

PRACA
DYPLOMOWA



PRACA DOKTORSKA
Zastosowanie hydrolaz
do reakcji transestryfikacji
w rozpuszczalnikach organicznych

A-21-6
K-c-130
K-f-136

Mgr inż. Catalina Wiśniewska

Praca doktorska wykonana w Instytucie Chemii Organicznej PAN
w latach 2010-2015

Promotor: Prof. dr hab. inż. Ryszard Ostaszewski

Warszawa Wola 2015

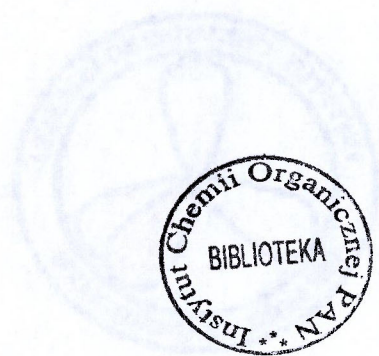
1

<http://www.rcin.org.pl>

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.380/16





B. Org. 380/16

*Serdecznie dziękuję mojemu Promotorowi
Panu Prof. dr hab. inż. Ryszardowi Ostaszewskiemu
za wybór interesującej tematyki badawczej oraz za nieocenioną pomoc
i wsparcie podczas realizacji niniejszej pracy.*

*Serdecznie dziękuję Polpharmie Starogard Gdański, w szczególności Ś.P.
Panu Doktorowi Janowi Ramzie oraz Panu Dyrektorowi Bogdanowi
Maślankowi za umożliwienie mi wykonywania pracy doktorskiej w
Instytucie Chemii Organicznej PAN oraz ogromne wsparcie w moim
rozwoju naukowym.*

*Bardzo dziękuję Panu Wiktorowi Ignacakowi za nieocenioną pomoc w
wykonywaniu analiz HPLC i GC oraz pracę w miłej atmosferze.*

*Serdecznie dziękuję wszystkim osobom z Zespołu XX, od których
uzyskałam pomoc i wsparcie, w szczególności: Doktorowi Dominikowi
Koszelewskiemu za ogromną pomoc w pracy nad publikacjami, Doktorowi
Stanisławowi Berłożeckiemu za pomoc w syntezie związków, Ani Źądło za
miłą kilkuletnią współpracę i Sarze Szymkuć za przyjaźń oraz wsparcie.*

*Chciałabym również serdecznie podziękować Dyrektorowi Instytutu
Chemii Organicznej Państwowej Akademii Nauk za umożliwienie
wykonania pracy doktorskiej.*

Dziękuję koleżankom i kolegom z hotelu doktoranckiego IChO za pomoc oraz umilenie czasu wolnego podczas studiów doktoranckich.

Dziękuję bardzo moim kochanym rodzicom za ogromne wsparcie.

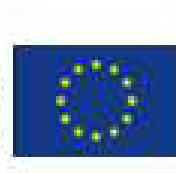
Muchas gracias al Amor de mi Vida, Andrés, por todo el apoyo que me has dado durante este tiempo.

Prace badawcze były finansowane przez Polpharmę Starogard Gdański

Wykonane badania zostały częściowo zrealizowane w ramach projektu „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym”, Nr projektu: POIG.01.03.01-00-158/09-07



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



 **polpharma**



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

Rodzicom

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej ukazały się w następujących publikacjach:

1. Catalina Wiśniewska, Dominik Koszelewski, Ryszard Ostaszewski, *Enzymatic Synergism in the Synthesis of β -Keto Esters*, *European Journal of Organic Chemistry*, **2015**, 24, 5432–5437.
2. Catalina Wiśniewska, Dominik Koszelewski, Ryszard Ostaszewski, *The influence of cosolvent concentration on enzymatic kinetic resolution of trans-2-phenyl-cyclopropane-1-carboxylic acid derivatives*, *Biocatalysis and Biotransformation*, **2015**, 33, 98-104.
3. Malgorzata Zysk, Catalina Wiśniewska, Anna Żądło, Ryszard Ostaszewski, *The unexpected kinetic effect of enzyme mixture: The case of enzymatic esterification*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2014**, 102, 225–229.
4. Catalina Wiśniewska, Ryszard Ostaszewski, *The studies of enzymatic kinetic resolution of 2-phenyl-2-methyl-3-oxobutanoate*, *Copernican Letters*, **2012**, 3, 153-59.

Wykaz skrótów stosowanych w niniejszej pracy:

Ar – grupa aromatyczna

Bn – grupa benzyłowa – C₆H₅CH₂-

Bu – grupa butylowa – C₄H₉-

i-Bu – grupa *izo*-butylowa

CAL-B – lipaza B z *Candida antarctica*

DABCO – 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan

DCC – *N,N*-dicykloheksylokarbodiimid

DCM – dichlorometan

de – nadmiar diastereoizomeryczny

DMAP – 4-(*N,N*-dimetyloamino)-pirydyna

d.r. – proporcja diastereoizomerów

E – enancjoselektywność

e.e. – nadmiar enancjomeryczny

EKR – enzymatyczny kinetyczny rozdział

Et – grupa etylowa C₂H₅-

GC – chromatografia gazowa

GLAP – proszek acetonowy z wątroby gęśiej

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa

kon. – konwersja

Me – grupa metylowa -CH₃

MeCN – acetonitryl

MS- spektrometria mas

Novozym 435 – immobilizowana lipaza B z *Candida antarctica*

OMe – grupa metoksyłowa

PLAP – proszek acetonowy z wątroby świńskiej

PLE – esteraza z wątroby świńskiej (*ang.* pig liver esterase)

Ph – grupa fenyłowa C₆H₅-

RP-HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa na fazach odwróconych

Ser – seryna

THF – tetrahydrofuran

t. pok. – temperatura pokojowa

TLC – chromatografia cienkowarstwowa

Wyd. – wydajność reakcji

Spis treści

1. Wstęp	14
2. Część literaturowa	16
2.1. Kataliza enzymatyczna	16
2.2. Hydrolazy	16
2.2.1. Mechanizm działania hydrolaz	17
2.2.2. Kinetyka reakcji enzymatycznych	18
2.3. Selektwność reakcji enzymatycznych	21
2.3.1. Enzymatyczna enancjoselektywna hydroliza	26
2.3.2. Stereoselektywna enzymatyczna estryfikacja	27
2.3.3. Stereoselektywna enzymatyczna transestryfikacja	28
2.3.4. Diastereoselektywność	29
2.4. Katalizowane enzymami reakcje tworzenia pierścieni	29
2.4.1. Reguły Baldwina zamykania pierścieni 3-7-członowych	29
2.4.2. Stereoselektywna enzymatyczna laktonizacja	33
2.4.3. Stereoselektywna enzymatyczna laktamizacja	34
2.5. Metody syntezy	35
2.5.1. Metody chemiczne syntezy beta-ketoestrów	35
2.5.2. Metody chemiczne otrzymywania nieracemicznych estrów kwasu acetylooctowego	39
2.5.3. Synteza beta-ketoestrów z zastosowaniem enzymów	42
2.6. Estry <i>tert</i> -butylowe kwasów karboksylowych	45
2.6.1. Chemiczne metody syntezy estrów <i>tert</i> -butylowych	46
2.6.2. Enzymatyczna funkcjonalizacja estrów <i>tert</i> -butylowych	46
2.6.3. Podsumowanie rozdziału	52
2.7. Podsumowanie części literaturowej	53
3. Badania własne	54
3.1. Cel badań	54

3.2. Badania nad rozdziałem kinetycznym estru metylowego kwasu 2-benzylo-2-metylo-3-oksomasłowego katalizowanym enzymami	54
3.2.1. Podsumowanie rozdziału	59
3.3. Badania nad enzymatycznym rozdziałem kinetycznym adduktów reakcji Baylisa-Hilmana	60
3.3.1. Podsumowanie rozdziału	64
3.4. Badania nad rozdziałem kinetycznym kwasu <i>trans</i> 2-fenilo-cyklopropano-1-karboksylowego i jego pochodnych	64
3.4.1. Podsumowanie rozdziału	72
3.5. Badania nad rozdziałem kinetycznym kwasu 3-fenilo-3-metylopropionowego	73
3.5.1 Podsumowanie rozdziału	76
3.6. Estryfikacja kwasów karboksylowych węglanem dietylu katalizowana enzymami	76
3.6.1 Podsumowanie rozdziału	80
3.7. Nowa biokatalityczna metoda syntezy estrów kwasu acetylooctowego	81
3.7.1. Wnioski	86
3.7.2. Badanie reakcji transestryfikacji acetylooctanu etylu i <i>tert</i> -butylu 2-feniloetanolem	86
3.7.3 Badania nad zastosowaniem acetylooctanu etylu do reakcji estryfikacji kwasów karboksylowych	90
3.7.3.1. Badania nad zastosowaniem acetylooctanu etylu jako donora dowolnej grupy alkoksylowej	94
3.7.4. Podsumowanie rozdziału	96
3.8. Badania nad mechanizmem reakcji transestryfikacji acetylooctanu <i>tert</i> -butylu oraz innych estrów <i>tert</i> -butylowych zawierających grupę karbonylową.....	96
3.8.1. Porównanie reakcji trans estryfikacji acetylooctanu etylu i <i>tert</i> -butylu	97
3.8.2. Kwas 3-okso-3-fenilo-propionowy i jego pochodne	98
3.8.3. Badania modelowe nad określeniem wpływu zmodyfikowanej grupy karbonylowej na przebieg reakcji	99
3.8.4. Kwas pirogronowy i jego pochodne	101
3.8.5. Kwas lewulinowy i jego pochodne	102

3.8.6. Kwas 5-oksoheksanowy i jego pochodne	104
3.8.7. Kwas 6-oksoheptanowy i jego pochodne	105
3.8.8. Proponowany mechanizm	106
3.8.9. Rozdział kinetyczny ketokwasów i pochodnych	109
3.8.10. Reakcja podwójnej transestryfikacji	110
3.8.11. Podsumowanie rozdziału	114
4. Wnioski końcowe	115
5. Część eksperymentalna	117
6. Literatura	144

Streszczenie:

Cel niniejszej pracy stanowiło opracowanie nowych biokatalitycznych metod syntezy wybranych estrów, będącymi ważnymi blokami budulcowymi w związkach biologicznie czynnych. Skupiono się na reakcjach enzymatycznej transestryfikacji, jednak badania zostały poszerzone również o enzymatyczną hydrolizę i estryfikację.

Opracowano metodę otrzymywania enancjomerycznie czystego estru etylowego kwasu 2-metyleno-3-fenyl-3-hydroksypropanowego, która przebiegała z bardzo wysoką enancjoselektywnością, poprzez estryfikację katalizowaną komercyjnie dostępnym enzymem, Novozymem.

Badania nad rozdziałem kinetycznym racemicznego kwasu *trans*-2-fenylcyklopropano-1-karboksyowego wykazały, że stężenie rozpuszczalnika ma kluczowy wpływ na enancjoselektywność reakcji, co umożliwiło opracowanie metody uzyskiwania odpowiedniego estru z wysoką enancjoselektywnością.

Szczególną uwagę poświęcono estrom kwasu acetylooctowego i opracowano efektywną metodę syntezy tej klasy związków. Metoda ta pozwala otrzymywać produkty z wysoką wydajnością i nie wymaga stosowania zmniejszonego ciśnienia ani wysokich temperatur. Wykazano, że reakcja transestryfikacji acetylooctanu etylu alkoholami jest katalizowana przez mieszaninę enzymów, która jest dużo bardziej efektywna niż pojedyncze enzymy. Grupę substratów do transestryfikacji tą metodą poszerzono o ketoestry, zawierające grupę karbonylową w pozycjach innych niż alfa. Ponadto wykazano, że acetylooctan *tert*-butylu również jest dogodnym reagentem do reakcji transestryfikacji z alkoholami, a reakcje z jego udziałem przebiegają bardzo wydajnie i enancjoselektywnie.

Uzyskane wyniki były niezmiernie interesujące, ponieważ estry *tert*-butylowe nie są akceptowane przez enzymy jako substraty. Wymagana jest specjalna struktura centrum aktywnego enzymu, aby mógł on hydrolizować estry *tert*-butylowe. Zaproponowano mechanizm, wyjaśniający reaktywność acetylooctanu *tert*-butylu oraz innych ketoestrów *tert*-butylowych w reakcjach enzymatycznej transestryfikacji.

Abstract

The aim of this work was to develop new biocatalytic methods for synthesis of selected esters, that are important building blocks in organic chemistry and substrates for the synthesis of biologically active compounds. A special attention was focused on the enzymatic transesterification reactions. This research was expanded on the enzymatic hydrolysis and esterification.

A new enzymatic method for synthesis of ethyl 2-methylene-3-phenyl-3-hydroxypropionate was developed, and successfully used for the production of target compound with high enantioselectivity.

The next studies on enzymatic kinetic resolution of racemic *trans*-2-phenylcyclopropane-1-carboxylic acid revealed that the concentration of cosolvent is crucial for enantioselectivity. The developed method enabled to obtain the target ethyl ester with very good yield and enantioselectivity value 150.

A special attention was focused on the synthesis of acetoacetic acid esters. An effective biocatalytic method for the synthesis of this class of compounds was developed. This method enables to obtain the respective products with high yields and does not require using low pressure nor high temperature. The transesterification reaction of ethyl acetoacetate was found to be efficiently catalysed by a mixture of enzymes. Systematic studies confirmed that kinetic effect of carefully selected mixture of enzymes is much higher than for a single enzyme. The group of substrates studied was expanded on keto-esters substrate, possessing the carbonyl group in alpha, gamma, delta, epsilon positions. Furthermore, it was revealed that *tert*-butyl acetoacetate is also a convenient substrate for the transesterification with alcohols.

Since *tert*-butyl esters are not substrates for enzymatic reactions, a special structure of the active site of enzyme is required to hydrolyze *tert*-butyl esters. A new mechanism, explaining the reactivity of *tert*-butyl acetoacetate and other *tert*-butyl keto-esters in enzymatic transesterification, was proposed.



1. Wstęp

Estry są jednymi z najszerzej stosowanych związków w chemii organicznej, które znajdują zastosowanie jako składniki substancji zapachowych, żywic i plastyfikatorów oraz w przemyśle kosmetycznym i spożywczym. Klasyczną metodą syntezy estrów jest reakcja estryfikacji, polegająca na ogrzewaniu kwasu karboksylowego z alkoholem w obecności katalizatora. Proces jest całkowicie odwracalny, wymaga stosowania dużego nadmiaru reagentów, a woda musi być usuwana z mieszaniny reakcyjnej. Inną metodą syntezy jest reakcja transestryfikacji w obecności katalizatorów. Jednak stosowane katalizatory często są toksyczne, a ich usuwanie wymaga dodatkowego etapu.

Do syntezy estrów, które miałyby być wykorzystane w przemyśle farmaceutycznym lub spożywczym, niezbędne są specjalne procedury, umożliwiające otrzymywanie produktów bez śladów zanieczyszczeń substancjami organicznymi bądź nieorganicznymi. Dlatego pożądane jest znalezienie nowych, nietoksycznych i efektywnych katalizatorów oraz opracowanie metod syntezy, które prowadziłyby do otrzymywania produktów z wysoką wydajnością i czystością, bez konieczności ich dodatkowego oczyszczania.

Otrzymywanie estrów enancjomerycznie czystych pozostaje nadal wyzwaniem w chemii organicznej. Znane metody ich otrzymywania również często wymagają stosowania toksycznych katalizatorów i mają wiele ograniczeń. Dlatego biokataliza znajduje coraz szersze zastosowanie w syntezie estrów, szczególnie w otrzymywaniu estrów enancjomerycznie czystych. Reakcje enzymatyczne są efektywne, selektywne, stereospecyficzne, a ponadto nie wprowadzają dodatkowych toksycznych zanieczyszczeń. Pozwalają otrzymywać produkty z wysoką wydajnością oraz enancjoselektywnością.

Reakcje enzymatycznej transestryfikacji są przeprowadzane najczęściej z zastosowaniem takich reagentów jak octan winylu i propenyłu. Dlatego bardzo ważne jest poszerzenie tej grupy reagentów o nowe substraty, które mogłyby być zastosowane do otrzymywania estrów.

Do bardzo ważnej grupy estrów należą estry kwasu acetylooctowego. Związki te są stosowane jako substraty w syntezie między innymi: aminokwasów, antybiotyków, środków przeciwbólowych, witaminy B, a także wykorzystywane w przemyśle perfumeryjnym, barwników, lakierów oraz spożywczym. Szczególnie pożądane są nieracemiczne pochodne tych estrów. Chemiczna transestryfikacja, prowadząca do otrzymywania tej klasy związków, wymaga stosowania wysokich temperatur oraz toksycznych katalizatorów. Enzymatyczne transestryfikacje są prowadzone z zastosowaniem nietrwałego reagenta, jakim jest keten, lub pod zmniejszonym ciśnieniem. Znaczne ograniczenie tych metod sprawia, że opracowanie efektywnej metody syntezy β -ketoestrów jest bardzo interesującym wyzwaniem.

2. Część literaturowa

2.1. Kataliza enzymatyczna

Zastosowanie enzymów w syntezie organicznej stanowi atrakcyjną alternatywę dla klasycznych katalizatorów ze względu na nietoksyczność, niski koszt, prostą procedurę izolacji produktu oraz brak konieczności dodatkowego oczyszczania. Enzymy są bardzo efektywnymi katalizatorami. Szybkość reakcji jest 10^8 - 10^{10} razy wyższa w porównaniu z szybkością reakcji niekatalizowanej, w niektórych przypadkach nawet 10^{17} , co znacznie przekracza wartość, którą mogą osiągnąć chemiczne katalizatory^[1]. Ponadto tradycyjne katalizatory są stosowane w stężeniach 0.1–1% molowych, podczas gdy większość reakcji enzymatycznych może być prowadzona przy stężeniu molowym 10^{-3} - 10^{-4} % katalizatora, co czyni je efektywniejszymi. Biokatalizatory są przyjazne środowisku i działają w łagodnych warunkach (temperatura rzędu 20-40 i pH 5-8), co minimalizuje problemy niepożądanych reakcji ubocznych, takich jak: rozkład, izomeryzacja, racemizacja i przegrupowania^[2].

Właściwości katalityczne enzymów pozwalają im na akceptowanie „nienaturalnych” substratów oraz katalizowanie więcej niż jednej transformacji chemicznej, co określa się terminem „promiscuity”^[3]. Transformacje te mogą różnić się grupą funkcyjną, czyli wiązaniem utworzonym lub rozerwanym i/lub mechanizmem katalitycznym, a także ścieżką tworzenia/rozerwania wiązania.

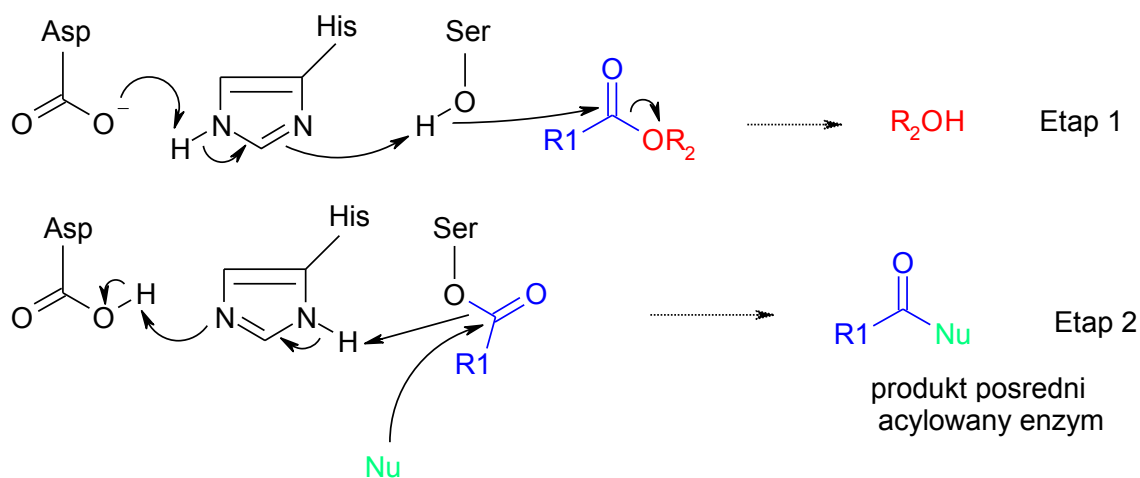
2.2. Hydrolazy

W syntezie organicznej głównymi reakcjami katalizowanymi przez enzymy są reakcje hydrolizy i tworzenia wiązań estrowych. Dlatego hydrolazy, a wśród nich esterazy i lipazy, są najczęściej stosowane jako katalizatory. Hydrolazy (EC 3), zgodnie z definicją zaproponowaną przez IUPAC, katalizują reakcję rozłączenia wiązań C-O, C-N i C-C poprzez przyłączenie lub usunięcie cząsteczki wody^[4]. Ze względu na typ hydrolizowanego wiązania można rozróżnić między innymi esterazy

i lipazy (wiązanie estrowe), proteazy (wiązanie peptydowe), glikozydazy (wiązanie glikozydowe) czy nukleazy (hydroliza kwasów nukleinowych). Aktywność katalityczna hydrolaz jest związana z obecnością w centrum aktywnym enzymu grup funkcyjnych łańcuchów bocznych kwasu asparaginowego lub glutaminowego, histydyny oraz seryny.

2.2.1. Mechanizm działania hydrolaz

Mechanizm hydrolizy wiązań estrowych i amidowych przez enzymy jest odmienny od zasadowej hydrolizy chemicznej. Grupa nukleofilowa z centrum aktywnego enzymu atakuje grupę karbonylową substratu (estru lub amidu). Nukleofilem może być grupa hydroksylowa seryny (np. esteraza z wątroby świni (PLE), subtilizyna i większość lipaz z mikroorganizmów), grupa karboksylowa kwasu asparaginowego (np. pepsyna) lub grupa S-H cysteiny (np. papaina)^[2]. Postulowany mechanizm jest przedstawiony na Schemacie 1:

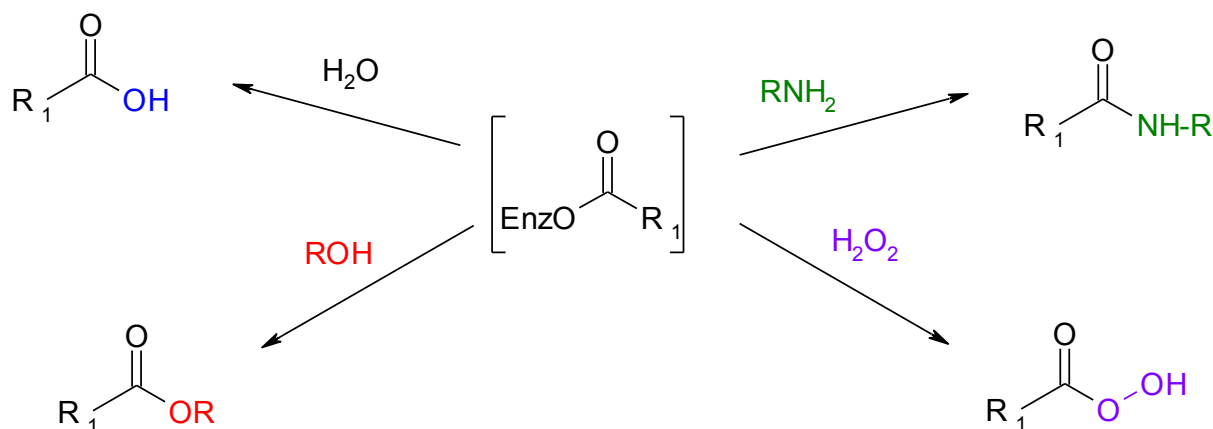


Schemat 1: Mechanizm działania hydrolaz

Dwie dodatkowe grupy (Asp i His) zlokalizowane w pobliżu reszty seryny tworzą triadę katalityczną. Specjalne oddziaływanie tych trzech grup powoduje zmniejszenie pK_a grupy hydroksylowej seryny, umożliwiając atak nukleofilowy na grupę karbonylową (etap 1). Ugrupowanie acylowe substratu zostaje kowalencyjnie przyłączone do enzymu, tworząc produkt pośredni, którym jest acylowany enzym, oraz powodując odejście grupy R_2-OH . Następnie nukleofil (Nu), atakuje kompleks

acylowany enzym, regenerując go, wskutek czego powstaje produkt kwas karboksylowy lub jego pochodna (etap 2).

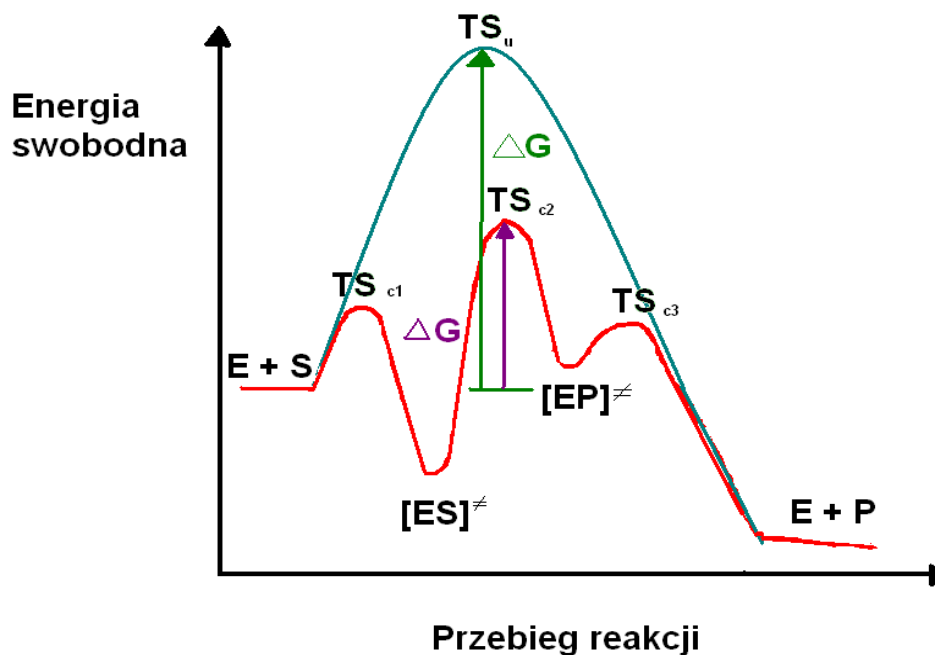
Gdy nukleofilem jest alkohol, przebiega reakcja transestryfikacji, w reakcji z aminą uzyskuje się amidy, a w reakcji z nadtlenkiem wodoru – peroksykwasy, co pokazano na schemacie 1a:



Schemat 1a: Reakcja acylowanego enzymu z wybranymi nukleofilami

2.2.2. Kinetyka reakcji enzymatycznych

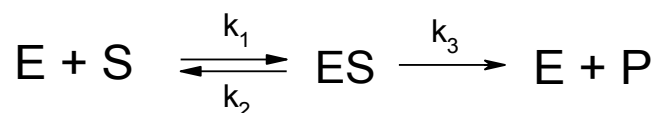
Enzymy katalizują reakcję chemiczną zgodnie z mechanizmem pokazanym powyżej. Zmiany energii swobodnej reakcji niekatalizowanej i katalizowanej przez enzym przedstawiono na Rysunku 1:



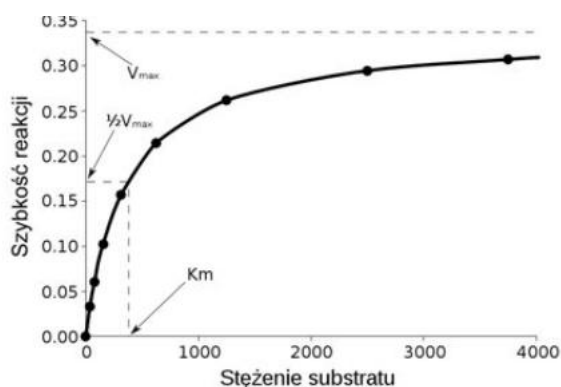
Rysunek 1: Zmiany energii swobodnej zachodzące w czasie reakcji katalizowanej przez enzym (---) i reakcji niekatalizowanej (---). Reakcja enzymatyczna przebiega poprzez stany przejściowe T_{sc1} , T_{sc2} , T_{sc3} , ΔG i ΔG – swobodna energia aktywacji odpowiednio reakcji niekatalizowanej i katalizowanej przez enzym

W wyniku reakcji enzymatycznej w pierwszym etapie tworzony jest poprzez stan przejściowy T_{sc1} produkt pośredni, którym jest kompleks enzym-substrat $[ES]$. Następnie poprzez kolejny stan przejściowy T_{sc2} , $[ES]$ przekształcony zostaje w produkt pośredni, którym jest kompleks enzym-produkt $[EP]$. Kompleks ten ostatecznie ulega rozpadowi poprzez stan przejściowy T_{sc3} do produktu $[P]$ i enzymu $[E]$. Stan przejściowy o najwyższej energii T_{sc2} , decydujący o szybkości reakcji, ma niższą energię niż stan przejściowy T_{su} reakcji niekatalizowanej. Tym samym reakcje katalizowane przez enzymy przebiegają z dużo większą szybkością.

W 1913 roku Leonor Michaelis i Maud Menten zaproponowali model odpowiadający kinetyce enzymatycznej. Podstawową cechą tego modelu jest założenie, że kompleks enzym-substrat $[ES]$ jest koniecznym etapem pośrednim procesu katalitycznego. Najprostszy model opisujący właściwości katalityczne większości enzymów jest opisany równaniem ^[5]:



Enzym łączy się z substratem, tworząc kompleks ES, reakcję charakteryzuje stała szybkości k_1 . Istnieją dwie możliwe drogi rozpadu kompleksu ES. Może on dysocjować do E i S ze stałą szybkości k_2 lub może się przekształcać w produkt P ze stałą szybkości k_3 . Równanie Michaelisa-Menten jest przedstawione na Rysunku 2:



$$V = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Równaniem Michaelisa-Menten:
gdzie: V – szybkość początkowa,
 S – stężenie substratu,
 K_m – stała Michaelisa-Menten.

Rysunek 2: Model Michaelisa-Menten

Przy niewielkich stężeniach substratu, kiedy $[S]$ jest znacznie mniejsze niż K_m ,

$$V = [S] V_{max} / K_m,$$

co oznacza, że szybkość reakcji jest wprost proporcjonalna do stężenia substratu.

Przy dużych stężeniach substratu, kiedy $[S]$ jest dużo większe od K_m ,

$$V = V_{max},$$

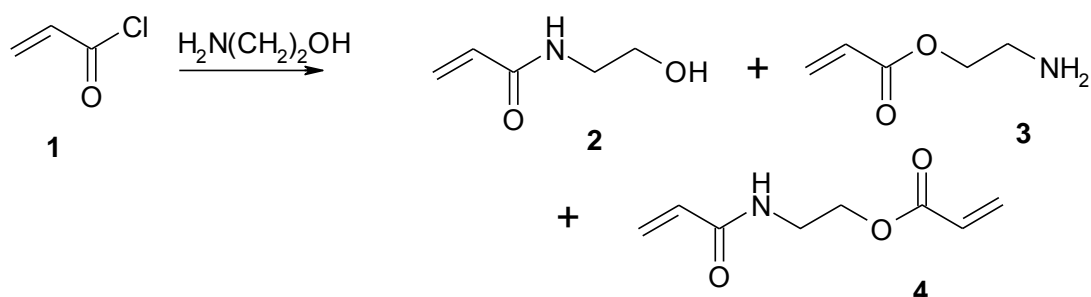
co oznacza, że szybkość jest maksymalna i niezależna od stężenia substratu. Znaczenie K_m wynika z równania przedstawionego wyżej. Kiedy $[S] = K_m$, wtedy $V = V_{max} / 2$. Stąd K_m jest równe takiemu stężeniu substratu, dla którego szybkość reakcji osiąga połowę swojej wartości maksymalnej. Inaczej jest to takie stężenie substratu, przy którym połowa miejsc aktywnych enzymu jest osadzona.

2.3. Selektywność reakcji enzymatycznych

Enzymy są katalizatorami chemo-, regio- i stereoselektywnych reakcji chemicznych.

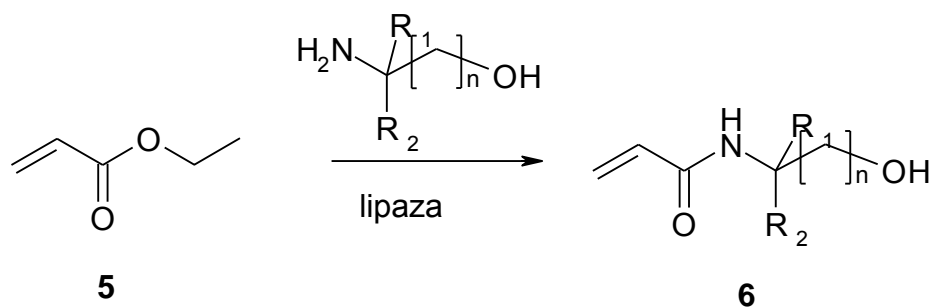
a) Chemoselektywność reakcji enzymatycznych:

W reakcjach chemoselektywnych enzymy katalizują reakcję jednej konkretnej grupy funkcyjnej w obecności innych, podobnych grup, na których reakcje w tych samych warunkach mogłyby zachodzić z powodzeniem. W konsekwencji tego zamiast mieszaniny produktów otrzymywany jest jeden. Przykładem enzymatycznej reakcji chemoselektywnej jest synteza *N*-2-hydroksyalkiloakrylamidów^[6]. W reakcji chlorku kwasu akrylowego **1** i 2-hydroksyetyloaminy mogą powstawać 3 produkty, przedstawione na Schemacie 2:



Schemat 2: Produkty powstające w wyniku reakcji chlorku kwasu akrylowego i 2-hydroksyetyloaminy

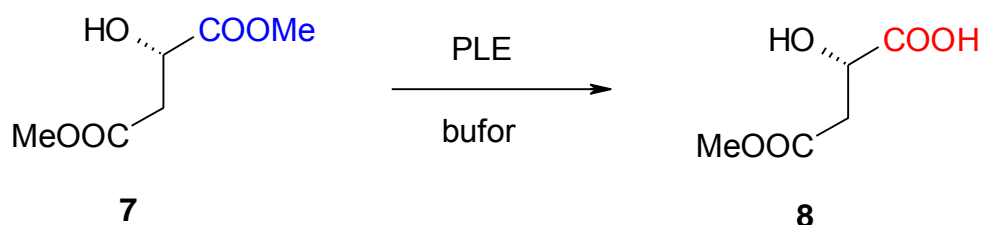
Reakcja estrów kwasu akrylowego i hydroksyamin jest katalizowana przez enzymy, a jedynym produktem powstającym jest podstawiony akrylamid^[6]. Dla lipazy z *Candida antarctica* (CALB) otrzymano *N*-2-hydroksyetyloakrylamid z wydajnością 93%. Obrazuje to Schemat 3:



Schemat 3: Chemoselektywna reakcja otrzymywania N-2-hydroksyetyloakrylamidu katalizowana przez enzymy

b) Regioselektywność reakcji enzymatycznych

Ze względu na chiralną strukturę enzymy mogą rozróżniać dwie grupy funkcyjne, identyczne chemicznie, które są usytuowane w różnych pozycjach cząsteczki. W reakcjach regioselektywnych jeden z izomerów powstaje w przewadze lub jest jedynym produktem reakcji. Przykładem jest katalizowana przez PLE reakcja hydrolizy estru kwasu S-2-hydroksy-1,4-butanodikarboksylowego^[7]. Tylko jedna z grup estrowych ulega hydrolizie i jedynym produktem reakcji jest kwas S-2-hydroksy-3-karbometoksypropanowy.

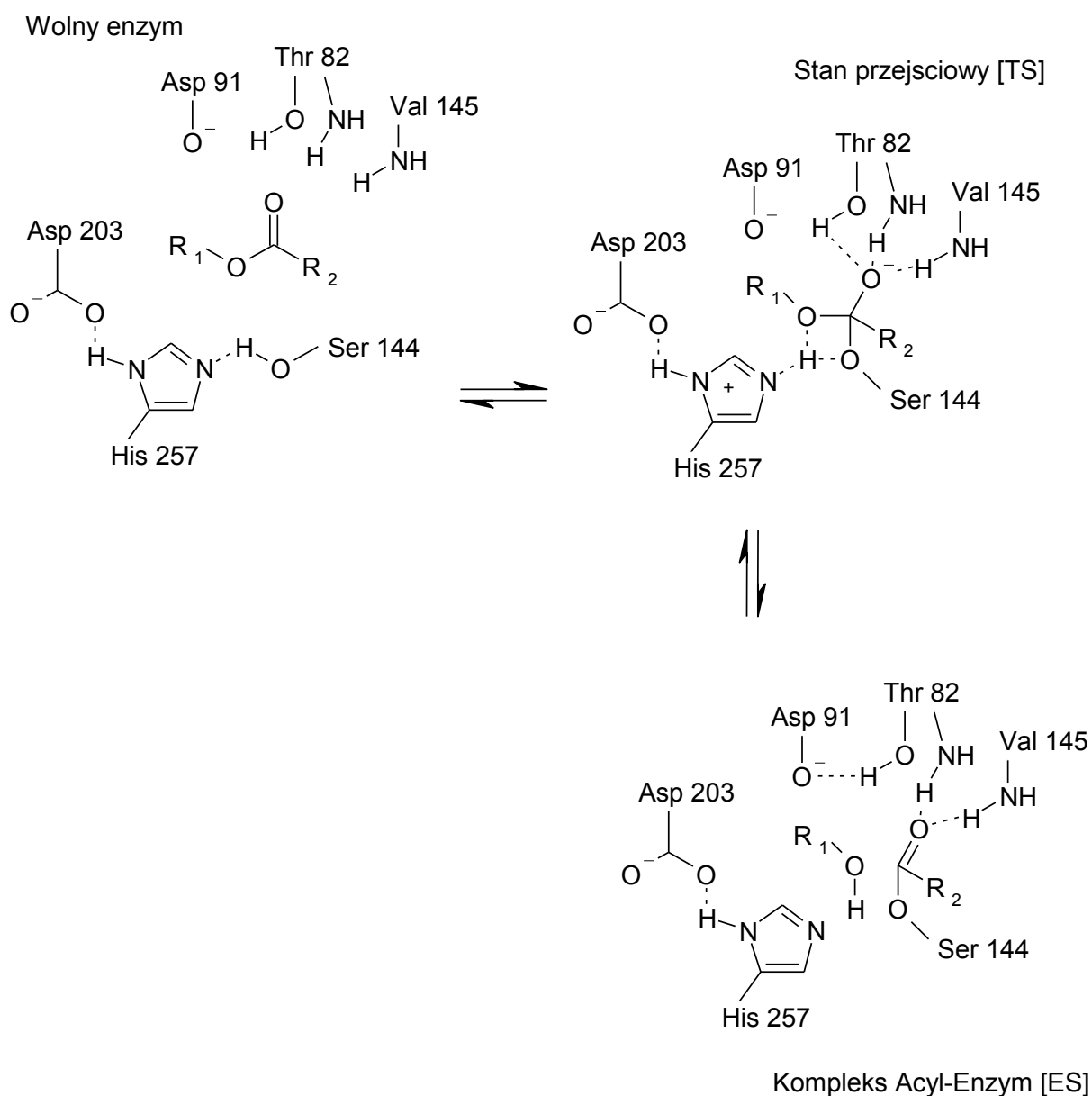


Schemat 4: Regioselektywna katalizowana przez PLE reakcja hydrolizy estru kwasu S-2-hydroksy-1,4-butanodikarboksylowego

c) Stereoselektywność reakcji enzymatycznych

Badania wykazały, że produkt pośredni w reakcjach enzymatycznych jest stabilizowany szeregiem oddziaływań, obniżających jego energię i wpływających na enancjoselektywność. Przykładem takiej reakcji jest reakcja hydrolizy/estryfikacji

katalizowana przez lipazę z *Rhizopus oryzae*. Na Schemacie 5 przedstawiono mechanizm tworzenia się kompleksu acyl enzym:

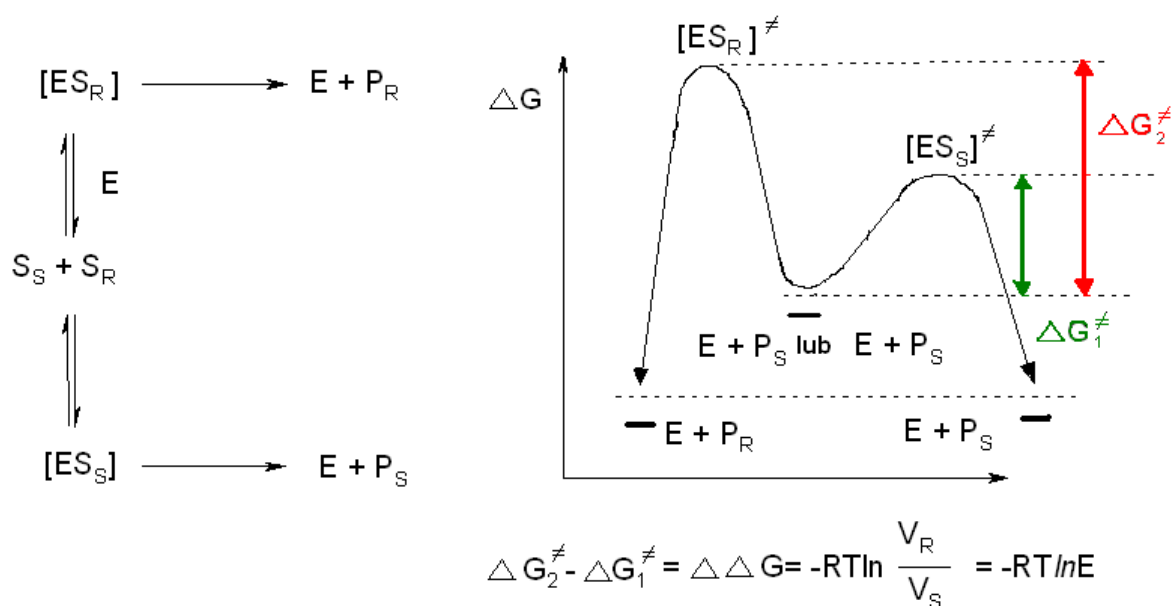


Schemat 5: Mechanizm reakcji hydrolizy/estryfikacji katalizowanej przez lipazę z *Rhizopus oryzae*

Grupa hydroksylowa reszty seryny 144, która bezpośrednio atakuje centrum elektrofilowe substratu, estru, jest stabilizowana przez wiązanie wodorowe z atomem azotu reszty His 257, która z kolei zostaje połączona wiązaniem wodorowym

z grupą estrową Asp 203. Po ataku nukleofilowym reszty seryny na atom węgla grupy karbonylowej tworzy się stan przejściowy, oznaczony na schemacie [TS]. Jest on stabilizowany przez Thr 82, Val 145 oraz przez oddziałujące ze sobą reszty Asp 203 i His 257. Następnie tworzy się acylowany enzym, którego grupa karbonylowa oddziałuje z grupą aminową Val 145 oraz Thr 82.

