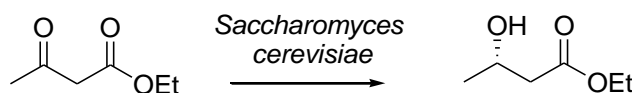
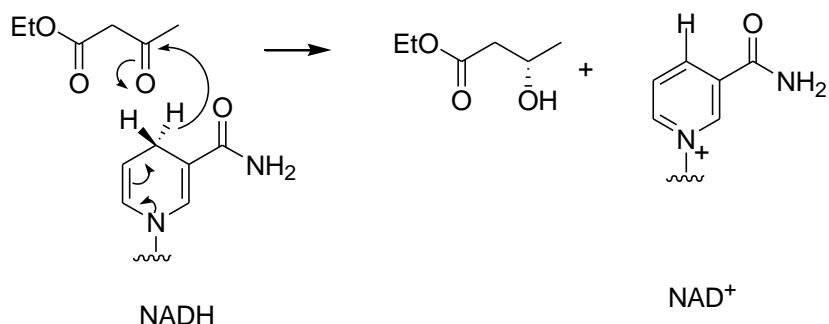


## Sintesi enantioselettiva dell'etil (+)-(S)-3-idrossibutirrato



La riduzione del gruppo carbonilico dell'etil acetoacetato viene ottenuta utilizzando cellule di lievito di birra in condizioni fermentanti. La reazione è catalizzata da delle deidrogenasi contenute nel lievito, una classe di zinco ossidoriduttasi, mentre lo ione idruro deriva dal coenzima NADH, il quale viene ossidato a NAD<sup>+</sup> durante il processo.



Si forma prevalentemente un enantiomero e il prodotto viene ottenuto con un eccesso enantiomerico che dipende dalle condizioni di reazione.

### Procedura

50 g di lievito di birra fresco (o 20 g di lievito secco) vengono aggiunti ad una soluzione di 75 g di saccarosio in 400 mL di acqua. La sospensione viene posta sotto agitazione con agitatore magnetico e riscaldata a 30-35°C. Dopo un'ora si aggiungono 5 g di etil acetoacetato (0.037 mol). La miscela viene mantenuta sotto agitazione alla temperatura di 30-35°C per un giorno.

L'andamento della reazione viene seguito mediante gascromatografia chirale: si preleva 1 mL della miscela di reazione e si effettua una estrazione con etere etilico (2 ml circa). L'estratto viene diluito con 2 mL di etere dietilico e anidrificato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro prima di essere iniettato al gascromatografo.

**Calcolare l'eccesso enantiomerico dell'alcol ottenuto dal gascromatogramma chirale.** Se dopo un giorno è presente ancora chetone,

si aggiungono 250 ml di soluzione di saccarosio fresca e si continua ad agitare per un giorno a 30-35°C. Al termine della reazione si rimuove il lievito filtrando la sospensione su uno strato di Celite (o per centrifugazione a 3700 giri per 10 min). La fase acquosa viene estratta 3 volte con etere etilico, gli estratti organici riuniti vengono seccati su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Dopo aver eliminato il solvente si distilla a pressione ridotta.

Si registrano gli spettri IR, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR e DEPT. Si determina il potere rotatorio specifico.

**Determinare la resa e l' eccesso enantiomerico sia dall' HRGC chirale che dal valore di potere rotatorio specifico del prodotto puro ottenuto.**

P.e.<sub>14mmHg</sub> 74-75°C. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 38.6 (c=1, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  : 4.22 (1H, m, CHOH), 4.16 (q, J=7Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.83 (1H, s, OH), 2.46 (2H, sistema ABX,CH<sub>2</sub>), 1.28 (3H, t, J=7Hz,), 1.24 (3H, d, J=6.5 Hz,).

### HRGC (high resolution gas chromatography) chirale:

DMePeBeta ciclodestrine (su OV1701)  $\beta$ -CDX: 7 unità di glucosio

25 m x 0.25 mm, spessore film 0.25  $\mu$ m, split 1:50

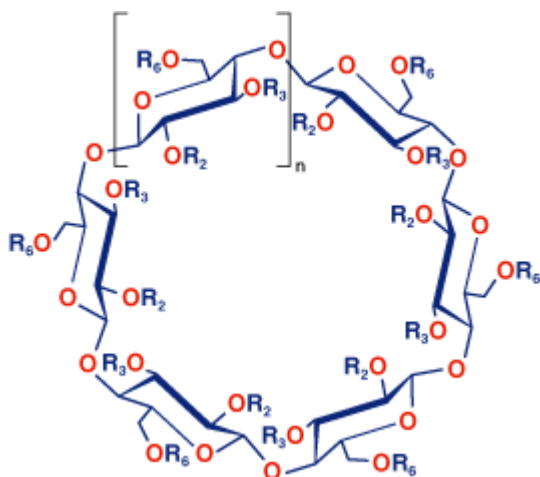
iniettore 240 °C, detector 260°C

forno: 70°C per 10 minuti, 2°C/min fino a 150°C

Acetoacetato di etile: 13,6 min

(S)-3-idrossibutirrato: 17,41 min

(R)-3-idrossibutirrato: 17,69 min



Gli oligosaccaridi ciclici consistono in sei ( $\alpha$ -ciclodestrine), sette ( $\beta$ -ciclodestrine) o otto ( $\gamma$ -ciclodestrine) unità di glucosio legate tramite legami  $\alpha$ -1,4.

