

Wydział Chemiczny
Politechniki Warszawskiej

*Zakład Technologii i Biotechnologii Środków
Leczniczych*

Technologia chemiczna - laboratorium

Instrukcja do ćwiczenia
Redukcja związków organicznych za pomocą drożdży
Saccharomyces cerevisiae

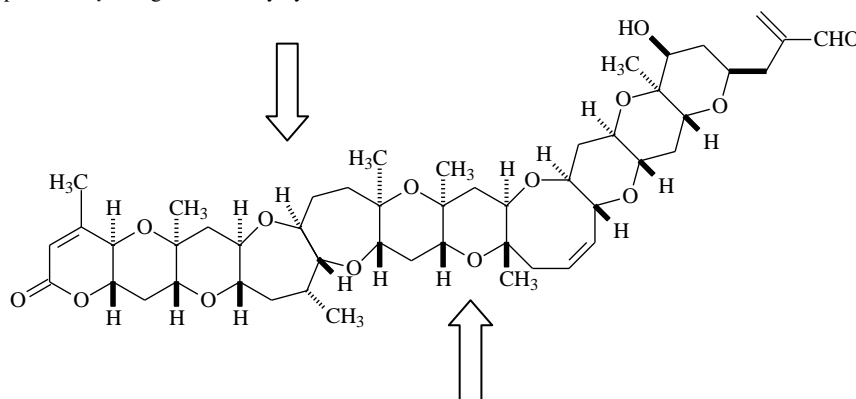
Opracowywali kolejno:
dr inż. Zbigniew Ochal
dr inż. Marcin Zagozda
dr inż. Marcin Poterała
dr inż. Joanna Głowczyk-Zubek

Warszawa 2017

Wstęp

Wszystkie organizmy żywe są zdolne do syntezy i przekształcania związków organicznych. Reakcje katalizowane enzymami - to podstawa wszystkich procesów życiowych. Możliwości syntezy skomplikowanych związków organicznych przez komórki mikroorganizmów, roślin i zwierząt środowisku wodnym, w niskiej temperaturze i obojętnym pH wprawiają w konsternację ambitnych chemików syntetyków. Dobrym przykładem może być synteza cyklicznego polieteru - brewetoksyny B. Jest to silna neurotoksyna produkowana przez morskie glony – bruzdnice. Zawiera 11 pierścieni i liczne centra chiralności. Udało się też otrzymać ten związek na drodze syntezy chemicznej. Na schemacie 1 porównano czas, wydajność i inne warunki obu dróg syntezy tego związku.

Biosynteza – glony (*Ptychodiscus brevis*), wyd. 3mg – 20 dni, 18 l pożywki, proste związki organiczne, enzymy



Synteza chemiczna
K.C.Nicolaou z zespołem - 20 osób (*Homo sapiens*), 12 lat 83 reakcje; wyd. 0,043%
2-deoksy-(D)-ryboza

Schemat 1. Otrzymywanie brewetoksyny B

Możliwości syntezy związków organicznych z wykorzystaniem organizmów żywych a ściślej z wykorzystaniem zawartych w ich komórkach enzymów są od dawna obiektem intensywnych badań naukowych.

Efekty tych badań znalazły szereg zastosowań przemysłowych w postaci produkcji na dużą skalę L-sorbozy (niezbędnej do syntezy witaminy C), produkcji większości antybiotyków, steroidów, aminokwasów, peptydów, akryloamidu.

Produkcja lub synteza biotechnologiczna to proces, wykorzystujący metabolizm żywych komórek, w czasie którego w wieloetapowych reakcjach biochemicznych powstaje skomplikowany związek chemiczny.

Synteza związku zachodzi w tym przypadku *de novo* z prostych substratów. Przykładem takiego procesu może być produkcja większości antybiotyków (np. produkcja erytromycyny w procesie fermentacji z wykorzystaniem metabolizmu promieniowca *Streptomyces erythreus*).

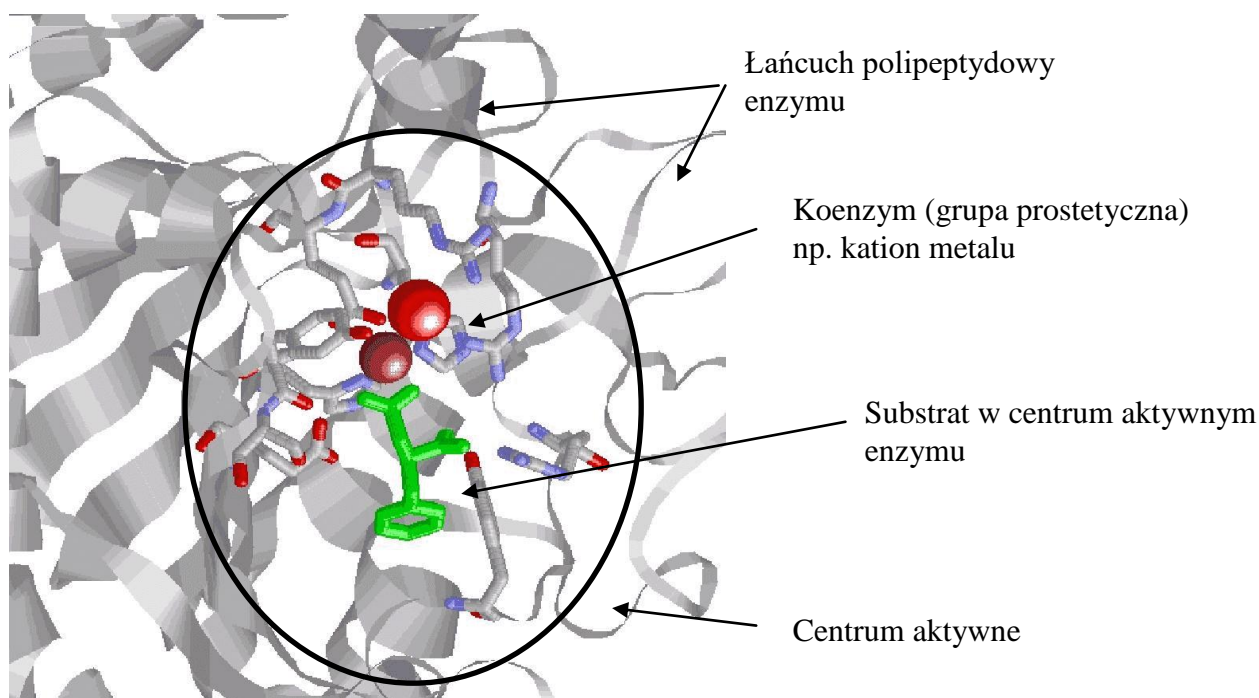
Reakcja biotransformacji to pojedyncza przemiana związku katalizowana przez enzymy zawarte w komórkach organizmu żywego lub enzymy wyizolowane z tych komórek[1].

