



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE FARMACEUTICHE

CICLO XXIV

COORDINATORE Prof. Stefano Manfredini

*ACETILACETOINO SINTASI DA *Bacillus licheniformis* NELLA SINTESI
STEREOSELETTIVA DI ALCOLI TERZIARI POLIFUNZIONALI*

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/11

Dottorando

Dott. Venturi Valentina

Valentina Venturi

(firma)

Tutore

Prof. Pedrini Paola

Paola Pedrini

(firma)

Anni 2009/2011

Sic et simpliciter.....

Ad maiora!

INDICE

Capitolo 1. Introduzione	pag. 7
1.1 Formazione di legami C-C: approccio tradizionale.....	pag. 9
1.2 Formazione di legami C-C: approccio moderno	pag. 11
1.3 Formazione di legami C-C: approccio biocatalitico.....	pag. 14
1.4 Formazione di legami C-C: approccio organocatalitico (o biomimetico)....	pag. 32
Capitolo 2. <i>Bacillus stearothermophilus</i> oppure <i>Bacillus licheniformis</i> ?.....	pag. 37
2.1 <i>Bacillus stearothermophilus</i>	pag. 38
2.2 <i>Bacillus stearothermophilus</i> oppure <i>Bacillus licheniformis</i> ?.....	pag. 46
2.3 <i>Bacillus licheniformis</i>	pag. 46
Capitolo 3. Acetilacetoino sintasi: sintesi di alcoli terziari	pag. 53
Capitolo 4. Sintesi di alcoli terziari: approccio biomimetico	pag. 89
Capitolo 5. Riduzioni stereoselettive di α -idrossi- β -dichetoni	pag. 113
Capitolo 6. Acetilacetoino sintasi nella sintesi dell'aroma del tè.....	pag. 167
Capitolo 7. Purificazione di acetilacetoino sintasi da <i>B. licheniformis</i>	pag. 183
Capitolo 8. Conclusioni.....	pag. 195
Bibliografia	pag. 199

INTRODUZIONE

La formazione del legame carbonio-carbonio è lo stadio fondamentale per la costruzione delle molecole organiche e rappresenta uno dei più importanti e stimolanti obiettivi della sintesi organica in quanto passaggio chiave nella maggior parte dei processi sintetici. L'attribuzione del premio Nobel per la Chimica 2010 all'americano Richard F. Heck e ai giapponesi Ei-ichi Negishi e Akira Suzuki per il loro lavoro nelle reazioni di coupling palladio-catalizzate sottolinea proprio l'importanza di un indirizzo della ricerca chimica rivolto a creare un legame carbonio-carbonio per la costruzione di macromolecole organiche complesse.

La necessità di ottenere molecole chirali biologicamente attive sia di origine naturale sia di origine non-naturale ha spronato studi approfonditi verso la formazione del legame carbonio-carbonio mediante accoppiamento asimmetrico. Straordinari risultati sono stati ottenuti con lo sviluppo di ausiliari chirali e catalizzatori chirali per il controllo della stereoselettività di molte importanti reazioni (condensazione aldolica, cicloaddizioni, addizioni a doppi legami); tuttavia, la ricerca continua e negli ultimi anni la biocatalisi sta diventando un pilastro fondamentale nella sintesi organica come alternativa alle tradizionali metodologie chimiche. La natura, come risultato di milioni di anni di evoluzione, ha sviluppato un vasto numero di catalizzatori, gli enzimi. Questi, intrinsecamente chirali, mostrano una straordinaria efficienza e specificità per la sintesi asimmetrica e la modificazione di molecole del metabolismo primario e secondario. L'impiego degli enzimi, oggi, presenta il vantaggio di mettere in campo processi di sintesi ecosostenibili in quanto non vengono usati solventi e reagenti inquinanti. Negli anni più recenti l'attenzione della sintesi organica è sempre più rivolta alla produzione di molecole complesse di interesse farmaceutico. Un congruo numero di tali prodotti sono sostanze naturali o loro derivati, altri sono analoghi semplificati, altri ancora sono composti che hanno mostrato di essere attivi nei confronti di alcuni organismi, di cellule malate, di recettori cellulari specifici o di specifici enzimi bersaglio.

Determinante per i progressi sintetici è stata la scoperta di numerosi nuovi metodi per la formazione di legami carbonio-carbonio. E' oggi possibile, infatti,

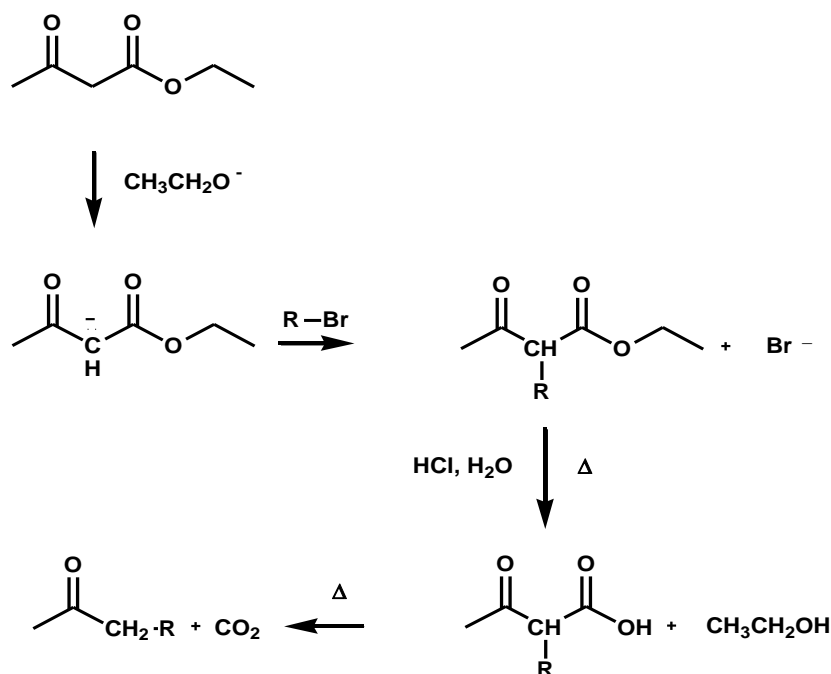
utilizzando una combinazione di metodi classici ed innovativi, sintetizzare molecole con funzionalità sensibili e scheletri carboniosi sorprendentemente complessi, con eccellente regio- ed enantioselettività, a partire da sintoni semplici ed economici.

1.1 Formazione di legami C-C: approccio tradizionale

I metodi classici per la formazione del legame carbonio-carbonio sono vari e possono essere così brevemente riassunti a seconda delle diverse metodologie di sintesi:

a) Sostituzione di un gruppo uscente ad opera di un nucleofilo al carbonio:

- Reagenti di Gilman (organocuprati)
- Alchil anioni e cianuri
- Alchilazioni di anioni enolato (sintesi di acidi carbossilici e di metilchetoni) (**Schema 1**)



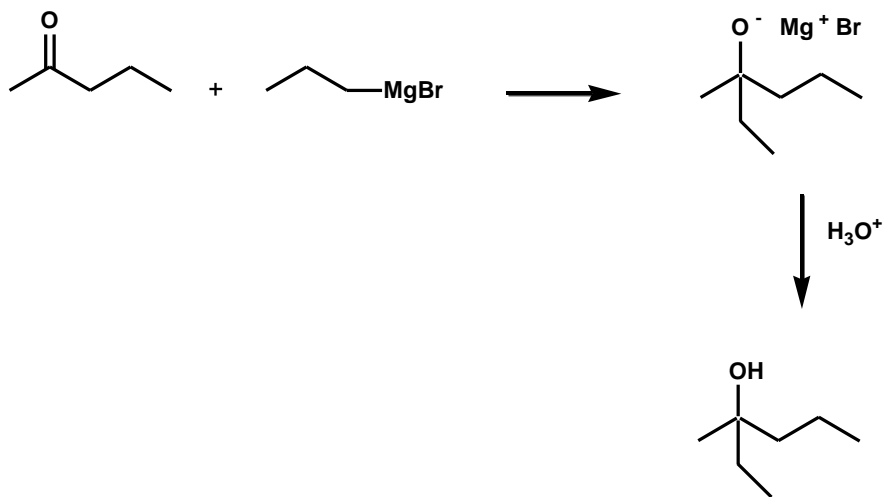
Schema 1. Sintesi acetacetica: sintesi di metilchetoni

- Alchilazione di enammine

b) Addizione nucleofila al carbonile o ad un gruppo carbossilico:

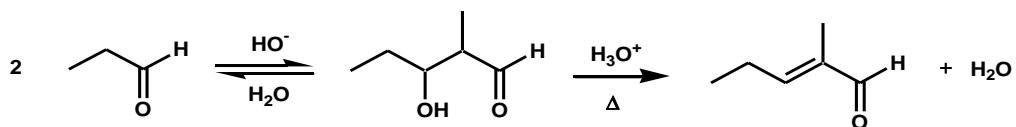
- Reagenti di Grignard, reagenti organolitio e reagenti di Gilman

(Schema 2)



Schema 2. Addizione di un reattivo di Grignard al carbonio carbonilico

- Anioni di alchini e cianuri
- Reazioni aldoliche (addizioni e condensazioni aldoliche tra aldeidi e chetoni) (Schema 3)



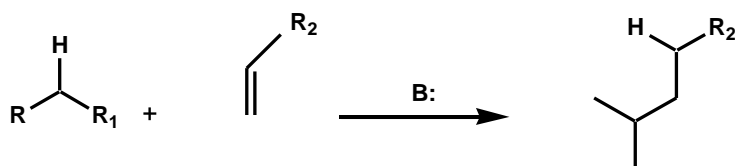
Schema 3. Reazione di condensazione aldolica

- Condensazione di Claisen (condensazione tra esteri) e di Dieckmann
- Acilazione di enammine

- Reazione di Wittig (per doppi legami C=C)

c) Addizione coniugata a composti carbonilici α,β -insaturi:

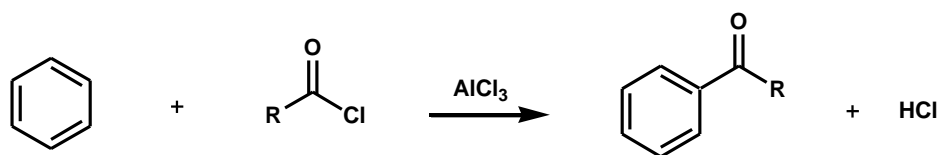
- reazione di Michael (Schema 4).



Schema 4. Reazione di Michael

d) Sostituzione aromatica:

- Alchilazione ed acilazione di aromatici secondo Friedel-Crafts (Schema 5).

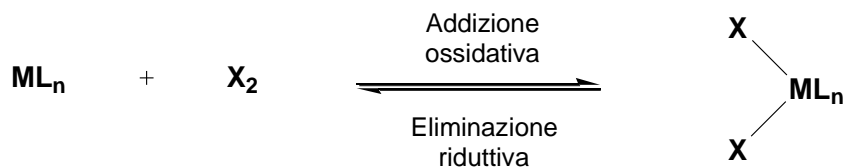


Schema 5. Acilazione di Friedel-Crafts del benzene

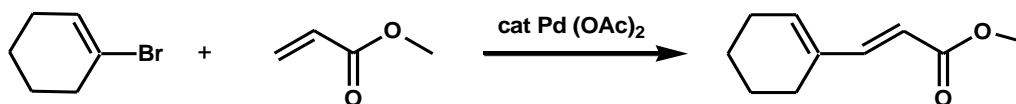
1.2 Formazione di legami C-C: approccio moderno

Gli approcci più recenti alla formazione del legame C-C sfruttano reagenti organometallici che rendono possibili trasformazioni altrimenti difficili da ottenere [1]. In questo ambito le reazioni chiave dei metalli e dei complessi metallici sono l'addizione ossidativa e l'eliminazione riduttiva, il suo processo complementare. Nell'addizione ossidativa il ligando si coordina al metallo aumentandone il suo numero di coordinazione; con l'eliminazione avviene il contrario e il metallo torna alla sua carica formale iniziale. L'addizione può avvenire con un metallo coordinato ad uno o più ligandi (L_n , dove n è il loro

numero), ma può avvenire anche con un metallo libero M. La reattività dei differenti substrati dipende strettamente dal metallo:

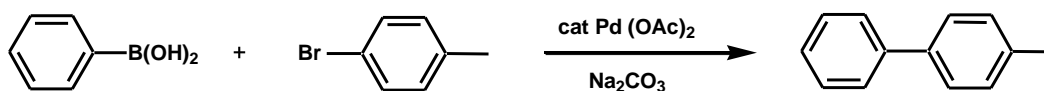


Un esempio di questo approccio sintetico è la reazione di Heck scoperta all'inizio degli anni '70. È una reazione palladio-catalizzata di sostituzione nucleofila operata da un alchene su un braccio arile (**Schema 6**). La perdita dell'idrogeno vinilico con formazione dell'anione è altamente regioselettiva: la formazione del nuovo legame carbonio-carbonio infatti avviene sul carbonio meno sostituito del doppio legame. La reazione di Heck è anche stereoselettiva: anche quando sono possibili entrambe le configurazioni per il doppio legame carbonio-carbonio, *E* e *Z*, il prodotto che si forma è quasi esclusivamente in configurazione *E*.



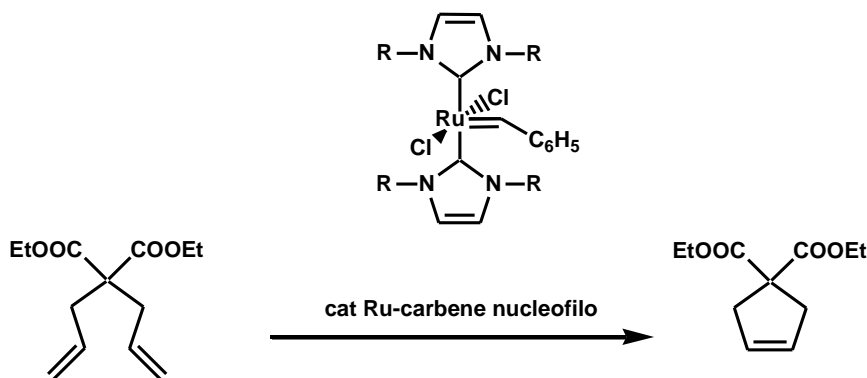
Schema 6. La reazione di Heck

Un altro metodo molto versatile per la formazione di legami carbonio-carbonio è stato sviluppato dal Professor Akira Suzuki dell'Università di Hokkaido e prende il nome di accoppiamento di Suzuki (**Schema 7**). È anche questo un processo palladio-catalizzato in cui un composto organico del boro reagisce con un alogenuro o un triflato organico. Il meccanismo comporta inizialmente una transmetallazione in cui il sostituente del derivato del boro sostituisce un ligando sul Pd e di seguito un'eliminazione riduttiva che porta alla formazione del nuovo legame C-C.



Schema 7. La reazione di accoppiamento di Suzuki

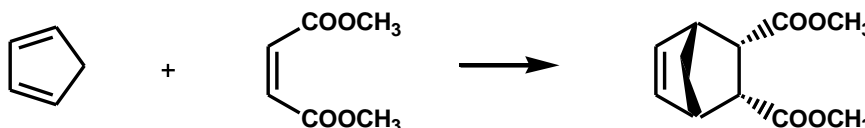
Un altro esempio recente è la reazione di metatesi messa a punto nel 2005 da Robert Grubbs, Richard Schrock e Ives Chauvin (premio Nobel per la chimica). Nelle reazioni di metatesi due alcheni si scambiano i carboni legati da doppio legame. E' un processo semplice e generale per formare doppi legami carbonio-carbonio. Questo tipo di reazione è catalizzata da complessi di Ru o Mo che possiedono come ligandi carbeni particolarmente stabili, resi tali da sostituenti stericamente ingombrati e fortemente elettron-donatori. Talvolta le reazioni di metatesi sono sfruttate per reazioni di ciclizzazione e ciò è possibile quando sono coinvolti due alcheni terminali della stessa molecole con formazione di un cicloalchene (**Schema 8**). La metatesi alchenica di ciclizzazione è usata per la sintesi di grandi macrocicli difficili da ottenere.



Schema 8. La reazione di metatesi

Infine, da non trascurare per la loro importanza sono alcune reazioni pericicliche, meno recenti in termine di scoperta, ma sempre attuali per le applicazioni sintetiche: la trasposizione di Claisen, di Cope e la reazione di Diels-Alder (**Schema 9**). La reazione di Diels-Alder, in particolare, è una cicloaddizione tra

dieni coniugati e composti con doppi o tripli legami carbonio-carbonio (dienofili) per dare prodotti ciclici (addotti di Diels-Alder).

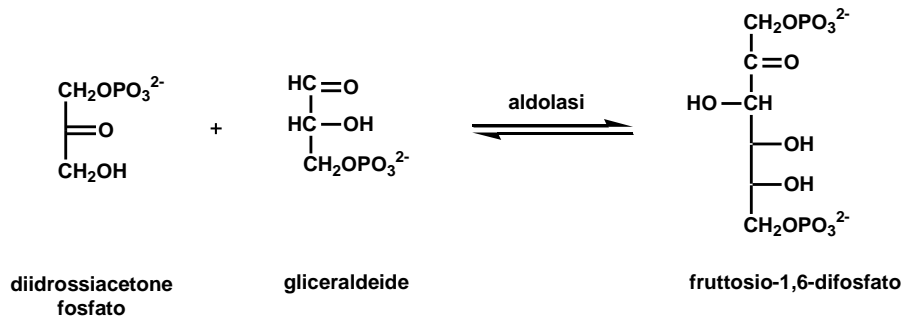
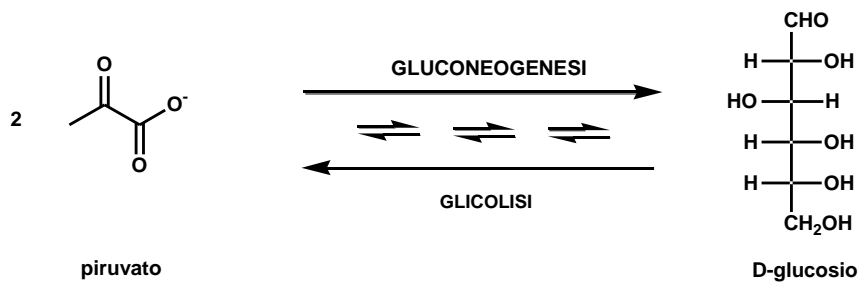


Schema 9. La reazione di Diels-Alder

1.3 Formazione di legami C-C: approccio biocatalitico

Dal punto di vista sintetico solo recentemente gli enzimi sono studiati come catalizzatori efficienti in reazioni di formazione del legame C-C.

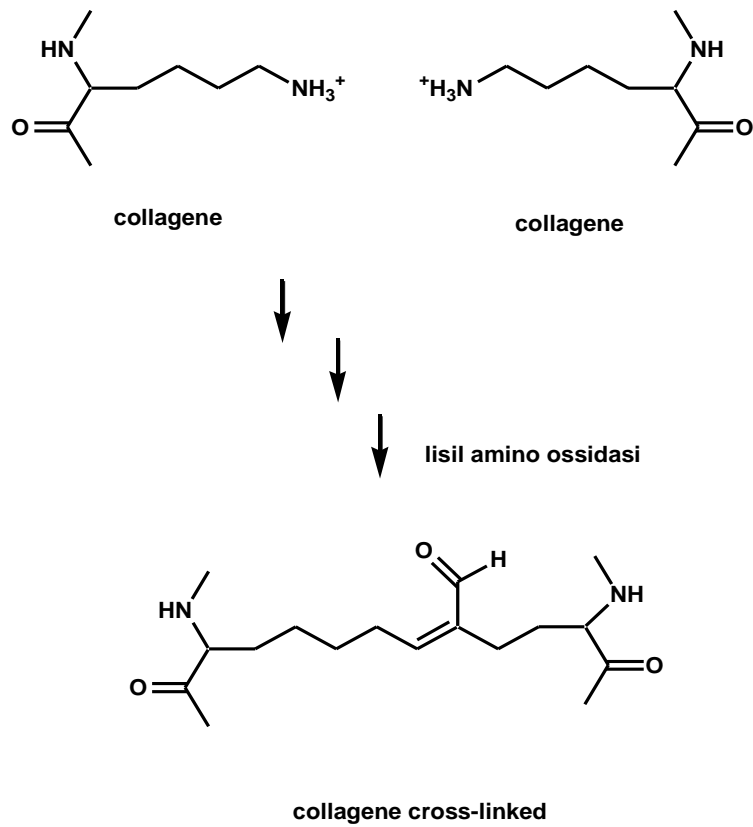
Ciò costituisce un enorme paradosso se si pensa che la natura è proprio la principale costruttrice di strutture molecolari complesse che nascono da questo tipo di legami tra atomi di carbonio. La condensazione aldolica, reazione ampiamente studiata dal punto di vista chimico, in cui il carbonio α di un'aldeide, privato di un protone, agisce da nucleofilo attaccando il carbonile di una seconda molecola per dare aldeidi α,β -insature (**Schema 3**), è una reazione alla base anche del metabolismo cellulare. Questo tipo di reazione è cruciale ad esempio nella via biosintetica nota come gluconeogenesi [2], indispensabile nei sistemi biologici per la sintesi del glucosio, il “carburante” energetico cellulare per eccellenza. La sintesi del glucosio avviene grazie ad una cascata di reazioni catalizzate da enzimi a partire da due molecole di piruvato: una reazione di addizione aldolica costituisce proprio uno di questi passaggi biosintetici. Questa “versione biologica” di addizione aldolica è catalizzata da un enzima che prende il nome di aldolasi e porta alla formazione di fruttosio-1,6-difosfato (**Schema 10**).



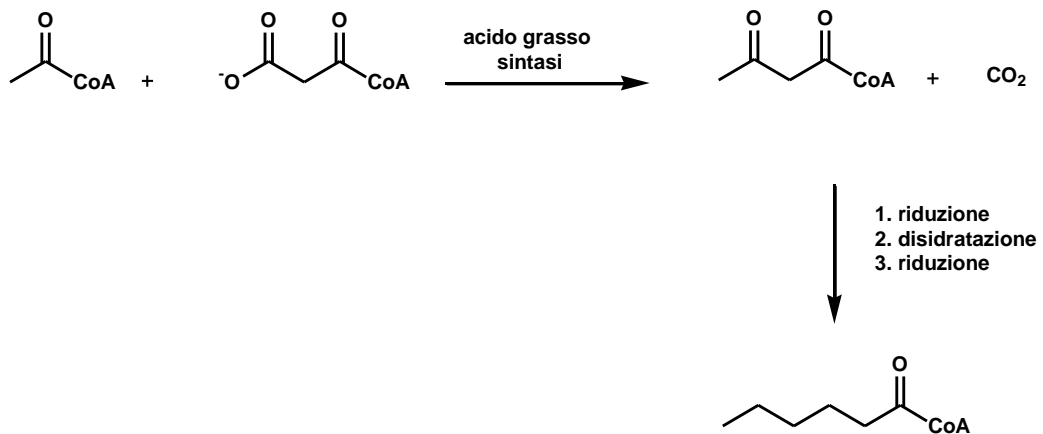
Schema 10. Condensazione aldolica “biologica” nella gluconeogenesi

Questa reazione è molto frequente nei sistemi biologici. Il collagene, una delle proteine più abbondanti dei mammiferi, è il componente principale dei tessuti fibrosi (ossa, denti, pelle, cartilagine, e tendini). I legami incrociati (cross-linking) che si hanno nei tessuti degli animali adulti sono alla base dei processi di invecchiamento e sono un esempio di condensazione aldolica catalizzata dalla lisil amino ossidasi (**Schema 11**).

Un esempio invece di condensazione di Claisen biologica è quella che costituisce il primo passaggio della biosintesi di un acido grasso: la condensazione tra una molecola di acetil CoA e una di malonil CoA, catalizzata dall' acido grasso sintasi (**Schema 12**). Il tioestere che si forma viene poi condensato ad un'altra molecola di malonil CoA; inserendo due atomi di carbonio alla volta, via via si formerà un acido grasso naturale a lunga catena con un numero pari di atomi di carbonio e nessuna ramificazione.



Schema 11. Condensazione aldolica “biologica”: la maturazione del collagene



Schema 12. Biosintesi di un acido grasso naturale

Gli enzimi rappresentano la versione “green” dei tradizionali catalizzatori chimici: sono molto versatili, richiedono condizioni di reazione blande che possono essere mantenute facilmente in laboratorio, permettono di condurre sintesi asimmetriche in maniera chemo- regio- ed enantioselettiva anche a partire da sintoni chirali senza alterarne la configurazione. Ai vantaggi sintetici, inoltre, gli enzimi coniugano anche vantaggi economici rispetto all’impiego dei catalizzatori chimici tradizionali ed il loro impiego garantisce un basso impatto ambientale in tutte le fasi del processo. Tuttavia, l’instabilità intrinseca degli enzimi rispetto a temperatura e pH dovuta alla loro natura proteica, il limite costituito dalla specificità di substrato, il ristretto numero di enzimi a disposizione, le basse rese in termini di prodotto finale dovute agli effetti di inibizione da substrato e la necessità di cofattori complessi hanno fatto sì che la biocatalisi avesse una scarsa diffusione nell’ambito della sintesi organica [3].

Nell’ultimo decennio però, grazie ai notevoli progressi compiuti nel campo della biologia molecolare e strutturale che hanno permesso una comprensione migliore della natura e delle potenzialità dei biocatalizzatori, la catalisi enzimatica ha finalmente trovato un ruolo da protagonista nella sintesi organica, non solo in ambito accademico ma anche industriale. Le moderne tecnologie del DNA ricombinante e dell’ingegneria genetica hanno inoltre permesso di poter veramente disporre di un biocatalizzatore per qualsiasi tipo di reazione e di migliorarne le caratteristiche intrinseche, rispondendo alle esigenze dei diversi approcci sintetici [4].

Il ruolo non trascurabile della catalisi enzimatica nella sintesi, accanto alla metallorganica e all’organocatalisi, è dimostrabile se si osserva come, dal 2000 ad oggi, le biotecnologie e la biocatalisi, grazie ai contributi provenienti da diverse discipline scientifiche, costituiscano una vera e propria “tecnologia” sfruttabile in diversi settori applicativi (farmaceutico, alimentare, chimica fine, prodotti chimici di base, cellulosa e carta, agricoltura, medicina, produzione di energia, industria mineraria) (**Figura 1**).

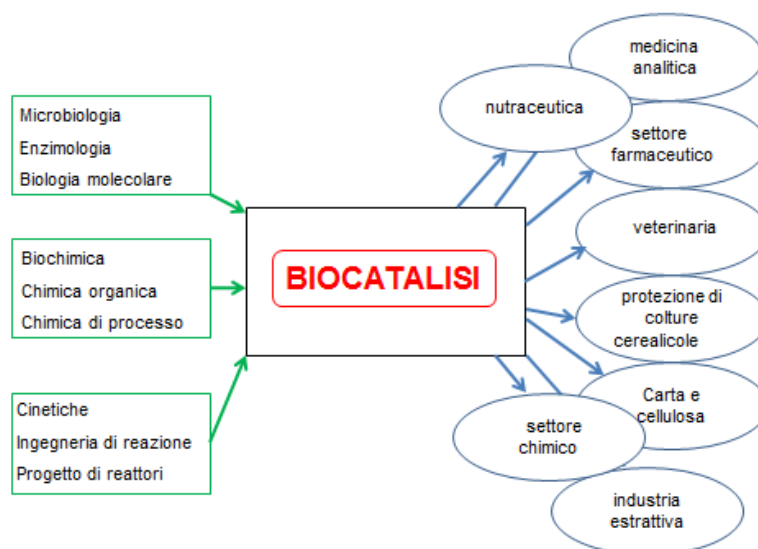
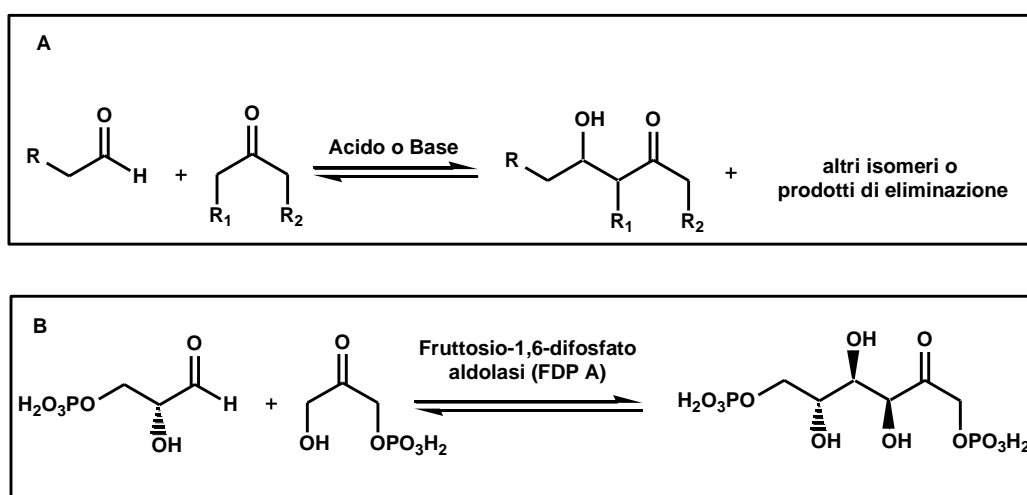


Figura 1. La biocatalisi: input scientifici e applicazioni industriali

Grazie alla sua interdisciplinarietà, la biocatalisi è una toolbox per la sintesi organica che permette di costruire un razionale sintetico tenendo in considerazione la molecola da sintetizzare, il processo di sintesi nel suo complesso e la natura biologica del catalizzatore [5].

Oggi è disponibile un gran numero di enzimi per la formazione e la rottura stereoselettiva di legami C-C che vengono riuniti sotto il nome di “liasi”. Le liasi sono enzimi fondamentali per costruire molecole target complesse: la formazione del legame carbonio-carbonio, infatti, è la base di ogni sintesi organica asimmetrica costituendo uno strumento imprescindibile per generare molteplici prodotti stereoisomerici, a partire da comuni semplici sintoni chirali o prochirali [6]. Gli enzimi, evolutisi per mostrare un’alta selettività ed efficienza catalitica, possono essere impiegati per supportare tali sintesi e rappresentano un’alternativa ecosostenibile ai catalizzatori chimici a base di metalli di transizione. Sono proteine completamente biodegradabili, innocue per l’ambiente ed agiscono preferibilmente in solventi acquosi a pH neutro e a temperatura ambiente. Il profilo “green” degli enzimi li rende particolarmente appetibili anche per l’industria farmaceutica e le reazioni enzimatiche sono state trasportate anche su

scala industriale [3]. La catalisi enzimatica nella formazione di legami carbonio-carbonio risulta particolarmente interessante rispetto a quella chimica tradizionale nella sintesi e modificazione di composti organici rilevanti dal punto di vista biologico che sono tipicamente complessi, multifunzionali e solubili in acqua. Classicamente, fanno parte di questa categoria i composti strutturalmente analoghi agli aminoacidi [5,7,8,9] o ai carboidrati [10,11]. Un esempio è la condensazione aldolica che, se confrontata con il processo chimico (A), consente di non utilizzare gruppi protettori per le diverse funzionalità sensibili del substrato e di non ottenere sottoprodotti di reazione (B) (Schema 13).



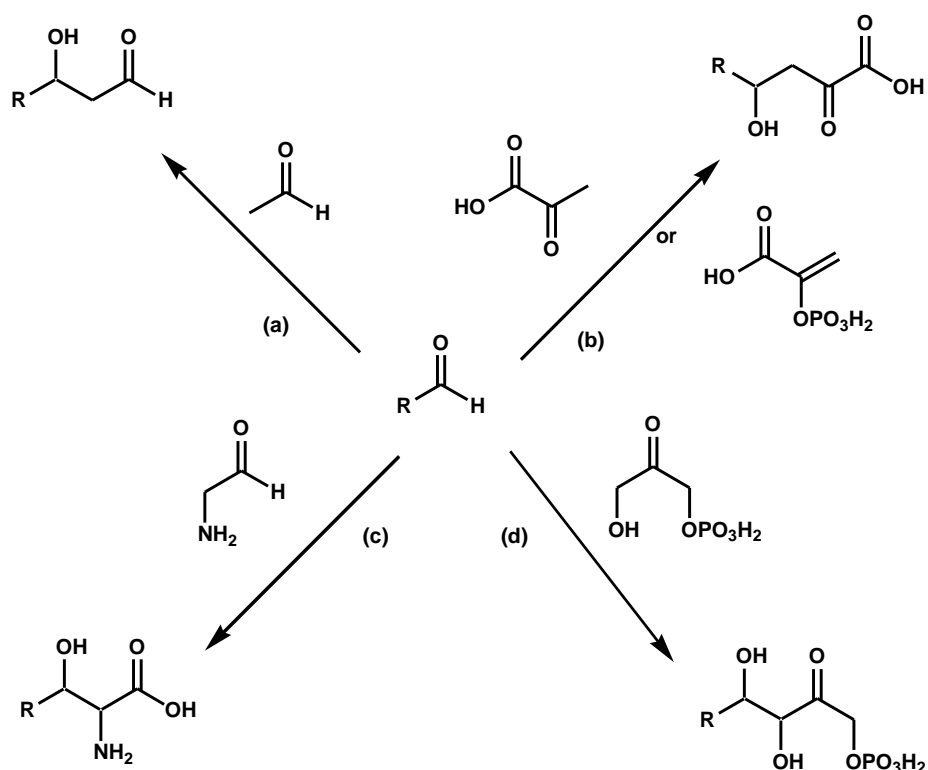
Schema 13. Condensazione aldolica: **A)** reazione chimica, **B)** reazione enzimatica

La maggior parte degli enzimi disponibili per la formazione e la rottura di legami carbonio-carbonio (“liasi”) sono aldolasi, idrossinitrile liasi ed enzimi tiammina pirofosfato dipendenti.

1.3.1 ALDOLASI

Le aldolasi catalizzano una condensazione aldolica, ovvero l’aggiunta stereocontrollata di un chetone (o aldeide) donatore (nucleofilo) ad un accettore (elettrofilo). Decine di aldolasi sono state identificate in natura [5,7] e molte di queste sono disponibili in commercio in scala sufficiente per applicazioni

preparative. Le aldolasi più utilizzate per scopi sintetici impiegano donatori costituiti da 2 o 3 atomi di carbonio e possono essere raggruppate in 4 gruppi principali che dipendono dalla struttura del nucleofilo: (a) le aldolasi acetaldeide-dipendenti, (b) le aldolasi piruvato (fosfoenolpiruvato)-dipendenti, (c) le aldolasi glicina-dipendenti e (d) le aldolasi diidrossiacetonefosfato (DHAP)-dipendenti (Schema 14) [3].



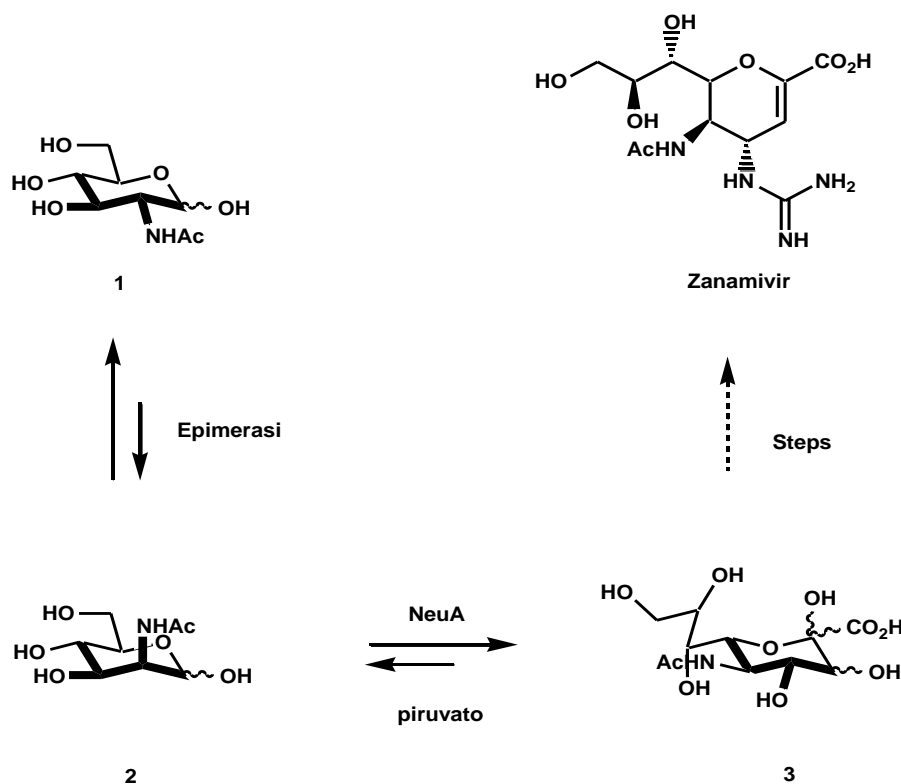
Schema 14. Aldolasi classificate sulla base del donatore nucleofilo utilizzato nella reazione di condensazione aldolica

I membri del primo (a) e del secondo gruppo (b) formano carbanioni acetilici e generano, in seguito alla condensazione aldolica, singoli stereocentri, mentre i membri del terzo (c) e del quarto (d) originano derivati carbonilici α -sostituiti che contengono 2 nuovi centri chirali vicinali al nuovo legame C-C, aspetto che li rende più appetibili per applicazioni di sintesi organica asimmetrica. Di norma le aldolasi hanno una discreta specificità di substrato per la componente nucleofila

donatrice a causa di ragioni meccanicistiche: l'attacco nucleofilo del donatore sull'accettore, catalizzato dall'enzima, avviene in maniera stereospecifica secondo un meccanismo altamente conservato, mentre ciò che è responsabile della stereoselettività relativa è l'orientamento del carbonile aldeidico nello spazio. In questo modo la stereochimica del nuovo legame C-C è altamente controllata dall'enzima indipendentemente dalla natura e dalla configurazione del substrato [12]. Per quello che concerne l'accettore elettrofilico, la maggior parte delle aldolasi tollera invece un ampio spettro di strutture e ciò rende possibile lo sviluppo di sintesi stereodivergenti: impiegando un solo tipo di aldolasi, ma variando gli accettori, è possibile ottenere librerie di composti stereoisomerici.

Le aldolasi, inoltre, sono classificate in aldolasi di classe I e aldolasi di classe II sulla base del meccanismo di deprotonazione dei substrati donatori, su cui si incentra il ruolo attivante dell'enzima. Alla classe I appartengono le aldolasi che seguono il meccanismo di deprotonazione via imina/enammina attraverso il legame covalente del substrato con una lisina del sito attivo [13]. Alla classe II appartengono le aldolasi che, invece, usano un acido di Lewis come cofattore [14].

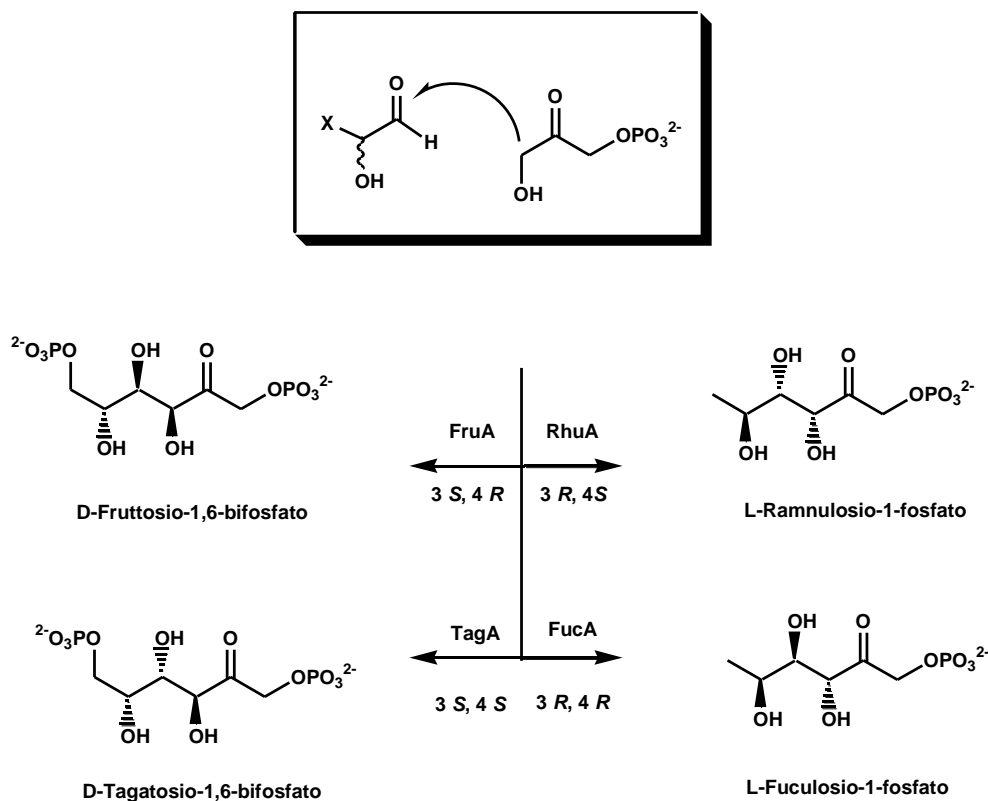
Molteplici sono le applicazioni sintetiche dei diversi tipi di aldolasi riportati in letteratura. Di particolare rilievo, ad esempio, è l'utilizzo in un processo industriale dell'aldolasi dell'acido siliaco NeuA. Si tratta di un enzima commerciale che catalizza l'addizione stereoselettiva reversibile del piruvato all'N-acetil-D-mannosamina, nella via metabolica di degradazione dell'acido siliaco. Il substrato naturale di NeuA è stato un importante target per la sintesi. Lo Zanamivir, introdotto nel 1999, rappresenta infatti il primo trattamento terapeutico contro il virus dell'influenza ottenuto da un derivato dell'acido siliaco. NeuA è stata la prima aldolasi su cui si sono concentrati gli sforzi per sviluppare un processo di bioconversione a livello industriale che è ancora oggi impiegato [15,16] (Schema 15).



Schema 15. Processo industriale per la sintesi di acido N-acetilmuramico come precursore di un inibitore del virus dell'influenza

Il composto **3** è un raro e costoso prodotto naturale, pertanto la sintesi dello Zanamivir è un processo che in partenza richiederebbe un investimento cospicuo a livello industriale. La biocatalisi in questo caso ha offerto un'opportunità più economica e vantaggiosa: il precursore **3** dello Zanamivir è stato ottenuto dall'N-acetil-glucosammina **1** "one pot", grazie ad un processo enzimatico integrato catalizzato da N-acetil-glucosammina 2-epimerasi e NeuA [12]. Un secondo interessante esempio di applicazione nella sintesi organica asimmetrica è quello delle aldolasi diidrossiacetone (DHAP) fosfato dipendenti. Se NeuA e le aldolasi piruvato dipendenti sono in grado di catalizzare la formazione di un solo centro stereogenico, le aldolasi DHAP-dipendenti, invece, portano alla formazione di due centri di asimmetria vicini al nuovo legame C-C che generano. In natura esistono solo 4 tipi di aldolasi DHAP-dipendenti e ciascuna catalizza una reazione aldolica stereospecifica che porta alla formazione dei quattro enantiomeri possibili del

chetoso 1-fosfato rispetto ai dioli vicinali sul C-3 e C-4 [12]. Le reazioni aldoliche catalizzate *in vivo* dalle aldolasi DHAP-dipendenti sono riportate di seguito (Schema 16).

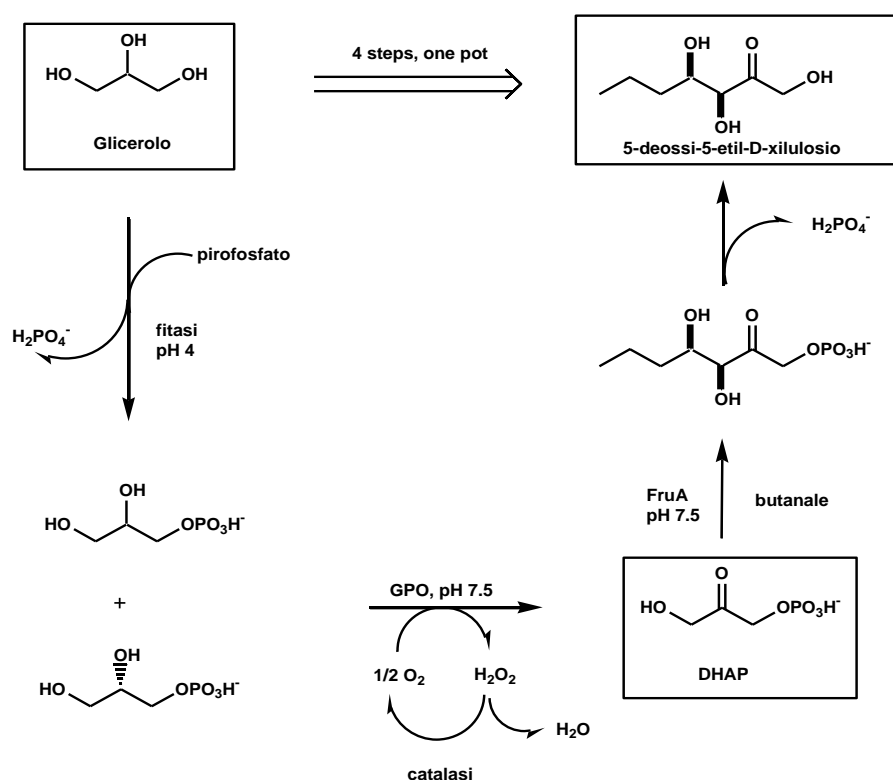


Schema 16. Reazioni aldoliche catalizzate *in vivo* dalle 4 aldolasi DHAP-dipendenti stereocomplementari

Queste aldolasi hanno trovato un particolare successo nella sintesi di stereocontrollata di composti poliossigenati grazie alla loro flessibilità nella specificità di substrato contrapposto all'alto livello di stereocontrollo della reazione [17]. Scegliendo tra le 4 l'aldolasi DHAP-dipendenti opportune, si ottiene un'ampia gamma di prodotti, controllando in modo preciso sia la stereochimica assoluta che quella relativa.

Recenti applicazioni delle aldolasi sono processi a cascata combinati con altri enzimi o abbinati a reazioni chimiche all'interno di metodologie sintetiche

tradizionali allo scopo di creare molecole target nuove o per sviluppare processi sintetici innovativi. Un processo enzimatico in quattro steps che prevede l'uso delle aldolasi è la sintesi a cascata one pot di carboidrati non naturali a partire dal glicerolo (**Schema 17**) [18].



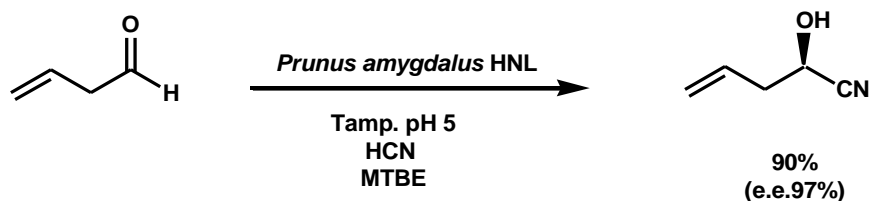
Schema 17. Sintesi biocatalizzata di carboidrati non naturali a partire dal glicerolo

La sintesi inizia con la fosforilazione del glicerolo catalizzata dalla pirofosfatasi seguita dall'ossidazione aerobica dell' L-glicerolo-3-fosfato con generazione in situ del DHAP; il terzo passaggio è l'addizione aldolica del DHAP catalizzata dalla 1,6-fruttosio-bifosfato aldolasi ed, infine, l'ultimo step è la defosforilazione dell'addotto aldolico per generare in prodotto finale.

1.3.2 OSSINITRILASI

Un'altra categoria di enzimi importanti per la formazione di legami C-C sono le osinitrilasi (idrossinitrile liasi).

Queste vengono utilizzate per catalizzare la formazione stereoselettiva di cianidrine attraverso la reazione tra un'aldeide e l'acido cianidrico (**Schema 18**) [3].



Schema 18. Reazione catalizzata dall'ossinitrilasi del *Prunus amygdalus*

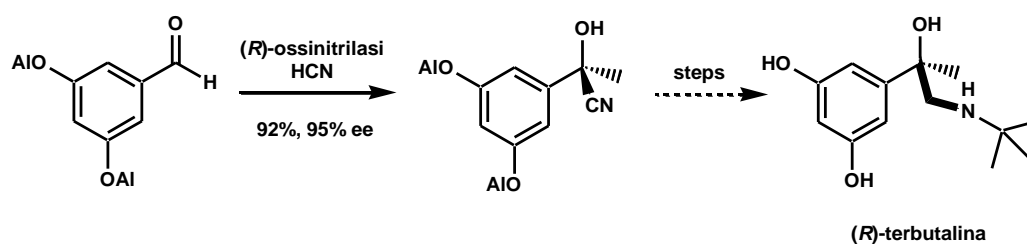
Il ruolo naturale di questi enzimi è quello di degradare le cianidrine nei tessuti di piante attaccate da parassiti liberando acido cianidrico che funziona da deterrente per il parassita stesso (per esempio l'idrolisi del mandelonitrile nel mandorlo). Le idrossinitrile liasi non necessitano di alcun cofattore e presentano una scarsa specificità di substrato ma un'alta stereoselettività, caratteristiche che ne fanno degli ottimi biocatalizzatori. La seguente tabella riporta le caratteristiche di alcune delle più utilizzate ossinitrilasi (**Tabella 1**).