Aktywność katalityczna enzymów jest wynikiem odpowiedniego przestrzennego ułożenia grup funkcyjnych łańcuchów bocznych aminokwasów. Ponieważ enzymy są katalizatorami homo-chiralnymi, reakcje przebiegające z ich udziałem mogą być stereoselektywne, a stereoselektywność wynika z przestrzennej budowy ich centrum aktywnego oraz struktury katalizatora. Tę właściwość enzymów szeroko wykorzystuje się do opracowania rozdziału kinetycznego enancjomerów mieszaniny racemicznej (*ang.* kinetic resolution, KR).



Rysunek 3: Diagram rozkładu energii dla enancjoselektywnej reakcji katalizowanej enzymem, E-enzym, S_s i S_R – enancjomeryczne substraty, P_S i P_R – enancjomeryczne produkty

Enzymy z różną prędkością katalizują reakcję z poszczególnymi enancjomerami substratu. Enancjoselektywność enzymów wynika z różnicy w energii aktywacji powstawania kompleksu enzym-enancjomer R-[ES_R] oraz enzym-enancjomer S-[ES_S] (Rys. 3), co w konsekwencji prowadzi do różnicy w szybkości

tworzenia się enancjomerów produktu P_R i P_S . Im większa jest różnica w energii aktywacji ΔG_1 i ΔG_2 , tym większa enancjoselektywność enzymu E, określana jako stosunek prędkości reakcji enancjomerów R i S (odpowiednio v_S oraz v_R). Zależność ta jest pokazana w Tabeli 1:

$\Delta \Delta G$	V_A/V_B	% E.e.
1.118	1.2	10
0,651	3	50
1.74	19	90
2.17	39	95
3.14	199	99
4.50	1999	99.9

Tabela 1: Zależność między różnicą energii aktywacji dla poszczególnych enancjomerów substratu a szybkościami ich reakcji i uzyskiwanymi nadmiarami enancjomerycznymi

Teoretycznie, już bardzo mała wartość $\Delta \Delta G=4.5$ kcal/mol może prowadzić do powstawania jednego z enancjomerów produktu z wysokim nadmiarem enancjomerycznym (e.e.>99%), co oznacza, że dla enzymu wysoka stereoselektywność jest możliwa do uzyskania prostym sposobem.

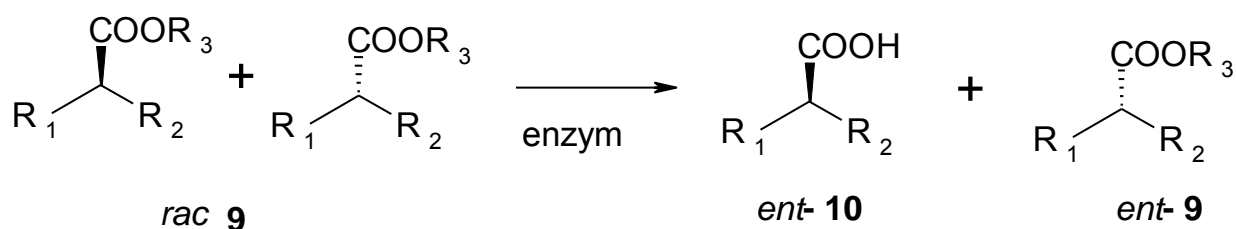
Enancjoselektywność

Katalizowanie przez enzymy reakcji enancjoselektywnych ma bardzo szerokie zastosowanie w biokatalizie. W enzymatycznym rozdziale kinetycznym poprzez hydrolizę, estryfikację, acylowanie i transestryfikację można uzyskiwać produkty enancjomerycznie czyste i wzbogacone.

2.3.1. Enzymatyczna enancjoselektywna hydroliza

Lipazy i proteazy mogą katalizować stereoselektywną hydrolizę chiralnych estrów w wodzie. W celu uzyskania rozdziału kinetycznego racemicznego alkoholu lub kwasu przeprowadza się chemiczną estryfikację, a następnie uzyskany ester poddawany jest reakcji hydrolizy, katalizowanej przez odpowiednią hydrolazę, która powinna hydrolizować wiązanie estrowe z odpowiednią stereoselektywnością.

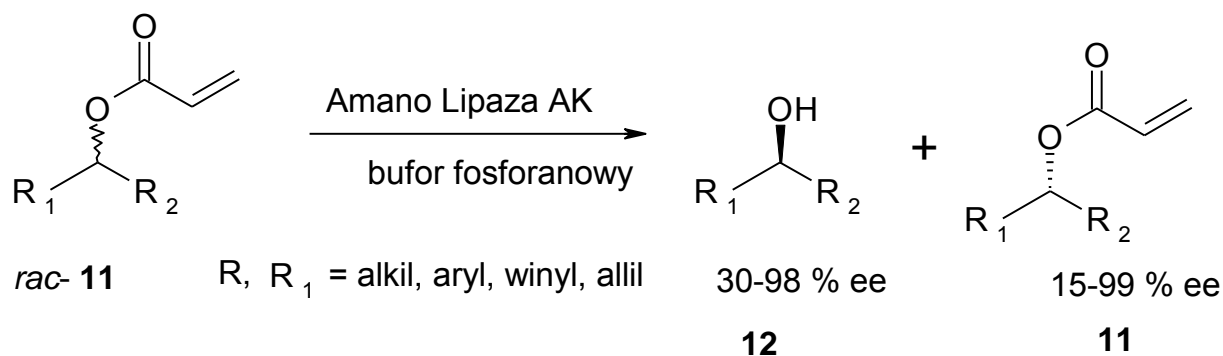
Jeśli hydrolaza reaguje tylko z jednym enancjomerem estru, osiągnięta jest konwersja 50%, a reagujący enancjomer jest całkowicie hydrolizowany do kwasu i alkoholu, pozostawiając nieprzereagowany enancjomer estru. Nawet jeśli reakcja nie jest enancjospecyficzna, osiągnięty zostaje częściowy rozdział kinetyczny, a nadmiar enancjomeryczny substratu i produktu zależy od konwersji. Enancjoselektywna enzymatyczna hydroliza jest przedstawiona na schemacie 6:



Schemat 6: Enancjoselektywna hydroliza estru katalizowana przez enzymy

Jeden z enancjomerów racemicznego estru kwasu karboksylowego jest transformowany do kwasu, podczas gdy drugi enancjomer estru pozostaje nieprzereagowany.

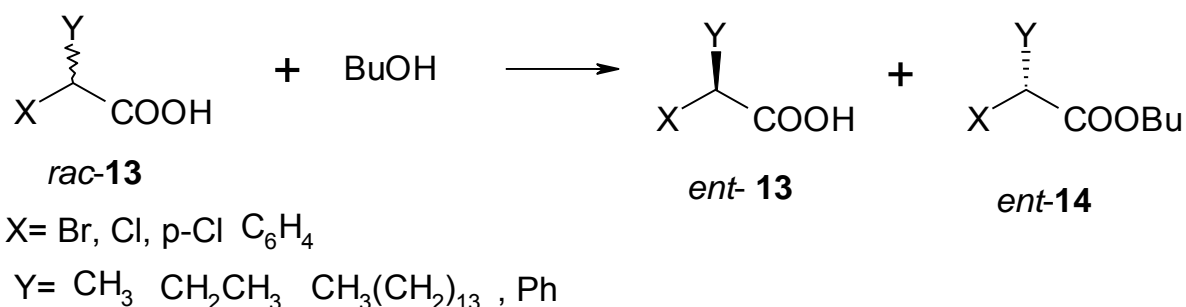
Przykładem enancjoselektywnej enzymatycznej hydrolizy jest rozdział kinetyczny akrylanów alkoholi drugorzędowych. Lipaza Amano AK jest doskonałym katalizatorem tych reakcji w buforze fosforowym. Zarówno alkohole alifatyczne, jak i aromatyczne były substratami dla enzymu, a produkty otrzymano z bardzo dobrą enancjoselektywnością^[9]:



Schemat 7: Enancjoselektywna hydroliza akrylanów katalizowana przez Amano Lipazę AK

2.3.2. Stereoselektywna enzymatyczna estryfikacja

Stereoselektywna estryfikacja i transestryfikacja katalizowana przez lipazy w rozpuszczalnikach organicznych jest podobnie jak hydroliza stosowana do rozdzielenia kinetycznego racemicznych alkoholi i kwasów.

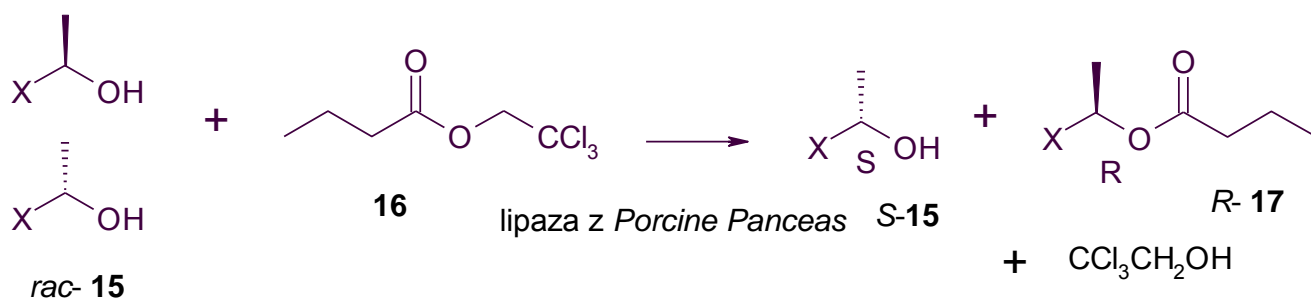


Schemat 8: Enancjoselektywna enzymatyczna estryfikacja racemicznych kwasów karboksylowych

Lipaza z *C. cylindracea* została zastosowana do stereoselektywnych estryfikacji w heksanie^[10]. Otrzymano produkty z wysoką enancjoselektywnością w większości przypadków. Proces rozdzielenia kinetycznego kwasów 2-bromo i 2-chloropropionowych katalizowany przez lipazę z *C. cylindracea* jest aktualnie przeprowadzany w skali przemysłowej^[10].

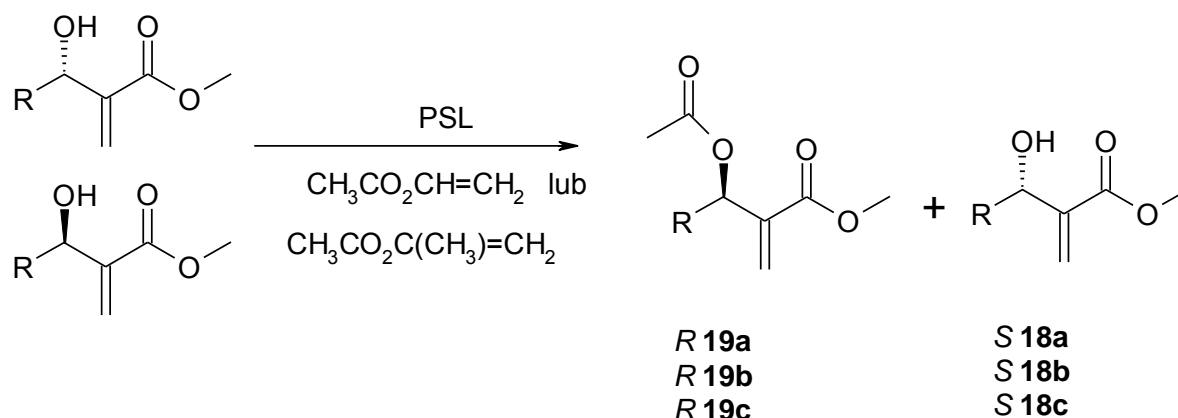
2.3.3. Stereoselektywna enzymatyczna transestryfikacja

Lipaza z *Porcine pancreas* została zastosowana do rozdziału kinetycznego ponad 30 racemicznych alkoholi drugorzędowych w bezwodnym eterze i heptanie. Otrzymano S alkohole i R estry z nadmiarem enancjomerycznym 90-100%.



Schemat 9: Enzymatyczna enancjoselektywna transestryfikacja kwasu karboksylowego racemicznym alkoholem

Innym przykładem reakcji enancjoselektywnej transestryfikacji jest katalizowane enzymami acylowanie racemicznych produktów reakcji Baylisa-Hillmana^[11]. Przy zastosowaniu odpowiednich warunków uzyskano produkt acylowania z nadmiarem enancjomerycznym 99%:

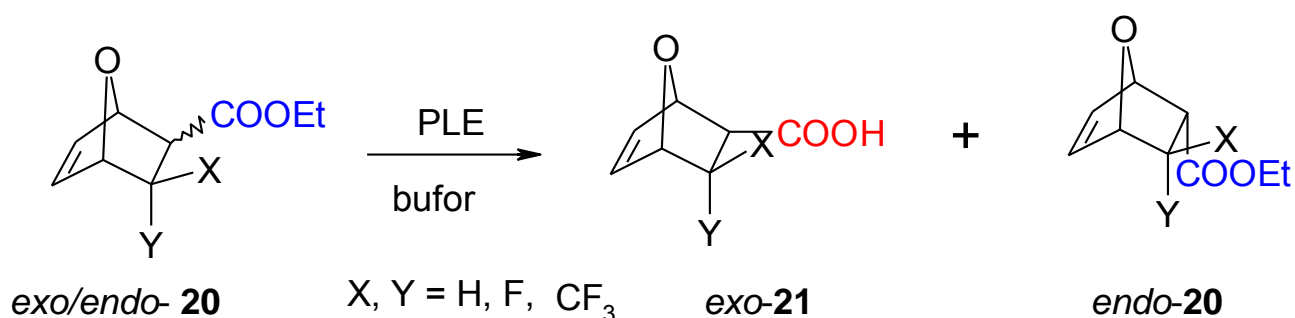


rac 18a: R=Me
rac 18b: R=propyl
rac 18c: R=naftyl

Schemat 10: Enancjoselektywna enzymatyczna transestryfikacja adduktów Baylisa-Hillmana

2.3.4. Diastereoselektywność

W enzymatycznych reakcjach diastereoselektywnych tylko jeden z diastereoizomerów jest rozpoznawany przez enzym i ulega transformacji. Przykładem jest katalizowana przez PLE hydroliza mieszaniny diastereoizomerów estru **20**. Tylko izomer *exo* ulega hydrolizie enzymatycznej, tworząc kwas karboksylowy, podczas gdy *endo* nie ulega reakcji^[8]:



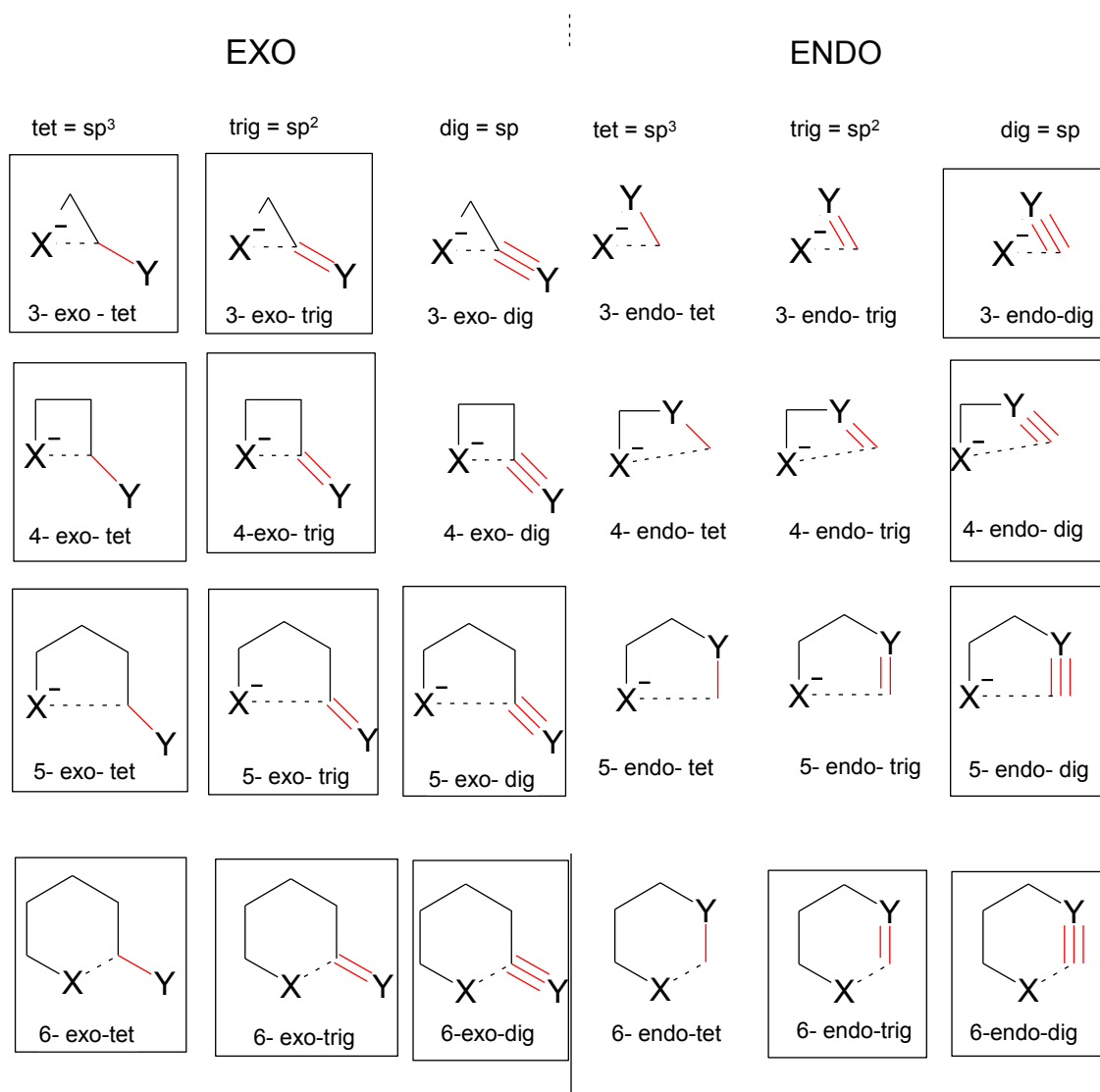
Schemat 11: Diastereoselektywna hydroliza katalizowana przez PLE

2.4. Katalizowane enzymami reakcje tworzenia pierścieni

Enzymy są bardzo często katalizatorami reakcji zamykania pierścieni, głównie pięcio-, sześć- i siedmioczłonowych. Te cyklizacje prowadzą do selektywnego otrzymywania laktonów i laktamów. Problem tworzenia małych pierścieni jest złożony i został opisany regułami Baldwina.

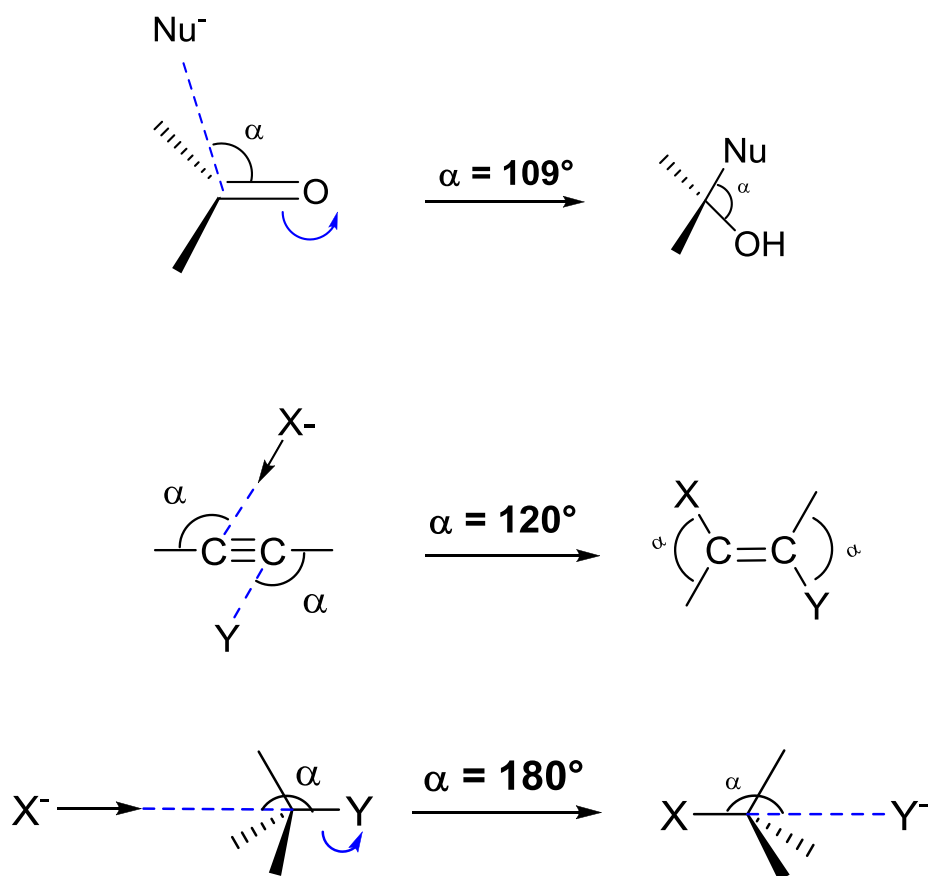
2.4.1. Reguły Baldwina zamykania pierścieni 3-7-członowych

Reguły Baldwina, zaproponowane w 1976 roku przez Jacka Baldwina, są przewodnikiem po reakcjach cyklizacji pierścieni od 3 do 7-członowych^[15]. Nie opisują absolutnego prawdopodobieństwa zamykania pierścieni, tylko ich względne szybkości, wskazując na reakcje uprzywilejowane i utrudnione^[16]:



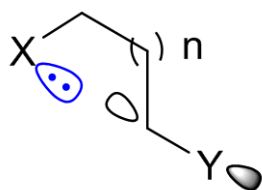
Rysunek 4: Reguły Baldwin

Reguły są przedstawione na rysunku. Cyfry oznaczają wielkość pierścienia, tworzonego podczas cyklizacji. Określenia *exo* i *endo* oznaczają typ wiązania tworzonego. Jeżeli wiązanie zrywane podczas cyklizacji znajduje się na zewnątrz pierścienia, mamy do czynienia z cyklizacją *exo*, jeżeli wewnątrz – *endo*. Określenia tet, trig i dig oznaczają odpowiednio atomy węgla tetraedrycznego (sp^3), trygonalnego (sp^2) i diagonalnego (sp). W przypadku atomu węgla tetraedrycznego atak nukleofila powinien nastąpić pod kątem 180° , zgodnie z inwersją Waldena^[16]. W przypadku trygonalnego atomu węgla – pod kątem około 109° , natomiast w przypadku diagonalnego – 120° (Rys. 5):



Rysunek 5: Atak nukleofilowy pod odpowiednim kątem w zależności od hybrydyzacji atomu węgla

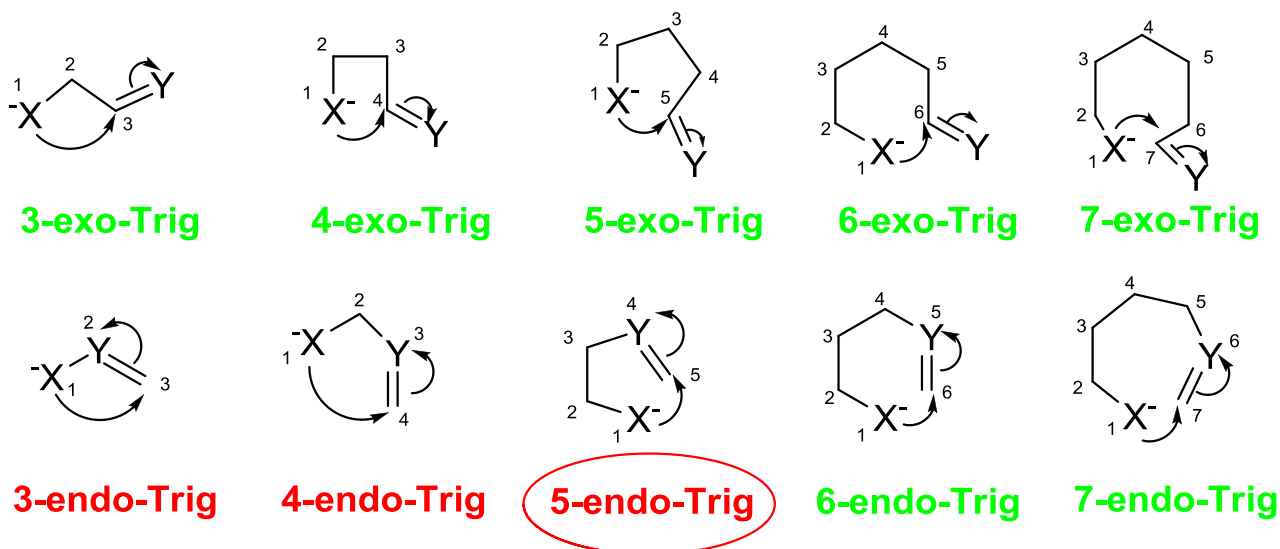
Dla układów tetraedycznych wszystkie cyklizacje *exo* są uprzywilejowane. Jest to spowodowane skutecznym nakładaniem wolnej pary elektronowej nukleofila z orbitalem niewiążącym C-Y. Dzięki temu możliwy jest atak pod odpowiednim kątem.



**Skuteczne nakładanie
wolnej pary X z C-Y σ^*
Możliwy atak pod kątem 180°**

Rysunek 6: Nakładanie par elektronowych podczas ataku nukleofilowego

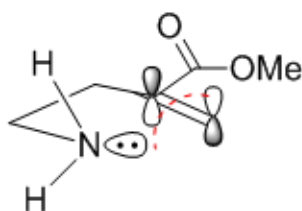
Dla układów trygonalnych również wszystkie cyklizacje *exo* pozostają uprzywilejowane (kolor zielony). Jest to również związane z nakładaniem się wolnej pary elektronowej nukleofila z orbitalem niewiążącym wiązania C-Y, dzięki czemu możliwy staje się atak pod kątem 109° :



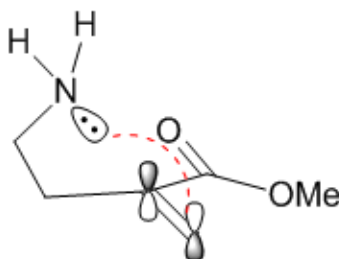
Rysunek 7: Reguły Baldwina dla układów Trig z atomem węgla sp^2

Cyklizacja *5-endo-trig* jest utrudniona również ze względów sterycznych. Wolna para elektronowa nukleofila nie dosięga orbitalu niewiążącego, przez co atak pod kątem 109° nie jest możliwy (Rys. 8):

Złe ustawienie



Zbyt daleko

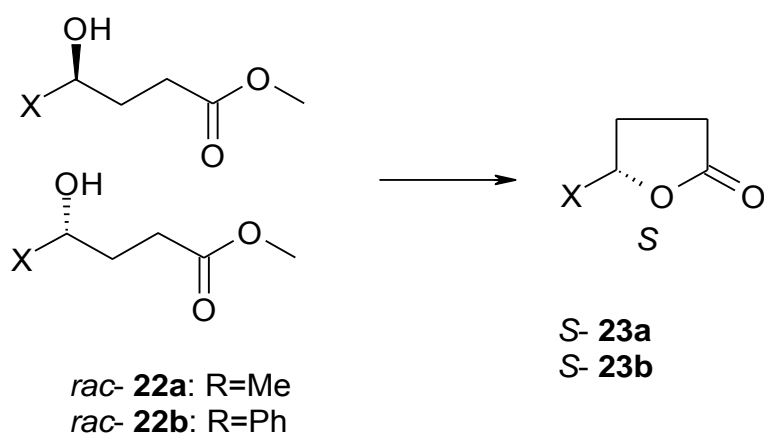


Wolna para azotu nie sięga orbitalu π^* akceptora Michaela
Atak po trajektorii Dünitza nie jest możliwy

Rysunek 8: Utrudniona cyklizacja *5-endo-trig*

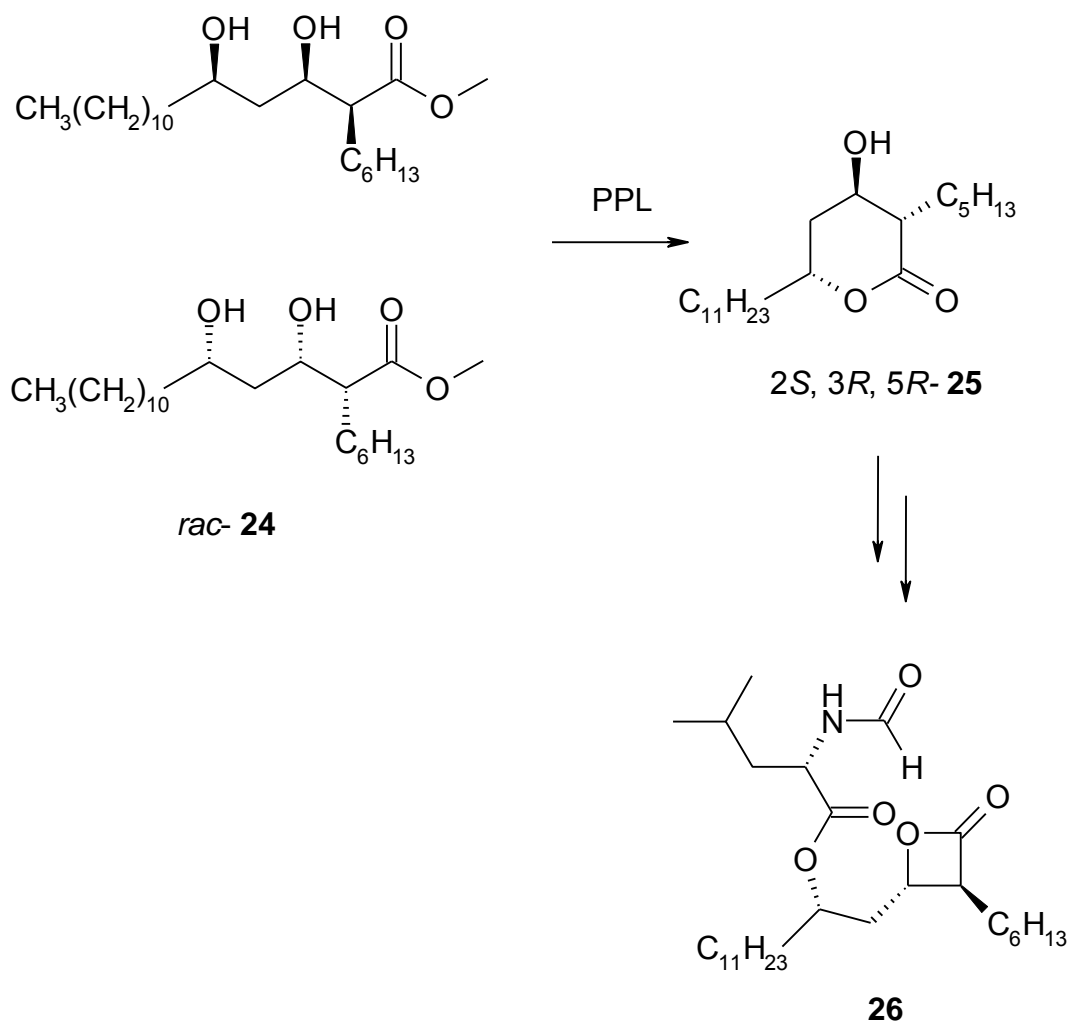
2.4.2. Stereoselektywna enzymatyczna laktonizacja

Lipazy mają również zastosowanie w syntezie laktonów, w tym nieracemicznych w rozpuszczalnikach organicznych z estrów kwasów karboksylowych. Na przykład, optycznie czyste γ -metylo i γ -fenylobutyrolaktony zostały zsyntetyzowane poprzez katalizowaną przez lipazę z *Porcine pancreas* wewnątrzcząsteczkową transestryfikację w eterze^[12]. Enzymatyczna enancjoselektywna transestryfikacja, prowadząca do utworzenia pięciocłonowego laktonu **23** (5-*exo*-trig), jest uprzywilejowana:



Schemat 12: Enzymatyczna enancjoselektywna transestryfikacja, prowadząca do utworzenia pięciocłonowego laktonu

Lipaza z *Porcine pancreas* (PPL) katalizuje γ -laktonizację racemicznego 3,5-hydroksy-2-alkiloestru, w wyniku czego powstaje lakton z wysokim e.e. (93%). Powstały lakton jest kluczowym substratem do syntezy tetrahydrolipstatyny **26**, leku przeciw cukrzycy typu II i przeciw otyłości^[13]:



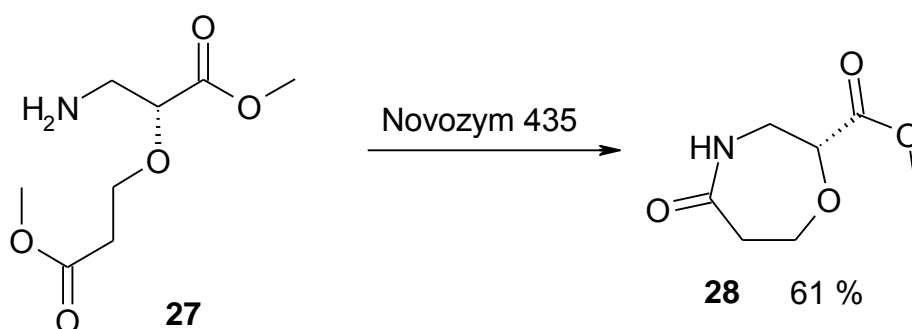
Schemat 13: Enzymatyczna enancjoselektywna transestryfikacja, prowadząca do utworzenia laktonu sześcioczłonowego

Enzymatyczna enancjoselektywna transestryfikacja, prowadząca do utworzenia laktonu sześcioczłonowego **25** (6-*exo-trig*), według reguł Baldwina jest uprzywilejowana.

2.4.3. Selektywna enzymatyczna laktamizacja

Chiralne kwasy 1,4-oksazepano-2-karboksylowe są analogami β -amino kwasów oraz interesującymi substratami do syntezy leków. Kluczowym etapem syntezy jest katalizowana przez enzymy regioselektywna laktamizacja aminoestru **27** do siedmioczłonowego pierścienia laktamowego **28**. Diester w wyniku wewnątrzcząsteczkowej reakcji katalizowanej przez Novozym 435 został

przekształcony w laktam **28** z konwersją 94%. Po oczyszczeniu za pomocą chromatografii otrzymano produkt z wydajnością 61%^[14]:



Schemat 14: Selektywna enzymatyczna laktamizacja prowadząca do otrzymania pierścienia siedmioczłonowego

Laktamizacja prowadząca do otrzymania pierścienia siedmioczłonowego **28** (7-*exo-trig*), podobnie jak wcześniej omówione cyklizacje, jest reakcją uprzywilejowaną i zgodną z regułami Balwina.

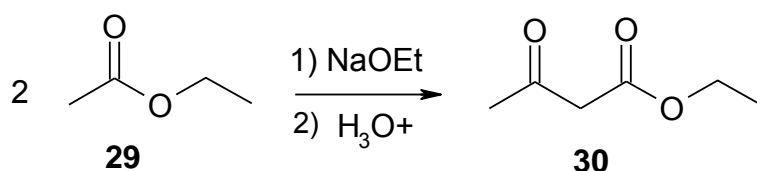
2.5. Metody syntezy β -ketoestrów

2.5.1. Metody chemiczne syntezy beta-ketoestrów

β -keto estry są bardzo ważną grupą związków organicznych, stosowanych w przemyśle farmaceutycznym, chemicznym i polimerów. Są produktami pośrednimi w syntezie wielu naturalnych związków, jak na przykład kwasy karminowe^[17], pirydazyny^[18], w reakcjach cykloaddycji halogenowanych chinonów^[19]. Mają zastosowanie w syntezie funkcjonalizowanych ketenimin^[20], w asymetrycznej hydrogenacji^[21], do otrzymywania pochodnych aminidynopirazolu^[22] i w syntezie związków heterocyklicznych^[23].

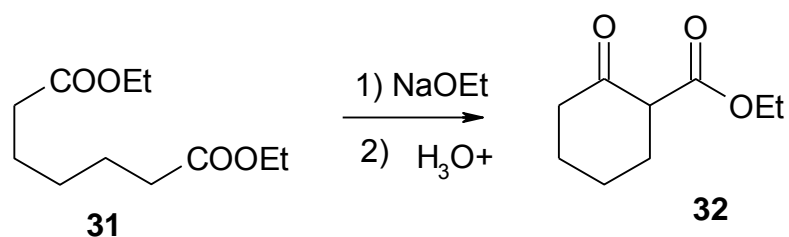
β -ketoestry, ze względu na zdolności chelatowania kompleksów metali, znajdują zastosowanie jako multifunkcyjne dodatki do lubrykantów, łącznie z tymi opartymi na olejach pochodzenia roślinnego, jako potencjalne leki przeciwwirusowe oraz katalizatory wielu stereoselektywnych reakcji^[24].

Wśród metod syntezy beta-ketoestrów najbardziej rozpowszechniona jest reakcja kondensacji. Dobry przykład stanowi synteza acetylooctanu etylu **30**, który otrzymywany jest z dwóch równoważników octanu etylu **29** w kondensacji Claisena:



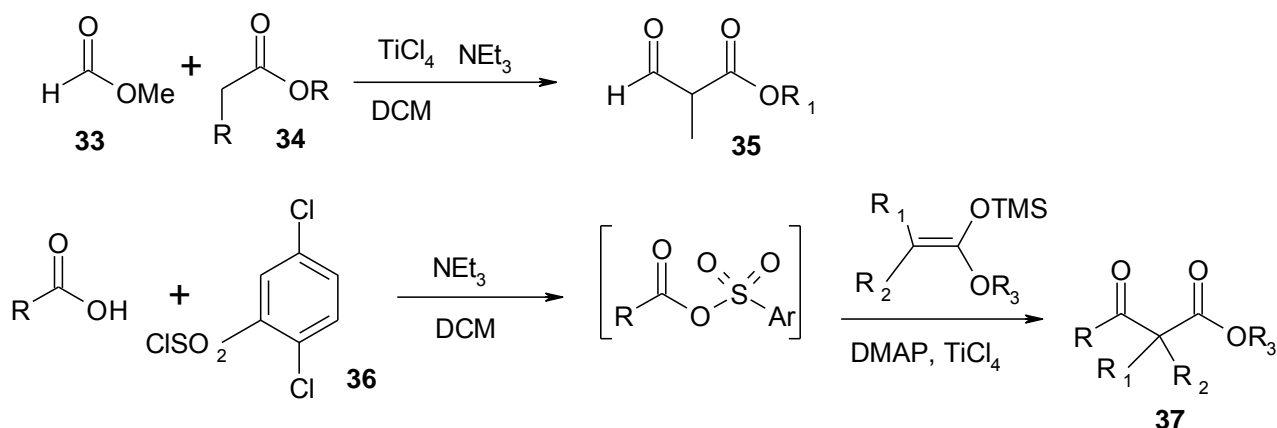
Schemat 15: Otrzymywanie acetylooctanu etylu w kondensacji Claisena

Innym przykładem otrzymywania ketoestrów w reakcji kondensacji jest synteza cyklicznych beta-ketoestrów w warunkach zasadowych:



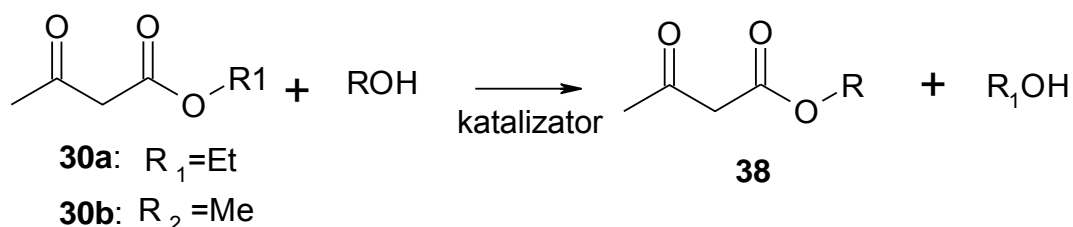
Schemat 16: Kondensacja Dickmanna

Reakcje kondensacji wykorzystuje się również w syntezie α -monopodstawionych β -ketoestrów^[25] oraz α,α -dipodstawionych β -ketoestrów^[26]:

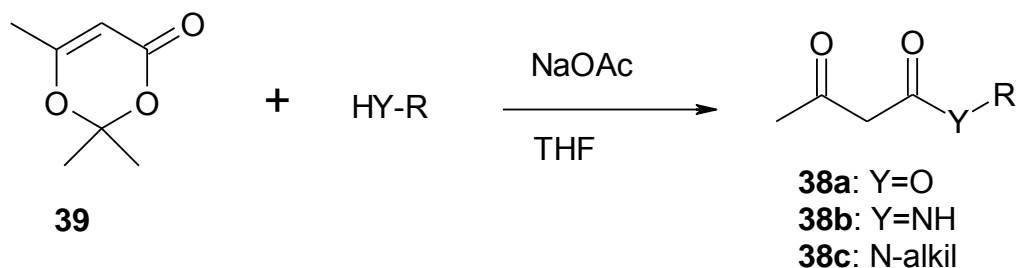


Schemat 17: Otrzymywanie podstawionych β -ketoestrów

Istnieje również kilka metod syntezy β -ketoestrów poprzez transestryfikację acetylooctanu etylu i metylu z alkoholami w obecności katalizatorów (Schemat 18). W tych powszechnie stosowanych metodach jako katalizatory używane są między innymi: alkoholany tytanu, kompleksowy cyny, związki nieorganiczne jak np. jodek indu^[25]. Wszystkie te metody wymagają zastosowania wysokich temperatur, a produktem pośrednim reakcji transestryfikacji jest keten:

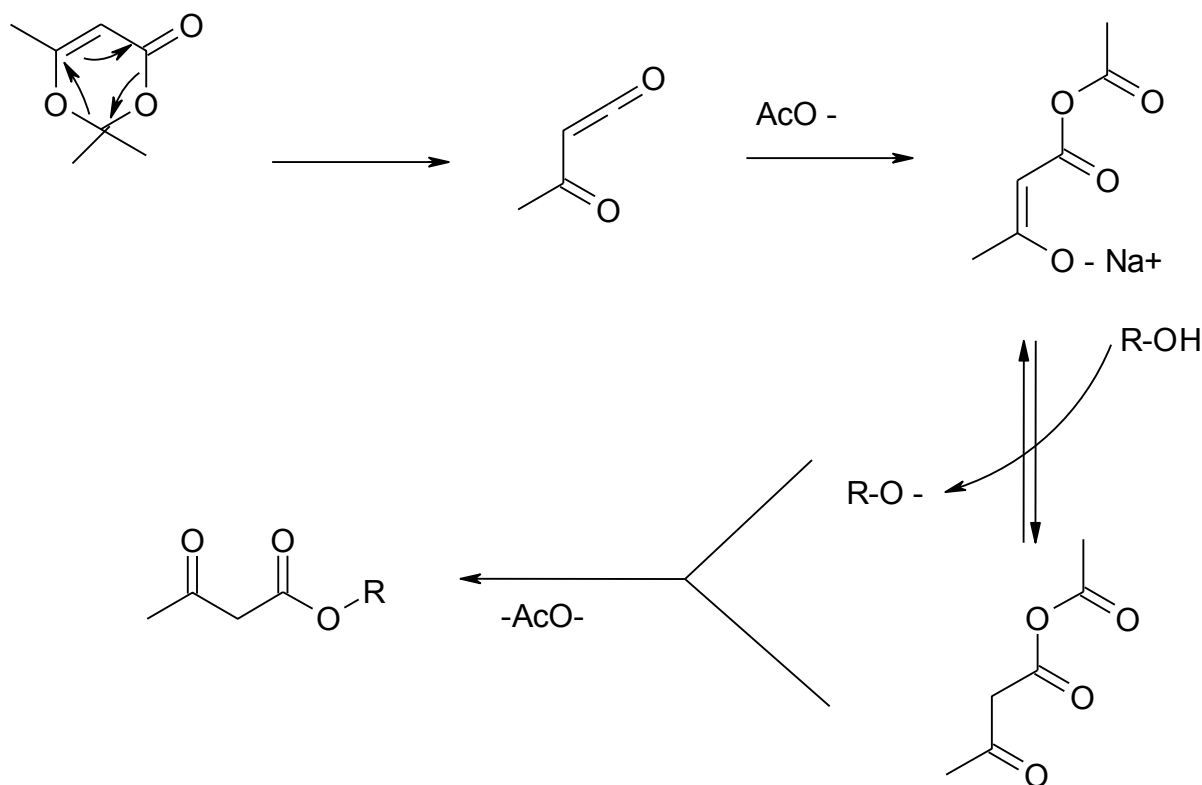


Schemat 18: Transestryfikacja acetylooctanów



Schemat 19: Transestryfikacja 2,2,6-trimetylo-4*H*-1,3-dioksyno-4-onu

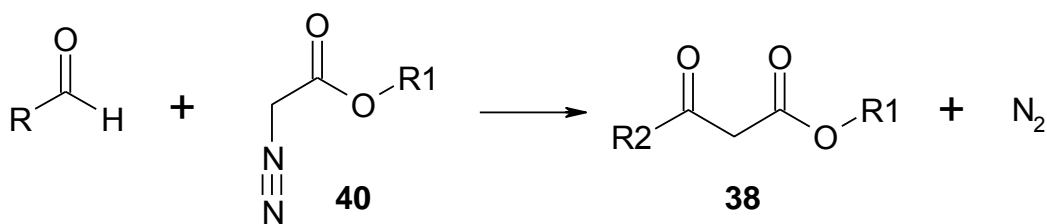
W reakcji pomiędzy 2,2,6-trimetylo-4*H*-1,3-dioksyno-4-onem oraz drugo- i trzeciorzędowymi alkoholami, katalizowanej przez octan sodu, we wrzącym tetrahydrofuranie uzyskuje się β -ketoestry i β -ketoamidy z dobrymi i bardzo dobrymi wydajnościami. Mechanizm reakcji został przedstawiony na Schemacie 20^[27]:



Schemat 20: Mechanizm reakcji transestryfikacji ze związkiem **39**

Substrat **39** pod wpływem ogrzewania przekształca się w acyloketen. Anion octanowy łączy się z wygenerowanym acetyloketenem, tworząc enolan mieszanego bezwodnika, który następnie reaguje z alkoholami lub aminami^[27].