Enzymy jako katalizatory

Reakcje chemiczne, w większości przypadków, prowadzi się w obecności katalizatorów mając na celu skrócenie czasu reakcji i umożliwienie otrzymania produktu z akceptowalną wydajnością.

W procesach biotechnologicznych i w reakcjach biotransformacji katalizatorami są enzymy.

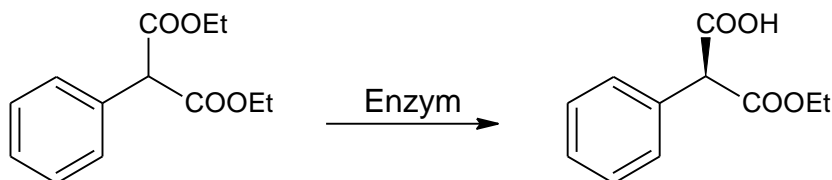
Enzymy są białkami zdolnymi do katalizowania reakcji chemicznych zachodzących w komórkach żywych organizmów. Miejscem gdzie zachodzi reakcja jest centrum aktywne enzymu powstałe przez odpowiednie ukształtowanie powierzchni dużej cząsteczki białka. Wiele enzymów należy do białek złożonych, w skład których oprócz części białkowej wchodzi związana z nią grupa prostetyczna. Grupą prostetyczną może być kation metalu, polisacharyd, lipid, porfiryna. W niektórych enzymach grupa prostetyczna związana jest w sposób odwracalny z białkiem i wówczas część białkowa nosi nazwę apoenzymu, a grupa prostetyczna – koenzymu. Fragment cząsteczki białka z centrum aktywnym przedstawiono na rysunku 1.



Rysunek 1. Fragment cząsteczki enzymu z uwidocznionym centrum aktywnym

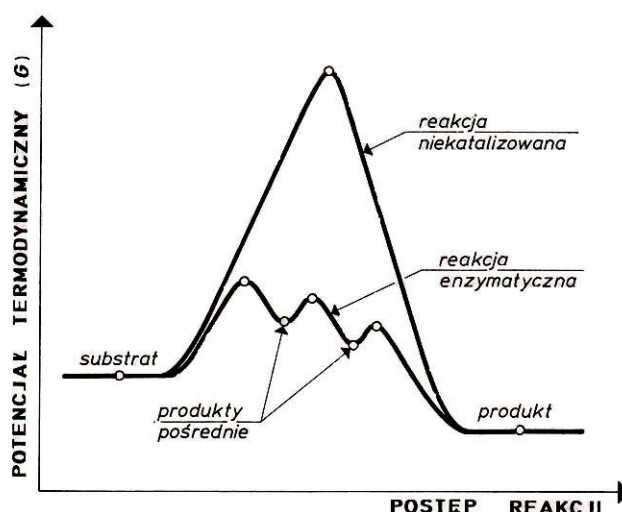
Źródłem enzymów są mikroorganizmy (bakterie, grzyby mikroskopowe), komórki roślinne oraz zwierzęce. Reakcje z wykorzystaniem enzymów jako katalizatorów można prowadzić stosując wydzielony i oczyszczony enzym natywny lub enzym immobilizowany czyli unieruchomiony na nośniku. Często dobrym sposobem prowadzenia reakcji enzymatycznej jest wykorzystanie całych komórek mikroorganizmów bez wyodrębniania zawartych w nich enzymów. Naturalnym środowiskiem, w którym funkcjonują enzymy w organizmach żywych jest woda. Z tego powodu reakcje enzymatyczne należałoby prowadzić w roztworze wodnym, w temperaturze 20-40°C, i pH w zakresie 5,5-8. Wydzielenie enzymu a także jego immobilizacja na stałym nośniku umożliwia prowadzenie wielu reakcji w rozpuszczalnikach organicznych, w szerszym zakresie temperatur i pH. Opracowanie reakcji biotransformacji (reakcji enzymatycznych z wykorzystaniem izolowanych

enzymów lub całych komórek) umożliwiło przeprowadzenie wielu reakcji w łagodnych warunkach jak również dało szansę na otrzymanie wielu związków trudnych do otrzymania innymi metodami. Przykładami mogą być reakcje otrzymywania monoestrów w wyniku hydrolizy diestrów (schemat 2.).



Schemat 2. Hydroliza fenylomalonianu dietylu

Każdy katalizator (również enzym) obniża energię aktywacji reakcji, nie wpływając na różnicę jej potencjału termodynamicznego. Reakcja katalizowana przez enzym przebiega zwykle w kilku etapach, charakteryzujących się stanami przejściowymi o niższych energiach niż energia stanu przejściowego reakcji niekatalizowanej.



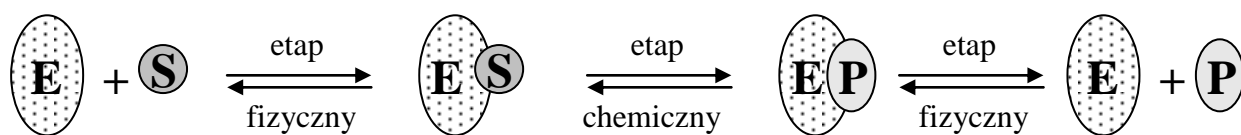
Rysunek 2. Zmiany energetyczne w reakcji niekatalizowanej i katalizowanej enzymem

Efekty katalityczne osiągnięte w reakcjach enzymatycznych bywają zadziwiające, reakcja jest przyspieszana od 10^9 do 10^{15} razy w stosunku do odpowiedniej niekatalizowanej reakcji chemicznej. Średnio około 1000 moli substratu reaguje z molem enzymu w ciągu jednej minuty, przy czym niektóre enzymy osiągają wartość 10^7 moli substratu na mol enzymu.

W procesie katalizy enzymatycznej możemy wyróżnić:

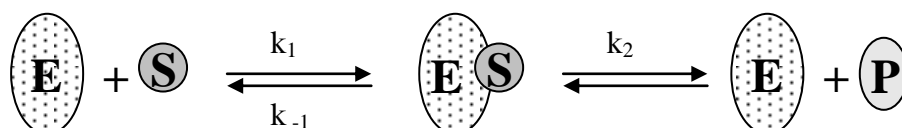
- procesy fizyczne takie jak dyfuzja substratu do centrum aktywnego enzymu oraz uwolnienie produktu z centrum aktywnego.
- proces chemiczny, czyli reakcję zachodzącą w centrum aktywnym enzymu prowadzącą do otrzymania produktu.