Tabella 1. Ossinitrilasi maggiormente utilizzate per scopi sintetici

Ossinitrilasi	Substrato naturale	Stereoselettività
<i>Prunus amygdalus</i> HNL	(<i>R</i>)-Mandelonitrile	<i>R</i>
<i>Linum usitatissimum</i> HNL	(<i>R</i>)-Butanonecianoidrina acetone cianoidrina	<i>R</i>
<i>Havea brasiliensis</i> HNL	Acetone cianoidrina	<i>S</i>
<i>Sorgum bicolor</i> HNL	(<i>S</i>)-4-idrossi-mandelonidrile	<i>S</i>
<i>Manihot esculenta</i> HNL	Acetone cianoidrina	<i>S</i>

Anche per questa categoria di enzimi esistono molteplici applicazioni sintetiche riportate in letteratura. E' di particolare interesse la sintesi catalizzata da un (*R*)-ossinitrilasi di alcuni farmaci del sistema adrenergico, tra cui l'(*R*)-terbutalina e il

salbutamolo, due broncodilatatori. In questa sintesi il passaggio chiave è l'aggiunta, altamente enantioselettiva, dell'acido cianidrico alla benzaldeide (Schema 19) [19].

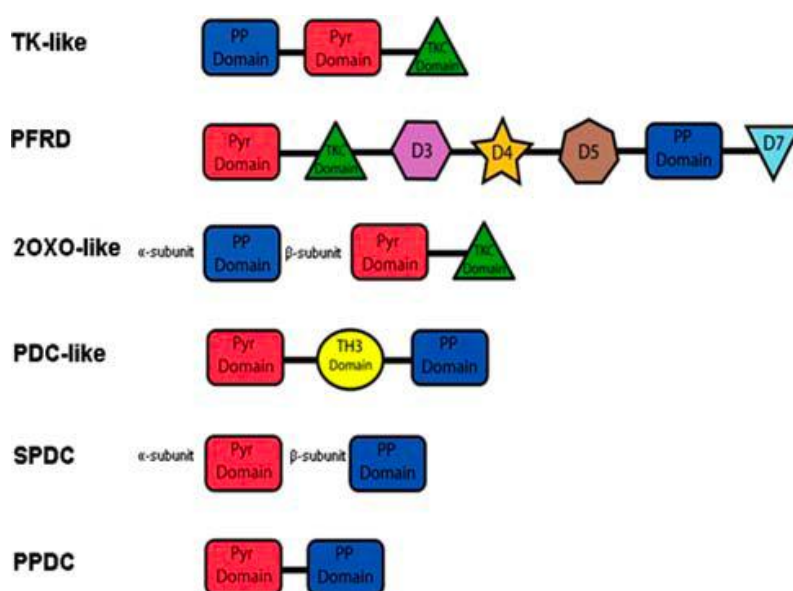


Schema 19. Sintesi enantioselettiva della terbutalina catalizzata da ossinitrilasi

1.3.3 ENZIMI TIAMINA DIFOSFATO (ThDP)-DIPENDENTI

Gli enzimi tiamina difosfato (ThDP) dipendenti catalizzano la formazione di un legame C-C tra due composti carbonilici portando alla formazione di un α -idrossichetone. A questa categoria appartengono un vasto numero di enzimi coinvolti in diversi pathways metabolici e che catalizzano un esteso numero di reazioni. Gli enzimi ThDP-dipendenti che comunemente trovano applicazioni nelle biotrasformazioni sono la benzaldeide liasi (BAL), la benzoilformiato decarbossilasi (BDF), l'acetoidrossiacido sintasi (AHAS), la transchetolasi (TK) e la piruvato decarbossilasi (PDC). Oggi, grazie alle moderne tecniche di biologia molecolare e all'avanzamento del progetto "genoma", il numero dei probabili enzimi ThDP-dipendenti sta crescendo e di conseguenza è facile aspettarsi che molto lavoro ci sarà ancora da compiere per svilupparne appieno le applicazioni sintetiche. Le conoscenze strutturali di questi enzimi rivelano un aspetto interessante: ad una ampia variabilità della sequenza amminoacidica presente nel sito catalitico si contrappone una struttura tridimensionale molto simile per tutti questi enzimi. Ciò spiega, da un lato la capacità degli enzimi ThDP-dipendenti di catalizzare un così vasto numero di reazioni, essendosi evoluti per accettare diversi tipi di substrato, dall'altro la struttura complessiva della proteina altamente conservata rende ragione del loro imprescindibile ruolo biologico in diversi

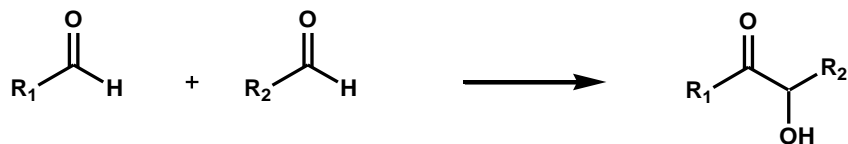
microorganismi. Questi due aspetti rendono oggi questi enzimi sempre più interessanti come nuova fonte di biocatalizzatori versatili per la sintesi organica asimmetrica [20]. Caratteristiche comuni a tutti gli enzimi ThDP-dipendenti sono il sito di binding per la tiamina (Th) all'interfaccia tra i domini altamente conservati del pirofosfato (PP) e della pirimidina (Pyr). Sulla base della disposizione genomica di queste regioni è stato possibile dividerli in sei famiglie filogenetiche [22]: la prima è quella degli enzimi simili alla transchetolasi (TK-like), il secondo gruppo ha come capostipite la piruvato ferredossina riduttasi (PFRD-like), il terzo la 2-oxoisovalerato-deidrogenasi (OXO-like), il quarto la (SPDC-like) e il sesto la fosfopiruvato decarbossilasi (PPDC-like) (**Figura 2**).



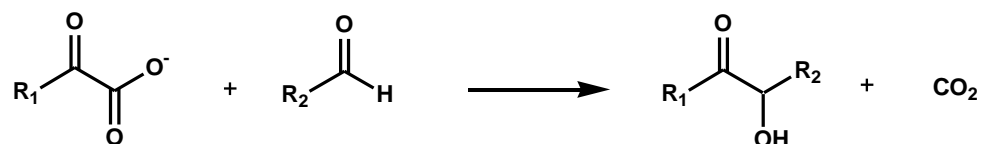
PP e Pyr sono i siti di binding della tiamina (Th); le subunità α e β denota casi in cui PP e Pyr si trovano su subunità diverse

Figura 2. Classificazione degli enzimi ThDP-dipendenti sulla base della disposizione genomica dei domini conservati

La sintesi di α -idrossichetoni catalizzata dagli enzimi ThDP-dipendenti avviene attraverso due meccanismi noti quali la condensazione aciloinica e la condensazione benzoinica (**Schemi 20, 21**).



Schema 20. Condensazione aciloinica.



Schema 21. Condensazione benzoinica.

Il primo (**Schema 20**) prevede la formazione di un legame C-C in condizioni riduttive mentre, nel secondo caso (**Schema 21**), la formazione del nuovo legame segue la rottura di un altro legame C-C in uno dei due reagenti [3].

Enzimi come la benzaldeide liasi (BAL) generalmente sono riconducibili ad un meccanismo di condensazione aciloinica, mentre le transchetolasi (TK) e le decarbossilasi operano una condensazione benzoinica, almeno nei riguardi dei loro substrati naturali.

Questi enzimi sono accomunati dal fatto che la loro catalisi necessita del cofattore tiamina difosfato (**Figura 3**).

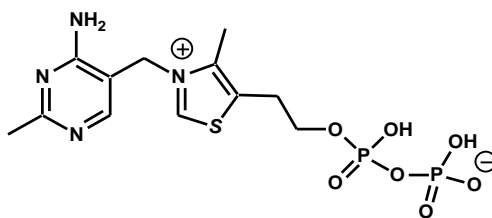
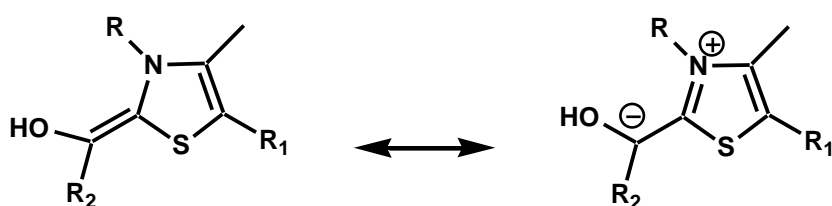


Figura 3. Struttura della tiamina difosfato.

La forma non fosforilata della tiamina è meglio conosciuta come vitamina B₁, il cui deficit è causa della patologia del Beriberi. Questo cofattore enzimatico è

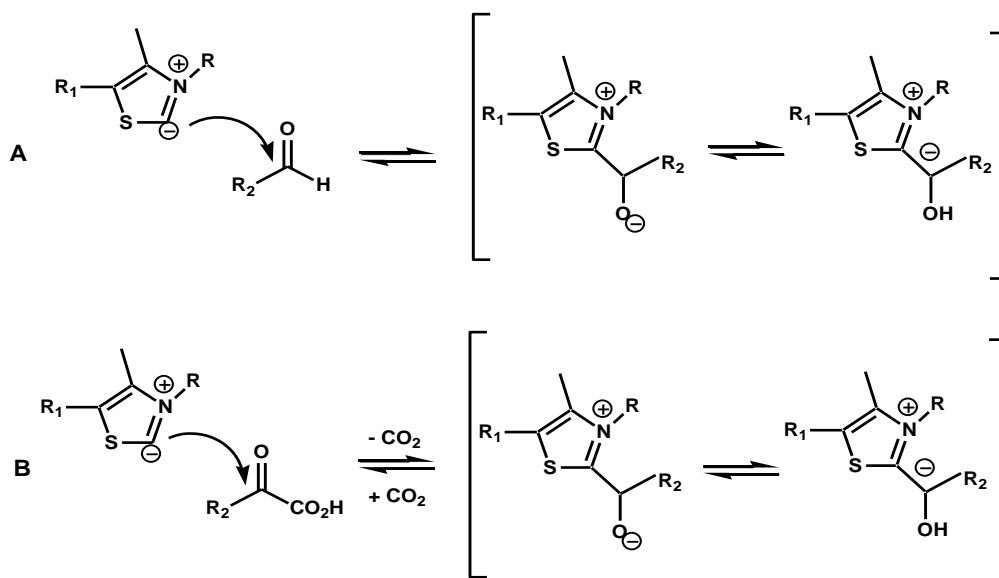
costituito da un nucleo pirimidinico, un anello tiazolidinico che contiene il C₂, che gioca il ruolo chiave nella catalisi, e il gruppo fosfato. Sebbene il donatore dell'aldeide attivata e l'accettore finale da cui dipende la natura del prodotto finale che si origina dal nuovo legame C-C possano variare a seconda dell'enzima ThDP-dipendente considerato, la catalisi ThDP-dipendente passa sempre attraverso la formazione di un'aldeide attivata. ThDP, nella sua forma di ilide, attiva il carbonio del carbonile aldeidico legato al C₂, richiamando su di sé elettroni e spingendolo a variare la sua reattività chimica tradizionale da elettrofilo a nucleofilo. Questo fenomeno è definito “*umpolung*” ed è la caratteristica peculiare della catalisi tiamina-dipendente (**Schema 22**).



Enamina - carbanione = aldeide attivata

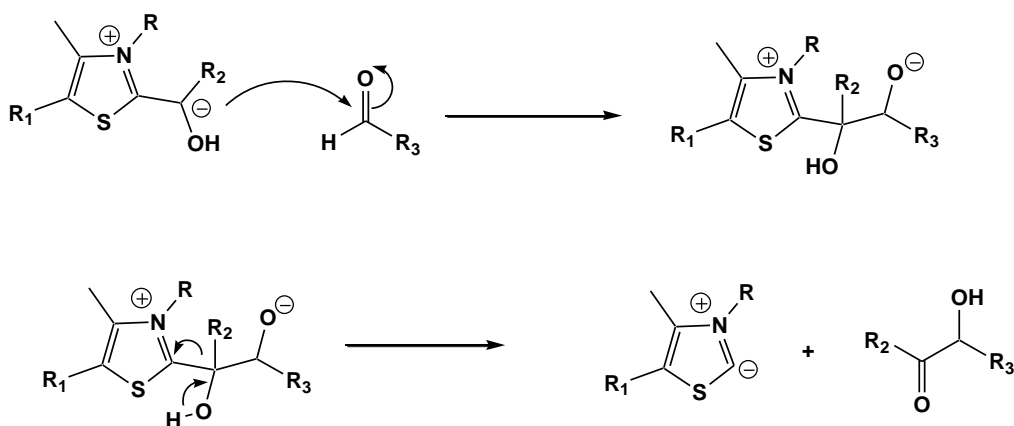
Schema 22. “*Umpolung*” del carbonio carbonilico nella catalisi tiamina dipendente

In modo più dettagliato il meccanismo catalitico degli enzimi ThDP-dipendenti inizia con la deprotonazione dell'anello tiazolidinico della tiamina ed il successivo attacco nucleofilo da parte del carbonio in posizione C-2 dell'anello nei confronti del gruppo carbonilico dell'aldeide o dell' α -chetoacido. Si viene a formare così un intermedio attivato (nel caso dell' α -chetoacido è prevista una precedente decarbossilazione) che rappresenta l'equivalente di un carbanione aldeidico (**Schema 23**).



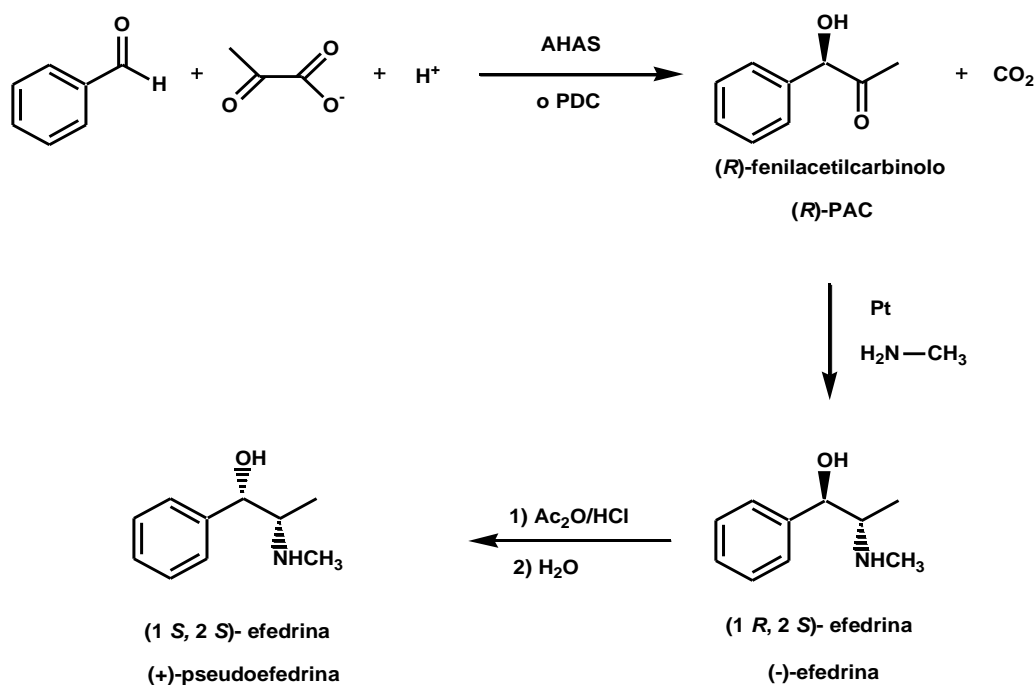
Schema 23. Formazione dell'intermedio attivato da un aldeide (**A**) e da un α -chetoacido (**B**).

L'attacco nucleofilo di questo carbanione su un secondo composto carbonilico porta alla formazione del nuovo legame carbonio-carbonio nell'intermedio ancora legato alla ThDP; successivamente l'intermedio subisce un riarrangiamento intramolecolare che porta alla formazione dell' α -idrossichetone e al rilascio della ThDP nella sua forma di ilide (**Schema 24**).



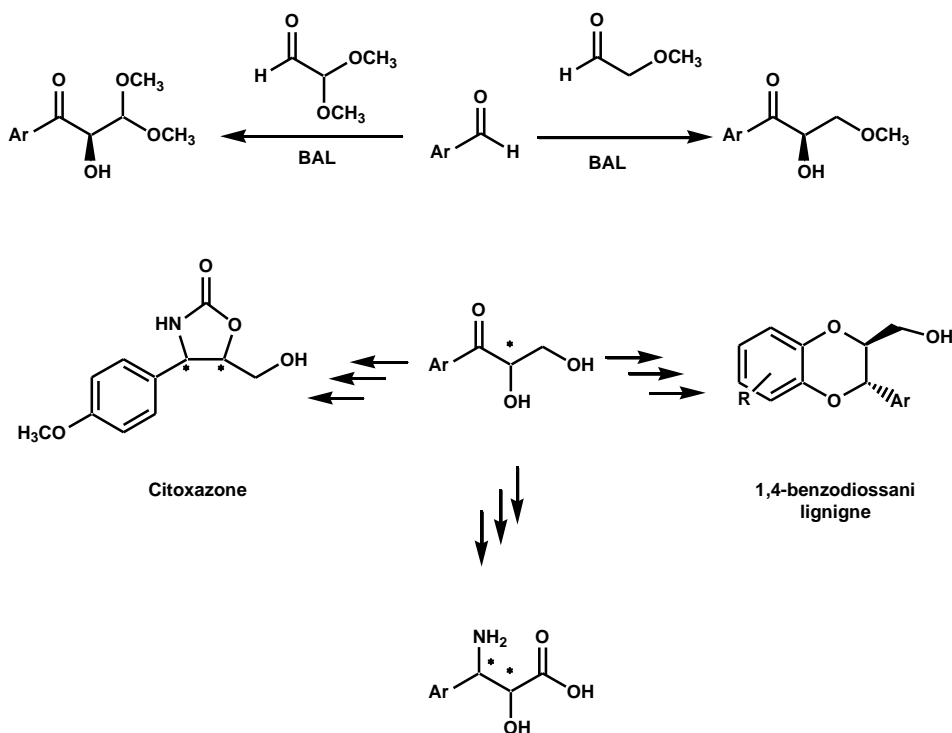
Schema 24. Formazione del legame C-C dell'idrossichetone

Anche per gli enzimi ThDP-dipendenti, come per gli enzimi responsabili della formazione di legami C-C descritti precedentemente, vi sono in letteratura diversi esempi di applicazioni sintetiche anche su scala preparativa. E' questo il caso della piruvato decarbossilasi (PDC) e della acetoidrossiacido sintasi (AHAS) che vengono impiegata per la sintesi di (*R*)-fenilacetilcarbinolo (PAC). L'industria farmaceutica, infatti, converte poi per via chimica l'(*R*)-PAC ottenuto biocataliticamente in (-)-efedrina e (+)-pseudoefedrina come descritto di seguito (**Schema 25**) [23].



Schema 25. Sintesi biocatalizzata di (*R*)-PAC, precursore dell'efedrina

Recentemente anche la benzaldeide liasi (BAL) da *Pseudomonas fluorescens* è stata utilizzata per catalizzare una condensazione aciloinica di aldeidi aromatiche con metossi e dimetossi acetaldeide allo scopo di ottenere una serie di 2,3-diosso aril propanoni che sono importanti sintoni per la sintesi di composti di interesse farmaceutico come il citoxazone, un modulatore delle citochine infiammatorie, e le lignine epatoprotettrici, come la silibila (**Schema 26**) [24].



Schema 26. Condensazioni benzoiniche catalizzate da BAL per la sintesi di precursori di composti di interesse farmaceutico

1.4 Formazione di legami C-C: approccio organocatalitico (o biomimetico)

Nel panorama di quelle che sono le possibili strategie per la sintesi asimmetrica di composti organici attraverso la formazione di legami carbonio-carbonio, non è possibile oggi trascurare l'organocatalisi. Una reazione organocatalitica è per definizione un processo chimico che utilizza come catalizzatore una molecola organica a basso peso molecolare non costituita da metalli di transizione. L'idea alla base dello studio di questi nuovi catalizzatori, che si contrappongono a quelli tradizionali a base di Pd e Ru (par. 1.1), ha un'impronta biomimetica. Da quando la biocatalisi ha raggiunto il successo anche a livello industriale, imponendosi come l'alternativa ecosostenibile ai processi tradizionali di sintesi, il mondo della chimica, in risposta, ha individuato le funzionalità chimiche chiave all'interno del

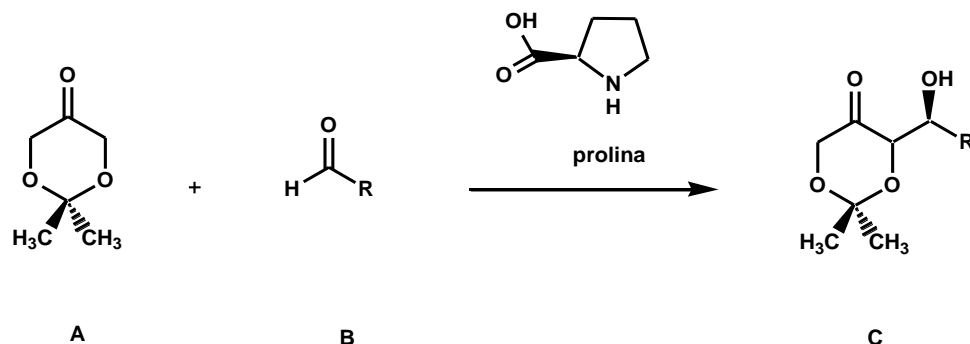
sito catalitico di enzimi e cofattori e le ha sfruttate per disegnare nuovi catalizzatori, definiti “organocatalizzatori”. I catalizzatori impiegati nell’organocatalisi sono essenzialmente molecole organiche naturali, in modo particolare aminoacidi come la prolina, che svolgono, *in vivo*, ruoli chiave come prebiotici. In letteratura è descritta per la prima volta nel 1971 una reazione aldolica asimmetrica intramolecolare catalizzata dalla prolina [25], ma solo trent’anni dopo questo lavoro è stato riconosciuto come il primo esempio di reazione organocatalitica. In questo secolo, l’espansione dell’organocatalisi ha dimostrato la sua versatilità per la sintesi asimmetrica per molteplici reazioni chiave di sintesi di legami carbonio-carbonio e carbonio-eteroatomi (tra le quali addizioni 1,3-dipolari, addizioni di Diels-Alder, condensazioni aldoliche, reazioni di Mannich e di Michael, epossidazioni, α -alogenazioni ed amminazioni di aldeidi).

L’organocatalisi è la risposta moderna alla chimica dei metalli che, seppur di indiscusso rilievo per la sintesi organica, non è in grado di rispondere alle esigenze attuali di una chimica più ecosostenibile. La chimica dei metalli non può ovviare agli elevati costi della preparazione dei catalizzatori, alla tossicità dei metalli, che, sebbene in tracce, nella reazione contaminano il prodotto finale, alla necessità spesso di operare in condizioni anidre ed anaerobiche ed alla necessità di introdurre gruppi protettori per le funzionalità reattive del substrato [26].

L’organocatalisi testimonia la grande importanza della lezione che si può trarre dalla natura come primaria fonte di ispirazione per la sintesi di molecole complesse e offre la risposta a questa domanda pubblicata su Science nel 2002: “How small can a highly active and stereoselective catalyst be? And what are the minimal functional and structural features required in a chiral catalyst?” [27].

Nella struttura molecolare dell’organocatalizzatore, infatti, vengono “riassunti” elementi chiave del sito attivo dell’enzima (i suoi aminoacidi “catalitici”) o del suo cofattore e i substrati naturali vengono parzialmente modificati come “building blocks” per i processi sintetici, come talvolta accade anche per gli intermedi chiave della catalisi enzimatica. E’ questo il caso, ad esempio, della

sintesi organocatalizzata di omologhi di carboidrati e vari derivati riportata di seguito (**Schema 27**).



Schema 27. Addizione aldolica prolina-catalizzata del diossanone e varie aldeidi C_2 e C_3 nella sintesi di carboidrati

In questo approccio la (*S*)-prolina è un aminoacido che come tale presenta una funzionalità acida ed una basica (così come avviene quasi sempre nel sito attivo di un enzima di solito tra acido aspartico e una lisina) ed in questa reazione svolge il ruolo biologico di un'aldolasi (par. 3.1), catalizzando la reazione aldolica tra il diossanone (**A**) e una serie di aldeidi α -ramificate C_2 e C_3 (**B**) per ottenere dei carboidrati (**C**). Il diossanone, invece, è un equivalente chirale di sintesi del diidrossiacetone (DHA) (**Figura 4**), che nella sua forma monofosforilata (DHAP) è un substrato dell'aldolasi nella gluconeogenesi (**Schema 10**).

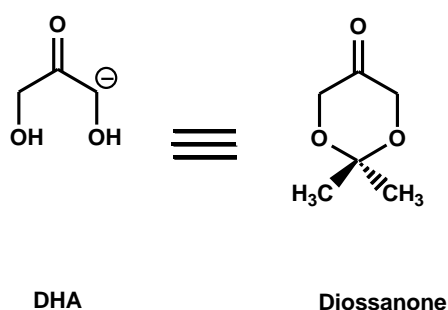
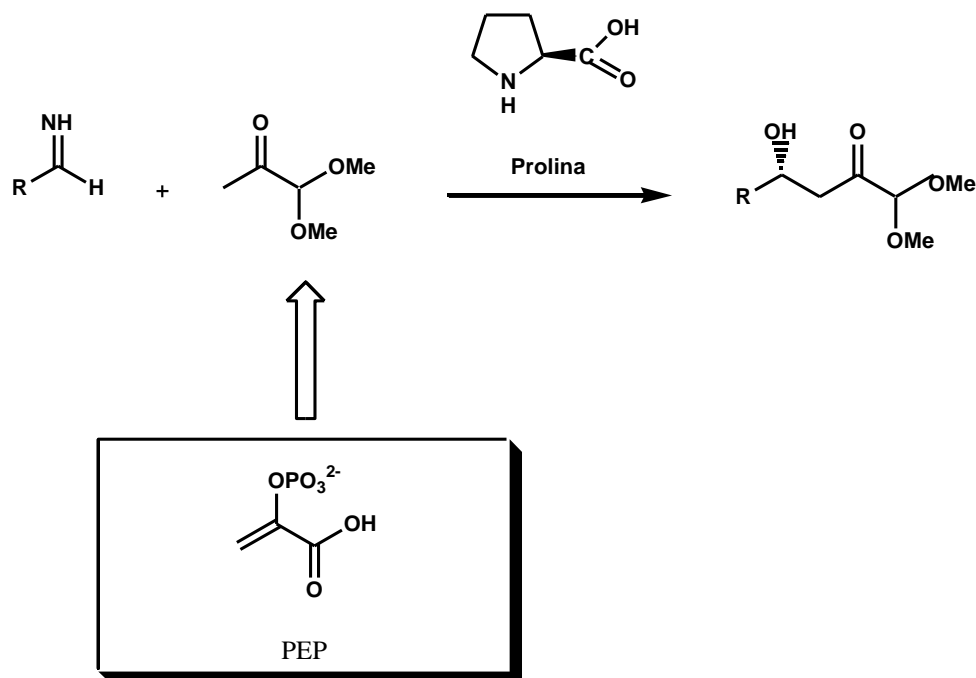


Figura 4. Diosanone: analogo del DHA nell'addizione aldolica organocatalitica

Analogamente anche il fosfoenolpiruvato (PEP), intermedio della glicolisi con un ruolo chiave nella sintesi degli aminoacidi aromatici e nella sintesi dei lipopolisaccaridi di membrana dei batteri Gram-negativi, è stato ripreso nella reazione di sintesi catalizzata dalla prolina per la sintesi del precursore dell'acido ulosonico (**Schema 28**) [28].

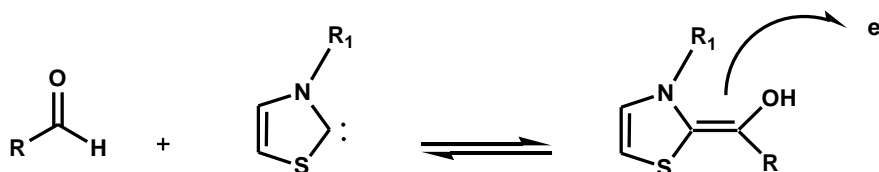


Schema 28. Reazione aldolica prolina-catalizzata del precursore dell'acido ulosonico

La formazione della “aldeide attivata” con il fenomeno di “*umpolung*” nella catalisi enzimatica tiamina-dipendente (**Schema 22**), infine, è stata ripresa dall'organocatalisi per quella che è la chimica degli N-eterocicli carbeni (NHC). I carbeni che mimano il ruolo della tiamina sono per lo più il tiazolo e sali di triazolo.

La tiamina è il cofattore che nella sua forma di ilide costituisce il carbene nucleofilo; la catalisi procede con la formazione dell'aldeide attivata (intermedio di Breslow) e il successivo attacco nucleofilo del suo C carbonilico su una seconda

molecola di substrato; l'intermedio tetraedrico che si forma riarrangia con conseguente rilascio del prodotto finale e del cofattore nella forma di carbene nucleofilo (**Schema 29**) [29].



Schema 29. Catalisi degli N-eterocicli carbeni

Negli ultimi anni in letteratura, nell'ambito della catalisi con gli N-eterocicli carbeni, sono stati pubblicati molti lavori nei quali è descritta la condensazione intra-molecolare di aldeidi e chetoni (condensazione benzoinica) e di addizioni 1,4-intramolecolari (reazione di Stetter) [28].

Molto ristretta è invece la letteratura che descrive varianti inter-molecolari delle reazioni precedenti, fatta eccezione per il recente lavoro di Enders [30] in cui è riportata la reazione tra aldeidi e trifluorometilchetoni catalizzata da un sale di triazolo biciclico usato come pre-catalizzatore.

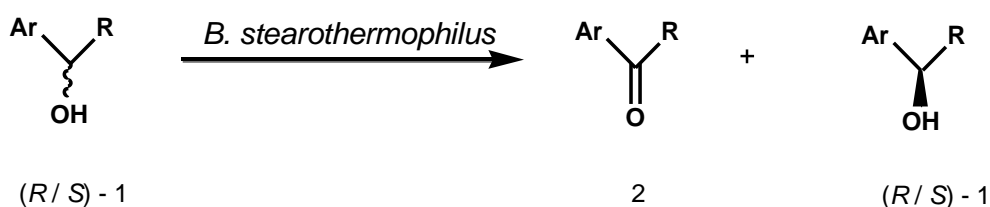
Bacillus stearothermophilus

oppure

Bacillus licheniformis?

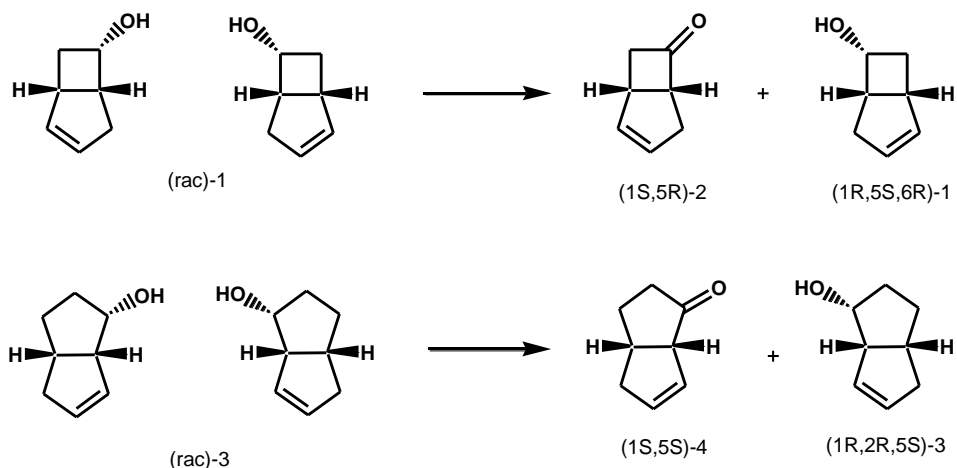
2.1 *Bacillus stearothermophilus*

Gli studi che costituiscono il background scientifico di questo progetto di ricerca di dottorato e che ne avvalorano i risultati risalgono al 1990, data in cui il mio gruppo di ricerca, costituito per lo più da chimici, decise di aprirsi alla biocatalisi, intravedendo in maniera lungimirante la scommessa futura della sintesi organica. Grazie ad una collaborazione con il Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare (DPVA) dell'Università degli Studi di Bologna, i ricercatori del mio gruppo si trovarono a disporre di un vasto numero di microorganismi da poter utilizzare in ambito biotrasformativo nei nostri laboratori dell'Università di Ferrara. Per capire l'originalità dei dati sperimentali allora ottenuti bisogna ricordare che in quegli anni le principali applicazioni sintetiche di microorganismi si limitavano per lo più all'impiego del lievito di birra (Baker's Yeast) in fermentazioni e biotrasformazioni per la risoluzione cinetica di composti racemici. Nei nostri laboratori si iniziò dapprima lo screening dei microorganismi della vasta collezione ricevuta da Bologna per la risoluzione cinetica di alcoli secondari. Come appare evidente dal primo lavoro del 1993 [31], il batterio che dette i migliori risultati nella risoluzione di miscele di alcoli arilici ed eteroarilici su scala analitica e preparativa fu il *Bacillus stearothermophilus* (**Schema 1**), così come allora era identificato nella collezione.



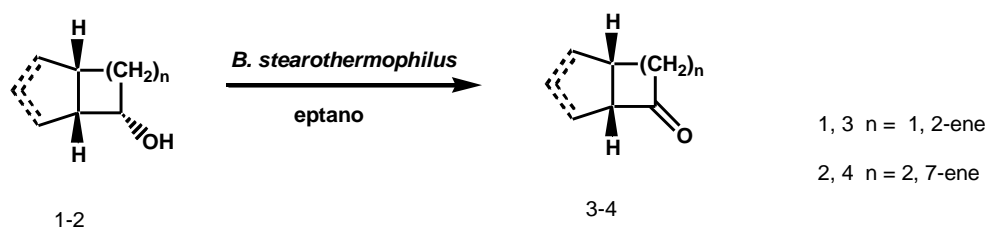
Schema 1. Ossidazione enantioselettiva di alcoli secondari
con *B. stearothermophilus*

Bacillus stearothermophilus continuò ad essere utilizzato negli anni successivi anche per la risoluzione cinetica via ossidazione di alcoli biciclici [32] (**Schema 2**), importanti intermedi per la sintesi di composti di interesse farmaceutico e di prodotti naturali, analoghi delle prostacicline.



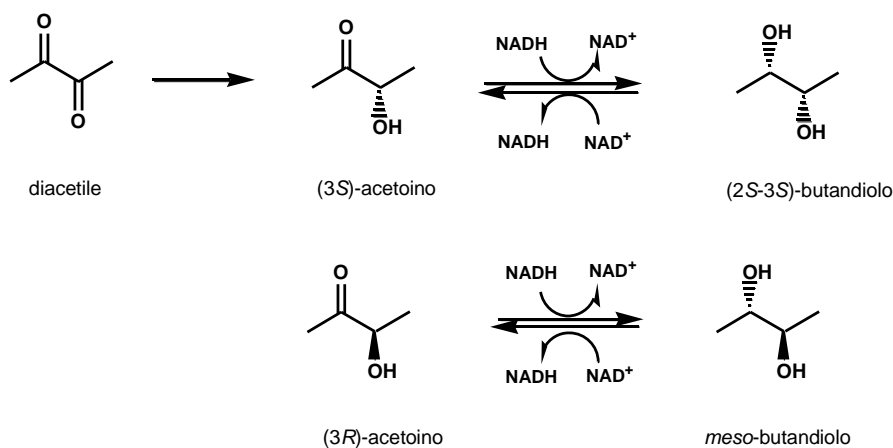
Schema 2. Risoluzione cinetica di alcoli biciclici via ossidazione
con *B. stearothermophilus*

Un lavoro innovativo sul panorama scientifico di quegli anni e che merita di essere ricordato risale al 1995 e descrive l'impiego di questo microorganismo in biotrasformazioni condotte in eptano (**Schema 3**) [33]. Fino ad allora, infatti, solo il lievito di birra e un microorganismo affine ai lieviti, il *Geotrichum candidum*, erano stati impiegati per scopi biocatalitici in solventi organici.



Schema 3. Ossidazioni catalizzate da *B. stearothermophilus* in eptano

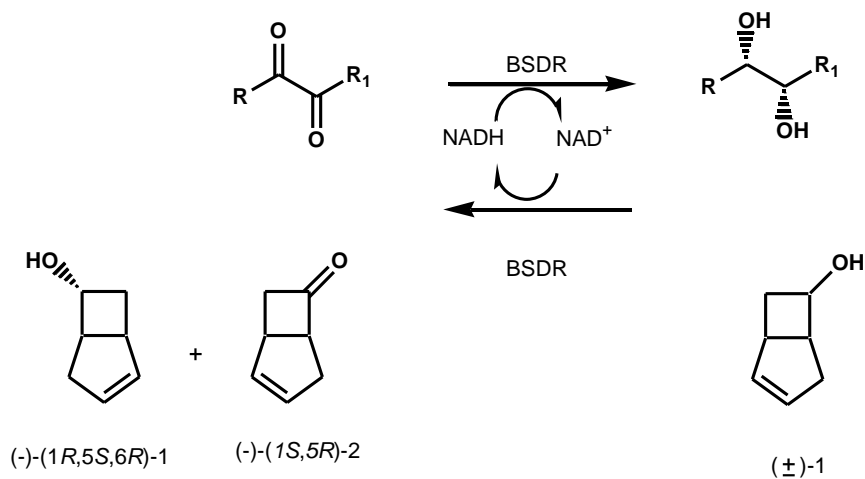
Dati questi risultati si iniziò lo studio biochimico dei principali processi metabolici di *B. stearothermophilus* e si arrivò alla purificazione e caratterizzazione della deidrogenasi responsabile delle ossidazioni descritte precedentemente. La deidrogenasi in questione si rivelò essere una diacetil(acetoino) reduttasi NADH-dipendente che fu parzialmente purificata, in collaborazione con il gruppo di biochimici del Prof. Ripa dell'Università di Ferrara [34] (Schema 4).



Schema 4. Reazioni catalizzate da diacetil(acetoino) reduttasi da *B. stearothermophilus*.

Successivamente questo enzima fu impiegato in reazioni di riduzione di α -dichetoni commerciali. L'aspetto maggiormente interessante di questo enzima, che fu chiamato *B. stearothermophilus* diacetil reduttasi (BSDR), consiste proprio nel fatto che il diacetile, substrato naturale, presenta due gruppi carbonilici vicinali. Applicazione naturale fu la riduzione di α -dichetoni commerciali. BSDR si rivelò non solo essere un nuovo ed efficiente biocatalizzatore in grado di accettare come substrati un'ampia gamma di dichetoni variamente sostituiti, ma anche dimostrò di essere altamente (*S*)-stereospecifica [35]. Si ottennero una serie di (*S,S*)-1,2-dioli enantiopuri, categoria di sintoni importanti per la sintesi

organica, utilizzando un sistema monoenzimatico di riciclo del cofattore NADH (Schema 5).



Schema 5. Riduzioni enantioselettive di α -dichetoni con BSDR

Accanto all'impiego di *B. stearothermophilus* e di BSDR per scopi biocatalitici, questo batterio è stato utilizzato in fermentazioni per la produzione di 2,3-butandiolo. *B. stearothermophilus*, batterio Gram positivo ubiquitario, insieme ad altri batteri (*Enterobacter aerogenes*, *B. Polimyxa*, *K. Oxytoca*, *B. licheniformis*) [36] è noto produrre per via fermentativa interessanti quantità di 2,3-butandiolo, metabolita importante dal punto di vista industriale insieme ad alcuni suoi derivati (Figura 1).

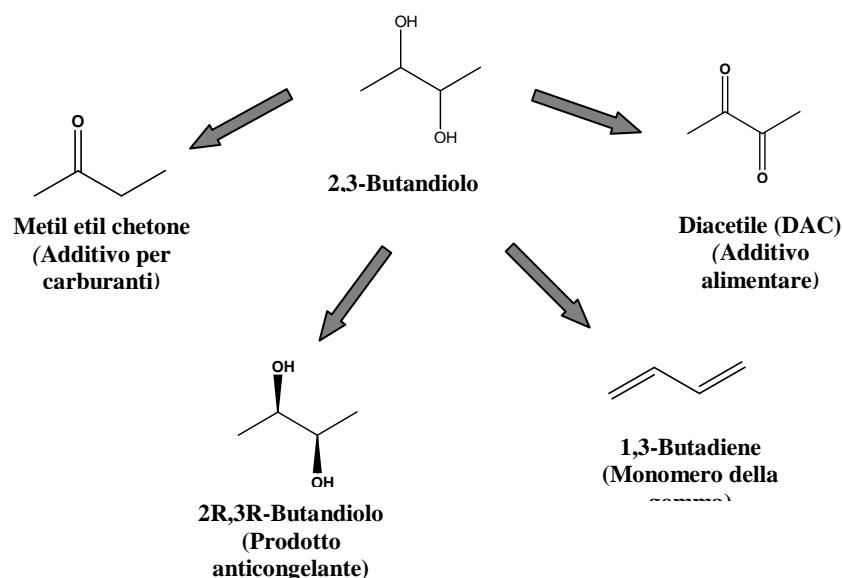


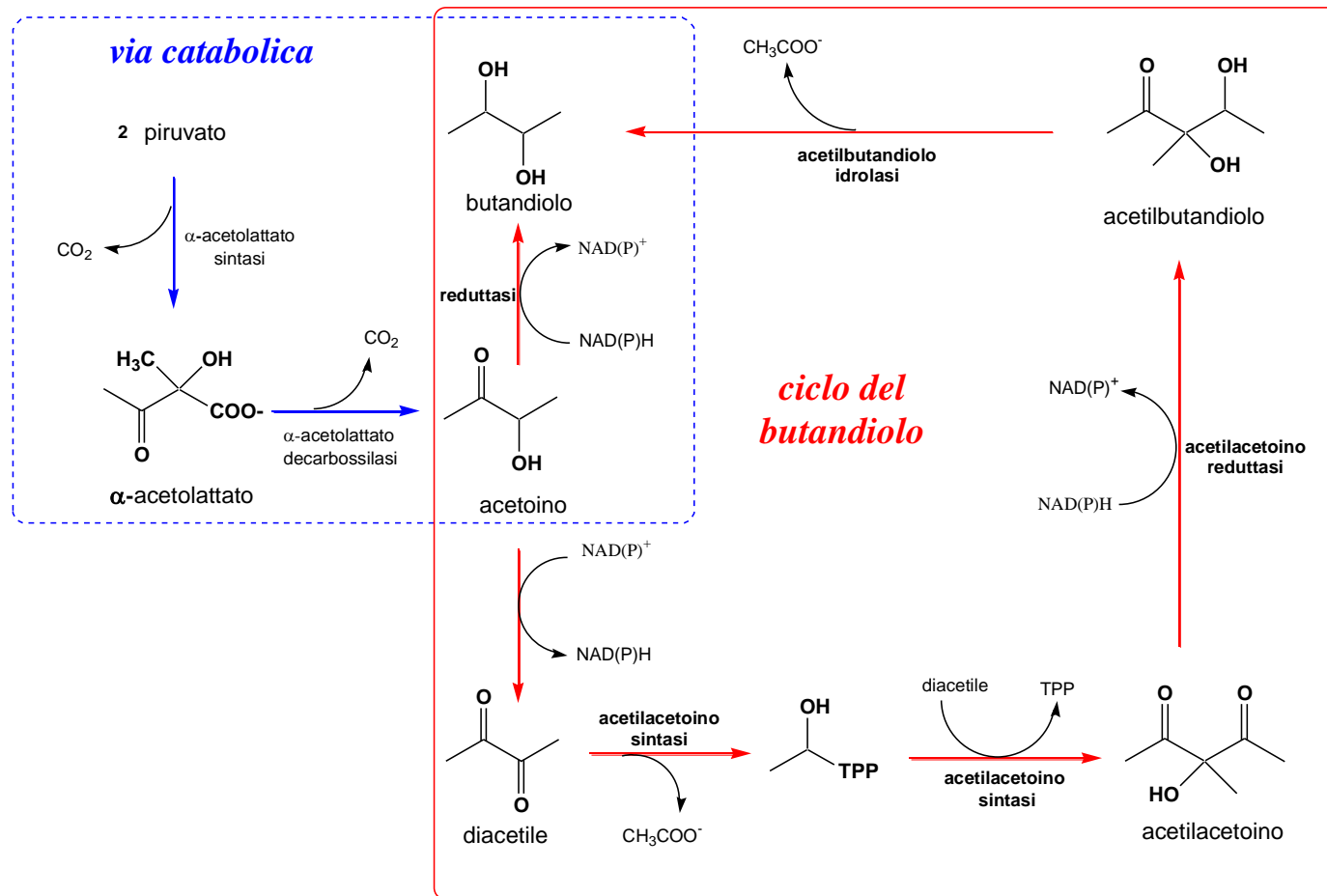
Figura 1. Applicazioni industriali del 2,3-butandiolo e i suoi derivati

Nei nostri laboratori sono state studiate fermentazioni a partire dal saccarosio, per poi passare ad uno screening riguardante altre tipologie di mono- e disaccaridi utilizzabili in questo processo come fonti di carbonio, per lo più saccaridi comuni, facendo particolare attenzione a quelli maggiormente presenti in matrici naturali complesse e in sottoprodotti derivanti dall'industria o da lavorazioni agricole [37]. I risultati ottenuti in campo fermentativo hanno spinto la ricerca verso uno studio strettamente biochimico del batterio, riguardante la via metabolica responsabile della produzione di 2,3-butandiolo e del suo precursore acetoino (AC).

I primi lavori scientifici riguardanti il metabolismo batterico per la produzione di 2,3-butandiolo sono stati pubblicati nel 1956 (Juni ed Elliot). E' stato messo in luce che alcuni ceppi batterici del genere *Aerobacter* e *Bacillus* erano in grado di produrre questo metabolita come principale prodotto di fermentazione a partire dal piruvato, derivato dal catabolismo dei carboidrati. Inoltre, alcuni di questi microorganismi, che principalmente si trovano nel suolo, avevano dimostrato di possedere, accanto alla via catabolica classica, anche una via anaerobica alternativa che ha come intermedio chiave per la produzione del 2,3-butandiolo l'acetilmetilcarbinolo (acetoino) [38], nota con il nome di "ciclo del butandiolo" (Schema 6).

La via catabolica ha come punto di partenza la condensazione di due molecole di piruvato provenienti dalla glicolisi, catalizzata dall'enzima acetolattato sintasi, per formare l' α -acetolattato. Tale prodotto viene successivamente convertito in acetoino (AC) con eliminazione di CO_2 per opera di un secondo enzima, l'acetolattato decarbossilasi. L'acetoino è l'intemedio chiave che può intraprendere due strade metaboliche che portano al butandiolo. La prima, quella indicata col nome di via catabolica, porta direttamente al diolo attraverso una riduzione (spesso reversibile) catalizzata da una o più acetoino reductasi. Questo percorso è quello proposto in letteratura per i batteri *Bacillus polymixa* e *Klebsiella pneumoniae*.

La seconda via, nominata "ciclo del butandiolo", inizia dall'ossidazione dell'acetoino a diacetile (DAC). Il diacetile formato viene utilizzato in una reazione di condensazione con una molecola di acetaldeide attivata; questo passaggio, catalizzato dall'enzima acetilacetoino sintasi, porta alla formazione dell'acetilacetoino (AAC). Tale prodotto a sua volta viene ridotto per opera di una acetilacetoino reductasi NADH-dipendente ad acetilbutandiolo (ABD), che di seguito viene convertito dall'enzima acetilbutandiolo idrolasi a 2,3-butandiolo, liberando una molecola di acetato.



Schema 6. Via catabolica e “ciclo del butandiolo” nei batteri per la produzione di 2,3-butandiolo

Dai dati ottenuti nel processo fermentativo è stata posta attenzione sull'enzima acetilacetoino sintasi (AAS) (**Schema 6**), che catalizza una reazione di formazione di legami C-C, importante e stimolante da un punto di vista biocatalitico e sintetico, come più volte sottolineato nella trattazione introduttiva ed in questo ambito si inserisce la mia tesi di dottorato. Noto in letteratura è che questo enzima è inducibile in presenza di acetoino (AC) e viene descritto e purificato per la prima volta in un lavoro di Ui e i suoi collaboratori nel 1998 in *B. cereus* YUF-4 [39].