Inną metodą otrzymywania β -ketoestrów jest katalizowana kwasami reakcja aldehydu diazoestru **40**, gdzie azot jest generowany jako produkt uboczny (Schemat 21)^[28]:

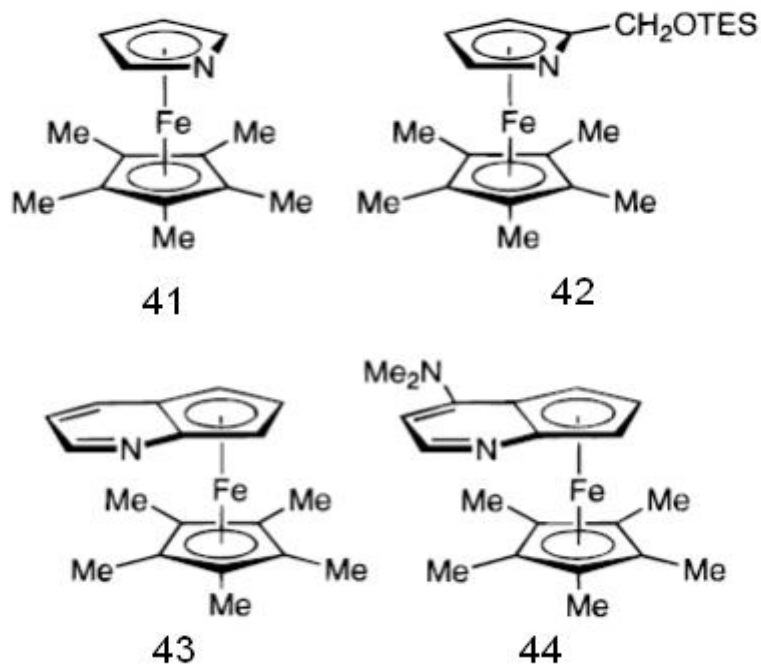


Schemat 21: Otrzymywanie acetylooctanów z diazozwiązków

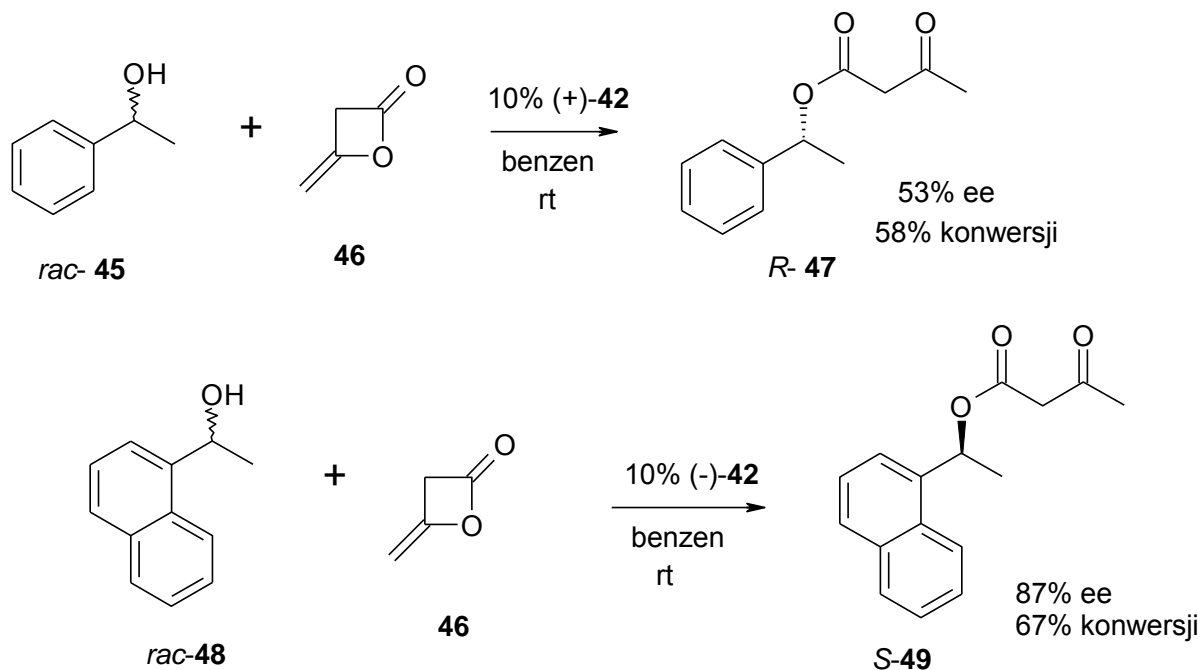
Wszystkie omówione metody syntezy estrów kwasu acetylooctowego pozwalają na otrzymanie produktów z wysoką wydajnością, ale wymagają zastosowania bardzo wysokich temperatur, co znacznie ogranicza ich zastosowanie, np. w przemyśle. Katalizatory stosowane do tych reakcji bardzo często są toksyczne. Ponadto diazoestry, stosowane jako substraty, są substancjami wybuchowymi oraz toksycznymi.

2.5.2. Metody chemiczne otrzymywania nieracemicznych estrów kwasu acetylooctowego

Odkrywanie nowych katalizatorów zarówno chiralnych jak i achiralnych do stereoselektywnego acylowania racemicznych alkoholi jest przez cały czas wyzwaniem w chemii organicznej. W celu otrzymania nieracemicznych estrów kwasu acetylooctowego stosuje się odpowiednie katalizatory. Efektywnymi katalizatorami są pochodne azaferrocenu **41** i **42** jak i analogi DMAPu **43** i **44**, które w reakcji 1-fenyletanolu z ketenem umożliwiły otrzymanie produktów z wysoką enancjoselektywnością. Pochodna azaferrocenu **42** okazała się także efektywnym katalizatorem rozdziału kinetycznego alkoholi drugorzędowych:



Rysunek 9: Chiralne katalizatory reakcji otrzymywania nieracemicznych β -ketoestrów

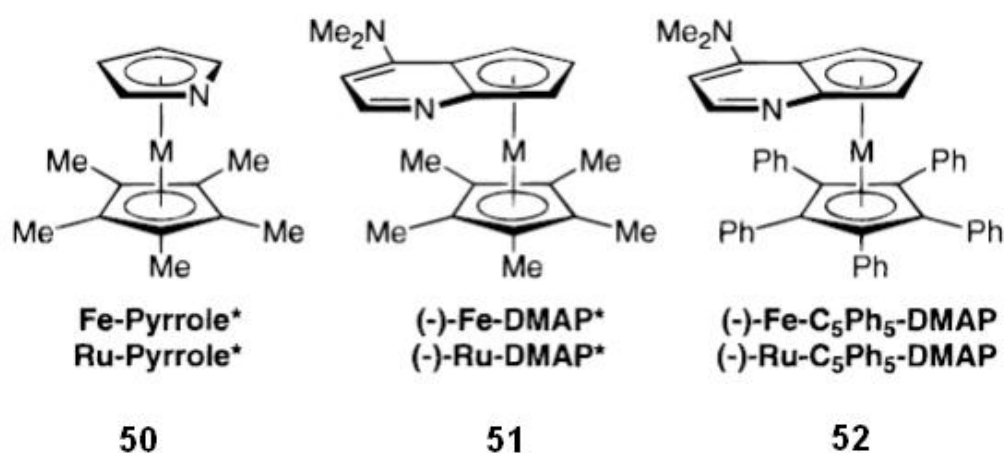


Schemat 22: Enancjoselektywna transestryfikacja diketenu i alkoholi

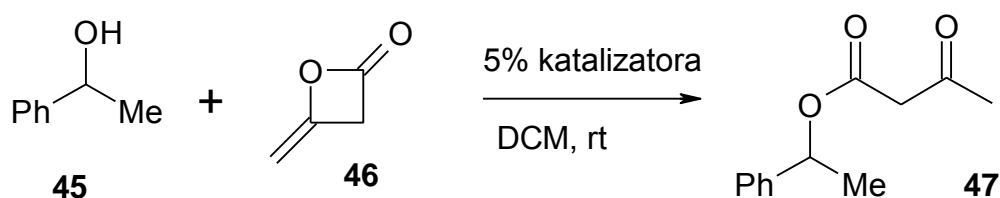
Innym typem katalizatorów są kompleksy rutenu, zawierające N- π -połączone związki heterocykliczne, które są stosowane jako efektywne nukleofilowe katalizatory do szeregu reakcji, między innymi acylowania alkoholi diketenem, otwarcia pierścienia diazolaktonów i addycji alkoholi do ketenów. Efektywność kompleksów rutenu została wykazana w rozdziale kinetycznym alkoholi drugorzędowych^[29] oraz w deracemizacji azalaktanów.

Wykazano także, że kompleksy Ru-Pirol są znacznie bardziej efektywne niż ich analogi żelazowe w katalizie addycji alkoholu benzyłowego do ketenu. W tych samych warunkach ester tworzy się dwukrotnie szybciej niż w obecności kompleksu rutenowego^[29].

Planarny chiralny Fe-C₅Ph₅-DMAP jest najbardziej enancjoselektywnym nieenzymatycznym katalizatorem rozdziału kinetycznego karbinoli poprzez acylowanie.



Rysunek 10: Chiralne katalizatory



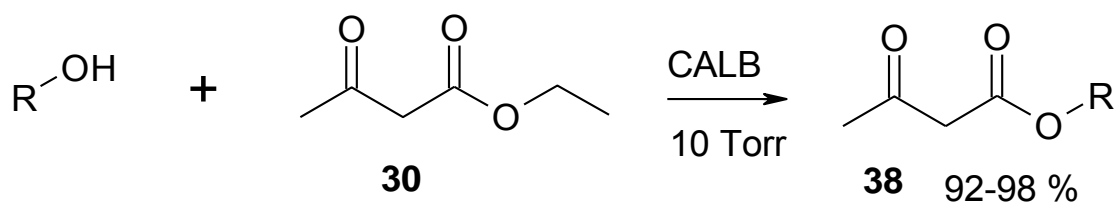
Schemat 23: Synteza nieracemicznych estrów kwasu acetylooctowego.

Podsumowując, główną metodą syntezy nieracemicznych pochodnych kwasu acetylooctowego jest transestryfikacja z zastosowaniem diketenu, katalizowana przez kompleksy metali. Diketeny są związkami nietrwałymi, co znacznie ogranicza zastosowanie tej syntezy.

2.5.3. Synteza β -ketoestrów z zastosowaniem enzymów

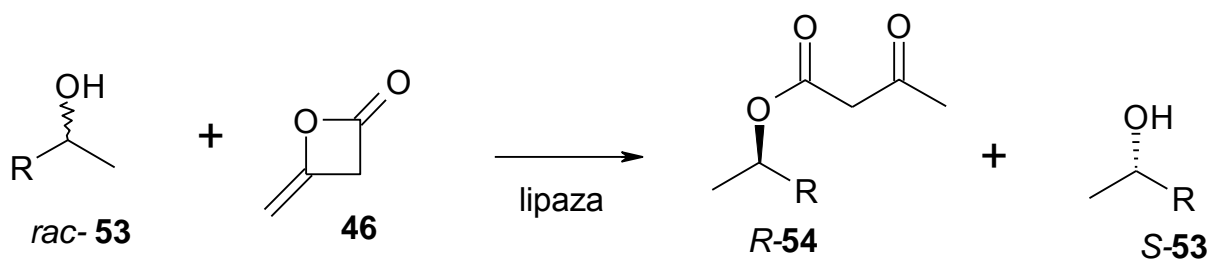
Lipazy są grupą hydrolaz serynowych, które wykazują doskonałą stereoselektywność oraz dobrą zdolność katalityczną w reakcjach transestryfikacji w rozpuszczalnikach organicznych.

Lipazy mogą być wykorzystane jako katalizatory reakcji transestryfikacji estru etylowego kwasu acetylooctowego, ale przeprowadzenie takich reakcji wymaga zastosowania obniżonego ciśnienia (10 Torr)^[30]. W tych warunkach etanol powstający jako produkt uboczny jest natychmiast odparowywany, co przesuwą równowagę reakcji w stronę tworzenia produktu. Zarówno pierwszo- jak i drugorzędowe alkohole, a także alilowe i propagilowe, są dogodnymi substratami dla lipazy do reakcji transestryfikacji.



Schemat 24: Transestryfikacja acetylooctanu katalizowana przez lipazę

Lipazy katalizują syntezę chiralnych β -keto estrów, gdzie donorem grupy acylowej jest diketen^[26].



Schemat 25: Rozdział kinetyczny poprzez transestryfikację diketenu

Lp.	produkt	R=	Kon. (%)	E.e. _s (%)	E.e. _p (%)
1	54a	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	62	73	31
2	54b	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	53	96	55
3	54c	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	47	97	42
4	54d	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	75	95	40
5	54e	-Ph	59	96	54

Tabela 2: Rozdział kinetyczny poprzez transestryfikację diketenu katalizowany lipazą

W obecności lipazy z *Pseudomonas* diketenu może być stosowany jako reagent do enancjoselektywnego acylowania alkoholi drugorzędowych. W rozdziale kinetycznym otrzymano optycznie czynne alkohole oraz estry kwasu acetylooctowego^[30]. Dla czterech alkoholi drugorzędowych **53** różniących się długością łańcucha oraz 1-fenyletanolu otrzymano produkty z nadmiarami enancjomerycznymi od 31 do 55%, przy wysokim nadmiarze enancjomerycznym substratu.

Przeprowadzono badania nad wpływem zastosowanej lipazy oraz alkoholu użytego jako substratu. Wyniki są przedstawione w Tabeli 3:

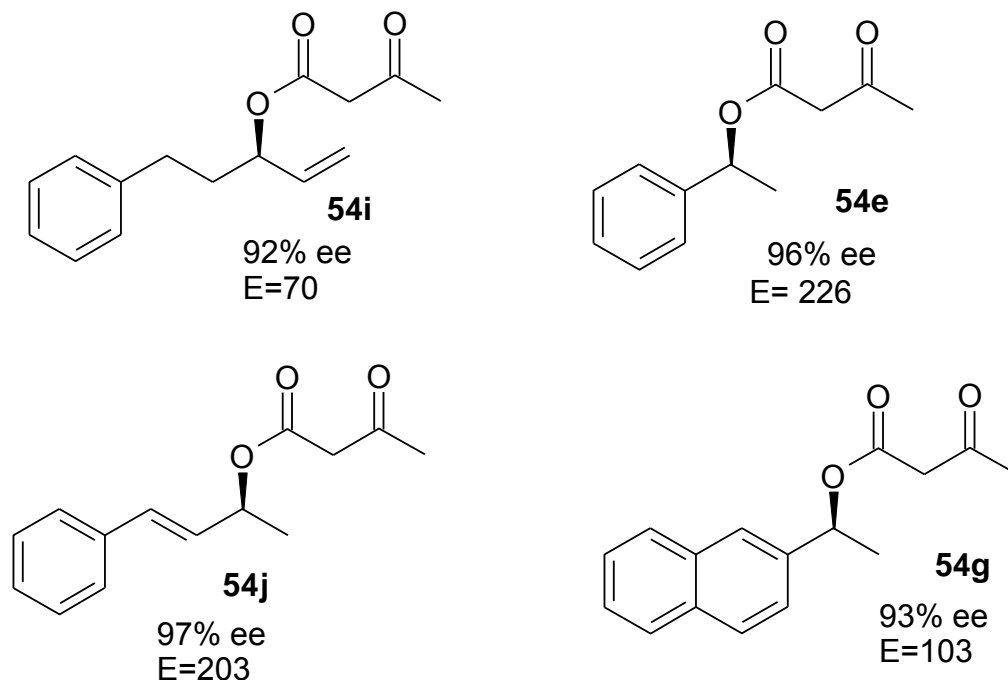
Lp.	Związek	R=	Lipaza	Kon.(%)	E.e. (%)	E
1	54e	-Ph	Amano PS	53	99	80
2			Amano AK	53	99	80
3			CAL	55	97	35
4	54f	-1-naftyl	Amano PS	41	19	2
5			Amano AK	28	13	2
6			CAL	52	94	57
7	54g	-2-naftyl	Amano PS	49	88	66
8			Amano AK	49	88	53
9			CAL	54	97	50
10	54h	-Bz	Amano PS	55	82	13
11			Amano AK	50	93	94
12			CAL	61	19	2
13	54d	-C ₆ H ₁₃	Amano PS	45	38	4
14			Amano AK	55	44	3
15			CAL	61	99	22

Tabela 3: Rozdział kinetyczny poprzez transestryfikację diketenu z zastosowaniem różnych lipaz

Dla 1-fenylotanolu otrzymano produkty z wysoką enancjoselektywnością dla wszystkich 3 lipaz. Zastąpienie grupy fenylovej 1-naftylową w substracie poskutkowało znacznym spadkiem enancjoselektywności, natomiast dla 2-naftolu również uzyskano produkty z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi. Gdy substratem był 3-fenyl-2-propanol, tylko lipaza Amano AK umożliwiła przeprowadzenie reakcji enancjoselektywnej, natomiast dla 2-oktanolu wartości enancjoselektywności były niskie we wszystkich 3 przypadkach.

Novozym 435 został wykorzystany w rozdziale kinetycznym racemicznych alkoholi drugorzędowych, prowadząc do otrzymania enancjomerycznie wzbogaconych betaketoestrów w reakcji transestryfikacji, w której zastosowano jako substrat acetylooctan etylu. Reakcja ta także jest prowadzona pod zmniejszonym

ciśnieniem^[30]. W czterech przypadkach uzyskano produkty, których nadmiary enancjomerycznych przekroczyły 90%.



Rysunek 11: Produkty uzyskane w rozdziale kinetycznym poprzez transestryfikację acetylooctanu etylu, katalizowanego przez Novozym 435 pod zmniejszonym ciśnieniem

Otrzymywanie nieracemicznych estrów kwasu acetylooctowego metodą enzymatyczną poprzez transestryfikację acetylooctanu etylu jest możliwe, jednak wymaga zastosowania próżni, co jest znacznym ograniczeniem tej metody. Alkohole o niskich temperaturach wrzenia nie mogą być stosowane jako substraty w rozdziale kinetycznym.

2.6. Estry *tert*-butylowe kwasów karboksylowych

Estry *tert*-butylowe kwasów karboksylowych są jedną z najbardziej rozpowszechnionych grup zabezpieczających, ze względu na ich odporność na atak nukleofilowy oraz łatwość usunięcia. Estry *tert*-butylowe nie są hydrolizowane w warunkach zasadowych, a w środowisku kwaśnym są hydrolizowane bardzo wolno. Grupa karbonylowa estru nie jest dostępna dla odczynników nukleofilowych.

Zabezpieczanie estrów kwasów karboksylowych poprzez utworzenie estru *tert*-butylowego jest w związku z tym ważną syntetyczną procedurą. Jednak właściwości estrów *tert*-butylowych, które sprawiają, że są one popularną grupą zabezpieczającą, sprawiają, że ich synteza jest trudniejsza niż innych estrów^[31].

2.6.1. Chemiczne metody syntezy estrów *tert*-butylowych

Jedną z najprostszych metod syntezy estrów *tert*-butylowych jest reakcja kwasu karboksylowego i izobutyleny w obecności katalizatora kwasowego. Inną metodą jest bezpośrednia reakcja kwasu karboksylowego z *tert*-butanolem w obecności karbodiimidu^[36] lub 1,1'-karbonylodiimidazolu^[37]. Mniej wydajnymi metodami opisanymi w literaturze są: reakcja chlorku kwasowego z *tert*-butanolem w obecności pirydyny^[32], reakcja chlorku kwasowego z *tert*-butanolem sodu lub halogenkiem *tert*-butylu^[33], reakcja kwasu karboksylowego z bezwodnikiem BOC^[34] oraz utlenienie aldehydu w *tert*-butanolu^[35].

Estry *tert*-butylowe są doskonałą grupą zabezpieczającą grupę karboksylową, dlatego poszukuje się nowych, wydajnych i efektywnych metod otrzymywania tej grupy związków.

2.6.2. Enzymatyczna funkcjonalizacja estrów *tert*-butylowych

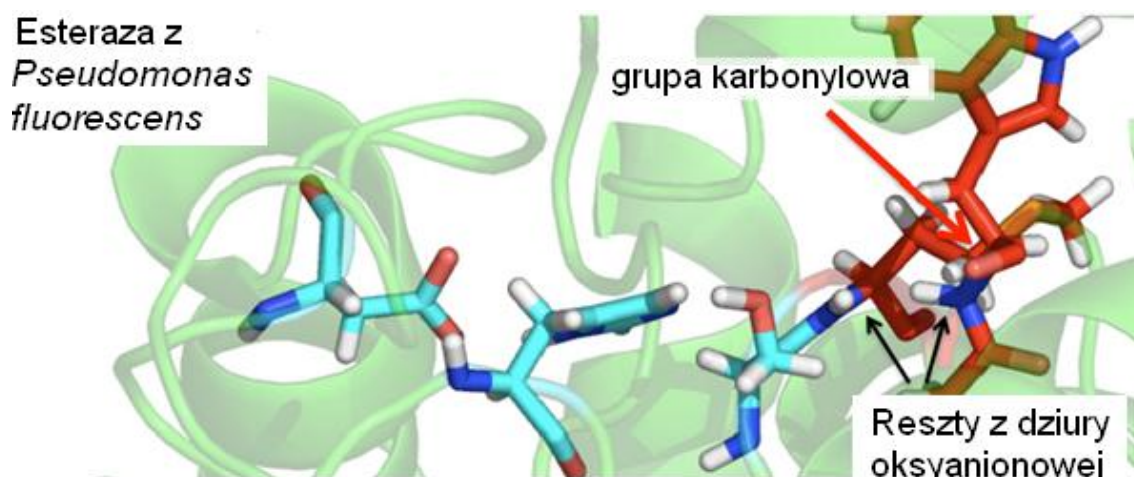
Synteza chiralnych alkoholi 3-rzędowych oraz ich estrów jest wielkim wyzwaniem w chemii organicznej. Optymalna metoda syntezy związków z centrum stereogenicznym na czwartorzędowym atomie węgla nie została znaleziona. Metody chemiczne często wymagają toksycznych reagentów, bardzo niskich lub wysokich temperatur, dlatego poszukiwane są nowe metody syntezy, przyjazne środowisku.

Opracowanie optymalnej metody syntezy optycznie czystych trzeciorzędowych alkoholi jest pożądane, ponieważ zawierają grupę funkcyjną występującą w wielu związkach naturalnych. Przykładami są: linalol, który jest środkiem zapachowym do produkcji perfum, mydeł, detergentów, taxol – organiczny związek chemiczny z

grupy alkaloidów terpenowych typu taksanów o działaniu cytostatycznym i przeciwnowotworowym oraz efavirenz, lek przeciwretrowirusowy, który zwalcza zakażenie HIV poprzez zmniejszenie liczby wirionów we krwi^[38].

Zastosowanie esteraz i lipaz do rozdziału kinetycznego alkoholi trzeciorzędowych jest ograniczone, ponieważ większość dostępnych komercyjnie enzymów nie akceptuje TA jako substratów. W eksperymencie spośród 25 komercyjnie dostępnych lipaz i esteraz tylko lipaza z *Candida rugosa* i lipaza A z *Candida antarctica* wykazały aktywność.

Analiza zależności między strukturą a funkcją centrum aktywnego esterazy odkryła podstawę molekularną tego ograniczenia. Aktywność wobec trzeciorzędowych alkoholi jest związana z budową dziury oksyanionowej – miejsca wiążącego, które stabilizuje tetrahedryczny stan przejściowy w hydrolizie estrów. W większości lipaz i esteraz obecna jest glicyna, obok rozległej hydrofobowej reszty (X). Grupa karbonylowa tak zwanego motywu GX skierowana jest w stronę alkoholu i zapobiega wiązaniu alkoholu z trzema podstawnikami (Rys.11).



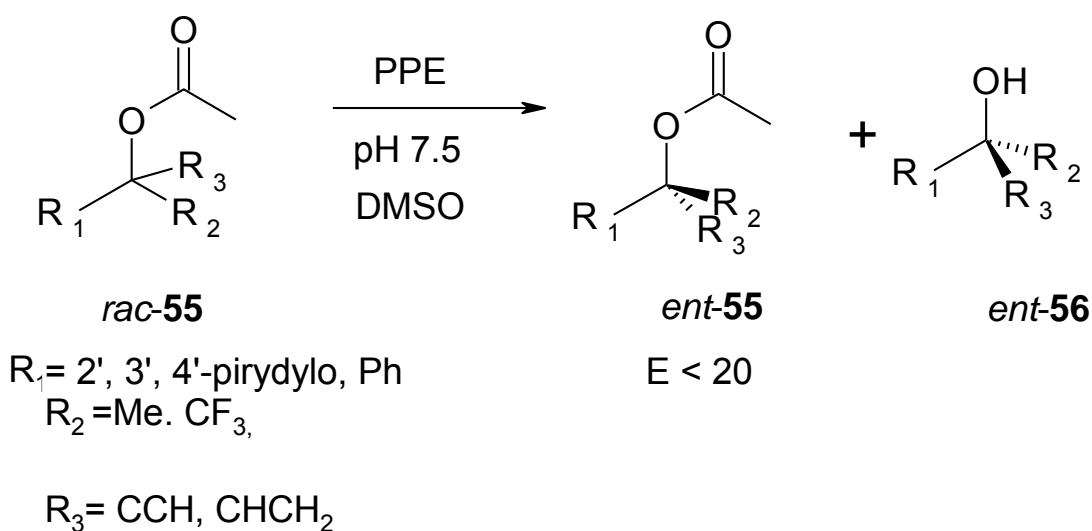
Rysunek 12: Budowa przestrzenna esterazy z *Pseudomonas fluorescens*

Niektóre podklasy hydrolaz mają szersze centrum aktywne z motywem zawierającym trzy glicyny lub dwie glicyny i alaninę, wraz z rozległą resztą aminokwasową (X). Enzymy należące do grupy zwanej GGG(A)X charakteryzują się podobieństwem do esterazy acetylocholino. Zostało udowodnione, że lipazy i

esterazy należące do tej grupy są stosowane do hydrolizy estrów alkoholi trzeciorzędowych

z dobrymi wydajnościami. W obrębie tej grupy enzymów przestrzeń w dziurze oksyanionowej jest powiększona, co pozwala bardziej wymagającym sterycznie substratom (np. z czwartorzędowym atomem węgla) na wejście do centrum aktywnego. Przykładami takich enzymów są: PLE (esteraza z wątroby świńskiej), esteraza acetylocholinylowa z węży *Bungarus fasciatus*, grzybów, bakterii Gram+ i Gram-.

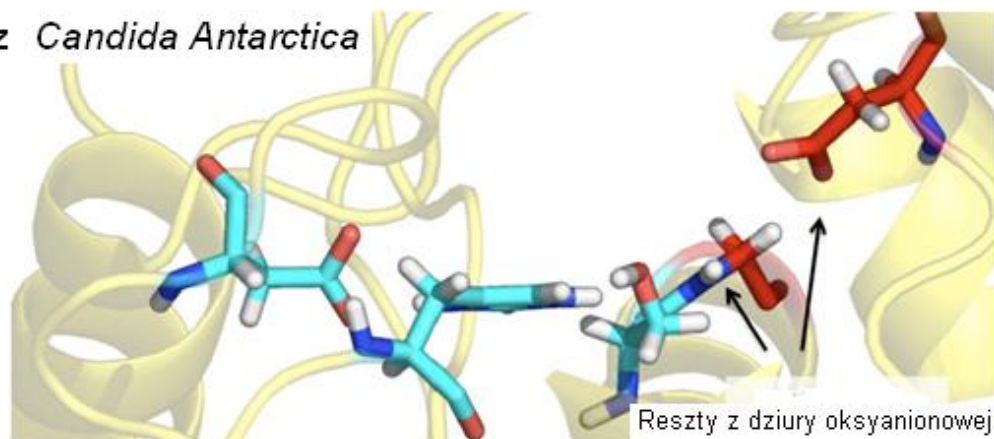
Zaobserwowanie, że ten motyw determinuje aktywność wobec trzeciorzędowych alkoholi, pozwoliło na odkrycie wielu enzymów.



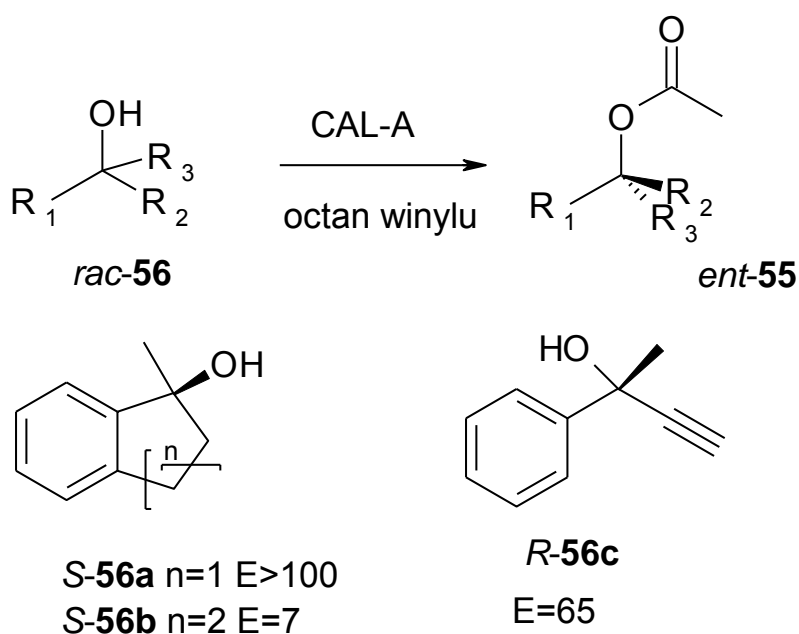
Schemat 26: Rozdział kinetyczny alkoholi trzeciorzędowych katalizowany przez esterazę z *P. Putida*

Lipaza A z *C. antarctica* (CAL-A) jest enzymem nienależącym do klasy GX ani GGG(A)X, ale wykazuje bardzo dużą aktywność i enancjoselektywność wobec alkoholi trzeciorzędowych. Jest to związane z faktem, że kwas asparaginowy stabilizuje dziurę oksyanionową (Rys. 13). Lipaza ta jest stosowana do syntezy, między innymi oleinianu *tert*-butylowego. Katalizuje syntezę chiralnych alkoholi trzeciorzędowych poprzez transestryfikację (Schemat 27).

Lipaza z *Candida Antarctica*

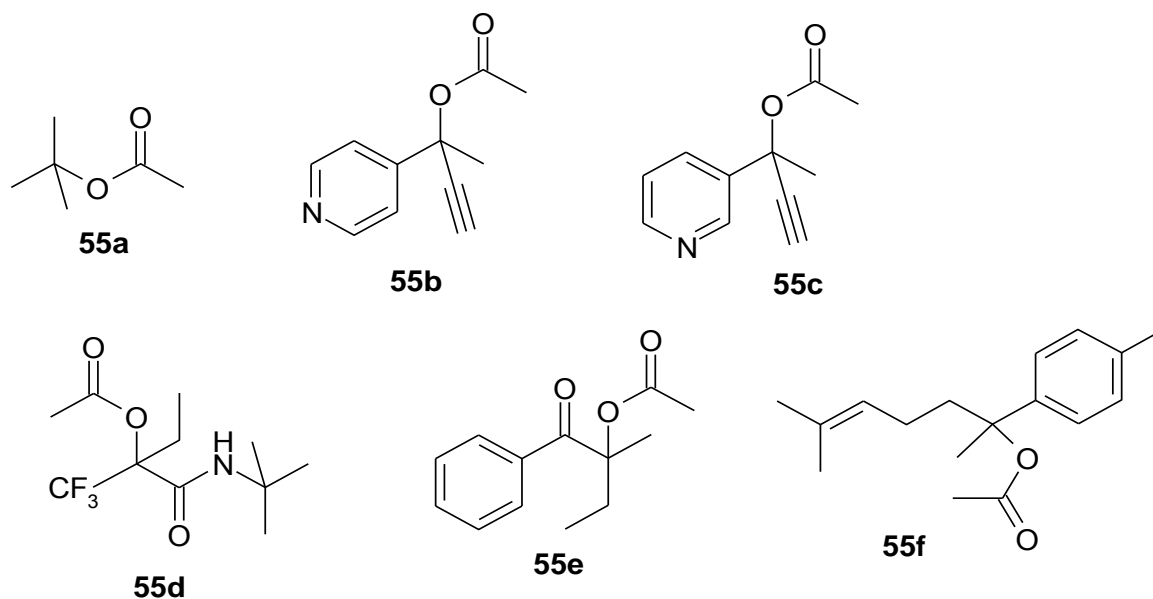


Rysunek 13: Budowa przestrzenna lipazy z *Candida antarctica*

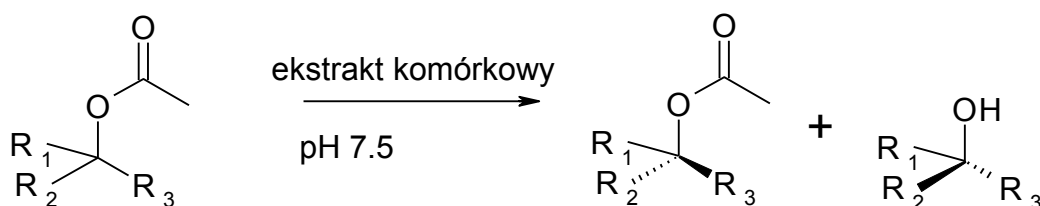


Schemat 27: Katalizowana przez lipazy transestryfikacja alkoholi trzeciorzędowych

Mikroorganizmy są obiecującym źródłem enzymów aktywnych i enancjoselektywnych wobec alkoholi trzeciorzędowych. Wyizolowano szereg szczepów bakteryjnych, z czego 14 używało octanu *tert*-butylu jako jedyne źródła węgla, 5 z nich było Gram-ujemnych, a większość bakteryjnych esteraz wykazujących aktywność była Gram-dodatnich. Kilka ze szczepów pozwoliło na uzyskanie produktów z wysoką enancjoselektywnością (E powyżej 70), (Rysunek 14).



Rysunek 14: Estry *tert*-butylowe poddane enzymatycznej hydrolizie

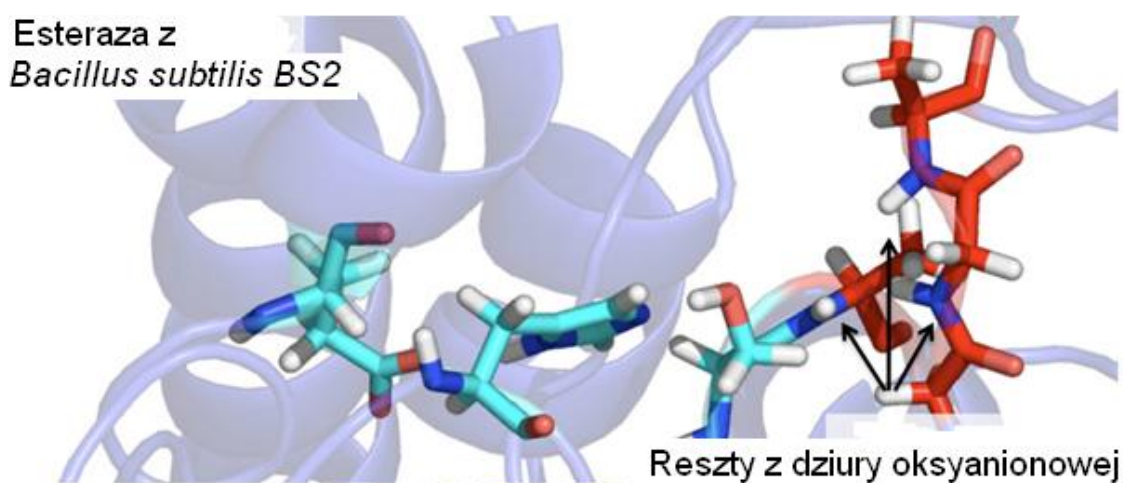


Schemat 28: Enzymatyczna hydroliza estrów *tert*-butylowych

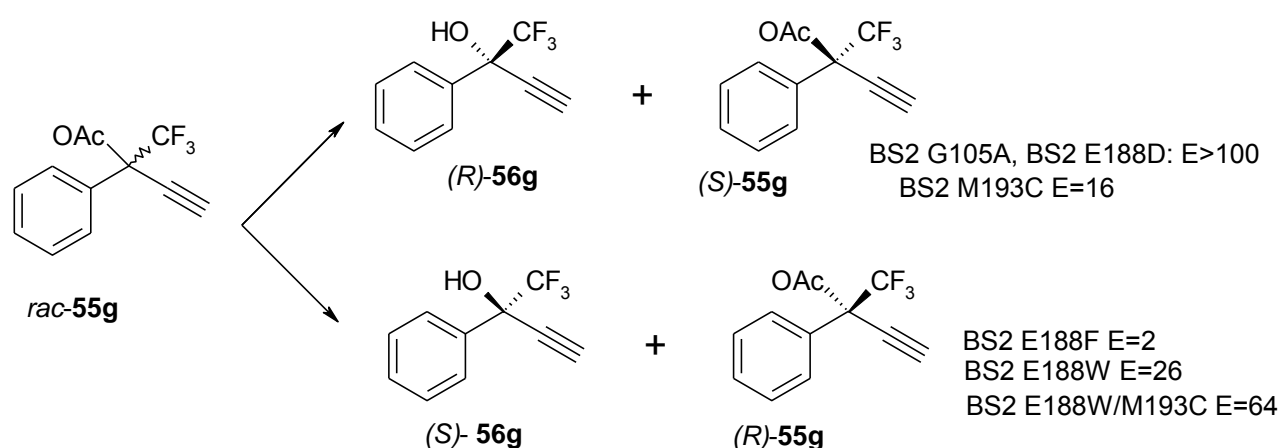
Inżynieria białkowa jest narzędziem do uzyskiwania ulepszonych biokatalizatorów, które mogłyby katalizować syntezę optycznie czynnych alkoholi trzeciorzędowych. Enzymy uzyskane w ten sposób wykazują się wysoką specyficnością. Podejście mające na celu uzyskanie esteraz z aktywnością wobec trzeciorzędowych alkoholi z *Bacillus stearotherophilus* i *Pseudomonas fluorescens* poprzez technikę PCR zawiodło. Stwierdzono, że konfiguracja dziury oksyanionowej w tych GX hydrolazach hamuje aktywność wobec trzeciorzędowych alkoholi i nie można tego zmienić poprzez losowe wstawianie aminokwasów. W przypadku esterazy z *Paenibacillus barcinonensis* pomimo strukturalnego podobieństwa do GGG(A)X enzymów, aktywność wobec alkoholi trzeciorzędowych była niska. Po analizie centrum aktywnego okazało się, że enzym należy do klasy GGG(A)X, ale ma serynę na trzeciej pozycji. Mutacja do motywu GGG-X zwiększyła aktywność *P. Barcinonensis*

oraz PLE. Okazało się, że wymiana na alaninę w 1 i 3 pozycji (AGGX, AGAX, GGAX) jest tolerowana. Druga glicyna wydaje się być kluczowa dla utrzymywania aktywności wobec alkoholi trzeciorzędowych.

W przypadku esterazy BS2 z *Bacillus subtilis* pierwsza glicyna jest kluczowa dla enancjoselektywności. Po zamianie na alaninę E wzrosło (od 42 do ponad 100). Kwas glutaminowy w N-terminalnej pozycji BS2 został zidentyfikowany jako kolejny kluczowy dla enancjoselektywności aminokwas. Zastąpienie go asparaginą również poprawiło enancjoselektywność (Schemat 29).

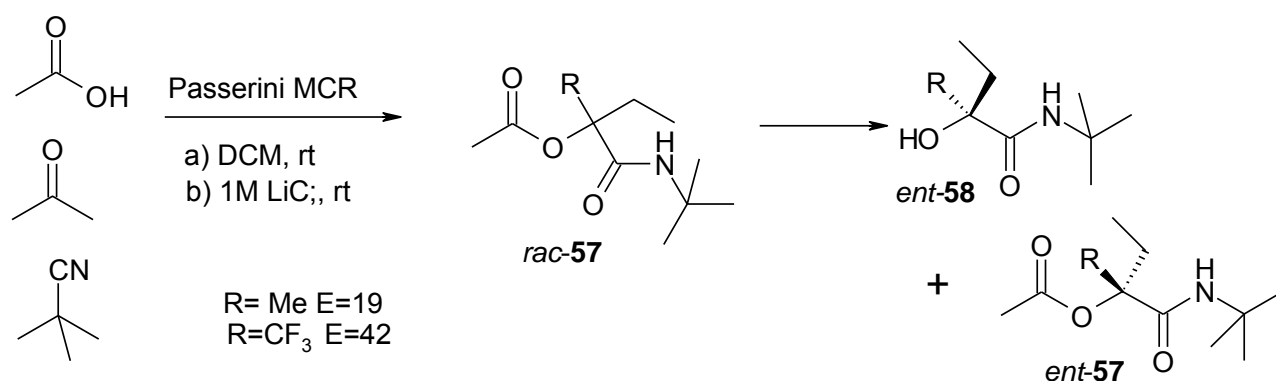


Rysunek 15: Budowa przestrzenna esterazy z *Bacillus subtilis* BS2



Schemat 29: Całkowita inwersja enancjoselektywności esterazy BS2 z *B. subtilis* poprzez mutagenезę

Przykładami zastosowania enzymów do otrzymywania chiralnych alkoholi trzeciorzędowych jest rozdział kinetyczny produktów reakcji Passerinięgo. Trzeciorzędowe hydroksykarboksylamidy okazały się być trudnymi substratami, jako że z 40 testowanych enzymów tylko 3 wykazały aktywność. Najlepszy enzym, należąca do grupy GGG(A)X esteraza Est8, pozwoliła na otrzymanie produktu z enancjoselektywnością 42.