Proces katalizy enzymatycznej z uwzględnieniem etapów fizycznych i chemicznych przedstawiono na schemacie 3.



Schemat 3. Etapy reakcji katalizowanej enzymem (E – enzym, S – substrat, P – produkt)

Najwolniejszymi etapami w reakcji enzymatycznej są etapy fizyczne, czyli dyfuzja substratu do centrum aktywnego enzymu oraz uwalnianie z niego produktu.



Schemat 4. Uproszczony zapis przebiegu reakcji katalizowanej enzymem

Z tego powodu zapis przebiegu reakcji można uprościć do dwóch etapów, gdzie k_1 – szybkość dyfuzji substratu do centrum aktywnego enzymu, k_2 – szybkość reakcji chemicznej (przekształcenia substratu w produkt) oraz szybkość uwalniania się uzyskanego produktu z enzymu (Schemat 4.).

Przyjmuje się, że reakcja enzymatyczna zachodzi według jednego z czterech poniższych mechanizmów lub ich kombinacji:

- Katalizę przez zbliżenie reagujących cząsteczek
- Katalizę przez utworzenie kowalencyjnych produktów pośrednich z enzymem
- Katalizę kwasowo-zasadową
- Katalizę przez odpowiednią deformację cząsteczki substratu [2].

Enzymy ze względu na rodzaje katalizowanych reakcji zostały podzielone na sześć klas:

1. **Oksydoreduktazy** – katalizujące reakcje utleniania i redukcji.
2. **Transferazy** – katalizujące reakcje przenoszenia grup funkcyjnych z cząsteczki donora do cząsteczki akceptora.
3. **Hydrolazy** – specjalna grupa transferaz, która katalizuje przenoszenie grupy funkcyjnej z cząsteczki donora do cząsteczki wody (czyli katalizują reakcje hydrolizy wiązań estrowych, amidowych, eterowych, glikozydowych z udziałem cząsteczki wody)
4. **Liazy** – katalizują reakcję addycji wody, amoniaku lub dwutlenku węgla do wiązań podwójnych lub reakcje odwrotne.
5. **Izomerazy** – katalizują wzajemne przekształcanie jednych izomerów w drugie (izomerów optycznych, konstytucyjnych, geometrycznych, enolu w keton itp.).
6. **Ligazy** – katalizują reakcję łączenia dwóch substratów, w wyniku czego powstają wiązania C–O, C–S, C–N, C–C z udziałem cząsteczki ATP (adenozynotrifosforan).

W syntezie chemicznej znalazły zastosowanie enzymy ze wszystkich 6-ciu klas ale najczęściej używa się oksydoreduktaz (reakcje utleniania, reakcje redukcji) i hydrolaz.

Większość stosowanych enzymów wykazuje dużą trwałość w warunkach reakcji chemicznych przewyższającą czasami trwałość syntetycznych katalizatorów chemicznych. Enzymy katalizujące reakcje biochemiczne w swoim naturalnym środowisku (w komórce żywego organizmu) znane są ze swojej specyficzności substratowej. Okazało się jednak, że wiele enzymów toleruje i katalizuje

przetwarzanie związków całkowicie syntetycznych różniących się znacznie budową od ich naturalnych substratów [1].

Reakcje redukcji z użyciem drożdży piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*)

Drożdże

Najprostszy sposób podziału grzybów oparty na ich wielkości to podział na grzyby makro- i mikroskopowe. Grzyby makroskopowe to znane wszystkim grzyby kapeluszowe. Grzyby mikroskopowe dzielimy na **drożdże** i grzyby strzępkowe.

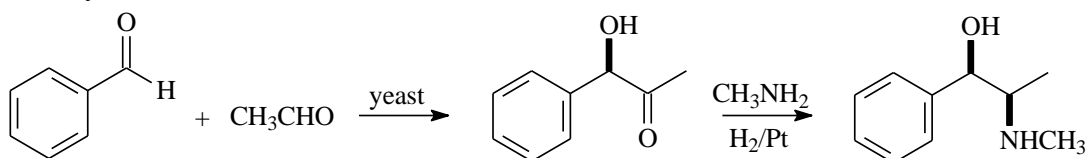
Drożdże są jednokomórkowymi organizmami eukariotycznymi. Występują powszechnie w glebie, na owocach i warzywach. W przewodniku do oznaczania drożdży opisano kilkaset gatunków [3]. Gatunek *Saccharomyces cerevisiae* opisano następująco:

wzrost w postaci białych kremowych kolonii o mazistej konsystencji, zdolność do pączkowania oraz do wytwarzania gamet płciowych i zarodników. Komórki mają kształt kulisty lub jajowaty czasem wydłużony. Wielkość komórek waha się od 1 do 5 μm średnicy (komórki kuliste) lub od 1 do 10 μm (komórki wydłużone). Dojrzała komórka drożdżowa zawiera ścianę komórkową, błonę cytoplazmatyczną, jądro komórkowe, rybosomy, mitochondria, aparat Golgiego, wodniczki raz materiały zapasowe.

Drożdże znalazły szerokie zastosowanie praktyczne w przemyśle spożywczym (produkcja piwa, wina, piekarnictwo) i w przemyśle paszowym jako dodatek do pasz zawierający białko, minerały i witaminy. Wykorzystano praktycznie ich zdolności do fermentowania laktozy, produkcji białka na bazie odpadów papierniczych i alkanów, produkcji glicerolu, D-sorbitolu oraz jako źródła szeregu enzymów umożliwiających prowadzenie reakcji chemicznych. Okazały się cennymi katalizatorami reakcji biotransformacji [4].

Reakcje biotransformacji

Pierwszą syntezę organiczną z udziałem biokatalizatora opisano w 1921 roku. Była to kondensacja acyloinowa aldehydu benzoesowego i aldehydu octowego zachodząca w obecności drożdży.



Schemat 5. Otrzymywanie D-(-)-efedryny

Produkt kondensacji, (R)-1-fenylo-1-hydroksypropan-2-on, jest związkiem optycznie czynnym. Chiralny katalizator, a taki charakter mają enzymy obecne w komórkach drożdży, promuje powstawanie chiralnego produktu [1].

Podstawowym sposobem wykorzystania drożdży w reakcjach biotransformacji jest:

- redukcja grupy karbonylowej ketonów, w wyniku czego powstaje jeden z enancjomerów optycznie czynnego alkoholu drugorzędowego
- redukcja aromatycznych nitrozwiązków do odpowiednich amin
- redukcja wiązania podwójnego w związkach nienasyconych.

