



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Kondensacja acyloinowa benzaldehydu przy użyciu drożdży

Instrukcja do zajęć laboratoryjnych z przedmiotu
Biotechnologia

Dla studentów kierunku Chemia specjalność Chemia Bioorganiczna

Materiały zostały wykonane w ramach realizowanego na Politechnice Śląskiej projektu nr UDA-POKL.04.01.01-00-114/09-01 pt.: „Unowocześnienie i rozszerzenie oferty edukacyjnej na kierunku Chemia na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej – otwarcie specjalności Chemia Bioorganiczna” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

CEL ĆWICZENIA

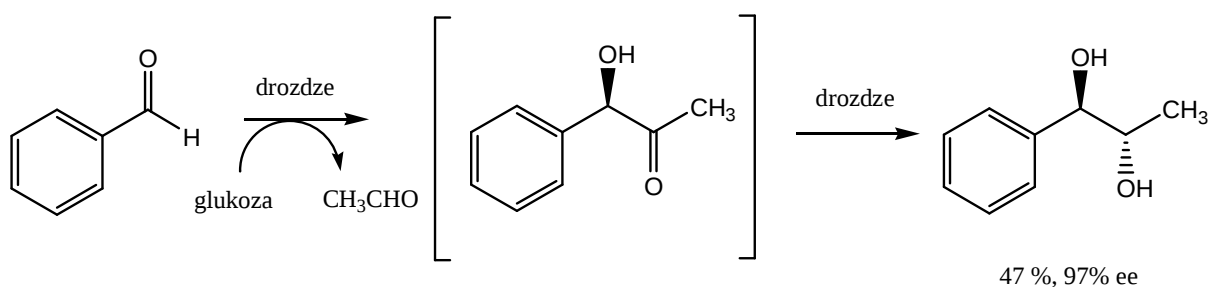
Celem ćwiczenia jest :

- otrzymanie w reakcji kondensacji acyloinowej odpowiedniego α -hydroksyketonu oraz diolu o określonej konfiguracji stereogenicznej wykorzystując jako biokatalizatorów różnego rodzaju drożdży,
- Pomiar skręcalności optycznej otrzymanych produktów tj, α -hydroksyketonu oraz diolu,
- Analiza widm magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR, ^{13}C NMR) otrzymanych produktów.

PODSTAWY TEORETYCZNE

Enzymy są często wykorzystywane w syntezie organicznej w celu tworzenia wiązań C-C jako efektywne biokatalizatory. Handlowo dostępne enzymy są stosunkowo drogimi preparatami dlatego też, często w reakcjach enzymatycznych jako biokatalizatorów używa się całych mikroorganizmów, a w szczególności komórek drożdży piekarniczych (*Saccharomyces cerevisiae*). Drożdże mogą być stosowane w postaci prasowanej, suchej, liofilizowanej oraz immobilizowanej. Są tanim i łatwo dostępnym surowcem. Reakcję z ich udziałem mogą być przeprowadzane zarówno w wodzie jak i rozpuszczalnikach organicznych. Komórki drożdży wykorzystywane są do syntezy wielu enzymów, natomiast najczęściej stosuje się je w mikrobiologicznych redukcji związków karbonylowych.

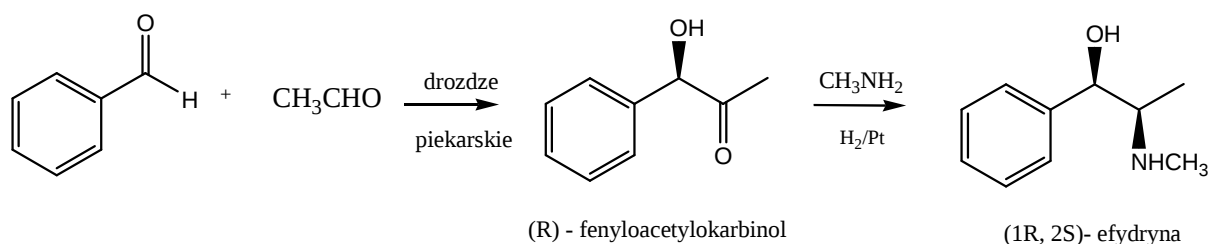
Asymetryczna kondensacja acyloinowa jest pierwszą reakcją organiczną z udziałem drożdży piekarskich jako biokatalizatorów opisaną w literaturze w 1921. Autorami tej reakcji są Nauberg i Hirsch, którzy to przeprowadzili kondensację benzaldehydu przy użyciu aldehydu octowego oraz drożdży piekarskich. Reakcja ta cieszy się dużym zainteresowaniem, ponieważ w prostej reakcji one-pot otrzymujemy diol posiadający dwa centra chiralności (Schemat 1). W związku z tym, można wykorzystać pomiar skręcalności optycznej w celu zidentyfikowania produktu końcowego tej reakcji. Identyfikacja substancji metodą polarymetryczną polega na wyznaczeniu jej skręcalności właściwej, która jest wielkością indywidualną każdej substancji.