Schemat 30: Chemoenzymatyczna synteza hydroksykarboksylamidów w multikomponentowej reakcji Passerinięgo i rozdziale kinetycznym katalizowanym przez esterazę

2.6.3. Podsumowanie rozdziału

W ciągu ostatnich lat dokonano wielkiego postępu w identyfikacji enzymów katalizujących enancjoselektywną syntezę estrów alkoholi trzeciorzędowych. Przede wszystkim znalezienie motywu GGG(A)X ułatwiło odkrycie nowych hydrolaz akceptujących te wymagające sterycznie substraty. Ponadto inżynieria białkowa znacznie pomogła w zrozumieniu i ulepszeniu enzymów, aby były bardziej użyteczne syntetycznie. Jednak zakres substratów i aktywność specyficzna większości biokatalizatorów akceptujących alkohole trzeciorzędowe są nadal zbyt ograniczone, aby pozwolić na szerokie zastosowanie w syntezie organicznej. Konieczne są dalsze badania, które pozwoliłyby opracować efektywne rozdziały kinetyczne estrów alkoholi trzeciorzędowych, równie przystępne jak alkoholi pierwszo- i drugorzędowych.

2.7. Podsumowanie części literaturowej

W części literaturowej przedstawiono wybrane przykłady zastosowania enzymów w syntezie organicznej. Wiele syntez z wykorzystaniem enzymów przebiega stereoselektywnie oraz umożliwia otrzymanie optycznie czystych związków. Zaprezentowano wykorzystanie enzymów do rozdziału kinetycznego racemicznych alkoholi, estrów i kwasów z wykorzystaniem hydrolaz. Przedstawiono szereg metod uzyskania optycznie czystych estrów i ich pochodnych na drodze hydrolizy estrów, estryfikacji kwasów karboksylowych oraz transestryfikacji estrów. Zaprezentowano przykłady otrzymywania enancjomerycznie czystych laktonów i laktamów, poprzez katalizowane enzymami cyklizacje, zachodzące zgodnie z opisanymi regułami Baldwina.

Estry kwasu acetylooctowego, szczególnie nieracemiczne, mają szerokie zastosowanie w przemyśle oraz są ważnymi substratami do syntezy wielu związków o aktywności biologicznej. W pracy przedstawiono znane literaturowo metody chemiczne otrzymywania tej klasy związków, które opierają się na transestryfikacji acetylooctanu etylu i 2,2,6-trimetylo-4*H*-1,3-dioksyno-4-onu z zastosowaniem różnych katalizatorów w wysokich temperaturach oraz kondensacji aldehydów i związków diazowych. Enzymatyczne metody syntezy tych związków polegają na reakcji diketenu z alkoholami oraz transestryfikacji acetylooctanu alkoholami w obecności Novozymu 435 pod zmniejszonym ciśnieniem.

W pracy opisano również zastosowanie i chemiczne metody syntezy estrów *tert*-butylowych. Szczególną uwagę poświęcono znanym w literaturze reakcjom enzymatycznym estrów *tert*-butylowych. Generalnie estry te nie są substratami dla enzymów i nie są przez nie hydrolizowane ani nie ulegają innym transformacjom. Tylko niektóre enzymy, o ściśle określonej budowie, zawierające motyw GGG(A)X, są w stanie hydrolizować tego typu estry. W pracy przedstawiono przykłady zastosowania tych enzymów do enancjoselektywnej hydrolizy racemicznych estrów *tert*-butylowych.

3. Badania własne

3.1. Cel badań

Celem przedstawionej pracy było opracowanie nowych metod syntezy estrów, wykorzystujących przede wszystkim reakcje enzymatycznej transestryfikacji. Ponieważ powszechnie stosowanymi reagentami w takich reakcjach są estry winylowe lub estry propargilowe, istotne było podjęcie badań nad znalezieniem nowych substratów do tych reakcji. Szczególne znaczenie mają estry kwasu acetylooctowego, dlatego wydawało się kluczowe sprawdzenie, czy enzymy można wykorzystać do syntezy tej klasy związków. Dotychczas opracowano enzymatyczną metodę syntezy β -ketoestrów, polegającą na transestryfikacji acetylooctanu etylu z zastosowaniem zmniejszonego ciśnienia, która ma wiele ograniczeń.

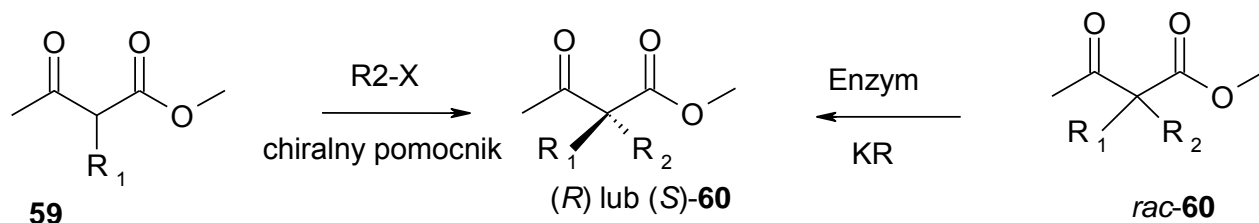
Wspomniane β -ketoestry nie są jedynymi przedstawicielami ketoestrów. Dlatego kolejną kwestią, która wydawała się istotna i warta zainteresowania, było sprawdzenie, czy estry posiadające grupę karbonylową w innej pozycji niż β mogą być także dogodnymi reagentami do reakcji transestryfikacji.

Ponadto istotne było porównanie nowo opracowanych metod do metod znanych, takich jak enzymatyczna hydroliza bądź estryfikacja. Szczególne znaczenie ma opracowanie nowych metod syntezy estrów enancjomerycznie czystych, które są cennymi półproduktami w syntezie organicznej.

3.2. Badania nad rozdziałem kinetycznym estru metylowego kwasu 2-benzyl-2-metylo-3-oksomasłowego katalizowanym enzymami

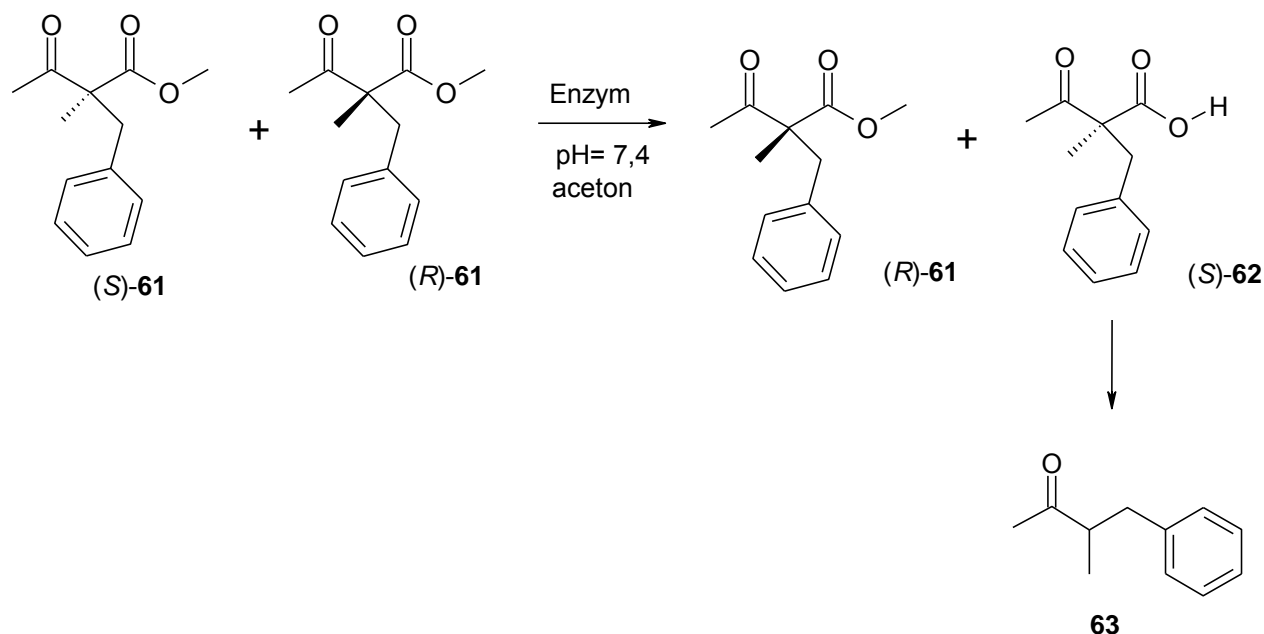
Synteza związków organicznych z czwartorzędowym centrum stereogenicznym jest wielkim wyzwaniem w chemii organicznej. Centrum stereogeniczne na czwartorzędowym atomie węgla jest często kluczowe dla aktywności biologicznej związków naturalnych i leków^[39]. Wśród tych związków dipodstawione β -ketoestry są ważną grupą organicznych bloków budulcowych^[40]. Mają zastosowanie w syntezie naturalnie występujących związków bioaktywnych, jak na przykład α,α -di podstawione aminokwasy, pochodne cycloheks-2-en-1-onu i inne^[41].

Najbardziej popularną metodą otrzymywania tego typu związków jest asymetryczne alkirowanie α -podstawionego estru kwasu acetylooctowego z zastosowaniem chiralnych katalizatorów. Metoda ta ma pewne ograniczenia, zawada steryczna pomiędzy podstawnikami na czwartorzędowym atomie węgla często uniemożliwia bowiem powstawanie produktu. Enzymatyczny rozdział kinetyczny wydaje się być alternatywą dla tej reakcji.



Schemat 31: Otrzymywanie nieracemicznych pochodnych kwasu 2-benzyl-2-metylo-3-oksomasłowego

Celem badań było zbadanie wpływu enzymów na konwersję i enancjoselektywność enzymatycznej hydrolizy racemicznego estru metylowego kwasu 2-benzyl-2-metylo-3-oksobutanowego, który został użyty jako związek modelowy.



Schemat 32: Rozdział kinetyczny estru metylowego kwasu 2-benzylo-2-metylo-3-oksobutanowego przez hydrolizę. Kwas 2-benzylo-2-metylo-3-oksobutanowy ulega dekarboksylacji, tworząc 3-metylo-4-fenylbut-2-on

Reakcja hydrolizy enzymatycznej estru metylowego kwasu 2-benzylo-2-metylo-3-oksobutanowego była prowadzona w temperaturze pokojowej, w mieszaninie acetonu i buforu fosforowego, użytej jako rozpuszczalnik. Po przeprowadzeniu *screeningu* enzymatycznego okazało się, że tylko niektóre z nich katalizują tę reakcję. Nowozym (a), Lipaza z *Candida antarctica* (b), Lipaza z *Rhizopus niveus* (c), Lipaza z kielków pszenicy (d), PLE (e), Cellulaza z *Aspergillus niger* (f), Acylaza z *Aspergillus melleus* (g), Lipaza z *Candida cylindracea* (h), Pektynazą z *Aspergillus niger* (i), Papaina (j), Lipaza z *Candida lipolytica* (k), Lipaza z *Rhizopus arrhizus* (l), Lipaza z *Pseudomonas fluorescens* (m), GLAP (n), Lipaza z *Porcine Pancreas* (o).

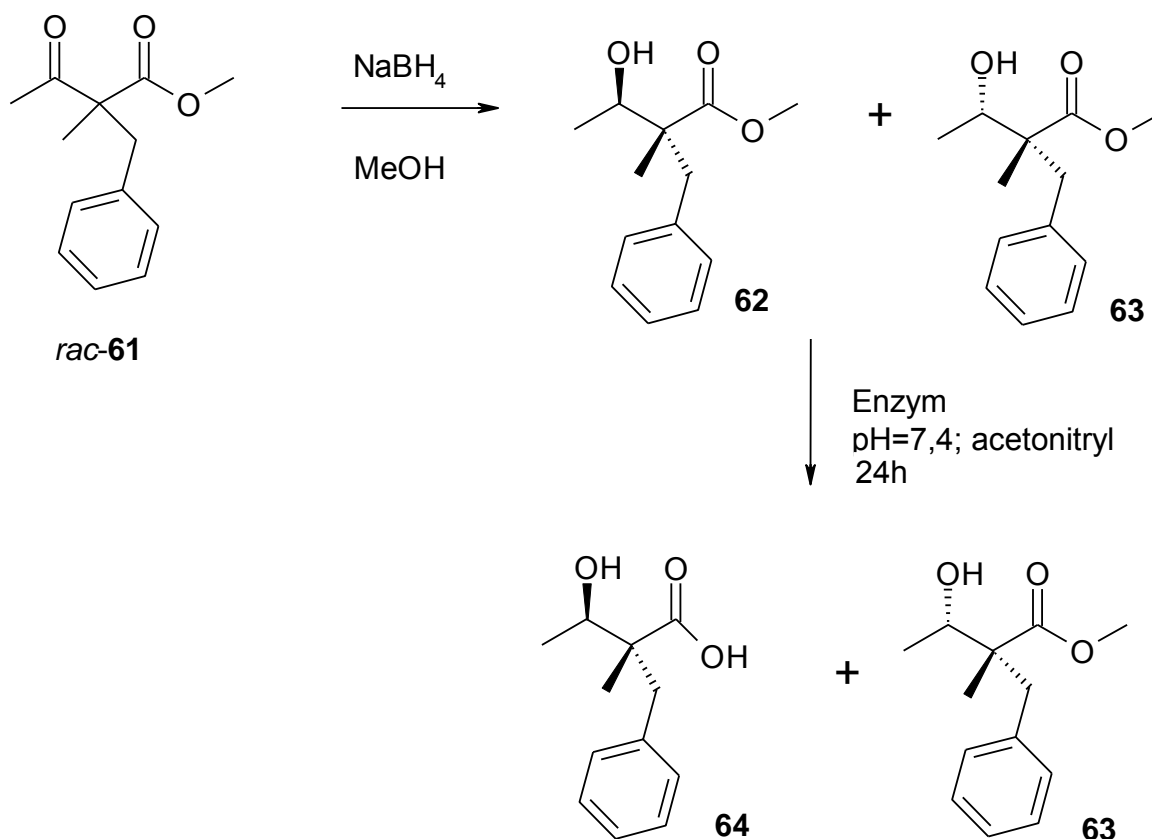
Tabela 4 pokazuje uzyskane wyniki konwersji i enancjoselektywności reakcji hydrolizy katalizowanej enzymami.

Lp.	Enzym	Kon. (%)	E.e. (%)	E
1	A	40	43	3,2
2	B	51	4.1	0.9
3	C	25	3.9	1
4	D	38	15	1,8
5	E	57	20	1.6
6	F	52	3.2	1.1
7	G	79	11	1.7
8	H	47	4.4	1
9	I	86	3.7	1.7
10	J	51	26	2,3
11	K	58	2.1	1,1
12	L	41	32	2,4
13	M	95	1.2	1.8
14	-	0	0	Nd

Tabela 4: Wpływ enzymu na konwersję i enancjoselektywność reakcji hydrolizy

Wszystkie eksperymenty zostały przeprowadzone w tych samych warunkach (24 godziny), więc możliwe było porównanie efektu kinetycznego każdego enzymu. W większości przypadków uzyskano konwersję około 50%, tylko w trzech przypadkach była ona wyższa (Tabela 7 lp. 7,9 i 13), a w jednym przypadku znacznie niższa, zaledwie 25% (Tabela 7, lp. 3). Wartości nadmiarów enancjomerycznych nie są wysokie, produkt z najwyższym nadmiarem (43%) uzyskano dla Novozyumu 435 (Tabela 5, lp. 1).

Jak wykazano wcześniej, zastosowanie mieszaniny dwóch lub więcej enzymów zamiast jednego pozwala zwiększyć szybkość reakcji. Postanowiłam zastosować kilka mieszanin enzymów do reakcji hydrolizy. We wszystkich przypadkach mieszanina enzymów przyspieszała hydrolizę, ale reakcje nie były enancjoselektywne, we wszystkich przypadkach uzyskałam mieszaniny racemiczne. Wyniki wskazują na to, że grupa karbonylowa obecna w substracie może być odpowiedzialna za brak enancjoselektywności. W celu potwierdzenia tego przypuszczenia zdecydowałam się użyć substratu z grupą hydroksylową zamiast karbonylowej.



Schemat 33. Redukcja grupy karbonylowej NaBH_4 i enzymatyczna hydroliza mieszaniny diastereoizomerycznych alkoholi

W wyniku redukcji estru metyloвого kwasu 2-benzylo-2-metylo-3-oksobutanowego z NaBH_4 uzyskałam mieszaninę diastereoizomerycznych alkoholi **62** i **63** (Schemat 33), która została użyta jako substrat do enzymatycznej

hydrolizy. Eksperyment został przeprowadzony w standardowych warunkach. Wyniki zostały przedstawione w Tabeli 5:

Lp.	enzym	Kon. (%)	E.e. (%)	E
1	A	48	31	2.5
2	N	56	18	1.7
3	E	49	4.2	1.1
4	H	23	11	2.0
5	F	18	3.5	0.9
6	O	58	3.2	1.3

Tabela 5: Wpływ enzymu na konwersję i diastereoselektywność hydrolizy

Konwersja była również około 50% w większości przypadków, dla dwóch enzymów była dużo niższa (Tabela 5, lp. 4 i 5). Wartości nadmiarów diastereoizomerycznych są również niewysokie, najwyższą wartość uzyskano, stosując Novozym 435 (Tabela 5, lp. 1). Wynika z tego, że kinetyka reakcji jest podobna dla substratu z grupą karbonylową i hydroksylową.

3.2.1. Podsumowanie rozdziału

Po przestudiowaniu wpływu enzymu na rozdział kinetyczny przez hydrolizę estru metyloвого kwasu 2-benzylo-2-metylo-3-oksobutanowego okazało się, że reakcja jest efektywnie katalizowana przez enzymy, ale nie jest enancjoselektywna. Wartości nadmiarów enancjomerycznych są niskie dla większości enzymów. Po redukcji grupy karbonylowej efekt jest podobny, hydroliza jest efektywna, ale enancjoselektywność niska.

Wykazano, że enzymy przyspieszają hydrolizę, jednak reakcja nie jest ani enancjoselektywna, ani diastereoselektywna. Powodem tego może być fakt, że otrzymywanie związków z centrum stereogenicznym na czwartorzędowym atomie

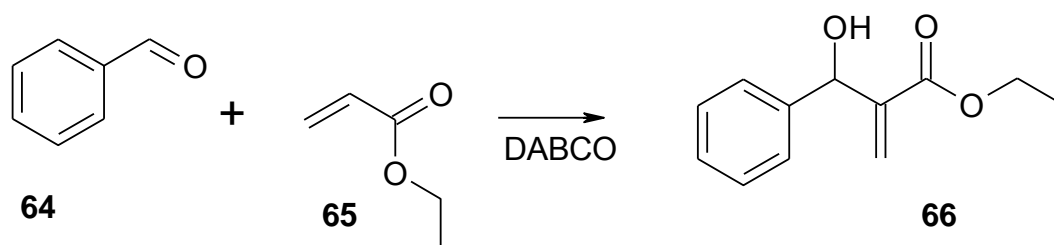
węgla jest bardzo trudne, a obecność grupy karbonylowej i hydroksylowej w pobliżu tego centrum praktycznie to uniemożliwia.

3.3. Badania nad enzymatycznym rozdziałem kinetycznym adduktów reakcji Baylisa-Hilmana

α -Metyleno- β -hydroksy, estry i ketony są bardzo użytecznymi substratami w syntezie wielu związków, a także są szeroko stosowane między innymi w przemyśle farmaceutycznym, rolnictwie i produkcji barwników^[42]. Związki te w prosty sposób otrzymywane są w formie racemicznej poprzez addycję związków α,β -nienasyconych do aldehydów^[43]. Przeprowadzono wiele eksperymentów, mających na celu otrzymanie tych adduktów w formie enancjomerycznie czystej lub wzbogaconej, przede wszystkim syntezę z zastosowaniem chiralnych katalizatorów^{[44], [45]} i rozdział kinetyczny^[46].

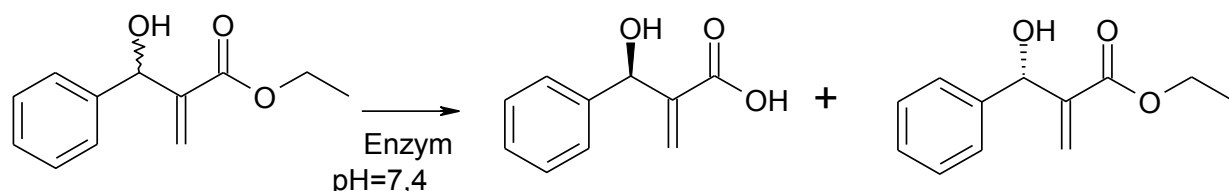
Celem tego etapu pracy było wykonanie badań nad enzymatycznym rozdziałem kinetycznym estru etylowego kwasu 2-metyleno-3-hydroksy-3-fenylopropionowego poprzez reakcję hydrolizy enzymatycznej oraz kwasu 2-metyleno-3-hydroksy-3-fenylopropionowego poprzez enzymatyczną estryfikację. Zbadano wpływ enzymu oraz donora grupy alkoksylowej na konwersję i enancjoselektywność.

Przeprowadziłam syntezę estru etylowego kwasu 2-metyleno-3-hydroksy-3-fenylopropionowego z benzaldehydu i akrylanu etylu, używając DABCO jako katalizatora.



Schemat 34: Synteza estru etylowego kwasu 2-metyleno-3-hydroksy-3-fenylopropionowego (Reakcja Baylisa-Hilmana)

Otrzymany addukt został poddany hydrolizie enzymatycznej. Środowiskiem reakcji była mieszanina acetonu i buforu fosforanowego o pH 7,4. Wyniki hydrolizy enzymatycznej są przedstawione w Tabeli 6.



Schemat 35: Enzymatyczna hydroliza estru etylowego kwasu 2-metyleno-3-hydroksy-3-fenylopropionowego

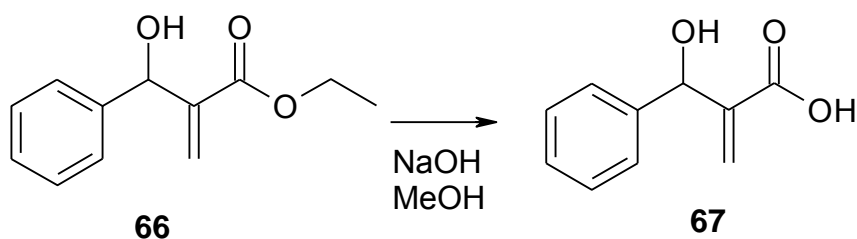
Lp.	Enzym	Kon. (%)	e.e. (%)	E
1	Novozym 435	41	10	1.3
2	Lipaza z <i>Rhizopus niveus</i>	51	3	1.1
3	Papaina	47	3	1.1
4	Amano lipaza AK	35	<i>rac</i>	nd
5	Lipaza z kielków pszenicy	47	5	1.2
6	PLE	41	<i>rac</i>	nd
7	Ślepa próba	0	nd	nd

Tabela 6: Wpływ enzymu na konwersję i enancjoselektywność

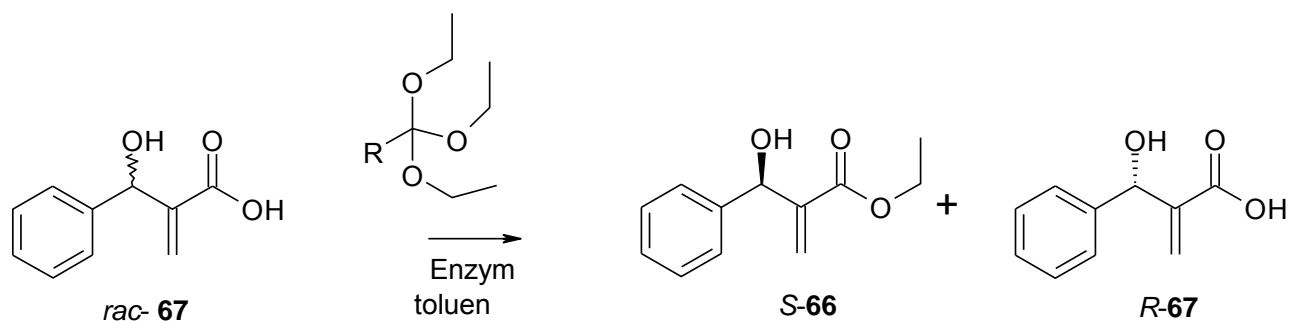
Dla próby bez enzymu nie uzyskano produktu, natomiast w obecności enzymów ester jest hydrolizowany. Enzymy przyspieszają reakcję hydrolizy, ale nie jest ona

enantjoselektywna. Dla wszystkich enzymów przy podobnych konwersjach otrzymano produkty racemiczne.

W następnej kolejności postanowiono przeprowadzić rozdział kinetyczny przez estryfikację. Racemiczny ester etylowy estru etylowego kwasu 2-metyleno-3-hydroksy-3-fenylopropionowego poddałam hydrolizie chemicznej, otrzymując kwas 2-metyleno-3-hydroksy-3-fenylopropionowy.



Schemat 36: Hydroliza chemiczna estru etylowego kwasu 2-metyleno-3-hydroksy-3-fenylopropionowego



Schemat 37: Enzymatyczna estryfikacja kwasu 2-metyleno-3-hydroksy-3-fenylopropionowego

Enzymatyczną estryfikację prowadzono w toluenie w temperaturze 50°C. Jako donorów grupy etoksyłowej użyto ortoocetanu trietylu i ortobenzoesanu trietylu. Wyniki są przedstawione w Tabeli 7.

Lp.	Enzym	R=	Kon. (%)	E.e. (%)	E
1	Novozym 435	-Ph	49	99	752
2	Amano Lipaza PS	-Ph	48	70	11
3	Lipaza z <i>Rhizopus niveus</i>	-Ph	50	63	8
4	Lipaza z <i>Pseudomonas cepacia</i>	-Me	31	17	1.5
5	Lipaza z kiełków pszenicy	-Me	42	23	1.9
6	GLAP	-Me	40	52	4
7	Amanolipaza z <i>Pseudomonas fluorescens</i>	-Me	21	32	2.1
8	Novozym 435	-Me	29	55	4
9	Amanolipaza PS	-Me	70	3	1.1
10	Papaina	-Me	15	80	10
11	PLE	-Me	25	20	1.6
12	-	-Ph	0	nd	nd
13	-	-Me	0	nd	nd

Tabela 7: Enzymatyczna estryfikacja kwasu 2-metyleno-3-hydroksy-3-fenylopropionowego

Dla reakcji bez enzymu (Tabela 7, lp. 12 i 13) nie uzyskano produktów, co oznacza, że reakcja jest katalizowana przez enzymy. Stosując ortoocetan trietylu jako donor, otrzymano produkty z dość niską enancjoselektywnością. Najwyższą wartość enancjoselektywności uzyskano dla Papainy (Tabela 7, lp. 10). Stosując

ortobenzoesan trietylu, uzyskano produkty z wyższą enancjoselektywnością. Dla kombinacji Novozym 435 i ortobenzoesan trietylu uzyskano produkt z bardzo wysoką enancjoselektywnością (Tabela 7, lp. 1).

3.3.1. Podsumowanie rozdziału

Reakcja hydrolizy estru etylowego kwasu 2-metyleno-3-hydroksy-3-fenylopropionowego jest przyspieszana przez enzymy, jednak nie jest enancjoselektywna. Reakcja estryfikacji kwasu 2-metyleno-3-hydroksy-3-fenylopropionowego wydaje się być dogodniejszą metodą otrzymywania enancjomerycznie wzbogaconych adduktów reakcji Baylisa-Hillmana – otrzymano produkty z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi. Ortobenzoesan trietylu również okazał się być lepszym donorem grupy etoksyłowej niż ortoocetan trietylu, jako że otrzymano produkty z wyższymi nadmiarami enancjomerycznymi. Dla Novozymu uzyskano produkt z bardzo wysoką enancjoselektywnością.

3.4. Badania nad rozdziałem kinetycznym kwasu *trans*-2-fenylo-cyklopropano-1 karboksylowego i jego pochodnych

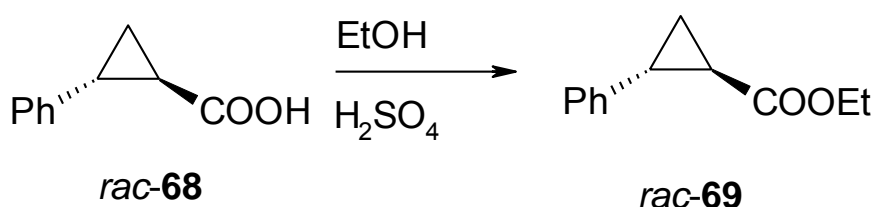
Enancjomerycznie czyste pochodne kwasu *trans*-2-fenylo-cyklopropano-1-karboksylowego są ważną grupą związków chemicznych, które pełnią istotną rolę w chemii organicznej i mają szerokie spektrum właściwości biologicznych^[47] takich jak: inhibicja enzymu, działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwrakowe i przeciw wirusowe^[48].

Mają szeroką gamę zastosowań w syntezie leków i biologicznie czynnych cząsteczek oraz stosowane jako substraty w syntezie β -aminokwasów^[49]. Interesujące właściwości strukturalne i znaczące działanie farmakologiczne są również kluczowe dla wielu naturalnych produktów, jak β -laktamy i inne farmaceutyki^[49]. Kwas *trans* 2-fenylo-cyklopropano-1-karboksylowy jest stosowany w syntezie kwasu (9-*R*,10-*S*)-dihydrosterkulinowego, znanego kwasu tłuszczowego mikroorganizmów i subtropikalnych roślin^[50]. Inne ważne substancje otrzymywane

z chiralnych pochodnych tego związku to tranilcypromina, środek stosowany w leczeniu depresji^[51]. Chiralne pochodne są ponadto związkami budulcowymi do syntezy związków aktywnych biologicznie, między innymi herbicydów oraz inhibitorów w leczeniu raka i wirusa HIV^[52].

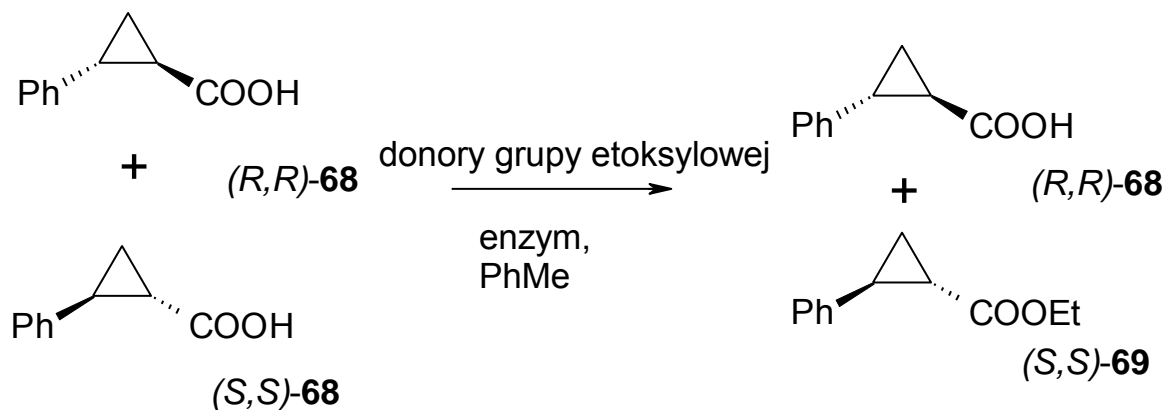
Ponieważ pochodne kwasu *trans*-2-fenilo-cyklopropano-1-karboksyłowego są bardzo ważnymi blokami budulcowymi i substratami do syntezy wielu związków biologicznie czynnych, poczyniono wiele starań w celu opracowania efektywnej metody syntezy tychże związków^[47]. Znaną metodą otrzymywania tych pochodnych jest asymetryczne cyklopropanowanie, czyli reakcja olefin z diazoctanami i różnymi typami pomocników chiralnych^[48]. Jako katalizatory znane są na przykład: katalizator (Salen)Ru(II)^[51], chloro-(η 6-p-cymen)(amidofosforyny rutenu (II))^[53], 2-arylo-5,5-bisoksazolino-2-yl[1,3]dioksany^[54], ligandy Aza-bis(oksazoliny)^[55], 2,2-bipirydyny i pirydylomonooksazoliny^[56]. Pochodne witaminy B₁₂ są również efektywnymi katalizatorami asymetrycznego cyklopropanowania^[57]. Produkty enancjomerycznie czyste zostały otrzymane z wysokimi wydajnościami, jednak dużą wadą tej metody jest fakt, że związki diazowe są wybuchowe, niestabilne i silnie toksyczne, co ogranicza ich zastosowanie, toteż enzymatyczny rozdział kinetyczny estru nie był efektywny^[51].

Celem tego etapu badań było opracowanie efektywnego rozdziału kinetycznego (EKR) dla kwasu *trans*-2-fenilo-cyklopropano-1-karboksyłowego **68**. W pierwszej kolejności zastosowano podejście przez estryfikację. Racemiczny ester **69** otrzymano metodą chemiczną.



Schemat 38: Synteza chemiczna estru etylowego kwasu

Istotne było zbadanie wpływu ważnych czynników, takich jak rodzaj enzymu, rozpuszczalnik i donor grupy etoksyłowej w reakcji estryfikacji. Enzymatyczny rozdział kinetyczny poprzez estryfikację został wykonany według schematu:



Schemat 39: Enzymatyczny rozdział kinetyczny przez estryfikację

W pierwszej kolejności przebadano wpływ enzymu na przebieg reakcji. Jako donora grupy etoksyłowej użyto tetraetoksyetanu i ortoocetanu etylu, ponieważ we wcześniejszych badaniach dały one satysfakcjonujące rezultaty^[58]. Tabela 8 pokazuje wyniki.

Lp.	Enzym	Dla tetraetoksyetanu			Dla ortoocetanu etylu		
		kon.(%)	E.e. (%)	E	Kon.(%)	e.e. (%)	E
1	-	0	nd	nd	0	nd	nd
2	Lipaza z kielków pszenicy	16	11	1,3	27	2	1,1
3	Papaina	22	27	1,9	5	<i>rac</i>	-
4	Lipaza z <i>Rhizopus oryzae</i>	55	3	1,1	41	<i>rac</i>	-
5	Lipaza z <i>Candida cylindracea</i>	22	15	1,4	12	3	1,1
6	Amano lipase PS	43	5	1,1	16	11	1,3
7	Lipaza z <i>Candida antarctica</i>	18	17	1,5	38	9	1,3
8	Lipaza z <i>Hog pancreas</i>	23	12	1,3	74	11	1,6
9	Lipaza z <i>Mucor javanicus</i>	22	9	1,2	48	13	1,5
10	Lipaza immobilizowana sol-gel-AK	19	6	1,1	20	5	1,1
11	Proteaza z <i>Rhizopus</i>	20	10	1,3	42	10	1,3
12	PLE	23	15	1,4	12	10	1,2
13	Acyłaza I z <i>Aspergillus melleus</i>	38	22	1,3	11	<i>rac</i>	-
14	Lipaza z <i>Carica papaya</i>	18	13	1,3			
15	Lipaza z <i>Candida lipolytica</i>	88	7	1,5	36	21	1,7
16	PLAP	22	10	1,3	11	<i>rac</i>	-
17	Proszek acetonowy z wątroby dzika	49	20	1,8	11	<i>rac</i>	-
18	Alkalaza CLEA	22	16	1,4	48	23	1,9
19	Amano lipaza AK	24	18	1,5	22	10	1,3
20	Novozym	63	14	1,6	28	17	1,5

Tabela 8: Enzymatyczny rozdział kinetyczny racemicznego kwasu *trans*-2-fenylcyklopropano-1-karboksylowego

Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w takich samych warunkach, używając toluenu jako rozpuszczalnika w 50°C przez 48 godzin. Dla próbki bez enzymu nie uzyskano żadnego produktu (Tabela 8, lp. 1). Dla większości enzymów użytych w reakcji uzyskano produkty nieracemiczne (Tabela 8, lp. 2-20). Niestety w większości przypadków enancjoselektywność była bardzo niska.

W następnym etapie zbadano wpływ donora grupy etoksylowej na przebieg reakcji (Tabela 9).

Lp.	Donor grupy etoksylowej	Kon. (%)	E.e.(%)	E
1	Ortooctan trietylu	28	17	1,5
2	Ortomrówczan trietylu	32	18	1,6
3	Tetraetoksymetan	63	14	1,6
4	1,2,-dietoksyetan	25	10	1,3
5	Acetylooctan etylu	<1	nd	nd
6	Acetal benzaldehydu	16	6	1,1
7	Węglan dietylu	<1	nd	nd
8	Ortobenzoesan trietylu	40	51	10

Tabela 9: Wpływ donora grupy etoksylowej na konwersję i enancjoselektywność dla Novozymu

Novozym 345 wybrano jako modelowy biokatalizator, ponieważ enancjoselektywność reakcji dla obu donorów była najwyższa (Tabela 8, lp. 20). Tabela 9 przedstawia uzyskane wyniki. Dla większości donorów enancjoselektywność reakcji była bardzo niska (Tabela 9, lp. 1-4, 6, 8) lub konwersja była niska (Tabela 9, lp. 5, 7). Dla ortobenzoesanu trietylu otrzymano

produkt z wydajnością 40% i nadmiarem enancjomerycznym 51% e.e., co odpowiada wartości enancjoselektywności 10 (Tabela 9, lp. 8).

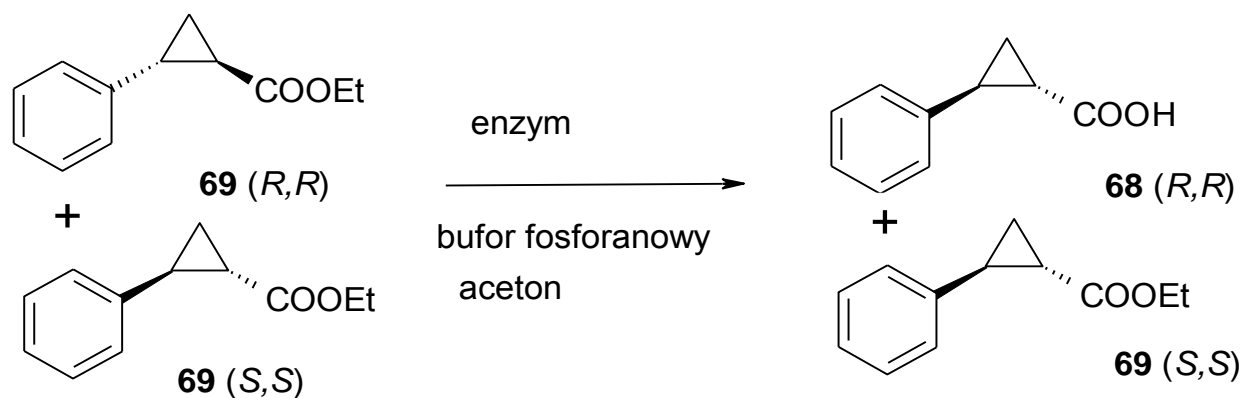
Następna seria eksperymentów została wykonana dla różnych enzymów przy użyciu ortobenzoesanu trietylu jako donora grupy etoksyłowej. Tabela 10 przedstawia wybrane wyniki. Wszystkie enzymy pokazane w Tabeli 8 zostały użyte jako biokatalizatory. Najlepsze wyniki są podsumowane w Tabeli 10.

Lp.	Enzym	Kon.(%)	E.e. (%)	E
1	Novozym	38	52	10
2	Lipaza immobilizowana sol-gel -AK	81	5	1,3
3	Lipaza z <i>Rhizopus arrhizus</i>	55	15	1,3
4	<i>Wheat germ</i>	62	10	1,6
5	Proteaza z <i>Rhizopus</i>	71	20	1,4

Tabela 10. Enzymatyczny rozdział kinetyczny z zastosowaniem ortobenzoesanu trietylu jako donora grupy etoksyłowej

Enzymatyczny rozdział kinetyczny racemicznego kwasu **68** bez względu na enzym i donor grupy etoksyłowej prowadzi do otrzymania enancjomerycznie wzbogaconego estru z niską enancjoselektywnością. Ponieważ nie uzyskano produktów z wysoką enancjoselektywnością, postanowiono przeprowadzić rozdział kinetyczny przez hydrolizę. Racemiczny ester etylowy **69** został zsyntetyzowany chemicznie, z zastosowaniem standardowej literaturowej procedury.

Reakcję enzymatycznej hydrolizy estru etylowego kwasu *trans*-2-fenylcyklopropano-1-karboksyłowego prowadzono w temperaturze pokojowej w dwóch mieszaninach rozpuszczalników zawierających aceton i bufor fosforanowy (bufor fosforanowy pH=7.0, 1:4 i 3:4 v/v).



Schemat 40: Enzymatyczna hydroliza racemicznego estru etylowego kwasu trans-2-fenylocyclopropano-1-karboksyowego **69**

Lp.	Enzym	Kon. ^a (%)	E.e. ^a (%)	E ^a	Kon. ^b (%)	E.e. ^b (%)	E ^b
1	<i>Ślepa próba</i>	0	nd	nd	0	nd	nd
2	Novozym 435	88	11	1,1	78	40	1,7
3	Proteaza z <i>Rhizopus</i>	92	<i>rac</i>	-	44	<i>rac</i>	-
4	Proteaza z <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	90	<i>rac</i>	-	22	10	2,3
5	Amanolipaza AK z <i>Pseudomonas fluorescens</i>	55	<i>rac</i>	-	36	5	1,3
6	PLE	65	<i>rac</i>	-	72	6	1,1

Tabela 11. Enzymatyczny rozdział kinetyczny przez hydrolizę racemicznego estru etylowego kwasu trans 2-fenylocyclopropano-1-karboksyowego

(^a warunki: 1 ml acetonu, 4ml buforu fosforanowego, 3,5h; ^b warunki: 1,5 ml acetonu, 2ml buforu fosforanowego o pH=7, 10mg enzymu, 24h)

Spontaniczna hydroliza substratu okazała się być bardzo wolna i tworzenie produktu nie zostało zaobserwowane. Reakcja hydrolizy jest katalizowana przez enzymy, ale nie jest enancjoselektywna (Tabela 11). Jak wiadomo enancjoselektywność reakcji enzymatycznej w dużej mierze zależy od typu i ilości rozpuszczalnika. Dlatego następne eksperymenty zostały przeprowadzone w mieszaninie zawierającej 43% acetonu jako rozpuszczalnika. Dla Novozymu konwersja była niższa, ale wzrósł nadmiar enancjomeryczny. Dla pozostałych enzymów również zaobserwowano spadek konwersji przy wzroście nadmiaru enancjomerycznego substratu.