Drożdże jako biokatalizatory posiadają wiele zalet:

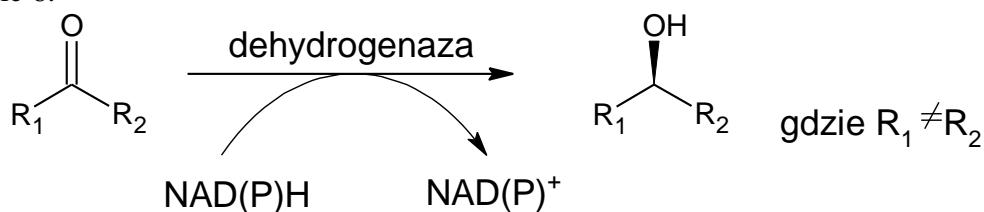
1. można używać całe komórki drożdżowe bez wyodrębniania enzymów
2. nie wymagają szczególnych pożywek w czasie reakcji

3. można dodawać je do mieszaniny reakcyjnej w postaci liofilizowanej (suchej) bez konieczności wcześniejszego namnażania
4. w czasie reakcji rzadko ulegają zakażeniu innymi mikroorganizmami, dlatego nie trzeba szczególnie dbać o sterylne warunki
5. drożdże redukują związki zarówno w środowisku lekko kwasowym jak i obojętnym
6. nie wymagają stosowania kofaktora
7. są tanie i łatwo dostępne.

Komórki drożdży zawierają wiele enzymów a wśród nich dehydrogenazy, które poza naturalnymi substratami akceptują związki syntetyczne. Reakcja redukcji grupy karbonylowej katalizowana jest przez dehydrogenazę alkoholową.

Dehydrogenazy należą do enzymów z grupy **oksydoreduktaz**; do działania wymagają obecności kofaktorów. Kofaktor jest niewielką, w stosunku do enzymu, cząsteczką organiczną należącą do rodziny koenzymów. Kofaktorami niezbędnymi w redukcji grupy karbonylowej przez dehydrogenazy jest dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NADH) lub jego fosforan (NADPH). Kofaktory te są przenośnikami anionu wodorkowego, który atakuje węgiel grupy karbonylowej związku związanego w centrum aktywnym dehydrogenazy. Możliwość regeneracji kofaktorów wynika z naturalnego metabolizmu zachodzącego w komórkach.

Ogólny mechanizm reakcji redukcji katalizowanej przez dehydrogenazę alkoholową przedstawiono na schemacie 6.

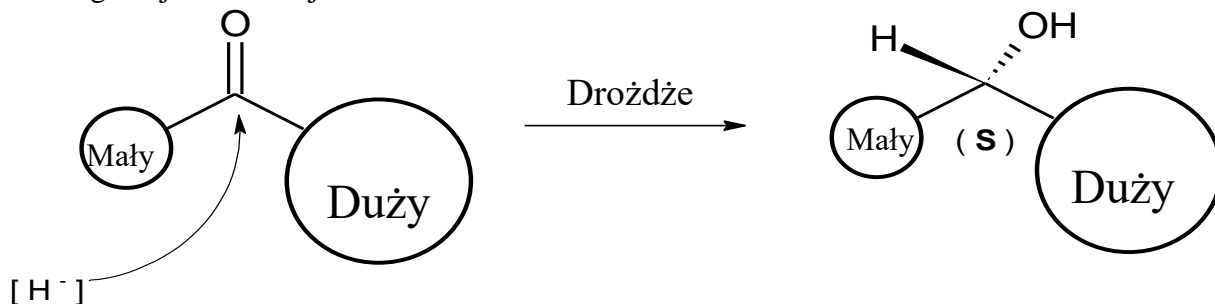


Schemat 6. Enzymatyczna redukcja ketonu do alkoholu

Reakcje redukcji katalizowane drożdżami można prowadzić w warunkach fermentujących w roztworze wodnym lub, bez możliwości normalnego metabolizmu, w rozpuszczalniku organicznym. W roztworze wodnym komórki drożdży mogą syntetyzować enzymy i regenerować kofaktory. W rozpuszczalnikach organicznych wykorzystuje się zawarte w komórkach enzymy i kofaktory bez możliwości ich regeneracji.

Proste ketony alifatyczne i aromatyczne ulegają redukcji przez drożdże fermentujące na ogół zgodnie z regułą Preloga.

Reguła ta mówi, iż redukcja grupy karbonylowej w ketonach zawierających po jednej stronie mały podstawnik a po drugiej duży, zachodzi od strony *Re* cząsteczki i prowadzi do otrzymania alkoholu o konfiguracji absolutnej *S*.



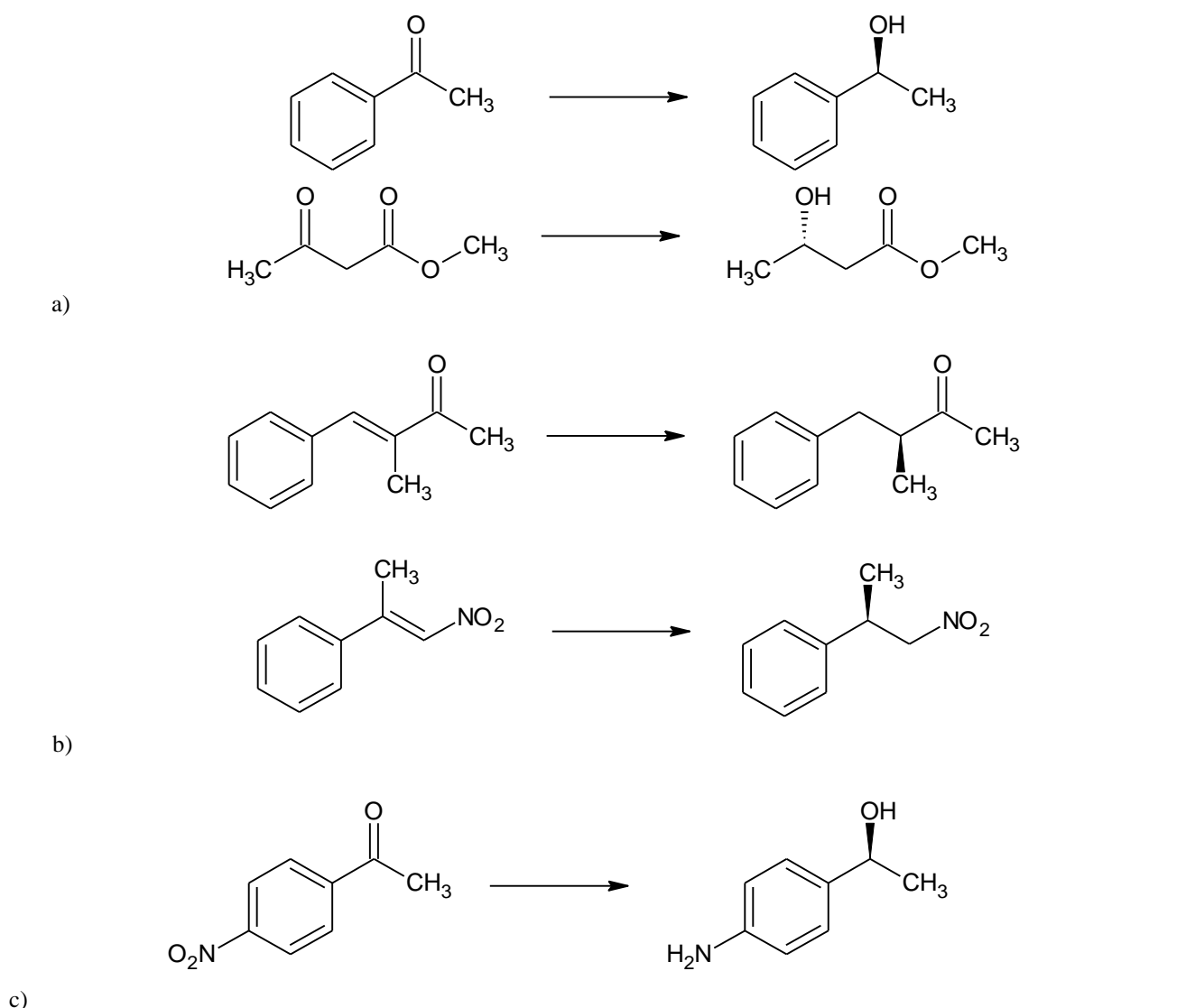
Schemat 7. Redukcja ketonu zachodząca zgodnie z regułą Preloga