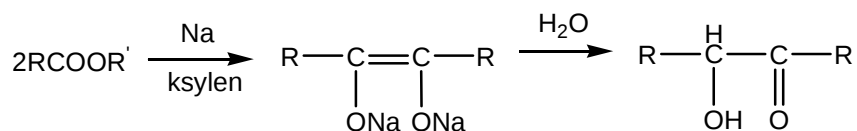
Schemat 1

Asymetryczna kondensacja acyloinowa jest przykładem reakcji formowania się wiązania C-C. W reakcji tej bierze udział fragment dwuwęglowy, który to pochodzi z dekarboksylacji kwasu pirogronowego, który przenoszony jest przez dekarboksylazę pirogronianową (PDC) w wyniku czego tworzy się odpowiedni (R)- α -hydroksyketon. W reakcji tej uczestniczy również pirofosforan tiaminy, który pełni rolę koenzymu. Powstały (R)- α -hydroksyketon może dalej ulegać reakcji w obecności drożdży i być redukowany do odpowiedniego erytrodiolu o czystości optycznej 90%. Reakcja kondensacji oraz dalszej redukcji dają produkt końcowy (erytrodiol) z wydajnością ok. 35%.

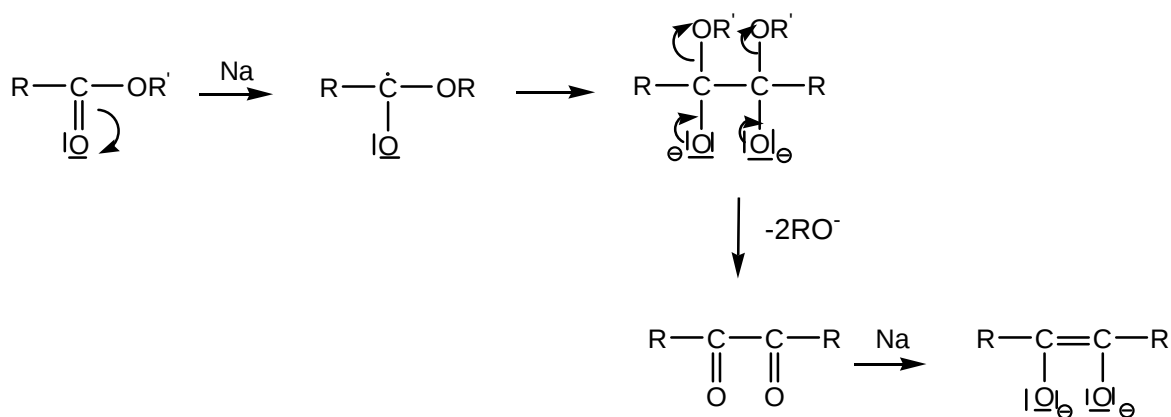
Reakcja ta została również rozszerzona na inne substraty takie jak: podstawione benzaldehydy, naftaleno-aldehydy oraz furylo-aldehydy. α -Hydroksyketony powstające w wyniku opisywanej kondensacji są ważnymi substratami w syntezie organicznej. Przykładem takiego zastosowania jest synteza (-)-efedryny z chiralnego prekursora (hydroksyketonu) (R)- fenyloacetylokarbinolu (Schemat 2).

**Schemat 2**

Kondensacja acyloinowa pod względem chemicznym polega na reakcji estrów z sodem we wrzącym eterze lub benzenie (Schemat 3). Produktami tej reakcji są odpowiednie α -hydroksyketony nazywane również acyloinami.

**Schemat 3**

Mechanizm reakcji kondensacji acyloinowej nie jest dokładnie znany, spekuluje się, że produktem przejściowym tej reakcji jest dwuketon RCOCOR , ponieważ widoczny jest on jako produkt uboczny. W związku z tym reakcja ta będzie najprawdopodobniej według poniższego schematu 4:



Schemat 4

W wyniku w/w kondensacji acyloinowej można otrzymać acyloiny o długich łańcuchach, np.: z grupami $\text{R}=\text{C}_{17}\text{H}_{35}$, jednak w przypadku estrów posiadających duży ciężar cząsteczkowy jako rozpuszczalnik stosuje się toluen lub ksylen. Kondensację acyloinową we wrzącym ksylenie wykorzystuje się do otrzymywania acyloin cyklicznych z dwusterów.