W związku z tym przeprowadzono serię eksperymentów w celu dokładnego zbadania wpływu ilości acetonu na konwersję i enancjoselektywność reakcji hydrolizy. Novozym 435 został wybrany jako modelowy enzym, a reakcja była prowadzona w temperaturze pokojowej przez 2 godziny w 5 ml mieszaniny bufor fosforanowy/aceton. Tabela 12 przedstawia uzyskane wyniki:

Lp.	Stężenie acetonu	Kon. (%)	E.e (%)	E
1	0,05	41	10	1,5
2	0,1	35	3	1,2
3	0,2	47	9	1,3
4	0,3	66	14	1,3
5	0,5	55	20	1,7
6	0,6	39	26	3
7	0,7	30	42	149,8
8	0,8	50	4	1,2
9	0,9	71	4	1,1

Tabela 12: Wpływ stężenia acetonu na enancjoselektywność reakcji hydrolizy katalizowanej przez Novozym 435

Przy niskim stężeniu acetonu wartości enancjoselektywności są niskie (Tabela 12, lp. 1-4). Zwiększenie stężenia acetonu do 60% spowodowało niewielki wzrost enancjoselektywności do 3.02 (Tabela 12, lp. 6). Natomiast przy stężeniu 70% acetonu (Tabela 12, lp. 7) uzyskano produkt z zaskakująco wysoką enancjoselektywnością 150. Dalsze podwyższenie stężenia do 80 i 90% obniżyło enancjoselektywność (Tabela 12, lp. 8-9).

Wykazanie, że przy bardzo wysokim stężeniu acetonu uzyskano produkt z wysoką enancjoselektywnością jest niezwykle zaskakujące. W większości przypadków rozpuszczalnik organiczny może zwiększyć stereoselektywność EKRu, ale wysokie stężenie dezaktywuje enzym ^[58].

3.4.1. Podsumowanie rozdziału

Rozdział kinetyczny racemicznego kwasu **68** przez estryfikację jest katalizowany przez enzymy, jednak enancjoselektywność reakcji nie okazuje się wysoka.

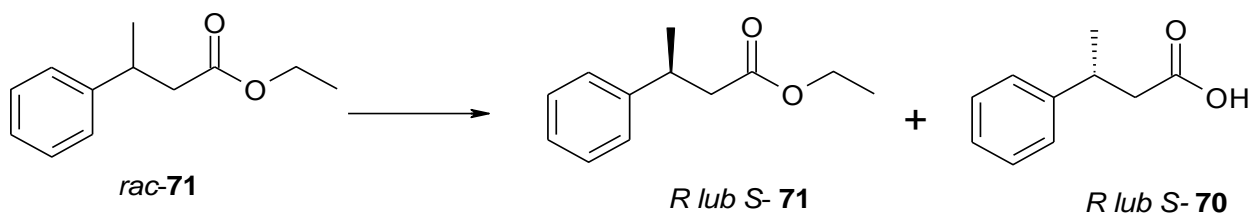
Novozym 345 okazał się być najlepszym enzymem, a ortobenzoesan trietylu najlepszym donorem grupy etoksylowej. Najwyższą wartość enancjoselektywności osiągnięto dla tej kombinacji i wynosiła ona 10.

Przeprowadzono drugie podejście przez hydrolizę estru etylowego kwasu 2-fenylcyklopropano-1-karboksylowego. Przebadano wpływ enzymu oraz rozpuszczalnika na enancjoselektywność. Wykazano, że stężenie acetonu użytego jako rozpuszczalnika dla buforu jest dla niej kluczowe. Dla stężenia acetonu równego 20% dla szeregu enzymów uzyskano produkty prawie racemiczne. Zwiększenie stężenia do 43% poskutkowało znacznym wzrostem enancjoselektywności, a systematyczne badania wpływu stężenia rozpuszczalnika potwierdziły ten wynik. Znalaziono odpowiednie warunki, aby uzyskać produkt ze znakomitą enancjoselektywnością. Dla stężenia 70% acetonu enancjoselektywność osiągnęła wartość 150. Zaobserwowany fenomen znacznie rozszerza zakres procesów biokatalitycznych. Zaprezentowane warunki mogą bowiem zostać zastosowane do procesów biokatalitycznych, zwiększając efektywność procesu. Procedura jest bardzo prosta i można dzięki niej uzyskiwać czyste produkty z wysoką wydajnością.

3.5. Badania nad rozdziałem kinetycznym kwasu 3-fenyl-3-metylopropionowego

Enancjomerycznie czyste kwasy 3-aryloalkanowe są stosowane jako substraty do asymetrycznej syntezy substancji przeciwbakteryjnych, jak na przykład związek o angielskiej nazwie *γ -malyngolide*, który jest naturalnie występującym laktonem pochodzącym z alg, kurkumen i kurkufenoli. Ponadto są wykorzystywane w syntezie aminokwasów β -metylofenyloalaniny i β -metylotyrozyny oraz pochodnych diazoketonów^[59].

Celem badań było opracowanie efektywnego enzymatycznego rozdziału kinetycznego.



Schemat 41: Rozdział kinetyczny racemicznego estru **71** przez hydrolizę

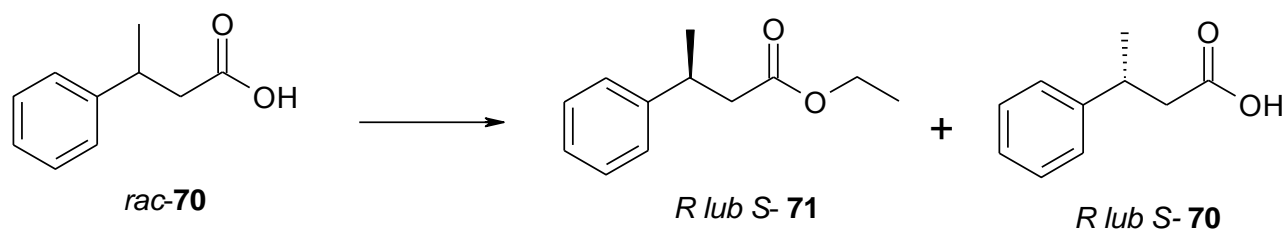
W pierwszej kolejności zastosowano podejście przez hydrolizę. Otrzymany metodą chemiczną ester etylowy kwasu 3-metylo-3-fenylopropionowego poddano hydrolizie enzymatycznej. Najpierw zbadano wpływ enzymu użytego jako katalizatora na konwersję i enancjoselektywność. Wyniki są przedstawione w Tabeli 13:

Lp.	Enzym	Kon. (%)	E.e. (%)	E
1	Novozym	68	17	1,4
2	Lipozym	17	13	5
3	Papaina	50	14	1,5
4	Lipaza z <i>Wheat germ</i>	23	14	3,2
5	Amanolipase	59	10	1,3
6	Alcalase CLEA	24	6	1,6
7	Lipaza z <i>Candida cylindracea</i>	47	11	1,4
8	Acylaza z <i>Aspergillus melleus</i>	30	10	1,8
9	Ślepa próba	-	-	-

Tabela 13: Hydroliza enzymatyczna estru etylowego kwasu 3-fenylo-3-metylopropionowego

Wszystkie reakcje były prowadzone w takich samych warunkach. Dla ślepej próby bez enzymu nie uzyskano produktu. Dla 8 enzymów uzyskano produkt hydrolizy. Największą konwersję uzyskano dla Novozymu, to jest 68%. Wartości nadmiarów enancjomerycznych we wszystkich przypadkach są rzędu 6-17%. Największą wartość enancjoselektywności uzyskano dla Lipozymu.

Reakcja hydrolizy jest przyspieszana przez niektóre enzymy, ale nie wykazuje enancjoselektywności. Wartości enancjoselektywności we wszystkich przypadkach są niskie, a najwyższa uzyskana wartość to 5. Ponieważ rozdział kinetyczny przez hydrolizę nie jest efektywny, zastosowano podejście przez estryfikację kwasu 3-fenyl-3-metylopropionowego. Jako donora grupy etoksyłowej użyto ortoocetanu trietylu, ponieważ jest on efektywny w reakcjach enzymatycznej estryfikacji i pozwala na uzyskanie produktów z wysoką enancjoselektywnością. Ponadto ze względu na niską temperaturę wrzenia jego nadmiar jest łatwy do usunięcia podczas izolacji produktu.



Schemat 42: Estryfikacja enzymatyczna (ortoocetan trietylu jako donor grupy etoksyłowej)

Reakcję enzymatycznej estryfikacji prowadzono w toluenie w 50°C przez 24 godziny z różnymi enzymami. Wyniki przedstawione są w Tabeli 14.

Lp.	Enzym	Kon. (%)	E.e. (%)	E
1	-	0	-	-
2	Novozym	47	15	1,5
3	Lipozym	27	74	8,5
4	<i>Lipaza z Candida Lipolytica</i>	49	18	1,7
5	Papaina	88	4	2,6
6	Lipaza z kielków pszenicy	20	5	1,1
7	Esteraza z wątroby końskiej	11	4	1
8	<i>Lipaza z Rhizopus niveus</i>	25	8	1,2
9	Alcalase CLEA	11	12	1,3
10	Amano lipaza z <i>Pseudomonas fluorescens</i>	36	5	1,1
11	<i>Lipaza z Candida cylindracea</i>	12	12	1,3
12	<i>Lipaza z Hog pancreas</i>	15	8	1,2
13	<i>Aspergillus melleus</i>	2	Nd	nd
14	Proteaza z <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	6	Nd	nd
15	Proteaza z <i>Bacillus licheniformis</i>	2	Nd	nd
16	DLAP II	-	Nd	nd
17	Lipaza immobilizowana sol-gel-AK	2	Nd	nd
18	<i>Penicillium roqueforti</i>	<1	Nd	nd
19	Lipaza z <i>Mucor miehei</i>	<1	Nd	nd
20	Proteaza z <i>Rhizopus oryzae</i>	<1	Nd	nd
21	<i>Lipaza z Rhizopus arrhizus</i>	<1	Nd	nd
22	<i>Lipaza z Candida antarctica</i>	<1	Nd	Nd

Tabela 14: Wpływ enzymu na enancjoselektywność enzymatycznej estryfikacji kwasu **70**

Dla ślepej próby nie uzyskano żadnego produktu. Natomiast dla wszystkich enzymów użytych jako katalizatorów uzyskano estry etylowe. W zależności od

zastosowanego enzymu uzyskano produkty z różną konwersją i nadmiarem enancjomerycznym. Dla części enzymów: lipaza *Aspergillus melleus*, proteaza z *Bacillus amyloliquefaciens*, Proteaza z *Bacillus licheniformis*, DLAP, lipaza immobilizowana sol-gel-AK, lipaza z *Penicillium roqueforti*, lipaza z *Mucor miehei*, proteaza z *Rhizopus oryzae*, lipaza z *Rhizopus arrhizus* i lipaza z *Candida Antarctica* uzyskano śladowe ilości produktu. Najwyższą wartość konwersji zaobserwowano dla reakcji z papainą, to jest 88%. Produkt z najwyższą enancjoselektywnością uzyskano dla Lipozymu, nadmiar enancjomeryczny wyniósł 74% przy konwersji 27%.

W następnej kolejności zbadano wpływ donora grupy etoksylowej na konwersję i enancjoselektywność. Eksperymenty przeprowadzono dla Lipozymu, czyli enzymu, dla którego wartość enancjoselektywności była najwyższa. Przeprowadzono reakcje w tych samych warunkach dla ortomówczanu trietylu, tetraetoksymetanu, dietoksyetanu, acetylooctanu etylu i węglanu dietylu. Wyniki są przedstawione w tabeli 15.

Lp.	Donor	Kon. (%)	e.e. (%)
1	Otromrówczan trietylu	11	4
2	Tetraetoksymetan	65	3
3	Dietoksyetan	5	3
4	Acetylooctan etylu	-	-
5	Węglan dietylu	16	6
6	Ortooctan trietylu	27	74

Tabela 15: Wpływ donora grupy etoksylowej

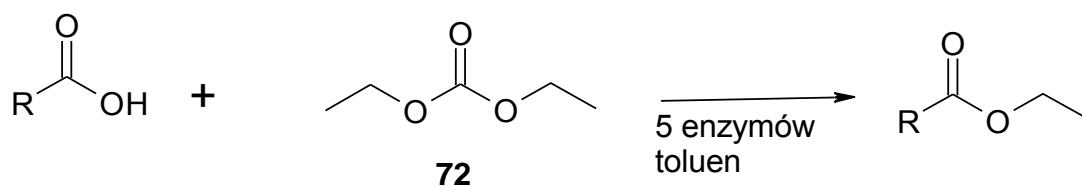
Produkt z najwyższą konwersją otrzymano dla tetraetoksymetanu – 65%, jednak wartość e.e. była bardzo niska. Okazało się, że użyty wcześniej ortooctan trietylu jest najlepszym donorem grupy etoksylowej.

3.5.1. Podsumowanie rozdziału

Przeprowadzono badania nad rozdziałem kinetycznym kwasu 3-fenylo-3-metylopropionowego. Zastosowano dwa podejścia: przez hydrolizę estru etylowego kwasu 3-metylo-3-propionowego oraz przez estryfikację kwasu z zastosowaniem różnych donorów grupy etoksyłowej. Dla hydrolizy przebadano wpływ enzymu na konwersję i enancjoselektywność. Okazało się, że osiem enzymów katalizuje reakcję hydrolizy, ale wartości enancjoselektywności są niskie. Dla estryfikacji zbadano wpływ enzymu oraz donora grupy etoksyłowej na konwersję i enancjoselektywność. Okazało się, że najlepszym enzymem jest Lipozym, a najlepszym donorem grupy etoksyłowej – ortoocetan trietylu. Otrzymano produkt z dość wysokim nadmiarem enancjomerycznym – 74% przy konwersji 27%.

3.6. Estryfikacja kwasów karboksylowych węglanem dietylu katalizowana enzymami

Celem badań było opracowanie efektywnej metody estryfikacji kwasów karboksylowych z zastosowaniem węglanu dietylu jako donora grupy etoksyłowej katalizowanej enzymami. Jako związku modelowego użyto kwasu 3-fenylopropionowego. Reakcje prowadzono w toluenie w temperaturze 35°C-40°C w toluenie przez 24 godziny. Okazało się, że mieszanina enzymów: lipaza z kielków pszenicy, acylaza z *Aspergillus melleus*, papaina, Amano lipase AK z *Pseudomonas fluorescens* i Novozym 435 jest efektywnym katalizatorem reakcji estryfikacji i pozwala na otrzymanie produktu z wysoką wydajnością (96%). Przystudiowano wpływ substratu na wydajność estryfikacji. Przeprowadzono reakcje dla różnych kwasów w tych samych warunkach. Wyniki są przedstawione w Tabeli 17:



Schemat 43: Estryfikacja kwasów karboksylowych węglanem dietylu

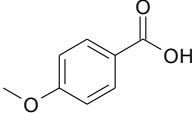
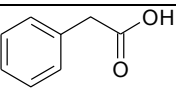
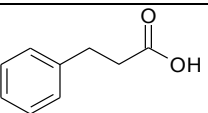
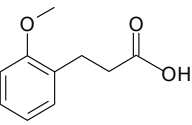
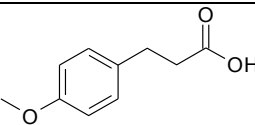
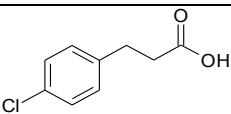
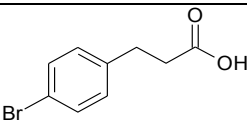
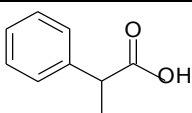
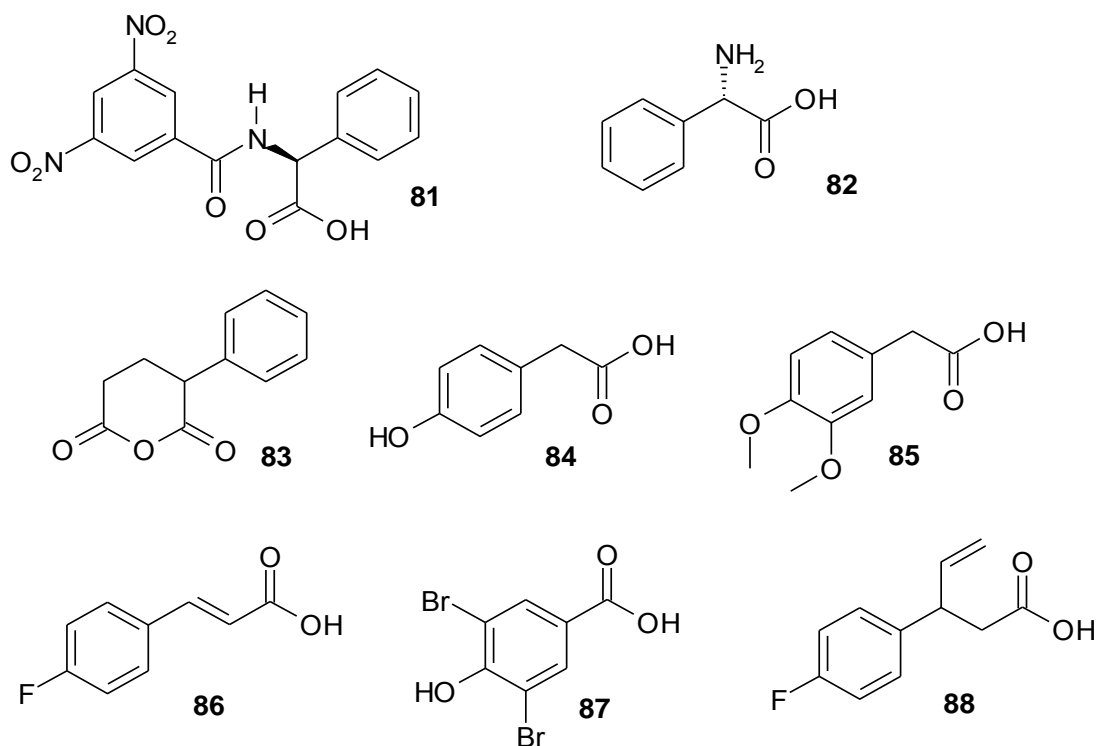
Lp	Substrat	Wyd. (%) (węglan dietylu)
1		73 46
2		74 98
3		75 96
4		76 75
5		77 81
6		78 73
7		79 72
8		80 71

Tabela 16: Estryfikacja kwasów karboksylowych węglanami

Otrzymano produkty z najwyższą wydajnością dla kwasów karboksylowych zawierających grupę fenyłową bez żadnych podstawników. Dla związków zawierających podstawniki elektronodonorowe wydajności są w niewielkim stopniu wyższe niż dla wyciągających elektrony. Metoda ta pozwala na otrzymanie estrów etylowych z wysokimi wydajnościami.



Rysunek 16: Kwasy nieulegające reakcji estryfikacji z węglanem etylu i mieszaniną enzymów

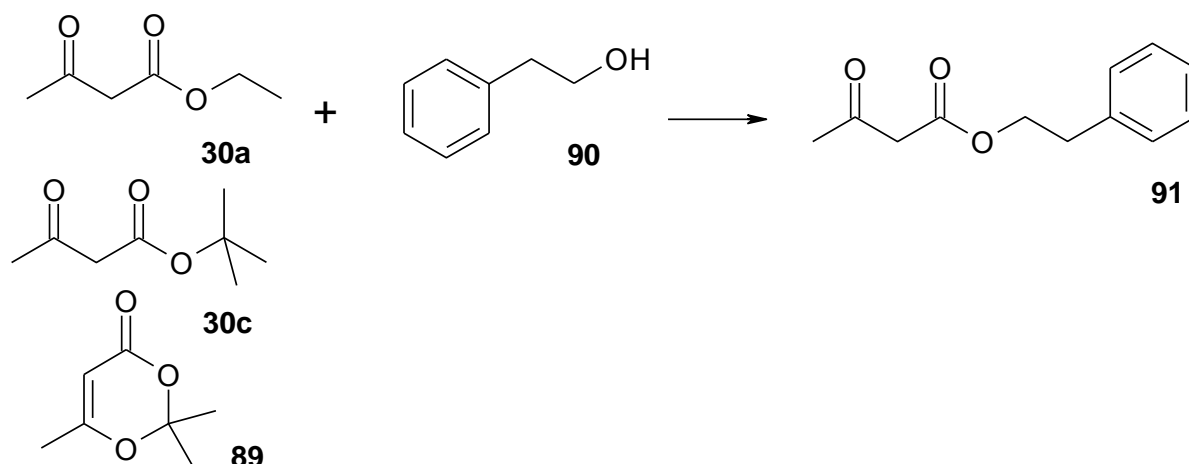
Niektóre kwasy karboksylowe nie mogą być substratami dla mieszaniny enzymów. Są przedstawione na rysunku 16. Aminokwasy nie ulegają reakcji estryfikacji. Podobnie kwasy zawierające grupę fenyłową z dużą ilością podstawników, grupę fenyłową z podstawnikiem hydroksylowym i wiązanie podwójne.

3.6.1. Podsumowanie rozdziału

Przedstawiono pierwszą nieodwracalną metodę estryfikacji kwasów karboksylowych katalizowaną przez mieszaninę enzymów. Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły, że mieszanina jest bardziej efektywna niż pojedyncze enzymy^[61]. Mieszanina enzymów nieodwracalnie przekształca wiele kwasów karboksylowych w estry etylowe, a donor grupy etoksyłowej stanowi komercyjnie dostępny węglan dietylu. Metoda jest przyjazna środowisku i bardzo wydajna.

3.7. Nowa, biokatalityczna metoda syntezy estrów kwasu acetylooctowego

Celem tego etapu badań było uzyskanie metody syntezy estrów kwasu acetylooctowego przez katalizowaną enzymami transestryfikację. Ogólna strategia syntezy jest przedstawiona na schemacie:



Schemat 44: Transestryfikacja acetylooctanu etylu, *tert*-butylu i 2,2,6-trimetyl-4H-1,3 dioksyno-4-onu z 2-fenyletanołem katalizowana enzymami

W pierwszej kolejności przeprowadzono *screening* enzymatyczny kolekcji enzymów zespołu XX IChO PAN.

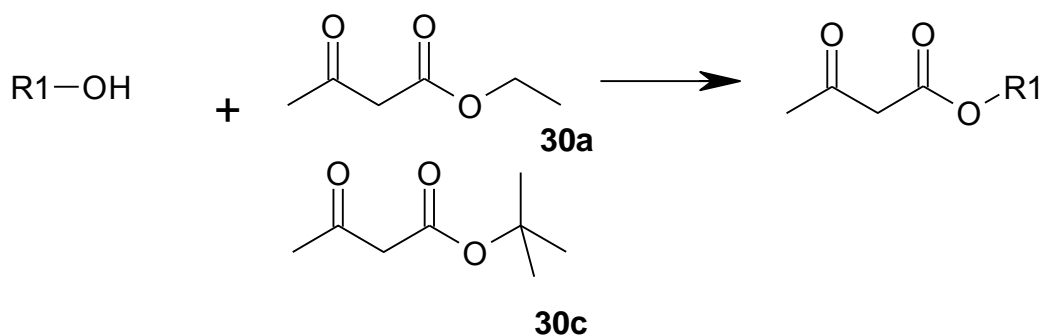
Eksperyment został przeprowadzony dla 2-fenyletanolu i acetylooctanu etylu w toluenie w 50°C przez 24 godziny. W celu przyspieszenia procesu 32 enzymy zostały podzielone na 8 mieszanin. Każda z grup zawierała 4 różne enzymy. Zaobserwowano, że tylko jedna grupa składająca się z Novozymu 435, Lipazy z *Rhizopus niveus*, Lipoproteinowej lipazy z *Pseudomonas* i papainy katalizuje efektywnie reakcję modelową. Wydajność wyizolowanego produktu wyniosła 92% (Tabela 17, lp. 15). W pozostałych grupach nie zaobserwowano tworzenia estru. W celu zweryfikowania, który z enzymów jest odpowiedzialny za tworzenie estru, wykonano serię eksperymentów. Dla każdego enzymu (Novozym, Papaina, Lipaza z *Rhizopus niveus*, Lipoproteinowa Lipaza z *Pseudomonas*) wydajności wyizolowanych produktów są mniejsze niż 1% (Tabela 17, lp. 1-4).

Lp.	Novozym 435	Papaina	Lipaza z <i>Rhizopus niveus</i>	Lipoproteinowa lipaza	Wyd. (%)
1	+				<1
2		+			<1
3			+		<1
4				+	<1
5	+	+			<1
6	+		+		<1
7	+			+	48
8		+	+		<1
9		+		+	31
10			+	+	<1
11	+	+	+		<1
12	+	+		+	<5
13	+		+	+	22
14		+	+	+	<5
15	+	+	+	+	92

Tabela 17. Efekt kinetyczny reakcji 2-fenylloetanolu i acetylooctanu etylu

Wcześniejsze badania wykazały, że mieszanina enzymów może katalizować reakcje chemiczne i pozwala uzyskiwać produkty z wysokimi wydajnościami, podczas gdy w reakcjach z pojedynczymi enzymami wydajności są bardzo niskie^[58]. Toteż systematyczne badania kombinacji mieszanin 2 i 3 enzymów wykazały, że

większość z nich nie ma znaczącego efektu katalitycznego, tylko w dwóch przypadkach wydajności są średnie (Tabela 18, lp. 7 i 9). Tak jak w poprzednich badaniach^[58], gdy użyto mieszaninę tych 4 enzymów, uzyskano produkt z bardzo wysoką wydajnością (Tabela 18, lp. 15).



Schemat 45: Transestryfikacja acetylooctanu etylu i *tert*-butylu z alkoholami katalizowana enzymami

W następnej kolejności zwrócono uwagę na donor grupy acetylooctanowej. Wykonano eksperymenty dla acetylooctanu etylu, *tert*-butylu i 2,2,6-trimetylo-4H-1,3 dioksyno-4-onu w toluenie w obecności mieszaniny czterech enzymów (Novozym, Papaina, Lipaza z *Rhizopus niveus* i Lipoproteinowa lipaza z *Pseudomonas*). β -ketoestry zostały otrzymane z wysoką wydajnością przy użyciu acetylooctanu etylu i *tert*-butylu, natomiast reakcja z 2,2,6-trimetylo-4H-1,3-dioksyno-4-onem nie była katalizowana przez enzymy. Dzieje się tak prawdopodobnie dlatego, że produktem pośrednim transestryfikacji alkoholi z tym związkiem jest keten, który może być generowany tylko termicznie. Tabela 18 pokazuje wyniki reakcji transestryfikacji alkoholi i acetylooctanu etylu i *tert*-butylu:

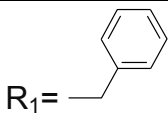
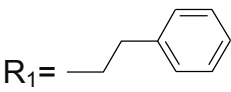
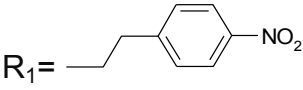
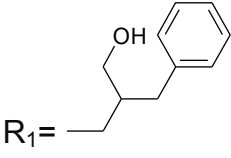
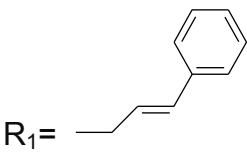
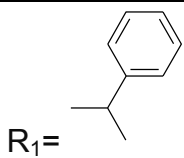
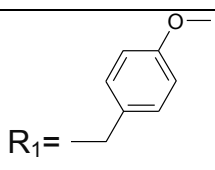
Lp.	R ₁	Wyd. (%) (30a)	Wyd. (%) (30c)	Produkt
1		80	76	92
2		92	88	93
3		67	86	94
4		30	<1	95
5		74	<1	96
6		96	72	97
7		65	84	98

Tabela 18: Wyniki reakcji transestryfikacji acetylooctanu etylu i *tert*-butylu z alkoholami katalizowana enzymami

W większości przypadków uzyskano produkty z bardzo dobrą wydajnością. Dla alkoholu benzyloвого i 2-fenyletanolu użyty acetylooctan nie miał większego wpływu na wydajność, wartości są niemalże takie same (Tabela 18, lp. 2). Dla alkoholi z grupą funkcyjną przy pierścieniu aromatycznym (-OCH₃, NO₂) wydajność była wyższa dla acetylooctanu *tert*-butylu (Tabela 18, lp. 3 i 7). Dla alkoholu cynamonowego i 2-benzylo-1,3-propanodiolu uzyskano produkty z dobrymi wydajnościami tylko dla acetylooctanu etylu (Tabela 18, lp. 4 i 5). W reakcji 2-

benzylo-1,3-propanodiolu z acetylooctanem otrzymano diacetylooctan 2-metylo-1,3-propanodiolu jako główny produkt z wydajnością 30% i acetylooctan 2-metylo-1,3-propanodiolu jako produkt uboczny.

Reakcji transestryfikacji poddano również fenole (Tabela 19):

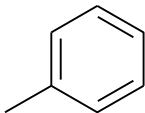
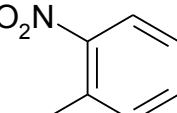
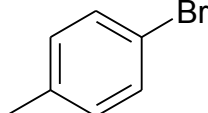
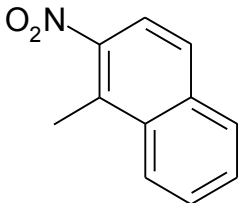
Lp.	R ₁	Wydajność (%) ^{1a}	Wydajność (%) ^{1b}
1	 R ₁ =	<1	<1
2	 R ₁ =	<1	<1
3	 R ₁ =	<1	<1
4	 R ₁ =	<1	<1

Tabela 19: Wyniki transestryfikacji acetylooctanu etylu i *tert*-butylu z fenolami

(^{1a}: Wydajności dla acetylooctanu etylu, ^{1b}: Wydajności dla acetylooctanu *tert*-butylu)

Dla fenolu, o-nitrofenolu, p-bromofenolu i 2-nitro-1-naftolu otrzymano śladowe ilości produktów. Oznacza to, że fenole nie są substratami dla enzymów w reakcji transestryfikacji acetylooctanów.

3.7.1. Wnioski

Opisano pierwszą procedurę otrzymywania β -ketoestrów poprzez katalizowaną enzymami transestryfikację acetylooctanu etylu i *tert*-butylu bez konieczności stosowania wysokiego ciśnienia.

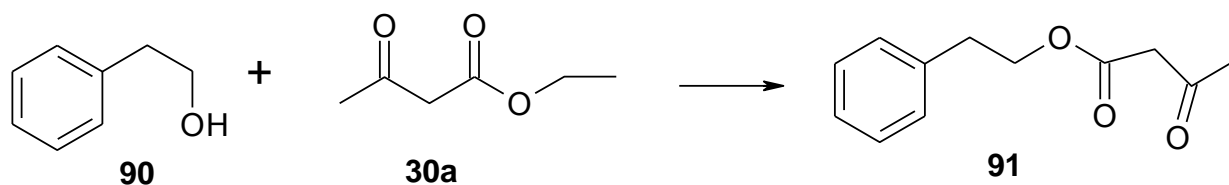
Mieszanina enzymów okazała się być katalizatorem nie tylko reakcji estryfikacji, lecz także transestryfikacji acetylooctanów.

Transestryfikacji ulegają alkohole pierwszo- i drugorzędowe, ale nie fenole. Dla fenolu, *o*-nitrofenolu, *p*-bromofenolu i 2-nitro-1-naftolu nie otrzymano żadnych produktów.

Synteza β -ketoestrów nie wymaga zastosowania wysokich temperatur, niskiego ciśnienia ani toksycznych katalizatorów. Procedura jest bardzo prosta i pozwala na uzyskanie czystych związków z wysokimi wydajnościami.

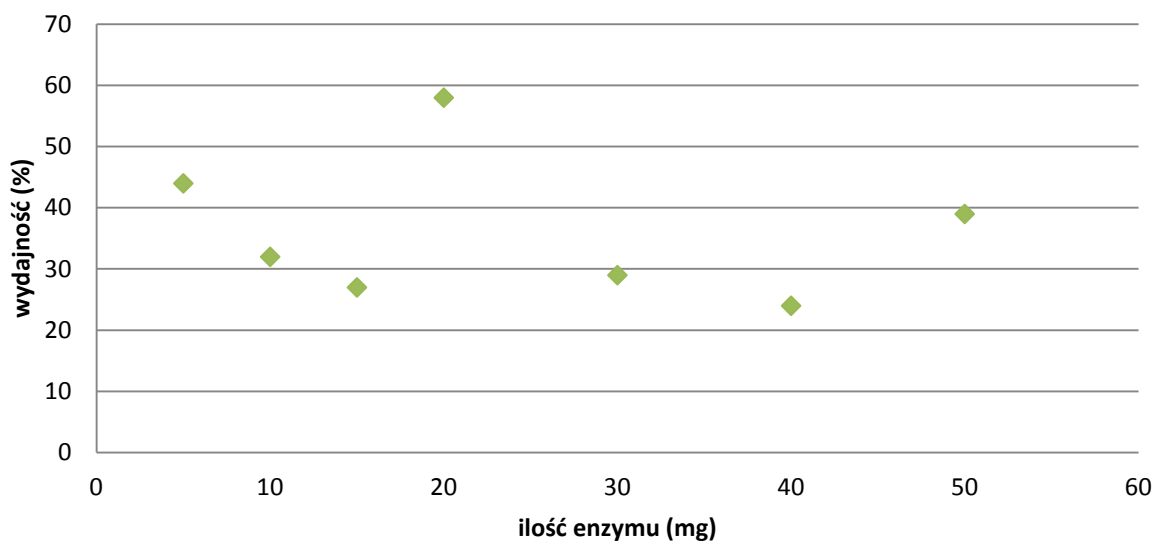
3.7.2. Badanie reakcji transestryfikacji acetylooctanu etylu i *tert*-butylu 2-fenyletanołem

Celem tego etapu badań było przestudiowanie wpływu ilości enzymu oraz ilości acetylooctanu na wydajność reakcji transestryfikacji. Jako substrat modelowy wybrano 2-fenyletanol a jako katalizator Novozym.



Schemat 46: Transestryfikacja acetylooctanu etylu 2-fenyletanołem

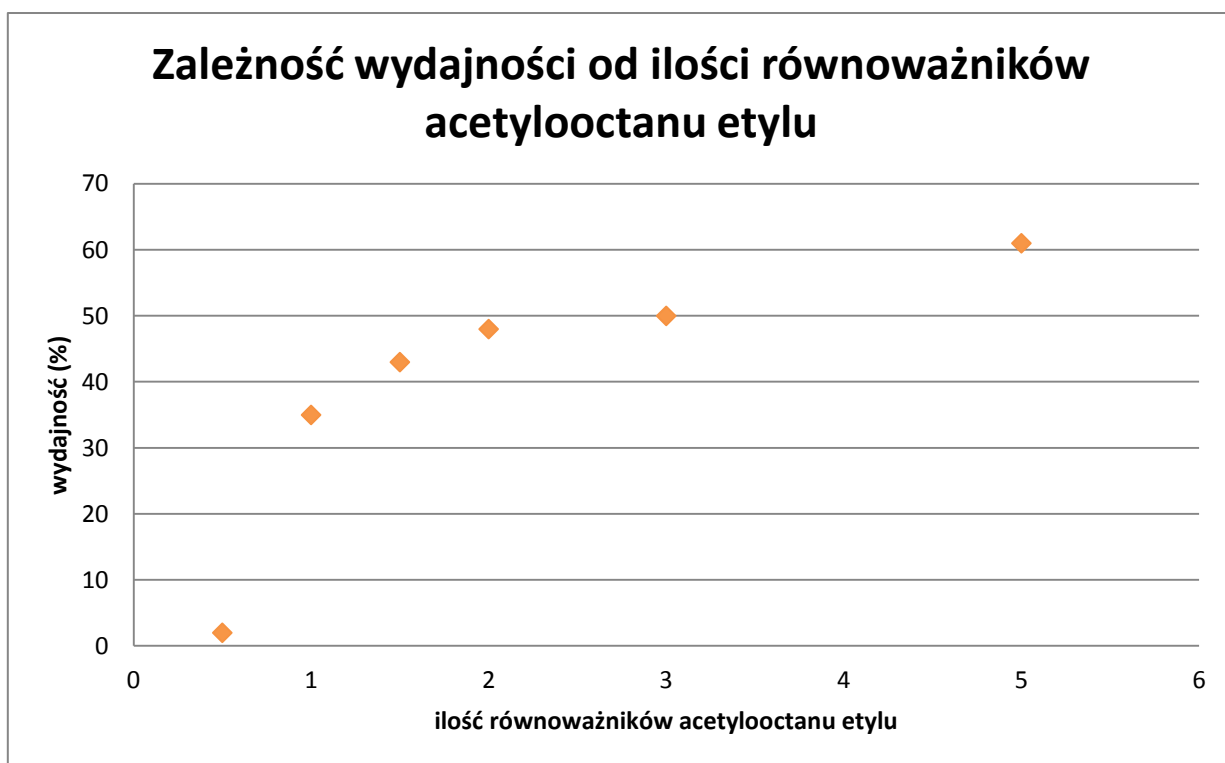
Zależność wydajności od ilości enzymu



Rysunek 17: Zależność wydajności reakcji transestryfikacji acetylooctanu etylu 2-fenyletanołem od ilości enzymu

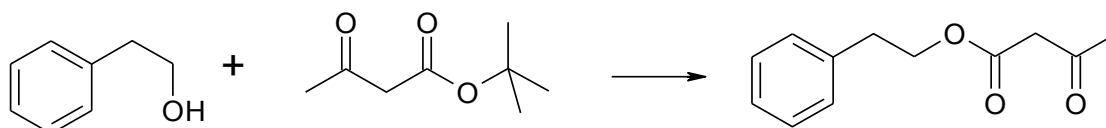
Zależność między ilością enzymu a wydajnością reakcji transestryfikacji jest przedstawiona na wykresie. Okazało się, że wydajność wzrasta wraz ze wzrostem ilości enzymu, ale tylko do pewnego momentu, a następnie spada. Z wykonanych badań wynika, że istnieje optymalna ilość enzymu, dla której wydajność reakcji jest najwyższa.

Zbadano również wpływ ilości równoważników acetylooctanu etylu na wydajność. Wydajność wzrasta wraz ze wzrostem ilości acetylooctanu etylu.

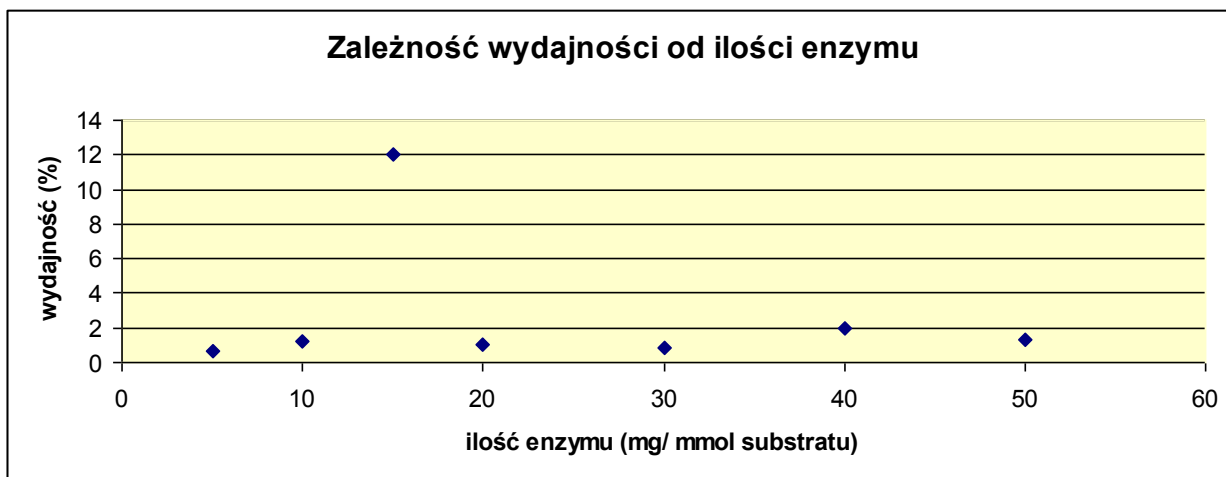


Rysunek 18: Zależność wydajności od ilości równoważników acetylooctanu etylu

Tę samą serię badań przeprowadzono dla reakcji transestryfikacji z acetylooctanem *tert*-butylu.

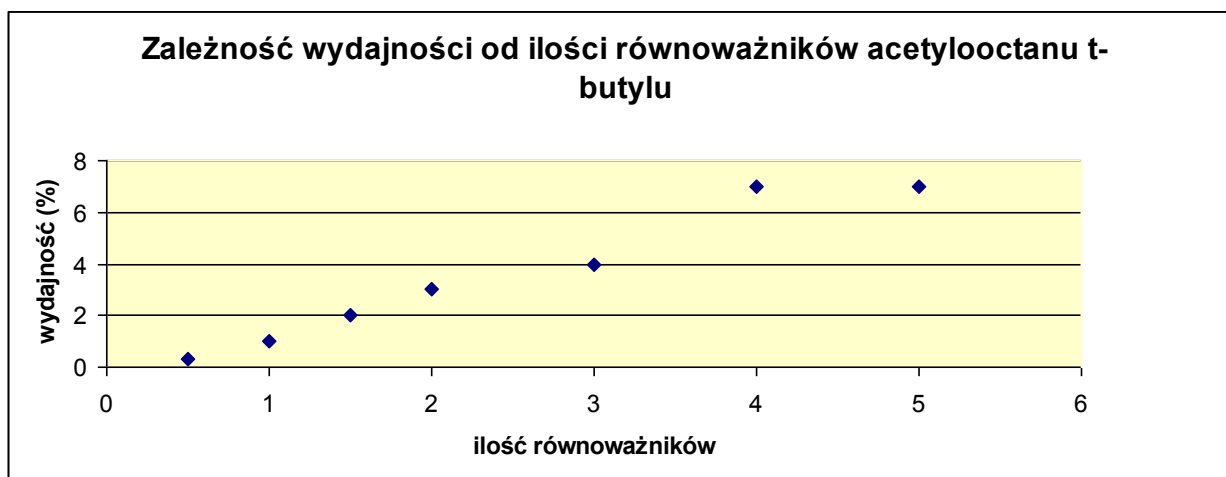


Schemat 47: Transestryfikacja acetylooctanu *tert*-butylu 2-fenyletanołem



Rysunek 19: Zależność wydajności reakcji od ilości enzymu

W reakcji transestryfikacji acetylooctanu *tert*-butylu również istnieje optymalna ilość enzymu, dla której wydajność jest najwyższa i wynosi 15 mg/1 mmol substratu. Dla pozostałych ilości enzymu uzyskano produkty z niskimi wydajnościami.