Jednak, jak w każdej regule, zdarzają się wyjątki kiedy powstaje produkt o przeciwnej konfiguracji. Przykładem niespełniającym tej reguły jest α -chloroacetofenon – redukcja tego związku prowadzi do

otrzymania (*R*)-2-chloro-1-fenyletanolu. Reguła ta nie sprawdza się dla związków, w których różnica w wielkości między podstawnikami po obu stronach grupy karbonylowej jest nieduża. Powodem różnej konfiguracji absolutnej produktów redukcji może być obecność w komórkach drożdży kilku dehydrogenaz o różnych preferencjach stereochemicznych [5].

Obecność w drożdżach piekarskich większej liczby dehydrogenaz powoduje, iż mogą one redukować wiele różnych związków zawierających grupę karbonylową.

Redukcji może ulegać także wiązanie podwójne węgiel–węgiel (C=C) oraz grupa nitrowa (NO₂). Na schemacie 8. zebrano przykłady bioredukcji różnych związków z wykorzystaniem drożdży piekarskich.



Schemat 8. Przykłady reakcji redukcji drożdżami piekarskimi; a) redukcja grupy karbonylowej w ketonach i α -ketoestrach; b) redukcja wiązania podwójnego węgiel–węgiel w α,β -nienasyconych ketonach i nitrozwiązkach; c) redukcja grupy nitrowej i karbonylowej w pochodnych nitrobenzenu [6].

Tak jak w przypadku enzymów reakcje z wykorzystaniem drożdży można prowadzić zarówno w roztworze wodnym jak i w rozpuszczalniku organicznym. Istnieje wiele możliwości prowadzenia reakcji w roztworze wodnym. Pierwszym z nich i najprostszym jest wprowadzenie drożdży do wody a następnie dodanie substratu rozpuszczonego w wodzie lub etanolu. Do układu reakcyjnego dodaje się etanol lub metanol, który umożliwia regenerację kofaktora. Regeneracja ta następuje poprzez

utlenienie alkoholu do aldehydu a następnie do kwasu, w wyniku, czego otrzymujemy zprotonowaną formę kofaktora, który może być ponownie wykorzystany w reakcji redukcji.

W przypadku zastosowania etanolu do rozpuszczenia substratu możemy użyć mniejszej ilości drożdży ze względu na regenerację kofaktora. Gdy rozpuszczalnikiem substratu jest woda musimy użyć nadmiaru drożdży, ponieważ nie następuje regeneracja NAD(P)H. Drugim ze sposobów jest użycie roztworu wodnego glukozy lub sacharozy (dodatkiem do tego roztworu mogą być sole nieorganiczne takie jak: fosforany (V), azotany (V), będące składnikami mineralnymi niezbędnymi dla rozwoju drożdży). W tym przypadku również można użyć wodę lub etanol do rozpuszczenia substratu. Bardzo istotnymi czynnikami podczas prowadzenia reakcji z wykorzystaniem drożdży w roztworze wodnym jest prowadzenie ich wcześniejszej inkubacji (około 30 minut) bez substratu oraz to, że ilość etanolu nie może przekroczyć 10%, ponieważ większe stężenie etanolu wpływa na zamieranie komórek drożdżowych. Wszystkie te reakcje prowadzi się w temperaturze pokojowej lub 30°C, w warunkach tlenowych. Użycie etanolu nie wynika tylko z faktu, iż chcemy regenerować kofaktor ale również, dlatego, że związki organiczne w większości przypadków nie rozpuszczają się dobrze w wodzie. Rozpuszczalnikami stosowanymi w przypadku, gdy etanol jest zbyt mało polarnym rozpuszczalnikiem są dimetylosulfotlenek (DMSO) lub dimetyloformamid (DMF).

Prowadzenie reakcji redukcji z wykorzystaniem drożdży piekarskich w rozpuszczalniku organicznym wymaga użycia ich w nadmiarze, ponieważ nie będzie następować regeneracja kofaktora. Najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami są: heksan, eter metylowo-*t*-butylowy, eter dietylowy, toluen itp. Dobór odpowiedniego rozpuszczalnika do reakcji odbywa się na drodze eksperymentalnej przez porównanie konwersji substratu w produkt, wydajności reakcji, oraz nadmiaru enancjomerycznego uzyskanego w danym rozpuszczalniku.

