



Doctoral Thesis

Stereochemische Untersuchungen der von *Pseudomonas oleovorans* katalysierten Bildung von Aldehyden aus Olefinen

Author(s):

Caduff, Pieder

Publication Date:

1992

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000646498> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 9751

**Stereochemische Untersuchungen der von *Pseudomonas
oleovorans* katalysierten Bildung von Aldehyden aus Olefinen.**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von

PIEDER CADUFF

dipl. Chem. ETH

geboren am 10. Juli 1959

von Cumbel / GR

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. D. Arigoni, Referent
PD Dr. B. Jaun, Korreferent

Zürich 1992

Zusammenfassung

Der Organismus *Pseudomonas oleovorans* verfügt über ein Enzymsystem, das befähigt ist, 1-Octen zu 7-Octen-1-ol zu hydroxylieren. Des Weiteren wird die terminale Doppelbindung derart oxidiert, dass 1,2-Epoxyoctan und Caprylaldehyd entstehen. Während der Aldehydbildung tritt eine intramolekulare 1,2-Wasserstoffwanderung auf. Es ist bekannt, dass das Epoxid nicht eine Zwischenstufe für die Gewinnung des Aldehyds darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurde regioselektiv monodeuteriertes 1-Octen mit ganzen *Pseudomonas oleovorans*-Zellen inkubiert, um den stereochemischen Verlauf der Bildung von Caprylaldehyd festzulegen. Es gelang nicht, den erwünschten Caprylaldehyd in der Kulturlösung nachzuweisen. Eine in den Bakterienzellen anwesende Aldehyddehydrogenase ist in der Lage, den enzymatisch gebildeten Aldehyd sogleich zur Carbonsäure zu oxidieren. Aus diesem Grunde wurde ebenfalls nach der Caprylsäure Ausschau gehalten. Aber auch dieses Metabolisierungsprodukt konnte nicht erfasst werden. Auf Grund dieses Befundes mussten die relevanten Komponenten des Enzymsystems der *Pseudomonas oleovorans* isoliert werden.

Die Isolierung des Rubredoxins und die partielle Reinigung der *Pseudomonas oleovorans*-Monooxygenase waren Voraussetzungen, um ein Enzymsystem zu erstellen, das aus NADPH, Spinat-Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase, Rubredoxin (bzw. Ferredoxin) und der partiell gereinigten Monooxygenase bestand. Wurde 1-Octen als Substrat für dieses POM-Enzymsystem eingesetzt, konnte die Caprylsäure als Oxydationsprodukt identifiziert werden. Bei Verwendung von cis-[1-²H]-1-Octen als Substrat war die isolierte Caprylsäure am Zentrum C(2) monodeuteriert. Da der Deuterierungsgrad des Produktes dem Deuteriumanteil in cis-Stellung des Substrates entsprach, war ausschliesslich der cis-ständige Ligand von C(1) nach C(2) gewandert. Dabei wird der primäre Deuteriumisotopeneffekt eher überwunden, als dass ein Wasserstoffatom aus der trans-Lage wandern würde. Diese Ausschliesslichkeit der 1,2-Wanderung des cis-ständigen Liganden konnte in einer komplementären Inkubation durch Einsatz von trans-[1-²H]-1-Octen als Substrat belegt werden.

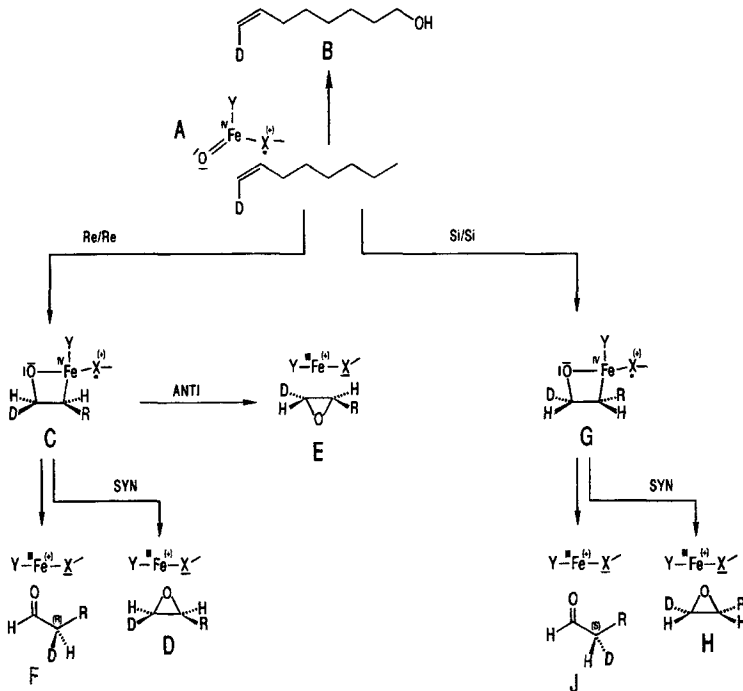
Um den stereochemischen Verlauf der Aldehydbildung beschreiben zu können, musste zudem die Konfiguration des Wanderungsterminus untersucht werden. Dazu wurde die Synthese von selektiv α -monodeuterierter Caprylsäure bekannter Konfiguration am C(2)-Zentrum notwendig. Durch Reduktion von [1- ^2H]-Heptanal mit dem chiralen Midland-Reagenz wurde stereoselektiv monodeuterierter [1- ^2H]-Heptanol hergestellt. Die Konfiguration des entstandenen Carbinolzentrums wurde auf unabhängige Weise enzymatisch und NMR-spektroskopisch bestimmt. In mehreren Syntheseschritten mit bekanntem stereochemischen Verlauf wurde die [2- ^2H]-Caprylsäure hergestellt. Nach einer Veresterung der Carbonsäure mit optisch reinem L-Mandelsäuremethylester konnte die Konfiguration des C(2)-Zentrums ^2H -NMR-spektroskopisch ermittelt werden. Diese analytische Methodik ermöglichte nun, die Konfiguration der enzymatisch gebildeten [2- ^2H]-Caprylsäure zu bestimmen.