Lo stesso gruppo di ricerca nel 2002 ha indicato proprio AAS come il marker per determinare la presenza del “ciclo del butandiolo” in batteri come *Bacillus cereus*, *B. subtilis* e *Micrococcus urea* [36]. Da questi studi acetilacetoino sintasi è risultato essere over-espresso in presenza di acetoino nel terreno ed inibito dalla presenza di glucosio. L'ipotesi più accreditata è che il ciclo del butandiolo costituisca il processo metabolico che permette ai batteri, in condizioni di crescita stringenti e in assenza o carenza di carboidrati come fonte di carbonio primaria, di rigenerare facilmente i cofattori NADH e NADPH. Tuttavia ancora molto resta ancora da chiarire; in particolare non è ancora stato delineato un chiaro profilo genetico associato al possesso di questa via metabolica.

Nel gruppo di ricerca con cui ho collaborato, dai risultati ottenuti dalla fermentazione con *B. stearothermophilus*, si è iniziato a studiare AAS con l'idea di poterlo sfruttare per scopi biocatalitici nella formazione di legami C-C e questo è l'argomento di questa tesi di dottorato che verrà sviluppato nei capitoli successivi. Crescendo le cellule di *B. stearothermophilus* su un terreno arricchito con acetoino e seguendo un protocollo già descritto per altri batteri [39], è stato infatti possibile indurre l'espressione di AAS anche in questo microorganismo e dimostrare la presenza del “ciclo del butandiolo”. Il lavoro svolto si è poi concentrato sulle applicazioni di AAS per la sintesi asimmetrica partendo da dichetoni commerciali forniti come substrato al posto di quello naturale, il diacetile [40].

2.2 *Bacillus stearothersophilus* oppure *Bacillus licheniformis*?

Date le prospettive di ricerca su AAS e la necessità di intraprendere studi di biologia molecolare nel tentativo di clonare ed esprimere questa proteina, è stato necessario inviare il microorganismo alla DSMZ per essere identificato con una sigla internazionale e per poter poi confrontare le informazioni presenti nei databases genomici.

Il batterio che per molti anni è stato identificato come *B. stearothermophilus* è stato reidentificato come *B. Licheniformis* all'inizio del 2011. Per un errore di etichettatura della collezione dell'Università di Bologna questo microorganismo per tanti anni è stato confuso con un'altra specie di *Bacillus*.

Come è facile da supporre per chiunque si occupi di microbiologia questo errore non avrebbe avuto modo di essere scoperto se non attraverso dei test specifici biochimici in quanto non vi sono marcate differenze di crescita e di metaboliti prodotti tra i due microorganismi. La reidentificazione, costringendo al riesame dei dati pubblicati e di quelli sperimentali più recenti, ha addirittura permesso di confermare i risultati precedentemente ottenuti con piacevole soddisfazione da parte dei ricercatori.

2.3 *Bacillus licheniformis*

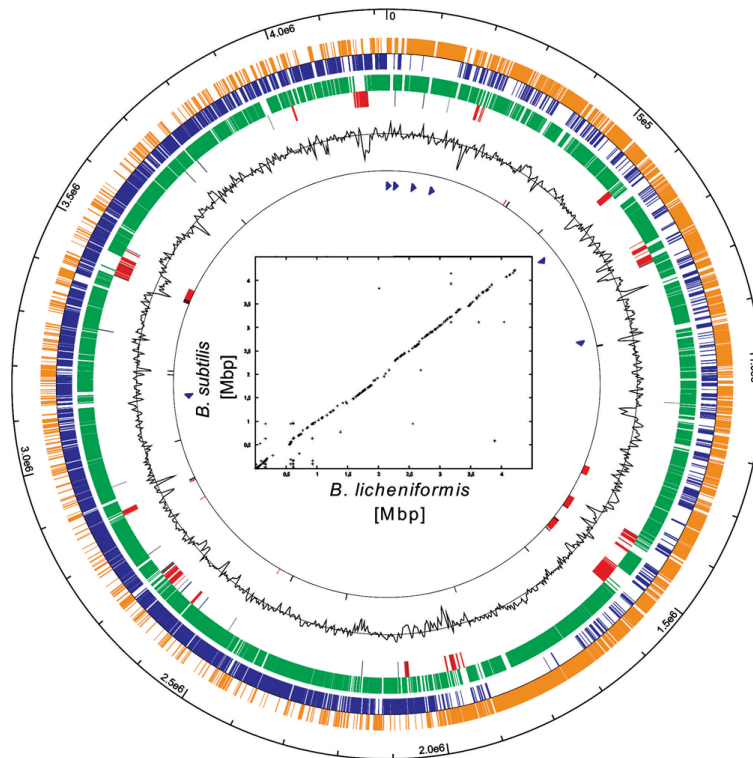
Il *B. licheniformis* è un batterio Gram-positivo sporigeno ubiquitario, non patogeno per animali e piante che presenta molte analogie con *B. stearothermophilus*. La sua temperatura ottimale di crescita è intorno ai 40-45 °C ma è in grado di sopportare anche temperature più alte, mentre a 37°C questo batterio è in grado di secernere la maggior quantità di enzimi. Il piumaggio di collo e coda di uccelli stanziali di terra o d'acqua, a differenza di quello degli uccelli di passo migratori, è un veicolo per *B. Licheniformis* che normalmente lo ricopre. Alcuni studi ritengono anche che alcuni metaboliti escreti dal batterio, probabilmente durante processi fermentativi, siano coinvolti nella modificazione del colore delle piume di questi uccelli.

B. licheniformis occupa una posizione di grande rilievo a livello industriale grazie agli esoenzimi che esso produce (fino a 20-25 g/L). Tra questi enzimi in

particolare le serin-proteasi alcaline (subtilisine) hanno trovato un rapido successo come additivi nella produzione di detergenti di uso domestico [41], con un output annuo di 500 tonnellate di enzima puro. Dai processi fermentativi di questo batterio si ricavano anche amilasi e l'antibiotico ad uso topico noto con il nome di bacitracina [42].

B. licheniformis appartiene al gruppo II del genere *Bacillus*, il cui organismo modello è il *B. subtilis*. A questo gruppo appartengono anche altri batteri di cui è stata determinata la sequenza genomica completa: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* ed alcune specie di *B. halodurans*. Accanto a “*B. licheniformis*”, che è il nome scientifico, questo microorganismo è apparso in passato in letteratura con vari sinonimi come “*Clostridium licheniforme*” (Weigmann 1898), “*Denitrobacillus licheniformis*” (Weigmann 1898- Verhoeven 1952), *Bacillus licheniformis* (Weigmann 1898- Chester 1901), *Bacillus sp.* W10.6, *Bacillus sp.* WED10.6, “*Clostridium licheniforme*” e “*Denitrobacillus licheniformis*”. Attualmente è nota solo la sequenza genomica di un tipo di *B. licheniformis*, identificato come *B. licheniformis* DSM 13/ ATCC 14580, ed a questo si farà riferimento nella trattazione a seguire.

Facendo un'analisi comparata della sequenze genomiche di *B. licheniformis* DSM 13 con quelle degli altri *Bacilli* del gruppo II, è possibile notare come *licheniformis* presenti caratteristiche che lo avvicinano maggiormente a *subtilis* e *halodurans*. Il genoma di *B. licheniformis* DSM 13 è costituito da un unico cromosoma circolare di 4,222,748 paia di basi ed è privo di plasmidi (**Figura 2**).



In blu e arancio è riportata la sequenza codificante nei 2 orientamenti . In verde sono riportate le ORFs omologhe a quelle di *B. subtilis*. In rosso i geni con un codon usage particolare per *B. licheniformis*. La variazione di G+C è indicata come grafico nero.

Figura 2. Mappa circolare del cromosoma di *B. licheniformis* DSM 13

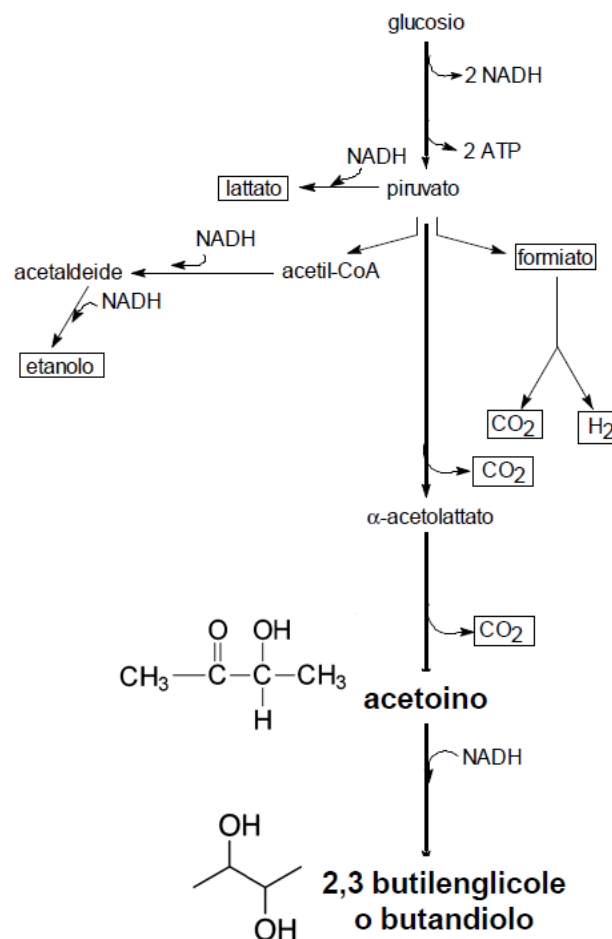
Il genoma di *B. licheniformis* è caratterizzato da 902 geni che risultano unici di questo ceppo rispetto agli altri microrganismi di questo gruppo, come si evince dall'analisi delle ORF_s (open reading frame). Tali geni costituiscono un serbatoio di nuovi potenziali biocatalizzatori da studiare di cui ancora non si conosce la funzione. Il sequenziamento del DSM 13 ha confermato, per analisi comparata con gli altri microrganismi già sequenziati all'interno del gruppo II del genere *Bacillus*, che il "core" genomico altamente conservato di questi microrganismi racchiude i geni che codificano per la regolazione ed il catabolismo degli aminoacidi, per gli enzimi che intervengono nella glicolisi, nella via del pentosio fosfato, nel ciclo degli acidi tricarbossilici e nella fermentazione 2,3-butenglicolica (del 2,3-butandiolo). Nella tabella seguente sono riportati i geni noti

che codificano per esoenzimi di *B. licheniformis* e che fanno di questo batterio un microorganismo di notevole interesse per applicazioni industriali e biotecnologiche (**Tabella 1**) [43].

Tabella 1. Selezione di esoenzimi identificati in *B. licheniformis* e i corrispondenti geni ortologhi in *B. subtilis*

Gene ID	Function	Gene designation in <i>B. subtilis</i>
BLi00656	α -Amylase precursor (EC 3.2.1.1)	
BLi03543	α -Glucosidase	
BLi02117	α -Glucosidase (EC 3.2.1.20)	
BLi03021	α -L-Arabinofuranosidase	<i>abfA</i>
BLi01295	Arabinan endo-1,5-L-arabinase	<i>abnA</i>
BLi04220	Arabinan endo-1,5- α -L-arabinosidase	<i>yxiA</i>
BLi04276	Arabinogalactane endo-1,4- α -galactosidase	<i>yvfO</i>
BLi00447	β -Galactosidase	<i>lacA</i>
BLi04214	β -Glucosidase	<i>bglH</i>
BLi01882	Cellulase (EC 3.2.1.4)	
BLi01881	Cellulose 1,4- β -cellobiosidase	
BLi00338	Chitinase (EC 3.2.1.14)	
BLi00339	Chitinase (EC 3.2.1.14)	
BLi02088	Endo-1,4- β -glucanase	<i>bglC</i>
BLi01883	Endo-1,4- β -mannosidase	
BLi00655	Endo-1,4- β -xylanase	<i>yjeA</i>
BLi01880	Endo-1,4-glucanase (EC 3.2.1.4)	
BLi00545	Esterase/lipase	
BLi00340	Glutamic acid-specific protease	<i>mpr</i>
BLi02827	Levanase	<i>sacC</i>
BLi03707	Levanase	<i>yveB</i>
BLi03706	Levansucrase	<i>sacB</i>
BLi03370	Lipase/esterase	
BLi02821	Lipase/esterase	
BLi00658	Maltogenic α -amylase (EC 3.2.1.1)	
BLi04019	Minor extracellular serine protease	<i>vpr</i>
BLi01123	Minor extracellular serine protease	<i>epr</i>
BLi01404	Pectate lyase	<i>pel</i>
BLi03053	Pectate lyase	<i>pelB</i>
BLi03741	Pectate lyase	<i>yvpA</i>
BLi04129	Pectate lyase	
BLi03498	Pectin methylesterase	
BLi04177	Peptidase T	<i>pepT</i>
BLi01399	Polysugar-degrading enzyme	<i>ykfC</i>
BLi02863	Protease	<i>yrrN</i>
BLi02862	Protease	<i>yrrO</i>
BLi01109	Subtilisin Carlsberg precursor (EC 3.4.21.62)	
BLi01909	Zinc protease (EC 3.4.99.-)	

Una delle caratteristiche che discosta il *B. licheniformis* dal suo capostipite (*B. subtilis*) riguarda la capacità di metabolizzare l'acetoino ed utilizzare 2,3-butandiolo [43]. Come molti altri enterobatteri aventi come habitat il suolo e le acque (*Enterobacter aerogenes* e i generi *Erwinia* e *Serratia*, patogeni delle piante), molti batteri del genere *Bacillus*, in assenza delle fonti energetiche primarie (glucosio) e/o in mancanza del giusto apporto di ossigeno, possono compiere, tra le altre, la fermentazione 2,3-butilenglicolica. Il prodotto principale è il 2,3-butilenglicole (2,3-butandiolo) che si forma dalla condensazione di due molecole di piruvato, con la liberazione di due molecole di CO₂ (Schema 7).



Schema 7. Fermentazione 2,3-butilenglicolica negli *Enterobatteri* ed in *B. licheniformis*

Nel corso della fermentazione si producono anche gli acidi tipici della fermentazione acido-mista, accanto a notevoli quantità di etanolo per il mantenimento dell'equilibrio ossido-riduttivo.

Accanto a questa via che potremmo definire “anabolica”, esiste anche una via alternativa, detta “ciclo del butandiolo”, per la biosintesi batterica di 2,3-butandiolo; entrambe le vie metaboliche condividono l'acetoino come intermedio chiave. La presenza del “ciclo del butandiolo” è stata ampiamente studiata in letteratura ma i complessi meccanismi che la regolano e gli enzimi che ne prendono parte non sono stati ancora del tutto chiariti. Ciò che si apprende dalla letteratura scientifica è che, a differenza della via classica del catabolismo del piruvato, descritta precedentemente, il “ciclo del butandiolo” è proprio solo di un numero più ristretto di batteri, tra cui compaiono alcuni tipi di *Klebsiella*, *Micrococcus urea*, *B. cereus* e *B. licheniformis* [39].

Considerando ora nello specifico *B. licheniformis*, è importante sottolineare come lo studio a livello della sequenza genomica di questo batterio [43] sia stato fondamentale per identificare le regioni codificanti i geni per la regolazione del metabolismo dell'acetoino. Si tratta fondamentalmente di 2 operoni *acoABCL* e *acuABC*, presenti anche nel genoma di *B. subtilis*. La trascrizione dell'operone *acoABCL* è indotta dalla presenza di acetoino e repressa dalla presenza del glucosio, proprio come accade in *B. subtilis*. Esperimenti di knock-out genico, con la produzione di mutanti che presentano delezioni nella regione dell'operone *acuABC*, mostrano come i geni codificati in questa regione svolgano un ruolo determinante nella regolazione del metabolismo dell'acetoino ma non siano direttamente coinvolti nella sua degradazione a 2,3-butandiolo. A differenza di *B. subtilis*, *B. licheniformis* è in grado di sfruttare acetoino come fonte di carbonio quando questo metabolita è addizionato al brodo di coltura al posto del glucosio o del saccarosio. Osservando la natura dei metaboliti prodotti durante la fase stazionaria di ceppi mutanti di *B. licheniformis* in regioni dell'operone *acoABCL*, è possibile dimostrare come all'aumentare della concentrazione di 2,3-butandiolo, la quantità di acetoino rimanga costante nel tempo. Ciò sta a significare che deve esistere una via alternativa di degradazione dell'acetoino che non è presente in *B.*

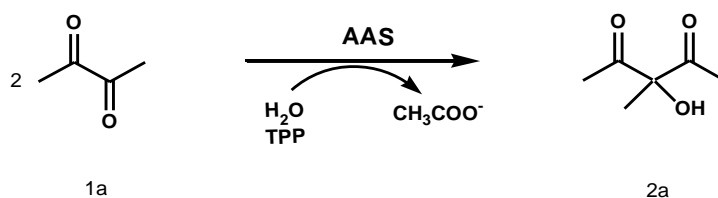
subtilis; quest'ultimo infatti è noto possedere solo un sistema reversibile di deidrogenasi che interconvertono 2,3-butandiolo in acetoino e viceversa [44]. I geni che appartengono agli operoni *acoABCL* e *acuABC* di *B. licheniformis* non sono però ancora stati ulteriormente descritti, ma è probabile che proprio nell'operone *acoABCL* si trovino le sequenze codificanti per gli enzimi coinvolti nel "ciclo del butandiolo".

Recenti esempi in letteratura vedono proprio messe in evidenza la capacità di *B. licheniformis* di produrre interessanti quantità di 2,3-butandiolo, metabolita che, insieme ai suoi derivati, da tempo viene prodotto in diversi settori industriali per le sue molteplici applicazioni di mercato [45].

**ACETILACETOINO SINTASI:
SINTESI DI ALCOLI TERZIARI**

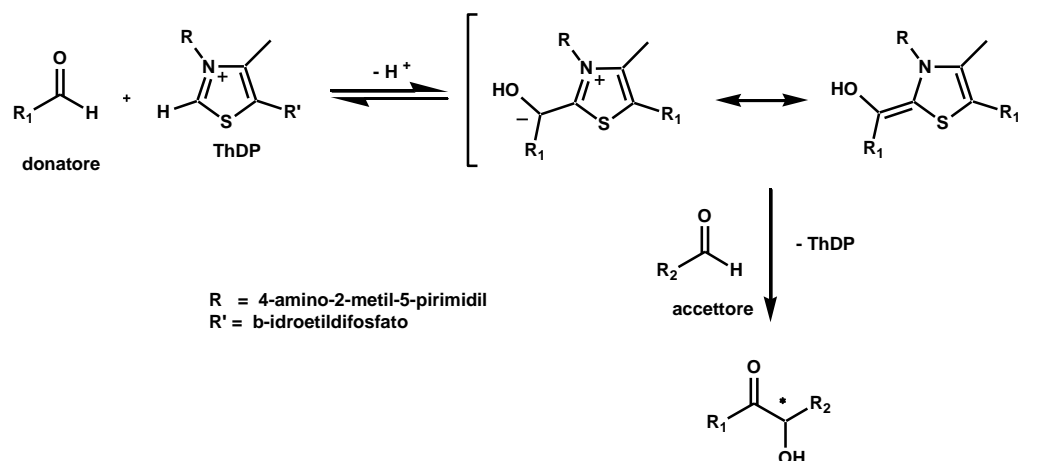
Il lavoro di ricerca che è descritto in questo capitolo rappresenta il punto iniziale e fondamentale su cui si è incentrato tutto il lavoro svolto durante questi tre anni di dottorato di ricerca ed ha come nucleo centrale l'impiego di acetilacetoino sintasi (AAS) da *B. stearothermophilus* per scopi sintetici. Qui viene descritto per la prima volta l'utilizzo di AAS come biocatalizzatore per la sintesi di α -idrossi- α -alchil- β -dichetoni attraverso la formazione di legami carbonio-carbonio, in reazioni di tipo aciloinico. Questo lavoro rappresenta la prima applicazione sintetica di AAS e costituisce una novità nell'ambito della biocatalisi applicata alla sintesi asimmetrica. Nella pubblicazione che ne è derivata, apparsa sul *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* nel 2010 [40], il microrganismo utilizzato ha ancora il nome di *Bacillus stearothermophilus*. In seguito, come precedentemente riportato (Cap. 2, par. 2.2), con l'invio a DSMZ per la caratterizzazione *B. stearothermophilus* è risultato essere *B. licheniformis*. Alla nuova identificazione ha fatto seguito una lettera di "errata corrige" al giornale. Da questo momento in poi si parlerà sempre di *B. licheniformis*.

In questo lavoro, poiché la formazione stereoselettiva di carboni quaternari e il controllo della configurazione dei centri di asimmetria all'interno di molecole dalla struttura complesse sono importanti obiettivi sintetici, vengono sintetizzati alcoli terziari attraverso reazioni di formazione di legami C-C per via enzimatica. AAS da *B. licheniformis* catalizza la prima reazione del "ciclo del butandiolo" (Cap. 2, par. 2.3) che consiste nella condensazione di 2 molecole di diacetile **1a** con la formazione di una molecola di acetilacetoino **2a** e il rilascio di acido acetico (Schema 1).



Schema 1. Sintesi di acetilacetoino

AAS è un enzima tiamina difosfato (ThDP)-dipendente che sfrutta l'*umpolung* dell'aldeide (donatore) durante il processo catalitico (Cap. 1, par. 1.3.3). Il nuovo legame C-C si forma in modo stereoselettivo dall'attacco del carbanione carbonilico legato alla tiamina su una seconda molecola di aldeide (accettore) (Schema 2).



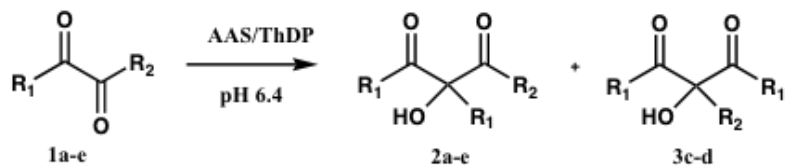
Schema 2. Meccanismo catalitico di AAS da *B. licheniformis* nel “ciclo del butandiolo”

Vista questa interessante reazione, AAS è stata utilizzata nella sintesi di α -idrossi-1,3-dichetoni a partire da una serie di α -dichetoni commerciali.

Le cellule di *B. licheniformis*, cresciute su un terreno arricchito con acetoino, secondo un protocollo già descritto per indurre l'espressione di AAS [36], trascorso il tempo ottimale, sono state lisate e l'estratto cellulare contenente l'enzima è stato direttamente utilizzato per catalizzare le reazioni di “homocoupling”, utilizzando gli α -dichetoni commerciali **1a-e**. Attraverso una semplice purificazione cromatografica è stato possibile ottenere una gamma di α -idrossi- α -alchil- β -dichetoni chirali **2a-e** e prochirali **3c-d** che sono riportati nella **Tabella 1**.

Tutti gli α -idrossi-1,3-dichetoni riportati sono alcoli terziari polifunzionali che costituiscono importanti “building blocks” per la sintesi asimmetrica in quanto presentano diverse funzionalità elaborabili in maniera indipendente.

Tabella 1. Sintesi AAS-catalizzata di α -idrossi-1,3-dichetoni **2** e **3**



1,2-dichetone 1	α -idrossi-1,3-dichetone 2 (resa %)	α -idrossi-1,3-dichetone 3 (resa %)
 1a	 2a (57)	
 1b	 2b (60)	
 1c	 2c (30, ee 70%) ^a	 3c (25) ^a
 1d	 2d (42, ee 67%) ^a	 3d (19) ^a
 1e	 2e (45, ee 76%)	

^a Le rese sono state calcolate sulla base dei prodotti ottenuti in miscela.

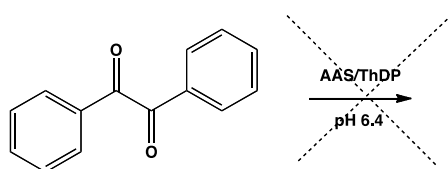
I dichetoni simmetrici 2,3-butandione **1a** e 3,4-esandione **1b** producono acetilacetoino **2a** ed α -idrossi-3,5-eptandione **2b** in resa del 57% e 60%, rispettivamente.

Questo risultato permette di affermare che AAS è in grado di trasferire sia il carbanione acetilico che quello propionilico. Nel caso delle reazioni sui dichetoni

non-simmetrici **1c-e** si ottengono solo i prodotti **2c-e** e **3c-d** derivanti dal trasferimento del carbanione acetilico.

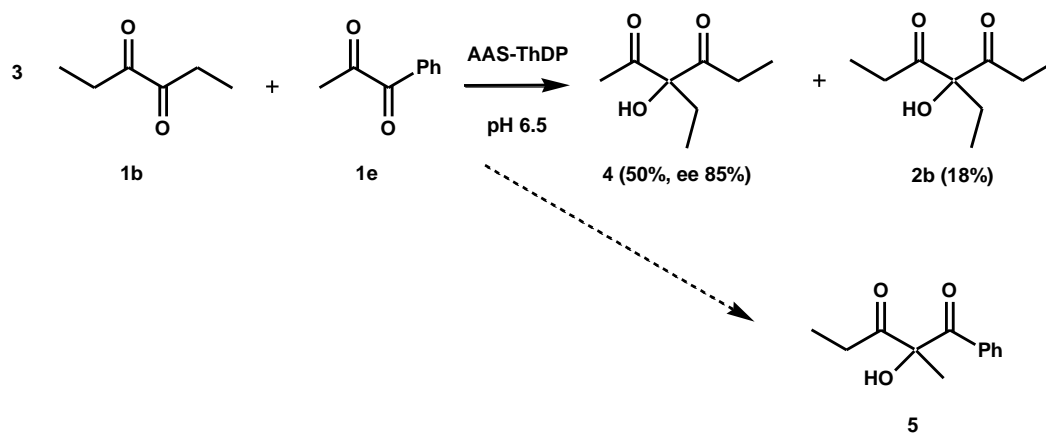
La reazione di “homo-coupling” di 2,3-pentadione **1c** fornisce una miscela dei due regioisomeri **2c** e **3c** (resa 55% della miscela) che derivano dall’attacco dell’acetil carbanione rispettivamente al C₂ e al C₃ di **1c**. Un risultato analogo si ottiene con 2,3-esandione **1d** che porta alla miscela dei regioisomeri **2d** and **3d** (resa della miscela 61%), probabilmente a causa dell’ingombro sterico della catena propionilica. In entrambi i casi **2c** e **2d** sono stati separati per cromatografia flash e gli eccessi enantiomerici (67 e 70%, rispettivamente) determinati mediante GC-MS su colonna chirale.

Questo comportamento è stato confermato dalla reazione di 1-fenil-1,2-propandione **1e** che produce soltanto l’alcol chirale **2e** (45%, ee 76%), probabilmente a causa da una parte della bassa elettrofilicità del carbonile benzilico e, dall’altra, dell’ingombro sterico sul C₂. D’altra parte l’incapacità di acetilacetoino sintasi di trasferire il carbanione benzoilico è dimostrato dal fatto che la reazione con 1,2-difeniletandione non da prodotti di “homo-coupling” (**Schema 3**).



Schema 3. Reazione di AAS con 1,2-difeniletandione

Data la versatilità di AAS come biocatalizzatore, si è pensato di sperimentarne le potenzialità sintetiche anche in reazioni di “cross-coupling” utilizzando un donatore diverso dall’accettore. La reazione è stata condotta utilizzando il dichetone **1b** in eccesso e il dichetone **1e** in difetto, così che il primo fungesse da “donatore” dell’aldeide e il secondo da “accettore” (**Schema 4**).



Schema 4. Reazione di cross-coupling catalizzata da AAS

In queste condizioni il prodotto principale è il prodotto di “cross-coupling” **4** (62%, ee 85%), rispetto al prodotto di “homo-coupling” **2b** (18%). Questo suggerisce una preferenza di AAS per l’acetil carbanione rispetto al pronionile ed ad altri carbanioni alcanoici. Rapporti variabili di questi due prodotti si ottengono variando le quantità iniziali di donatore ed accettore (**Figura 1**), mentre il prodotto di “cross-coupling” **5** non si ottiene in nessun caso.

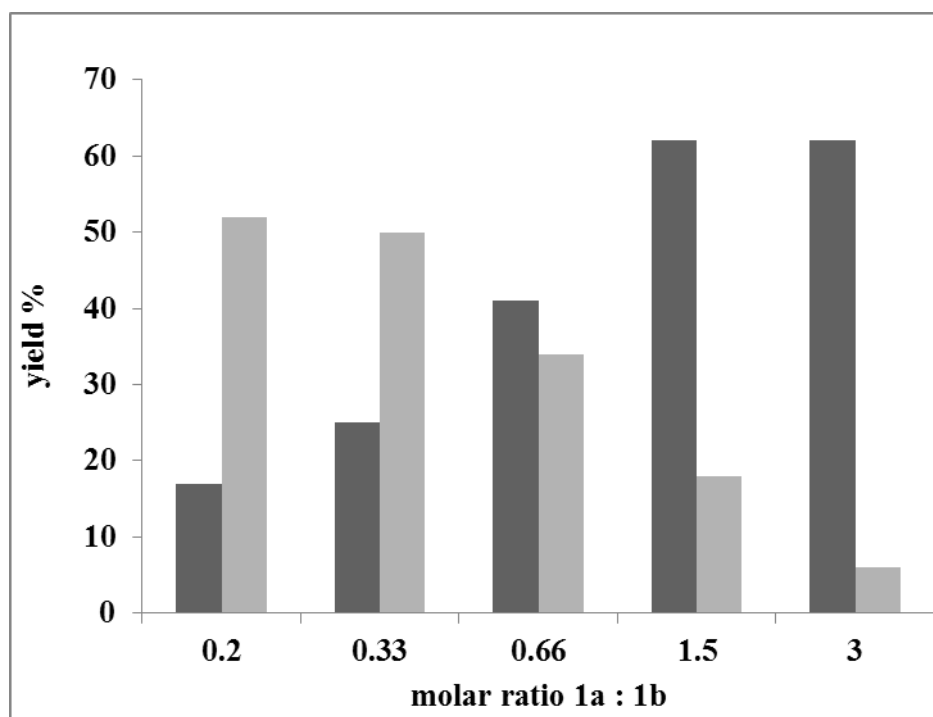
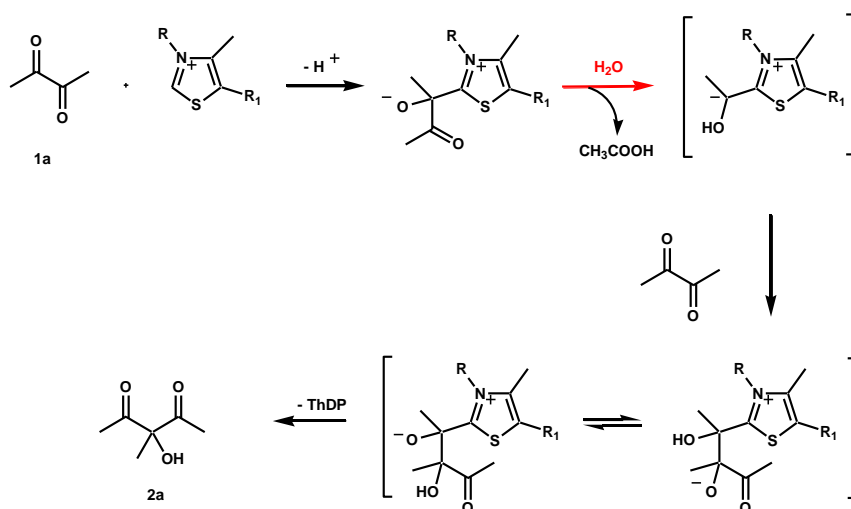


Figura 1. Distribuzione dei prodotti di “cross-coupling” di **1a** e **1b**

Questo risultato è una conferma dell'alta capacità di trasferire l'anione acetile rispetto al propionile e quindi chiude la possibilità di utilizzare potenziali acetil donatori come accettori per altre catene aciliche.

Il lavoro di ricerca illustrato è il primo esempio di applicazione per scopi sintetici di AAS da *B. licheniformis*. Questo enzima è risultato essere un versatile catalizzatore per la sintesi di α -idrossi- α -alchil- β -dichetoni, accentuando substrati diversi dal naturale e rivelandosi unico all'interno della famiglia di enzimi ThDP-dipendenti finora noti in letteratura per quanto riguarda due aspetti fondamentali: i) il meccanismo catalitico e ii) la capacità di accettare α -dichetoni come donatori di carbanioni acetilici. Come si può osservare dal meccanismo di reazione relativo alla condensazione di due molecole di 2,3-butandione (diacetile) **1a**, il substrato naturale di AAS, il passaggio chiave che contraddistingue la catalisi di questo enzima è l'idrolisi a cui è sottoposto il primo intermedio che si forma legato alla tiamina, in seguito all'attacco nucleofilo del C₂ dell'anello tiazolidinico, da cui deriva il rilascio di idrossietil-tiamina difosfato e acido acetico (**Schema 5**). Questo aspetto rende il meccanismo catalitico di AAS peculiare rispetto a quello degli altri enzimi ThDP-dipendenti (PDC, TK ecc.) (Cap. 1, par. 1.3.3) in cui i gruppi uscenti sono CO₂ o D-gliceraldeide-3-fosfato [2,21].



Schema 5. Idrolisi dell'intermedio legato alla tiamina: peculiarità del meccanismo catalitico di AAS

Il secondo importante aspetto che rende nuova AAS è quello di accettare come donatori degli 1,2-dichetoni simmetrici e non simmetrici in reazioni di homo- e cross-coupling. Esiste, infatti, in letteratura solo un'altra sintasi ThDP-dipendente, YerE, descritta sempre nel 2010 [48], che è in grado di sintetizzare alcoli terziari chirali ma che si serve del piruvato come donatore per l' "umpolung" dell'aldeide e di 1,2-dichetoni solo come accettori finali nelle reazioni di coupling.

La novità, descritta in questo lavoro, consiste nell'aver individuato un biocatalizzatore versatile come nuovo strumento per reazioni di formazione di legami C-C. Questo ha permesso di sintetizzare nuovi α -idrossi- α -alchil- β -dichetoni chirali, che rappresentano interessanti "building blocks" [46,49,50].

Alla conclusione di questo lavoro la caratterizzazione di tutti i nuovi alcoli terziari è stata completa dal punto vista chimico ma è rimasta da definire la configurazione assoluta dei centri chirali che verrà risolta mediante trasformazione dei prodotti ottenuti (Cap. 5).

Per la caratterizzazione dei prodotti, la descrizione della procedura sperimentale e il dettaglio dei materiali e metodi utilizzati viene riportato l'articolo (allegato **A**) e gli spettri ^1H e ^{13}C NMR, GC ed MS dei nuovi α -idrossi-1,3-dichetoni sintetizzati e completamente caratterizzati (allegato **B**). Come allegato **C** è riportato il Report DSMZ ricevuto nel 2011 con l'identificazione di *B. licheniformis*.

A)

Author's personal copy

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 64 (2010) 113–117



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molcatb

Bacillus stearothermophilus acetylacetoin synthase: A new catalyst for C–C bond formation

Pier Paolo Giovannini^{a,*}, Paola Pedrini^a, Valentina Venturi^a, Giancarlo Fantin^b,
Alessandro Medici^a

^a Dipartimento di Biologia ed Evoluzione, Università di Ferrara, C.so Ercole I d'Este 32, I-44100 Ferrara, Italy

^b Dipartimento di Chimica, Università di Ferrara, via L. Borsari, I-44100 Ferrara, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 November 2009

Received in revised form 23 February 2010

Accepted 2 March 2010

Available online 6 March 2010

Keywords:

Acetylacetoin synthase
Bacillus stearothermophilus
C–C bond formation
Enzyme catalysis
 α -Hydroxy-1,3-diketones

ABSTRACT

The synthesis of α -hydroxy-1,3-diketones **2** and **3** from the corresponding 1,2-diketones with *Bacillus stearothermophilus* ATCC2027 acetylacetoin synthase (AAS) was described. The enzyme catalyzed the condensation of the dialkyl- or alkyl-aryl-1,2-diketones **1** with the elimination of a carboxylic acid moiety. The reactions were carried out using either one diketone both acting as donor and acceptor (homo-coupling) or with two different reacting species (cross-coupling). The homo-coupling reactions of the asymmetric dialkyl-1,2-diketones **1c–d** afforded a mixture of the regioisomers **2** (30–42%, ee 67–70%) and **3** (19–25%), while only the 1,3-diketones **2a** (57%), **2b** (60%), and **2e** (45%, ee 76%) were obtained using 2,3-butanedione **1a**, 3,4-hexanedione **1b**, and 1-phenyl-1,2-propanedione **1e**, respectively. The cross-coupling reactions of the diketones **1a** and **1b**, and **1b** and **1e** were carried out using various ratios of the donor and the acceptor. In both cases the only cross-coupling product was 3-ethyl-3-hydroxy-2,4-hexanedione **4** (62%, ee 91%).

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

C–C bond forming reaction is one of the main goals in synthetic organic chemistry and represents the critical step of many syntheses. In this field the enzymatic C–C bond forming reactions are very attractive for the high chemo-, regio- and enantioselectivity. Nature supplies versatile enzymes that catalyze these reactions under mild conditions (i.e. lyase, transketolase, aldolase) [1,2]. Biocatalytic approaches to carbonylation are frequently based on thiamine diphosphate-dependent (ThDP-dependent) enzymes. Benzaldehyde lyase (BAL), benzoyl-formate decarboxylase (BFD), and pyruvate decarboxylase (PDC) are successfully used for both the asymmetric carbonylation of two aromatic aldehydes and the cross-carbonylation of an aromatic and an aliphatic aldehyde to afford enantiomerically pure α -hydroxy ketones [1,2]. Recently PDC- and BAL-mediated benzoin-type condensation of aliphatic aldehydes has been reported [3]. All these enzymes use ThDP as cofactor to obtain the umpolung of an aldehyde (donor). The new C–C bond is stereoselectively formed by the attack of this carbonyl carbanion on a second aldehyde (acceptor) (Scheme 1).

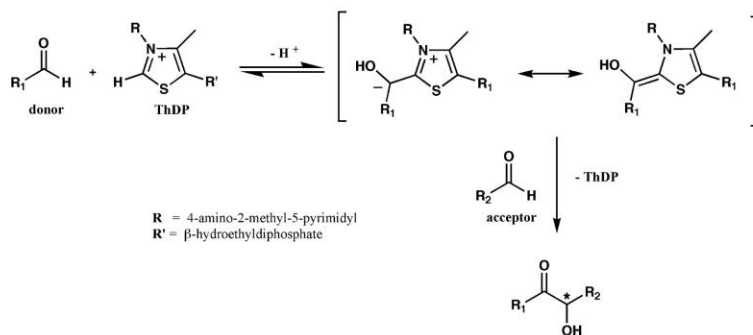
An interesting ThDP-dependent enzyme is acetylacetoin synthase (AAS) that seems to play a key role in the synthesis

of 2,3-butanediol by fermentation with various bacteria [4–8]. The different isomeric forms of butanediol are produced by a catabolic pathway starting from pyruvate and involving various acetoin reductases [9] or by the “butanediol cycle” which existence was reported in different bacteria [10]. In this cycle [11] AAS catalyzes the condensation between two molecules of 2,3-butanedione **1a** (diacetyl) leading to the formation of 3-hydroxy-3-methyl-2,4-pentanedione **2a** (acetylacetoin) and acetic acid [10] (Scheme 2). While with other ThDP-dependent enzymes (i.e. PDC, TK) the leaving groups are carbon dioxide or D-glyceraldehyde-3-phosphate [1,2], with AAS the mechanism is quite different. In this case, the intermediate, obtained by the attack of the AAS-bound ThDP anion on the carbonyl group, undergoes hydrolysis leading to hydroxyethyl-ThDP and acetic acid. The carbanion intermediate attacks a second molecule of diacetyl forming the new C–C bond, and finally, a shift of the alcolate anion allows the release of acetylacetoin and ThDP in hylyde form.

Till today very few data have been reported on the purification and characterization of this enzyme [12] and moreover it has never been employed for synthetic purposes.

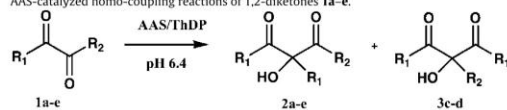
In the present work *Bacillus stearothermophilus* acetylacetoin synthase has been used in the homo-coupling reactions of the 1,2-diketones **1** to obtain the regioisomeric α -hydroxy-1,3-diketones **2** and **3** (Table 1) and in the cross-coupling reactions of the 1,2-diketones **1a** and **1b**, and **1b** and **1e**, respectively.

* Corresponding author. Tel.: +39 0532 293776; fax: +39 0532 208561.
E-mail address: gvpnp1@unife.it (P.P. Giovannini).



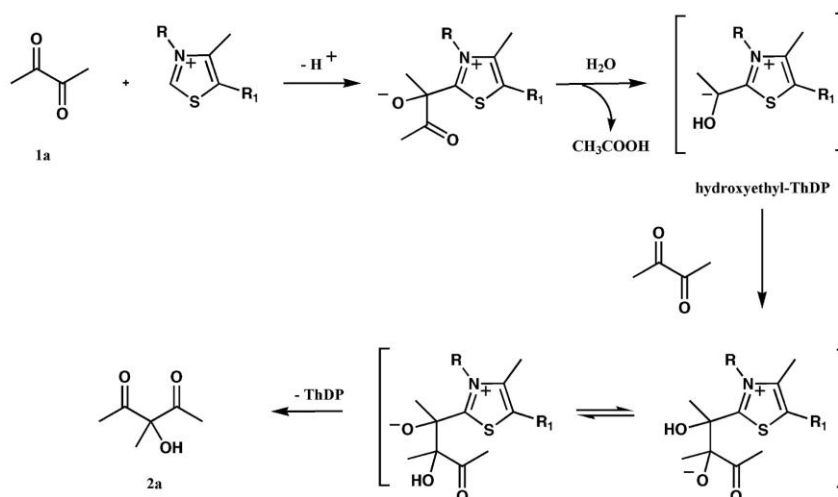
Scheme 1. ThDP-mediated C-C bond formation.

Table 1
AAS-catalyzed homo-coupling reactions of 1,2-diketones 1a-e.



1,2-Diketone 1	α -Hydroxy-1,3-diketone 2 (yield %)	α -Hydroxy-1,3-diketone 3 (yield %)
	a	
	a	

^aThe yields are calculated on the basis of the ratio obtained in the mixture.



Scheme 2. AAS-catalyzed conversion of diacetyl to acetylacetoin.

2. Experimental

2.1. Analytical methods

GC analyses were performed on a Carlo Erba 6000, equipped with a FID detector and a fused capillary column Megadex 5 (25 m × 0.25 mm) containing dimethyl-*n*-pentyl- β -cyclodextrin on OV 1701 (from Mega snc), helium as carrier gas (80 kPa). The mass spectra were obtained using a Varian 4000 GC/MS/MS equipped with chiral column Megadex 5, using the same conditions described for GC analyses. NMR spectra were recorded on a Varian Gemini 300 spectrometer. Chemical shifts are given in parts per million from Me₄Si as internal standard. Optical rotations were measured on a Perkin–Elmer Model 241 polarimeter.

2.2. Preparation of the cell free extract

B. stearothermophilus ATCC2027 was cultured in a medium (200 mL in a 500 mL Erlenmeyer flask) containing meat extract (10 g/L), polypeptone (10 g/L), NaCl (5 g/L) and 3-hydroxy-2-butanone (5 g/L). After 48 h growth at 110 rpm the cells (2 g, wet weight) were harvested by centrifugation (6000 rpm, 10 min), washed with 150 mM NaCl solution (50 mL) and suspended in 50 mM phosphate buffer at pH 6.5 (50 mL). The suspension was treated at high pressure (1380 bar) with a French press and then centrifuged (15,000 rpm, 20 min, 5 °C). The supernatant (46 mL) was used without further purification to catalyze the coupling reactions.

2.3. General procedure for AAS-catalyzed homo-coupling reaction of 1,2-diketones 1a–e

The cell free extract (46 mL) was added to a solution of diketones **1** (3 mmol), thiamine diphosphate (15 mg, 35 μ mol) and magnesium sulphate (10 mg, 83 μ mol) in 50 mM phosphate buffer at pH 6.5 (50 mL). The reaction was gently shaken at 30 °C for 14 h and then heated (80 °C, 20 min). After removing the precipitate by centrifugation (10,000 rpm, 20 min) the solution was extracted

with ethyl acetate (3 × 30 mL). The combined organic layers were washed with saturated NaHCO₃ (40 mL) and dried over anhydrous sodium sulphate. The solvent was evaporated and the residue was chromatographed on silica gel (chloroform/*n*-hexane 8:2 as eluent) to afford the products **2** and **3** (Table 1).

2.3.1. Homo-coupling reaction of 2,3-butanedione 1a

GLC analysis; temp 60–64 °C (1 °C/min) 64–200 °C (2 °C/min), retention time (min): **1a**, 3.0; **2a**, 15.1.

3-Hydroxy-3-methyl-2,4-pentanedione **2a** [15]: colourless oil; 0.11 g, 57%; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.60 (s, 3H, CH₃), 2.30 (s, 6H, 2CH₃CO), 4.70 (s, 1H, OH).

2.3.2. Homo-coupling reaction of 3,4-hexanedione 1b

GLC analysis; temp 80–200 °C (1.5 °C/min), retention time (min): **1b**, 5.2; **2b**, 22.5.

4-Ethyl-4-hydroxy-3,5-heptanedione **2b**: colourless oil; 0.15 g, 60%; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.82 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz, CH₃), 1.04 (t, 6H, *J* = 7.5 Hz, 2CH₃), 2.04 (q, 2H, *J* = 7.5 Hz, CH₂), 2.51 (dq, 2H, *J* = 21 Hz, *J* = 7.5 Hz, CH₂), 2.73 (dq, 2H, *J* = 21 Hz, *J* = 7.5 Hz, CH₂), 4.65 (br s, 1H, OH); ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.3, 7.4, 29.8, 30.6, 90.9, 210.2.

Anal calcd for C₉H₁₆O₃: C, 62.77%, H, 9.36%; Found C, 62.90%, H, 9.39%.

2.3.3. Homo-coupling of 2,3-pentanedione 1c

GLC analysis; temp 80–200 °C (1.5 °C/min), retention time (min): **1c**, 5.1; **3c**, 11.6; **2c**, 15.4 and 15.9.

3-Hydroxy-3-methyl-2,4-hexanedione **2c** and 3-ethyl-3-hydroxy-2,4-pentanedione **3c** are obtained in 1.2:1 mixture (yield of the mixture 55%). Pure sample of **2c** was obtained by flash chromatography on silica gel (*n*-hexane/AcOEt 10:1 as eluent).

3-Hydroxy-3-methyl-2,4-hexanedione **2c**: colourless oil; 65 mg, 30%; [α]_D²⁰ = +15 (c 0.5 g/100 mL, CHCl₃); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.05 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz, CH₃), 1.55 (s, 3H, CH₃), 2.27 (s, 3H, CH₃CO), 2.51 (dq, 1H, *J* = 21 Hz, *J* = 7.5 Hz, CH₂), 2.73 (dq, 1H, *J* = 21 Hz, *J* = 7.5 Hz, CH₂), 4.65 (br s, 1H, OH); ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.5, 22.8, 24.5, 87.4, 207.4, 210.2; GC–MS: retention time

(min) 15.4 and 15.9, ee 70%; MS (70 eV, EI); m/z (%) 145 ($\leq 1\%$) $[M+H]^+$, 102 (27%) $[(MH)-CH_3CO]^+$, 88 (100%) $[(MH)-C_2H_5CO]^+$, 57 (25%), 43 (30%).

Anal calcd for $C_7H_{12}O_3$: C, 58.32%; H, 8.39%. Found C, 58.42%; H, 8.37%.

3-Ethyl-3-hydroxy-2,4-pentanedione 3c: colourless oil; 50 mg, 25%; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.85 (t, 3H, $J=7.5$ Hz, CH_3), 2.05 (q, 2H, $J=7.5$ Hz, CH_2), 2.27 (s, 6H, 2 CH_3CO); 4.7 (br s, 1H, OH).

2.3.4. Homo-coupling of 2,3-hexanedione 1d

GLC analysis; temp 80–200 °C (1.5 °C/min), retention time (min): **1d**, 4.9; **3d**, 15.9; **2d**, 20.8 and 20.9.

3-Hydroxy-3-methyl-2,4-heptanedione 2d and **3-acetyl-3-hydroxy-2-hexanone 3d** are obtained in 2.2:1 mixture (yield of mixture 61%). Pure samples of **2d** and **3d** were obtained by flash chromatography on silica gel (*n*-hexane/AcOEt 10:1 as eluent).

3-Hydroxy-3-methyl-2,4-heptanedione 2d: colourless oil; 99 mg, 42%; $[\alpha]_D^{20} = +3$ (c 0.5 g/100 mL, $CHCl_3$); 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.91 (t, 3H, $J=7.5$ Hz, CH_3), 1.56 (s, 3H, CH_3), 1.6 (m, 2H, CH_2), 2.25 (s, 3H, CH_3CO), 2.49 (dt, 1H, $J=17.5$ Hz, $J=7.5$ Hz, CH_2), 2.68 (dt, 1H, $J=17.5$ Hz, $J=7.5$ Hz, CH_2), 4.75 (br s, 1H, OH); ^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 13.5, 16.8, 22.6, 24.6, 38.6, 87.6, 207.4, 209.5; GC–MS: retention time (min) 20.8 and 20.9, ee 67%; MS (70 eV, EI); m/z (%) 159 ($\leq 1\%$) $[M+H]^+$, 116 (21%) $[(MH)-CH_3CO]^+$, 88 (100%) $[(MH)-C_3H_7CO]^+$, 71 (37%), 43 (46%).