PRZEBIEG ĆWICZENIA

Kondensacja acyloinowa benzaldehydu przy użyciu drożdży

Odczynniki:

- Drożdże piekarskie (świeże, suszone), drożdże winne,
- Benzaldehyd (świeżo destylowany)
- Acetaldehyd
- Glukoza
- Woda
- Celit
- Octan etylu
- Heksan
- Siarczan magnezu (MgSO_4)
- Etanol
- Iód

Szkło i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- Mieszadło magnetyczne
- Strzykawki jednorazowe (1ml)
- Wyparka rotacyjna
- Płytki TLC
- Komora rozwijająca

- Kapilary
- Dipol magnetyczny
- Sączi lub bibuła filtracyjna
- Wata kosmetyczna
- Lejek Büchnera
- Rozdzielacz (250 ml)
- Kolbki stożkowe płaskodenne (250 ml)
- Cylinder miarowy 100 ml
- Szkiełka zegarkowe
- Lejki szklane
- Szpatułki metalowe
- Termometr (20°C)

Wykonanie ćwiczenia

1. W kolbie stożkowej o pojemności 100 ml umieścić wcześniej odważone drożdże (6g) i glukozę (5 g), a następnie dodać 30 ml wody. Całość mieszać w temperaturze otoczenia (20°C) przez 15 minut. Następnie do mieszaniny dodać za pomocą strzykawek jednorazowych benzaldehydu (0.3 ml) oraz acetaldehydu* (0.40 ml) i pozostawić na mieszadle magnetycznym przez ok. 90 minut tj. do zaniku benzaldehydu. Reakcję kontrolować co 15 minut za pomocą TLC (3:1 heksan/octan etylu), R_f benzaldehydu wynosi 0.88 natomiast hydroksyl ketonu 0.54.**

* Przed dodaniem acetaldehydu do mieszaniny reakcyjnej z uwagi na fakt jego niskiej temperatury wrzenia tj 21°C należy schłodzić w zamrażalniku przez ok. 15 minut strzykawkę do odmierzania tej substancji

** Na tym etapie reakcji po zaniku benzaldehydu prawdopodobnie na płytce TLC będą widoczne tylko dwa produkty tj. hydroksyl keton raz alkohol benzyłowy, które mają w przybliżeniu taką samą wartość R_f (0.54)

2. Po upływie 90 minut (zaniku benzaldehydu –analiza TLC) mieszaninę reakcyjną podzielić na dwie części i podpisać roztwór **nr.1** i roztwór **nr.2**.
 - a.) Do roztworu **nr.2** dodać kolejną porcję drożdży (3.2 g) oraz glukozy (3 g). Całość mieszać przez ok. 2 godziny do zaniku benzaldehydu i hydroksy ketonu – analiza TLC co 20 minut (3:1 heksan/octan etylu), R_f produktu końcowego tj. odpowiedniego diolu wynosi 0.14.
 - b.) Do roztworu **nr 1** dodać celit 10g, wymieszać i całość przesączyć przez lejek Büchnera pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie osad przemyć dużą ilością

wody ok. 50 ml. Przesącz przelać do rozdzielacza i przemyć 4x75 ml octanem etylu. Kolejno połączyć ekstrakty organiczne i wysuszyć siarczanem magnezu. Następnie odsączyć środek suszący (siarczan magnezu), a rozpuszczalnik (octan etylu) odparować na wyparce rotacyjnej. Z otrzymanej mieszaniny przygotować próbkę **NR 1** i zmierzyć skręcalność optyczną otrzymanego produktu. Następnie przygotować próbkę w celu wykonania widm ^1H NMR oraz ^{13}C NMR odważając do kuwety 30 mg próbki **NR 1** i dodając 0.5 ml deuterowanego metanolu. Widma ^1H NMR oraz ^{13}C NMR zostaną wykonane przez prowadzącego i dostarczone studentom w wersji papierowej lub elektronicznej.

3. Po upływie 2 godzin do roztworu **nr 2** dodać celit 10g, wymieszać i całość przesączyć przez lejek Büchnera pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie osad przemyć dużą ilością wody ok. 50 ml. Przesącz przelać do rozdzielacza i przemyć 4x75 ml octanem etylu. Kolejno połączyć ekstrakty organiczne i wysuszyć siarczanem magnezu. Następnie odsączyć środek suszący (siarczan magnezu), a rozpuszczalnik (octan etylu) odparować na wyparce rotacyjnej. Z otrzymanej mieszaniny przygotować próbkę **NR 2** i zmierzyć skręcalność optyczną otrzymanego produktu. Następnie przygotować próbkę w celu wykonania widm ^1H NMR oraz ^{13}C NMR odważając do kuwety 30 mg próbki **NR 2** i dodając 0.5 ml deuterowanego metanolu. Widma ^1H NMR oraz ^{13}C NMR zostaną wykonane przez prowadzącego i dostarczone studentom w wersji papierowej lub elektronicznej.