Bei der Verwendung von [2- ^2H]-1-Octen als Substrat des beschriebenen POM-Enzymsystems wurde nachgewiesen, dass 63% der α -monodeuterierten Caprylsäure die (2R)-Konfiguration besitzen. Die restlichen 37% weisen die antipodale Konfiguration auf. Wurde cis-[1- ^2H]-1-Octen enzymatisch umgesetzt, standen 26% der (2R)-konfigurierten Carbonsäure 74% der (S)-[2- ^2H]-Caprylsäure gegenüber. Da aus beiden Inkubationsexperimenten der [2- ^2H]-Caprylaldehyd entsteht, wird keiner der Anteile durch die Oxidation zur Carbonsäure verändert. Somit stellt sich diese Verteilung bereits bei der Bildung des Caprylaldehyds ein.

Die Ausschliesslichkeit der 1,2-Wanderung des cis-ständigen Substituenten erlaubt, die Richtung des elektrophilen Angriffs der oxidierenden Eisen-oxo-spezies auf die Substratdoppelbindung und die Konfiguration des α -monodeuterierten Caprylaldehyds miteinander zu korrelieren. Somit entspricht das (2R)/(2S)-Verhältnis im Aldehyd der Häufigkeit des elektrophilen Angriffes aus dem jeweiligen Halbraum der Substratdoppelbindung. Als interne Standardisierung wurde jeweils die Menge der enzymatisch gebildeten, terminal ungesättigten Caprylsäure verwendet. Diese Carbonsäure ist durch Hydroxylierung und Oxydation der Substratmethylgruppe gebildet worden.

Neben dem Caprylaldehyd wird 1,2-Epoxyoctan gebildet. Da dieses Metabolisierungsprodukt nicht im gleichen zellfreien System nachgewiesen werden konnte, wurden die relativen Anteile der konfigurationsisomeren, monodeutierten Epoxide aus Inkubationen von cis- bzw. trans-[1-²H]-1-Octen mit ganzen *Pseudomonas oleovorans*-Zellen ermittelt.

Basierend auf den aus den Inkubationen mit den Enzymsystemen und den ganzen Bakterienzellen gewonnenen Resultaten wurde ein mechanistisches Bild entworfen, das die Beschreibung der Metabolisierung von terminal ungesättigten Kohlenwasserstoffen mit dem Enzymsystem der *Pseudomonas oleovorans* erlaubt. Stellvertretend wird der Reaktionsmechanismus für die Metabolisierung von cis-[1-²H]-1-Octen im Schema A dargestellt.



Schema A : Reaktionsschema der Metabolisierung von cis-[1-²H]-1-Octen mit dem Enzymsystem der *Pseudomonas oleovorans*.

Summary

The organism *Pseudomonas oleovorans* bears an enzyme system capable of hydroxylating 1-octene to 7-octene-1-ol. In addition the substrate double bond can be oxidized to yield 1,2-epoxyoctane and octanal. In the course of the aldehyde formation an intramolecular 1,2-hydride shift is required. It is known that the epoxide is not an intermediate for the formation of the aldehyde. In an attempt to investigate the stereochemistry of the aldehyde formation regioselectively monodeuterated 1-octenes were incubated with whole cells of *Pseudomonas oleovorans*. In this incubation no octanal could be detected. Therefore a cell free enzyme system was prepared.