Anal calcd for $C_8H_{14}O_3$: C, 60.74%; H, 8.92%. Found: C, 60.61%; H, 8.89%.

3-Acetyl-3-hydroxy-2-hexanone 3d: colourless oil; 45 mg, 19%; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.95 (t, 3H, $J=7.5$ Hz, CH_3); 1.22 (m, 2H, CH_2); 1.93 (m, 2H, CH_2); 2.24 (s, 6H, 2 CH_3CO), 4.65 (br s, 1H, OH); ^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 14.1, 16.6, 25.3, 38.4, 91.1, 207.5.

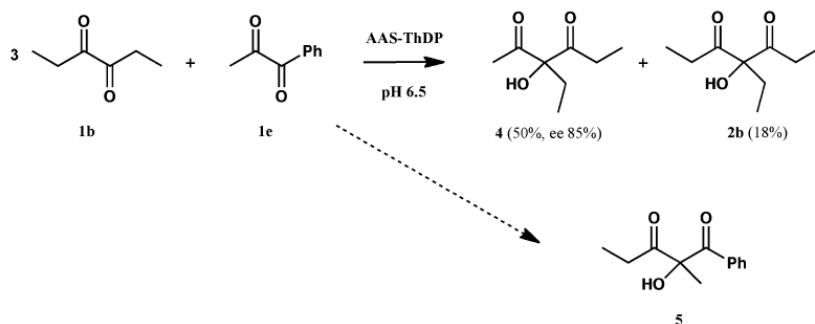
Anal calcd for $C_8H_{14}O_3$: C, 60.74%; H, 8.92%. Found: C, 60.69%; H, 8.95%.

2.3.5. Homo-coupling reaction of 1-phenyl-1,2-propanedione 1e

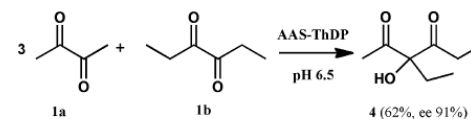
GLC analysis; temp 100–200 °C (5 °C/min), retention time (min): **1e**, 10.9; **2e**, 16.6 and 16.7.

2-Hydroxy-2-methyl-1-phenyl-1,3-butanedione 2e: colourless oil; 0.13 g, 45%; ee 40%; $[\alpha]_D^{20} = +13$ (c 0.5 g/100 mL, $CHCl_3$); 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.7 (s, 3H, CH_3), 2.2 (s, 3H, CH_3CO), 5.0 (br s, 1H, OH), 7.4–8.2 (m, 5H, Ph); ^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 23.4, 24.7, 85.8, 128.6, 129.8, 133.6, 133.9, 197.9, 206.5; GC–MS: retention time (min) 16.6 and 16.7, ee 76%; MS (70 eV, EI); m/z (%) 193 (2%) $[M+H]^+$, 150 (24%) $[(MH)-CH_3CO]^+$, 105 (100%), 77 (56%).

Anal calcd for $C_{11}H_{12}O_3$: C, 68.74%; H, 6.29%. Found: C, 68.59%; H, 6.31%.



Scheme 4. AAS-mediated cross-coupling reaction of diketones **1b** and **1e**.



Scheme 3. AAS-mediated cross-coupling reaction of diketones **1a** and **1b**.

2.4. AAS-catalyzed cross-coupling reaction of 1,2-diketones 1a and 1b

The cell free extract (10 mL) was added to a solution of **1a** (0.46 g, 5.4 mmol), **1b** (0.2 g, 1.8 mmol), thiamine diphosphate (5 mg, 12 μ mol) and magnesium sulphate (3 mg, 25 μ mol) in 50 mM phosphate buffer at pH 6.5 (10 mL). The reaction was gently shaken at 30 °C for 48 h and then worked up as described for the homo-coupling reactions. GLC analysis; temp 80–200 °C (1.5 °C/min), retention time (min): **2a**, 9.3; **4**, 19.3 and 19.7; **2b**, 22.5. After chromatography of the residue on silica gel (*n*-hexane/AcOEt 10:1 as eluent) **3-ethyl-3-hydroxy-2,4-hexanedione 4** (Scheme 3) was obtained as colourless oil: 0.176 g (62%); $[\alpha]_D^{20} = +49.8$ (c 1.6 g/100 mL, CH_2Cl_2); 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.8 (t, 3H, $J=7.5$ Hz, CH_3), 1.0 (t, 3H, $J=7.5$ Hz, CH_3), 2.0 (q, 2H, $J=7.5$ Hz, CH_2), 2.3 (s, 3H, CH_3CO), 2.5 (dq, 1H, $J=20$ Hz, $J=7.5$ Hz, CH_2), 2.7 (dq, 1H, $J=20$ Hz, $J=7.5$ Hz, CH_2), 4.6 (br s, 1H, OH); ^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.3, 7.4, 25.0, 29.6, 30.9, 91.1, 207.4; 210.2. GC–MS: retention time (min) 19.3 and 19.7, ee 91%; MS (70 eV, EI); m/z (%) = 159 (1%) $[M+H]^+$, 116 (50%) $[(MH)-CH_3CO]^+$, 102 (100%) $[(MH)-C_2H_5CO]^+$, 87 (90%).

Anal calcd for $C_8H_{14}O_3$: C, 60.74%; H, 8.92%. Found: C, 60.70%; H, 8.94%.

2.5. AAS-catalyzed cross-coupling reaction of 1,2-diketones 1b and 1e

The cell free extract (10 mL) was added to a solution of **1b** (0.5 g, 4.4 mmol), **1e** (0.22 g, 1.5 mmol), thiamine diphosphate (5 mg, 12 μ mol) and magnesium sulphate (3 mg, 25 μ mol) in 50 mM phosphate buffer at pH 6.5 (10 mL). The reaction was gently shaken at 30 °C for 48 h and then worked up as described for the homo-coupling reactions. After chromatography of the residue on silica gel (*n*-hexane/AcOEt 10:1 as eluent) **3-ethyl-3-hydroxy-2,4-hexanedione 4** (0.12 g, 50%, ee 85%) was obtained (Scheme 4).

3. Results and discussion

B. stearothermophilus AAS is an inducible enzyme and it can be easily obtained from the cells cultivated on a 3-hydroxy-2-butanone (acetoin) rich medium [11]. The cell free extract, obtained after high-pressure extrusion of a bacterial cells suspension in phosphate buffer at pH 6.5, was used without any purification to directly catalyze the reactions. The homo-coupling reactions were carried out by adding catalytic amount of ThDP and MgSO₄ to a solution of the selected α -diketone in the cell free extract. After simple work up and chromatography the 2-alkyl-2-hydroxy-1,3-diketones **2** and **3** were obtained in 19–60% yield. The results are reported in Table 1.

The symmetric 2,3-butanedione **1a** and 3,4-hexanedione **1b** afforded 3-hydroxy-3-methyl-2,4-pentanedione (acetylacetoin) **2a** and 4-ethyl-4-hydroxy-3,5-heptanedione **2b** in 57% and 60% yield, respectively. On the basis of this result it is possible to assert that AAS is able to transfer both the acetyl and propionyl carbanion.

On the contrary the reactions of the non-symmetric diketones **1c–e** gave only the products **2c–e** and **3c** and **3d** derived from the acetyl anion transfer. This suggested a higher migratory aptitude of this group with respect to propionyl or other alkanoyl moieties. In particular the homo-coupling of 2,3-pentanedione **1c** gave a 1.2:1 mixture of the regioisomers **2c** and **3c** (yield of the mixture 55%) arising from the attack of the acetyl carbanion at C-2 and C-3 of **1c**, respectively. Flash chromatography of the mixture afforded the chiral 3-hydroxy-3-methyl-2,4-hexanedione **2c** with 70% enantiomeric excess, determined by GC–MS on chiral column.

Similar results were obtained by the homo-coupling reaction of 2,3-hexanedione **1d** that gave a 2.2:1 ratio mixture of regioisomeric **2d** and **3d** (yield of mixture 61%) probably because of the steric hindrance of the propyl moiety. Also in this case the chiral 3-hydroxy-3-methyl-2,4-heptanedione **2d** was separated from **3d** by flash chromatography and the enantiomeric excess (67%) was determined by GC–MS on chiral column. This behaviour was confirmed by the reaction with 1-phenyl-1,2-propanedione **1e** that produced only the chiral **2e** (45%, ee 76%). The sole formation of this product was probably favoured by the low electrophilicity of the benzylic carbonyl in addition to the less hindrance of C₂-position. Furthermore, the inability of AAS to transfer the benzoyl carbanion was demonstrated by the reaction with 1,2-diphenyl-1,2-ethanedione that did not give any homo-coupling product.

On the basis of these results the synthetic potential of *B. stearothermophilus* AAS was investigated using a donor different from the acceptor (cross-coupling reaction). The reaction of diketones **1a** and **1b** in different ratios produced the cross-coupling product 3-ethyl-3-hydroxy-2,4-hexanedione **4** together with the previously observed homo-coupling product **2b** (Fig. 1). With an excess of **1b** the homo-coupling product **2b** prevailed over **4**. The best conversion of **1b** to the chiral **4** (62%, ee 91%) was obtained using a 3:1 ratio of **1a** and **1b** (Scheme 3).

On the contrary, the cross-coupling between diketones **1b** and **1e**, using an excess of **1b** (3 equiv.) in an attempt to transfer a propionyl carbanion from **1b** to **1e** did not afford the “expected cross-coupling product **5**” but 3-ethyl-3-hydroxy-2,4-hexanedione **4** (50%, ee 91%) as main product and 4-ethyl-4-hydroxy-3,5-heptanedione **2b** (18%) as minor product (Scheme 4). This result confirmed the higher migratory aptitude of acetyl vs propionyl anion and prevented the possibility to use potential acetyl donors as acceptor for other acyl anion moieties.

On the other hand, attempts to employ ketones, acetaldehyde and benzaldehyde as substrates either for homo- or cross-coupling reactions did not afford any significant results. The absolute configuration of the new compounds **2c**, **2d**, **2e** and **4** is under investigation.

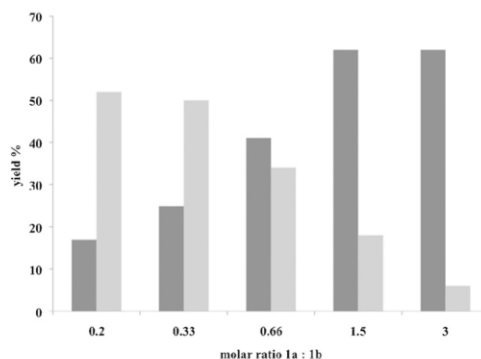


Fig. 1. Product distribution of the cross-coupling reaction of **1a** and **1b**: (■) compound **4**; (□) compound **2b**.

4. Conclusions

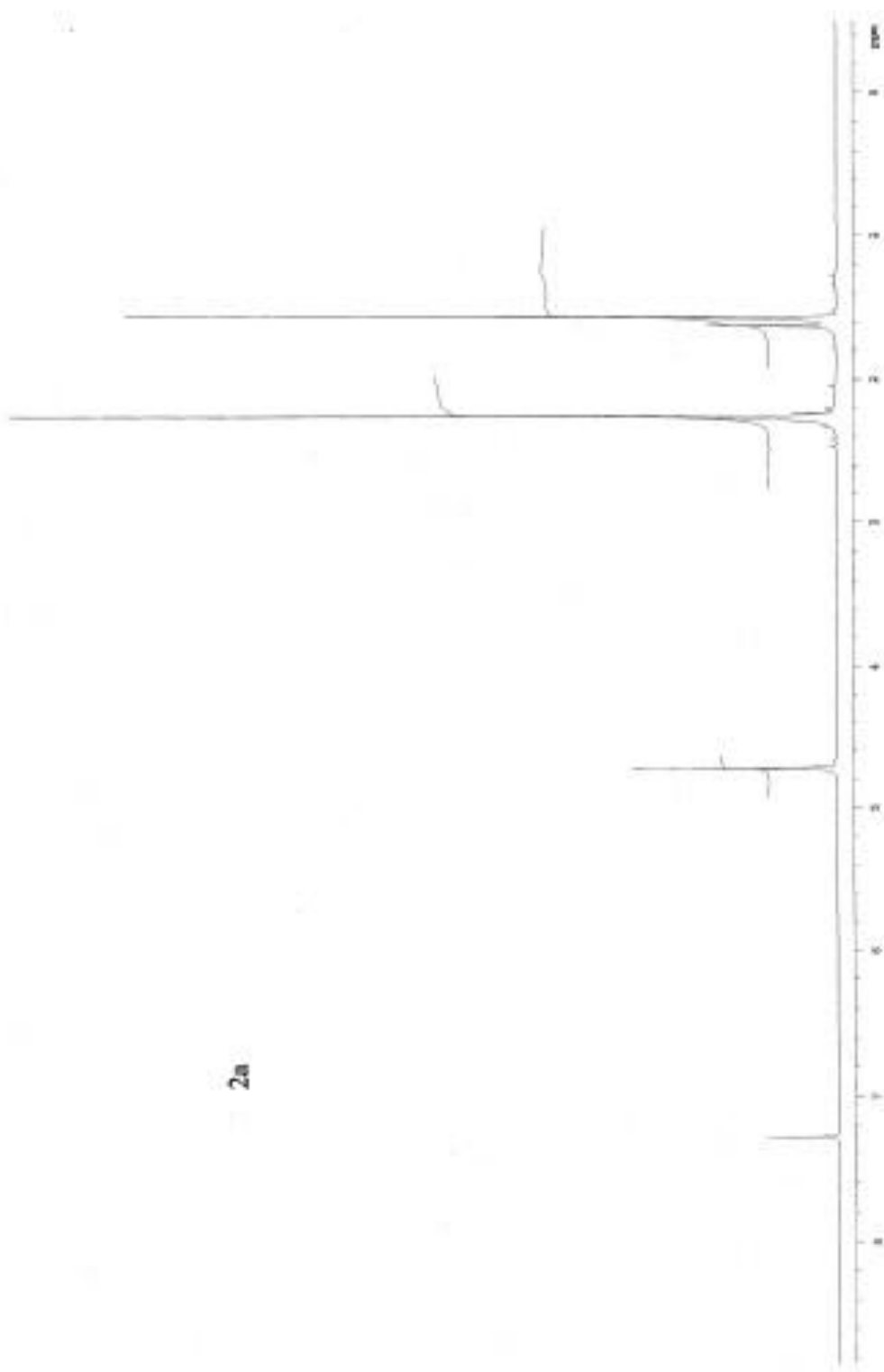
To our knowledge this is the first synthetic application of a ThDP-dependent enzyme that, using a ketone as acceptor of the ThDP-activated acyl carbanion, allows the formation of tertiary substituted alcohols. *B. stearothermophilus* AAS catalyzes the homo-coupling reactions of the 1,2-diketones **1a–e** furnishing a new enzymatic strategy for the synthesis of 2-alkyl-2-hydroxy-1,3-diketones **2a–e** (30–60%) and **3c** and **3d** (19–25%). Except for **2a**, all these 1,3-diketones are new compounds that have been fully characterized. All chiral compounds (i.e. **2c**, **2d** and **2e**) are obtained in good enantiomeric excesses (70%, 67%, and 76%, respectively). The AAS is also employed in the cross-coupling reactions of diketones **1a** and **1b** to give the 1,3-diketone **4**. The best yields of **4** (62%, ee 91%) are obtained with 3 equiv. of **1a**. Surprisingly the cross-coupling reaction of diketones **1b** and **1e** (3:1 ratio) does not afford the “expected 2-hydroxy-2-methyl-1-phenyl-1,3-pentanedione **5**” but the 1,3-diketone **4** confirming the higher migratory aptitude of acetyl vs propionyl anion. The enantiomeric excesses of all chiral compounds are determined by chiral GC/MS spectrometry and the absolute configuration is still under investigation.

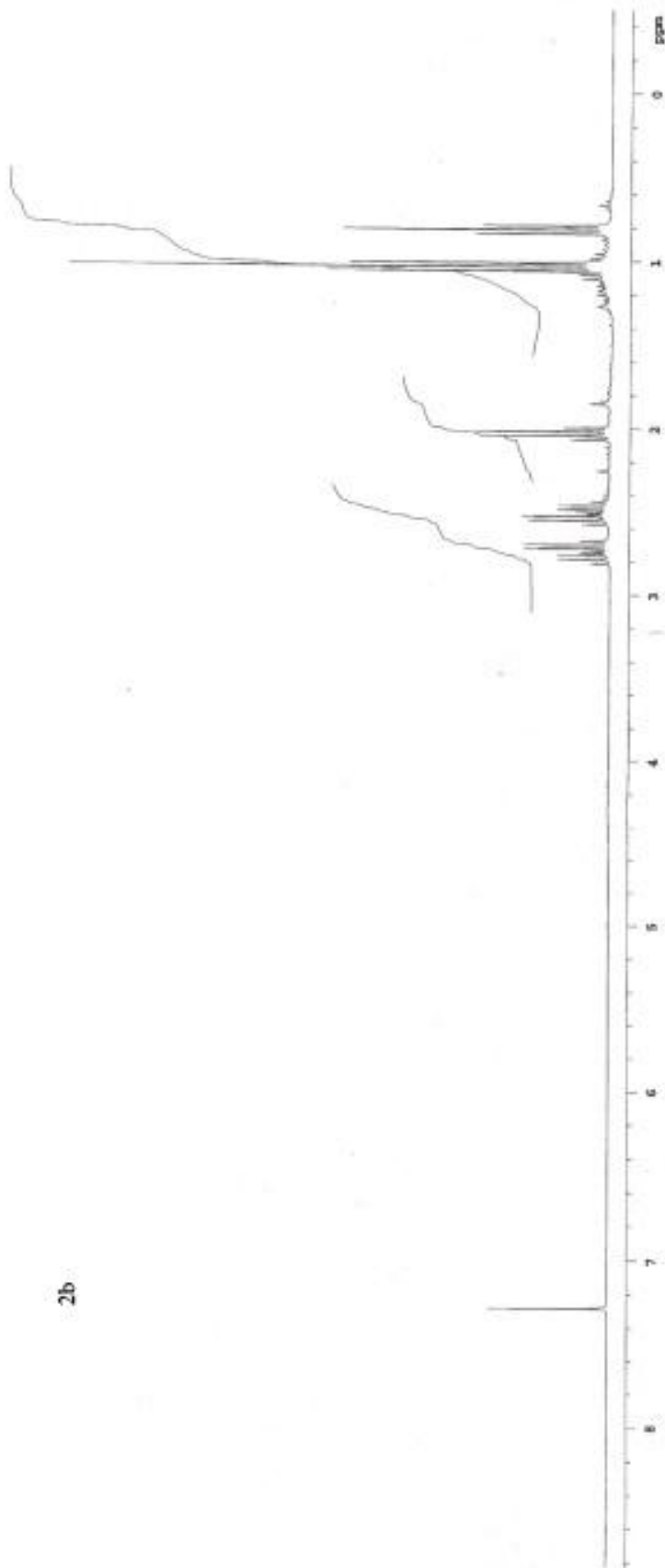
Finally, the products obtained by AAS-mediated homo- and cross-coupling reactions are multidentate compounds containing a chiral or a prochiral hydroxylated carbon centre, interesting and promising building blocks for asymmetric synthesis [13–15].

References

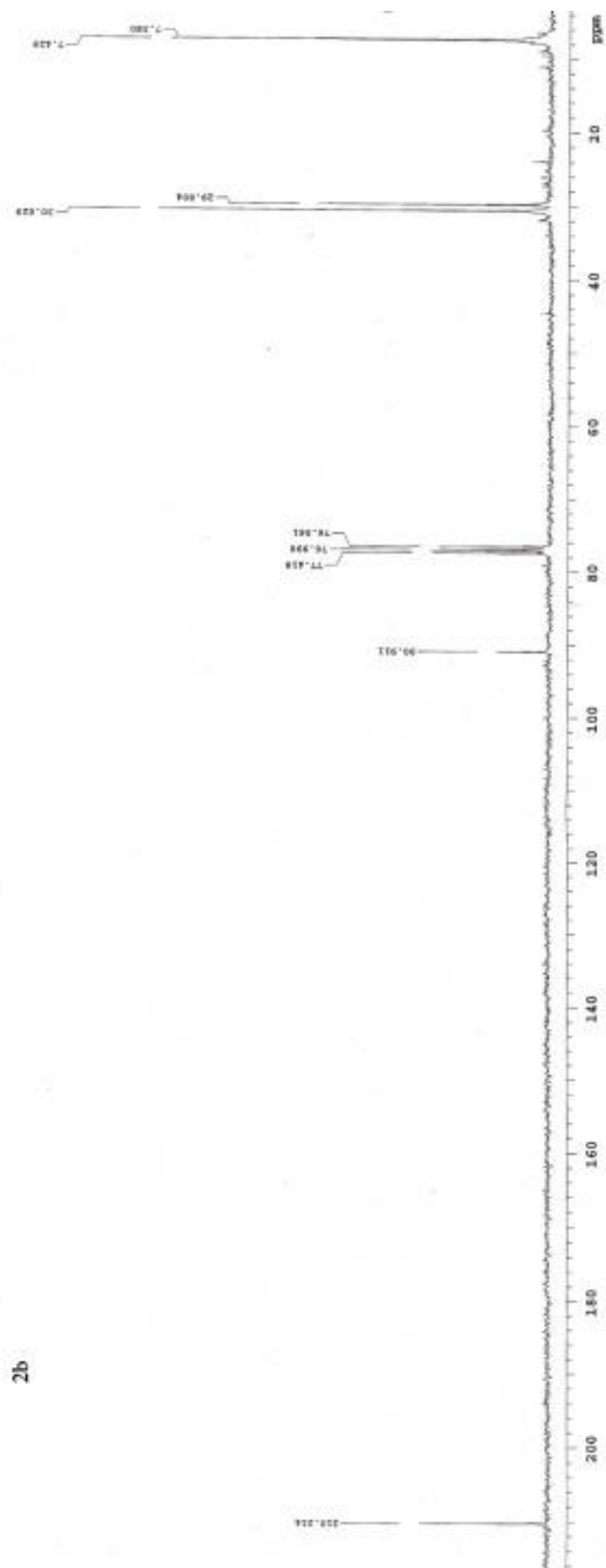
- [1] J. Sukumaran, U. Hanefeld, Chem. Soc. Rev. 34 (2005) 530–542.
- [2] R. Kluger, K. Tittmann, Chem. Rev. 108 (2008) 1797–1883.
- [3] P. Dominguez de Maria, M. Pohl, D. Gocke, H. Gröger, H. Trauthwein, T. Stillger, L. Walter, M. Müller, Eur. J. Org. Chem. (2007) 2940–2944.
- [4] R.J. Magee, N. Kosaric, Adv. Appl. Microbiol. 32 (1987) 89–161.
- [5] B.S. Grover, S.K. Garg, J. Verma, World J. Microbiol. Biotechnol. 6 (1990) 328–332.
- [6] P. Perego, A. Converti, A. Del Borghi, P. Canepa, Bioprocess Eng. 23 (2000) 613–620.
- [7] C. deMas, N.B. Jansen, G.T. Tsao, Biotechnol. Bioeng. 31 (1987) 366–377.
- [8] P. Perego, A. Converti, M. Del Borghi, Bioresour. Technol. 89 (2003) 125–131.
- [9] S. Ui, N. Matsuyama, H. Masuda, H. Muraki, J. Ferment. Technol. 62 (1984) 551–559.
- [10] S. Ui, K. Watanabe, T. Magaribuchi, Biosci. Biotechnol. Biochem. 58 (1994) 2271–2272.
- [11] S. Ui, T. Hosaka, K. Mizutani, T. Ohtsuki, A. Mimura, J. Biosci. Bioeng. 93 (2002) 248–251.
- [12] S. Ui, T. Hosaka, K. Mizutani, A. Mimura, Biosci. Biotechnol. Biochem. 62 (1998) 795–797.
- [13] H. Takikawa, A. Takada, K. Hikita, K. Suzuki, Angew. Chem. Int. Ed. 47 (2008) 7446–7449.
- [14] Y. Monguchi, T. Takahashi, Y. Iida, Y. Fujiwara, Y. Inagaki, T. Maegawa, H. Sajiki, Synlett (2008) 2291–2294.
- [15] J. Christoffers, T. Kauf, T. Werner, M. Rössle, Eur. J. Org. Chem. (2006) 2601–2608.