Nadmiar enancjomeryczny

Redukcja grupy karbonylowej w ketonie prowadzi do otrzymania drugorzędowego alkoholu posiadającego asymetryczny atom węgla, (gdy podstawniki po obu stronach grupy karbonylowej są różne). W wyniku tej redukcji można otrzymać produkt racemiczny lub jeden z enancjomerów. Racemiczny drugorzędowy alkohol otrzymuje się najczęściej w wyniku redukcji chemicznej (np. NaBH₄), a optycznie czynny w wyniku redukcji biochemicznej lub chemicznej w środowisku chiralnym. W celu sprawdzenia selektywności reakcji enzymatycznej (w tym przypadku redukcji) wyznacza się nadmiar enancjomeryczny produktu. **Nadmiar enancjomeryczny** (*ee*, *enantiomeric excess*) jest to stosunek ilości jednego enancjomeru pomniejszony o ilość drugiego z enancjomerów do sumy ilości tych dwóch izomerów optycznych.

$$ee = \frac{Q - P}{Q + P} \times 100\%$$

gdzie:

ee – nadmiar enancjomeryczny wyznaczony w procentach

Q – liczba moli lub stężenie molowe enancjomeru będącego w przewadze

P – liczba moli lub stężenie molowe drugiego enancjomeru

Do wyznaczenia nadmiaru enancjomerycznego z powyższego wzoru wykorzystuje się metody chromatograficzne: HPLC – wysokosprawną chromatografię cieczową z kolumną chiralną lub GC – chromatografię gazową również z kolumną chiralną.

Istnieje również możliwość wyznaczenia *ee* na podstawie skręcalności światła spolaryzowanego:

$$ee = \frac{[\alpha]_D^{25} \text{ pom.}}{[\alpha]_D^{25} \text{ lit.}} \times 100\%$$

gdzie:

$[\alpha]_D^{25} \text{ pom.}$ - wartość skręcalności właściwej światła spolaryzowanego badanego związku w temperaturze 25°C i przy długości światła 589nm, (czyli zakres D).

$[\alpha]_D^{25}$ *lit.* - wartość skręcalności właściwej światła spolaryzowanego określona w tych samych warunkach dla związku o nadmiarze enancjomerycznym ee=100%. Najczęściej jest to wartość literaturowa.

Konfiguracja absolutna

Bardzo istotną cechą optycznie czynnych związków jest konfiguracja absolutna na asymetrycznym atomie węgla. Istnieje wiele metod pozwalających na określanie konfiguracji absolutnej; należą do nich:

- polarymetria
- korelacja konfiguracji absolutnej metodami chemicznymi
- rentgenografia
- metody chiralooptyczne
- metoda Moshera (wykorzystanie $^1\text{H NMR}$)

Polarymetria [7]

Najprostszą z tych metod jest polarymetria, która polega na porównaniu znaku skręcalności właściwej z danymi literaturowymi. Dla przykładu skręcalność właściwa dla czystego optycznie (*S*)-(+)-3-hydroksybutanianu etylu wynosi $[\alpha]_D = +43,5^\circ$ ($c = 1,0$; CHCl_3), jeżeli więc po bioredukcji acetylooctanu etylu otrzymamy hydroksyester o dodatniej wartości skręcalności właściwej wówczas możemy stwierdzić, że dominującym enancjomerem jest enancjomer o konfiguracji *S*. Określanie konfiguracji absolutnej za pomocą porównania znaku skręcalności światła spolaryzowanego ma jedną poważną wadę. Związek, któremu chcemy przypisać konfigurację absolutną musi mieć określoną wcześniej konfigurację absolutną i podaną wartość skręcalności właściwej światła spolaryzowanego.

Metody chiralooptyczne [7]

Należą do grupy fizykochemicznych metod badania struktury związków organicznych. Opierają się one na pomiarze dyspersji skręcalności optycznej (ORD) i na zjawisku dichroizmu kołowego (CD).

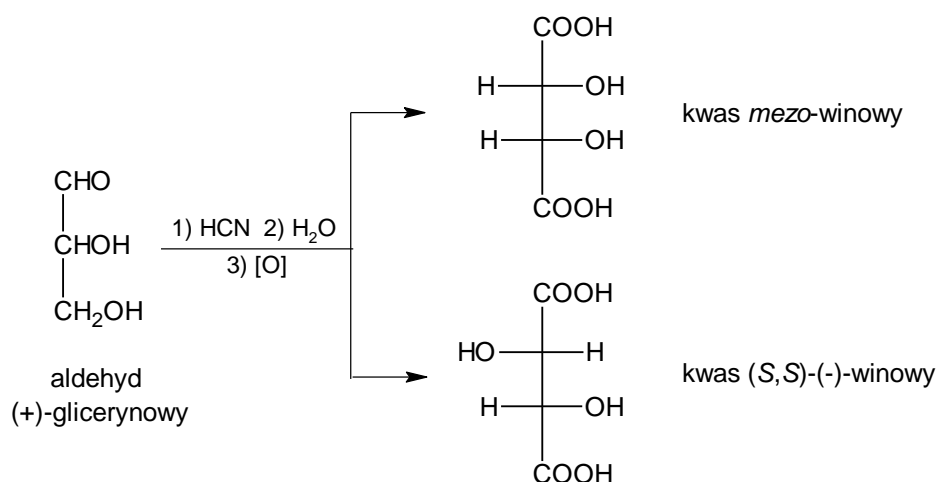
W technice ORD wykorzystujemy promieniowanie elektromagnetyczne spolaryzowane kołowo, którego składowe: lewostronna i prawostronna oddziałują z optycznie czynnym, nie absorbującym środowiskiem, w różny sposób. Badając przebieg zmienności wartości skręcalności optycznej w funkcji długości fali otrzymujemy charakterystyczne dla danej substancji widmo, na podstawie którego możemy ustalić konfigurację absolutną związku.

Technika CD, podobnie jak ORD wykorzystuje promieniowanie elektromagnetyczne spolaryzowane kołowo. Składowe tego promieniowania w kontakcie z ośrodkiem optycznie czynnym ulegają absorpcji, przy czym stopień absorpcji dla składowej lewostronnej i prawostronnej nie jest jednakowy. Rejestrując zmiany absorpcji w funkcji długości fali użytego promieniowania, otrzymujemy widmo. Po ustaleniu znaku efektu Cottona i zastosowaniu odpowiednich modeli matematycznych możemy na jego podstawie ustalić konfigurację absolutną związku.

Metody chiralooptyczne mogą być stosowane zarówno do związków w stanie stałym, ciekłym jak i gazowym, pod warunkiem, że mają one w swej strukturze co najmniej dwa ugrupowania chromoforowe. Warunek ten jest konieczny, gdyż analiza widma wymaga stosowania modeli matematycznych np. modelu odwzorującego oddziaływanie dwóch oscylatorów. Jeżeli cząstka nie posiada takich grup, trzeba przeprowadzić derywatyzację. Niestety, jak pokazuje praktyka, widma uzyskane tą metodą są bardzo często złożone i trudne w interpretacji. Wymagają dodatkowych obliczeń, a ponadto są podatne na wszelkiego rodzaju zmiany konformacyjne zachodzące w układzie.