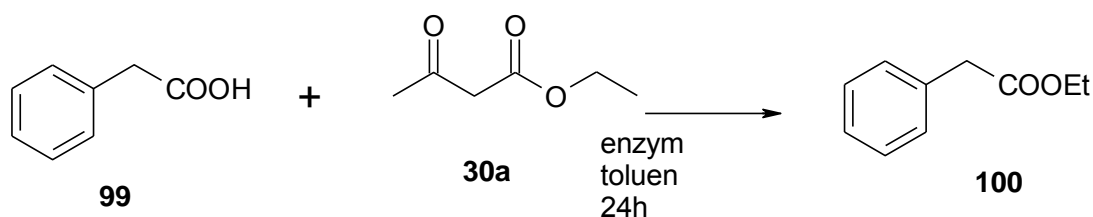


Rysunek 20: Zależność wydajności od ilości równoważników acetylooctanu *tert*-butylu

Zależność między ilością acetylooctanu *tert*-butylu a wydajnością reakcji transestryfikacji jest bardzo podobna do zależności acetylooctanu etylu, wydajność wzrasta wraz ze wzrostem ilości równoważników acetylooctanu *tert*-butylu.

3.7.3. Badania nad zastosowaniem acetylooctanu etylu do reakcji estryfikacji kwasów karboksylowych

Celem badań było sprawdzenie, czy acetylooctan etylu może być donorem grupy etoksylowej w estryfikacji kwasów karboksylowych. W tym celu przeprowadziłam *screening* enzymatyczny. Pierwsze eksperymenty były przeprowadzone dla kwasu fenylooctowego i acetylooctanu etylu w toluenie jako rozpuszczalniku w 50°C przez 24 godziny. Przeprowadzono badania przesiewowe dla całej kolekcji enzymów zespołu XX IChO PAN. Okazało się, że 5 enzymów (Novozym, lipaza z kielków pszenicy, *Mucor javanicus*, *Aspergillus oryzae* i Lipaza z *Pseudomonas fluorescens*) katalizuje tą reakcję, ale wydajności są niskie (poniżej 1%). Wcześniejsze badania wykazały, że mieszanina enzymów katalizuje reakcje chemiczne i pozwala na uzyskanie produktów z bardzo wysokimi wydajnościami, podczas gdy przy jednym enzymie wydajności są niskie [58]. Dlatego przeprowadzono systematyczne badania wszystkich kombinacji enzymów, a ich wyniki przedstawiono w Tabeli 20.



Schemat 48: Estryfikacja kwasu fenylooctowego acetylooctanem etylu katalizowana enzymami

Lp.	Novozym	Lipaza z kielków pszenicy	Lipaza z <i>Mucor javanicus</i>	Lipaza z <i>Aspergillus oryzae</i>	Lipaza z <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Wyd. (%)
1	+					<1
2		+				<1
3			+			<1
4				+		<1

5					+	<1
6	+	+				<1
7	+		+			<1
8	+			+		<1
9	+				+	<1
10		+	+			<1
11		+		+		<1
12		+			+	<1
13			+	+		<1
14			+		+	<1
15				+	+	<1
16	+	+	+			22
17	+	+		+		<1
18	+	+			+	<1
19	+		+	+		10
20	+		+		+	<1
21	+			+	+	<1
22		+	+	+		<1
23		+	+		+	<1
24		+		+	+	<1
25			+	+	+	<1
26	+	+	+	+		35
27	+	+	+		+	<1
28	+	+		+	+	<1
29	+		+	+	+	21
30		+	+	+	+	<1
31	+	+	+	+	+	90

Tabela 20: Badanie wpływu kombinacji enzymów na wydajność reakcji estryfikacji

Systematyczne badania kombinacji 2, 3 i 4 enzymów wykazały, że większość kombinacji nie ma znaczącego efektu katalitycznego. Dla kombinacji 2 enzymów we

wszystkich kombinacjach uzyskano ślady produktu (lp. 6-15). Dla kombinacji trzech enzymów w dwóch przypadkach uzyskano produkty z nieco wyższymi wydajnościami – 22% (lp. 16) i 10% (lp. 19). Dla kombinacji 4 enzymów również w dwóch przypadkach wydajności były wyższe – 35% (lp. 26) i 21% (lp. 29). Gdy użyto kombinacji 5 enzymów, został otrzymany produkt z najwyższą wydajnością (Tabela 21, lp. 31).

Po znalezieniu optymalnych warunków dla reakcji transestryfikacji, przeprowadziłam reakcję estryfikacji innych kwasów karboksylowych. Wyniki są przedstawione w Tabeli 21:

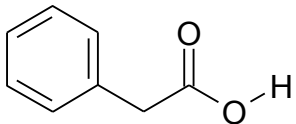
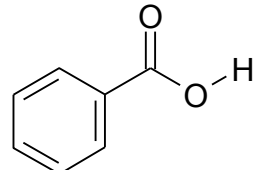
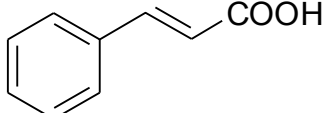
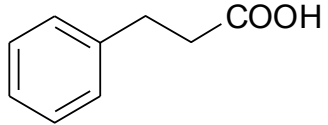
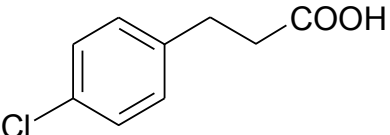
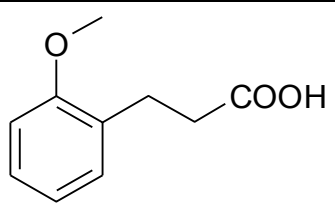
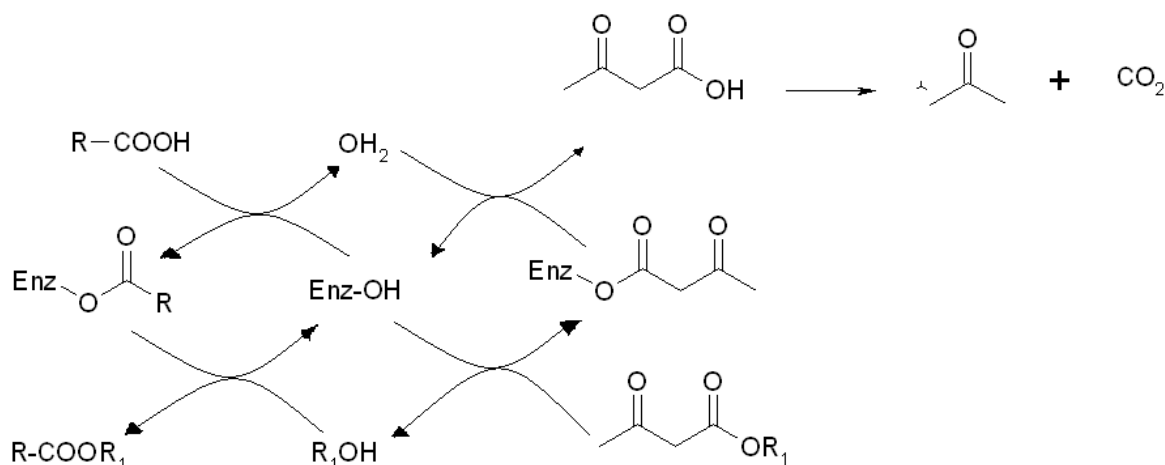
Lp	Substrat	Wydajność produktu (%)	Produkt
1		90	100
2		60	101
3		59	102
4		84	103
5		62	104
6		36	105

Tabela 21: Estryfikacja kwasów karboksylowych acetylooctanem etylu

We wszystkich przypadkach mieszanina enzymów katalizuje reakcję estryfikacji z acetylooctanem etylu jako donorem grupy etoksyłowej. Produkty otrzymano z dobrymi i bardzo dobrymi wydajnościami. Na Schemacie 49 przedstawiony jest prawdopodobny przebieg reakcji.



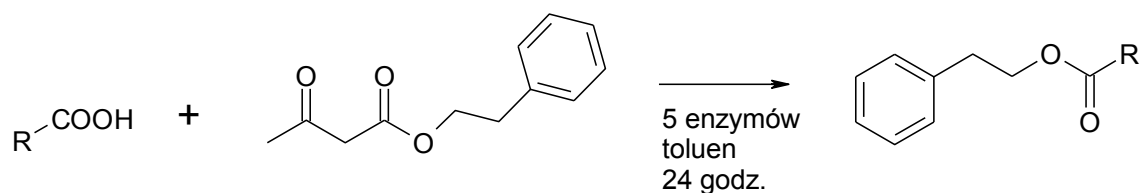
Schemat 49: Mechanizm estryfikacji acetylooctanem etylu ($R_1 = \text{Et}$)

Enzym łącząc się z kwasem, tworzy kompleks acylowany enzym, który następnie reaguje z cząsteczką acetylooctanu etylu, tworząc ester etylowy kwasu karboksylowego i kompleks acetylooctan-enzym. Kompleks ten pod wpływem wody powstałej podczas reakcji hydrolizuje do kwasu acetylooctowego, a enzym jest regenerowany. Kwas acetylooctowy tworzący się podczas reakcji łatwo rozkłada się do acetonu i dwutlenku węgla, co jest siłą napędową reakcji i czyni proces nieodwracalnym.

3.7.3.1. Badania nad zastosowaniem acetylooctanu etylu jako donora dowolnej grupy alkoksyłowej

Celem eksperymentu było sprawdzenie, czy acetylooctany mogą być donorami innych grup alkoksyłowych niż etoksyłowa. Przeprowadzono eksperyment dla szeregu kwasów karboksylowych i acetylooctanu 2-fenyletanolu w toluenie

z zastosowaną wcześniej mieszaniną enzymów w tych samych warunkach co estryfikacje acetylooctanem etylu.



Schemat 50: Estryfikacja kwasów karboksylowych otrzymanym wcześniej acetylooctanem fenyletanolu

Lp.	R=	Wyd. (%)	Produkt
1	Ph	28	106
2	Bz	92	107
3		68	108
4		78	109

Tabela 22: Estryfikacja kwasów karboksylowych acetylooctanem 2-fenyletanolu

Okazało się, że dla czterech kwasów karboksylowych otrzymano estry 2-fenyletanolu (Tabela 22). Dla kwasu benzoowego otrzymano produkt z wydajnością 28% (Tabela 22, lp. 1), natomiast pozostałe estry 2-fenyletanolu z wyższymi wydajnościami (Tabela 22, lp. 2-4). Oznacza to, że tą metodą można także otrzymywać estry inne niż etylowe.

3.7.4. Podsumowanie rozdziału

Acetylooctan etylu nie jest znany w literaturze jako donor grupy etoksylowej. Przedstawione wyniki wskazują, że może on być także stosowany do estryfikacji kwasów karboksylowych. Kwas acetylooctowy, który tworzy się podczas reakcji, natychmiast rozpada się do acetonu i dwutlenku węgla, co jest siłą napędową reakcji, sprawiając, że proces jest nieodwracalny i bardzo wydajny.

Acetylooctany mogą być donorami innych grup niż etoksylowa. W modelowej reakcji kwasów karboksylowych z acetylooctanem 2-fenyletanolu otrzymano produkty estryfikacji z dobrymi wydajnościami.

Reakcja jest katalizowana przez mieszaninę enzymów, dużo bardziej efektywną niż pojedyncze enzymy.

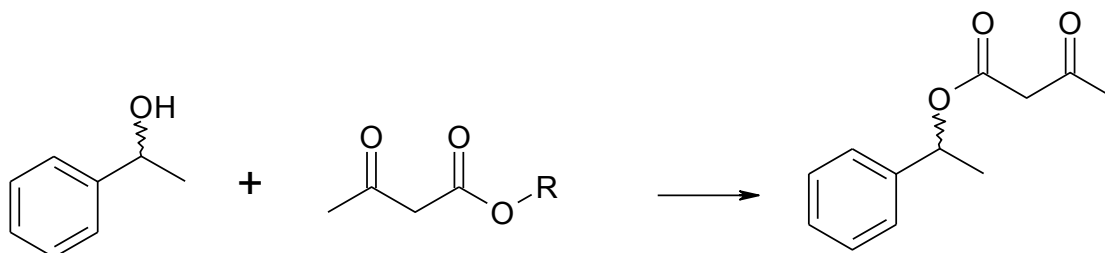
Metoda nie wymaga stosowania wysokich temperatur, niskiego ciśnienia ani toksycznych katalizatorów. Procedura jest bardzo prosta i pozwala na uzyskanie estrów z wysokimi wydajnościami.

3.8. Badania nad mechanizmem reakcji transestryfikacji acetylooctanu *tert*-butylu oraz innych estrów *tert*-butylowych zawierających grupę karbonylową

Enzymatyczna transestryfikacja, w której substratami są acetylooctan *tert*-butylu oraz alkohole, nie jest znana w literaturze. Ponadto zastosowanie esteraz i lipaz do hydrolizy estrów alkoholi trzeciorzędowych jest ograniczone, ponieważ większość komercyjnie dostępnych enzymów nie akceptuje estrów alkoholi trzeciorzędowych jako substratów^[60]. Tylko i wyłącznie enzymy posiadające specjalną strukturę centrum aktywnego mogą hydrolizować te estry. Uzyskane w tej pracy wyniki wykazują, że acetylooctan *tert*-butylu jest substratem do reakcji enzymatycznej transestryfikacji. Celem kolejnego etapu badań było sprawdzenie, czy takie reakcje katalizowane przez enzymy są także reakcjami enancjoselektywnymi.

Synteżę nieracemicznych wzorców produktów wykonano metodą chemiczną, z odpowiednich alkoholi, uzyskując enancjomerycznie czyste estry, które były używane jako związki referencyjne do kolejnych badań.

3.8.1. Porównanie reakcji transestryfikacji acetylooctanu etylu i *tert*-butylu



Schemat 51: Transestryfikacja acetylooctanów z enancjomerami 1-fenyletanolu

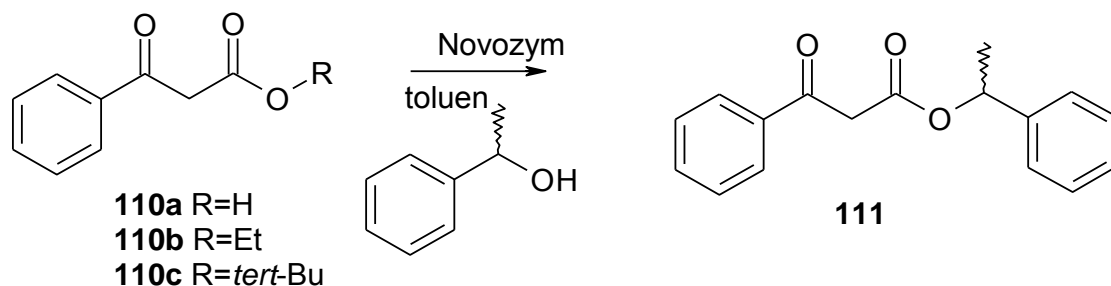
Lp.	Alkohol	R=	Wyd. (%)
1	<i>R</i>	Et	6
2	<i>S</i>	Et	1
3	<i>R</i>	<i>tert</i> -Bu	3
4	<i>S</i>	<i>tert</i> -Bu	93

Tabela 23: Transestryfikacja acetylooctanów z enancjomerami 1-fenyletanolu

Celem badań było porównanie zachowania enzymu (Novozymu 435) w obecności acetylooctanu etylu i *tert*-butylu w reakcji z obydwoma enancjomerami 1-fenyletanolu. Wszystkie eksperymenty były przeprowadzone w takich samych warunkach. Wyniki są

przedstawione w tabeli. Dla acetylooctanu etylu otrzymano produkty z niskimi wydajnościami, jednak enancjomer *R* reaguje szybciej (lp. 1 i 2). W przypadku acetylooctanu *tert*-butylu zmienia się stereopreferencja biokatalizatora. Enancjomer *S* reaguje bardzo szybko, natomiast *R* bardzo wolno. Dla obu acetylooctanów reakcja jest enancjoselektywna, jednak w tym przypadku stereopreferencja enzymu okazuje się odmienna. Wskazuje to, że mechanizm reakcji dla obu substratów jest odmienny.

3.8.2. Kwas 3-okso-3-fenylopropionowy i jego pochodne



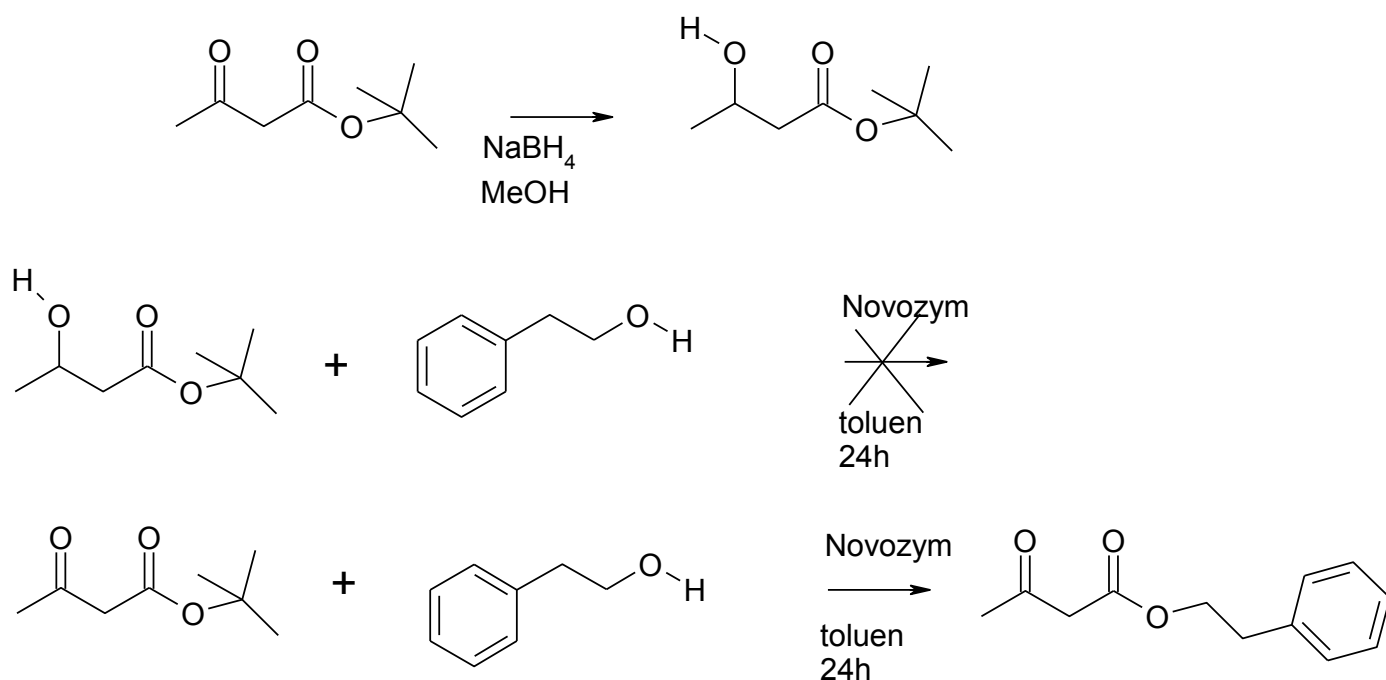
Schemat 52: Transestryfikacja kwasu 3-okso-3-fenylopropionowego i jego pochodnych

Lp.	Alkohol	R=	Wyd. (%)
1	<i>R</i>	H	36
2	<i>S</i>	H	31
3	<i>R</i>	Et	45
4	<i>S</i>	Et	43
5	<i>R</i>	<i>tert</i> -Bu	10
6	<i>S</i>	<i>tert</i> -Bu	42

Tabela 24: Transestryfikacja kwasu 3-okso-3-fenylopropionowego i jego pochodnych

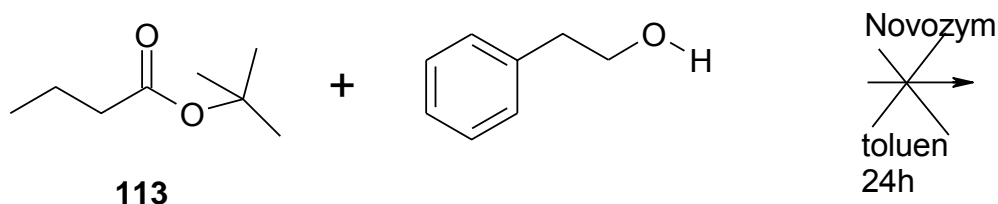
Kolejnym substratem użytym do badań był kwas 3-fenyl-3-oksopropanowy oraz jego estry: etylowy oraz *tert*-butylowy. Celem eksperymentu było porównanie efektu kinetycznego, kiedy w substracie znajduje się grupa fenylova zamiast metylowej. Wyniki są przedstawione w tabeli. Dla kwasu oraz estru etylowego oba enancjomery reagują z podobną szybkością, co oznacza, że reakcje nie są enancjoselektywne. Natomiast dla estru *tert*-butylowego enancjomer *S* reaguje zdecydowanie szybciej, reakcja jest enancjoselektywna. Wskazuje to, że mechanizm reakcji dla estru *tert*-butylowego jest odmienny od mechanizmu reakcji estru etylowego i kwasu.

3.8.3. Badania modelowe nad określeniem wpływu zmodyfikowanej grupy karbonylowej na przebieg reakcji



Schemat 53: Redukcja grupy karbonylowej w acetylooctanie *tert*-butylu i transestryfikacja katalizowana przez Novozym

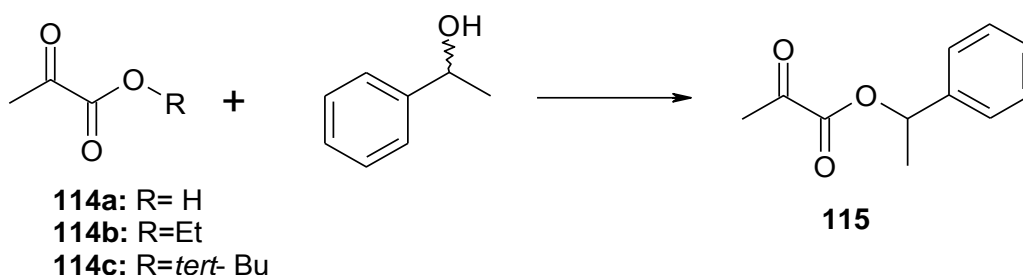
Ponieważ dotychczas uzyskane wyniki były trudne do interpretacji, zdecydowałam się zbadać wpływ grupy karbonylowej w pozycji β na przebieg reakcji. Zredukowano grupę karbonylową acetylooctanu *tert*-butylu do hydroksylowej. Uzyskany ester został użyty jako substrat do transestryfikacji w tych samych warunkach, co acetylooctan *tert*-butylu z Novozymem jako katalizatorem. Dla acetylooctanu *tert*-butylu uzyskano produkt transestryfikacji, natomiast dla estru *tert*-butylowego kwasu 3-hydroksybutanowego nie uzyskano żadnego produktu. Oznacza to, że grupa karbonylowa bierze istotny udział w enzymatycznej transestryfikacji. W kolejnym eksperymencie zastosowano maślan *tert*-butylu jako substrat, związek, który nie ma grupy karbonylowej w pozycji β . Eksperyment przeprowadzono w takich samych warunkach i nie otrzymano żadnego produktu transestryfikacji.



Schemat 53a: Reakcja transestryfikacji maślanu *tert*-butylu

Aby dokładniej określić wpływ grupy karbonylowej, wykonałam kolejną serię eksperymentów dla kwasów i estrów zawierających grupę karbonylową w innych pozycjach niż pozycja beta.

3.8.4. Kwas pirogronowy i jego pochodne



Schemat 54: Transestryfikacja pirogronianów

Lp.	R=	Alkohol	Wyd. (%)
1	H	<i>R</i>	<1%
2	H	<i>S</i>	<1%
3	Et	<i>R</i>	<1%
4	Et	<i>S</i>	<1%
5	<i>tert</i> -Bu	<i>R</i>	<1%
6	<i>tert</i> -Bu	<i>S</i>	43%

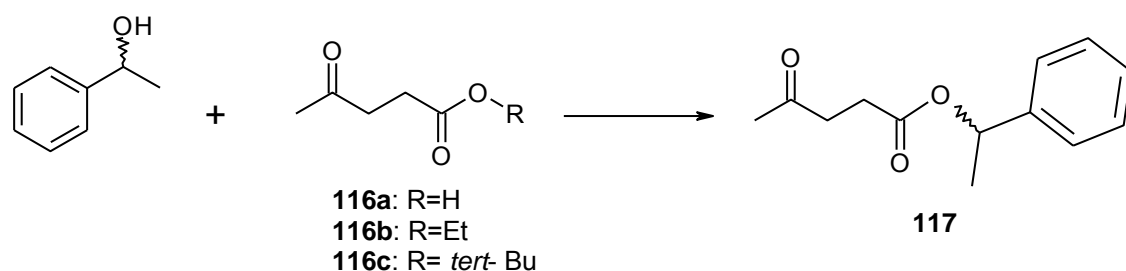
Tabela 25: Transestryfikacja pirogronianów

Kolejnymi związkami użytymi do badań był kwas pirogronowy oraz jego ester etylowy i *tert*-butylowy. Związki te zawierają grupę karbonylową w pozycji α . Przeprowadzono reakcję transestryfikacji katalizowaną przez Novozym, a wyniki są przedstawione

w Tabeli 25. Dla kwasu pirogronowego i jego estru etylowego uzyskano tylko ślady produktu. Reakcja nie jest więc ani wydajna, ani enancjoselektywna. Natomiast dla pirogronianu *tert*-butylu i enancjomeru *S* otrzymano enancjomerycznie czysty ester

z wydajnością 43% (lp. 6), podczas gdy zastosowanie drugiego enancjomeru alkoholu jako substratu prowadziło do uzyskania jedynie śladowych ilości produktu. W tych samych warunkach kwas oraz ester etylowy nie ulegają reakcji, podczas gdy ester *tert*-butylowy jest substratem do enzymatycznej transestryfikacji, a reakcja ta jest wysoce enancjoselektywna.

3.8.5. Kwas lewulinowy i jego pochodne



Schemat 55: Transestryfikacja lewulinianów

Kolejną grupą substratów użytą do badań były kwas lewulinowy oraz jego ester etylowy i *tert*-butylowy – związki zawierające grupę karbonylową w pozycji γ . Wyniki reakcji transestryfikacji z obydwoma enancjomerami 1-fenyletanolu dla kwasu lewulinowego i jego estrów: etylowego i *tert*-butylowego z Novozymem jako katalizatorem są przedstawione w Tabeli 26.

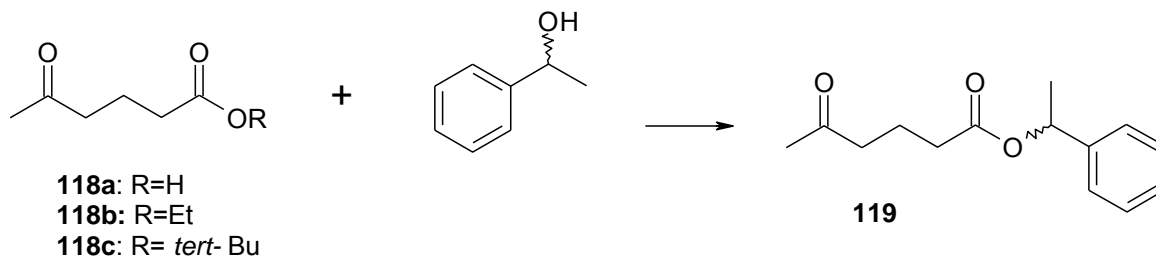
Lp.	Alkohol	R=	Wyd. dla Novozymu (%)	Wyd. dla Lipozymu (%)
1	S	H	10	<1
2	R	H	83	9
3	S	Et	8	<1
4	R	Et	2	12
5	S	<i>tert</i> -Bu	<1	<1
6	R	<i>tert</i> -Bu	<1	<1

Tabela 26: Transestryfikacja pochodnych kwasu lewulinowego

Dla kwasu lewulinowego enancjomer R reaguje szybciej, więc produkt otrzymano z wydajnością 83% (lp. 2), natomiast alkohol o konfiguracji S dawał produkt z wydajnością 10% (lp. 1), co oznacza, że reakcja jest enancjoselektywna. Zastosowanie jako substratu estru etylowego kwasu lewulinowego oraz enancjomeru S alkoholu prowadzi do powstania odpowiedniego estru, ale z wydajnością zbliżoną do reakcji enancjomeru R alkoholu. Reakcja jest w jakimś stopniu enancjoselektywna, ale mamy do czynienia ze zmianą stereopreferencji. Dla estru *tert*-butylowego dla obu enancjomerów uzyskano śladowe ilości produktu. Aby sprawdzić ogólność tego zjawiska, eksperymenty powtórzono dla innego enzymu, którym był Lipozym. Dla kwasu ten sam enancjomer reaguje w przewadze, natomiast szybkość reakcji jest dużo niższa. Dla estru etylowego zmiana enzymu poskutkowała zmianą stereopreferencji – enancjomer R reaguje szybciej. Wyniki reakcji transestryfikacji dla estru *tert*-butylowego pokrywają się z poprzednimi. Oznacza to, że kiedy grupa karbonylowa jest w pozycji γ , transestryfikacja estru *tert*-butylowego staje się nieefektywna.

3.8.6. Kwas 5-oksoheksanowy i jego pochodne

Kolejnymi substratami do badań był kwas 5-oksoheksanowy i jego estry. Związki te zawierają grupę karbonylową oddzieloną trzema atomami węgla od grupy estrowej. Przeprowadzono ten sam szereg eksperymentów dla kwasu 5-oksoheksanowego, jego estru etylowego i *tert*-butylowego. Dla kwasu i estru etylowego enancjomer *R* reaguje szybciej, reakcja estru jest bardziej enancjoselektywna, a produkt uzyskano z wyższą wydajnością. Dla estru *tert*-butylowego dla obu enancjomerów uzyskano śladowe ilości produktu. Oznacza to, że jeżeli grupa karbonylowa estru *tert*-butylowego jest w pozycji dalszej niż β, produkt tworzy się bardzo powoli.



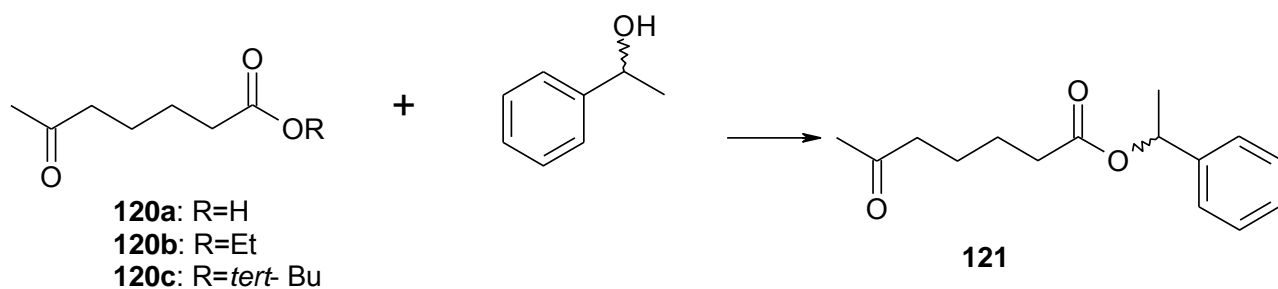
Schemat 56: Transestryfikacja kwasu 5-oksoheksanowego i jego pochodnych

Lp.	R=	Alkohol	Wyd. (%)
1	H	<i>R</i>	72
2	H	<i>S</i>	1
3	Et	<i>R</i>	36
4	Et	<i>S</i>	2
5	<i>tert</i> -Bu	<i>R</i>	2
6	<i>tert</i> -Bu	<i>S</i>	<1

Tabela 27: Transestryfikacja kwasu 5-oksoheksanowego i jego pochodnych

Reakcja kwasu 5-oksoheksanowego z alkoholem jest wysoce enancjoselektywna, reakcja estru etylowego również, ale w mniejszym stopniu, natomiast ester *tert*-butylowy praktycznie nie ulega reakcji enzymatycznej transestryfikacji.

3.8.7. Kwas 6-oksoheptanowy i jego pochodne



Schemat 57: Transestryfikacja kwasu 6-oksoheptanowego i jego pochodnych

Lp.	R =	Alkohol	Wyd. (%)
1	H	<i>R</i>	53
2	H	<i>S</i>	5
3	Et	<i>R</i>	19
4	Et	<i>S</i>	3
5	<i>tert</i> -Bu	<i>R</i>	5
6	<i>tert</i> -Bu	<i>S</i>	<1

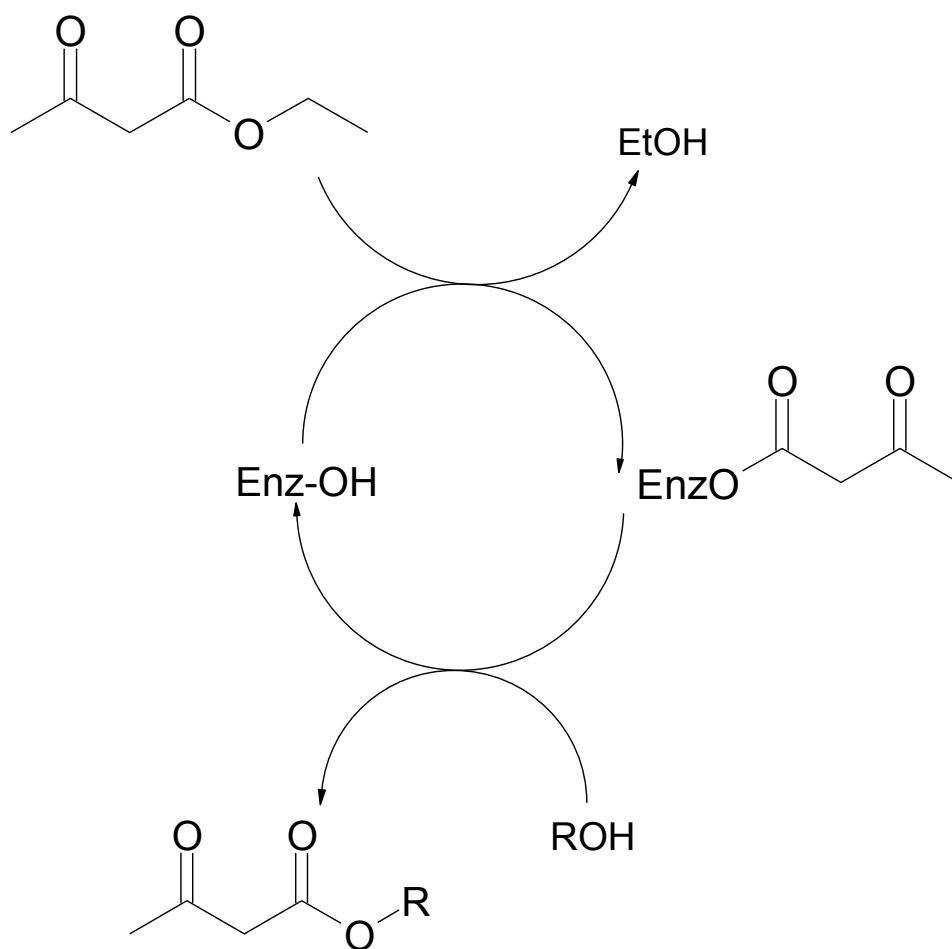
Tabela 28: Transestryfikacja kwasu 6-oksoheptanowego i jego pochodnych

Kolejnym substratem w tej serii badań był kwas 6-oksoheptanowy i jego estry, związki zawierające grupę karbonylową, oddaloną o 4 atomy węgla od grupy estrowej. Wyniki są przedstawione w Tabeli 32. Dla kwasu reakcja jest enancjoselektywna, enancjomer *R* powstaje w przewadze. Podobnie dla estru etylowego, gdzie wydajności są niższe, ale zachowana jest ta sama stereopreferencja. Dla estru *tert*-butylowego przeciwny enancjomer reaguje szybciej, jednak otrzymano produkty z niskimi wydajnościami. Potwierdza to tezę, że estry *tert*-butylowe, posiadające grupę karbonylową w dalszej pozycji niż β nie ulegają bądź ulegają bardzo wolno reakcjom enzymatycznej trans estryfikacji.

3.8.8. Proponowany mechanizm

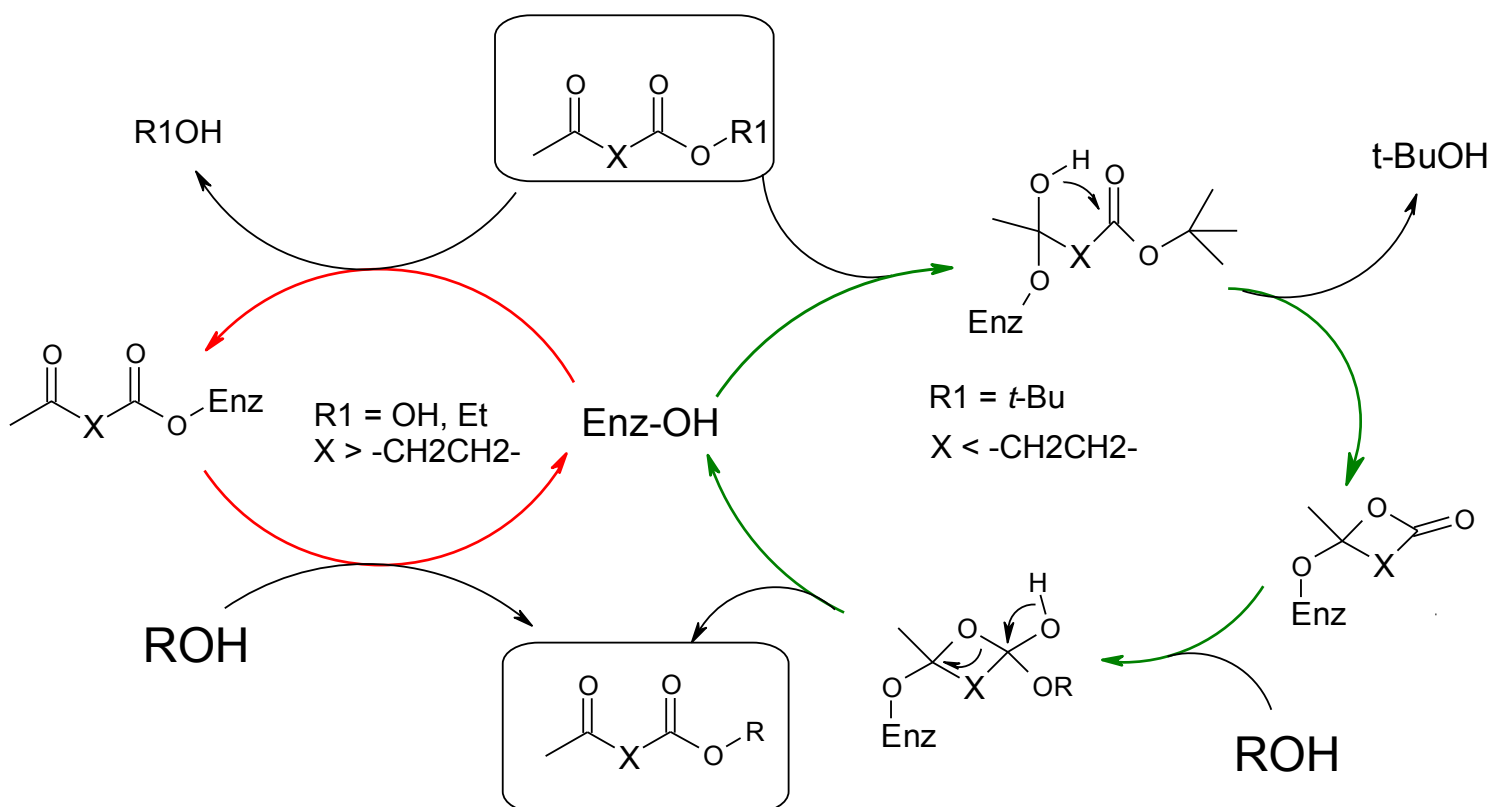
Przeprowadzone eksperymenty wykazują, że estry *tert*-butylowe zawierające grupę karbonylową w pozycji α i β są substratami dla enzymatycznej transestryfikacji, reakcje z ich udziałem są enancjoselektywne, a enancjoselektywność różni się od wyników uzyskanych dla estrów etylowych bądź kwasów. Zaproponowano mechanizm tych reakcji, który dla estrów *tert*-butylowych nie może być taki sam jak dla estrów etylowych.

W reakcji enzymatycznej transestryfikacji acetylooctanu etylu grupa hydroksylowa reszty seryny centrum aktywnego enzymu atakuje centrum elektrofilowe acetylooctanu etylu, tworzy się kompleks acyl-enzym, odchodzi cząsteczka etanolu. W następnym etapie acyl-enzym reaguje z alkoholem R-OH i tworzy się nowy acetylooctan (Schemat 58).



Schemat 58: Mechanizm transestryfikacji acetylooctanu etylu

Komercyjnie dostępne enzymy nie akceptują estrów *tert*-butylowych jako substratów. Ponieważ produkty transestryfikacji acetylooctanu *tert*-butylu otrzymano z bardzo dobrymi wydajnościami, mechanizm tej reakcji musi być odmienny. Najprawdopodobniej enzym jako nukleofil atakuje drugie centrum elektrofilowe. Po ataku wolnej pary elektronowej atomu tlenu na grupę karbonylową tworzy się pierścień czteroczłonowy. W następnym etapie odchodzi cząsteczka *tert*-butanolu, a cząsteczka alkoholu atakuje grupę karbonylową i powstaje nowy acetylooctan.



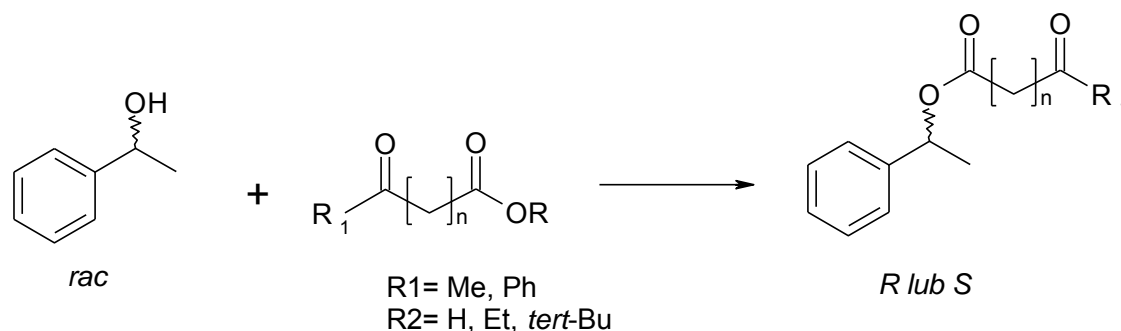
Schemat 59: Proponowany mechanizm transestryfikacji ketoestrów *tert*-butylu ($X=(CH_2)_n$)

Dla acetylooctanu *tert*-butylu i estru *tert*-butylowego kwasu 3-okso-3-fenylpropionowego produkty transestryfikacji uzyskano z dobrymi wydajnościami. Pierścień czteroczłonowy tworzony jako produkt pośredni nie jest stabilny i łatwo reaguje z alkoholem. Dla pirogronianu *tert*-butylu tworzy się pierścień 3-członowy, który również szybko ulega rozerwaniu.

Dla estrów kwasów: lewulinowego, 5-oksoheksanowego i 6-oksoheptanowego tworzą się odpowiednio pierścienie pięcio-, sześć- i siedmioczłonowe. Te pierścienie są bardzo stabilne i niełatwo ulegają rozerwaniu. Atak nukleofila jest wolniejszy, a co za tym idzie, tworzenie się produktu również następuje dużo wolniej.