B) Spettri ^1H e ^{13}C NMR

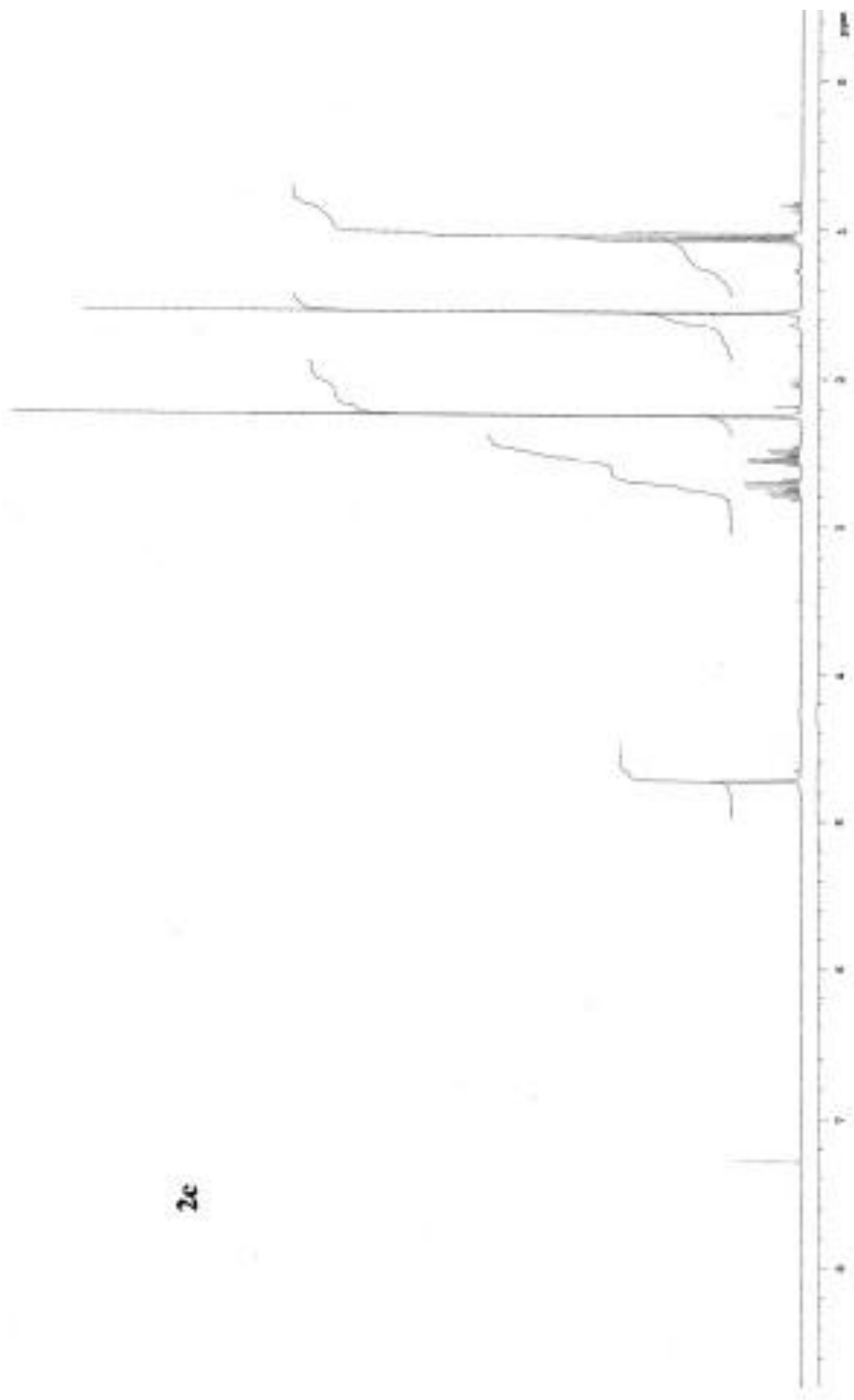




2b

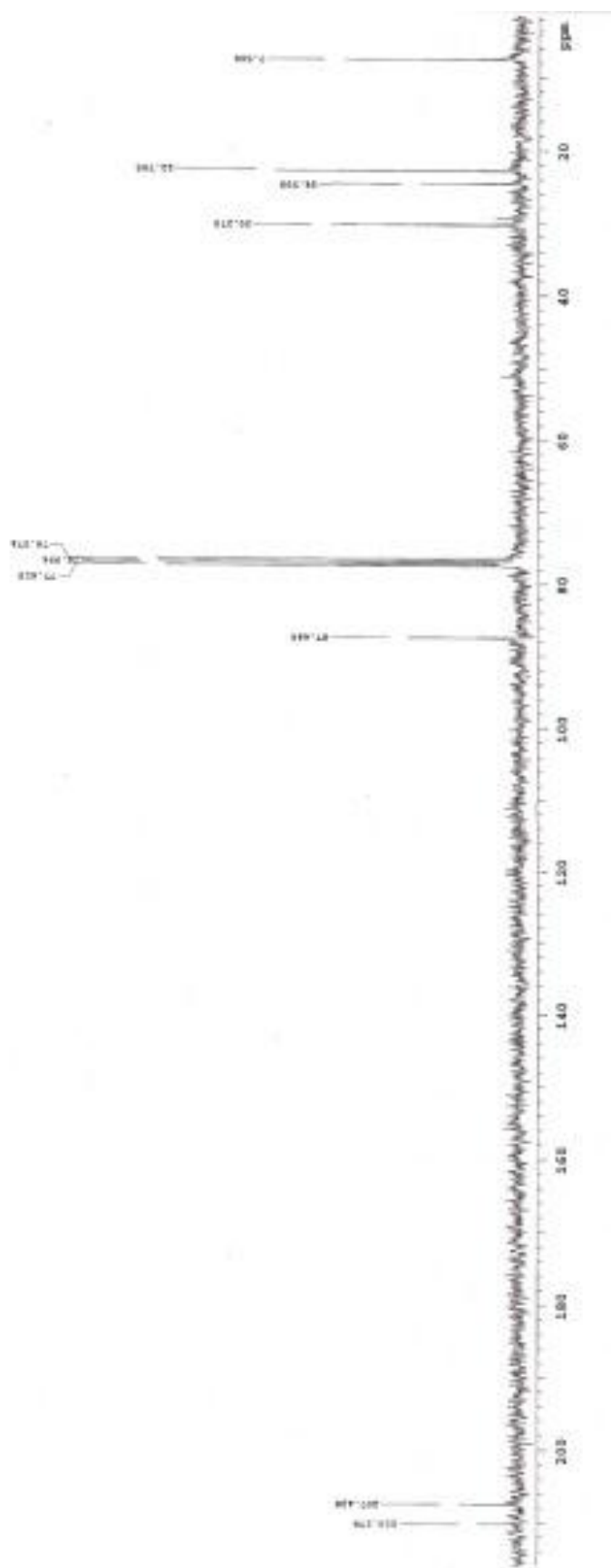


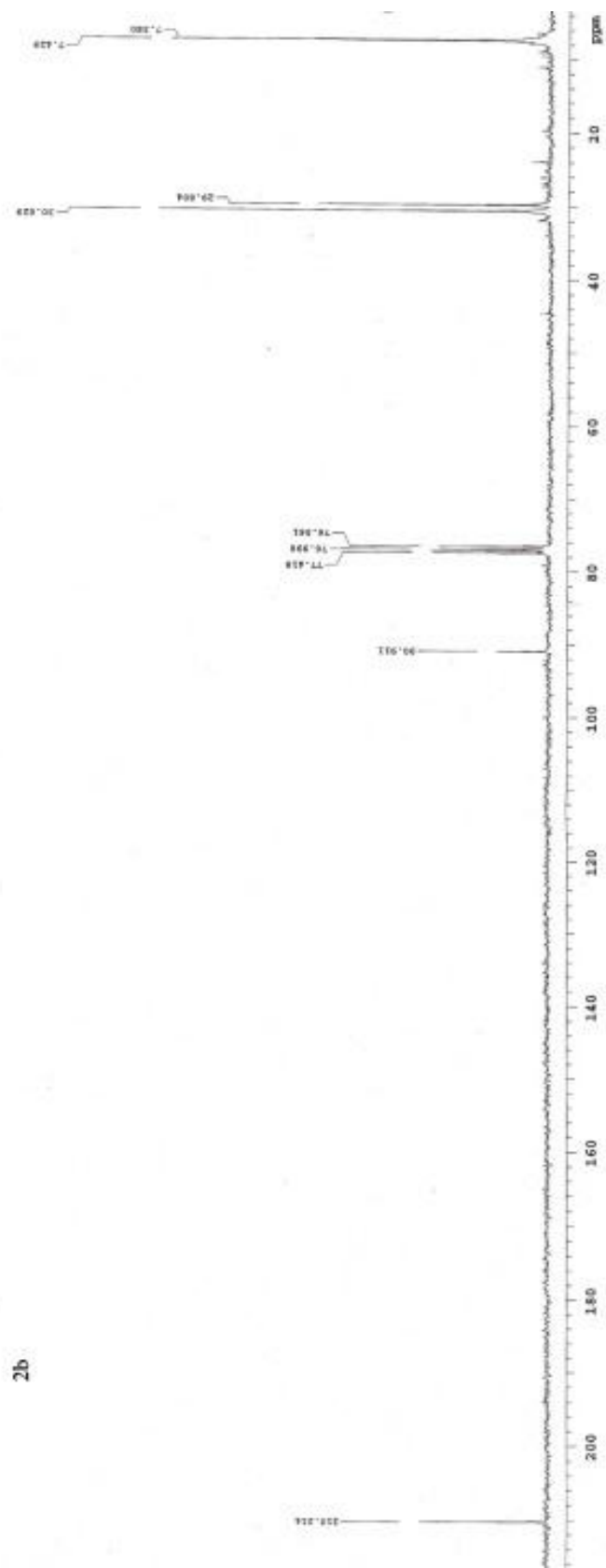
2b



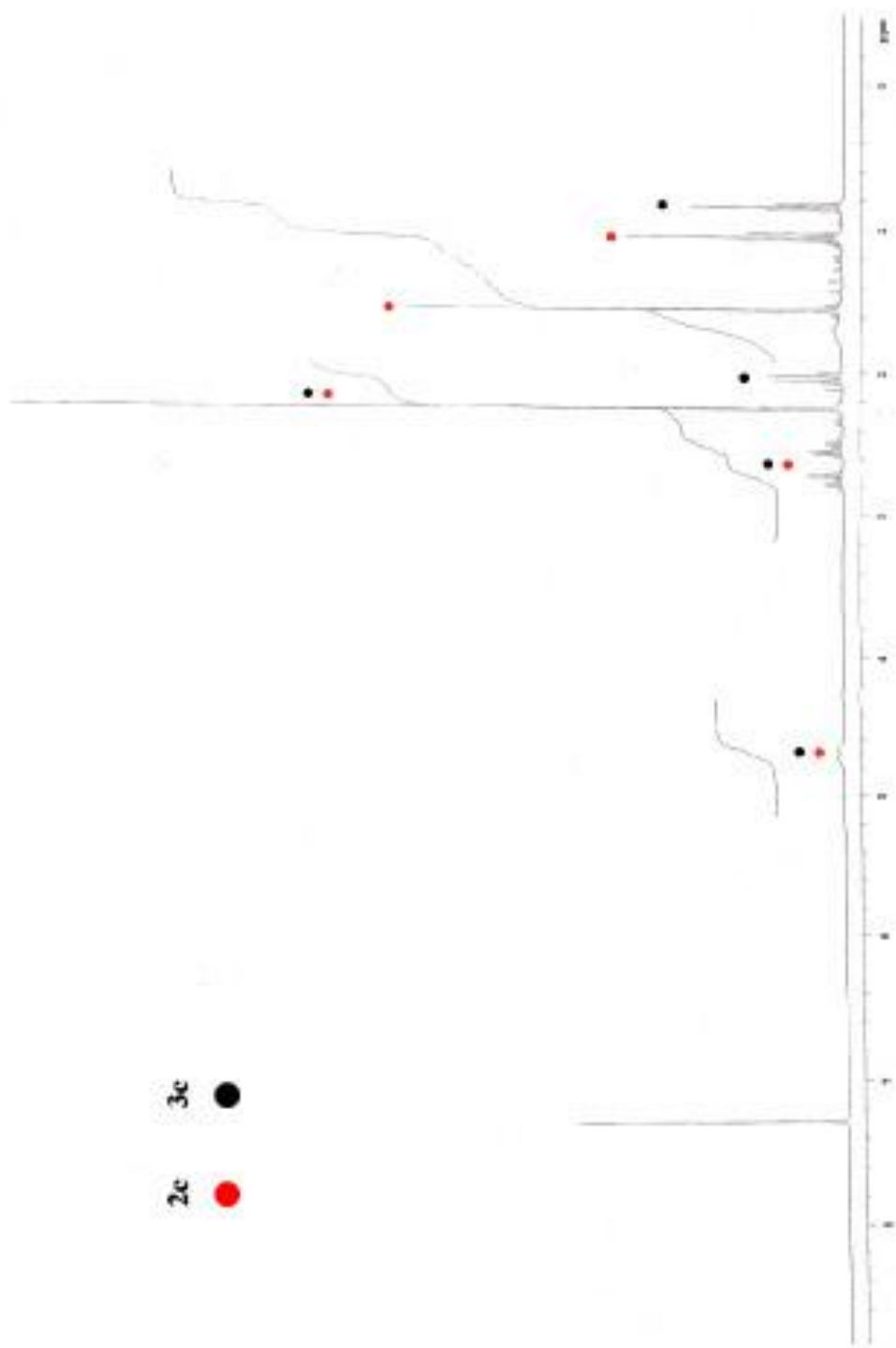
2c

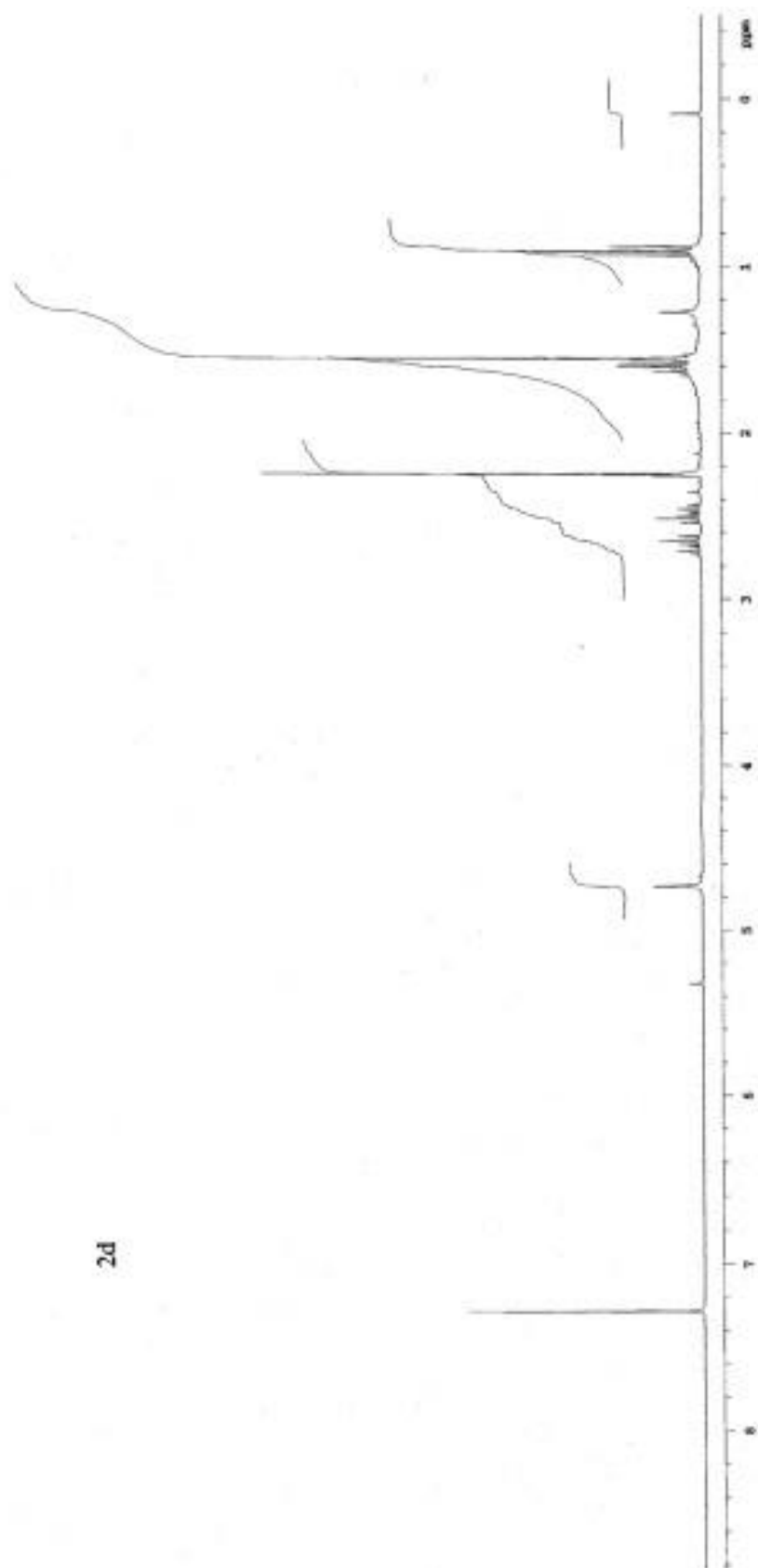
2c



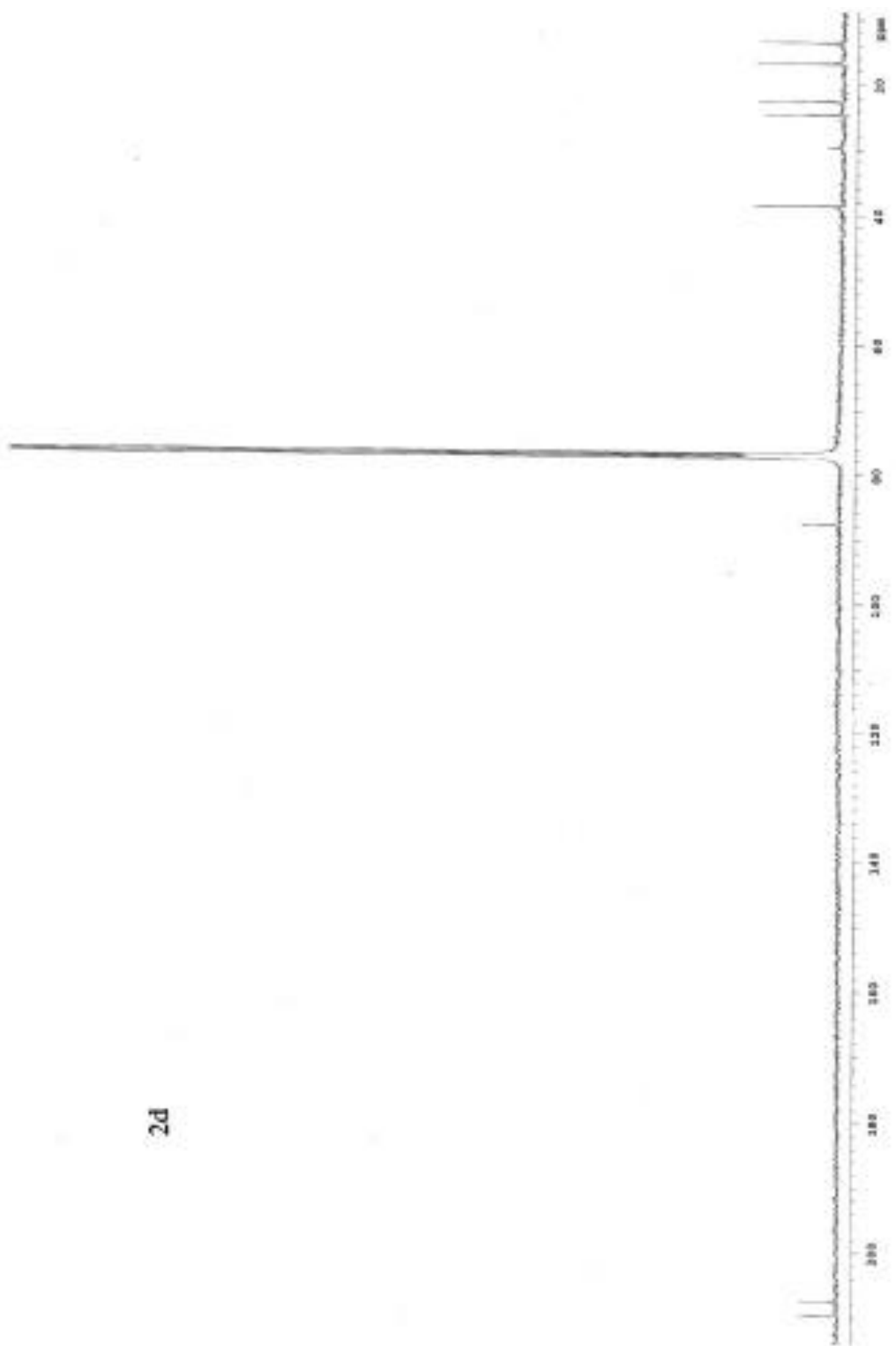


2b

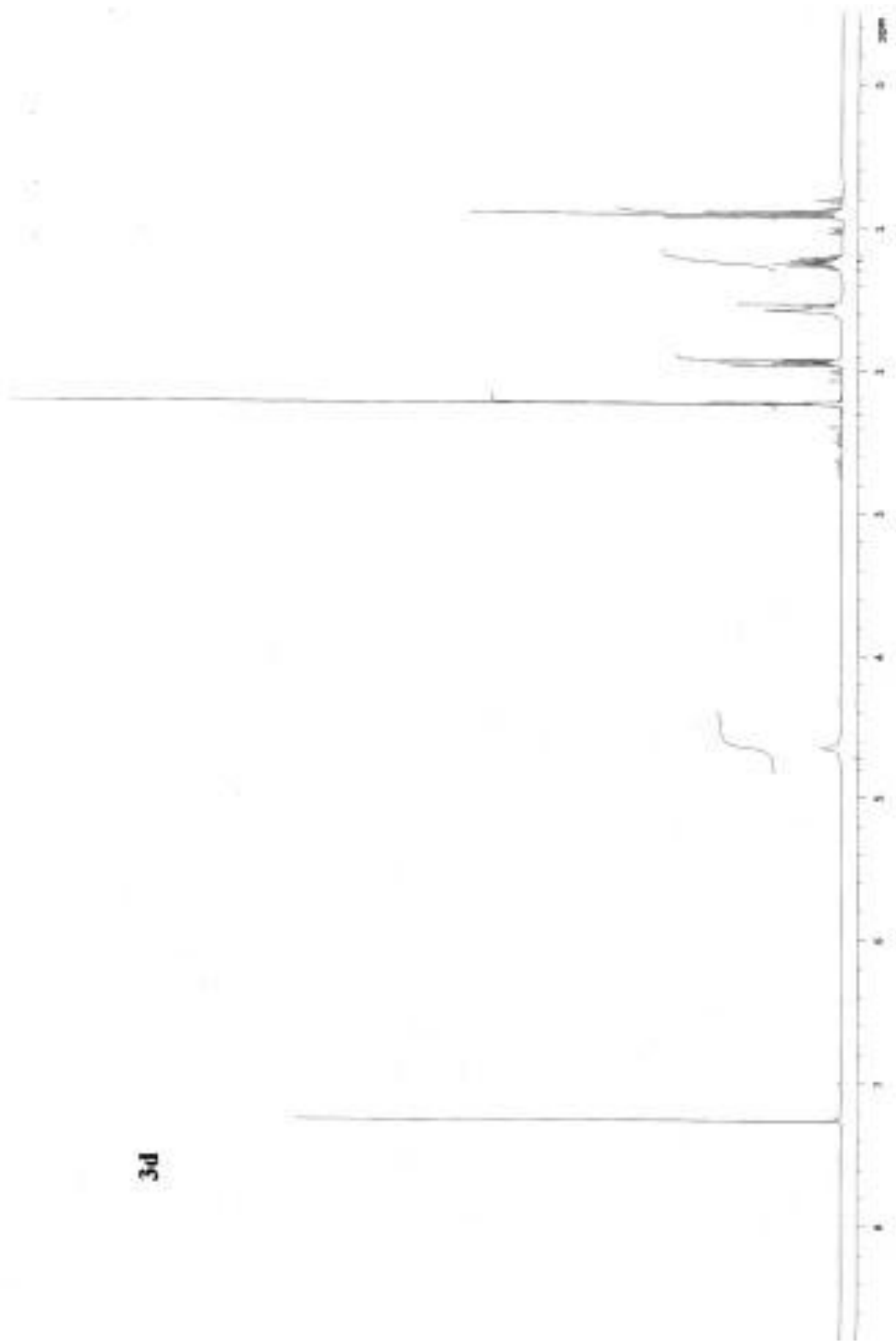


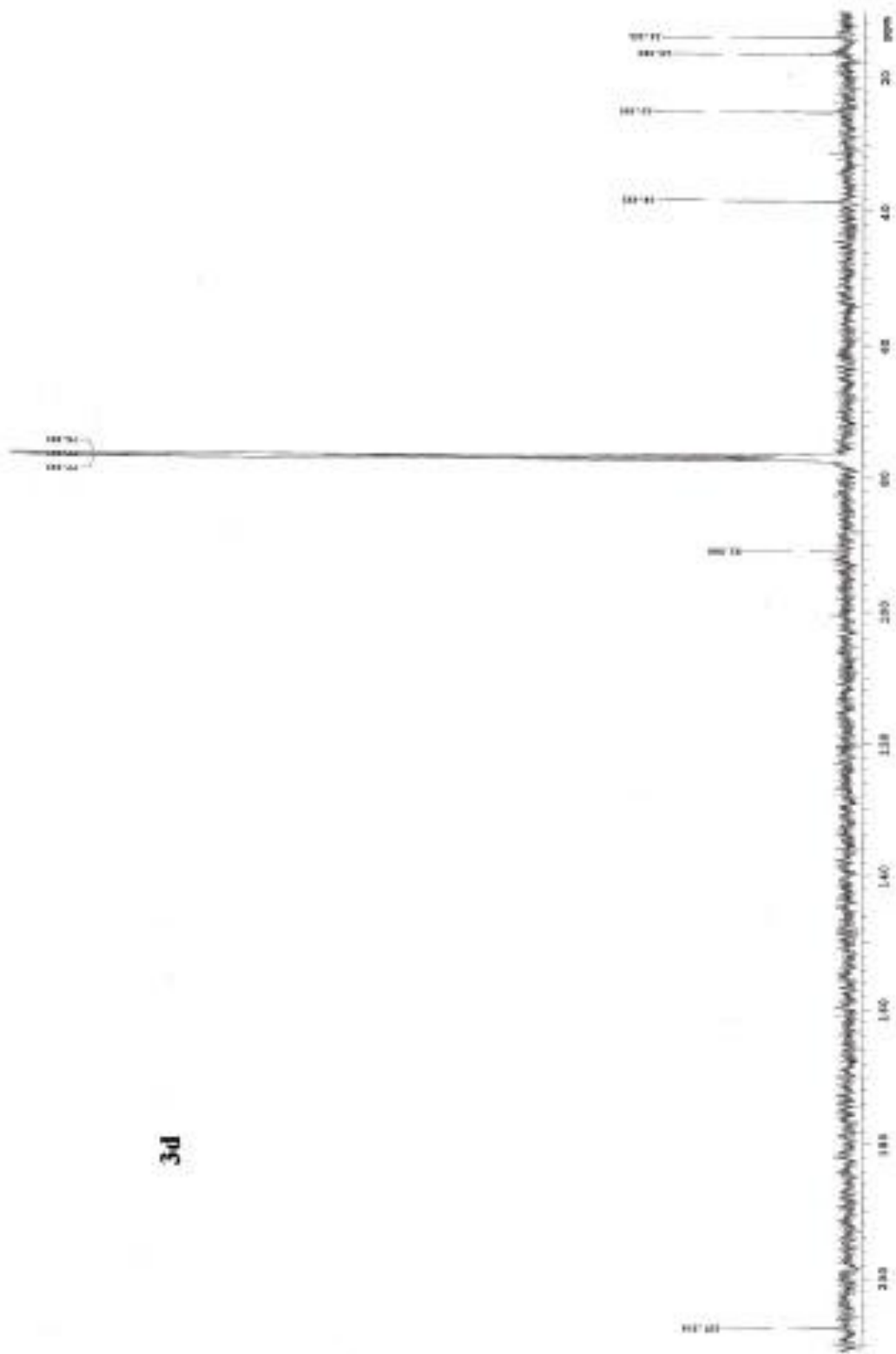


2d

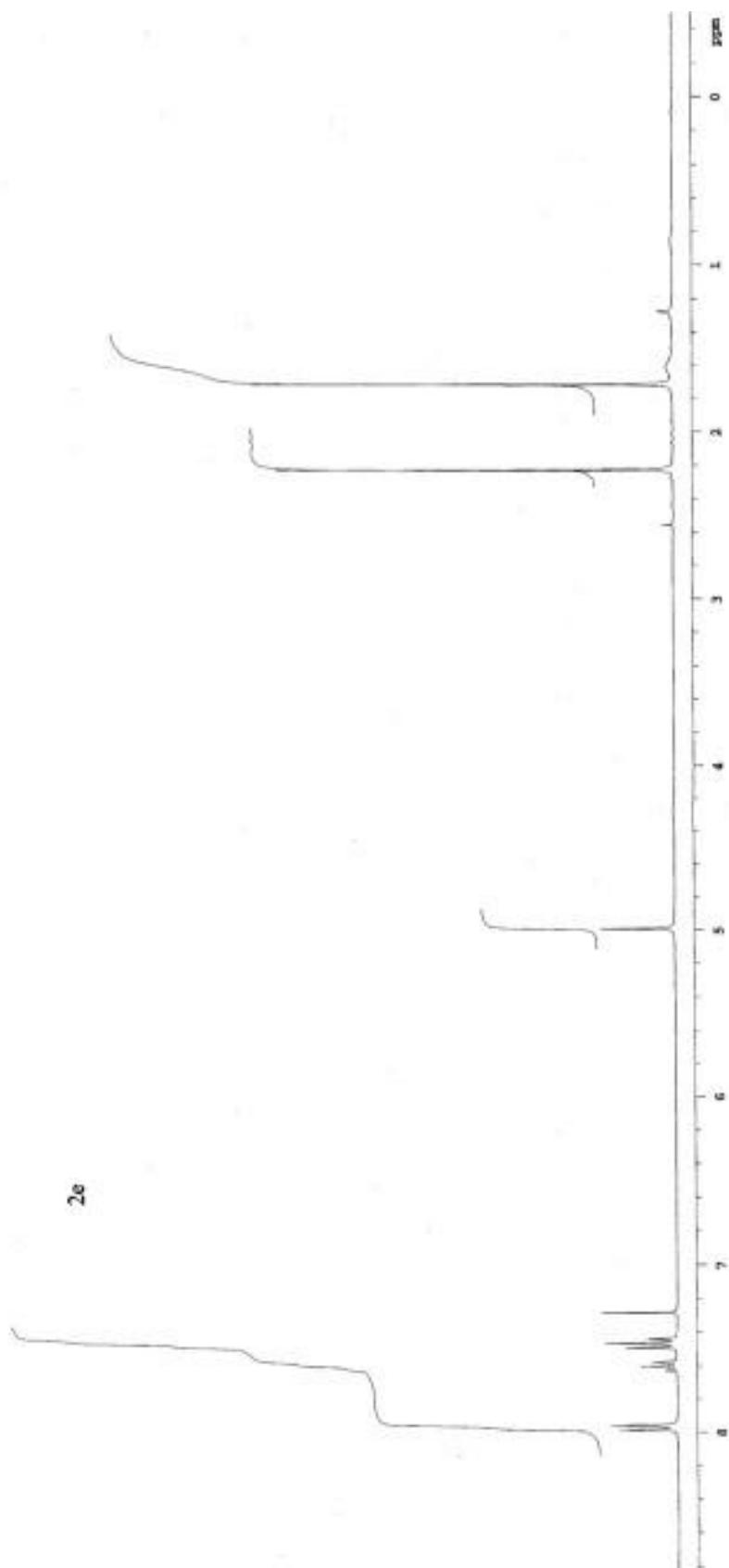


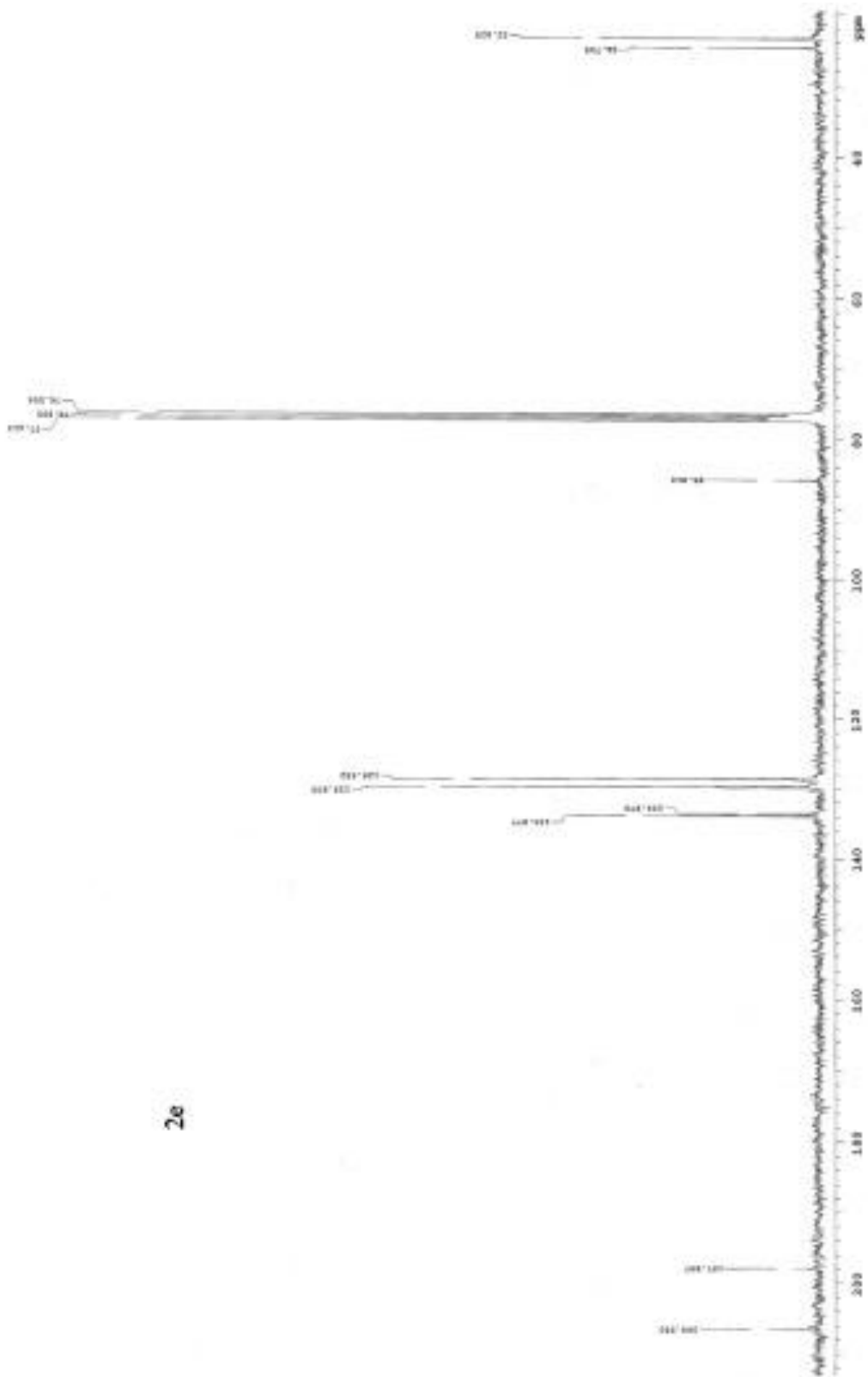
2d



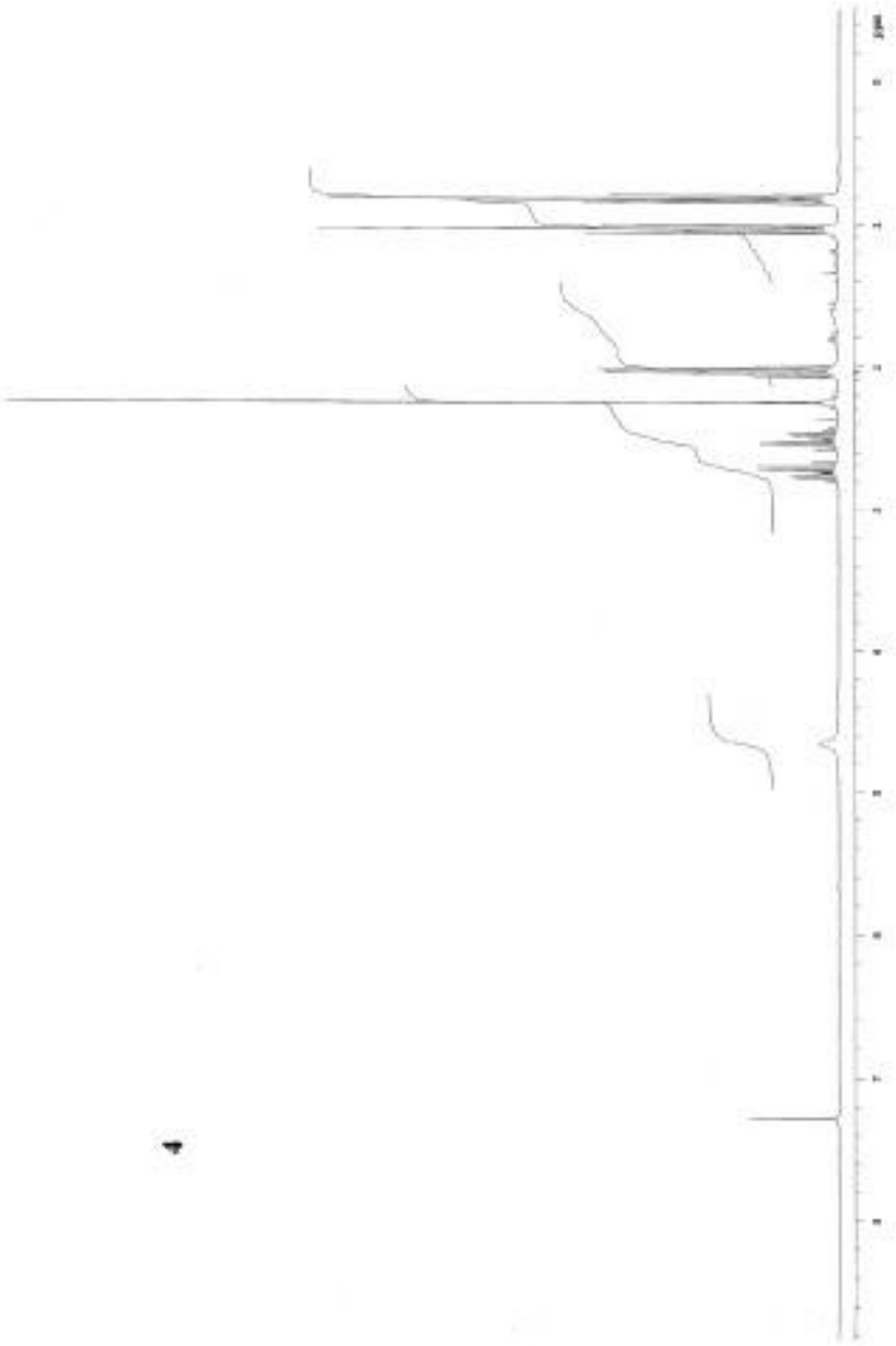


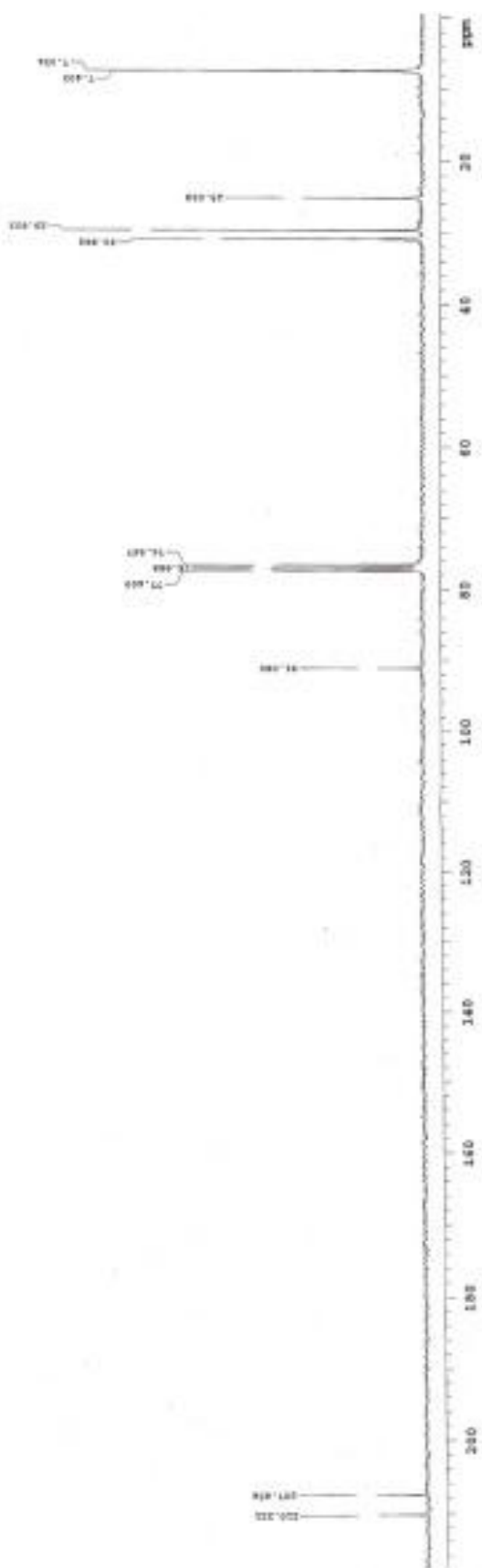
3d





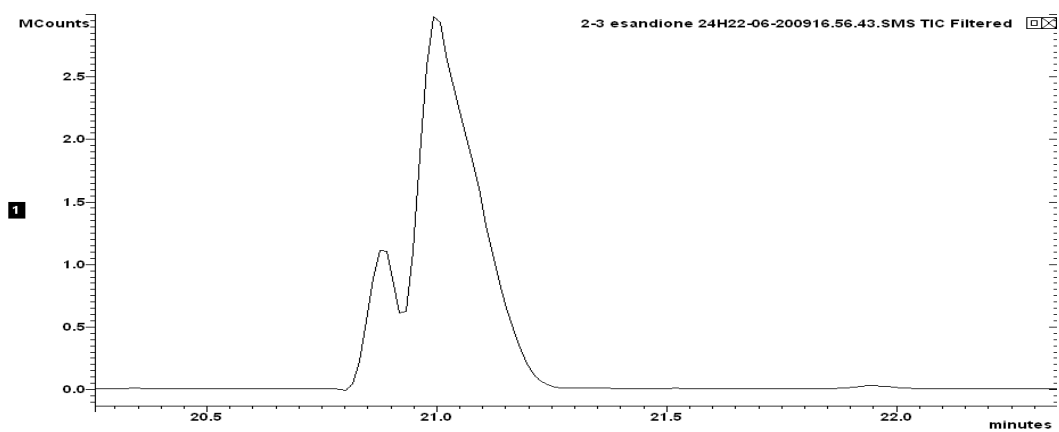
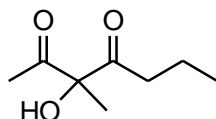
2e



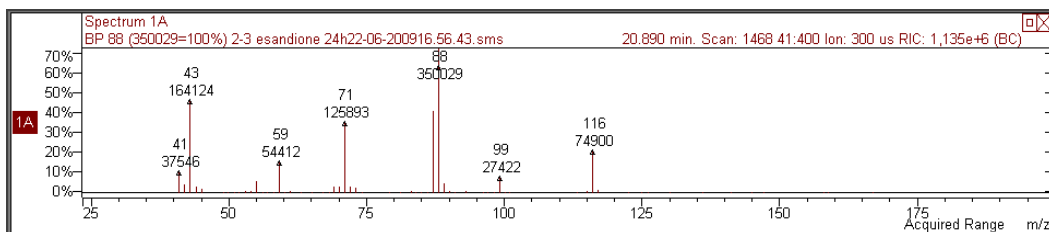


4

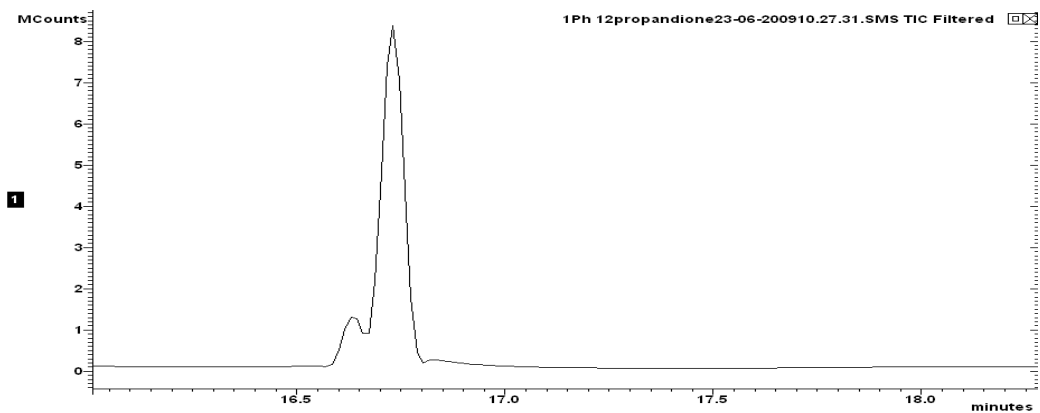
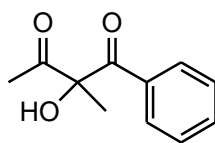
GC e MS del composto 2d



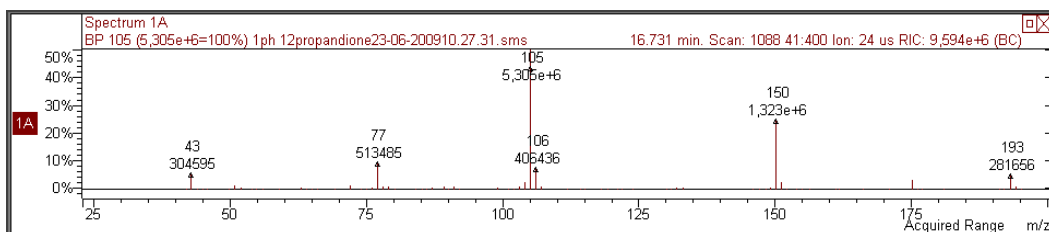
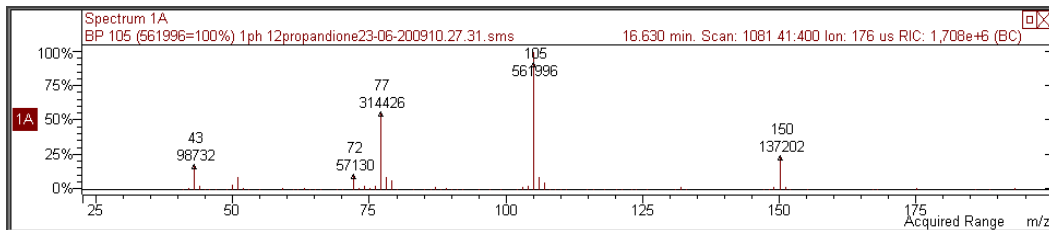
Data File	RT (min)	Area	Area (%)
2-3 esandione 24H22-06-200916.56.43.SMS	20.880	4,99E+06	83,6
2-3 esandione 24H22-06-200916.56.43.SMS	20.991	2,55E+07	16,4



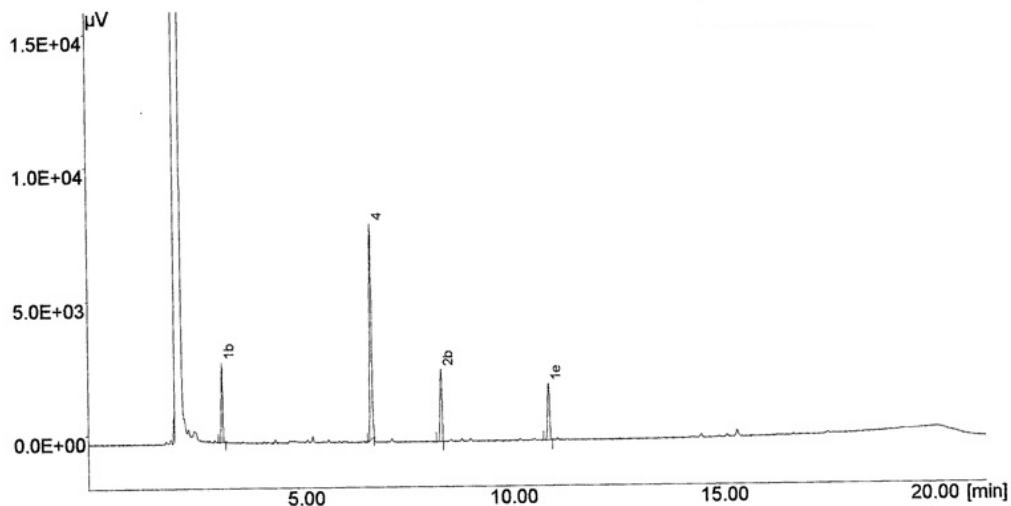
GC e MS del composto 2e



Data File	RT (min)	Area	Area (%)
1Ph 12propandione23-06-200910.27.31.SMS	16.634	4,28E+06	11,9
1Ph 12propandione23-06-200910.27.31.SMS	16.731	3,18E+07	88,1



Reazione di cross-coupling di 1b e 1c AAS-catalizzata: analisi GC della miscela di reazione



File name : 1Ph12PD 34ED1eq 48 017.CH1

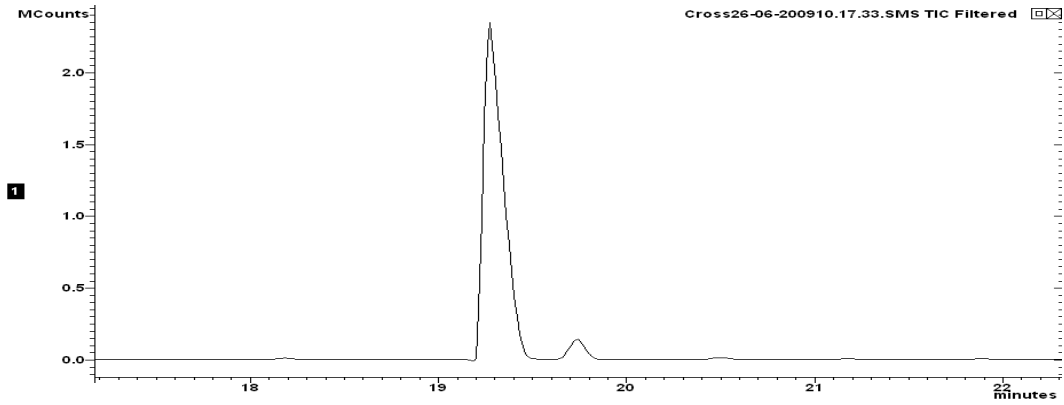
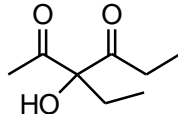
Info :
100-200°C 5°C/min, He 80 KPa

Vial # = 1 Rack # = 1
Injection Date : 25-Sep-2008 18:03:48
Curr. Date : 28-Jul-2009 12:33:24
User : MATTEO
Group : 6000
Control Method :

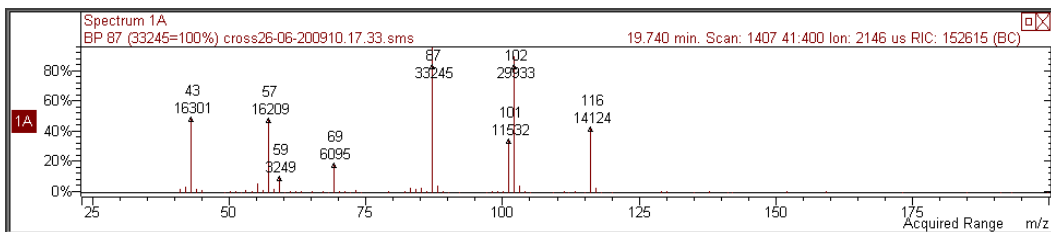
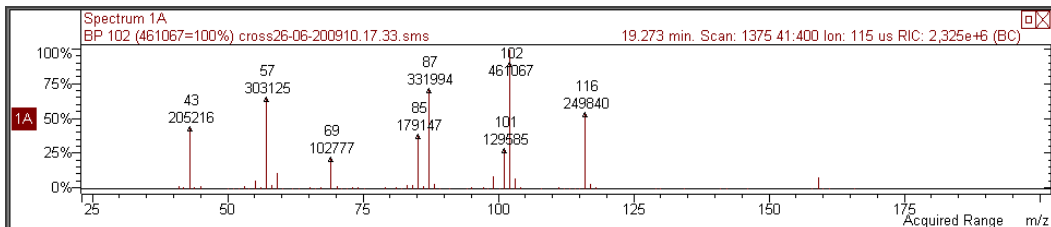
#	Name	RT	Area[µV.Sec]	%Area
1	1b	3.177	4975.385	13.796
2	4	6.723	18477.511	51.234
3	2b	8.385	6519.010	18.076
4	1e	10.940	6093.100	16.895

Total Area of Peak = 36065.005 [µV.Sec]

GC e MS del composto 4



Data File	RT (min)	Area	Area (%)
Cross26-06-200910.17.33.SMS	19.265	1,70E+07	95,4
Cross26-06-200910.17.33.SMS	19.736	819672	4,6



C)



DSMZ GmbH · Inhoffenstraße 7 B · 38124 Braunschweig

Prof. Paola Pedrini
Univesità di Ferrara
Dipartimento di Biologia ed Evoluzione
C. so Ercole I D'Este, 32
44100 Ferrara
Italy

DSMZ GmbH
Inhoffenstraße 7 B
38124 Braunschweig
GERMANY

Tel.: +49(0)531 26 16-0
Fax: +49(0)531 26 16-418
E-mail: contact@dsmz.de
Internet: www.dsmz.de

DIN EN ISO 9001:2000

Ihr Zeichen/Your ref.

Unser Zeichen/Our ref.

Tel:
0531 26 16-

Datum/Date

03411

231
identification@dsmz.de

2011-04-08

DSMZ-IDENTIFICATION SERVICE

Dear Madam, dear Sir,

we have now completed the studies for the identification of your strain

Geobacillus stearothermophilus – ID 11-197

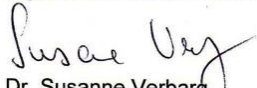
For the result please see the report attached.

According to the present taxonomy the above mentioned strain can be affiliated to the genus and species mentioned in the protocol.

Pathogenity was not tested.

Yours sincerely,

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH


Dr. Susanne Verbarq

Encl.: identification report and invoice no. 01103276-1

Geschäftsführer/
Managing Director:
Prof. Dr. Jörg Overmann
Aufsichtsratsvorsitzender/Head of
Managing Board: MR Dr. Axel Kollatschny

Braunschweigische Landessparkasse
Kto.-Nr./Account: 2 039 220
BLZ/Bank Code: 250 500 00
IBAN DE22 2505 0000 0002 0392 20
SWIFT (BIC) NOLADE 2 H

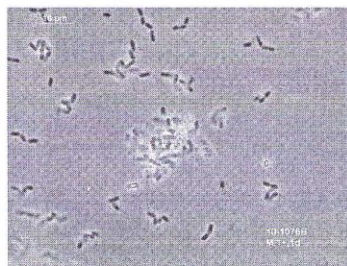
Handelsregister/
Commercial Register:
Amtsgericht Braunschweig
HRB 2570
Steuer-Nr. 13/200/24030

Identification of strain '*Geobacillus stearothermophilus*'
 (DSM 11-197)

Bacillus licheniformis

Properties of the strain

Rods	+	Lysozym-broth	+
width µm	0.6-0.7	Use of citrate	+
length µm	2.0-3.0	propionate	+
Aminopeptidase test	-	NO ₂ from NO ₃	-
KOH test	-	Indol reaction	-
Oxidase	-	Phenylalanine deaminase	-
Catalase	+	Arginine dihydrolase	+
Spores	+		
Sporangium swollen	-		
Anaerobic growth	+	RESULT: strain <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	
VP reaction	+	= <i>Bacillus licheniformis</i>	
pH in VP broth	5,3		
Maximum temperature		The analysis of the cellular fatty acids	
Growth positive up to	55°C	shows good correspondence to the	
		profile of the <i>Bacillus subtilis</i> group.	
Growth in medium pH 5.7	+	The partial sequencing of the 16SrDNA	
NaCl 2%	+	shows a similarity of 100% to <i>Bacillus licheniformis</i> .	
5%	+	The physiological characters confirm this result.	
7%	+		
10%	+		
Acid from			
D-glucose	+		
D-xylose	+		
D-mannitol	+		
D-fructose	+		
L-arabinose	+		
Gas from glucose	-		
Hydrolysis of			
casein	-		
gelatine	+		
starch	+		
tween 80	-		
Lecithinase	-		



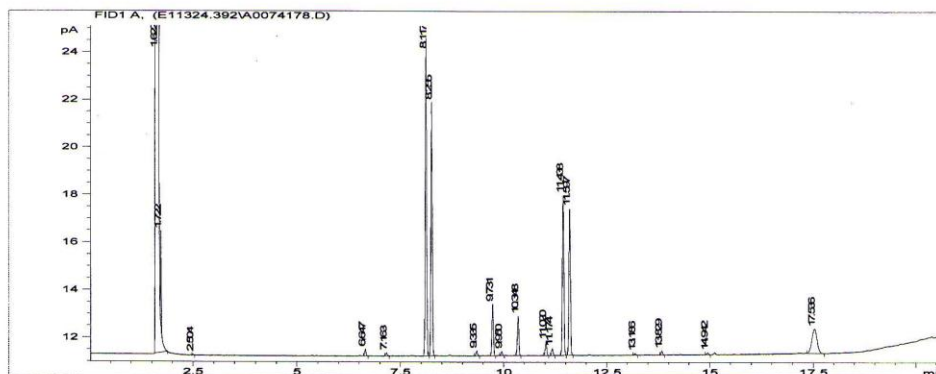
Volume: DATA File: E113243.92A Samp Ctr: 7 ID Number: 24178
 Type: Samp Bottle: 14 Method: TSBA40
 Created: 3/24/2011 11:54:35 AM
 Sample ID: UN-V-11-197-GEOBAC-PEDRINI-FERRARA-ITALY

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.622	3.053E+8	0.022	----	7.030	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.722	8749	0.018	----	7.232		----	< min rt	
2.504	145	0.022	----	8.815		----	< min rt	
6.647	1246	0.034	1.012	13.619	14:0 ISO	0.65	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
7.163	589	0.031	0.998	14.000	14:0	0.30	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
8.117	59833	0.036	0.977	14.623	15:0 ISO	29.91	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
8.255	48919	0.037	0.974	14.714	15:0 ANTEISO	24.38	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
9.335	1068	0.039	0.954	15.388	16:1 w7c alcohol	0.52	ECL deviates 0.001	
9.731	10607	0.038	0.948	15.627	16:0 ISO	5.15	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
9.950	832	0.035	0.945	15.759	16:1 w11c	0.40	ECL deviates 0.002	
10.348	8441	0.040	0.939	15.999	16:0	4.06	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
11.020	2934	0.040	0.930	16.389	ISO 17:1 w10c	1.40	ECL deviates 0.001	
11.174	1472	0.037	0.928	16.478	Sum In Feature 4	0.70	ECL deviates 0.002	17:1 ISO I/ANTEI B
11.438	35683	0.040	0.925	16.631	17:0 ISO	16.89	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
11.597	31519	0.040	0.923	16.723	17:0 ANTEISO	14.88	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
13.186	365	0.040	0.906	17.632	18:0 ISO	0.17	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
13.829	898	0.040	0.900	17.998	18:0	0.41	ECL deviates -0.002	Reference -0.006
14.942	410	0.040	0.891	18.635	19:0 ISO	0.19	ECL deviates 0.001	Reference -0.004
17.536	17966	0.110	----	20.129		----	> max rt	
----	1472	----	----	----	Summed Feature 4	0.70	17:1 ISO I/ANTEI B	17:1 ANTEISO B/i I

ECL Deviation: 0.001 Reference ECL Shift: 0.003 Number Reference Peaks: 11
 Total Response: 204817 Total Named: 204817
 Percent Named: 100.00% Total Amount: 195437

Matches:

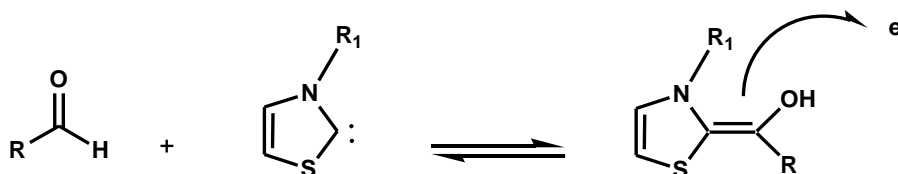
Library	Sim Index	Entry Name
TSBA40 4.10	0.138	Bacillus-amyloliquefaciens* (Bacillus subtilis group)
	0.076	Bacillus-lentimorbus**
	0.076	Bacillus-licheniformis* (Bacillus subtilis group)
	0.074	Corynebacterium-aquaticum (not an approved name)



**SINTESI DI ALCOLI TERZIARI:
APPROCCIO BIOMIMETICO**

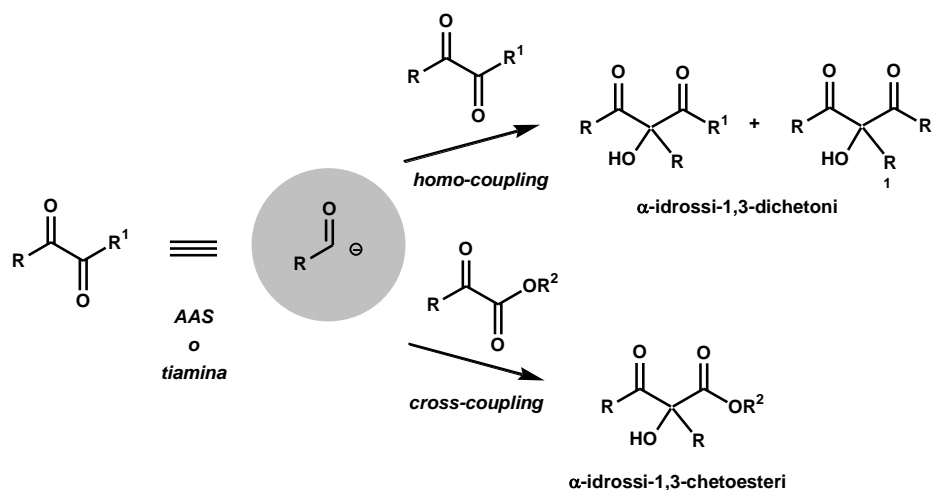
Il meccanismo catalitico di AAS e la sua applicazione alla sintesi asimmetrica (Cap. 3) ha spinto i ricercatori con cui ho collaborato a studiare un approccio biomimetico od organocatalitico, basato sulla tiamina che funge da pre-catalizzatore, come metodologia alternativa per la formazione di legami carbonio-carbonio nella sintesi di alcoli terziari.

Oggi si trovano disponibili carbeni stabili che derivano dall'imidazolo e dal triazolo e che si comportano come ligandi nella catalisi. Gli N-eterocicli carbeni (NHC), come riportato nella review di Herrmann and Kocher [52], svolgono principalmente la funzione di nucleofili e trovano molteplici applicazioni operando come la tiamina difosfato, un sale di tiazolio che in natura funge da cofattore per molti enzimi (Cap. 1, par. 1.4) (**Schema 1**).



Schema 1. Meccanismo generale della catalisi degli N-eterocicli carbeni

Prendendo spunto dall'attività dell'enzima acetilacetoino sintasi (AAS), che grazie alla presenza del cofattore tiamina difosfato, catalizza reazioni di formazione di legami C-C di tipo aciloinico (Cap. 3) [40], sono stati approfonditi aspetti più chimici della catalisi ThDP-dipendente. Sono stati sintetizzati in versione racemica gli stessi α -idrossi- α -alchil- β -dichetoni ottenuti e caratterizzati per via enzimatica ed anche α -idrossi-1,3-chetoesteri. Il lavoro pubblicato nel 2011 su *Tetrahedron* [56] dimostra la versatilità dell'approccio biomimetico proposto che rappresenta un significativo passo in avanti nella chimica degli NHC (**Schema 2**).



Schema 2. Sintesi di α-idrossi-1,3-dichetoni e α-idrossi-1,3-chetoesteri utilizzando α-dichetoni come acil-donatori

Ispirandosi al precedente studio enzimatico (Cap.3), sono stati impiegati come catalizzatori la tiamina cloridrato **2a** e il sale di tiazolo **2b**, analogo della tiamina (**Figura 1**),

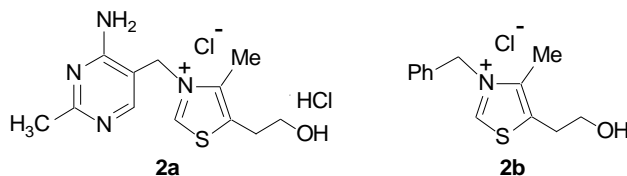
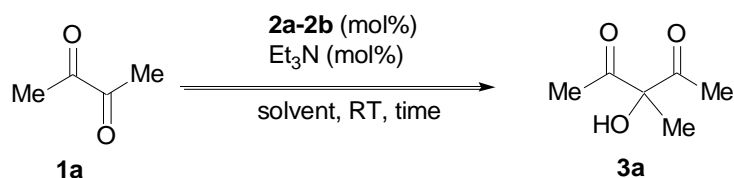


Figura 1. Tiamina cloridrato **2a** e sale di tiazolo **2b**

in reazioni di homo-coupling utilizzando il 2,3-butandione (diacetile) **1a** come donatore ed accettore di acil-anioni (**Schema 3**).



Schema 3. Homo-coupling di 2,3-butandione **1a**

Le diverse prove eseguite per ottimizzare la reazione di homo-coupling sono riportate in **Tabella 1**.

Tabella 1. Ottimizzazione della reazione di homo-coupling del dichetone **1a**^a

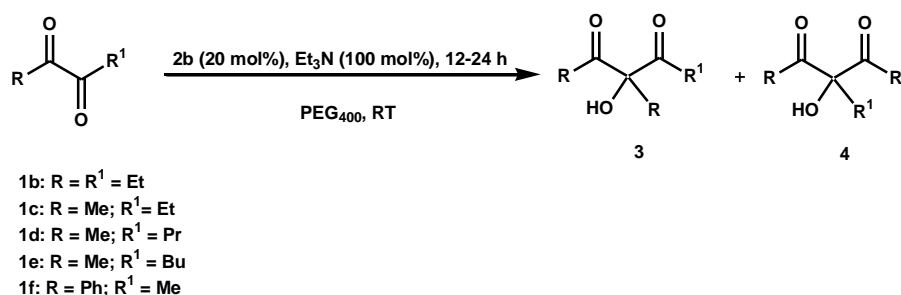
Reazione	Catalizzatore (mol %)	Solvente	Tempo (h)	3a (resa %) ^b
1 ^c	2a (100)	H ₂ O	5	<5
2 ^c	2a (100)	EtOH	5	75
3 ^c	2a (100)	PEG ₄₀₀	3	95
4 ^{c,d}	2a (100)	PEG ₄₀₀	3	90
5 ^e	2a (20)	PEG ₄₀₀	48	45
6 ^e	2b (20)	PEG ₄₀₀	12	95
7 ^{d,e}	2b (20)	PEG ₄₀₀	12	91

^aReazioni condotte con 2.0 mmol di **1a** (0.5 M). ^bResa isolata. ^cEt₃N: 200 mol%.

^dReazioni condotte con il riciclo di **2** e del PEG₄₀₀ dopo aver aggiunto nuova Et₃N. ^eEt₃N:100 mol%.

La presenza di una base nell'ambiente di reazione è fondamentale per ricreare la forza basica presente nel sito attivo degli enzimi ThDP-dipendenti come AAS: nello specifico i risultati migliori si sono ottenuti con Et₃N. La reazione di homo-coupling catalizzata dalla tiamina cloridrato **2a** inizialmente è stata condotta in H₂O ma le rese di acetilacetoino **3a** sono state inferiori al 5%. Il prodotto ha mostrato di essere fortemente instabile e di degradarsi nell'ambiente di reazione anche utilizzando, al posto di Et₃N, una base debole come il sodio bicarbonato. Con il supporto dei dati riportati in letteratura che riportano la degradazione di **3a** in ambiente basico e ad elevate temperature[61], si può affermare che l'instabilità di **3a** sia dovuta al concomitante impiego di H₂O come solvente e di una base. Conferma di questo si è avuta dalla condensazione di **1a**, con tiamina cloridrato **2a** accoppiata a Et₃N, in etanolo (EtOH) (Reazione 2). In questo caso il prodotto atteso **3a** è stato ottenuto con una resa del 75%. Questo risultato soddisfacente ci ha spinto ad utilizzare come mezzo di reazione il polietilenglicole (PEG₄₀₀), un solvente non tossico impiegato in "green chemistry", che ha facilitato il workup delle reazioni, permettendo il riciclo del cofattore. La reazione con il dichetone **1a**

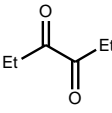
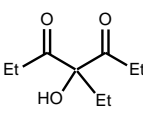
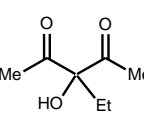
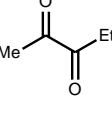
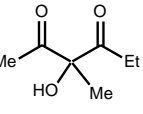
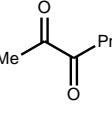
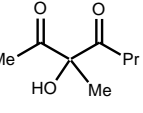
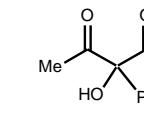
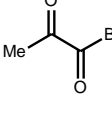
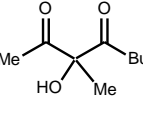
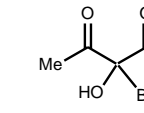
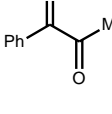
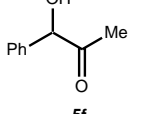
(0,5 M), tiamina cloridrato **2a** (1 equiv) ed Et₃N (2 equiv) in PEG₄₀₀, dopo 3h, fornisce il prodotto desiderato **3a** con una resa praticamente quantitativa (95%) (Reazione 3). Da sottolineare è il fatto che, in fase di estrazione, il PEG₄₀₀ intrappola il catalizzatore **2°**, mentre il prodotto **3a** passa nel solvente organico; aggiungendo nuovamente al PEG₄₀₀ il dichetone ed Et₃N, il catalizzatore può essere riciclato mantenendo soddisfacenti le rese del prodotto **3a** (90%) (Reazione 4). Il catalizzatore è stato riciclato fino a 5 volte con minima perdita del prodotto, in termini di resa del prodotto isolato. L'unico svantaggio nell'impiego del catalizzatore **2a** è che i risultati migliori si ottengono se viene utilizzato in quantità stechiometrica. Quando si passa a condizioni catalitiche, infatti, i tempi di reazione si allungano notevolmente (48h) e le rese di **3a** si abbassano (45%) (Reazione 5). E' stato impiegato come catalizzatore anche il sale di tiazolo **2b**, un prodotto commerciale analogo semplificato della tiamina. Questo secondo catalizzatore ha dato risultati migliori rispetto a **2a** sia nella fase di riciclo, sia nella possibilità di essere utilizzato in quantità catalitiche (Reazioni 5, 6 e 7). La versatilità del sistema è stata dimostrata successivamente in reazioni di homo-coupling su differenti donatori-accettori di acil-anioni. Sono stati impiegati una selezione di α -dichetoni commerciali **1b-f**, simmetrici e non simmetrici, già precedentemente utilizzati come substrati delle reazioni catalizzate da AAS (Cap. 3) (Schema 4).



Schema 4. Reazioni di homo-coupling con α -dichetoni commerciali

Nella **Tabella 2** sono riportati i risultati ottenuti nelle reazioni di homo-coupling catalizzate dal sale di tiazolo **2b** degli α -dichetoni **1b-f**.