PRZYGOTOWANIE DO ZAJĘĆ

1. Przeczytaj uważnie instrukcję i dokładnie przeanalizuj czynności oraz techniki laboratoryjne opisane w części eksperymentalnej.
2. Zapoznaj się z zagrożeniami związanymi z stosowanymi odczynnikami oraz poszczególnymi czynnościami wykonywanymi na zajęciach (karty charakterystyk).
3. Zwróć uwagę czy znasz następujące pojęcia: enzym, kondensacja acyloinowa, stereoseletywność reakcji, nadmiar enancjomeryczny, skręcalność właściwa
4. Zastanów się czy wiesz:
 - W jakim celu dodawana jest druga porcja drożdży i glukozy do roztworu nr 2?
 - Jak powinno wyglądać widmo ^1H NMR i ^{13}C NMR benzaldehydu, alkoholu benzylowego, otrzymywanego hydroksyketony oraz diolu

OPRACOWANIE WYNIKÓW

W celu opracowania sprawozdania należy umieścić:

- a) krótki wstęp teoretyczny na temat wykorzystania drożdży jako biokatalizatorów w syntezie organicznej,
- b) przebieg ćwiczenia wraz z obserwacjami dokonanymi w trakcie doświadczenia,
- c) analizę widm NMR próbek **nr 1 i nr 2** z podaniem stosunków otrzymanych produktów,
- d) porównanie wartości skręcalności optycznej zmierzonej z wartościami literaturowymi (pozycja literaturowa 22 i 23).
- e) z przeprowadzonych eksperymentów i analizy widm wyciągnąć odpowiednie wnioski końcowe.

LITERATURA

1. L. Kłyszewko-Stefanowicz, *Ćwiczenia z Biochemii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, (2011)
2. S. M. Roberts, *Preparative Biotransformations Whole Cell and Isolated Enzymes in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons., (1992)
3. E. Białecka-Florjańczyk, E. Majewska, *Biotransformacje z udziałem drożdży "Saccharomyces cerevisiae"*, BIOTECHNOLOGIA, 3,74, 113-133 (2006) Warszawa
4. R. Csuk, B. I. Glanzer, *Chem. Rev.*, 49-97, (1991),
5. S. Servi, *Synthesis*, 1-25, (1990),
6. G. M. Walker, *Yeast-physiology and biotechnology*, J. Wiley, New York. (1998),
7. K. Nakamura, R. Yamanaka, T. Matsuda, T. Harada, *Tetrahedron Asym.*, 14, 2659-2681, (2003),
8. C. Neuberg, J. Hirsch, *Biochem. Z.*, 115, 282, (1921)
9. H. Ohta, K. Ozaki, J. Konishi, G. Tsuchihashi, *Agric. Biol. Chem.*, 50, 1261, (1986),
10. D. H. G. Crout, H. Dalton, D. W. Hutchinson, M. Miyagoshi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1329, (1991),
11. G. A. Sprenger, M. Pohl, *J. Mol. Cat. B.*, 6, 145-152. (1999),
12. C. Neuberg, L. Liebermann, *Biochem. Z.*, 196, 311, (1921)
13. M. Behrens, N. N. Iwanoff, *Biochem. Z.*, 196, 478, (1926)
14. Merc and Co., U.S. Patent, 3 339 769 (1976),
15. J.W. Rothrock (Merk and Co), U.S. Patent 3 338 796 (1964), *Chem. Abstr.*, 67, 89797
16. Y. Shimizu, *J. Chem. Soc. Jpn.*, 71, 503, (1950),
17. D. Groger, H. P. Schmauder, H. Frommel, East German Patent, 62, 554, (1967), *Chem. Abstr.*, 70, 86297
18. M. Braun, H. Wild, *Angew. Chem. Ind. Ed. Engel.*, 23, 723, (1984)
19. McElvain *Org. Reaction*, 4, 256, (1948),
20. Finley, *Chem. Rev.*, 64, 573, (1964),

21. J. March, *Chemia Organiczna*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, (1975),
22. B. M. Neast, W. Kroutil, K. Faber, *Adv. Synth. Catal*, 348, 873, (2006)
23. X. Li, M. Tansova, Ch. Vasileiou, B. Borhan, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 1885, (2008)