Wszystkie pierścienie tworzące się w tych reakcjach powstają zgodnie z regułami Baldwina: pierścień 3-członowy (3-*exo-trig*), 4-członowy (4-*exo-trig*), 5-członowy (5-*exo-trig*), 6-członowy (6-*exo-trig*), 7-członowy (7-*exo-trig*).

3.8.9. Rozdział kinetyczny keto-kwasów i pochodnych



Schemat 60: Rozdział kinetyczny racemicznego 1-fenyletanolu katalizowany Novozymem

Lp.	R ₂ =	R ₁ =	N=	Kon. (%)	ee _s (%)	E
1	<i>tert</i> -Bu	Me	0	20	23 (<i>S</i>)	30
2	<i>tert</i> -Bu	Me	1	59	75 (<i>S</i>)	6.9
3	<i>tert</i> -Bu	Ph	1	45	47 (<i>S</i>)	5.8
4	H	Me	2	34	50 (<i>R</i>)	110
5	H	Me	3	23	29 (<i>R</i>)	90
6	Et	Me	3	16	18 (<i>R</i>)	42
7	H	Me	4	27	32 (<i>R</i>)	19
8	Et	Me	4	25	27 (<i>R</i>)	12

Tabela 29: Wyniki rozdziału kinetycznego wybranych ketokwasów i ich estrów

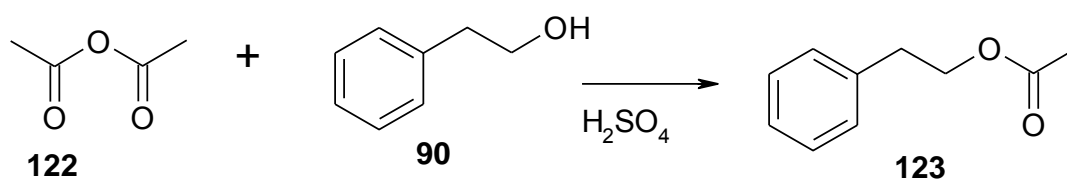
Dla szeregu ketokwasów i estrów w reakcji z obydwojoma enancjomerami 1-fenyletanolu otrzymano różne wydajności, co wskazuje na to, że reakcje są enancjoselektywne. Celem tej serii eksperymentów było przeprowadzenie rozdziału kinetycznego racemicznego 1-fenyletanolu z zastosowaniem tych substratów oraz porównanie efektu kinetycznego enzymu w obecności racemicznego alkoholu i pojedynczych enancjomerów. Do eksperymentu wybrano te związki, które reagowały z jednym enancjomerem ze znacznie większą szybkością: pirogronian *tert*-butylu, acetylooctan *tert*-butylu, ester *tert*-butylowy kwasu 3-fenyl-3-

oksopropanowego, kwas lewulinowy, kwas 5-oksoheksanowy i jego ester etylowy oraz kwas 6-oksoheptanowy i jego ester etylowy. Wyniki zostały przedstawione w Tabeli 29. W każdym przypadku ten sam enancjomer co w poprzednim eksperymencie powstaje w nadmiarze, co oznacza, że wszystkie te reakcje są enancjoselektywne. Dla estrów *tert*-butylowych jest preferowany alkohol o konfiguracji *S*, podczas gdy dla kwasów i estrów etylowych – enancjomer *R*, co potwierdza otrzymane wcześniej wyniki. Dla kwasu lewulinowego otrzymano produkt z bardzo wysoką enancjoselektywnością, natomiast dalsze zwiększenie ilości atomów węgla między grupą karbonylową i karboksylową powoduje zmniejszenie enancjoselektywności. Dla estrów etylowych otrzymano produkty z niższą enancjoselektywnością niż dla kwasów. Badania potwierdzają, że α i β -ketoestry *tert*-butylowe są substratami dla enzymów w reakcjach transestryfikacji, a reakcje z ich udziałem są enancjoselektywne. Ponadto stereopreferencja estrów *tert*-butylowych we wszystkich przypadkach jest odwrotna niż dla estrów etylowych i kwasów, co potwierdza tezę, że mechanizm tych transestryfikacji jest odmienny.

3.8.10. Reakcja podwójnej transestryfikacji

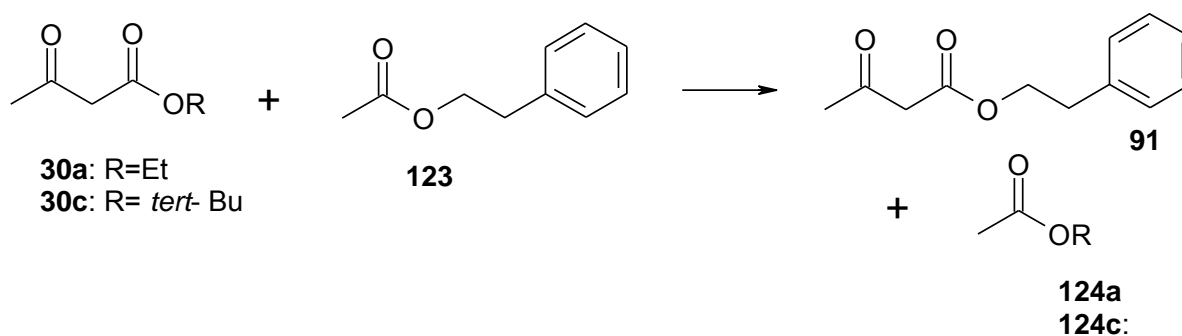
Wykonane uprzednio badania wykazały przydatność hydrolaz do reakcji transestryfikacji. Interesującym wariantem tej reakcji jest zastosowanie jako substratów dwóch estrów o różnej budowie chemicznej i sprawdzenie, czy enzymy mogą katalizować selektywnie reakcję transestryfikacji. Klasyczna kataliza będzie w tym przypadku prowadziła do powstania statystycznej ilości 4 estrów.

Aby uzyskać odpowiedź na to pytanie, wykonano syntezę modelowego estru, pokazaną na schemacie 61:



Schemat 61: Synteza octanu 2-fenyletanolu

W kolejnej serii eksperymentów poddano reakcji transestryfikacji mieszaninę estrów pokazaną na schemacie 62:



Schemat 62: Reakcja podwójnej transestryfikacji

W badaniach przesiewowych stwierdzono, że 8 enzymów katalizuje tę reakcję.

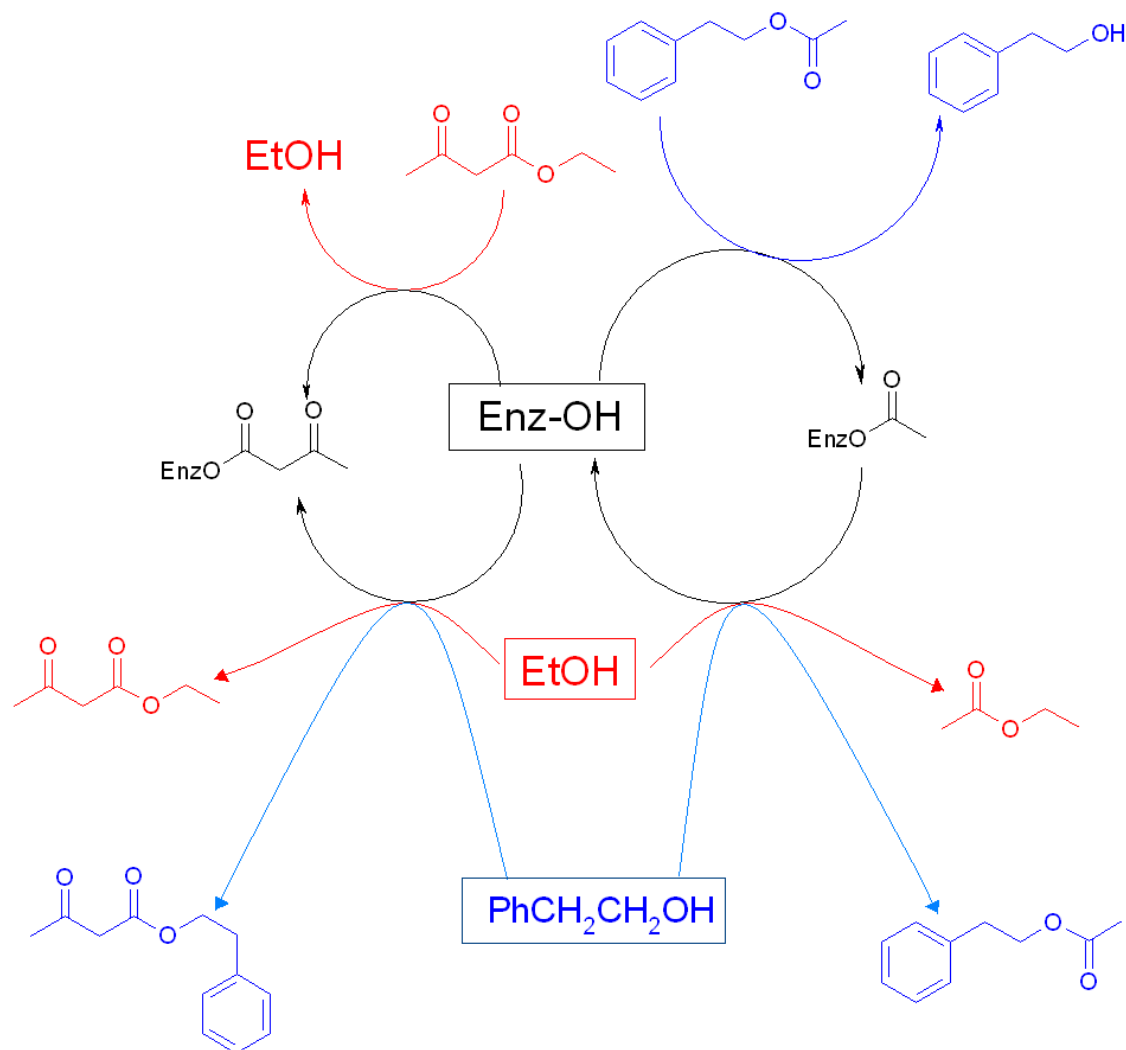
Następnie wykonano reakcje z acetylooctanem etylu i *tert*-butylu z octanem 2-fenyletanolu prowadzone w toluenie przez 24 godziny, katalizowane wyselekcjonowanymi enzymami. Wyniki przedstawione są w Tabeli 31

Lp.	Enzym	R=	Wyd. (%)
1	Novozym	Et	37 (38 ^a)
2	Novozym	<i>tert</i> -Bu	<1 (49 ^a)
3	Lipozym	Et	3
4	Lipozym	<i>tert</i> -Bu	2
5	Lipaza z <i>Rhizopus niveus</i>	Et	1
6	Lipaza z <i>Rhizopus niveus</i>	<i>tert</i> -Bu	1
7	Proteaza z <i>Rhizopus</i>	Et	1
8	Proteaza z <i>Rhizopus</i>	<i>tert</i> -Bu	1
9	Papaina	Et	4
10	Papaina	<i>tert</i> -Bu	11
11	Alkalaza CLEA	Et	1
12	Alkalaza CLEA	<i>tert</i> -Bu	1
13	Lipaza z <i>Rhizopus arrhizus</i>	Et	1
14	Lipaza z <i>Rhizopus arrhizus</i>	<i>tert</i> -Bu	1
15	Proteaza z <i>Bacillus</i>	Et	1
16	Proteaza z <i>Bacillus</i>	<i>tert</i> -Bu	1

Tabela 30: Wyniki reakcji podwójnej transestryfikacji po 24 godzinach (^a wydajność po wydłużeniu czasu do 6 dni)

Przebadano szereg enzymów i okazało się, że tylko 2 katalizują tę reakcję z wydajnością powyżej 10% – Novozym i papaina. Dla Novozymu w reakcji transestryfikacji z acetylooctanem etylu, produkt (acetylooctan 2-fenylloetanolu) uzyskano z wydajnością 37% w czasie 24 godzin (lp. 1), podczas gdy dla acetylooctanu *tert*-butylu uzyskano tylko śladowe tego produktu (lp. 2). W reakcji

katalizowanej przez papainę ester *tert*-butylowy reaguje szybciej (lp. 10). Widać bardzo wyraźny wpływ grupy opuszczającej na wydajność. Reakcję z Novozymem powtórzono, wydłużając czas do 6 dni. Okazało się, że dla acetylooctanu etylu wydłużenie czasu nie ma żadnego wpływu na wydajność. Natomiast dla acetylooctanu *tert*-butylu otrzymano produkt z wydajnością 49%. Oznacza to, że enzym precyzyjnie reaguje na substrat, a otrzymane wyniki potwierdzają, że mechanizm reakcji transestryfikacji acetylooctanem etylu i *tert*-butylu jest odmienny.



Schemat 63: Mechanizm reakcji transestryfikacji octanu 2-fenyletanolu i acetylooctanu etylu

Reakcja transestryfikacji octanu 2-fenyletanolu i acetylooctanów jest reakcją bardzo złożoną. Jej prawdopodobny przebieg z acetylooctanem etylu został przedstawiony na Schemacie 63. Enzym równolegle reaguje z acetylooctanem etylu,

tworzy się acetylowany enzym i etanol (co oznaczono kolorem czerwonym) oraz z octanem fenyloetanolu, tworząc acylowany enzym i fenyloetanol (oznaczono to kolorem niebieskim). Powstały etanol może reagować z acetylowanym enzymem, dzięki czemu odtwarza się acetylooctan etylu lub z acylowanym enzymem, tworząc octan etylu. Z kolei powstały 2-fenyloetanol w reakcji z acetylowanym enzymem daje acetylooctan 2-fenyloetanolu, natomiast w reakcji z acylowanym enzymem odtwarza się użyty jako substrat octan 2-fenyloetanolu. Ponieważ reakcja ta jest złożona i w jej wyniku tworzy się więcej produktów, powstawanie acetylooctanu 2-fenyloetanolu jest wolniejsze niż dla zwykłej transestryfikacji.

3.8.11. Podsumowanie rozdziału

Przeprowadzono badania nad mechanizmem reakcji transestryfikacji acetylooctanu *tert*-butylu. Przygotowano reakcje transestryfikacji estrów *tert*-butylowych zawierających grupę karbonylową w różnych pozycjach z obydwoma enancjomerami 1-fenyloetanolu. Dla związków zawierających grupę karbonylową w pozycji α i β reakcje są efektywne i enancjoselektywne, podczas gdy dla związków zawierających tę grupę w dalszych pozycjach uzyskano śladowe ilości produktu. Przeprowadzony rozdział kinetyczny potwierdza otrzymane wyniki oraz wykazuje, że stereopreferencja estrów *tert*-butylowych jest odwrotna niż estrów etylowych. Zaproponowano mechanizm, wyjaśniający to zjawisko. W reakcji ketoestrów *tert*-butylowych z alkoholem, jako produkt pośredni tworzy się pierścień, którego wielkość decyduje o dalszym przebiegu reakcji. Dla nietrwałych pierścieni 3- i 4-członowych produkt tworzy się szybciej, reakcja jest wydajna i enancjoselektywna. Dla trwałych pierścieni 5-, 6- i 7-członowych reakcja jest bardzo wolna i otrzymano śladowe ilości produktu.

4. Wnioski końcowe

W niniejszej pracy zaprezentowano wyniki badań nad katalizowaną hydrolazami reakcją transestryfikacji w rozpuszczalnikach organicznych na wybranych związkach modelowych.

Rozdział kinetyczny adduktów reakcji Baylisa-Hillmana przez transestryfikację po dobraniu odpowiednich warunków (enzymu, rozpuszczalnika) jest bardzo dobrą metodą otrzymywania związków enancjomerycznie czystych. Hydroliza enzymatyczna adduktów Baylisa-Hillmana przebiega z niską enancjoselektywnością.

Transestryfikacja kwasów karboksylowych węglanem dietylu, katalizowana przez mieszaninę enzymów, jest bardzo efektywną metodą otrzymywania estrów etylowych i spełnia wymogi zielonej chemii.

Wykonane badania nad opracowaniem rozdziału kinetycznego kwasu *trans*-2-fenylocyklopropano-1-karboksylowego poprzez transestryfikację z zastosowaniem różnych enzymów oraz donorów grupy etoksylowej wykazały, że nie jest możliwe uzyskanie produktów z wysoką enancjoselektywnością. Jednocześnie stwierdzono, że enzymatyczna hydroliza tej klasy związków po dobraniu odpowiednich warunków pozwala na uzyskanie produktów z wysoką enancjoselektywnością.

Transestryfikacja β -ketoestrów alkoholami katalizowana pojedynczym enzymem jest mniej wydajna niż mieszanina enzymów. Metoda ta pozwala otrzymywać tej klasy związki z wysokimi wydajnościami, a ponadto jest łatwa w wykonaniu, niewymagająca zastosowania zmniejszonego ciśnienia i przyjazna środowisku. Opracowana metoda transestryfikacji jest bardzo dobrą alternatywą dla metod wykorzystujących octan winylu i propargilu jako substraty. Stwierdzono, że acetylooctan *tert*-butylu jest dogodnym reagentem do reakcji enzymatycznej transestryfikacji. Uzyskano wyniki, dla których stereoselektywność reakcji transestryfikacji estrów *tert*-butylowych i etylowych jest przeciwna, co wskazuje na to, że mechanizm reakcji obu reagentów dla tego samego enzymu w identycznych warunkach jest odmienny. Zaproponowano mechanizm reakcji enzymatycznych,

wyjaśniający to zjawisko, w którym procesy przebiegają zgodnie z regułami Baldwina.

Reakcja podwójnej transestryfikacji jest również katalizowana przez enzymy, a dla odpowiednich enzymów produkty uzyskiwane są z wydajnościami, które nie byłyby możliwe do osiągnięcia w układach niekatalizowanych.

Podsumowując, w pracy zaprezentowano wyniki badań nad reakcją transestryfikacji katalizowanej hydrolazami w rozpuszczalnikach organicznych. Ponadto wykonane badania zostały rozszerzone o enzymatyczne reakcje hydrolizy i estryfikacji, aby porównać otrzymane wyniki z wynikami uzyskanymi dla reakcji transestryfikacji.

5. Część eksperymentalna

Uwagi ogólne

Widma NMR wykonano na aparacie Varian Gemini 200 (200 MHz) i 400 (400 MHz). Widma rejestrowano w CDCl_3 , z TMS jako wzorcem wewnętrznym. Przesunięcia sygnałów (δ) podano w ppm, a stałe sprzężenia (J) w hercach (Hz). Widma masowe zarejestrowano na aparacie API-365. Pomiar skracalności właściwej zostały wykonane na spektrofotometrze Jasco DIP-360 przy długości fali (λ) 254nm, z użyciem kuwety 1dm o pojemności 1.2 ml. Analizy elementarne wykonano w pracowni Mikroanalizy PAN, używając aparatu CHN Perkin-Elmer 240. Temperatury topnienia podano bez korekt.

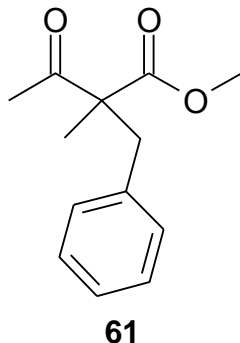
Analizy HPLC wykonano, używając aparatu LC-6A Shimadzu z detektorem UV SPD-6A i analizatorem Chromatopac C-6A. Nadmiary enancjomeryczne określono za pomocą HPLC i z zastosowaniem kolumny chiralnej Chiralcel OD-H (5 μ , 4.6 mm ϕ x 250 mm, Diacel Chemical Ind., Ltd.) zaopatrzonej w prekolumnę (0 μ , 4 mm ϕ x 10 mm). Nadmiary diastereoizomeryczne określono za pomocą HPLC z zastosowaniem kolumny Kromasil, Si 60 (7 μ , 4.6 mm ϕ x 250 mm).

Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Do analiz TLC używano płytek aluminiowych pokrytych Kieselgel 60 F₂₅₄ firmy Merck. Oczyszczanie związków za pomocą chromatografii kolumnowej wykonano, używając żelu krzemionkowego firmy Merck, Kieselgel 60 (230-400 mesh).

Wykorzystane reagenty były komercyjnie dostępne, natomiast przy związkach niekomercyjnych podano sposób ich otrzymywania. Używane rozpuszczalniki były czystości analitycznej. Jako eluenty do chromatografii kolumnowej i analiz HPLC stosowano: heksan, octan etylu, chloroform, metanol, izopropanol, heptan, które oczyszczono dodatkowo przez destylację.

Badania nad rozdziałem kinetycznym estru metylowego kwasu 2-benzyl-2-metylo-3-oksomasłowego katalizowanym enzymami

Synteza estru metylowego kwasu 2-benzyl-2-metylo-3-oksobutanowego 61^[61]



Ester metylowy kwasu 2-benzyl-2-metylo-3-oksobutanowego **61** został zsyntetyzowany z estru metylowego kwasu 2-metylo-3-okso-butanowego. Mieszanina chlorku benzoilu (18.9 g, 0.15 mola), 2-metyloacetylooctanu etylu (16.2 ml, 0.15 mola), bezwodnego K_2CO_3 (20.7g, 0.15 mola) w metanolu (100ml) ogrzewano pod chłodnicą zwrotną. Podczas ogrzewania obserwowano wydzielanie się gazu (dwutlenku węgla). Po około 3 godzinach, kiedy gaz przestał się wydobywać, dodano 30 ml zimnej wody, a mieszaninę reakcyjną zagęszczono na wyparce do około 50 ml. Pozostałość ekstrahowano octanem etylu (3 x 50 ml). Połączone warstwy organiczne przemyto 0.5 N HCl (50 ml), wysuszono siarczanem magnezu i odparowano rozpuszczalnik. Surowy produkt rekrytalizowano z heksanu, otrzymując bezbarwne kryształy z wydajnością 88%.

1H NMR ($CDCl_3$, 200 MHz) 1.09 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 2.8-3.17 (dd, 2H), 3.53 (s, 3H), 6.82-7.05 (m, 5H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 50 MHz) δ 19.24, 26.76, 40.76, 52.58, 61.09, 127.07, 128.45, 130.28, 136.57, 173.06.

Generalna procedura enzymatycznej hydrolizy

W kolbie 10 ml umieszczono ester metylowy kwasu 2-benzyl-2-metylo-3-oksobutanowego (0,5 mmol), 1.5 ml buforu fosforanowego (pH=7.4), 0.5ml

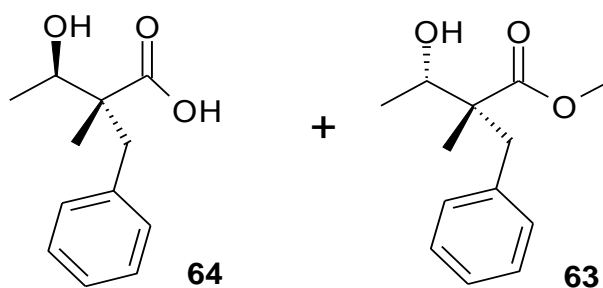
rozpuszczalnika (aceton lub acetonitryl). Reakcje prowadzone były w temperaturze pokojowej na wytrząsarce. Po 24 godzinach enzymy usunięto poprzez filtrację, a następnie odparowano rozpuszczalnik na wyparce. Substrat został wyekstrahowany octanem etylu (3x20ml). Warstwy organiczne połączone, przemyto NaHSO_4 , wysuszono MgSO_4 , a następnie odparowano rozpuszczalnik.

Oznaczenie nadmiarów enancjomerycznych estru metylowego kwasu 2-benzylo-2-metylo-3-oksobutanowego

Nadmiary enancjomeryczne oznaczono na HPLC używając kolumny chiralnej Chiralcel OD-H, w układzie hexan/*i*PrOH=95:5; przepływ =1mL/min; czasy retencji 7,6 min and 8,2 min.

Redukcja grupy karbonylowej estru metylowego kwasu 2-benzylo-2-metylo-3-oksobutanowego

Roztwór estru metylowego kwasu 2-benzylo-2-metylo-3-oksobutanowego (0.06 mol) w metanolu (60ml) umieszczono w kolbie. Roztwór NaBH_4 (0.022mol) w 2ml 2M NaOH i 11ml H_2O został wkroplony z prędkością 0.5 ml/min. Kolbę umieszczono w łaźni wodnej podczas wkraplania, tak, aby temperatura utrzymywała się w granicach 18-20°C. Kiedy temperatura przestała wzrastać, odparowano metanol, a resztę rozcieńczono H_2O . Produkt ekstrahowano eterem etylowym, fazę organiczną przemyto wodą, wysuszono MgSO_4 , a rozpuszczalnik odparowano.



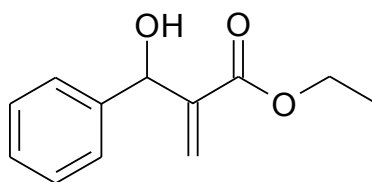
^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) 1.1 (s, 3H), 2.3 (s, 3H), 2.8-3.17 (dd, 2H), 3.53 (s, 3H), 4.05-4.16 (q, 1H), 6.82-7.05 (m, 5H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 19.24, 26.76, 40.76, 52.58, 61.09, 71.2, 127.07, 128.45, 130.28, 136.57, 173.2

Badania nad enzymatycznym rozdziałem kinetycznym adduktów reakcji Baylisa-Hilmana

Synteza estru etylowego kwasu 2-metyleno-3-fenylo-3-hydroksypropanowego 66^[62]

15 g benzaldehydu (0,14 mola), 25 ml akrylanu etylu (0,28 mola) oraz 5 g DABCO (0,047 mola) umieszczono w kolbie na mieszadle magnetycznym. Mieszano przez 72 godziny w temperaturze pokojowej. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono chlorkiem metylenu, przemyto 5% roztworem HCl, a następnie wodą. Suszono siarczanem sodu, po czym zatężono. Otrzymano produkt z wydajnością 88%.



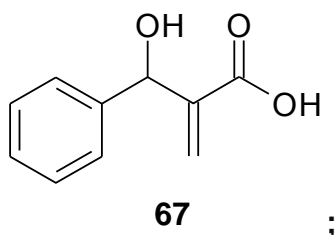
66

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.19-1.27 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 3.17 (s, 1H), 4.11-4.22 (k, $J = 7.0$ Hz, 2H), 5.56 (s, 1H), 5.81 (s, 1H), 6.33 (s, 1H), 7.3-7.37 (m, 5H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.28, 61.17, 73.55, 126.09, 126.79, 127.98, 126.6, 141.54, 166.54.

Synteza kwasu 2-metyleno-3-fenylo-3-hydroksypropanowego^[63]

Do roztworu estru metylowego kwasu 2-metyleno-3-fenylo-3-hydroksypropanowego (595mg, 3.1 mmola) w roztworze MeOH: H_2O (4ml, 2:1) dodano KOH (265 mg, 4 mmole) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 10 godzin. Warstwę wodną zakwaszono 5% HCl do pH=2, a następnie ekstrahowano eterem. Suszono siarczanem magnezu i odparowano rozpuszczalnik.



^1H NMR (CDCl_3) δ 2.04 (s, 1H), 5.54 (s, 1H), 5.94 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 7.25-7.36 (m, 5H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 73.6, 126.19, 126.73, 127.98, 126.6, 141.54, 166.54.

Generalna procedura hydrolizy

Ester etylowy kwasu 2-metyleno-3-fenilo-3-hydroksypropanowego (103mg, 0.5mmola) w 2 ml roztworu bufor fosforanowy/acetone (9:1) i 10 mg enzymu umieszczono w kolbie na mieszadle magnetycznym. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po odsączeniu enzymu i odparowaniu rozpuszczalnika wydzielono produkty za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan: octan etylu).

Generalna procedura estryfikacji

Kwas 2-metyleno-3-fenilo-3-hydroksypropanowego (88 mg, 0.5mmola) w 2 ml toluenu, donor grupy etoksydowej (2,5 mmola) i 10 mg enzymu umieszczono w kolbie na mieszadle magnetycznym. Reakcję prowadzono w temperaturze 50°C przez 24 godziny. Po odsączeniu enzymu i odparowaniu rozpuszczalnika wydzielono produkty za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan: octan etylu).

Oznaczanie nadmiarów enancjomerycznych

Nadmiary enancjomeryczne oznaczono na HPLC, używając kolumny chiralnej Chiralcel OD-H, w układzie hexan/iPrOH=90:10; przepływ=1mL/min; czasy retencji 14,8 min i 15,6 min.

Badania nad rozdziałem kinetycznym kwasu *trans* 2-fenilo-cyklopropano-1-karboksylowego i jego pochodnych

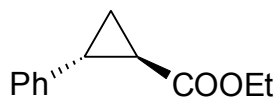
Synteza estru etylowego kwasu *trans* 2-fenilo-cyklopropano-1-karboksylowego

(69)^[64]

Kwas *trans* 2-fenilo-cyklopropano-1-karboksylowy jest komercyjnie dostępny w katalogu Aldrich.

Ester etylowy został zsyntetyzowany standardową procedurą estryfikacji.

Etanol, kwas siarkowy i Kwas *trans* 2-fenilo-cyklopropano-1-karboksylowy grzano pod chłodnicą zwrotną, a przebieg reakcji kontrolowano za pomocą TLC. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono, dodano wodę i octan etylu. Warstwę organiczną przemyto 10% wodorowęglanem sodu i wysuszono bezwodnym MgSO₄, a rozpuszczalnik odparowano. Otrzymano produkt z wydajnością 91%.



rac-69

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.17-1.24 (t, *J* = 7.2 Hz 3H), 1.2-1.25 (m, 1H), 1.45-1.59 (m, 1H), 1.78- 1.84 (m, 1H), 2.39-2.51 (m, 1H), 4.04-2.15 (k, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.0-7.21 (m, 5H)

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.49, 17.29, 24.42, 26.39, 60.933, 126.38, 128.7, 128.69, 140.35.

Generalna procedura enzymatycznej hydrolizy

Ester etylowego kwasu *trans* 2-fenilo-cyklopropano-1-karboksylowego (0,5 mmol), 5 ml mieszaniny (bufor (pH=7.4)/aceton) i 10 mg enzymu umieszczono w 10-ml kolbie. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej. Przebieg reakcji był kontrolowany za pomocą TLC. Po 2 godzinach enzymy zostały usunięte przez filtrację, a aceton odparowano na wyparce. Substrat ekstrahowano octanem etylu (3x

20ml). Połączone warstwy organiczne przemyto NaHSO_4 , wysuszono MgSO_4 i odparowano rozpuszczalnik.

Generalna procedura enzymatycznej estryfikacji

Roztwór kwasu trans 2-fenilo-cyklopropano-1-karboksylowego (0,5mmol) w toluenie (1ml), donor grupy etoksylowej (3 ekwiwalenty) i 10 mg enzymu umieszczono w 10-ml kolbie. Reakcję prowadzono w temperaturze 50°C . Przebieg reakcji był kontrolowany za pomocą TLC. Enzymy zostały usunięte przez filtrację, a produkt wyizolowano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (heksan/octan etylu).

Oznaczenie nadmiarów enancjomerycznych

Nadmiary enancjomeryczne oznaczono za pomocą HPLC, stosując kolumnę Chiralcel OD-H, układ hexan/iPrOH=90:10; przepływ = 1 mL/min; (-)-(R, R)-**69** 7.2 min i (S, S)-**69**:8.5 min

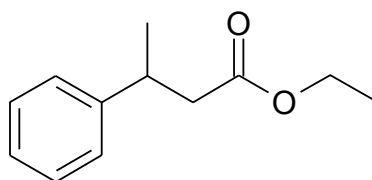
Badania nad rozdziałem kinetycznym kwasu 3-fenilo-3-metylopropionowego

Synteza estru etylowego kwasu 3-fenilo-3-metylopropionowego (**71**)^[65]

Kwas 3-fenilo-3-metylopropionowy jest komercyjnie dostępny w katalogu Aldrich.

Ester etylowy został zsyntetyzowany standardową procedurą estryfikacji.

Etanol, kwas siarkowy i kwas 3-fenilo-3-metylopropionowy grzano pod chłodnicą zwrotną, a przebieg reakcji kontrolowano za pomocą TLC. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono, dodano wodę i octan etylu. Warstwę organiczną przemyto 10% wodorowęglanem sodu i wysuszono bezwodnym MgSO_4 , a rozpuszczalnik odparowano. Otrzymano produkt z wydajnością 96%.



rac-71

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.57-1.2 (t, 3 H, $J= 8.2$), 1.29-1.31 (d, 3H, $J= 8.4$ Hz), 2.54-2.6 (q, 2H, $J = 8.4$), 3.24-3.31 (q, 1H, $J= 8.4$), 4.04-4.11 (q, 2H, $J= 8.2$), 7.18-7.36 (m, 5H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.3, 21.9, 36.6, 43.1, 60.3, 126.5, 126.9, 128.6, 145.9, 172.5.

Generalna procedura hydrolizy

Ester etylowy kwasu 3-fenylpropionowego (0,5 mmol), 5 ml mieszaniny (bufor (pH=7.4) 1.5 ml/aceton 3.5 ml) i 10 mg enzymu umieszczono w 10-ml kolbie. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej. Przebieg reakcji był kontrolowany za pomocą TLC. Po 2 godzinach enzymy zostały usunięte przez filtrację, a aceton odparowano na wyparce. Substrat ekstrahowano octanem etylu (3x20ml). Połączone warstwy organiczne przemyto NaHSO_4 , wysuszono MgSO_4 i odparowano rozpuszczalnik.

Generalna procedura estryfikacji

Roztwór kwasu 3-fenylpropionowego (0,5mmol) w toluenie (1ml), donor grupy etoksylovej (3 ekwiwalenty) i 10mg enzymu umieszczono w 10-ml kolbie. Reakcję prowadzono w temperaturze 50°C. Przebieg reakcji był kontrolowany za pomocą TLC. Enzymy zostały usunięte przez filtrację, a produkt wyizolowano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (heksan/octan etylu).

Oznaczanie nadmiarów enancjomerycznych

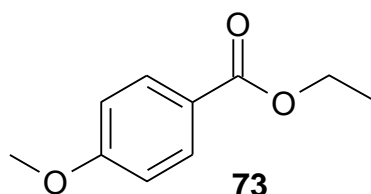
Nadmiary enancjomeryczne oznaczono za pomocą HPLC, stosując kolumnę Chiralcel OD-H, układ hexan/iPrOH=90:10; przepływ =1mL/min; czasy retencji: 10.03 min i 11.06 min.

Estryfikacja kwasów karboksylowych węglanem dietylu

Ogólna procedura estryfikacji

Do roztworu kwasu (1 mmol) w toluenie (1 ml), dodano węglan dietylu (2 mmol) i enzymy (4 mg każdego enzymu). Reakcję prowadzono przez 48 godzin w temperaturze 40°C na mieszadle magnetycznym. Po ochłodzeniu, mieszaninę reakcyjną przemyto NaHCO₃ (3×) i solanką (1×). Rozpuszczalnik usunięto na wyparce.

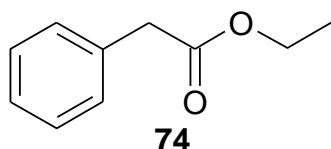
p-metoksybenzoesan etylu (73)^[66]



¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) ε 1.29–1.36 (t, J = 7.0 Hz, 3H), 3.86 (s, 3H), 4.21–4.32 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 7.78–7.85 (m, 2H), 7.99–8.09 (m, 2H).

¹³C NMR (CDCl₃, 200 MHz) ε 14.4, 55.3, 60.6, 113.3, 122.6, 131.3, 163.1, 166.7.

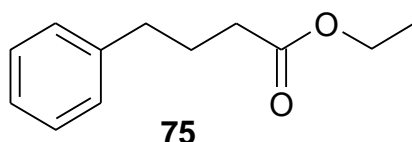
Fenylooctan etylu (74)^[67]



¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) ε 1.19–1.30 (t, J = 7.0 Hz, 3H), 3.60 (s, 2H), 4.09–4.21 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 7.22–7.36 (m, 5H).

¹³C NMR (CDCl₃, 200 MHz) ε 14.4, 41.6, 61.0, 127.2, 128.7, 129.1, 134.3, 171.4.

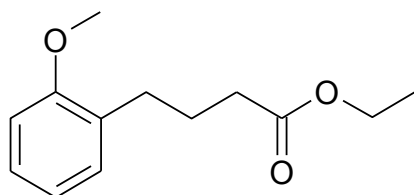
3-fenylopropionian etylu (75)^[68]



^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) ϵ 1.19–1.27 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 2.57–2.66 (t, 2H, $J = 7.9$ Hz), 2.91–2.99 (t, 2H, $J = 7.9$ Hz), 4.07–4.18 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 7.18–7.35 (m, 5H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 200 MHz) ϵ 14.5, 31.2, 36.3, 60.8, 126.6, 128.7, 130.2, 140.8, 173.0.

(o-metoksyfenylo)-propionian etylu (76)^[69]

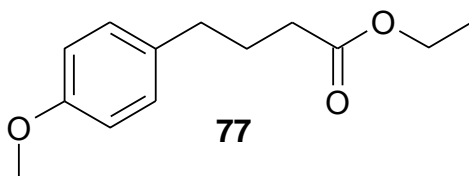


76

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) ϵ 1.16–1.25 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz), 2.51–2.63 (t, 2H, $J = 8.2$ Hz), 2.83–2.90 (t, 2H, $J = 8.2$ Hz), 3.78 (s, 3H), 4.07–4.17 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz), 6.85–7.15 (m, 4H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 200 MHz) ϵ 14.5, 26.1, 34.7, 53.0, 61.0, 111.0, 120.2, 127.8, 128.5, 131.1, 158.0, 173.5.

3-(p-metoksyfenylo)-propionian etylu (77)^[68]

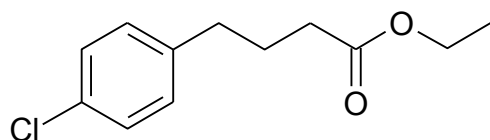


77

^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) ϵ 1.19–1.27 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz), 2.51–2.62 (t, 2H, $J = 8.2$ Hz), 2.85–2.91 (t, 2H, $J = 8.2$ Hz), 3.79 (s, 3H), 4.05–4.19 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz), 6.80–7.14 (m, 4H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 200 MHz) ϵ 14.7, 31.8, 36.0, 53.0, 61.0, 128.5, 129.3, 132.3, 140.0, 173.4.

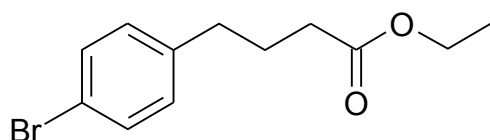
3-(p-chlorofenylo)-propionian etylu (78)^[68]



^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.19–1.27 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 2.55–2.63 (t, 2H, $J = 7.9$ Hz), 2.88–2.95 (t, 2H, $J = 7.9$ Hz), 4.07–4.17 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 7.11–7.27 (m, 4H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 14.8, 31.6, 36.0, 60.8, 128.1, 129.0, 132.1, 140.0, 173.0.

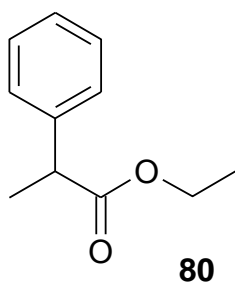
3-(p-bromofenyl)-propionian etylu (79)^[68]



^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.19–1.26 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 2.55–2.63 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 2.86–2.94 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 4.06–4.17 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 7.06–7.42 (m, 4H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 14.2, 30.3, 35.6, 60.5, 120.0, 130.1, 131.5, 139.5, 172.6.

2-fenylopropionian etylu (80)^[70]



^1H NMR(CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.16–1.24 (t,3H, $J = 7.0\text{Hz}$),1.45–1.49(d,3H, $J = 7.5\text{Hz}$), 3.67–3.72 (m,1H),4.10–4.19(q, $J = 7.0\text{Hz}$,2H),7.21–7.25(m,5H).

^{13}C NMR(CDCl_3 , 200MHz) δ 14.1, 18.8,45.6,61.3,127.1,127.6, 128.1, 140.3,174.6

Synteza estrów kwasu acetylooctowego katalizowana mieszaniną enzymów

Synteza acetylooctanu 2-fenylloetanolu

Roztwór 2-fenyletanolu (160 mg, 1.5 mmola) i acetylooctanu etylu (780 mg, 6 mmol) i 25 mg mieszaniny enzymów w 10 ml toluenu umieszczono w 20-ml fiołce. Reakcję prowadzono na wytrząsarce w temperaturze 40°C przez 24 godziny. Enzymy usunięto poprzez filtrację, a toluen odparowano. Surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (octan etylu/heksan), uzyskując 418 mg estru z wydajnością 98% jako bezbarwny olej.

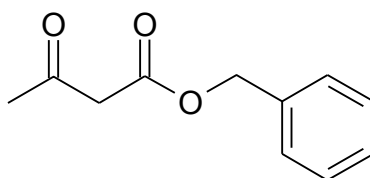
Siedem różnych mieszanin enzymatycznych użytych w screeningu

1. Lipaza z *Candida rugosa* (Sigma-Aldrich), lipaza typ II z *Porcine pancreas* (Sigma-Aldrich), cellulaza z *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich), acylaza I z *Aspergillus melleus* (Fluka).
2. Lipaza z *Candida lipolytica* (Sigma-Aldrich), lipaza z *Candida antarctica* (Sigma-Aldrich), lipaza z kielków pszenicy, Amano proteaza PS (Sigma-Aldrich).
3. Cellulaza typ VI z *Trichoderma viride* (Sigma-Aldrich), lizozym z kurzego jaja, pektynaza z *Rhizopus sp.*, Driselase *Basidiomycetes sp.* (Sigma-Aldrich)
4. Lipoprotein lipaza z *Pseudomonas sp.* (Sigma-Aldrich), lipaza z *Rhizopus niveus* (Sigma-Aldrich) papaina (Merck), Novozym 435 (Novo Nordisk).
5. Amano lipaza AK z *Pseudomonas fluorescens* (Sigma-Aldrich), lipaza z *Pseudomonas cepacia*, lipaza z *Hog pancreas* (Fluka), Amano lipaza PS z *Burkholderia cepacia* (Sigma-Aldrich).
6. Lipaza z *Mucor javanicus* (Sigma-Aldrich), lipaza z *Rhizopus arrhizus* (Sigma-Aldrich), lipaza z *Mucor miehei* (Sigma-Aldrich), lipaza z *Pseudomonas fluorescens* (Sigma-Aldrich).
7. Lipaza z *Chromobacterium viscosum* (Sigma-Aldrich), proteaza z *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich), lipaza z *Penicillium roqueforti* (Sigma-Aldrich), proteaza z *Bacillus amyloliquefaciens* (Sigma-Aldrich).

Ogólna procedura transestryfikacji

Roztwór alkoholu (0.5 mmol), acetylooctanu etylu lub *tert*-butylu (2 mmol) i 10 mg każdego z enzymów w 3 ml toluenie umieszczono w fiolkach 10-ml. Reakcję prowadzono w temperaturze 40°C przez 24 godziny. Enzymy usunięto poprzez filtrację, a toluen oraz acetylooctan usunięto na wyparce. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (octan etylu/heksan).

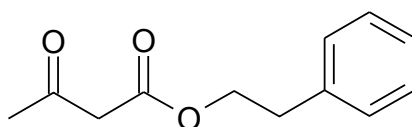
Acetylooctan benzylu (92)^[71]



¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 2.24 (s, 3H), 3.50 (s, 2H), 5.18 (s, 2H); 7.35-7.37 (m, 5H);

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 32.5, 71.6, 54.4, 132.6, 135.4, 136.3, 145.5, 175.2, 211.3.