Tabella 2. Reazioni di homo-coupling^a con α -dichetoni **1b-f**

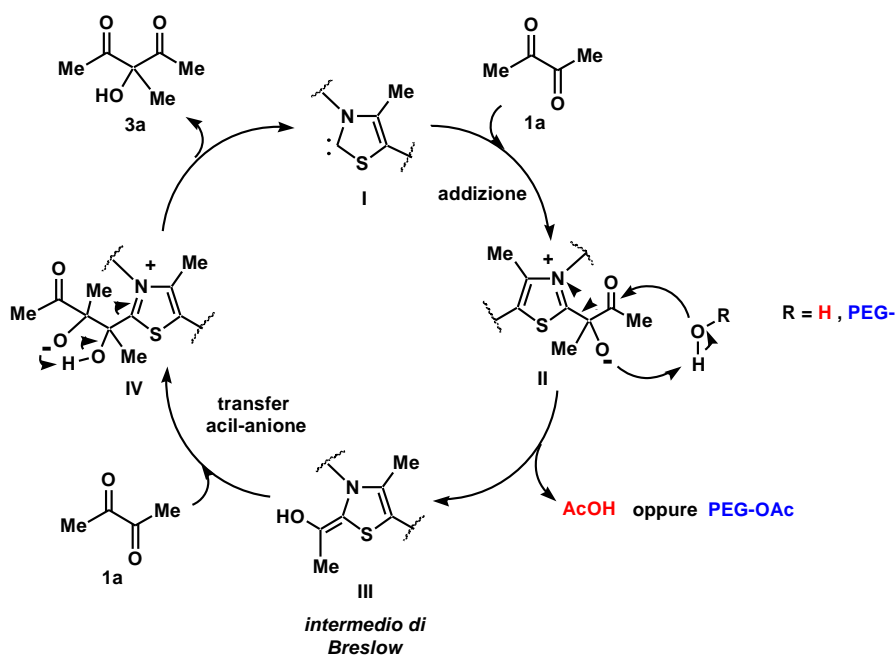
α -dichetone	α -idrossi-1,3-dichetone	
 1b	 3b (82%)	 4c (7%) ^{c,d}
 1c	 3c (74%) ^c	
 1d	 3d (61%) ^e	 4d (27%) ^{d,e}
 1e	 3e (63%) ^f	 4e (19%) ^{d,f}
 1f	 5f (75%)	

^a2.0 mmol di dichetone (0.5 M). ^bresa prodotto isolato. ^cTracce (<10%) di prodotto di coupling con trasferimento del propionile (Analisi GC-MS e ¹H NMR). ^dRese determinate con analisi ¹H NMR della miscela di reazione. ^eTracce (<10%) di prodotto di coupling derivato dal trasferimento del butanoile. ^fTracce (<10%) del prodotto di coupling derivato dal trasferimento del pentanoile.

Dalle reazioni di homo-coupling con α -dichetoni **1b-e** è stato possibile ottenere con rese soddisfacenti gli stessi α -idrossi-1,3-dichetoni **3b-e** e **4c-e**, già precedentemente caratterizzati dalle reazioni con AAS (Cap. 3), ma in questo caso in forma racemica. Come già riportato nel capitolo 3, è possibile notare che

quando l' α -dichetone è non simmetrico **1c-e** il trasferimento dell'acil-anione (MeCO^-) è predominante rispetto a quello degli altri carbanioni che generano, invece, differenti prodotti, presenti solo in tracce nella reazione. Inoltre, l'acil-anione è preferibilmente trasferito sul carbonile meno ingombrato della seconda molecola di substrato che funge da accettore, come si nota dalle differenti rese dei regioisomeri **3d** (61%) / **4d** (27%) e **3e** (63%) / **4e** (19%). Risultato analogo si ottiene anche con l'approccio catalizzato dall'enzima AAS (Cap. 3).

Risultato inatteso è, invece, quello dato dall'homo-coupling del dichetone **1f** che porta all'aciloino **5f** (75%). La spiegazione di tale comportamento si può trovare nel meccanismo con cui avviene la catalisi (enzimatica e biomimetica) delle reazioni di homo-coupling. Nello **Schema 5** viene riportato il meccanismo partendo dal dichetone **1a**.



Schema 5. Meccanismo catalitico proposto per le reazioni di homo-coupling di α -dichetoni per via chimica ed enzimatica

La catalisi inizia con la deprotonazione dell'anello tiazolidinico, della tiamina nell'approccio enzimatico o dei suoi analoghi in quello chimico, e l'attacco

nucleofilo su una molecola di **1a** che funge da acil-donatore. Si forma così l'intermedio **II** che viene poi idrolizzato, dall'H₂O nella catalisi enzimatica e dal PEG₄₀₀ in quella chimica, generando l'intermedio **III** con il rilascio di acido acetico o di PEG₄₀₀ acetilato. L'intermedio **III**, sfruttando l'*umpolung* dell'aldeide, compie il secondo attacco nucleofilo su una seconda molecola di **1a** per dare l'intermedio **IV** che riarrangia, permettendo il rilascio del prodotto atteso **3a** e del catalizzatore nella sua forma di ilide. Il meccanismo riportato nello **Schema 5** è applicabile a tutte le reazioni condotte sugli α -dichetoni **1b-e** ad eccezione del caso specifico del dichetone **1f** che presenta come sostituente un fenile (**Tabella 2**) e da cui si ottiene l'idrossichetone **5f**, al posto dell'aspettato α -idrossi-1,3-dichetone **3f** ottenuto dalle precedenti sintesi enzimatiche con AAS (**Figura 2**).

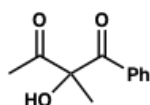
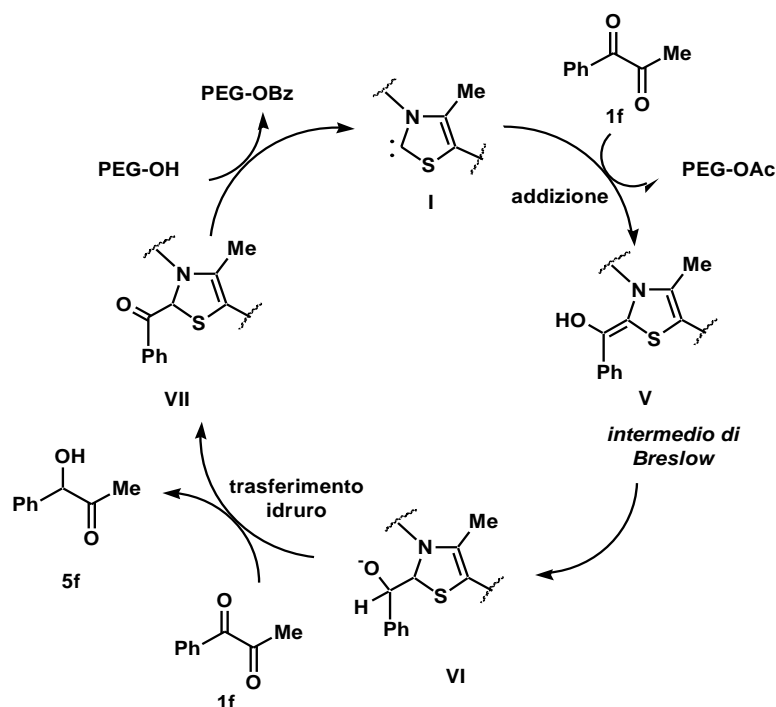


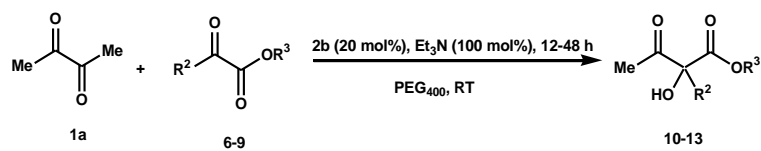
Figura 2. Prodotto di homo-coupling di **1f** ottenuto dalla sintesi enzimatica.

Il meccanismo proposto per la formazione di **5f** nella sintesi biomimetica è riportato nello **Schema 6**.



Schema 6. Reazione biomimetica di homo-coupling del dichetone **1f**

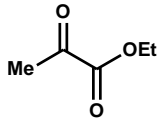
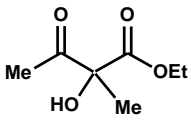
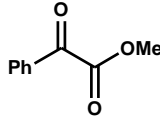
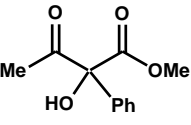
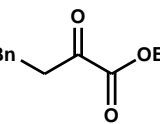
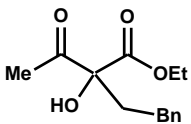
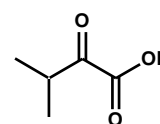
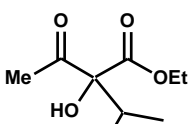
Anche in questo caso si ipotizza la formazione dell'intermedio di Breslow **V** che segue un'evoluzione anomala a causa della presenza del fenile. Viene proposto un riarrangiamento prototropico che porta all'intermedio **VI**; successivamente, questo è stabilizzato dal trasferimento dell'idruro su una seconda molecola di substrato **1f** che viene ridotto ad idrossichetone **5f** dando l'intermedio **VII**. Il successivo attacco nucleofilo di PEG₄₀₀ sull'intermedio **VII** è l'unica strada che permette la rigenerazione del catalizzatore. Evidenze sperimentali che avvalorano l'ipotesi di questo meccanismo sono da una parte la caratterizzazione del prodotto **5f** e dall'altra la presenza di PEG benzoilato distinguibile dalle analisi ¹H NMR. La versatilità del sistema biomimetico catalizzato dal sale di tiazolo **2b** è stata dimostrata in reazioni di cross-coupling tra il dichetone **1a** e una serie di α -chetoesteri **6-9** che ha portato alla sintesi di una serie di α -idrossi-1,3-chetoesteri 10-13 (**Schema 7**).



Schema 7. Reazioni di cross-coupling con α -dichetone **1a** e α -chetoesteri **6-9**

I risultati di queste reazioni di cross-coupling sono riportati nella **Tabella 3**.

Tabella 3. Reazioni di cross-coupling^a tra α -dichetone **1a** e α -chetoesteri **6-9**

donatore	accettore	α -idrossi-1,3-chetoestere
1a	 6	 10 (52%)
1a	 7	 11 (51%)
1a	 8	 12 (58%)
1a	 9	 13 (48%)

^a3 equiv di α -chetoestere come accettore. ^bRese di prodotto isolato.

Gli α -idrossi-1,3-chetoesteri **10-13** sono stati ottenuti con rese soddisfacenti (48-58%). Questi risultati rappresentano un'interessante esempio dell'applicazione alla sintesi degli NHC in quanto al momento esistono solo pochi esempi in letteratura di accoppiamenti aldeidi-chetoni inter-molecolari [54], con la sola eccezione di un recente lavoro del 2011 che descrive reazioni di cross-coupling altamente chemoselettive tra aldeidi alifatiche e aldeidi aromatiche orto-sostituite [55].

Da un punto di vista più biochimico, inoltre, al di là dell'interesse che possono suscitare per le molteplici applicazioni sintetiche che ne possono derivare, queste reazioni organocatalizzate hanno permesso di comprendere più a fondo e confermare le osservazioni già descritte sul meccanismo catalitico della AAS [40].

Per la caratterizzazione dei prodotti, la descrizione della procedura sperimentale e il dettaglio dei materiali e metodi utilizzati viene riportato l'articolo (Allegato **A**) e gli spettri ^1H e ^{13}C NMR dei prodotti sintetizzati (Allegato **B**).



α -Diketones as acyl anion equivalents: a non-enzymatic thiamine-promoted route to aldehyde–ketone coupling in PEG₄₀₀ as recyclable medium

Olga Bortolini^a, Giancarlo Fantin^{a,*}, Marco Fogagnolo^a, Pier Paolo Giovannini^b, Valentina Venturi^b, Salvatore Pacifico^a, Alessandro Massi^{a,*}

^a Dipartimento di Chimica, Laboratorio di Chimica Organica, Università di Ferrara, Via L. Borsari 46, I-44121 Ferrara, Italy

^b Dipartimento di Biologia ed Evoluzione, Università di Ferrara, Corso Ercole I D'Este, 32, I-44121 Ferrara, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2011

Received in revised form 2 August 2011

Accepted 22 August 2011

Available online 27 August 2011

Keywords:

α -Diketones
 α -Hydroxyketones
 Polyethylene glycol
 Thiazolium salts
 N-Heterocyclic carbenes

ABSTRACT

By mimicking the peculiar behavior of thiamine diphosphate-dependent acetylacetoinsynthase, it has been demonstrated that thiamine hydrochloride **2a** and its simple analogue thiazolium salt **2b** are able to activate α -diketones as acyl anion equivalents in nucleophilic acylations, such as the homo-coupling of α -diketones and the hitherto unreported cross-coupling between α -diketones and α -ketoesters. These carboligation reactions were optimized under stoichiometric (**2a**) and catalytic conditions (**2b**) by using eco-friendly PEG₄₀₀ as the reaction medium, thus allowing both solvent and thiazolium salt recycling.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Thiamine diphosphate (ThDP)-dependent enzymes, such as pyruvate decarboxylase (PDC), benzaldehyde lyase (BAL), and benzoylformate decarboxylase (BDF), are a group of biocatalysts involved in a variety of reactions including the formation and cleavage of carbon–carbon bonds.¹ These enzymes have in common the capability to generate an ‘active aldehyde’ species,² that is, a ThDP-bound carbanion–enamine intermediate, which reacts with an aldehyde acceptor to form a α -hydroxyketone in an acyloin-type condensation.² Within this area of research, a recent study from our group demonstrated that 1,2-diketones may serve as acyl anion equivalents when ThDP-dependent acetylacetoinsynthase (AAS) is utilized as catalyst in the homo-coupling of 1,2-diketones to form chiral α -hydroxyketones (Fig. 1).^{3,4} This finding triggered us to investigate a possible biomimetic route, reminiscent of ThDP activity,⁵ to nucleophilic acylations involving α -diketones as acyl anion donors. By considering the peculiar mechanism of action of AAS,³ it was envisaged that the sole thiamine coenzyme (pre-catalyst) in the presence of a suitable base could display the same ability to activate α -diketones as acyl anion sources.⁶ Hence, the optimization of an organocatalytic (racemic) version of the

already disclosed enzymatic homo-coupling of 1,2-diketones³ (virtually an intermolecular aldehyde–ketone coupling) was initially considered. Subsequently, the more challenging thiamine-catalyzed direct cross-coupling reaction between diketone donors and α -ketoester acceptors was also investigated to explore the potential of the proposed carboligation methodology (Fig. 1). Indeed, while significant advances have been recently made in N-heterocyclic carbene (NHC) catalysis⁷ to promote intramolecular aldehyde–ketone couplings,⁸ examples of the non-enzymatic intermolecular variant are limited to the study by Enders and Henseler,⁹ which described the cross-coupling between aldehydes and

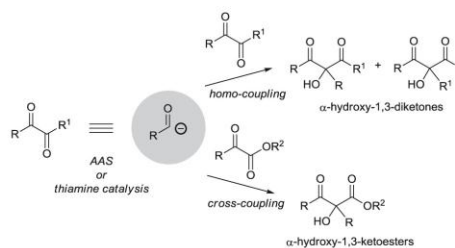


Fig. 1. Synthesis of α -hydroxy-1,3-diketones and α -hydroxy-1,3-ketoesters using α -diketones as acyl anion equivalents.

* Corresponding authors. E-mail addresses: giancarlo.fantin@unife.it (G. Fantin), msslsn@unife.it (A. Massi).

highly electrophilic trifluoromethyl ketones using a bicyclic triazolium salt as the pre-catalyst.¹⁰

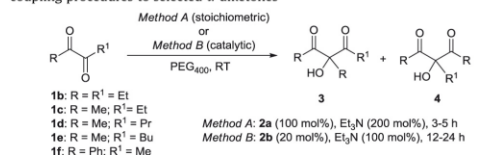
2. Results and discussion

In analogy with our previous enzymatic study,³ we initially investigated the activity of the thiamine hydrochloride **2a**-Et₃N couple in water using 2,3-butanedione (biacetyl) **1a** as donor–acceptor substrate (Table 1, entry 1). Triethylamine was chosen as the base to reproduce the basic strength of active sites in the catalytic pocket of ThDP-dependent enzymes.¹¹ Against the almost complete consumption of **1a** as determined by TLC and ¹H NMR analyses, only small amounts of the expected product **3a** survived to these conditions, in agreement with an old report of Mizuhara and Handler⁶ asserting that biacetyl **1a**, in aqueous alkaline medium and in the presence of thiamine, is cleaved to acetaldehyde and 2-(1-hydroxyethyl)-thiamine. On the other hand, the α -hydroxy-1,3-diketone **3a** product has been reported to be unstable under basic and thermal conditions due to a complex sequence of equilibria involving the corresponding oxy-anions.¹² These multiple rearrangements are also active in the presence of mild bases as sodium bicarbonate. Our findings, however, suggest that the instability of **3**-like products is related not only to the presence of a base but, and more importantly, to the concomitant use of an aqueous medium, as demonstrated by the results found for the condensation of **1a** promoted by the thiamine hydrochloride **2a**-Et₃N couple in EtOH (entry 2). In this case, the expected product **3a** was in fact obtained in 75% isolated yield. It is worth stressing that crucial for a successful work-up was the purification of **3a** by distillation. Encouraged by these promising results, we decided to widen the selection of protic solvents with polyethylene glycol (PEG₄₀₀), a non-toxic and eco-friendly medium that should allow for both solvent and pre-catalyst recycling.¹³ Hence, when the mixture of **1a** (0.5 M), thiamine hydrochloride **2a** (1 equiv), and Et₃N (2 equiv) in PEG₄₀₀ was stirred for 3 h, the target α -hydroxyketone **3a** was recovered in almost quantitative yield (95%) after extraction with Et₂O and subsequent product distillation (entry 3). Rewardingly, the PEG solution containing the thiamine promoter could be reloaded with fresh diketone **1a** and Et₃N to afford **3a** in 90% isolated yield (entry 4). Additional recycles (up to five) resulted equally effective with minimal loss of product yield. No change in the reaction outcome occurred on moving from stoichiometric to

catalytic conditions (**2a**, 20 mol %), although a modest conversion (45%) was achieved within a reasonable reaction time (48 h, entry 5). Fortunately, the use of the commercially available thiazolium salt **2b**, that is, a simplified analogue of thiamine **2a**, greatly increased the reaction rate and **3a** was recovered in almost quantitative yield after 12 h stirring and standard work-up (entry 6). The recyclability of **2b** in PEG₄₀₀ was finally demonstrated as before (entry 7).

We then examined the tolerance of the procedure for different donor–acceptor substrates with stoichiometric thiamine **2a** (Method A, Table 2) and found that 3,4-hexanedione **1b** was successfully converted to the expected product **3b** (88%, entry 1). When the protocol was extended to the unsymmetrically substituted dialkyl α -diketones **1c–e** (entries 2–4), it was observed that acetyl anion transfer (MeCO⁻) was predominant over migration of its higher carbanion counterparts, in full agreement with the

Table 2
Short study on the applicability of the optimized stoichiometric and catalytic homo-coupling procedures to selected α -diketones^a



Entry	α -Diketone	α -Hydroxy-1,3-diketone (Method A (%); Method B (%)) ^b	
1		 3b (88%; 82%)	
2		 3c (71%; 74%) ^c	 4c (11%; 7%) ^{c,d}
3		 3d (65%; 61%) ^e	 4d (24%; 27%) ^{e,f}
4		 3e (67%; 63%) ^f	 4e (17%; 19%) ^{d,f}
5		 5f (78%; 75%)	

^a Reactions performed with 2.0 mmol of diketone (0.5 M).

^b Isolated yield.

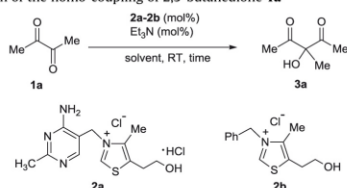
^c Lower amounts (<10%) of coupling products arising from propionyl anion transfer were also detected (GC–MS and ¹H NMR analyses).

^d Lower amounts (<10%) of coupling products arising from butyryl anion transfer were also detected.

^e Lower amounts (<10%) of coupling products arising from pentanoyl anion transfer were also detected.

^f Lower amounts (<10%) of coupling products arising from pentanoyl anion transfer were also detected.

Table 1
Optimization of the homo-coupling of 2,3-butanedione **1a**^a



Entry	Catalyst (mol %)	Solvent	Time (h)	3a Yield (%) ^b
1 ^c	2a (100)	H ₂ O	5	<5
2 ^c	2a (100)	EtOH	5	75
3 ^c	2a (100)	PEG ₄₀₀	3	95
4 ^{c,d}	2a (100)	PEG ₄₀₀	3	90
5 ^e	2a (20)	PEG ₄₀₀	48	45
6 ^e	2b (20)	PEG ₄₀₀	12	95
7 ^{d,e}	2b (20)	PEG ₄₀₀	12	91

^a Reactions performed with 2.0 mmol of **1a** (0.5 M).

^b Isolated yield.

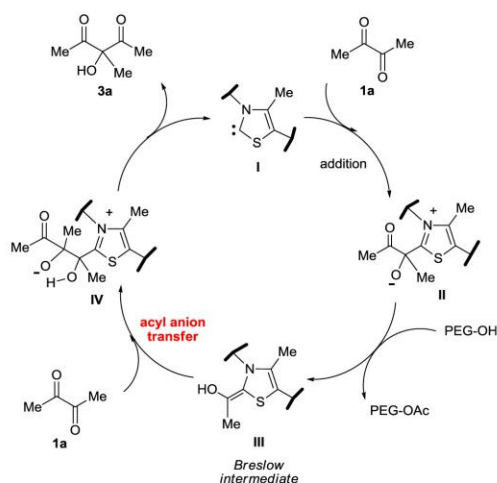
^c Et₃N: 200 mol %.

^d Reaction performed with recycled **2** and PEG₄₀₀ after addition of fresh Et₃N.

^e Et₃N: 100 mol %.

reactivity pertaining to the AAS enzymatic system.³ Accordingly, the corresponding α -hydroxyketones **3c–e** (65–71%) were isolated together with lower amounts (11–24%) of the isomeric derivatives **4c–e** (entries 2–4). As previously observed, the results obtained in the above transformations with catalytic **2b** (Method B) closely paralleled those detected with stoichiometric thiamine **2a** although with a longer reaction time (12–24 h).

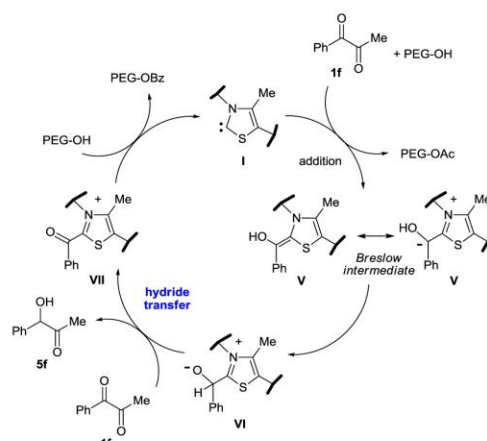
The mechanism that accounts for all these findings may invoke the formation of the intermediate **II** resulting from the addition of the thiazolin-2-ylidene **I** to the α -diketone **1**, and its evolution to the Breslow intermediate **III** by attack of the PEG solvent to the carbonyl of **II**. Subsequent addition of the Breslow intermediate to the acceptor, that is, a second molecule of α -diketone **1**, leads to the formation of the product **3** and regeneration of the catalyst **I** (Scheme 1).¹⁴ It is worth noting that formation of the key intermediate **III** by the above postulated mechanism seems to be confirmed by the isolation of 1 equiv of acetylated PEG solvent (PEG-OAc) from the crude reaction mixture.¹⁵



Scheme 1. Proposed reaction pathway for the homo-coupling of alkyl diketones **1a–e** (substrate **1a** as representative example).

The overall reactivity of the thiazolium-promoted homo-coupling of α -diketones **1** can be fully explained by Scheme 1, except when the formation of a phenyl-substituted Breslow intermediate of type **V** occurs (Scheme 2). This is demonstrated by the results observed in the homo-coupling of 1-phenyl-1,2-propanedione **1f** (Table 2, entry 5). In that case, the fate of intermediate **V** seems to be different with generation, through prototropic rearrangement to **VI**,¹⁶ of a hydride equivalent, that is, transferred to the acceptor **1f**. Once the α -diketone undergoes reduction to **5f**,¹⁷ the thiazolin-2-ylidene **I** is regenerated by transfer of the benzoyl group from the acyl thiazolium intermediate **VII** to PEG (Scheme 2).^{15,18}

In a next set of experiments we investigated the donor–acceptor attitudes of α -ketoesters toward the thiazolium- Et_3N system. In a control experiment (Table 3, entry 1), ethyl pyruvate **6** was not reactive under the previously optimized homo-coupling conditions (Methods A and B). This finding, however, may be exploited to perform cross-coupling reactions between α -ketoester acceptors and a suitable acyl anion donor, such as **1a**. To explore this hitherto unreported carbonylation reaction, the commercially available α -ketoester esters **6–9** (3 equiv) were coupled with **1a** under optimal stoichiometric and catalytic conditions (entries 2–5). Gratifyingly,



Scheme 2. Proposed reaction pathway for the reduction of **1f**.

Table 3
Homo-coupling of ethyl pyruvate **6** and cross-couplings between **1a** and selected α -ketoesters **6–9**^a

Entry	Donor	Acceptor	α -Hydroxy-1,3-ketoesters (Method A(%); Method B(%)) ^b
1	6	6	No reaction
2	1a	6	10 (55%; 52%)
3	1a	7	11 (42%; 51%)
4	1a	8	12 (50%; 58%)
5	1a	9	13 (51%; 48%)

^a All reactions performed with 3 equiv of α -ketoester acceptor.

^b Isolated yield.

the corresponding α -hydroxy-1,3-ketoesters **10–13** were obtained in fair yields (around 50%), thus demonstrating the feasibility of this approach. While the side homo-coupling reaction of **1a** could not be suppressed under these conditions, the isolation of the target products **10–13** was facilitated by the volatile nature of the homo-coupling by-product **3a**.

3. Conclusion

In summary, we have demonstrated that 1,2-diketones may serve as acyl anion equivalents in thiamine-promoted α -diketone homo-couplings in analogy with a previously reported ThDP-dependent enzymatic system. In addition, a novel substrate combination, that is, α -diketone to α -ketoester, has been investigated by using the same thiamine promoter. The setup of a catalytic procedure for the above transformations has also been optimized by employing a more active analogue of thiamine as the pre-catalyst. Polyethylene glycol (PEG₄₀₀) has been shown to be an effective and reusable reaction medium for the above transformations. Further investigations of the generality of the disclosed mode of acyl anion generation and the development of NHC-promoted asymmetric variants are currently underway in our laboratories.

4. Experimental section

4.1. General remarks

Reactions were monitored by TLC on silica gel 60 F₂₅₄ with detection by charring with phosphomolybdic acid. Flash column chromatography was performed on silica gel 60 (230–400 mesh). Bulb-to-bulb distillation was performed with a Büchi Glass Oven B-580 apparatus. ¹H (300 MHz) and ¹³C (75 MHz) NMR spectra were recorded in CDCl₃ solutions at room temperature. Peaks assignments were aided by ¹H–¹H COSY and gradient-HMQC experiments. GC–MS spectra were recorded using a Varian 4000 GC/MS/MS system equipped with a fused capillary column Megadex 5 (25m×0.25 mm) containing dimethyl-*n*-pentyl- β -cyclodextrin on OV 1701. Analyses were carried out with a gradient of 1.5 °C/min (from 80 °C up to 200 °C); retention times (*t*_R) are given in minutes. ESI MS analyses were performed in positive ion mode with samples dissolved in 10 mM solution of ammonium formate in 1:1 MeCN/H₂O. For accurate mass measurements the compounds were analyzed in positive ion mode by electrospray ionization (ESI) hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer (Q-TOFMS) fitted with a Z-spray electrospray ion source (Waters, Manchester, UK). The capillary source voltage and the cone voltage were set at 3200 V and 45 V, respectively; the source temperature was kept at 120 °C; nitrogen was used as a drying gas at a flow rate of ca. 80 L/h. The time-of-flight analyzer was externally calibrated with NaI from *m/z* 300 to 2000 to yield accuracy near to 5 ppm. Accurate mass data were collected by directly infusing samples (10 pmol/ μ L in 1:1 MeCN/H₂O+0.1% ammonium formate) into the system at a flow rate of 5 μ L/min. Spectroscopic data of compounds **3a**,^{3,19} **3b**,^{3,20} **3c**,^{3,21} **3e**,²¹ **4c**,³ **4d**,³ **5f**,²² **10**,²³ and **13**²⁴ were identical to those reported in the literature. Copies of the ¹H spectra of **3a–e**, **4d**, **5f**, **10**, and **13** are reported as purity and identity documentation.

4.2. Optimized procedure for the homo-coupling of α -diketones **1a–e**

Method A. To a vigorously stirred mixture of thiamine hydrochloride **2a** (337 mg, 1.00 mmol), Et₃N (279 μ L, 2.00 mmol), and PEG₄₀₀ (4 mL) α -diketone **1** (2.00 mmol) was added in one portion. The mixture was stirred at room temperature until TLC analysis revealed the disappearance of the starting α -diketone (3–5 h). The reaction medium was then diluted with Et₂O (5 mL), vigorously

stirred for 5 min, allowed to separate out and the ethereal solution was decanted. This process was repeated twice to obtain the crude α -hydroxyketone **3** in Et₂O, whereas the mother liquor (PEG₄₀₀-thiamine hydrochloride **2a**) was kept aside for further runs. The extraction solvent was then removed under a nitrogen stream and the residue containing the target α -hydroxyketone purified by either bulb-to-bulb distillation (compounds **3a** and **3b**) or flash chromatography (compounds **3c–e**). Product yields are reported in the next paragraphs for Method A.

Method B. To a vigorously stirred mixture of 3-benzyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolium chloride **2b** (54 mg, 0.20 mmol), Et₃N (140 μ L, 1.00 mmol), and PEG₄₀₀ (4 mL) α -diketone **1** (2.00 mmol) was added in one portion. The mixture was stirred at room temperature until TLC analysis revealed the disappearance of the starting α -diketone (12–24 h). The reaction medium was then diluted with Et₂O (5 mL), vigorously stirred for 5 min, allowed to separate out and the ethereal solution was decanted. This process was repeated twice to obtain the crude α -hydroxyketone **3** in Et₂O, whereas the mother liquor (PEG₄₀₀-methylthiazolium **2b**) was kept aside for further runs. The extraction solvent was then removed under a nitrogen stream and the residue containing the target α -hydroxyketone purified as described above. Product yields for Method B are reported in Table 2.

4.2.1. 3-Hydroxy-3-methylpentane-2,4-dione (3a). The crude reaction mixture was bulb-to-bulb distilled (50 °C, 5 mmHg) to give **3a**,^{3,19} (124 mg, 95%) as a colorless liquid. Lit.:^{19b} bp 43–44 °C (4 mmHg). ESI MS (130.1): 153.5 (M+Na⁺). Compound **3a** partially decomposes on silica gel.

4.2.2. 4-Ethyl-4-hydroxyheptane-3,5-dione (3b). The crude reaction mixture was bulb-to-bulb distilled (84 °C, 5 mmHg) to give **3b**,^{3,20} (151 mg, 88%) as a colorless liquid. ESI MS (172.1): 195.8 (M+Na⁺). Compound **3b** partially decomposes on silica gel.

4.2.3. (R/S)-3-Hydroxy-3-methylhexane-2,4-dione (3c). Column chromatography with 12:1 cyclohexane/AcOEt afforded **3c**,^{3,21} (102 mg, 71%) as a colorless oil. ESI MS (144.1): 145.1 (M+H⁺). A chromatographic fraction containing **4c** but slightly contaminated by **3c** was collected for **4c**³ identification (¹H NMR analysis). Compound **4c** partially decomposes on silica gel.

4.2.4. (R/S)-3-Hydroxy-3-methylheptane-2,4-dione (3d). Column chromatography with 12:1 cyclohexane/AcOEt afforded **3d**,^{3,21} (102 mg, 65%) as a colorless oil. ESI MS (158.1): 181.7 (M+Na⁺). A chromatographic fraction containing **4d** was collected for **4d**³ identification (¹H NMR analysis). Compound **4d** partially decomposes on silica gel.

4.2.5. (R/S)-3-Hydroxy-3-methyloctane-2,4-dione (3e). Column chromatography with 12:1 cyclohexane/AcOEt afforded **3e**,²¹ (115 mg, 67%) as a colorless oil. GC–MS (70 eV, EI): *t*_R 23.65 (first enantiomer); 23.84 (second enantiomer), *m/z* 172 (M⁺, <1%), 130 (20), 88 (100), 43 (45). ESI MS (172.1): 195.5 (M+Na⁺). A chromatographic fraction containing **4e** was collected for **4e** identification. 3-Butyl-3-hydroxypentane-2,4-dione **4e**: GC–MS (70 eV, EI): *t*_R 20.90, *m/z* 172 (M⁺, <1%), 130 (100), 43 (68). ¹H NMR: δ =4.65 (br s, 1H, OH), 2.25 (s, 6H, CH₃(CO)), 2.04–1.95 (m, 2H, 2 H-4'), 1.40–1.19 (m, 4H, 2 H-2', 2 H-3'), 0.90 (t, 3H, J=7.0 Hz, CH₃). ¹³C NMR: δ =207.6 (2C), 91.0 (C), 36.1 (CH₂), 25.3 (CH₂), 25.2 (2 CH₃), 22.7 (CH₂), 13.8 (CH₃). ESI MS (172.1): 173.4 (M+H⁺). HRMS (ESI/Q-TOF): calcd *m/z* for C₉H₁₇O₃ [M+H]⁺, 173.1178; found, 173.1170. Compound **4e** partially decomposes on silica gel.

4.2.6. (R/S)-1-Hydroxy-1-phenylpropan-2-one (5f). **Method A.** To a vigorously stirred mixture of thiamine hydrochloride **2** (337 mg,

1.00 mmol), Et₃N (279 μ L, 2.00 mmol), and PEG₄₀₀ (4 mL) α -diketone **1f** (293 μ L, 2.00 mmol) was added in one portion. The mixture was stirred at room temperature for 3 h and then diluted with Et₂O (5 mL). The resulting mixture was vigorously stirred for 5 min, allowed to separate out and the ethereal solution was decanted. This process was repeated twice. The collected ethereal fractions were concentrated and the resulting residue was eluted from a column of silica gel with 4:1 cyclohexane/AcOEt to give **5f**²² (234 mg, 78%) as a white amorphous solid. ESI MS (150.1): 173.7 (M+Na⁺).

The subsequent elution with AcOEt afforded a mixture of PEG-OBz and PEG-OAc. PEG-OBz: ¹H NMR: δ =8.20–8.05, 7.60–7.50, and 7.48–7.40 (3m, Ph), 4.50–4.40 and 3.90–3.80 (2m, OCH₂CH₂OBz), 3.70–3.50 (m, OCH₂CH₂O–). PEG-OAc: ¹H NMR: δ =4.30–4.20 and 3.60–3.50 (2m, OCH₂CH₂OAc), 3.70–3.50 (m, OCH₂CH₂O–), 2.08 (s, CH₃).

Method B. To a vigorously stirred mixture of 3-benzyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolium chloride **2b** (54 mg, 0.20 mmol), Et₃N (279 μ L, 2.00 mmol), and PEG₄₀₀ (4 mL) α -diketone **1f** (293 μ L, 2.00 mmol) was added in one portion. The mixture was stirred at room temperature for 12 h and then diluted with Et₂O (5 mL). The resulting mixture was vigorously stirred for 5 min, allowed to separate out and the ethereal solution was decanted. This process was repeated twice. The collected ethereal fractions were concentrated and the resulting residue was eluted from a column of silica gel with 4:1 cyclohexane/AcOEt to give **5f**²² (225 mg, 75%) as a white amorphous solid.

4.3. General procedure for the cross-couplings of **1a** with α -ketoesters **6–9**

Method A. To a vigorously stirred mixture of thiamine hydrochloride **2** (337 mg, 1.00 mmol), Et₃N (279 μ L, 2.00 mmol), α -ketoester **6–9** (3.00 mmol), and PEG₄₀₀ (4 mL) 2,3-butanedione **1a** (84 μ L, 1.00 mmol) was added in one portion. The mixture was stirred at room temperature until TLC analysis revealed the disappearance of **1a** (3–8 h). The reaction medium was then diluted with Et₂O (5 mL), vigorously stirred for 5 min, allowed to separate out and the ethereal solution was decanted. This process was repeated twice. The collected ethereal fractions were concentrated and the resulting residue was eluted from a column of silica gel with the suitable elution system to give the corresponding α -hydroxy-1,3-ketoester **10–13**. Product yields are reported in the next paragraphs for Method A.

Method B. To a vigorously stirred mixture of 3-benzyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolium chloride **2b** (54 mg, 0.20 mmol), α -ketoester **6–9** (3.00 mmol), and PEG₄₀₀ (4 mL) 2,3-butanedione **1a** (84 μ L, 1.00 mmol) was added in one portion. The mixture was stirred at room temperature until TLC analysis revealed the disappearance of **1a** (12–48 h). The reaction medium was then diluted with Et₂O (5 mL), vigorously stirred for 5 min, allowed to separate out and the ethereal solution was decanted. This process was repeated twice. The collected ethereal fractions were concentrated and the resulting residue was eluted from a column of silica gel with the suitable elution system to give the corresponding α -hydroxy-1,3-ketoester **10–13**. Product yields are reported in Table 3.

4.3.1. (R/S)-Ethyl 2-hydroxy-2-methyl-3-oxobutanoate (10). Column chromatography with 3:1 cyclohexane/AcOEt afforded **10**²³ (88 mg, 55%) as a yellow oil. ESI MS (160.1): 183.5 (M+Na⁺).

4.3.2. (R/S)-Methyl 2-hydroxy-3-oxo-2-phenylbutanoate (11). Column chromatography with 8:1 cyclohexane/AcOEt afforded **11** (87 mg, 42%) as a yellow foam. ¹H NMR: δ =7.60–7.50 and 7.48–7.35 (2m, 5H, Ph), 4.78 (br s, 1H, OH), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 2.26

(s, 3H, CH₃). ¹³C NMR: δ =203.6 (C), 170.8 (C), 130.1 (C), 128.8 (2 CH), 128.6 (2 CH), 126.3 (CH), 84.6 (C), 53.6 (CH₃), 26.9 (CH₃). ESI MS (208.1): 209.7 (M+H⁺). HRMS (ESI/Q-TOF): calcd *m/z* for C₁₁H₁₃O₄ [M+H]⁺, 209.0814; found, 209.0821.

4.3.3. (R/S)-Ethyl 2-acetyl-2-hydroxy-4-phenylbutanoate (12). Column chromatography with 8:1 cyclohexane/AcOEt afforded **12** (125 mg, 50%) as a yellow foam. ¹H NMR: δ =7.38–7.15 (m, 5H, Ph), 4.28 (br s, 1H, OH), 4.25 (q, 2H, J=7.0 Hz, OCH₂CH₃), 2.70–2.60 (m, 2H, 2 H-4), 2.45 (ddd, 1H, J_{3a,4a}=8.0 Hz, J_{3a,4b}=8.5 Hz, J_{3a,3b}=14.0 Hz, H-3a), 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.24 (ddd, 1H, J_{3b,4a}=7.5 Hz, J_{3b,4b}=8.0 Hz, J_{3a,3b}=14.0 Hz, H-3b), 1.27 (t, 3H, J=7.0 Hz, OCH₂CH₃). ¹³C NMR: δ =204.9 (C), 171.0 (C), 141.1 (C), 128.7 (4 CH), 126.4 (CH), 84.1 (C), 63.0 (CH₂), 37.2 (CH₂), 29.8 (CH₂), 24.8 (CH₃), 14.3 (CH₃). ESI MS (250.1): 251.6 (M+H⁺). HRMS (ESI/Q-TOF): calcd *m/z* for C₁₄H₁₈O₄ [M+H]⁺, 251.1283; found, 251.1277.

4.3.4. (R/S)-Ethyl 2-acetyl-2-hydroxy-3-methylbutanoate (13). Column chromatography with 8:1 cyclohexane/AcOEt afforded **13**²⁴ (96 mg, 51%) as a yellow foam. ESI MS (188.1): 189.3 (M+H⁺).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the University of Ferrara (Progetto FAR 2010) and the Italian Ministry of University and Scientific Research (Progetto FIRB Chem-Profarma-Net Grant RBPR05NWWC 008) for financial supports. Thanks are also given to Mr. Paolo Formaglio for NMR experiments.

Supplementary data

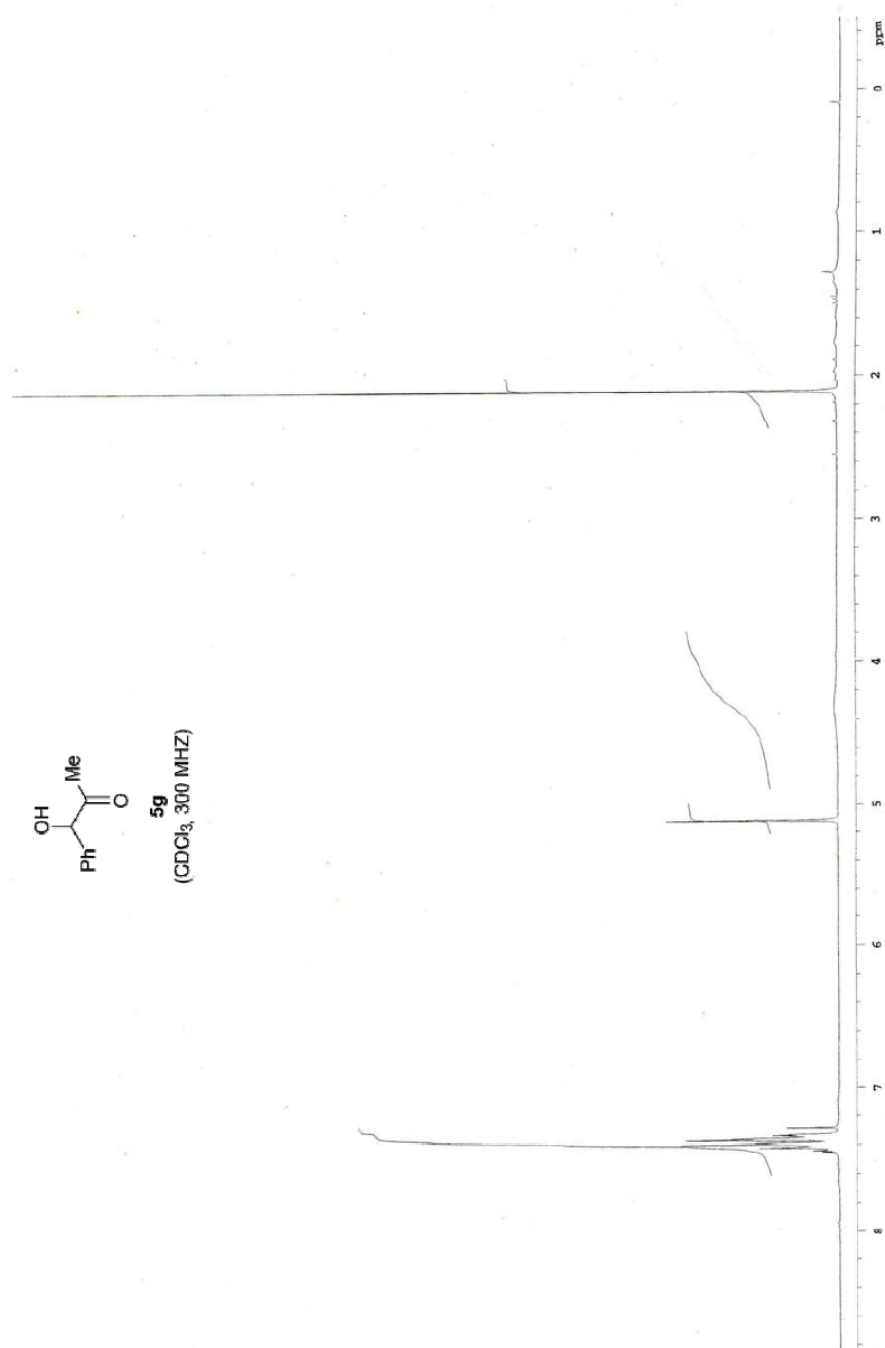
¹H and ¹³C spectra for new compounds. Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at doi:10.1016/j.tet.2011.08.056. These data include MOL files and InChIKeys of the most important compounds described in this article.

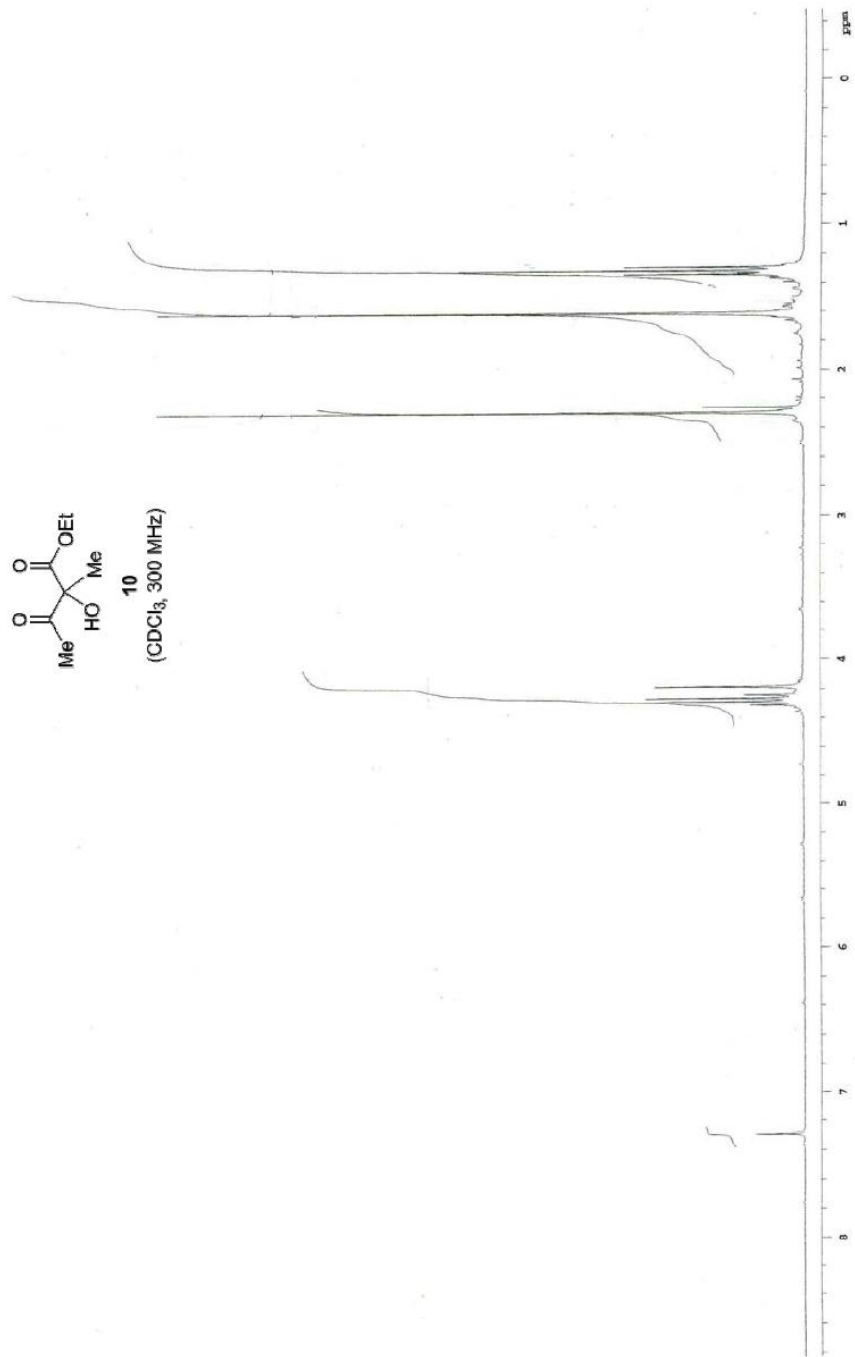
References and notes

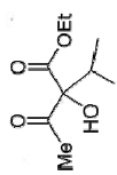
- (a) Sprenger, G. A.; Pohl, M. J. *Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *6*, 145–159; (b) Pohl, M.; Lingen, B.; Müller, M. *Chem.—Eur. J.* **2002**, *8*, 5288–5295.
- Enders, D.; Balensiefer, T. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 534–541.
- Giovannini, P. P.; Pedrini, P.; Venturi, V.; Fantin, G.; Medici, A. J. *Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *64*, 113–117.
- In a parallel investigation, Müller and co-workers demonstrated that α -hydroxy methyl ketones can be obtained by using a different ThDP-dependent enzyme catalyst and pyruvate as acetyl anion equivalent. Lehwald, P.; Richter, M.; Röhr, C.; Liu, H.-W.; Müller, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 2389–2392.
- Kluger, R.; Tittmann, K. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1797–1833.
- Pioneering observations by Mizuhara and Handler established that the thiamine-promoted reaction of biacetyl and acetaldehyde involved scission of the biacetyl into two moieties to form acetoin and acetate. Mizuhara, S.; Handler, P. J. *Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 571–573.
- For recent reviews, see: (a) Moore, J. L.; Rovis, T. *Top. Curr. Chem.* **2010**, *291*, 77–144; (b) Enders, D. J. *Org. Chem.* **2008**, *73*, 7857–7870; (c) Rovis, T. *Chem. Lett.* **2008**, *37*, 2–7; (d) Enders, D.; Niemeier, O.; Henseler, A. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5606–5655.
- For representative examples, see: (a) Enders, D.; Niemeier, O.; Balensiefer, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1463–1467; (b) Takikawa, H.; Hachisu, Y.; Bode, J. W.; Suzuki, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 3492–3494; (c) Enders, D.; Niemeier, O.; Raabe, G. *Synlett* **2006**, 2431–2434; (d) Li, Y.; Feng, Z.; You, S.-L. *Chem. Commun.* **2008**, 2263–2265.
- Enders, D.; Henseler, A. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1749–1752.
- For a recent study on highly chemoselective crossed condensations between aliphatic and *ortho*-substituted aromatic aldehydes, see: O'Toole, S. E.; Rose, C. A.; Gundala, S.; Zeitler, K.; Connon, S. J. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 347–357.
- (a) Sheehan, J. C.; Hunneman, D. H. J. *Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3666–3667; (b) For a recent review, see: Nemeria, N. S.; Chakraborty, S.; Balakrishnan, A.; Jordan, F. *FEBS J.* **2009**, *276*, 2432–2446.
- (a) Rubin, M. B.; Inbar, S. J. *Org. Chem.* **1988**, *53*, 3355–3558; (b) Rubin, M. B.; Inbar, S. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 5021–5024.
- Chen, J.; Spear, S. K.; Huddleston, J. G.; Rogers, R. D. *Green Chem.* **2005**, *7*, 64–82.