Isolation of rubredoxin and partial purification of the *Pseudomonas oleovorans* monooxygenase allowed to reconstitute an enzyme system consisting of NADPH, spinach-ferredoxin-NADP⁺-reductase, rubredoxin (respectively ferredoxin) and the partially purified monooxygenase. Using 1-octene as substrate for this POM-enzyme system, octanoic acid was detectable by GLC/MS. Incubation of *cis*-[1-²H]-1-octene yielded an α -monodeuterated octanoic acid having the same deuterium content as found in *cis*-position of the substrate. This implies that only the ligand in *cis*-position of the substrate is able to undergo the 1,2-migration in spite of an adverse isotope effect. The complementary incubation using *trans*-[1-²H]-1-octene confirmed the observed specificity of the 1,2-shift.

To investigate the stereochemistry of the aldehyde formation analytical tools had to be established in order to determine the configuration at the C(2)-center of octanal or of octanoic acid. The synthesis of [2-²H]-octanoic acid of known configuration was initiated by the reduction of [1-²H]-heptanal with a chiral Midland reagent. The configuration of the resulting [1-²H]-1-heptanol was established by means of enzymatic oxidation/reduction in the presence of yeast alcohol dehydrogenase and by NMR analysis. Different consecutive synthetic steps of known stereochemical course were carried out to form the [2-²H]-octanoic acid of known C(2)-configuration. After

esterification of the carboxylic acid with optically active methylester of L-mandelic acid the diastereotopic ligands of the monodeuterated center could be identified by means of ^2H -NMR-spectroscopy. This analytical methodology allowed to determine the configuration of the enzymatically produced [2- ^2H]-octanoic acid.

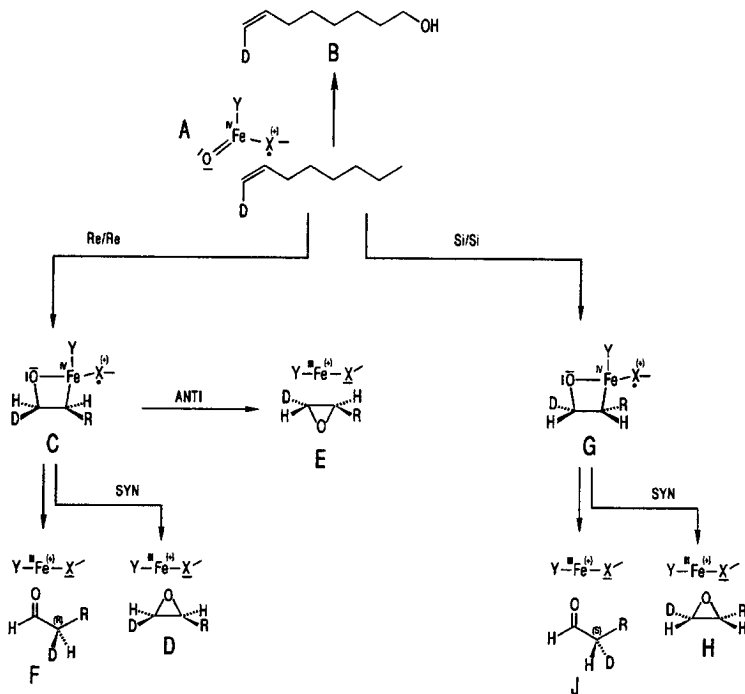
When [2- ^2H]-1-octene was used as substrate for the POM-enzyme system 63% of the α -monodeuterated octanoic acid are of (2R)-configuration and 37% have antipodal configuration. Incubation of cis-[1- ^2H]-1-octene with the same enzyme system resulted in 26% of (2R)- and 74% of (2S) monodeuterated octanoic acid.

The exclusive migration of the ligand in cis-position of the substrate double bond allows to correlate the side of electrophilic attack on the double bond by the oxidative iron-oxo-species and the configuration of the α -monodeuterated aldehyde. Therefore the quotient (2R)/(2S) is monitoring the ratio of the Re/Re- and Si/Si-attack on the substrate double bond. The amount of 1-octenoic acid produced by hydroxylation and oxidation of the substrate methyl group allows to determine the turnover of the reaction. Because incubation time is kept constant the results from incubation of each of the monodeuterated substrates can be compared.

A further product of the enzymatic conversion of 1-octene with whole cells of *Pseudomonas oleovorans* is 1,2-epoxyoctane. This epoxide could not be isolated using the cell free POM enzyme system. The relative distribution of constitution isomeric monodeuterated epoxides was determined by incubation of cis- and trans-[1- ^2H]-1-octene with the bacterial cells.

On the basis of the results with the POM enzyme system and the experiments with whole *Pseudomonas oleovorans* cells a mechanistic scheme is proposed to describe the metabolism of terminally unsaturated hydrocarbons with the enzyme system of *Pseudomonas oleovorans*. Scheme A illustrates

the reaction pathway for incubation of cis-[1-²H]-1-octene with the enzyme system.



Scheme A : Reaction of cis-[1-²H]-1-Octen with the *Pseudomonas oleovorans* enzyme system.