerührt. Man goss auf Wasser, extrahierte mit Chloroform, wusch die Auszüge mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, trocknete über Magnesiumsulfat und dampfte ein. Den Rückstand (510 mg) chromatographierte man an 25 g Kieselgel.

Benzol eluierte 207 mg Benzil und andere Oxydationsprodukte, Benzol-Äther-Gemische eluierten 297 mg fast reines Benzoin. Nach dreimaliger Umkristallisation erhielt man ein optisch und chemisch reines Produkt mit Smp. 132—133° und  $[\alpha]_D = +120,8^\circ$  ( $c = 0,71$ , Aceton). Zur Analyse wurde bei 95°/0,05 Torr sublimiert.

*Anal.*  $C_{14}H_{12}O_2$  (212,25) Ber.: C 79,22; H 5,70%  
Gef.: C 79,10; H 5,67%

Das IR.-Spektrum in Chloroform war identisch mit jenem von (±)-Benzoin, hingegen zeigten sich deutliche Unterschiede in den KBr-Spektren. Optische Rotationsdispersion (in Methanol):  $[\Phi]_{350} = +4050$ ,  $[\Phi]_{315} = 0^\circ$ .

Die Optische-Rotationsdispersion-Messung verdanken wir Professor W. Klyne, London. Die IR.-Spektren wurden in unserer Abteilung für Instrumentalanalyse (Leitung Dr. W. Simon), die Mikroanalysen in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung W. Manser) ausgeführt.

Dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

## LITERATUR

1. Vgl. *Helv. Chim. Acta* **39** (1956) 748; **41** (1958) 1416, 2362, 2379; **42** (1959) 736, 1862, 2624.
2. A. Mc Kenzie und H. Wren, *J. Chem. Soc.* **93** (1908) 309, R. Roger und W. B. McKay, *J. Chem. Soc.* **1931**, 2237. Vgl. K. Freudenberg, *Stereochemie*, Verlag Deuticke, Leipzig und Wien, 1933, S. 697.
3. Vgl. G. Berti, F. Bottari und B. Macchia, *Farmaco (Pavia) Ed. sci.* **15** (1960) 377. G. Berti und F. Bottari, *J. Org. Chem.* **25** (1960) 1286.
4. C. Neuberg und F. F. Nord, *Ber.* **52** (1919) 2248.
5. L. W. Trevoy und W. G. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **71** (1949) 1675.
6. W. Acklin, V. Prelog und B. Serdarević, *Helv. Chim. Acta* **46** (1963) 2440.

## IZVOD

**Reakcije sa mikroorganizmima. XIII. Saopćenje. O stereospecifičnoj redukciji benzoina i benzila s *Curvularia falcata****W. Acklin, Z. Kis i V. Prelog*

Rastuće kulture mikroorganizma *Curvularia factata* (Tehon) Boedijn reduciraju stereospecifično (*R*)-benzoin (IIa) u hidrobenezoin (III) i (*S*)-benzoin (IIb) u (*S,S*)-izohidrobenezoin (IVb). Redukcija benzila daje prvo smjesu obih benzoina u kojoj prevladava (*S*)-enantiomer dok u daljnjoj reakciji nastaju kao konačni produkti diastereomerni dioli III i IVb.

ORGANISCH-CHEMISCHES LABORATORIUM  
EIDGENÖSSISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE  
ZÜRICH, ŠVICARSKA

Primljeno 12. ožujka 1965.