14. Formation of the Breslow intermediate **III** may also be explained by release from **II** of a putative ketene, which in turn is entrapped by the PEG solvent. A similar mechanism was proposed by Mizuhara and Handler for the thiamine-promoted reaction of biacetyl **1a** with acetaldehyde, though no evidence of ketene expulsion was provided (see Ref. 6).
15. The extractability with Et₂O of acylated PEG byproducts (PEG-OAc, Schemes 1 and 2; PEG-OBz, Scheme 2) results in a partial loss of PEG solvent after each run, thus limiting its reuse in repeated experiments.
16. For a detailed study on the 1,2-proton shift involved in this type of intermediate species, see: Gronert, S. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3065–3068.
17. For a previous study on the preferential reduction of the benzoyl group of **1f**, see: Toukonitty, E.; Franceschini, S.; Vaccari, A.; Murzin, D.-Y. *Appl. Catal., A* **2006**, *300*, 147–154 and references therein.
18. The mechanism of Scheme 2 is reminiscent of the reaction pathway proposed by Scheidt and co-workers for NHC-catalyzed hydroacylation of activated ketones: (a) Chan, A.; Scheidt, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4558–4559; (b) Phillips, E. P.; Chan, A.; Scheidt, K. A. *Aldrichimica Acta* **2009**, *42*, 55–66; Other possible mechanisms of forming **5f** are: (i) release of benzaldehyde from intermediate **VI** followed by attack of this by an acetyl anion equivalent, or (ii) formation of a product of type **3** or **4** followed by a retro-aldol reaction to lose the extra acyl group. In order to gain a more detailed view of the reaction mechanism, devoted studies are currently underway in our laboratories.
19. (a) Christoffers, J.; Kauf, T.; Werner, T.; Rössle, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2601–2608; (b) Ramirez, F.; Bhatia, S. B.; Bigler, A. J.; Smith, C. P. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 1192–1196.
20. Clausen, C.; Weidner, L.; Butenschön, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 3799–3806.
21. Naef, R.; Jaquier, A. *PCT Int. Appl.* 2006, WO 2006092749 A1 20060908.
22. Zhang, W.; Shi, M. *Chem. Commun.* **2006**, 1218–1220.
23. Baucherel, X.; Levoirier, E.; Uziel, J.; Juge, S. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1385–1387.
24. Christoffers, J.; Werner, T.; Unger, S.; Frey, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 425–431.

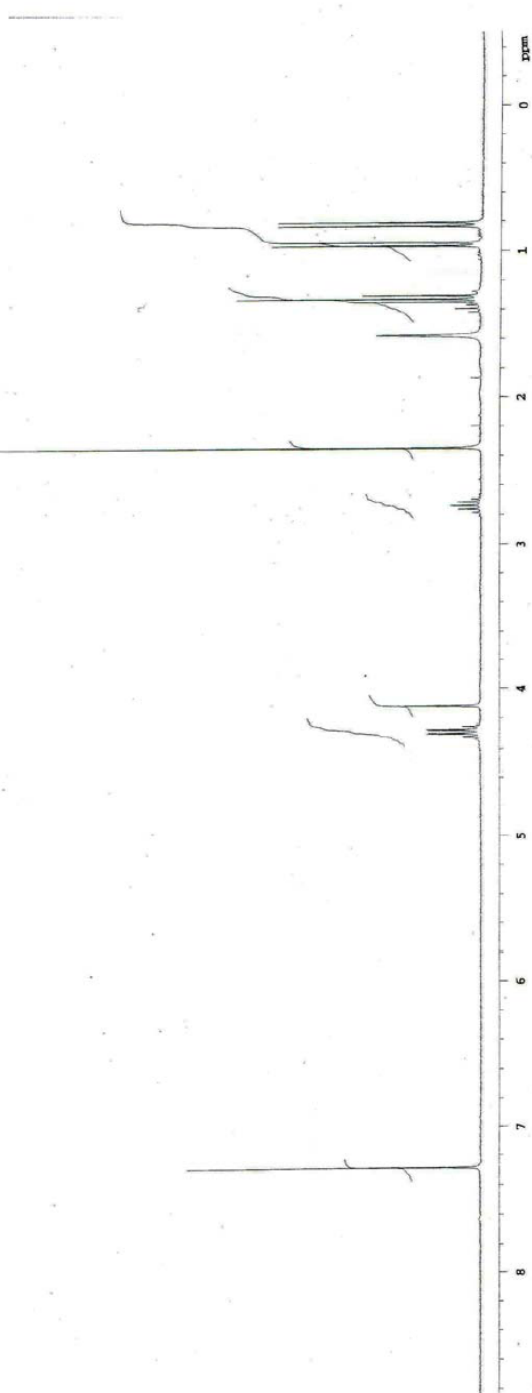
B)

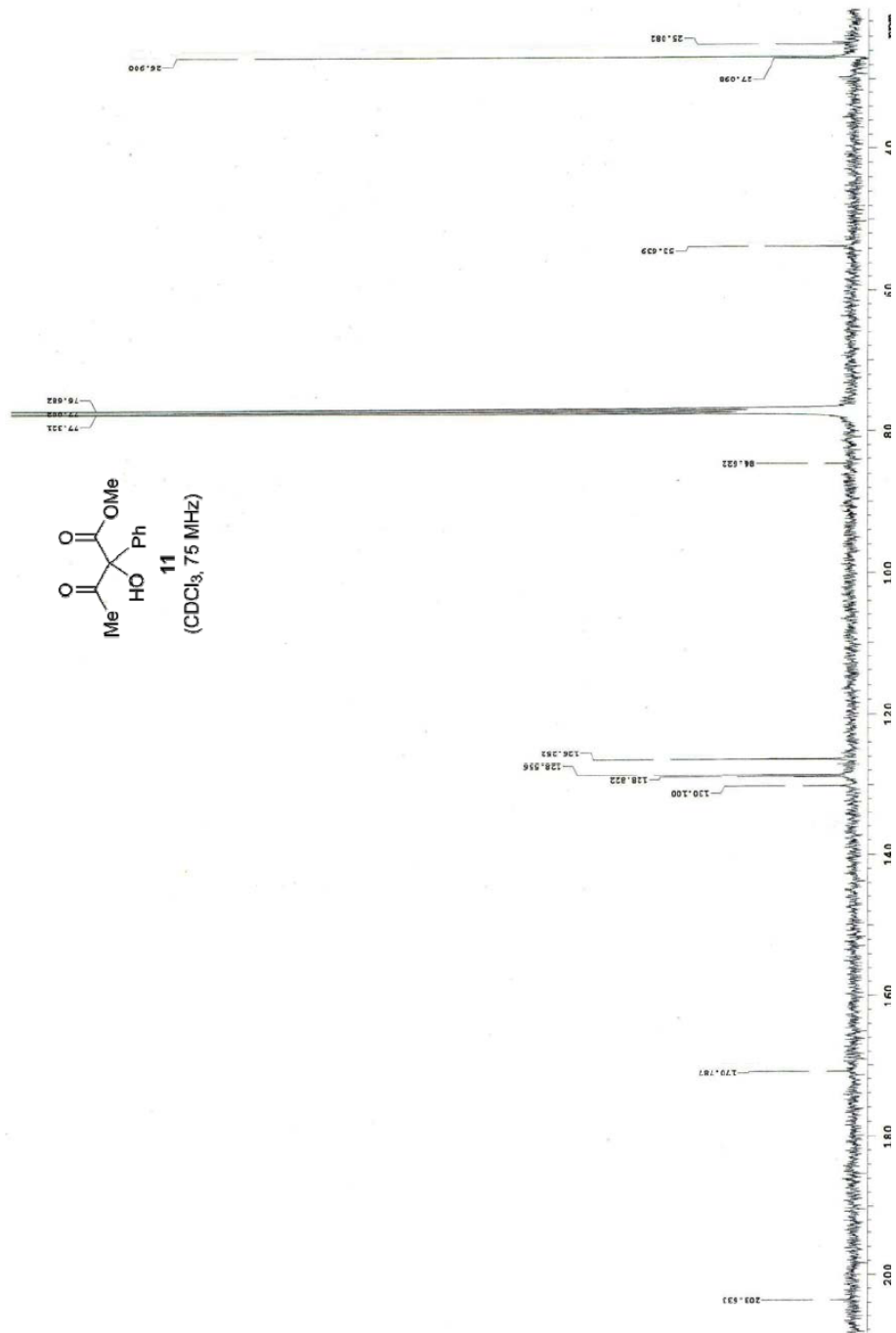


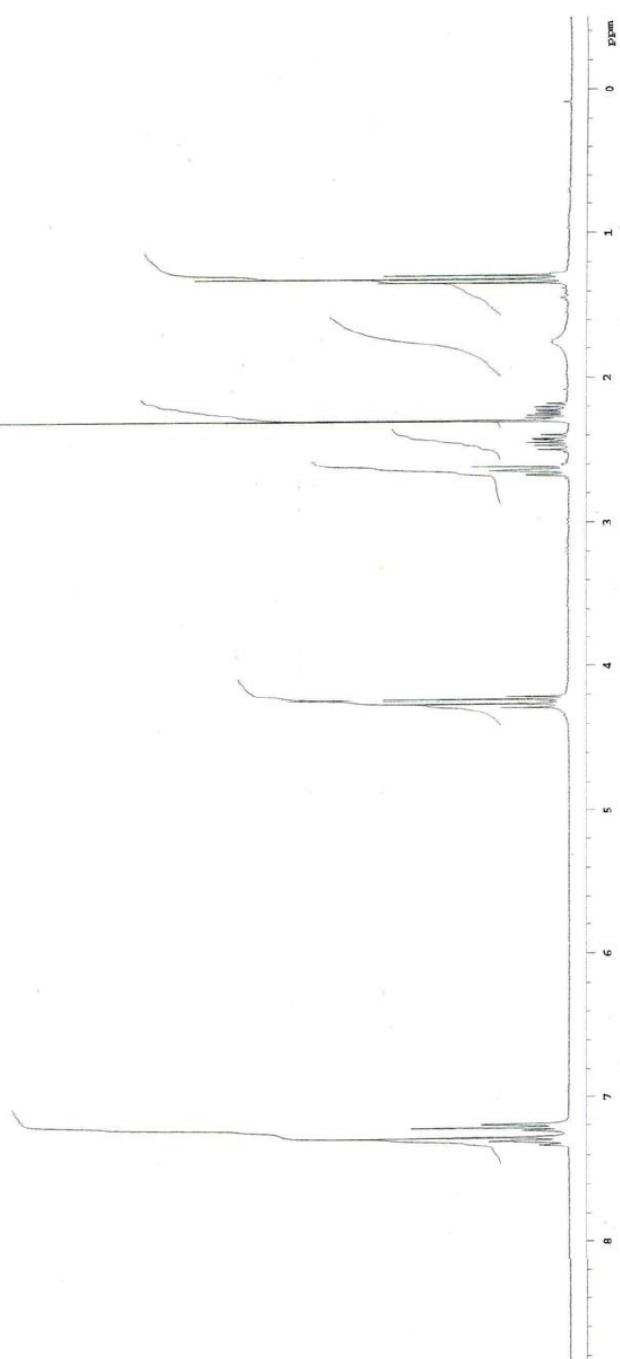
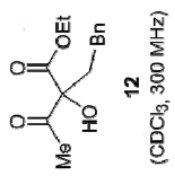




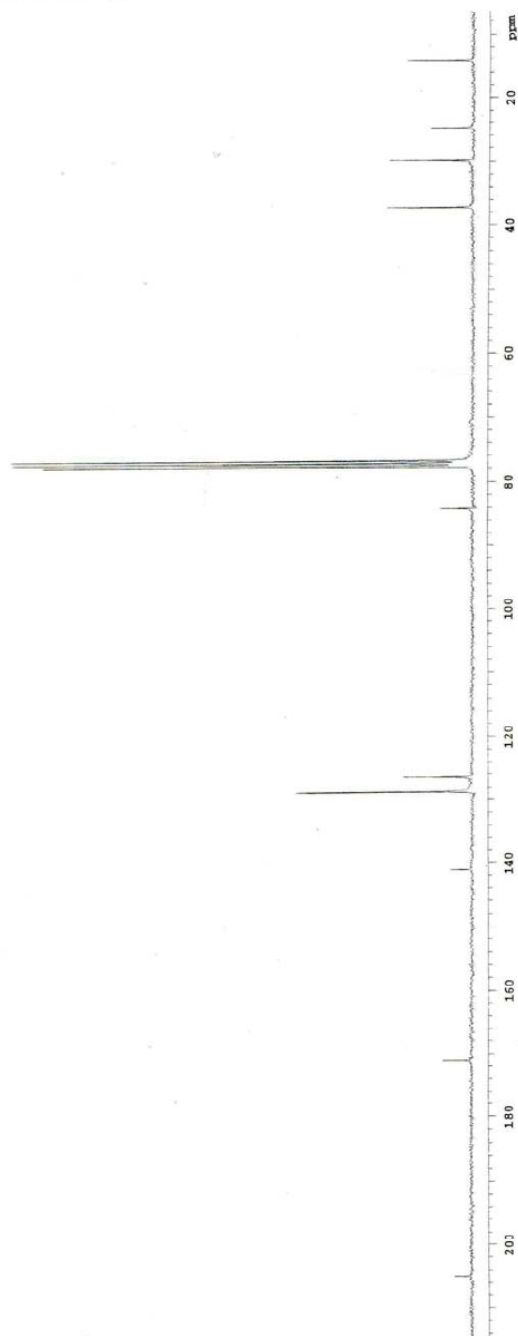
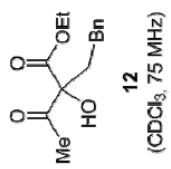
13
(CDCl₃, 300 MHz)







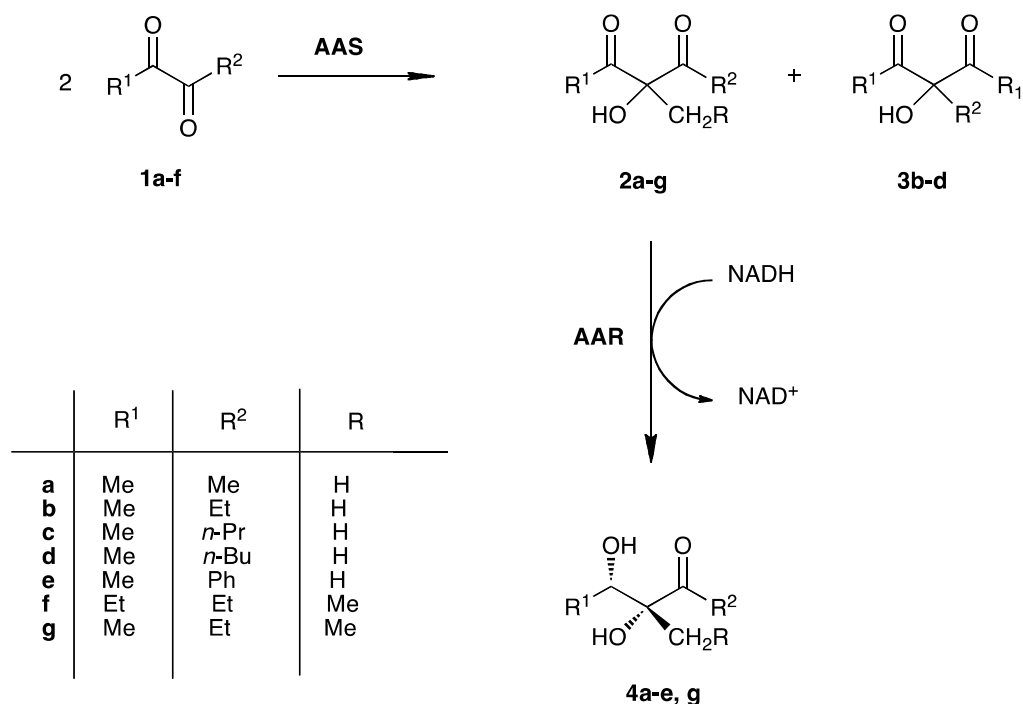
S15



S16

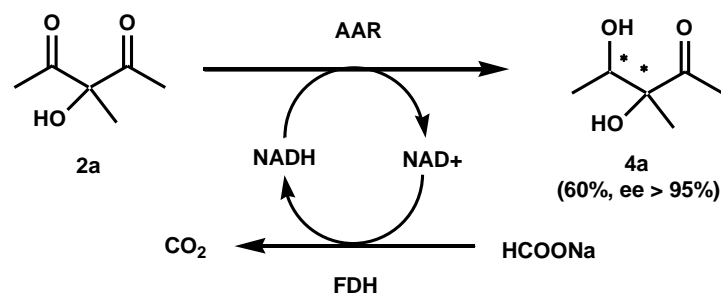
**RIDUZIONI STEREOSELETTIVE
DI α -IDROSSI-1,3-DICHETONI**

Il lavoro che qui è descritto rappresenta l'immediato sviluppo dello studio relativo alla sintesi di alcoli terziari catalizzata da acetilacetoino sintasi (AAS) da *B. licheniformis* [40], discusso nel capitolo 3, e lo completa con la determinazione della stereochimica assoluta dei composti ottenuti. Gli α -alchil- α -idrossi- β -dichetoni **2a-g** (resa 30-45%) e i relativi regioisomeri **3b-d**, ottenuti dalle reazioni di homo e cross-coupling, catalizzate da acetilacetoino sintasi, (AAS) tra α -dichetoni **1a-f**, sono stati caratterizzati nel lavoro precedente (**Schema 1**). L'attribuzione della stereochimica del carbonio quaternario chirale dei composti **2b-e** e **2g**, ottenuti con buoni eccessi enantiomerici (ee 67-91%), è stata determinata mediante la riduzione enzimatica regio- ed enantioselettiva con acetilacetoino reductasi da *B. licheniformis* (AAR), enzima (*S*)-stereospecifico, che ha portato agli α,β -diidrossichetoni **4a-e** e **4g** con rese elevate (60-70%) e ottimi eccessi enantiomerici (> 95%) (**Schema 1**).



Schema 1. Applicazione sintetica di AAS e AAR da *B. licheniformis*

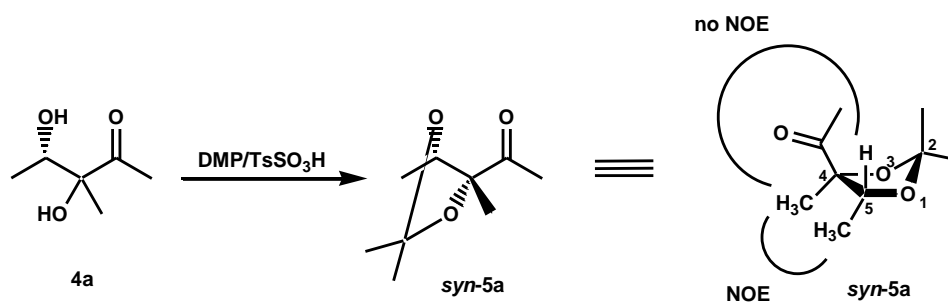
Acetilacetoino riduttasi (AAR), purificata e caratterizzata dal mio gruppo di ricerca [34], appartiene al medesimo “ciclo del butandiolo” di *B. licheniformis* di cui fa parte anche acetilacetoino sintasi (AAS). Questa riduttasi, già utilizzata per scopi biocatalitici in riduzioni di dichetoni variamente sostituiti nei corrispondenti (*S,S*)-dioli [35], era stata identificata con il nome di *B. stearothermophilus* diacetil riduttasi (BSDR). Assodata la nuova recente identificazione di *B. stearothermophilus* come *B. licheniformis* (Cap. 2), BSDR è stata chiamata AAR. La riduzione regio- ed enantioselettiva degli α -idrossi- β -dichetoni **2a-g** catalizzata da acetilacetoino riduttasi (AAR) ha permesso di sintetizzare e caratterizzare una nuova categoria di dioli **4a-e** e **4g**, la cui struttura ritroviamo in diversi composti naturali (anelli macrolidici, citreodiolo e citreoviridina) [62] ed in precursori per la sintesi di tetraidrofurani polisostituiti [63]. L’aspetto cruciale, comunque, di questo lavoro è stato quello legato all’attribuzione della stereochimica dei dioli **4a-e** e **4g** (Schema 1) e di conseguenza anche del centro chirale dei composti **2a-g**, originatosi dalla reazione catalizzata da AAS. Il primo stadio è stata la determinazione della configurazione relativa e per fare questo si è concentrata l’attenzione sulla riduzione del dichetone **2a** che porta stereoselettivamente al diolo **4a** (Schema 2).



Schema 2. Riduzione di acetilacetoino **2a** catalizzata da AAR

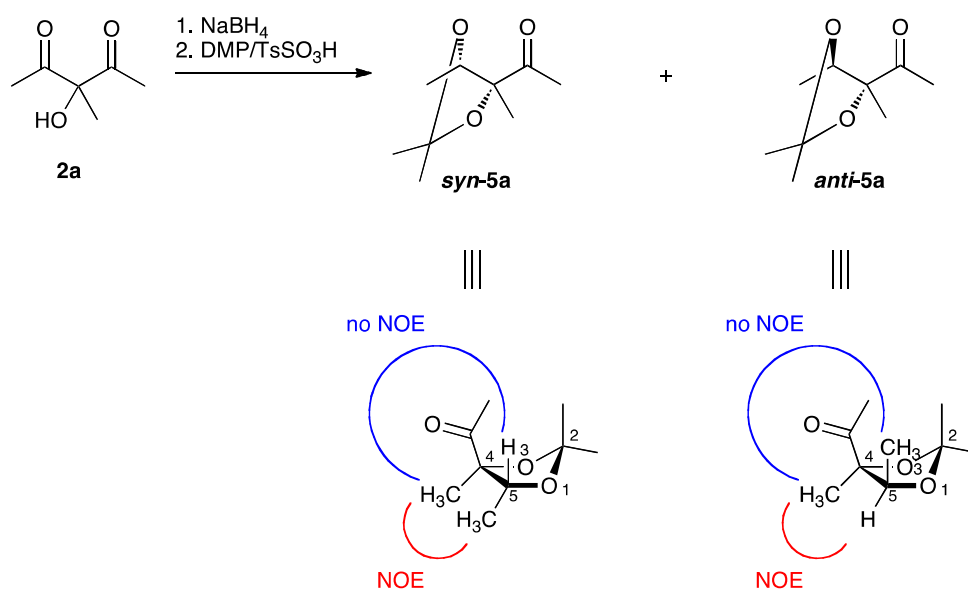
La reazione di riduzione di **2a**, catalizzata da AAR con l’estratto cellulare di *B. licheniformis* non purificato, è stata condotta in tampone fosfato in presenza di sodio formiato (5 equiv.) e formiato deidrogenasi (FDH) per il riciclo del

cofattore NADH. Dopo 3h, è stato possibile isolare un unico prodotto, il 3-metil-3,4-didrossi-2-pentanone **4a** (Schema 2), con una resa del 60%. Analisi ^1H NMR e GC-MS hanno confermato trattarsi di un unico diastereoisomero. Da lavori precedenti [34][35], AAR è risultato un enzima (*S*)-stereospecifico e quindi il carbonile che viene ridotto ha presumibilmente stereochimica *S*. Per determinare se il carbonio quaternario in α al carbonile fosse in posizione *syn* o *anti* rispetto al nuovo centro chirale formatosi, **4a** è stato trasformato nel derivato diossolanico **5a** e su questo sono stato condotti gli esperimenti NOE (Schema 3).



Schema 3. Esperimento NOE sul derivato diossolanico **5a**

L'esperimento NOE sul derivato diossolanico **5a** ha permesso di stabilire che il composto **4a** ottenuto dalla riduzione catalizzata da AAR è in configurazione *syn*: un effetto NOE, infatti, è misurabile tra i metili C₄ e C₅, in *cis* rispetto all'anello diossolanico, mentre nessun segnale è osservato tra il protone legato al C₅ e il metile legato a C₄. Per confermare l'effettiva configurazione *syn* del diastereoisomero **4a** sono stati eseguiti degli esperimenti ulteriori di confronto sui derivati diossolanici ottenuti, questa volta, per riduzione chimica del composto **2a** (Schema 4).



Schema 4 . Esperimenti NOE sulle coppie di diastereoisomeri *syn*- ed *anti*-5a ottenuti per riduzione con NaBH₄

L'acetilacetoino **2a** è stato ridotto chimicamente con difetto di NaBH₄; i dioli ottenuti sono stati poi derivatizzati nei corrispondenti diossolani. Dalla reazione di riduzione chimica aspecifica è possibile ottenere tutte e quattro le possibili coppie di diastereoisomeri *syn* ed *anti*-5a che mostrano set di segnali distinti all'analisi ¹H NMR. Conducendo esperimenti NOE sulle coppie di diastereoisomeri è stato possibile confermare i risultati precedentemente ottenuti sul prodotto derivato dalla sintesi con AAR (**Schema 3**). Il diastereoisomero *anti*-5a mostra effetto NOE tra il protone legato al C₅ e il metile al C₄, ma nessun segnale tra i metili al C₄ e al C₅, mentre il *syn* mostra effetti NOE opposti. In conclusione, con questo secondo esperimento NOE è stato possibile affermare con certezza che il diastereoisomero **4a** ottenuto dalla riduzione con AAR di **2a** (**Schema 2**) è in configurazione *syn* (**Figura 1**).

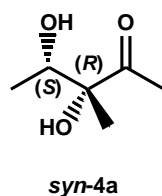
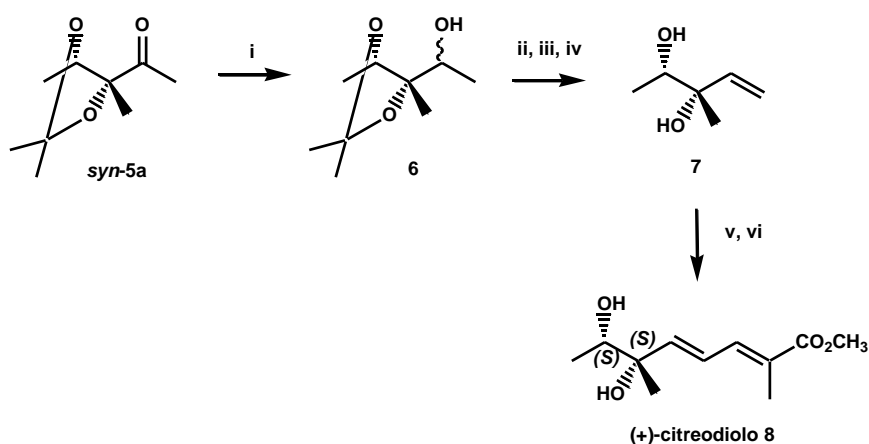


Figura 1. Diastereoisomero *syn-4a* ottenuto dalla riduzione stereoselettiva con AAR

Dati questi risultati e dall'ipotesi che la riduzione con AAR sia (*S*)-stereospecifica, la configurazione relativa del diolo **4a** dovrebbe essere 3(*R*), 4(*S*). Questa ipotesi è stata confermata trasformando il derivato diossolanico *syn-5a* nell'antipode di un prodotto naturale, il (+)-citrediololo (**Schema 5**), di cui è nota in letteratura la configurazione assoluta dei centri chirali [64].



Schema 5. Sintesi del (+)-citrediololo da *syn-5a*

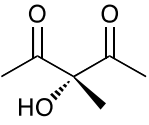
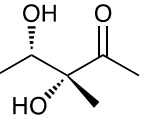
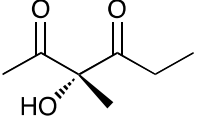
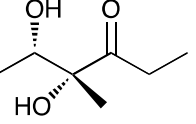
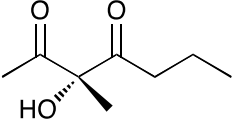
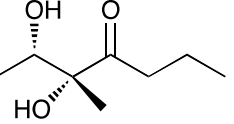
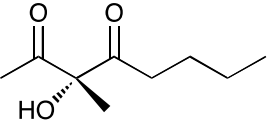
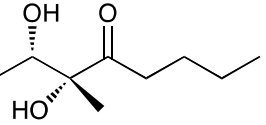
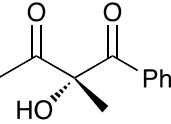
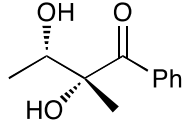
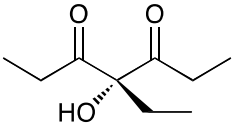
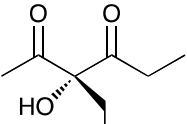
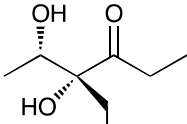
Inizialmente, il derivato *syn-5a* è stato ridotto con sodio boroidruro (**i**) per ottenere l'alcol **6** (resa del 65%); successivamente il composto **6** è stato convertito nell'allil diolo **7** (40%) in un procedimento one-pot che prevede l'attivazione dell'alcol **6** con anidride triflica (Tf_2O) (**ii**) e la sua eliminazione con formazione del doppio legame, con l'aggiunta di 1,8-diazabicyclo[5.4.0] undec-7-ene (DBU) (**iii**) e acido *p*-toluen solfonico (*p*-TsOH) (**iv**). Anche i due passaggi successivi che

portano dall'olefina **7** al citreodiolo **8** (67%) sono stati condotti one-pot: cross-metatesi (**v**) di **7** con acroleina, promossa da un catalizzatore Hoveyda-Grubbs di seconda generazione, seguita dall'olefinazione di Wittig (**vi**) con un'ilide di fosfonio precedentemente sintetizzata [**65**]. Attraverso i passaggi descritti è stato possibile ottenere il (+)-citreodiolo, antipode del prodotto naturale, descritto in letteratura e di cui è riportata la configurazione assoluta sulla base della descrizione degli spettri NMR e del potere rotatorio ($[\alpha]_D$) [**64**]. Confrontando la caratterizzazione del prodotto naturale con i dati spettrali e gli esperimenti NOE condotti sul derivato **5a** è stato possibile confermare la sua configurazione *syn* ed assegnare la configurazione assoluta 3(*R*) e 4(*S*) ai due centri chirali del composto **4a** (**Figura 1**).

Sulla base dei soddisfacenti risultati ottenuti, si è pensato di estendere le riduzioni regio ed enantioselettive con AAR a tutta la gamma di α -idrossi- β -dichetoni **2b-g** (**Schema 1**), ottenuti dalle reazioni di homo e cross-coupling catalizzate da AAS (Cap.3). A causa della difficoltà separativa in fase di purificazione, i composti **2b-d** e **3b-d** (**Schema 1**) sono stati utilizzati in miscela nella reazione di riduzione con AAR. Gli α,β -diidrossichetoni ottenuti dalle riduzioni catalizzate da AAR sono riportati nella **Tabella 1**.

I prodotti **4b-e** e **4g** sono stati ottenuti con rese soddisfacenti (61-70%) ed eccellenti eccessi diastereomerici ed enantiomerici (de > 95%; ee > 95%). È interessante notare che i dichetoni prochirali **3b-d** (**Schema 1**) non sono substrati per AAR; di conseguenza, la riduzione enzimatica è un valido metodo per la risoluzione cinetica delle miscele di regioisomeri **2b-d** e **3b-d** (**Schema 1**) e può sostituirsi alla separazione per cromatografia flash, data l'intrinseca instabilità dei dichetoni **2a-e** e **2g** e **3b-d** (**Schema 1**) a contatto con la silice [**61a**]. Inoltre, alcuni aspetti peculiari dell'attività catalitica di AAR in relazione alla sua tollerabilità di substrato possono essere dedotti da alcuni risultati sperimentali (**Tabella 1**).

Tabella 1. Reazioni di riduzione catalizzate da AAR dei composti **2a-g**

α -idrossi-1,3-dichetone (ee%) ^a	tempo (h)	α,β -diidrossichetone resa % ^b (ee %) ^a
 2a	3	 4a 60 (> 95)
 2b (70)	3	 4b 61 ^c (> 95)
 2c (67)	4	 4c 65 ^c (> 95)
 2d (72)	4	 4d 70 ^c (> 95)
 2e (76)	5	 4e 63 (>95)
 2f	12	nessuna reazione
 2g (91)	12	 4g 63 (>95)

^a Determinate da analisi GC chirale (vedi parte sperimentale). ^b Rese isolate. ^c Rese isolate basate su α -idrossi-1,3-dichetone **2**.

Il composto **2f** ad esempio non viene ridotto dall'enzima nemmeno prolungando i tempi di reazione; il composto **2e** e **2g** vengono invece convertiti negli α,β -diidrossichetoni corrispondenti ma in tempi lunghi rispetto agli altri substrati (5 h e 12 h invece di 3 h). Si può quindi affermare che la catalisi di AAR sia inibita in

presenza di substrati con gruppi più ingombranti di un metile legati al C quaternario. Osservando infine i prodotti di riduzione **4a-e** e **4g** ed i loro eccessi enantiomerici si può affermare che AAR è altamente regiospecifica per la riduzione del carbonile meno stericamente impedito (MeCO⁻) dei substrati **2b-e** e **2g** ed enantioselettiva per l'enantiomero maggioritario (*R*) degli α,β -diidrossichetoni. L'enantiomero minoritario (*S*), infatti, dei composti **2b-e**, **2g** può essere isolato inalterato dalla reazione di riduzione, come mostrano le analisi gas cromatografiche su colonna chirale.

Come per il diolo **4a** la configurazione relativa degli α,β -diidrossichetoni **4b-e** e **4g** è stata determinata attraverso esperimenti NOE sui derivati diossolanici **5b-e** e **5g** (Figura 2).

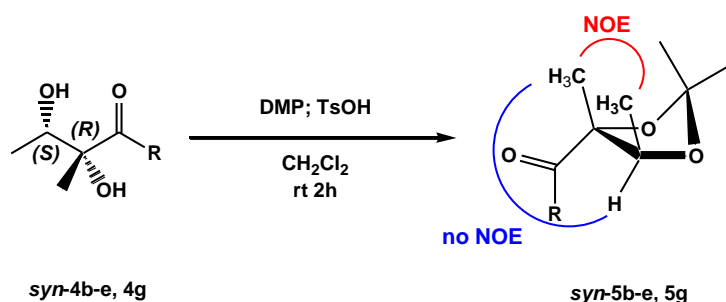


Figura 2. Esperimenti NOE sui derivati diossolanici *syn-5b-e* e *syn-5g*

In accordo a quanto dimostrato per il derivato **5a** (Fig. 1), la configurazione assoluta di **4b-e** e **4g** è stata assegnata assumendo che AAR trasferisca l'idruro sul gruppo acetilico di **2b-e** e **2g** sulla faccia *Re*, originando un (*S*)-metilcarbinolo, come evidenziato nella riduzione di **2a** e nelle pregresse applicazioni sintetiche di questo enzima [34][35]. Per analogia, quindi, anche in questo caso la configurazione la configurazione del C quaternario chirale sarà (*R*). In conclusione questo lavoro ha mostrato la capacità di AAR da *B. licheniformis* di sintetizzare diastereo- ed enantioselettivamente α,β -diidrossichetoni enantiopuri. La purezza ottica dei composti ottenuti è legata all'alta regioselettività di AAR nella riduzione e all'alta stereospecificità verso la configurazione (*R*) del C quaternario del substrato. Da questo risultato si è potuto attribuire la

configurazione assoluta degli α -idrossi- β -dichetoni di partenza ottenuti dalla sintesi enzimatica con AAS da *B. licheniformis* (Cap. 3). La descrizione della stereochimica è riportata in **Tabella 2**.

Tabella 2. Configurazione assoluta e potere ottico dei composti **4**, **5** e **2**.

composto	nome	ee %	$[\alpha_D]$
4a	3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> -diidrossi-3-metil-2-pentanone	> 95	- 10.7
5a	4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> -1-(2,2,4,5-tetrametil-1,3-diossolan-4-il)- etanone	> 95	+ 46.9
4b	4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> -diidrossi-3-metil-2-esanone	> 95	- 8.6
5b	4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> -1-(2,2,4,5-tetrametil-1,3-diossolan-4-il)- propanone	> 95	+ 5.2
4c	2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> -diidrossi-3-metil-4-eptanone	> 95	- 10.0
5c	4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> -1-(2,2,4,5-tetrametil-1,3-diossolan-4-il)- butanone	> 95	+ 46.5
4d	2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> -diidrossi-3-metil-4-ottanone	> 95	- 8.2
5d	4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> -1-(2,2,4,5-tetrametil-1,3-diossolan-4-il)- pentanone	> 95	+ 46.4
4e	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> -diidrossi-2-metil-1-fenil-1-butanone	> 95	+ 8
5e	4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> -1-(2,2,4,5-tetrametil-1,3-diossolan-4-il)- benzofenone	> 95	+ 8.1
4g	4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> -diidrossi-4-etil-3-esanone	> 95	+ 6.6
5g	4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> -1-(4-etil-2,2,5-trimetil-1,3-diossolan-4-il)- propanone	> 95	+ 51.9
2b	3 <i>R</i> -idrossi-3-metil-2,4-esandione	70	+ 15 ^a
2c	3 <i>R</i> -idrossi-3-metil-2,4-eptandione	67	+ 3 ^a
2d	3 <i>R</i> -idrossi-3-metil-2,4-ottandione	72	+ 7.3
2e	2 <i>R</i> -idrossi-2-metil-1-fenil-1,3-butandione	76	+ 13 ^a
2g	3 <i>R</i> -idrossi-3-etil-1,3-esandione	91	+ 49.8 ^a

^a I poteri ottici sono quelli riportati nel lavoro allegato al capitolo 3

Per la caratterizzazione dei prodotti, la descrizione della procedura sperimentale e il dettaglio dei materiali e metodi utilizzati viene riportato l'articolo allegato (allegato **A**), gli spettri ¹H NMR, NOE, GC ed MS dei nuovi α,β -diidrossichetoni sintetizzati e completamente caratterizzati (allegato **B**).

Enzymatic diastereo- and enantioselective synthesis of α -alkyl- α,β -dihydroxyketones†Pier Paolo Giovannini,^a Giancarlo Fantin,^a Alessandro Massi,^a Valentina Venturi^b and Paola Pedrini^b

Received 9th June 2011, Accepted 22nd August 2011

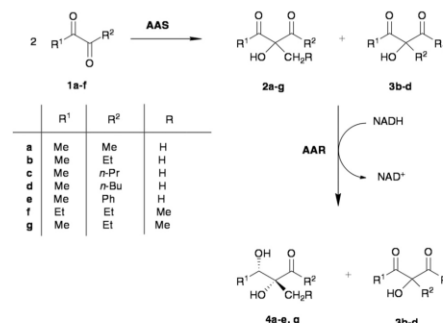
DOI: 10.1039/c1ob05928a

An enzymatic strategy for the preparation of optically pure α -alkyl- α,β -dihydroxyketones is reported. Homo- and cross-coupling reactions of α -diketones catalyzed by acetylacetoin synthase (AAS) produce a set of α -alkyl- α -hydroxy- β -diketones (30–60%, ee 67–90%), which in turn are reduced regio-, diastereo-, and enantioselectively to the corresponding chiral α -alkyl- α,β -dihydroxyketones (60–70%, ee >95%) using acetylacetoin reductase (AAR) as catalyst. Both enzymes are obtained from *Bacillus licheniformis* and used in a crude form. The relative *syn* stereochemistry of the enantiopure α,β -dihydroxy products is assigned by NOE experiments, whereas their absolute configuration is determined by conversion of the selected 3,4-dihydroxy-3-methyl-pentan-2-one to the natural product (+)-citrediol.

Introduction

Enantiopure tertiary alcohols are very valuable building blocks for the synthesis of many different natural products and pharmaceuticals. As a consequence, many efforts have been devoted to the development of chemical¹ and enzymatic² strategies towards these valuable structures. Various biocatalysts, such as epoxide hydrolases,³ halohydrin dehalogenases,⁴ hydroxynitrile lyases,⁵ lipases, and esterases⁶ have been widely used to this purpose. Surprisingly, the use of thiamine diphosphate (ThDP)-dependent enzymes in this field appears to be scanty. In 2010 Müller and co-workers described the utilization of YerE, a recombinant ThDP-dependent flavoenzyme, for umpolung couplings of pyruvate with different ketone acceptors to give enantioenriched tertiary alcohols.⁷ In the same year, we reported a parallel study in which we demonstrated that α -diketones may serve as acyl anion equivalents when ThDP-dependent acetylacetoin synthase (AAS) from *Bacillus licheniformis*⁸ is used as catalyst in the homo- and cross-couplings of α -diketones **1** (Scheme 1).

By the disclosed carbonylation reaction, which is virtually an intermolecular aldehyde–ketone coupling, we were able to prepare a set of chiral α -alkyl- α -hydroxy- β -diketones **2** (30–45%) with good enantioselectivity (ee 67–91%) together with the regioisomeric prochiral derivatives **3**[†] (Scheme 1). Tertiary alcohols **2** and **3** are promising building blocks for asymmetric synthesis because they display a structure with two additional carbonyl groups which

Scheme 1 Synthesis of the *syn*- α -alkyl- α,β -dihydroxyketones **4a–e,g**.

can be selectively elaborated. In this regard, the enantio- and stereoselective reduction of α -hydroxy- β -diketones **2** towards α,β -dihydroxyketones **4** is an opportunity (Scheme 1).

On the other hand, enantiopure diols of type **4** have already proven to be valuable precursors for the synthesis of chiral polysubstituted tetrahydrofurans⁹ and natural products.¹¹ Indeed, various dehydrogenases have been successfully employed for the asymmetric reduction of β -diketones,¹² but only few of them showed activity toward α -disubstituted substrates.¹³














Herein we report the highly regio-, diastereo-, and enantioselective reduction of α -hydroxy- β -diketones **2**, obtained by the previously described AAS-based strategy, to *syn*- α -alkyl- α,β -dihydroxyketones **4** using *B. licheniformis* acetylacetoin reductase (AAR) as catalyst.¹⁴ A crucial issue, in the present work, is the stereochemical assignment of the resulting α,β -dihydroxyketones **4** that we addressed by means of NOE experiments and by

^aDipartimento di Chimica, Università di Ferrara, Via L. Borsari 46, I-44121 Ferrara, Italy. E-mail: gvnpp@unife.it; Fax: +39 0532 240709; Tel: +39 0532 455173

^bDipartimento di Biologia ed Evoluzione, Università di Ferrara, C.so Ercole I d'Este 32, I-44121 Ferrara, Italy

† Electronic supplementary information (ESI) available: copies of ¹H and ¹³C NMR spectra. See DOI: 10.1039/c1ob05928a

Table 1 AAR-mediated reduction of compounds **2a–g**

Entry	α -Hydroxy- β -diketone (ee%)*	Time (h)	α,β -Dihydroxyketone yield% ^b (ee%)*
1	 2a	3	 4a 60 (>95)
2	 2b (70)	3	 4b 61 ^c (>95)
3	 2c (67)	4	 4c 65 ^c (>95)
4	 2d (72)	4	 4d 70 ^c (>95)
5	 2e (76)	5	 4e 63 (>95)
6	 2f	12	—
7	 2g (91)	12	 4g 63 (>95)

* Determined by chiral GC-analysis (see experimental section). ^b Isolated yield. ^c Isolated yield based on α -hydroxy- β -diketone **2**.

the stereoconservative conversion of a selected product into the natural compound (+)-citreodiol.

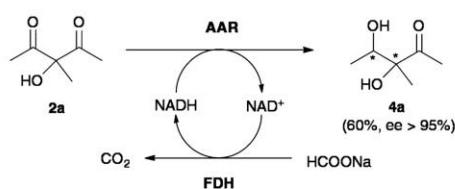
Results and discussion

We recently synthesised a number of α -alkyl- α -hydroxy- β -diketones **2** and **3** by coupling reactions of α -diketones **1** using acetylacetoinsynthase from *Bacillus licheniformis* (Scheme 1 and Table 1 for complete structures).⁹ More precisely, compounds **2a–f** were obtained by homo-couplings of the corresponding diketones **1a–f**, while **2g** was prepared by cross-coupling of **1a** as donor and diketone **1f** as acceptor. In the case of unsymmetrically substituted diketones **1b–d**, the formation of chiral β -diketones **2b–d** was accompanied by the generation of variable amounts (24–45%) of the regioisomeric prochiral derivatives **3b–d**.¹⁵

With diketones **2** and **3** in hand, we could begin our investigation on their asymmetric reduction to acyl diols through selective reduction of one carbonyl group. A previous explorative mechanistic

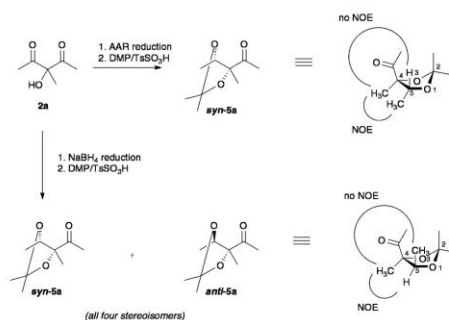
study showed the capability of bacterial AAR to promote the selective reduction of acetylacetoinsynthase **2a** to acetylbutanediol **4a** on an analytical scale.¹⁶ This evidence prompted us to optimize a preparative procedure for the same transformation and investigate AAR activity on all diketones **2** and **3**. Accordingly, *B. licheniformis* was grown on high sucrose concentration broth to induce a high expression level of AAR,¹⁷ thus allowing the use of the cell free extract in its crude form. The enzymatic reduction of **2a** was carried out in phosphate buffer at pH 6.5 in the presence of sodium formate (5 equiv.) and formate dehydrogenase (FDH) for NADH recycling (Scheme 2).

After 3 h shaking, 3-methyl-3,4-dihydroxy-2-pentanone (acetylbutanediol) **4a** was recovered in 60% yield as a single diastereoisomer and high enantiomeric purity (ee >95%), as detected by ¹H NMR and chiral GC analyses. It is worth noting that the use of excess sodium formate for reaction rate acceleration was possible due to the complete inactivity of AAR on **4a**. Enzyme selectivity was further confirmed by extending



Scheme 2 Acetylacetoin reductase (AAR)-based reduction of acetylacetoin **2a**.

the reaction time and/or adding excess of enzyme. The relative stereochemistry of compound **4a** was next investigated by NOE experiments performed on the isopropylidene derivative **5a**, which was obtained by treating **4a** with dimethoxypropane (DMP) under acidic conditions (Scheme 3).

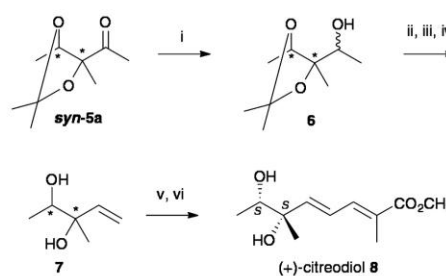


Scheme 3 Synthesis of *syn*- and *anti*-**5a** and NOE signals.

These measurements showed the presence of a signal between the C_4 - and C_5 -methyl groups whereas no NOE was observed between the C_5 -hydrogen and C_4 -methyl group directly bound to the dioxolane ring. These results were in accordance with a *syn* stereochemistry that was unequivocally confirmed by performing the same NOE measurements on the diastereomeric *anti*-**5a**. The mixture of *syn*- and *anti*-**5a** was readily prepared by reduction of **2a** with NaBH_4 and treatment of the resulting diols with DMP (Scheme 3).

As expected, opposite results were detected in the NOE measurements of *anti*-**5a**, namely the presence of a signal between C_5 -hydrogen and C_4 -methyl group and lack of signal between C_4 - and C_5 -methyl groups. On the other hand, an optimized chiral GC analysis of the *syn/anti*-**5a** mixture displays all the four stereoisomers, one of which corresponds in retention time to the one obtained from the enzymatic reaction. Overall, these results confirmed the essentially complete regio-, diastereo-, and enantioselectivity of the AAR-catalyzed reduction of **2a** ($de > 95\%$, $ee > 95\%$).

In order to assign the absolute configuration of the two chiral centres of **4a**, the isopropylidene derivative *syn*-**5a** was transformed to (+)-citreodiol **8**, the antipode of a metabolite of *Penicillium citreoviride* B (IFO 6200), which is related to the inhibitor of ATP-synthesis and ATP-hydrolysis citreoviridine¹¹ (Scheme 4).