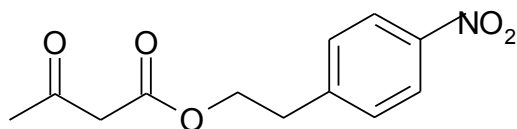
Acetylooctan 2-fenylloetanolu (93)^[72]



¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 2.20 (s, 3H), 2.96 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.43 (s, 2H); 4.37 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H); 7.22-7.31 (m, 5H);

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 26.5, 31.4, 46.5, 62.2, 123.1, 124.9, 125.3, 133.82, 167.1, 200.

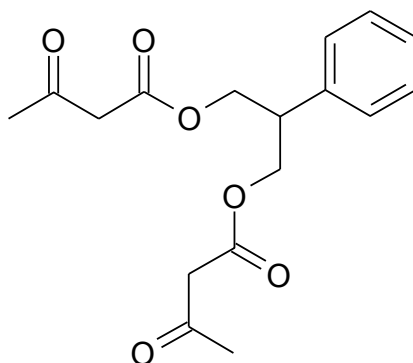
Acetylooctan 2-(4-nitrofenylo)-etanolu (94)^[73]



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 2.23 (s, 3H), 3.08 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.45 (s, 2H), 4.41 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 6.88 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H);

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 30.5, 34.9, 50.1, 64.9, 124.0, 129.9, 145.5, 167.1, 200.4.

2-benzylo-1,3-propanodiol diacetyloctan (95)



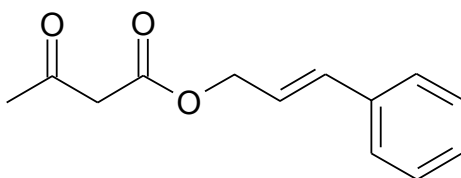
^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 2.28 (s, 6H), 2.32-2.39 (m, 1H), 2.69 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.48 (s, 4H), 4.11-4.21 (m, 4H); 7.16-7.30 (m, 5H);

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 30.4, 34.5, 39.3, 50.1, 64.5, 126.7, 128.8, 129.2, 138.5, 167.1, 200.6;

Analiza elementarna obliczona dla $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_6$; C 64.66%, H 6.63%, oznaczona C 64.63, H 6.67%;

HR ESIMS ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ obliczony dla $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{Na}$ 357.1314, oznaczony 357.1316

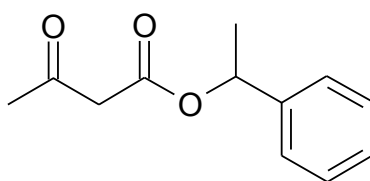
Ester cynamonowy kwasu acetylooctowego (96)^[74]



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 2.28 (s, 3H), 3.50 (s, 2H); 4.79 (dd, $J = 1.2, 5.2$ Hz, 2H); 6.24-6.31 (m, 1H), 6.66 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 7.26-7.4 (m, 5H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 30.4, 50.2, 66.1, 122.5, 126.8, 128.4, 128.8, 135.1, 136.1, 167.1, 200.6.

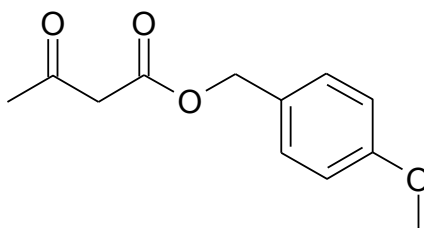
Acetyloctan 1-fenyletanolu (97)^[75]



^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.57 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 2.23 (s, 3H), 3.46 (s, 2H); 5.93 (q, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.26-7.36 (m, 5H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 22.1, 30.3, 50.6, 73.7, 126.3, 128.3, 128.8, 139.0, 164.5, 198.6.

Acetyloctan 4-metoksybenzylu (98)^[76]



^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 2.23 (s, 3H), 3.47 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 5.12 (s, 2H), 6.88 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H)

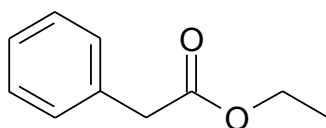
^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 30.4, 50.4, 55.5, 67.2, 114.2, 127.6, 130.5, 154.3, 168.5, 200.0.

Badania nad zastosowaniem acetylooctanu etylu do reakcji estryfikacji kwasów karboksylowych

Ogólna procedura estryfikacji

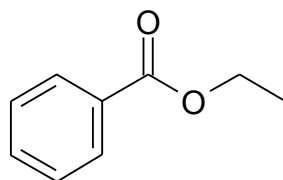
Kwas karboksylowy (1 mmol), acetylooctan etylu (5 mmoli, 650 mg), 5 mg każdego enzymu (Novozym, Lipaza z kielków pszenicy, Lipaza z *Mucor javanicus*, Lipaza z *Aspergillus oryzae*, Lipaza z *Pseudomonas fluorescens*) w 1 ml toluenu umieszczono w kolbie na mieszadle magnetycznym. Reakcję prowadzono w temperaturze 50°C przez 24 godziny. Enzymy odfiltrowano i odparowano rozpuszczalnik oraz nadmiar acetylooctanu etylu. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie heksan: octan etylu.

Fenylooctan etylu (100)^[66]



¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.19–1.30 (t, J = 7.0 Hz, 3H), 3.60 (s, 2H), 4.09–4.21 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 7.22–7.36 (m, 5H). ¹³C NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 14.4, 41.6, 61.0, 127.2, 128.7, 129.1, 134.3, 171.4.

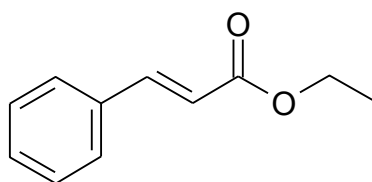
Benzoesan etylu (101)^[68]



¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.36–1.42 (t, 3H), 4.33–4.38 (q, 2H), 7.4–8.3 (m, 5H)

¹³C NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 14.3, 60.9, 128.5, 129.6, 130.4, 132.8, 166.7

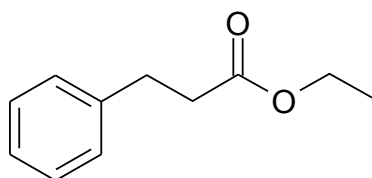
Cynamonian etylu (102)^[77]



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.34 (3H, t, J = 7.1 Hz), 4.27 (2H, q, J = 7.1), 6.44 (1H, d, J = 16.0), 7.37-7.69 (5H, m), 7.68 (d, J = 16 Hz, 1H)

¹³C NMR (CDCl₃, 200 MHz) ε 14.0, 60.15, 117.9, 144.2, 127.6, 128.6, 129.9, 134.2

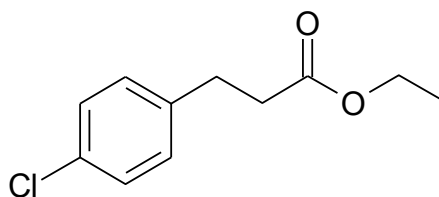
3-fenylopropionian etylu (103)^[68]



¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) ε 1.19–1.27 (t, 3H, J = 7.2 Hz), 2.57–2.66 (t, 2H, J = 7.9 Hz), 2.91–2.99 (t, 2H, J = 7.9 Hz), 4.07–4.18 (q, 2H, J = 7.2 Hz), 7.18–7.35 (m, 5H).

¹³C NMR (CDCl₃, 200 MHz) ε 14.5, 31.2, 36.3, 60.8, 126.6, 128.7, 130.2, 140.8, 173.0.

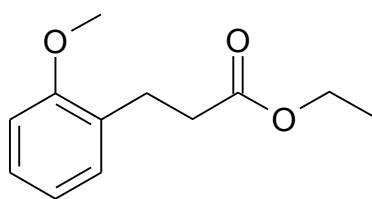
3-p-chloro-fenylopropionian etylu (104)^[68]



¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) ε 1.19–1.27 (t, 3H, J = 7.2 Hz), 2.55–2.63 (t, 2H, J = 7.9 Hz), 2.88–2.95 (t, 2H, J = 7.9 Hz), 4.07–4.17 (q, 2H, J = 7.2 Hz), 7.11–7.27 (m, 4H).

¹³C NMR (CDCl₃, 200 MHz) ε 14.8, 31.6, 36.0, 60.8, 128.1, 129.0, 132.1, 140.0, 173.0.

3-o-metoksy-fenylopropionian etylu (105)^[68]

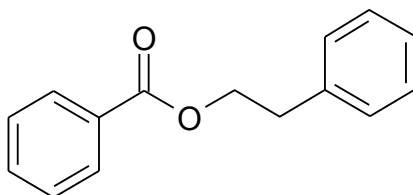


¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) ε 1.16–1.25 (t, 3H, J = 7.0 Hz), 2.51–2.63 (t, 2H, J = 8.2 Hz), 2.83–2.90 (t, 2H, J = 8.2 Hz), 3.78 (s, 3H), 4.07–4.17 (q, 2H, J = 7.0 Hz), 6.85–7.15 (m, 4H).

¹³C NMR (CDCl₃, 200 MHz) ε 14.5, 26.1, 34.7, 53.0, 61.0, 111.0, 120.2, 127.8, 128.5, 131.1, 158.0, 173.5.

Estry 2-fenyloetanolu

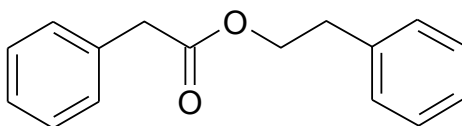
Benzoesan 2-fenyloetanolu (106)^[78]



¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) ε 2.9 – 3.1 (t, 2 H, J=7Hz), 4.4 – 4.6 (t, 2H, J= 7 Hz), 7.1-8.0 (m, 10H)

¹³C NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 35.0, 65.1, 126.6, 127.0, 128.5, 128.6, 129.0, 129.3, 134.1, 134.4, 137.5, 172.0

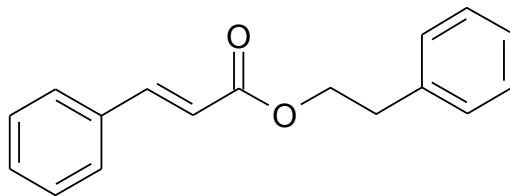
Fenyloctan 2-fenyloetanolu (107)^[79]



¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) ε 2.79-2.96 (t, 2H, J=7 Hz), 5.72 (s, 2H), 4.2-4.38 (t, 2H, J=7 Hz), 7.03-7.4 (m, 10H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 171.6, 137.8, 134.1, 129.4, 129.0, 128.6, 128.6, 127.1, 126.6, 65.4, 41.5, 35.

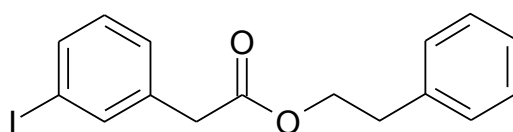
Cynamonian 2 –fenyloetanolu (108)^[80]



^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) ϵ 2.79-2.96 (t, 2H, J=7 Hz), 4.2-4.38 (t, 2H, J=7 Hz), 6.44 (1H, d, J = 16.0), 7.01-7.8 (m, 11H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 35.0, 64.2, 118.2, 126.6, 127.0, 128.5, 128.6, 128.8, 129.0, 129.3, 134.4, 139.5, 144.1, 166.0

m-jodo-fenylooctan 2-fenyloetanolu (109)

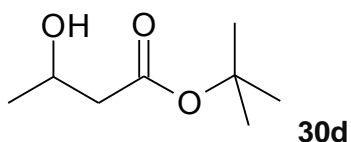


^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) ϵ 2.79-2.96 (t, 2H, J=7 Hz), 5.72 (s, 2H), 4.2-4.38 (t, 2H, J=7 Hz), 7.03-7.4 (m, 9 H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 171.6, 137.8, 134.1, 129.4, 129.0, 128.6, 127.1, 126.6, 65.4, 41.5, 35.1

Badania nad mechanizmem reakcji transestryfikacji acetylooctanu *tert*-butylu oraz innych estrów *tert*-butylowych zawierających grupę karbonylową

Synteza estru *tert*-butylowego kwasu 3-hydroksybutanowego 30d^[81]



Roztwór acetylooctanu *tert*-butylu (0.06 mol) w metanolu (60ml) umieszczono w kolbie. Roztwór NaBH₄ (0.022mol) w 2ml 2M NaOH i 11ml H₂O został wkroplony z prędkością 0.5 ml/min. Kolbę umieszczono w łaźni wodnej podczas wkraplania, tak aby temperatura utrzymywała się w granicach 18-20°C. Kiedy temperatura przestała wzrastać, odparowano metanol, a resztę rozcieńczono H₂O. Produkt ekstrahowano eterem etylowym, fazę organiczną przemyto wodą, wysuszono MgSO₄, a rozpuszczalnik odparowano.

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.18-1.22 (d, *J* = 8 Hz, 3H), 1.23-1.27 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 1.46 (s, 9H), 2.34-2.4 (m, 1H), 2.63 (s, 1H)

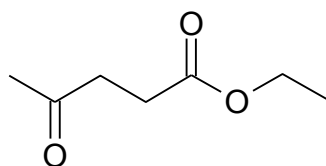
¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 22.48, 28.29, 43.97, 64.54, 81.44, 172.88

Generalna procedura otrzymywania estrów etylowych kwasów karboksylowych

Acetylooctan etylu, pirogronian etylu oraz ester etylowy kwasu 3-fenyl-3-okso-propanowego zostały zakupione w katalogu Aldrich. Pozostałe estry etylowe zostały otrzymane następującą metodą.

Etanol, kwas siarkowy (kat.) i kwas karboksylowy grzano pod chłodnicą zwrotną, a przebieg reakcji kontrolowano za pomocą TLC. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono, dodano wodę i octan etylu. Warstwę organiczną przemyto 10% wodorowęglanem sodu i wysuszono bezwodnym MgSO₄, a rozpuszczalnik odparowano.

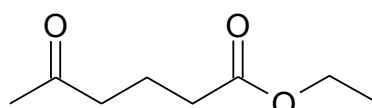
Lewulinian etylu 116b^[82]



^1H NMR (CDCl_3 , Bruker) δ 1.24-1.27 (t, $J = 7.1$ Hz 3H), 2.19 (s, 3H), 2.56-2.58 (t, $J = 6.5$ Hz 2H), 2.74-2.76 (t, $J = 6.5$ Hz 2H), 4.11-4.15 (k, $J = 7.1$ Hz, 2H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , Bruker) δ 14.11, 28.00, 29.8, 37.92, 60.57, 172.7, 206.62

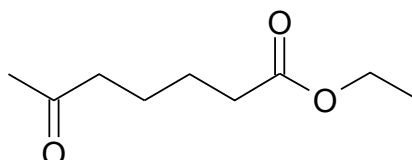
Ester etylowy kwasu 5-oksoheksanowego 118b^[83]



^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.14-1.31 (t, $J = 7$ Hz, 3H), 1.76-1.84 (q, $J = 7$ Hz, 2H), 2.07 (s, 3H), 2.22-2.29 (k, $J = 7$ Hz, 2H), 2.38-2.47 (k, $J = 7$ Hz, 2H), 4.03-4.11 (k, $J = 7$ Hz, 2H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.2, 19.5, 30.1, 33.2, 41.2, 60.0, 173.2, 209.2

Ester etylowy kwasu 6-oksoheptanowego 120b^[84]



^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.17 (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H), 1.52–1.53 (m, 4 H), 2.06 (s, 3 H), 2.23 (t, $J = 5.7$ Hz, 2 H), 2.38 (t, $J = 6$ Hz, 2 H), 4.01–4.08 (q, $J = 7.2$ Hz, 2 H)

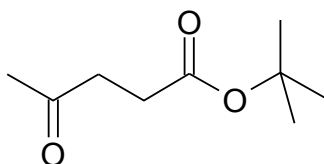
^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.4, 23.3, 24.5, 30.0, 34.2, 43.4, 60.5, 173.6, 207.3

Generalna procedura otrzymywania estrów *tert*-butylowych kwasów karboksylowych

Acetylooctan *tert*-butylu został zakupiony w katalogu Aldrich. Pozostałe estry *tert*-butylowe zostały zsyntetyzowane następującą metodą.

Do roztworu kwasu karboksylowego (5 mmoli) w chlorku metylenu (50 ml) w atmosferze argonu dodano DCC (1.32 g, 5 mmoli), *tert*-butanol (2.5 ml) i 4-DMAP (6.1 mg, 0.05 mmola). Po 40 godzinach mieszaninę reakcyjną wytrząsano z NaHCO₃ (50 ml), ekstrahowano chlorkiem metylenu (3 x 25 ml), a połączone warstwy organiczne wysuszono Na₂SO₄ i odparowano rozpuszczalnik. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/octan etylu).

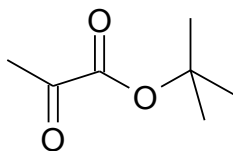
Lewulinian *tert*-butylu 116c^[85]



¹H NMR (CDCl₃, Bruker) δ 1.44 (s, 9H), 2.18 (s, 3H), 2.48-2.51 (t, *J* = 6.7 Hz 2H), 2.68-2.7 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H)

¹³C NMR (CDCl₃, Bruker) δ 28.04, 29.22, 29.86, 38.1, 80.56, 171.96, 206.8

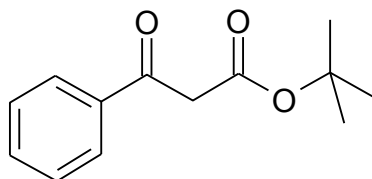
Pirogronian *tert* butylu 114c^[86]



¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.47 (s, 9H), 2.53 (s, 3H)

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 24.9, 27.2, 165.1, 200,2

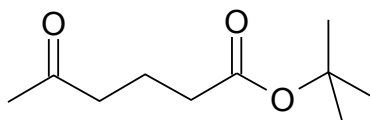
Ester *tert*-butylowy kwasu 3-fenylo-3-oksopropanowego 110c^[87]



¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.43 (s, 9H), 3.9 (s, 2H), 7.47-7.51 (m, 5H)

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 28.15, 47.63, 126.16, 128.71, 128.94, 133.78

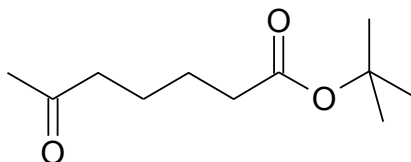
Ester tert-butyłowy kwasu 5-oksoheksanowego 118c^[88]



¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.44 (s, 9H), 1.77-1.89 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.21-2.27 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 2.42-2.54 (k, *J* = 7 Hz, 2H)

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 19.32, 28.32, 30,1, 34.71, 42.78

Ester tert-butyłowy kwasu 6-okso-heptanowego 120c^[89]



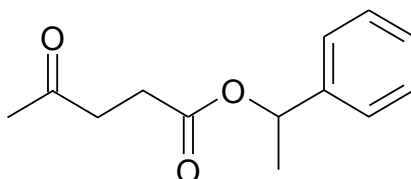
¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.46 (s, 9H), 1.5-1.62 (t, *J* = 7 Hz, 2H). 1.74-1.85 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 2.2 (s, 3H), 2.21-2.27 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 2.42-2.54 (k, *J* = 7 Hz, 2H)

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 19.32, 20.4, 28.32, 30,1, 34.71, 42.78

Generalna procedura otrzymywania estrów 1-fenyletanolu kwasów karboksylowych

Do roztworu kwasu karboksylowego (1 mmol) w chlorku metylenu (10 ml) w atmosferze argonu dodano DCC (264 mg, 1 mmoli), 1-fenyletanol (1 mmol, 122 mg) i 4-DMAP (1.2 mg, 0.01 mmola). Po 40 godzinach mieszaninę reakcyjną wytrząsano z NaHCO₃ (10 ml). Ekstrahowano chlorkiem metylenu (3 x 5 ml), a połączone warstwy organiczne wysuszono Na₂SO₄ i odparowano rozpuszczalnik. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/octan etylu).

Lewulinian 1-fenylo-etanolu 117

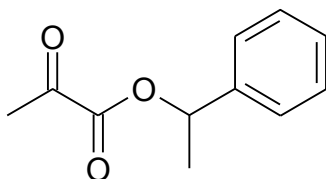


^1H NMR (CDCl_3 , Bruker) δ 1.53-1.54 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.53-2.79 (m, 4H), 5.85-5.89 (k, $J = 6.6$ Hz, 1H), 7.26-7.36 (m, 5H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 22.11, 28.29, 29.8, 37.91, 72.6, 125.99, 127.82, 128.45, 141.57, 171.94, 206.46

Analiza elementarna: oszacowana dla $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_3$; C 70.87%, H 7.34%, oznaczona C 70.85, H 7.34%;

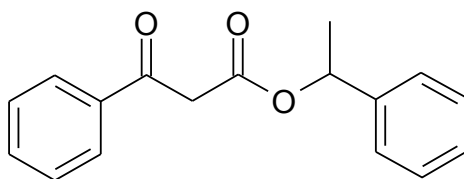
Pirogronian 1-fenylo-etanolu 115^[90]



^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.83-1.87 (d, $J = 7$ Hz, 3H), 3.1 (s, 2H), 5.08-5.11 (k, $J = 7$ Hz, 1H), 7.32-7.42 (m, 5H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 23.8, 25.1, 72.3, 126.2, 127.3, 127.9, 140.3, 172.0, 193.8

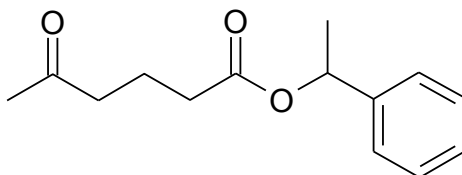
Ester kwasu 3-fenylo-3-oksopropanowego 111^[91]



^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.43-1.47 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 3.92 (s, 2H), 5.85-5.88 (k, $J = 6.6$ Hz, 1H), 7.21-7.85 (m, 10H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 22.14, 46.47, 73.81, 126.2, 128.19, 128.52, 128.71, 128.78, 128.96, 131.49, 133.89

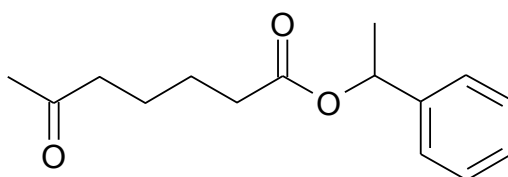
Ester kwasu 5-okso-heksanowego 119^[92]



^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.5-1.52 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 1.78-1.8 (q, 2H, $J = 7.4$ Hz), 2.14 (s, 3H), 2.25-2.27 (q, 2H, $J = 7.4$ Hz), 2.39-2.43 (q, 2H, $J = 7.4$ Hz), 5.52-5.54 (q, 1H, $J = 6.8$ Hz), 7.39-7.51 (m, 5H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 18.9, 22.3, 29.5, 33.9, 42.2, 55.2, 126.1, 128.5, 128.9, 143.1, 173.5, 208.3

Ester kwasu 6-okso-heptanowego 121^[93]



^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.5-1.52 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 1.55-1.57 (q, 4H, $J = 7.4$), 2.14 (s, 3H), 2.25-2.27 (q, 2H, $J = 7.4$ Hz), 2.39-2.43 (q, 2H, $J = 7.4$ Hz), 5.52-5.54 (q, 1H, $J = 6.8$ Hz), 7.39-7.5 (m, 5H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.3, 22.8, 26.7, 27.5, 32.1, 41.2, 59.0, 126.7, 128.5, 128.8, 143.0, 173.5, 208.3

Procedura estryfikacji/transestryfikacji z enancjomerami 1-fenyletanolu

61 mg 1-fenyletanolu (enancjomeru *R* lub *S*, 0.05 mmola), 0.05 mmola kwasu karboksylowego, estru etylowego lub *tert*-butylowego, 10 mg enzymu w 1 ml toluenu umieszczono w 10-ml fiolce. Reakcję prowadzono w temperaturze 50°C przez 6 dni. Enzym usunięto poprzez filtrację, a rozpuszczalnik odparowano. Ilość powstałego estru 1-fenyletanolu w mieszaninie reakcyjnej oznaczono za pomocą technik: GC oraz HPLC.

Oznaczanie wydajności – ilości powstałego estru 1-feniloetanolu

Acetylooctany

Ilość powstałego acetylooctanu 1-feniloetanolu oznaczano za pomocą HPLC w układzie faz odwróconych, kolumna C18, układ acetonitryl: woda 1:1, 0.8 ml/min, czas retencji 12.02.

Pozostałe estry oznaczono za pomocą chromatografii gazowej (Varian kapilary kolumna CP-SIL 5CB, dł. kolumny 50 m; średnica 0.53 mm; 1mikrom CP 7695)

Gradient od 100 C przez 5 minut, przez 10 minut do temperatury 300°C; 300 stopni przez 2 minuty.

Ester 1-feniloetanolu kwasu 3-okso-3-fenilopropionowego **111** – Czas retencji 22.42 min.

Pirogronian 1-feniloetanolu **115**, Czas retencji – 12.45 min.

Lewulinian 1-feniloetanolu **117**, Czas retencji – 15.98 min.

Ester 1-feniloetanolu kwasu 5-oksoheksanowego **119** – Czas retencji 17.52 min.

Ester 1-feniloetanolu kwasu 6-oksoheptanowego **121** – Czas retencji 18.83 min.

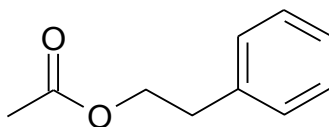
Rozdział kinetyczny wybranych beta-ketokwasów i estrów

Generalna procedura

1 mmol kwasu bądź estru rozpuszczono w 1 ml toluenu, dodano 122 mg (1mmol) racemicznego 1-feniloetanolu i 20 mg Novozymu. Reakcję prowadzono w temperaturze 50°C. Po 6 dniach odsączono enzym, odparowano rozpuszczalnik, a następnie wydzielono 1-feniloetanol za pomocą chromatografii kolumnowej w układzie heksan: octan etylu. Nadmiar enancjomeryczny substratu oznaczono za pomocą HPLC, używając kolumny chiralnej Chiralcel OD-H, w układzie hexan/iPrOH=95:5; przepływ =1mL/min; czasy retencji 6.05 min (S) i 6.89 min (R).

Podwójna transestryfikacja

Synteza Octanu 2-fenyletanolu 123^[94]



Do 2-fenyletanolu (5.95 g, 0.049 mola) dodano 3 krople stężonego kwasu siarkowego, a następnie wkraplano bezwodnik octowy (5 g, 0.049 mola). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 17 godzin. Następnie dodano wodę i 20% NaOH. Produkt ekstrahowano eterem etylowym. Warstwę organiczną przemyto wodą i suszono siarczanem magnezu, a następnie odparowano rozpuszczalnik. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej (heksan/octan etylu).

¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 2.03 (s, 3H), 2.9-2.97 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 4.24-4.31 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 7.23-7.28 (m, 5H)

¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 21.19, 35.29, 85.14, 126.77, 128.71, 129.09, 138.03, 171.25

Procedura transestryfikacji

61 mg octanu 2-fenyletanolu (0.5 mmola), acetylooctan etylu lub *tert*-butylu (2 mmole), 10 mg enzymu w 1 ml toluenu umieszczono w 10-ml fiolce. Reakcję prowadzono w temperaturze 50°C. Po 72 godzinach/6 dniach usunięto enzymy poprzez filtrację i odparowano toluen. Ilość otrzymanego acetylooctanu 2-fenyletanolu w mieszaninie reakcyjnej oznaczono za pomocą GC.

Oznaczanie wydajności

Ilość powstałego estru oznaczono za pomocą chromatografii gazowej (Varian kapilary kolumna CP-SIL 5CB; dł. kolumny 50 m; średnica 0.53 mm; 1mikrom CP 7695)

Gradient od 100°C przez 5 minut, przez 10 minut do temp 300°C przez 2 minuty.

Czas retencji 22.4 minuty.

6. Literatura

- [1] R. Wolfenden, M.J. Snider, *Acc. Chem. Res.* **34**, **2001**, 938.
- [2] K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, **1997**.
- [3] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, **2004**, 6032-604.
- [4] źródło internetowe: <http://www.iupac.org/goldbook/H02901.pdf>
- [5] L. Stryer, J. Berg, J.L. Tymoczko, *Biochemia*, PWN Warszawa **2005**.
- [6] E. M. Rustoy, A. Baldessari, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **39**, **2006**, 50-54.
- [7] E. Busto, V. Gotor-Fernández, *Chem. Rev.*, **111**, **2011**, 3998-4035.
- [8] Ramesh N. Patel, *Stereoselective Biocatalysis*, CRC Press, **2000**.
- [9] P. P. Bora, G. Bez, J. Momo, H. Anal *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **72**, **2011**, 270-275.
- [10] C. E. Garrett, G. C. Fu, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, **1998**, 7479-7483.
- [11] N. Hayashi, K. Yanagihara, S. Tsuboi, *Tetrahedron: Asymmetry* **9**, **1998**, 3825-3830.
- [12] A. Sharma, S. Chattopadhyay, *J. Org. Chem.* **64**, **1999**, 8059-8062.
- [13] T. Olejniczak, A. Mironowicz, C. Wawrzeńczyk, *Bioorg Chem.* **31**, **2003**, 199-205.
- [14] C. J. Aurell, S. Karlsson, F. n, S. M. Andersen, *Org. Process Res. Dev.*, **18**, **2014**, 1116-1119.
- [15] K. Suginaka, Y. Hayashi, Y. Yamamoto, *Tetrahedron: Asymmetry* **4**, **1996**, 1153.

- [16] J. Baldwin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1976**, 734-736.
- [17] S. J. Bingham, J. H. P. Tyman, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **1997**, 3637.
- [18] O. A. Attanasi, P. Filippone, C. Fiorucci, E. Foresti, F. Mantellini, *J. Org. Chem.*, **63**, **1998**, 9880-87.
- [19] M. Couturier, P. Brassard, *Synthesis*, **7**, **1994**, 703.
- [20] I. Yavari, F. Nourmohammadian, *J. Chem. Res.*, **2000**, 218-219.
- [21] F. Mathey, F. Robin, F. Mercier, M. Spagnol, PCT Int. Appl, WO 98 00,375; CA, 128, 127603, **1998**.
- [22] K. Niigata, T. Kimura, S. Hayashibe, H. Shikama, T. Takasu, E. Hirasaki, Jpn. Kokai Tokkyo Koho, **1994**, JP 06,298,737; CA, 122,133 18, **1995**.
- [23] S. J. Bingham; J. H. P. Tymana, *Org. Prep. Proc. Int.*, **33**, **2001**, 357-361.
- [24] L.I. Koval, V.I. Dzyuba, O.L. Ilnitska, V.I. Pekhnyo *Tetrahedron Letters* **49**, **2008**, 1645-1647.
- [25] H. Nakatsuji, H. Nishikado, K. Ueno, Y. Tanabe, *Org. Lett.*, **11**, **2009**, 4258-4261.
- [26] T. Shinada, M. Hamada, K. Miyoshi, M. Higahino, T. Umezawa, Y. Ohfuné, *Synlett*, **2010**, 2141-2145.
- [27] V. Sridharan, M. Ruiz, J. C. Menéndez, *Synthesis*, **2010**, 1053-1057.
- [28] H. Murata, H. Ishitani, M. Iwamoto, *Tetrahedron Letters*, **49**, **2008**, 4788-4791.
- [29] G. E. Jeromin, V. Welsch, *Tetrahedron Letters*, **36**, **1995**, 6663-6664.
- [30] A. Cordova, K. D. Janda, *J. Org. Chem.*, **66**, **2001**, 1906-1909.
- [31] S. W. Wright, D. L. Hageman, A. S. Wright, L. D. McClure, *Tetrahedron Letters*, **38**, **1997**, 7345-7348.
- [32] R. Altschul, *J. Am. Chem. Soc.* **70**, **1948**, 2569-2572.

- [33] S.S. Wang, B.F. Gisin, D.P. Winter, R. Makofske, I. D. Kulesha, C. Tzougraki, J. Meienhofer, *J. Org. Chem.*, **42**, **1977**, 1286-1290.
- [34] V.F. Pozdnev, *J. Gen. Chem. USSR (Engl. Transl.)*, **58**, **1988**, 592-597.
- [35] S. Yamazaki, *Chemistry Letters*, **24**, **1995**, 127-128.
- [36] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **17**, **1978**, 522-524.
- [37] T. Kamijo, H. Harada, K. Lizuka, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, **1984**, 5044-047.
- [38] R. Kourist, U. T. Bornscheuer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **91**, **2011**, 505-517.
- [39] T. Ooi, T. Miki, M. Taniguchi, M. Shiraishi, M. Takeuchi, K. Maruoka *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, **2003**, 3796-3798.
- [40] M. H. Stefaniak, F. Tinardon, J. D. Wallis, *Synlett*, **6**, **1997**, 677-678.
- [41] M. Tanaka, M. Oba, K. Tamai, Suemune, *J. Org. Chem.*, **66**, **2001**, 2667-2673.
- [42] V. Singh, S. Batra, *Tetrahedron*, **64**, **2008**, 4511-4574.
- [43] J. Kim, H. Lee, J. Gong, *Tetrahedron Letters*, **43**, **2002**, 9141-9146.
- [44] B. Pégot, G. Vo-Thanh, D. Gori, A. Loupy, *Tetrahedron Letters*, **45**, **2004**, 6425-6428.
- [45] M. Kitamura, N. Hayashi, *Tetrahedron: Asymmetry*, **9**, **1998**, 3825-3830.
- [46] C. Ó Dálaigh, S. J. Connon, *J. Org. Chem.*, **72**, **2007**, 7066-7069.
- [47] N. Youssef, A. El-Seidy, M. Schiavoni, B. Castano, F. Ragaini, E. Gallo, A. Caselli, *J. Organomet. Chem.*, **714**, **2012**, 94-103.
- [48] M. Lenes Rosenberg, K. Vlasana, N. Sen Gupta, D. Wragg, M. Tilset, *J. Org. Chem.* **76**, **2011**, 2465-2470.
- [49] J.A. Miller, E. J. Hennessy, W.J. Marshall, M. A. Scialdone, S.T. Nguyen, *J. Org. Chem.*, **68**, **2003**, 7884-7886.

- [50] Y. Lou, M. Horikawa, R. A. Kloster, N. A. Hawryluk, E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, **2004**, 8916-8918.
- [51] R. Csuk, M. J. Schabel, Y. von Scholz, *Tetrahedron: Asymmetry*, **7**, **1996**, 3505-3512.
- [52] C. Ladd, D. Sustac Roman, A. Charette, *Org. Lett.*, **6**, **2013**, 1350-1353.
- [53] D. Huber, P.G.A. Kumar, P.S. Pregosin, I. S. Mikhel, A. Mezzetti, *Helvetica Chimica Acta*, **89**, **2006**, 1696-1710.
- [54] J. Knight, P. Belcher, *Tetrahedron: Asymmetry*, **16**, **2005**, 1415-1418.
- [55] H. Werner C. Herrerias, M. Glos, A. Gissibl, I.M. Fraile, I. Perez, I. A. Mayoral, O. Reiser, *Adv. Synth. Catal.*, **348**, **2006**, 125-132.
- [56] A. Bouet, B. Heller, C. Papamica, G. Dupas, S. Oudeyer, F. Marsaisa V. Levache, *Org. Biomol. Chem.*, **5**, **2007**, 1397-1404.
- [57] Y. Chen, X. P. Zhang, *J. Org. Chem.*, **69**, **2004**, 2431-2435.
- [58] M. Zysk, A. Żądło, A. Brodzka, C. Wiśniewska, R. Ostaszewski, *J. Mol. Cat. B*, **102**, **2014**, 225-229.
- [59] R. E. Deasy, M. Brossat, T. S. Moody, A. R. Maguire *Tetrahedron: Asymmetry*, **22**, **2011**, 47-61.
- [60] T. Kamijo, H. Harada, K. Lizuka, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, **1984**, 5044-5047.
- [61] M. Lee, D. Kim, *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, **2002**, 913-922.
- [62] B. Ferreira, R. Pirovani, L. Souza-Filho, F. Coelho, *Tetrahedron*, **65**, **2009**, 7712-7717.
- [63] S. Sheng, Q. Wang, L. Guo, X. Liu, X. Huang, *Synlett*, **12**, **2006**, 1887-1890.
- [64] J. Shabtai, E. Ney-Igner, H. Pines, *J. Org. Chem*, **46**, **1981**, 3795 – 3802.

- [65] C. Metallinos, J. Zaifman, L. Van Belle, L. Dodge, M. Pilkington, *Organometallics*, 28, **2009**, 4534–4543.
- [66] X.F. Wu, Ch. Darcel, *Eur. J. Org. Chem.*, 8, **2009**, 1144–1147.
- [67] Y.B. Kiran, R. Ikeda, N. Sakai, T. Konakahara, *Synthesis*, 2, **2010**, 276–278.
- [68] S.J. Pridmore, J.M.J. Williams, *Tetrahedron Lett.*, 49, **2008**, 7413–7415.
- [69] P. Gomes, C. Gosmini, J.Y. Nedelec, J. Perichon, *Tetrahedron Lett.*, 43, **2002**, 5901–5903.
- [70] M. Tobisu, R. Nakamura, Y. Kita, N. Chatani, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, **2009**, 3174–3175.
- [71] S. Magens, M. Ertelt, A. Jatsch, B. Plietker, *Org. Lett.*, 10, **2008**, 53-56.
- [72] S. Tayyari, F. Naghavi, S. Pojhan, R. W. McClurg, R. E. Sammelson, *J. Mol. Struc.* 987, **2011**, 241-254.
- [73] a) T. Hudlicky, T. Tsunoda, K. G. Gadamasetti, J. A. Murry, G. E. Keck, *J. Org. Chem.* 56, **1991**, 3619-3623; b) A. Nudelman, R. Kelner, N. Broida, H.E. Gottlieb, *Synthesis* 5, **1989**, 387-388.
- [74] N. Iqbal, E. E. Knaus, *Archiv der Pharmazie* **1996**, b, 23-26.
- [75] T. Ogawa, A. Nakazato, K. Tsuchida, K. Hatayama, *Chem. Pharm. Bull.*, 41, **1993**, 108-116.
- [76] Y. Takekawa, K. Shishido, *J. Org. Chem.* 66, **2001**, 8490-8503.
- [77] S. Chandrasekhar, *Tetrahedron Letters*, 48, **2007**, 1269-1271.
- [78] S. Magens, B. Plietker, *J. Org. Chem.*, 75, **2010**, 3715–372.
- [79] L. Nordstrøm, H.Vogt, R. Madsen, *J. Am. Chem. Soc.*, 52, **2008**, 17672–17673
- [80] Stevenson, E. David E, G. Parkar, J. Zhang, A. Roger, *Enzyme and Microbial Technology*, 40, **2007**, 1078-1086.

- [81] X. Wan, Y. Sun, Y. Luo, D. Li, Z. Zhang, *Journal of Organic Chemistry*, 70, **2005**, 1070-1072.
- [82] S. Xue, Y. Liu, L. Li, Q. Guo, *Journal of Organic Chemistry*, 70, **2005**, 8245-8247.
- [83] M.G. Kulkarni, *Synth. Comm.*, 21, **1991**, 581-586.
- [84] R. Kundu, Z. Ball, *Org. Lett.*, 12, **2010**, 2460-2463.
- [85] F. Chen, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, **2008**, 743-755.
- [86] Y. Kohchi, K. Nakama, S. Komiyama, F. Watanabe, PCT Int. Appl. (**2014**), WO 2014027696 A1 20140220.
- [87] C. Galliford, *Chem. Comm.*, 16, **2008**, 1926-1928.
- [88] a) Narasaka, Koichi; Ukaji, Yutaka; Watanabe, Kazutoshi, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 60, **1987**, 1457-64, b) O. Pamies, J. Baeckvall, *J. Org. Chem.*, 67, **2002**, 1261-1265.
- [89] H. Maerki, *Helvetica Chimica Acta*, 71, **1988**, 320-36.
- [90] W. Binkley, *J. Org. Chem.*, 41, **1976**, 3030-3031.
- [91] M.T. Reetz, *Curr. Opinion Chem. Biol.*, 6, **2002**, 145-150.
- [92] S. Yamazaki, *Chem. Lett.*, **1995**, 127-128.
- [93] P. Moriel, A. Garcia, *Green Chemistry*, 16, **2014**, 4306-4311.
- [94] Kim, Bo Ram; Sung, Gi Hyeon; Ryu, Ki Eun; Yoon, Hyo Jae; Lee, Sang-Gyeong; Yoon, Yong-Jin, *Synlett*, 25(13), 1909-1915; 2014
- [95] J. S. Witzeman, W. D. Nottingham, *J. Org. Chem.*, 56, **1991**, 1713-1718
- [96] W. Szymański, R. Ostaszewski, *J. Mol. Cat. B.*, 47, **2007**, 125-128.
- [97] B. P. Bandgar, S. S. Pandit, L. S. Uppalla, *Org. Prep. Proc. Int.*, 35, **2003**, 219-222.

- [98] S.Tayyari, F. Naghavi, S. Pojhan, R. W. McClurg, R. E. Sammelson, *J. Mol. Struc.*, **987**, **2011**, 241-254.
- [99] T. Ogawa, A. Nakazato, K. Tsuchida, K. Hatayama, *Chem. & Pharm. Bull.*, **41**, **1993**, 108-116.
- [100] S. Magens, M. Ertelt, A. Jatsch, B. Plietker, *Org. Lett.*, **10**, **2008**, 53-56.
- [101] N. Iqbal, E. E. Knaus, *Archiv der Pharmazie (Weinheim, Germany)* **329**, **1996**, 23-26.
- [102] Y. Takekawa, K. Shishido, *J. Org. Chem.*, **6**, **2001**, 8490-8503.
- [103] T. Hudlicky, T. Tsunoda, K. G. Gadamasetti, J. A. Murry, G. E. Keck, *J. Org. Chem.*, **56**, **1991**, 3619-3623.
- [104] A. Nudelman, R. Kelner, N. Broida, H.E. Gottlieb, *Synthesis*, **5** (**1989**) 387 – 388
- [105] P. Baumhof, R. Mazitschek, A. Giannis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, **2001**, 3672-3674
- [106] W. Chang, M. Dey, P. Liu, S.O. Mansoorabadi, C. Drennan, H. Liu, *Nature*, **496**, **2013**, 114
- [107] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic chemistry*, **2001**.
- [108] M. Nascimento, S. Zanotto, S. Melegari, L. Fernandes, *Tetrahedron: Asymmetry*, **14**, **2003**, 3111-3115
- [109] J. C. Ruble, G. C. Fu, *J. Org. Chem.*, **61**, **1996**, 7230-7231.
- [110] G. E. Jeromin, V. Welsch, *Tetrahedron Letters*, **36**, **1995**, 6663-6664.
- [111] K. Johnsson, P. G. Schultz *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, **1994**, 7425-7426.
- [112] M.G. Stanton, M. R. Gagne, *J. Org. Chem.*, **62**, **1997**, 8240-8242.

[113] N. Mallesha, S. Prahlada Rao, R. Suhas, D. C. Gowda, *Tetrahedron Letters* 53, **2012**, 641–645.

[114] S. W. Wright, D. L. Hageman, A. S. Wright, L. D. McClure, *Tetrahedron Letters*, 38, **1997**, 7345-7348.

[115] R. Altschul, *J. Am. Chem. Soc.*, 70, **1948**, 2569-2572.

[116] W. Szymański, R. Ostaszewski, *Tetrahedron*, 64, **2008**, 3197-3203.

B. Org. 380/16



Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.380/16



90000000192883