Korelacja konfiguracji absolutnej metodami chemicznymi

W metodzie tej związek A, którego konfiguracji poszukujemy zostaje przekształcony na drodze chemicznej w pochodną B o uprzednio ustalonej strukturze przestrzennej i skręcalności właściwej. Zakładając, że zastosowane reakcje chemiczne biegły z całkowitą retencją konfiguracji, bądź też z jej inwersją przy czym wynik stereochemiczny reakcji jest dokładnie znany, można na podstawie badań polarymetrycznych przypisać konfigurację absolutną badanemu związkowi. Metoda ta była stosowana m.in. w badaniach mających na celu ustalenia struktury aldehydu (+)-glicerynowego. Związek ten został przekształcony za pomocą szeregu reakcji chemicznych w kwas winowy, którego budowa była już dokładnie poznana.



Schemat 9. Chemiczna korelacja konfiguracji absolutnej aldehydu (+)-glicerynowego

Na podstawie badań polarymetrycznych stwierdzono, że w mieszaninie powstającej powstał kwas (S,S)-(-)-winowy (kwas mezo-winowy nie skręca płaszczyzny światła). Ponieważ wszystkie zastosowane reakcje (synteza cyjanohydryny, hydroliza cyjanohydryny oraz utlenianie grupy hydroksylowej) zachodziły poza centrum chiralnym nie powodowały one zmiany konfiguracji absolutnej aldehydu, można więc z całą pewnością stwierdzić, że badany aldehyd miał taką samą konfigurację jak powstały kwas (S,S)-(-)-winowy.

Rentgenografia

Rentgenografia wykorzystuje zjawisko dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na atomach w sieci krystalicznej. Uzyskujemy dzięki temu, charakterystyczny dla danej substancji obraz zwany rentgenogramem, który poddany analizie umożliwia określenie konfiguracji absolutnej badanego związku. Niestety metoda ta wymaga stosowania monokryształów dobrej jakości i skomplikowanej aparatury, która nie zawsze jest dostępna w laboratoriach chemicznych, ponadto do prawidłowej interpretacji uzyskanych wyników badań konieczna jest dogłębna wiedza teoretyczna i wieloletnie doświadczenie w tej technice badawczej.

Spektroskopia NMR

Pierwsze doniesienia o możliwości wykorzystania tej techniki badawczej do ustalenia czystości optycznej, a następnie konfiguracji absolutnej pojawiły się w latach sześćdziesiątych XX wieku. Fundamentalne dla rozwoju tej techniki badania przeprowadzili Morton Raban i Kurt Minslow z Uniwersytetu Princeton. Zastosowali oni NMR przy badaniu składu mieszaniny diastereoizomerów estru 1-(*o*-fluorofenilo)etylowego kwasu 2-fenylpropionowego, a następnie porównali otrzymany wynik z danymi uzyskanymi za pomocą metod chromatograficznych. Okazało

się, że stosunek diastereoizomerów określony na podstawie widma NMR wynosił 68/32 i był bardzo zbliżony do wartości otrzymanej za pomocą chromatografii 67/33. Wyniki tego eksperymentu jednoznacznie potwierdziły poprawność tej metody badawczej.

W ciągu kolejnych lat metoda ta była udoskonalana i rozwijana przez wielu badaczy, przeprowadzone badania wykazały, że za jej pomocą można wyznaczać nie tylko czystość optyczną związków, ale również ich konfigurację absolutną.

Część eksperymentalna

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z metodą redukcji związków organicznych przy pomocy drożdży piekarskich natywnych i immobilizowanych. Aby dostosować ćwiczenia do planu studiów (ograniczenia czasowe) i możliwości studentów wybrano proste przykłady z zastosowaniem drożdży natywnych i immobilizowanych w alginianie wapnia prowadzone w warunkach fermentujących lub bez możliwości fermentacji, w wodzie i w rozpuszczalnikach organicznych.

Wariant pierwszy

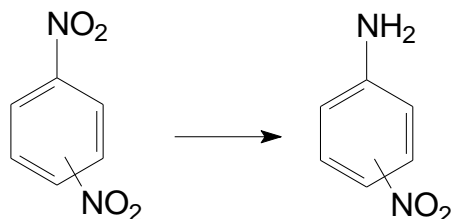


- wykonanie reakcji redukcji grupy karbonylowej w cząsteczce acetylooctanu etylu z wykorzystaniem drożdży piekarskich immobilizowanych w alginianie wapnia i porównanie skuteczności prowadzenia tych reakcji w roztworze wodnym z dodatkiem glukozy i w rozpuszczalniku organicznym
- określenie wydajności, konfiguracji absolutnej oraz nadmiaru enancjomerycznego otrzymanych produktów [(*S*)-(+)-3-hydroksybutanianu etylu].

Wariant drugi

- wykonanie reakcji redukcji grupy karbonylowej w cząsteczce acetylooctanu etylu z wykorzystaniem drożdży piekarskich natywnych oraz drożdży immobilizowanych w alginianie wapnia i porównanie skuteczności prowadzenia tych reakcji w rozpuszczalniku organicznym
- określenie wydajności, konfiguracji absolutnej oraz nadmiaru enancjomerycznego otrzymanych produktów

Wariant trzeci



- wykonanie reakcji redukcji grupy nitrowej w cząsteczkach: p-dinitrobenzenu i m-dinitrobenzenu
- wyodrębnienie, oczyszczenie, identyfikacja produktów

- porównanie przebiegu obu reakcji

Redukcja acetylooctanu etylu za pomocą drożdży immobilizowanych w roztworze wodnym (wariant 1.)

1. Immobilizacja drożdży

Odczynniki

- Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma) – 10 g
- Alginian sodu 2,5 g
- Chlorek wapnia 10 g
- Woda destylowana 550 ml

Ustawić na mieszadło magnetycznym zlewkę zawierającą 250 ml wody, włączyć mieszadło i dodawać porcjami 2,5 g alginianu sodu.

Mieszać do całkowitego rozpuszczenia alginianu. W przypadku powstania tzw. „zgęstek” można użyć szklanej bagietki do ich rozprowadzenia.

Dodać do roztworu alginian sodu porcjami (z mieszaniem) 10 g suchych drożdży i mieszać aż do uzyskania jednorodnej zawiesiny.

Przygotować 300 ml 0,3 M roztworu chlorku wapnia.