## BIOTRASFORMAZIONI

Ci sono due sistemi di biotrasformazione, quello che fa uso di enzimi isolati e quello che opera con cellule intere, ognuno dei quali ha i suoi vantaggi e i suoi svantaggi. Enzimi isolati hanno il vantaggio di essere sistemi semplici, facilmente maneggiabili, specifici per determinate reazioni e facilmente tolleranti cosolventi, ma sono anche in genere sistemi molto costosi che talvolta necessitano addizione di cofattori non sempre recuperabili.

L'impiego di cellule intere è molto economico e non necessita la presenza di cofattori anche se presenta svantaggi quali la difficoltà di estrazione del prodotto, la possibilità di reazioni secondarie non desiderate e difficoltà di ottenere miscele omogenee con altri solventi.

Un microorganismo largamente impiegato in chimica organica è il *Saccharomyces cerevisiae* (lievito di birra) che catalizza reazioni di riduzione di composti contenenti gruppi carbonilici portando all'ottenimento di alcoli secondari. Nel caso di riduzione di un chetone prochirale si ottengono alcoli otticamente attivi.

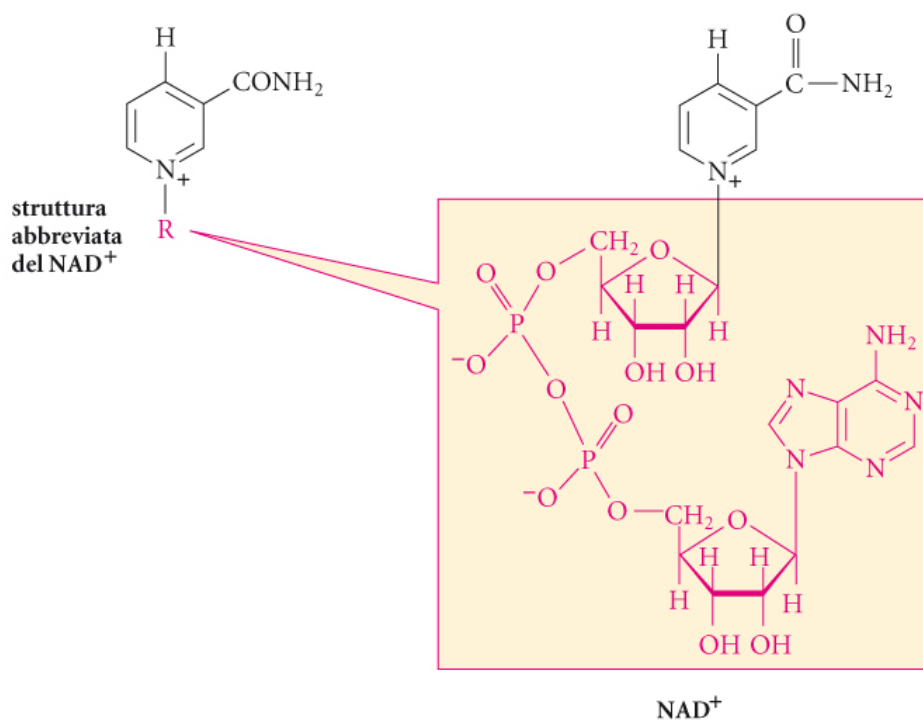
L'utilizzo di un sistema a cellule intere come il lievito di birra ha il vantaggio di utilizzare blande condizioni di reazione in termini di pH, temperatura e solvente (generalmente acqua), di dare regiospecificità (nel caso di più gruppi funzionali la reazione avviene ad un solo sito specifico), di essere stereoselettivo (l'enzima distingue tra gli enantiomeri di un substrato racemo) e di essere ecocompatibile.

### Regola di Prelog:

Chetoni variamente sostituiti sono ridotti dal *Saccharomyces cerevisiae* ottenendo alcoli secondari principalmente a configurazione S.

Il trasferimento di idrogeno al substrato avviene dalla posizione 4 del nucleo diidropiridinico del coenzima ridotto. Questo trasferimento è stereospecifico non solo rispetto al substrato ma anche rispetto al coenzima. I due idrogeni in posizione 4 della parte diidropiridinica del coenzima ridotto non sono enzimaticamente equivalenti. L'enzima attiva solamente uno degli idrogeni del

coenzima ridotto in quanto un lato del coenzima è stereospecificamente schermato dalla proteina.



**Figura 10.1** Struttura completa e abbreviata del NAD<sup>+</sup>. La parte in colore della struttura completa è abbreviata come gruppo R.