Do delikatnie mieszanego roztworu chlorku wapnia dodawać małymi kroplami zawiesinę drożdży w alginianie sodu uzyskując kuleczki alginianu wapnia z uwięzioną w nich zawiesiną drożdży w wodzie. Kuleczki powinny mieć średnicę 2-4 mm; do ich wytworzenia można użyć pipety Pasteura lub strzykawki zaopatrzonej w igłę o odpowiedniej średnicy.

Kuleczki alginianu wapnia mieszać przez pół godziny, następnie odsączyć na lejku Büchnera (może być bez bibuły) pod zmniejszonym ciśnieniem i przemyć wodą.

2. Redukcja drożdżami w warunkach fermentacyjnych

Odczynniki

- Glukoza 5,6 g
- Woda wodociągowa 80 ml
- Acetylooctan etylu 0,5 g
- Drożdże immobilizowane (połowa przygotowanych kuleczek - ok. 5 g drożdży)

W kolbie stożkowej (250 ml) umieścić 80 ml wody wodociągowej, dodać 5,6 g glukozy, połowę (na wagę lub na objętość) przygotowanych kuleczek drożdży w alginianie wapnia.

Kolbę zatkać korkiem z waty i ustawić na wytrząsarce w temperaturze 30⁰C na pół godziny.

Do kolby dodać 0,5 g acetylooctanu etylu i ponownie umieścić na wytrząsarce na ok. 24 godziny.

Odsączyć kuleczki alginianu na lejku Büchnera, przemyć 20 ml eteru etylowego.

Rozdzielić fazy w rozdzielaczu.

Fazę wodną ekstrahować starannie eterem etylowym (3 razy po 20 ml).

Połączone fazy organiczne suszyć bezwodnym siarczanem magnezu.

Odparować rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce, zważyć otrzymany olej, określić jego czystość przy pomocy chromatografii gazowej (GC), w razie potrzeby oczyścić na kolumnie chromatograficznej.

Przygotować próbkę produktu do oznaczenia skręcalności płaszczyzny światła spolaryzowanego.

3. Redukcja acetylooctanu etylu za pomocą drożdży immobilizowanych w rozpuszczalniku organicznym

Odczynniki

- Acetylooctan etylu 0,26 g
- Eter naftowy 64 ml
- Kuleczki alginianu wapnia zawierające ok. 5 g drożdży

W kolbie stożkowej na 250 ml umieścić 64 ml eteru naftowego i kuleczki alginianu wapnia z drożdżami, dodać acetylooctan etylu

Kolbę zamknąć korkiem i umieścić na wytrząsarce w temperaturze 30⁰C na ok. 24 godziny

Odsączyć kuleczki alginianu na lejku Büchnera, przemyć 15 ml eteru naftowego.

Roztwór eterowy suszyć bezwodnym siarczanem magnezu

Odparować rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce, zważyć otrzymany olej, określić jego czystość przy pomocy chromatografii gazowej (GC), w razie potrzeby oczyścić na kolumnie chromatograficznej.

Przygotować próbkę produktu do oznaczenia skręcalności płaszczyzny światła spolaryzowanego.

Redukcja acetylooctanu etylu za pomocą drożdży natywnych immobilizowanych w rozpuszczalniku organicznym (wariant 2)

1. Immobilizacja drożdży

Odczynniki

- Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma) – 5 g
- Alginiansodu 1,25 g
- Chlorek wapnia 5 g
- Woda destylowana 275 ml

Przygotować kuleczki drożdży zamknięte w alginianie wapnia tak jak w wariacie 1 (zwróć uwagę na ilości)

2. Redukcja acetylooctanu etylu za pomocą drożdży immobilizowanych w rozpuszczalniku organicznym

Przeprowadź doświadczenie identycznie jak w wariacie 1. punkt 3.

3. Redukcja acetylooctanu etylu za pomocą drożdży natywnych w rozpuszczalniku organicznym

Odczynniki

- Acetylooctan etylu 0,26 g
- Eter naftowy 64 ml
- Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma) – 5 g
- Woda destylowana 3 ml

W kolbie stożkowej na 100 ml umieścić 64 ml eteru naftowego, 3 ml wody i drożdże, dodać acetylooctan etylu.

Kolbę zamknąć korkiem i umieścić na wytrząsarce w temperaturze 30⁰C na ok. 24 godziny

Zdekantować roztwór organiczny nad drożdże, drożdże przemyć 15 ml eteru dietylowego

Połączone roztwory eterowe suszyć bezwodnym siarczanem magnezu.

Odparować rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce, zważyć otrzymany olej, określić jego czystość przy pomocy chromatografii gazowej (GC), w razie potrzeby oczyścić na kolumnie chromatograficznej.

Przygotować próbkę produktu do oznaczenia skręcalności płaszczyzny światła spolaryzowanego.

Redukcji grupy nitrowej w cząsteczkach: p-dinitrobenzenu i m-dinitrobenzenu (wariant 3)

Odczynniki

- p-Dinitrobenzen/ m-dinitrobenzen 0,250 g
- Metanol 20 ml
- Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma) – 7,8 g
- Woda destylowana 40 ml
- 2 g NaOH rozpuszczone w 5 ml wody
- Chlorek metylenu 25 ml

W kolbie stożkowej poj.100 ml umieścić 40 ml wody i drożdże i ogrzać szybko do 70 °C.

Dodać niezwłocznie dinitrobenzen rozpuszczony na ciepło w metanolu i roztwór wodorotlenku sodu. Kolbę umieścić na wytrząsarce w temperaturze 70 °C na 1,5 – 2 godziny.

Ochłodzoną do temperatury pokojowej mieszaninę przenieść do rozdzielacza

Dodać 25 – 30 ml chlorku metylenu w celu wyekstrahowania z zawiesiny związku organicznego

Oddzielić fazę organiczną przesączając ją przez warstwę celitu pod zmniejszonym ciśnieniem.

Przesącz wysuszyć bezwodnym siarczanem magnezu.

Po odsączeniu środka suszącego odparować rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce.

Surowy produkt oczyścić na kolumnie chromatograficznej, zważyć i zidentyfikować (tt, IR, GC)

Literatura

1. J.Gawroński, K.Gawrońska, K.Kacprzak, M.Kwit, *Współczesna synteza organiczna*, WN PWN, Warszawa **2004**
2. P. Kafarski, B. Lejczak, *Chemia bioorganiczna*, PWN, Warszawa 1994
3. A.Barnett, R.W. Payne, D.Yarrow, *Yeast characteristics and identification*, Cambridge University Press, **1990**
4. A.Różalski, *Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej*, Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, **2007**
5. K. Faber, „*Biotransformations in organic chemistry*” Springer 1997
6. S.Servi, *Synthesis*, **1990**, 1-5
7. W.Zieliński (red), *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*, WNT, Warszawa, **1995**