Scheme 4 Synthesis of (+)-citreodiol **8**. Reagents and conditions: (i) NaBH_4 , Et_2O , MeOH ; (ii) Tf_2O , pyridine, CH_2Cl_2 ; (iii) DBU, CH_2Cl_2 ; (iv) *p*- TsOH , CH_2Cl_2 , MeOH ; (v) Hoveyda-Grubbs 2nd gen. catal., acrolein, CH_2Cl_2 , THF, reflux; (vi) $\text{H}_2\text{C}(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3)\text{COOCH}_3$, benzene, reflux.

The synthesis began with the reduction of *syn*-**5a** with sodium borohydride to afford the corresponding alcohol **6** (85% yield). This compound was next converted to the allyl diol **7** in 40% yield via a three-step one-pot procedure. This involved the initial activation of **6** with triflic anhydride (Tf_2O), followed by elimination to the corresponding terminal alkene and isopropylidene removal promoted by 1,8-diazabicyclo[5.4.0] undec-7-ene (DBU) and *p*-toluenesulfonic acid (*p*- TsOH), respectively. The next two steps were run in a single flask as well. Hence, cross-metathesis of pure **7** with acrolein promoted by Hoveyda-Grubbs 2nd generation catalyst was followed by Wittig olefination with the 2-(triphenylphosphoranylidene)-2-propanoic acid methyl ester¹⁸ to give (+)-citreodiol **8** in 67% yield (two steps). The spectral data, and optical rotation of **8** ($[\alpha]_D = +6.8$, c 0.7; lit.¹⁹ $[\alpha]_D = +4.3$, c 1.0) were consistent with those reported for (+)-citreodiol, thus allowing us to confirm the *syn* stereochemistry of **4a** and establish the 3(*R*) and 4(*S*) absolute configurations of its chiral centers. Importantly, this stereochemical assignment is in agreement with the (*S*)-stereospecificity previously observed for AAR-catalyzed reductions.¹⁴

Encouraged by the excellent stereochemical outcome detected in the reduction of **2a**, we next examined the substrate scope of the proposed enzymatic reduction by applying the optimized procedure to the previously synthesized α -hydroxy- β -diketones **2** and **3**. The results of this investigation are summarized in Table 1.

Due to their difficult purification, chiral diketones **2b–d** were subjected to the AAR-catalyzed reduction together with the corresponding regioisomers **3b–d** (entries 2–4). In spite of this, α -methyl- α,β -dihydroxy-ketones **4b–d** were obtained in satisfactory yields (61–70%) and excellent diastereo- and enantiomeric excesses ($de > 95\%$; $ee > 95\%$). It is worth noting that prochiral diketones **3b–d** were unreactive under these conditions. However, this outcome can be exploited as a method for the kinetic resolution of **2/3** regioisomeric mixtures, though the recovery by chromatography of symmetric diketones **3b–d** was complicated by their intrinsic instability on silica.²⁰ The enzymatic reduction of pure diketone **2e** proceeded smoothly in 5 h furnishing the diol **4e** in a 63% yield with high stereoselectivity (entry 5). By contrast, no reduction product was obtained with symmetric diketone **2f** (entry 6). The optically pure α,β -dihydroxy-ketone **4g** was finally obtained in

Table 2 Absolute configuration and optical rotation of compounds **4**, **5** and **2**

Compound	ee (%)	$[\alpha]_D$	
4a	3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> -dihydroxy-3-methyl-2-pentanone	>95	-10.7
5a	4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> -1-(2,2,4,5-tetramethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-ethanone	>95	+46.9
4b	4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> -dihydroxy-3-methyl-2-hexanone	>95	-8.6
5b	4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> -1-(2,2,4,5-tetramethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-propanone	>95	+5.2
4c	2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> -dihydroxy-3-methyl-4-heptanone	>95	-10.0
5c	4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> -1-(2,2,4,5-tetramethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-butanone	>95	+46.5
4d	2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> -dihydroxy-3-methyl-4-octanone	>95	-8.2
5d	4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> -1-(2,2,4,5-tetramethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-pentanone	>95	+46.4
4e	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> -dihydroxy-2-methyl-1-phenyl-1-butanone	>95	+8
5e	4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> -1-(2,2,4,5-tetramethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-benzophenone	>95	+8.1
4g	4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> -dihydroxy-4-ethyl-3-hexanone	>95	+6.6
5g	4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> -1-(4-ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-propanone	>95	+51.9
2b	3 <i>R</i> -hydroxy-3-methyl-2,4-hexandione	70	+15 ^a
2c	3 <i>R</i> -hydroxy-3-methyl-2,4-heptanedione	67	+3 ^a
2d	3 <i>R</i> -hydroxy-3-methyl-2,4-octanedione	72	+7.3
2e	2 <i>R</i> -hydroxy-2-methyl-1-phenyl-1,3-butanedione	76	+13 ^a
2g	3 <i>R</i> -hydroxy-3-ethyl-1,3-hexandione	91	+49.8 ^a

^a The optical rotations are reported in ref. 15

good yield (72%) by the optimized procedure although with a longer reaction time (12 h; entry 7).

A common feature of the AAR-catalyzed reduction of chiral diketones **2b–e** and **2g** was the complete selectivity of the enzyme toward the corresponding major (*R*)-enantiomers. The minor (*S*)-enantiomers of **2b–e** and **2g** were, in fact, recovered unaltered in the crude mixtures after reduction as determined by chiral GC analysis. Moreover, on the basis of the above substrate study it can be pointed out that: (i) AAR exhibits complete specificity for the reduction of acetyl group in α -hydroxy- α -methyl- β -diketones **2**; (ii) the presence of substituents bulkier than a methyl group on the quaternary carbon of **2** inhibits the catalysis, as demonstrated by the unreactivity of **2f** and the lower reaction rate observed for **2g** reduction; (iii) as already mentioned, the enzyme exhibits a high selectivity with respect to the configuration of the α -quaternary carbon.

As previously described for **4a**, the relative *syn* stereochemistry of the reduction products **4b–e** and **4g** was confirmed by their conversion to the corresponding dioxolanes **5b–e** and **5g**. In all 1,3-dioxolanes, in fact, a NOE was observed between C₅-methyl group and R¹-hydrogens, while no NOE interaction was detected between C₅- and R¹-hydrogens. The absolute configuration of **4b–e** and **4g** was finally assigned by assuming that the AAR-mediated hydride attack on the acetyl group of **2b–e** and **2g** occurs at the *Re*-face furnishing a methylcarbinol moiety with (*S*)-configuration. As a consequence it is possible to deduce the (*R*) configuration of the α -quaternary chiral centre. The absolute configurations and the optical rotation of the newly synthesized chiral products are summarized in Table 2.

Conclusions

In summary, we have shown that the combined use of the two enzymes AAS and AAR, readily available from the same bacterium *B. licheniformis*, allows the preparation of enantiopure α -alkyl- α,β -dihydroxyketones starting from inexpensive and commercially available α -diketones. The high enantiopurity of the products is mainly due to the high stereospecificity of AAR either for the

conversion of acetyl groups to (*S*)-methyl carbinols or with respect to the (*R*)-configuration of the α -quaternary carbon. This last feature is particularly interesting as it is known that dehydrogenases' stereoselectivity for the α -stereocenter is often modest. Most of the enantiomerically pure ketodiol diols herein synthesized are new compounds and their complete characterization including their stereochemical assignment is duly reported. Finally, the present investigation has also allowed us to determine the absolute configuration of the chiral diketone precursor.

Experimental

General information

Diketones **1a–f**, formate dehydrogenase (FDH) from *Candida boidinii*, nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), thiamine diphosphate (ThDP) and sodium formate were purchased from Sigma-Aldrich. Products **2a**, **2e**, **2f**, **2g** and the mixtures of regioisomers **2b–3b** (ratio 1.2 : 1) and **2c–3c** (ratio 2.2 : 1) were obtained as described.¹⁵ TLC were run on precoated silica plates (thickness 0.25 mm, Merck), and silica gel (Fluka, Kieselgel 60, 70–230 mesh) was used for column chromatography. ESI mass spectra were obtained using a LCQ Duo (ThermoQuest, San Jose, CA, USA), in positive-ion mode by introducing the sample as 10⁻⁶ M solution in methanol. Instrumental parameter: capillary voltage, spray voltage 4.6 kV, capillary temperature 200 °C, mass scan range was from *m/z* 100 to 1000 amu for 30000 ms scan time; N₂ was used as sheath gas. NMR spectra were recorded on a Varian Gemini 300 spectrometer. Chemical shifts are given in parts per million from Me₄Si as internal standard. Optical rotations were measured on a Perkin–Elmer Model 241 polarimeter.

GC analyses

Gas chromatographic analyses were performed on a Carlo Erba 6000, equipped with a FID detector and a fused capillary column Megadex 5 (25 m X 0.25 mm) containing dimethyl-*n*-pentyl- β -cyclodextrin on OV 1701 (from Mega snc), helium as carrier gas (80 kPa).

For AAR reduction of **2a**: 90–200 °C (2 °C min⁻¹), retention time (min): **2a**, 7.1; **4a**, 15.5.

For NaBH₄ reduction of **2a**: 90–200 °C (2 °C min⁻¹), retention time (min): **2a**, 7.1; **4a**, 15.5 and 15.9.

For AAR reduction of **2b**: temp 80–100 °C (1.5 °C min⁻¹), 100–200 °C (10 °C min⁻¹) retention time (min): **3b**, 10.7; **2b**, 12.5 and 12.8; **4b**, 19.8.

For AAR reduction of **2c**: temp 80–100 °C (1.5 °C min⁻¹), 100–200 °C (10 °C min⁻¹) retention time (min): **3c**, 14.6; **2c**, 15.9 and 16.0; **4c**, 21.0.

For AAR reduction of **2d**: temp 80–100 °C (1.5 °C min⁻¹), 100–200 °C (10 °C min⁻¹) retention time (min): **3d**, 17.5; **2d**, 18.3 and 18.4; **4d**, 22.3.

For AAR reduction of **2e**: temp 100–200 °C (5 °C min⁻¹), retention time (min): **2e**, 17.1 and 17.2; **4e**, 16.5.

For AAR reduction of **2g**: temp 80–200 °C (1.5 °C min⁻¹), retention time (min): **2g**, 16.0 and 16.3; **4g**, 33.6.

For the synthesis of dioxolane **5a–e** and **5g**: temp 60–200 °C (2 °C min⁻¹) retention time (min): **5a** from enzymatic reduction, 16.1; *syn*-**5a** from NaBH₄ reduction, 15.5 and 16.1; *anti*-**5a** from NaBH₄ reduction, 17.1 and 17.4; **5b**, 21.1; **5c**, 26.3; **5d**, 30.9; **5e**, 52.8; **5g**, 29.6.

Enzymes preparation

B. licheniformis was cultured in two different media in order to obtain crude AAS or AAR respectively. For the preparation of AAS, the medium was composed of meat extract (10 g L⁻¹), polypeptone (10 g L⁻¹), NaCl (5 g L⁻¹) and 3-hydroxy-2-butanone (5 g L⁻¹), while in order to obtain BSDR sucrose (40 g L⁻¹), peptone (20 g L⁻¹), yeast extract (10 g L⁻¹) Na₂HPO₄·6H₂O (6.8 g L⁻¹), K₂SO₄ (2.6 g L⁻¹) were present in the medium. The culture conditions and the cells' treatment were the same for both the enzymes: the bacteria was grown for 48 h at 38–40 °C and 110 rpm, then the cells were harvested by centrifugation (6000 rpm, 20 min) and washed with 150 mM NaCl solution (50 mL). Wet cells obtained from the two different cultures (2.0 g) were suspended in 50 mM phosphate buffer at pH 6.5 containing EDTA (0.1 mM) and β-mercaptoethanol (1 mM) (20 mL), the suspensions were treated at high pressure (1280 bar) with a French press and then centrifuged (9000 rpm, 20 min, 10 °C). The cell free extracts (16 mL) were used without further purification.

3-Hydroxy-3-methyl-2,4-heptanedione (2d) and 3-butyl-3-hydroxy-2,4-pentanedione (3d)

The AAS cell free extract (16 mL) was added to a solution of diketone **1d** (384 mg, 3 mmol), ThDP (17 mg, 39 μmol) and magnesium sulfate (15 mg, 125 μmol) in 50 mM phosphate buffer at pH 6.5 (50 mL). The reaction was gently shaken at 30 °C for 14 h and then heated (80 °C, 20 min). After removing the precipitate by centrifugation (9000 rpm, 20 min) the solution was extracted with ethyl acetate (3 × 30 mL). The combined organic layers were washed with saturated NaHCO₃ (40 mL) and dried over anhydrous Na₂SO₄. The solvent was evaporated to afford 168 mg (0.98 mmol, 65%) of a mixture of compounds **2d** and **3d** in a 3 : 1 ratio. Pure samples of **2d** and **3d** were obtained by flash chromatography on silica gel (*n*-hexane–AcOEt 15 : 1 as eluent).

3-Hydroxy-3-methyl-2,4-octanedione (2d)

Colourless oil (48%, ee 72%). $[\alpha]_D^{20} +7.3$ (c 0.2, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H: 0.93 (t, 3H, J = 7.5 Hz, CH₃) 1.22–1.36 (m, 2H, CH₂) 1.48–1.62 (m, 2H, CH₂) 1.56 (s, 3H, CH₃) 2.25 (s, 3H, CH₃CO) 2.51 (dt, 1H, J = 17.5 and 7.5 Hz, CH₂CO) 2.70 (dt, 1H, J = 17.5 and 7.5 Hz, CH₂CO) 4.75 (br s, 1H, OH). ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_C: 13.8, 22.5, 22.7, 24.6, 25.5, 36.5, 87.6, 207.4, 209.6; ESI [MNa]⁺ *m/z* 195.1. Anal calcd for C₉H₁₆O₃: C, 62.77%; H, 9.36%. Found: C, 62.69%; H, 9.29%.

3-Hydroxy-3-butyl-2,4-pentanedione (3d)

Colourless oil (15%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H: 0.91 (t, 3H, J = 7.5 Hz, CH₃) 1.10–1.40 (m, 4H, 2CH₂) 1.95–2.05 (m, 2H, CH₂) 2.25 (s, 6H, 2CH₃CO) 4.65 (br s, 1H, OH). ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_C: 13.8; 22.7, 25.2, 25.3, 29.4, 29.7, 36.1, 91.0, 207; ESI [MNa]⁺ *m/z* 195.1. Anal calcd for C₉H₁₆O₃: C, 62.77%; H, 9.36%. Found: C, 62.71%; H, 9.32%.

General procedure for the enzymatic reduction of α-alkyl-α-hydroxy-β-diketones 2a–g

To a solution of NAD⁺ (10 mg, 15 μmol), sodium formate (335 mg, 5 mmol), formate dehydrogenase (1.0 mg, 10 U) and AAR cell free extract (15 mL) in phosphate buffer 50 mM at pH 6.5 (35 mL) containing EDTA (0.1 mM) and 1 mM 2-mercapto-ethanol, the selected diketones **2** (1.0 mmol) were added. For compounds **2b–d**, the mixtures **2b/3b**, **2c/3c** and **2d/3d** were used in the proper amount to have 1.0 mmol of the diketone **2**. The mixture was gently shaken overnight at 30 °C and then warmed up at 80 °C for 20 min. The proteins were removed by centrifugation (9000 rpm, 20 min) and the supernatant was extracted with ethyl acetate (3 × 30 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated to afford a pale yellow oil that was purified by column chromatography on silica gel using cyclohexane–ethyl acetate 2 : 1 as eluent.

3R,4S-Dihydroxy-3-methyl-2-pentanone (4a)

Colourless oil (79 mg, 60%, ee >95%). $[\alpha]_D^{20} -10.7$ (c 1.4, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H: 1.25 (s, 3H, CH₃) 1.27 (d, 3H, J = 7.5 Hz, CH₃) 1.98 (d, 1H, J = 9.0 Hz, OH) 2.30 (s, 3H, CH₃CO) 4.02 (br s, 1H, OH) 4.05 (m, 1H, CHOH). ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_C: 13.8, 21.8, 24.0, 71.3; 81.6, 211.7, ESI [MNa]⁺ *m/z* 155.2. Anal calcd for C₆H₁₂O₃: C, 54.53%; H, 9.15%. Found: C, 54.38%; H, 9.21%.

4R,5S-Dihydroxy-4-methyl-3-hexanone (4b)

Colourless oil (89 mg, 61%, ee >95%). $[\alpha]_D^{20} -8.6$ (c 1.5, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H: 1.13 (t, 3H, J = 7.0 Hz, CH₃) 1.25 (s, 3H, CH₃) 1.27 (d, 3H, J = 7.0 Hz, CH₃) 2.05 (br s, 1H, OH) 2.60 (dq, 1H, J = 7.0 and 18.0 Hz, CH₂CO) 2.68 (dq, 1H, J = 7.0 and 18.0 Hz, CH₂CO) 4.05 (m, 1H, OH) 4.10 (br s, 1H, OH). ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_C: 7.6, 16.9, 21.7, 29.2, 71.1, 81.0, 214.3; ESI [MNa]⁺ *m/z* 169.2. Anal calcd for C₇H₁₄O₃: C, 57.51%; H, 9.65%. Found: C, 57.45%; H, 9.51%.

2S,3R-Dihydroxy-3-methyl-4-heptanone (4c)

Colourless oil (104 mg, 65%, ee >95%). $[\alpha]_D^{20}$ -10.0 (c 0.8, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H : 0.94 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) 1.23 (s, 3H, CH₃) 1.27 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) 1.68 (sex, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂) 2.10 (br s, 1H, OH) 2.53 (dt, 1H, *J* = 7.0 and 18.0 Hz, CH₂CO) 2.60 (dt, 1H, *J* = 7.0 and 18.0 Hz, CH₂CO) 4.05 (m, 1H, CHOH) 4.10 (br s, 1H, OH); ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_C : 13.6, 16.8, 16.9, 21.6, 37.8, 71.0, 81.0, 213.6; ESI [MNa]⁺ *m/z* 183.0. Anal calcd for C₉H₁₆O₃: C, 59.97%; H, 10.07%. Found: C, 60.01%; H, 10.11%.

2S,3R-Dihydroxy-3-methyl-4-octanone (4d)

Colourless oil (122 mg, 70%, ee >95%). $[\alpha]_D^{20}$ -8.2 (c 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H : 0.94 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) 1.25 (s, 3H, CH₃) 1.28 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) 1.28-1.42 (m, 2H, CH₂) 1.58-1.70 (m, 2H, CH₂) 1.88 (br s, 1H, OH) 2.58 (dt, 1H, *J* = 7.0 and 18.0 Hz, CH₂CO) 2.65 (dt, 1H, *J* = 7.0 and 18.0 Hz, CH₂CO) 4.05 (m, 1H, CHOH), 4.08 (br s, 1H, OH). ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_C : 13.8, 17.0, 21.7, 22.3, 25.5, 35.6, 71.0, 81.0, 213.6; ESI [MNa]⁺ *m/z* 198.1. Anal calcd for C₉H₁₈O₃: C, 62.04%; H, 10.41%. Found: C, 61.99%; H, 10.13%.

2R,3S-Dihydroxy-2-methyl-1-phenyl-1-butanone (4e)

Yellow pale oil (122 mg, 63%, ee >95%). $[\alpha]_D^{20}$ +8.0 (c 0.4, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H : 1.30 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) 1.54 (s, 1H, CH₃) 2.10 (br s, 1H, OH) 4.22 (br s, 1H, OH) 4.38 (m, 1H, CHOH) 7.43-8.05 (m, 5H, Ph). ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_C : 16.8, 23.1, 71.4, 81.4, 128.5, 129.3, 132.8, 204.8; ESI [MNa]⁺ *m/z* 217.1. Anal calcd for C₁₁H₁₄O₃: C, 68.02%; H, 7.27%. Found: C, 68.15%; H, 7.23%.

4R,5S-Dihydroxy-4-ethyl-3-hexanone (4g)

Colourless oil (115 mg, 72%, ee >95%). $[\alpha]_D^{20}$ +6.6 (c 0.5, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H : 0.75 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) 1.15 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) 1.27 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) 1.65-1.75 (m, 2H, CH₂) 2.54 (dq, 1H, *J* = 7.0 and 18.0 Hz, CH₂CO) 2.68 (dq, 1H, *J* = 7.0 and 18.0 Hz, CH₂CO) 4.05 (m, 1H, CHOH) 4.13 (br s, 1H, OH). ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_C : 7.4, 7.5, 17.5, 27.8, 29.5, 71.2, 84.5, 213.8; ESI [MNa]⁺ *m/z* 183.1. Anal calcd for C₈H₁₆O₃: C, 59.97%; H, 10.07%. Found: C, 60.11%; H, 10.15%.

Reduction of acetylaceton (2a) with NaBH₄

Acetylaceton **2a** (130 mg, 1.0 mmol) was dissolved in diethyl ether-methanol 5:1 (8 mL), the solution was cooled (ice bath) and NaBH₄ (38 mg, 1.0 mmol) was added. The ice bath was removed and the mixture was maintained at r. t. The reaction was monitored by TLC (cyclohexane-ethyl acetate 1:1) and when the conversion was complete 1 M HCl (5 mL) was added. The organic layer was separated and the aqueous solution was extracted with diethyl ether (2 × 10 mL). The combined organic phases were dried (Na₂SO₄) and the solvent was removed under vacuum. The products were purified by short column chromatography (silica gel, cyclohexane-ethyl acetate 2:1 as eluent) to obtain the mixture of *syn*- and *anti*-**4a** (110 mg, 83%).

The ¹H NMR spectrum of the mixture allows us to identify the signals of *anti*-2,3-dihydroxy-3-methyl-pentan-2-one (**4a**): ¹H

NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H : 1.08 (d, 3H, *J* = 7.5 Hz, CH₃), 1.45 (s, 3H, CH₃), 1.85 (d, 1H, *J* = 14 Hz, OH), 2.25 (s, 3H, CH₂CO), 3.80 (br s, 1H, OH), 3.90 (dq, 1H, *J* = 7.0 and 10 Hz, CHOH). The diastereomeric mixture of *syn* and *anti*-**4a** was dissolved in dichloromethane (5 mL) and treated successively as described in the general procedure for the synthesis of the corresponding dioxolane. Column chromatography (silica, cyclohexane-diethyl ether 10:1 as eluent) afforded the mixture of *syn* and *anti*-**5a** (130 mg, 92%). The signals of 1-(2,2,4,5-tetramethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-ethanone (*anti*-**5a**) were identified from ¹H NMR spectrum of the mixture: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H : 1.16 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃), 1.38 (s, 3H, CH₃), 1.44 (s, 3H, CH₃), 1.58 (s, 3H, CH₃), 2.24 (s, 3H, CH₂CO), 4.14 (q, 1H, *J* = 7.0 Hz, CH-OR).

General procedure for the synthesis of 1,3-dioxolane derivatives 5

To a solution of the selected α -alkyl- α,β -dihydroxy-ketones **4** (0.5 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL), 2,2-dimethoxypropane (312 mg, 0.37 mL, 3 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid (5 mg, 0.03 mmol) were added. After 2 h at room temperature the mixture was diluted with a saturated solution of NaHCO₃ (10 mL) and extracted with dichloromethane (3 × 10 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated. The residue was chromatographed (silica gel, cyclohexane-diethyl ether 10:1 as eluent).

4R,5S-1-(2,2,4,5-Tetramethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-ethanone (*syn*-5a)

Colourless oil (69 mg, 80%, ee >95%). $[\alpha]_D^{20}$ +46.9 (c 1.3, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H : 1.20 (s, 3H, CH₃) 1.28 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) 1.40 (s, 3H, CH₃) 1.50 (s, 3H, CH₃) 2.30 (s, 3H, CH₂CO) 4.14 (q, 1H, CHOC). ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_C : 14.5, 18.7, 25.5, 25.9, 28.4, 74.4, 87.5, 108.3, 211.7; ESI [MNa]⁺ *m/z* 195.1. Anal calcd for C₉H₁₆O₃: C, 62.77%; H, 9.36%. Found: C, 62.41%; H, 9.53%.

1-(2,2,4,5-Tetramethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-propanone (5b)

Colourless oil (79 mg, 85%, ee >95%). $[\alpha]_D^{20}$ +5.2 (c 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H : 1.03 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) 1.2 (s, 3H, CH₃) 1.28 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) 1.39 (s, 3H, CH₃) 1.48 (s, 3H, CH₃) 2.65-2.80 (m, 2H, CH₂CO), 4.08 (q, *J* = 7.0 Hz, CHOR). ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_C : 7.2, 14.5, 19.1, 26.0, 28.4, 30.6, 74.6, 87.6, 108.2, 214.0; ESI [MNa]⁺ *m/z* 209.3. Anal calcd for C₁₀H₁₈O₃: C, 64.49%; H, 9.74%. Found: C, 64.14%; H, 9.66%.

1-(2,2,4,5-Tetramethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-butanone (5c)

Colourless oil (87 mg, 87%, ee >95%). $[\alpha]_D^{20}$ +46.5 (c 1.5, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_H : 0.93 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) 1.21 (s, 3H, CH₃) 1.28 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) 1.40 (s, 3H, CH₃) 1.50 (s, 3H, CH₃) 1.60 (sex, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂) 2.68 (t, 2H, CH₂CO) 4.10 (q, 1H, *J* = 7.0 Hz, CHOR). ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_C : 13.7, 14.5, 16.4, 19.0, 25.9, 28.4, 39.2, 74.5, 87.5, 108.1, 213.4; ESI [MNa]⁺ *m/z* 223.0. Anal calcd for C₁₁H₂₀O₃: C, 65.97%; H, 10.07%. Found: C, 65.62%; H, 9.96%.

1-(2,2,4,5-Tetramethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-pentanone (5d)

Colourless oil (92 mg, 86%, ee >95%). $[\alpha]_D^{20} +46.4$ (c 0.8, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 0.92 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) 1.20 (s, 3H, CH₃) 1.29 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃), 1.30–1.36 (m, 2H, CH₂), 1.38 (s, 3H, CH₃) 1.47 (s, 3H, CH₃) 1.60–1.40 (m, 2H, CH₂) 2.70 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₂CO) 4.10 (q, 1H, *J* = 7.0 Hz, CHOR). ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 13.9, 14.5, 19.1, 22.3, 25.1, 25.9, 28.4, 37.0, 74.5, 87.5, 108.1, 213.5; ESI [MNa]⁺ *m/z* 237.0. Anal calcd for C₁₇H₃₂O₃: C, 67.26%; H, 10.35%. Found: C, 67.17%; H, 10.51%.

1-(2,2,4,5-Tetramethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-benzophenone (5e)

Colourless oil (106 mg, 91%, ee >95%). $[\alpha]_D^{20} +8.1$ (c 0.8, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 1.20 (s, 3H, CH₃) 1.43 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) 1.48 (s, 3H, CH₃) 1.55 (s, 3H, CH₃) 4.56 (q, 1H, *J* = 7.0 Hz, CHOR) 7.40–8.25 (m, 5H, Ph). ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 15.5, 21.7, 25.8, 28.5, 75.7, 87.5, 108.0, 128.1, 130.4, 132.9, 134.7, 202.5; ESI [MNa]⁺ *m/z* 257.0. Anal calcd for C₁₄H₁₈O₃: C, 71.77%; H, 7.74%. Found: C, 71.32%; H, 7.81%.

1-(4-Ethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-propanone (5g)

Colourless oil (85 mg, 85%, ee >95%). $[\alpha]_D^{20} +51.9$ (c 0.5, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 0.81 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz, CH₃) 1.02 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) 1.30 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) 1.42 (s, 3H, CH₃), 1.40–1.55 (m, 1H, CH₂), 1.49 (s, 3H, CH₃), 1.82–1.95 (m, 1H, CH₂), 2.27 (dq, *J* = 7.0 and 19.0 Hz, CH₂CO) 2.64 (dq, *J* = 7.0 and 19.0 Hz, CH₂CO) 3.97 (q, 1H, *J* = 7.0 Hz, CHOC). ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 7.0, 7.7, 13.8, 25.0, 26.2, 28.4, 32.4, 75.0, 90.9, 108.4, 214.4; ESI [MNa]⁺ *m/z* 223.1. Anal calcd for C₁₁H₂₀O₃: C, 65.97%; H, 10.07%. Found: C, 70.12%; H, 10.13%.

Synthesis of 1-(2,2,4,5-tetramethyl-1,3-dioxolan-4-yl)-ethanol (6)

Compound **5a** (150 mg, 0.87 mmol) was dissolved in diethyl ether–methanol 8:1 (5 mL), the solution was cooled (ice bath) and NaBH₄ (10 mg, 0.26 mmol) was added. After the addition the mixture was stirred at room temperature for 1 h and then diluted with 1 M HCl (5 mL). The organic phase was separated and the aqueous layer was extracted with diethyl ether (2 × 10 mL). The combined organic phases were dried (anhydrous Na₂SO₄), evaporated and the residue was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane–ethyl acetate 2:1 as eluent) affording an equimolecular mixture of (4*R*,5*S*,6*S*)- and (4*R*,5*S*,6*R*)-**6** diastereomers (136 mg, 90%): ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) selected data: δ 1.04, 1.08, 1.35, 1.36, 1.43 and 1.44 (6 s, 6 × 3H, 6CH₃), 3.58 and 3.75 (2q, 2 × 1H, *J* = 6.5 Hz, CHOH), 4.14 and 4.24 (2q, 2 × 1H, *J* = 6.5 Hz, CHOR). ESI [MNa]⁺ *m/z* 197.1.

Synthesis of 3-methyl-1-penten-3,4-diol (7)

Compound **6** (150 mg, 0.86 mmol) and pyridine (153 μ L, 1.9 mmol) were dissolved in dichloromethane (4 mL). To the stirred solution trifluoromethanesulfonic anhydride (173 μ L, 1.03 mmol) was added at room temperature. After 30 min DBU (0.64 mL, 4.3 mmol) was added and after a further 30 min the mixture was diluted with 1 M HCl (5 mL). The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (2 × 5 mL). The combined organic phases were

dried (anhydrous Na₂SO₄) and evaporated under nitrogen. The crude 2,2,4,5-tetramethyl-4-vinyl-1,3-dioxolane [selected data ¹H NMR (CDCl₃) δ_{H} : 3.96 (dd, 1H, *J* = 6.5 Hz, CHOR), 5.15 (dd, 1H, *J* = 1.5 and 11.0 Hz, CH₂), 5.33 (dd, 1H, *J* = 1.5 and 17.5 Hz, CH₂), 5.88 (dd, 1H, *J* = 11.0 and 17.5 Hz, CH)] was dissolved in anhydrous methanol (7 mL) and acidified with *p*-toluenesulfonic acid. The reaction was stirred at room temperature and checked by TLC (eluent: cyclohexane–ethyl acetate 1.5:1). When the conversion was complete silica gel was added to the mixture in order to absorb the product and the solvent was removed under reduced pressure. Short column chromatography of the residue using cyclohexane–ethyl acetate 2:1 as eluent afforded product **7** slightly contaminated (45 mg, 45%): ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.18 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz, CH₃), 1.26 (s, 3H, CH₃), 3.68 (q, 1H, *J* = 6.5 Hz, CHOH), 5.22 (dd, 1H, *J* = 1.3 and 11.0 Hz, CH₂), 5.38 (dd, 1H, *J* = 1.3 and 17.0 Hz, CH₂), 5.92 (dd, 1H, *J* = 11.0 and 17.0 Hz, CH), ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 16.5, 21.5, 72.8, 75.6, 114.3, 142.73; ESI [MNa]⁺ *m/z* 139.2.

Synthesis of (+)-citrediol (8)

The diol **7** (45 mg, 0.39 mmol) was dissolved in anhydrous dichloromethane–tetrahydrofuran 4:1 (10 mL) with acrolein (0.22 mL, 3.1 mmol) and Hoveyda-Grubbs 2nd generation catalyst (23 mg, 7 mol%). The solution was heated to reflux for 6 h and then the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in benzene (8 mL) together with methyl-2-(triphenylphosphoranylidene)-propanoate (0.3 g, 0.86 mmol) and the mixture was refluxed for 6 h. After evaporation, the residue was purified by column chromatography (silica gel, cyclohexane–ethyl acetate 2:1 as eluent) affording citrediol **8** as a colourless oil: $[\alpha]_D^{20} +6.8$ (c 0.7, CHCl₃), lit¹⁹ +4.3 (c 1.0; CHCl₃); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.20 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz, CH₃), 1.30 (s, 3H, CH₃), 2.0 (s, 1H, CH₃), 3.75 (m, 1H, CHOH), 3.77 (s, 3H, CH₃), 6.12 (d, 1H, *J* = 15 Hz, CH), 6.70 (dd, 1H, *J* = 11.0 and 15.0 Hz, CH), 7.20 (1H, *J* = 11.0 Hz, CH), ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 12.9, 17.0, 22.0, 52.0, 73.1, 75.7, 76.6, 124.8, 127.6, 137.5, 145.2, 168.9, 13.8, 17.0, 21.7, 22.3, 25.5, 35.6, 71.0, 81.0, 213.6. ESI [MNa]⁺ *m/z* 237.3.

Acknowledgements

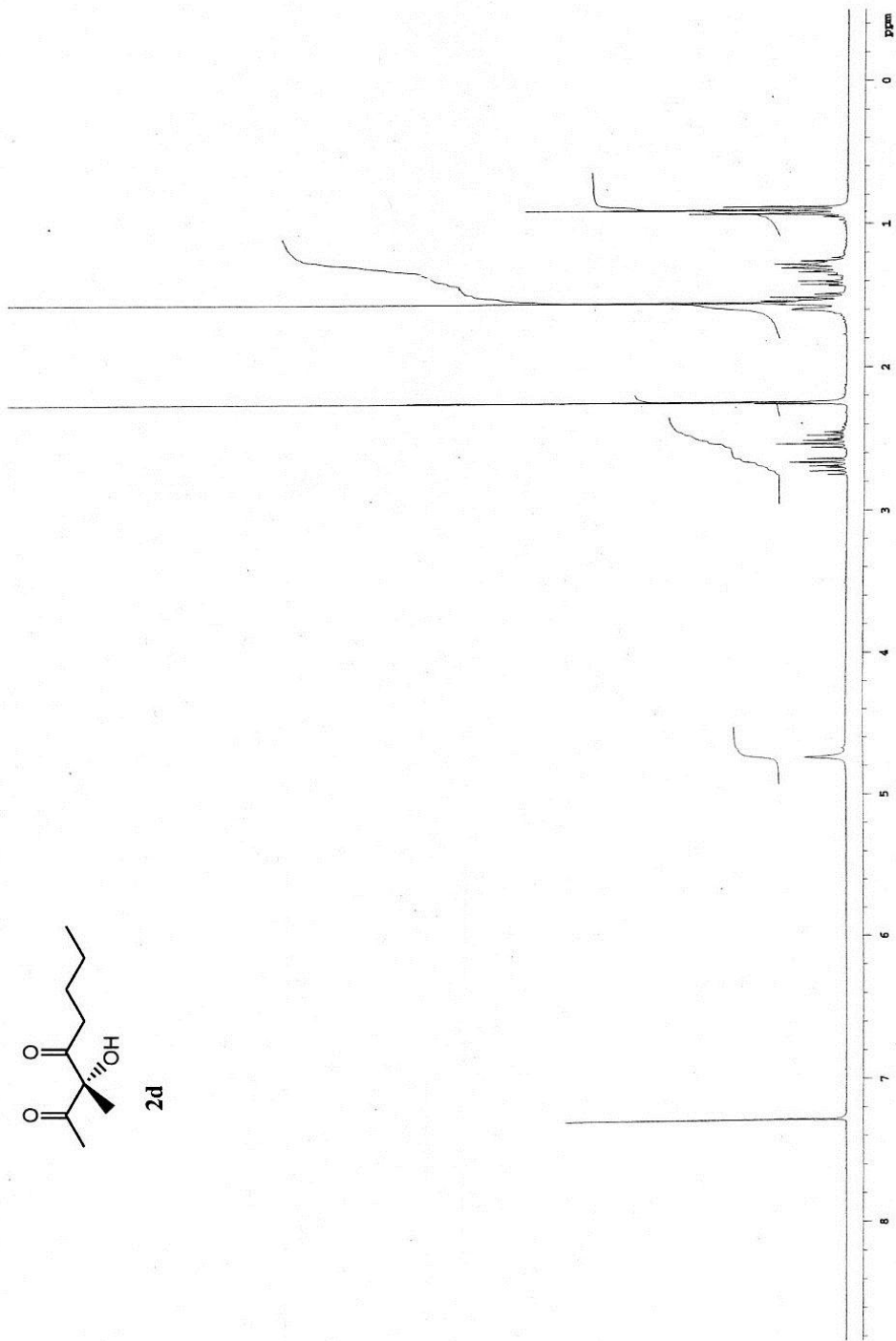
We gratefully acknowledge Cambrex-IEP GmbH Wiesbaden Germany and ICE srl Reggio Emilia Italy for the financial support. Thanks are due to Dr Tatiana Bernardi and Mr. Paolo Formaglio for technical assistance in ESI-MS and NMR analysis.

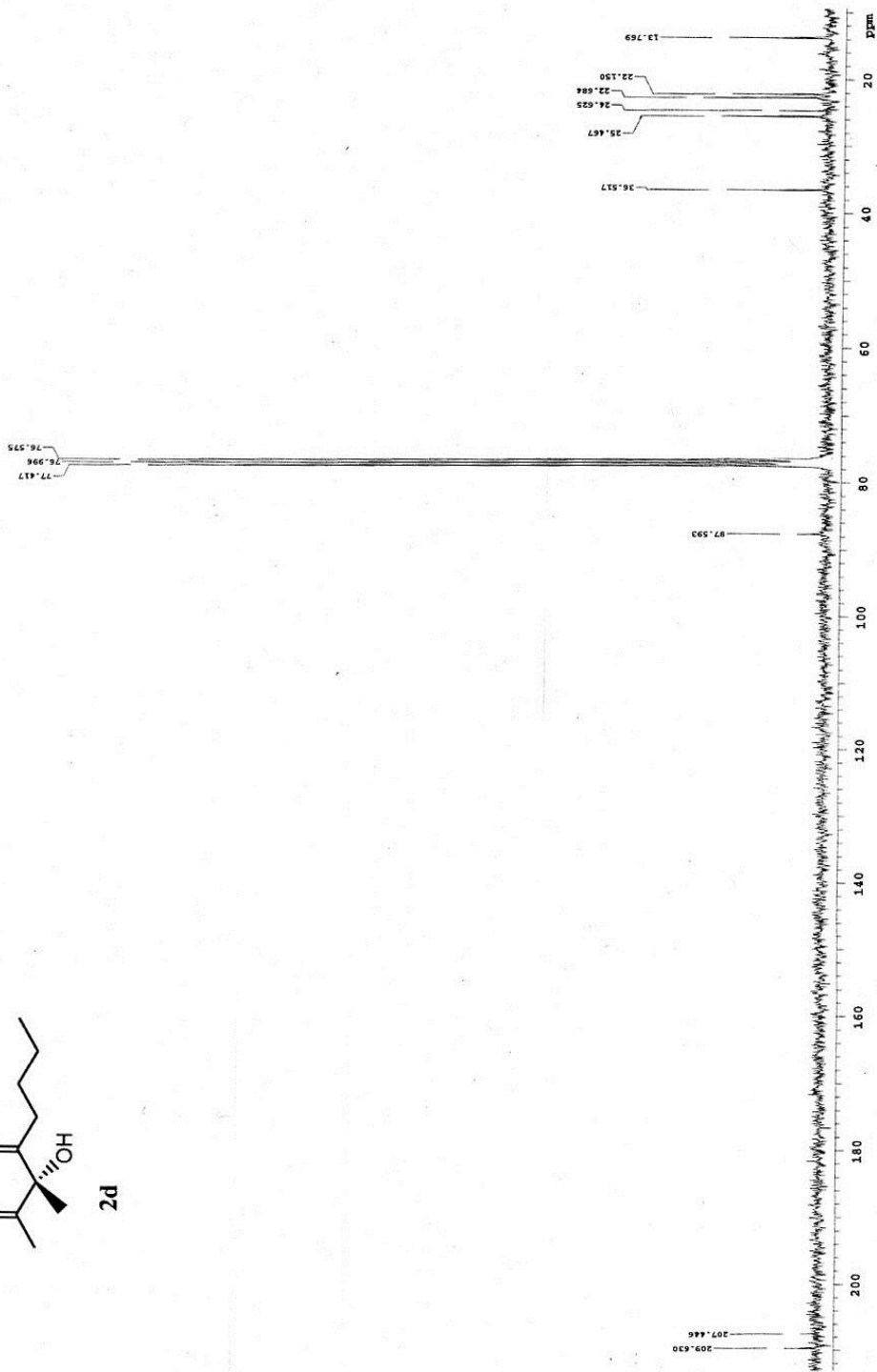
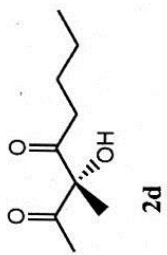
Notes and references

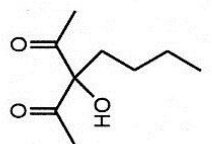
- (a) M. Shibasaki and M. Kanai, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2853; (b) G. Cozzi, R. Hilgraf and N. Zimmermann, *Eur. J. Org. Chem.*, 2007, 5969; (c) F. Gosselin, R. A. Britton, J. Mowat, P. D. O'Shea and I. W. Davies, *Synlett*, 2007, **14**, 2193; (d) R. Riveiros, D. Rodriguez, J. P. Sestelo and L. A. Sarandeses, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 1403; (e) C. Garcia and V. S. Martin, *Curr. Org. Chem.*, 2006, **10**, 1849; (f) J. Christoffers and A. Barao, *Adv. Synth. Catal.*, 2005, **347**, 1473.
- R. Kourist, P. Dominguez de Maria and U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem*, 2008, **9**, 4.
- (a) A. Fujino, M. Asano, H. Yamaguchi, N. Shirasaka, A. Sakoda, M. Ikunaka, R. Ohata, S. Nishiyama and T. Sugai, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 979; (b) H. Hellström, A. Steinreiber, S. F. Mayer and K. Faber, *Biotechnol. Lett.*, 2001, **23**, 169.

- 4 M. Majerić Elenkov, H. W. Hoeffken, L. Tang, B. Hauer and D. B. Janssen, *Adv. Synth. Catal.*, 2007, **349**, 2279.
- 5 T. Purkharthofer, W. Skranc, C. Shuster and H. Griengl, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, **76**, 309.
- 6 (a) D. Özdemirhan, S. Sezer and Y. Sönmez, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2008, **19**, 2717; (b) E. Henke, J. Pleiss and U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **41**, 3211; (c) S. Hari Krishna, M. Persson and U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2002, **13**, 2693; (d) S.-T. Chen and J.-M. Fang, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 4349.
- 7 P. Lehwald, M. Richter, C. Röhr, H.-w. Liu and M. Müller, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 2389.
- 8 The bacterial source (*Bacillus stearothermophilus*) of AAS reported in ref. 9 has been reclassified as *Bacillus licheniformis*. **Errata corrigé** have been sent to the editor.
- 9 P. P. Giovannini, P. Pedrini, V. Venturi, G. Fantin and A. Medici, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, **64**, 113.
- 10 (a) F. Cohen, D. W. C. MacMillan, L. E. Overman and A. Romero, *Org. Lett.*, 2001, **3**, 1225; (b) N. Hanaki, J. T. Link, D. W. C. MacMillan, L. E. Overman, W. G. Trankle and J. A. Wurster, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 223; (c) L. E. Overman and G. M. Rishton, *Organic Syntheses*, Wiley, New York, 1998, Collect. Vol. 9, p. 4; (d) M. H. Hopkins, L. E. Overman and G. M. Rishton, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 5354.
- 11 P. Ghosh, J. R. Cusick, J. Inghrim and L. J. Williams, *Org. Lett.*, 2009, **11**, 4672.
- 12 T. Matsuda, R. Yamanaka and K. Nakamura, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2009, **20**, 513.
- 13 (a) D. Kalaitzakis and I. Smonou, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 8658; (b) D. Kalaitzakis, J. D. Rozzell, I. Smonou and S. Kambourakis, *Adv. Synth. Catal.*, 2006, **348**, 1958.
- 14 Acetylacetoin reductase (AAR), because of the reclassification of *B. stearothermophilus* as *B. licheniformis*, is the enzyme named BSDR in reference: P. P. Giovannini, M. Mantovani, A. Grandini, A. Medici and P. Pedrini, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2011, **69**, 15. **Errata corrigé** have been sent to the editor.
- 15 The homo-coupling of **1d** is herein reported for the first time (see Experimental Section).
- 16 (a) S. Ui, T. Hosaka, K. Mizutani and A. Mimura, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 1998, **62**, 795; (b) S. Ui, T. Hosaka, K. Watanabe and A. Mimura, *J. Ferment. Bioeng.*, 1998, **85**, 79.
- 17 (a) S. Ui, T. Hosaka, K. Mizutani, T. Ohtsuki and A. Mimura, *J. Biosci. Bioeng.*, 2002, **93**, 248; (b) S. Ui, K. Watanabe and T. Magaribuchi, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 1994, **58**, 2271.
- 18 M. Handa, K. A. Scheidt, M. Bossart, N. Zheng and W. R. Roush, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 1031.
- 19 Y. Shizuri, S. Nishiyama, D. Imai, S. Yamamura, H. Furukawa, K. Kawai and N. Okada, *Tetrahedron Lett.*, 1984, **25**, 4771.
- 20 M. B. Rubin and S. Inbar, *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 3355.

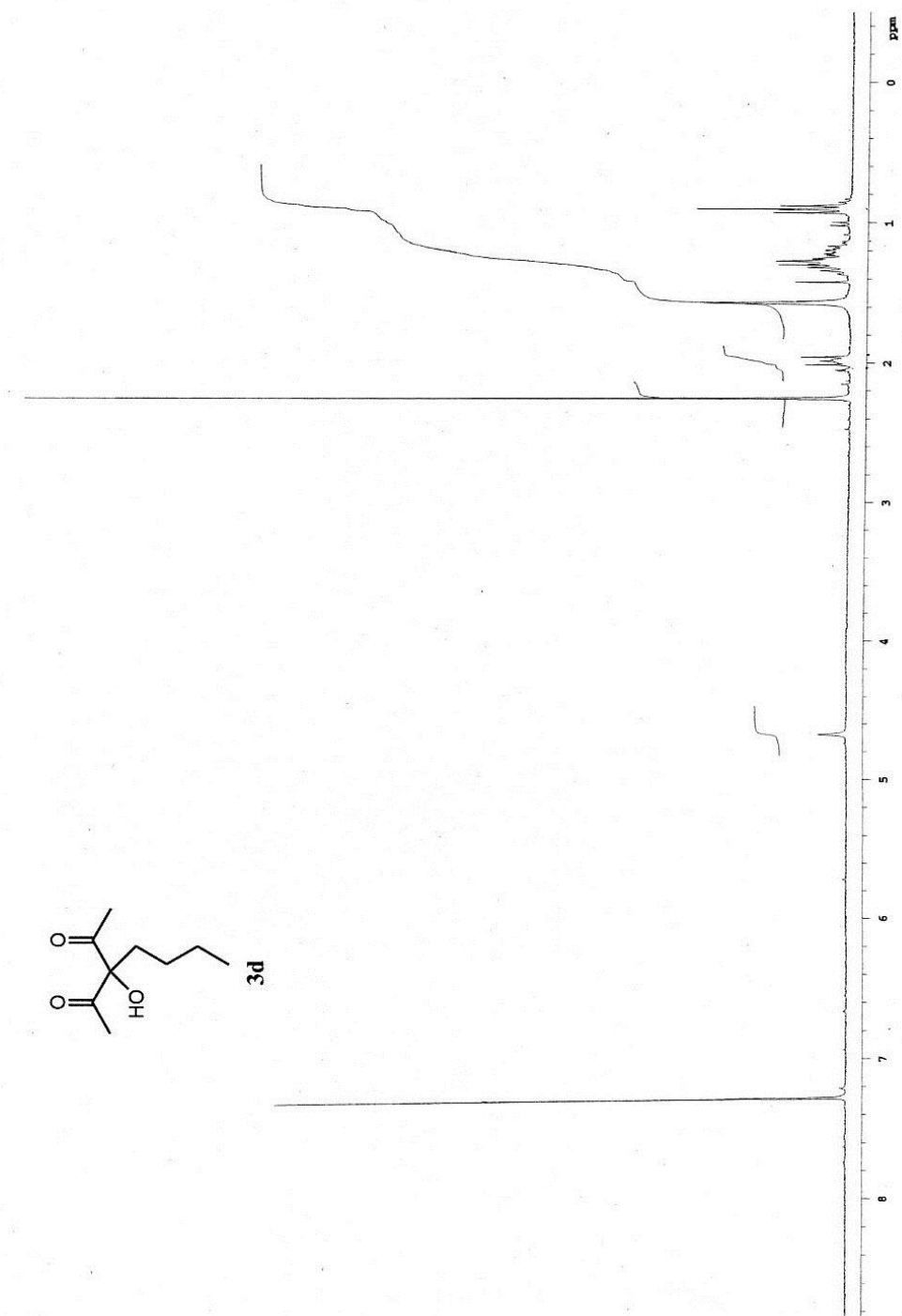
B)

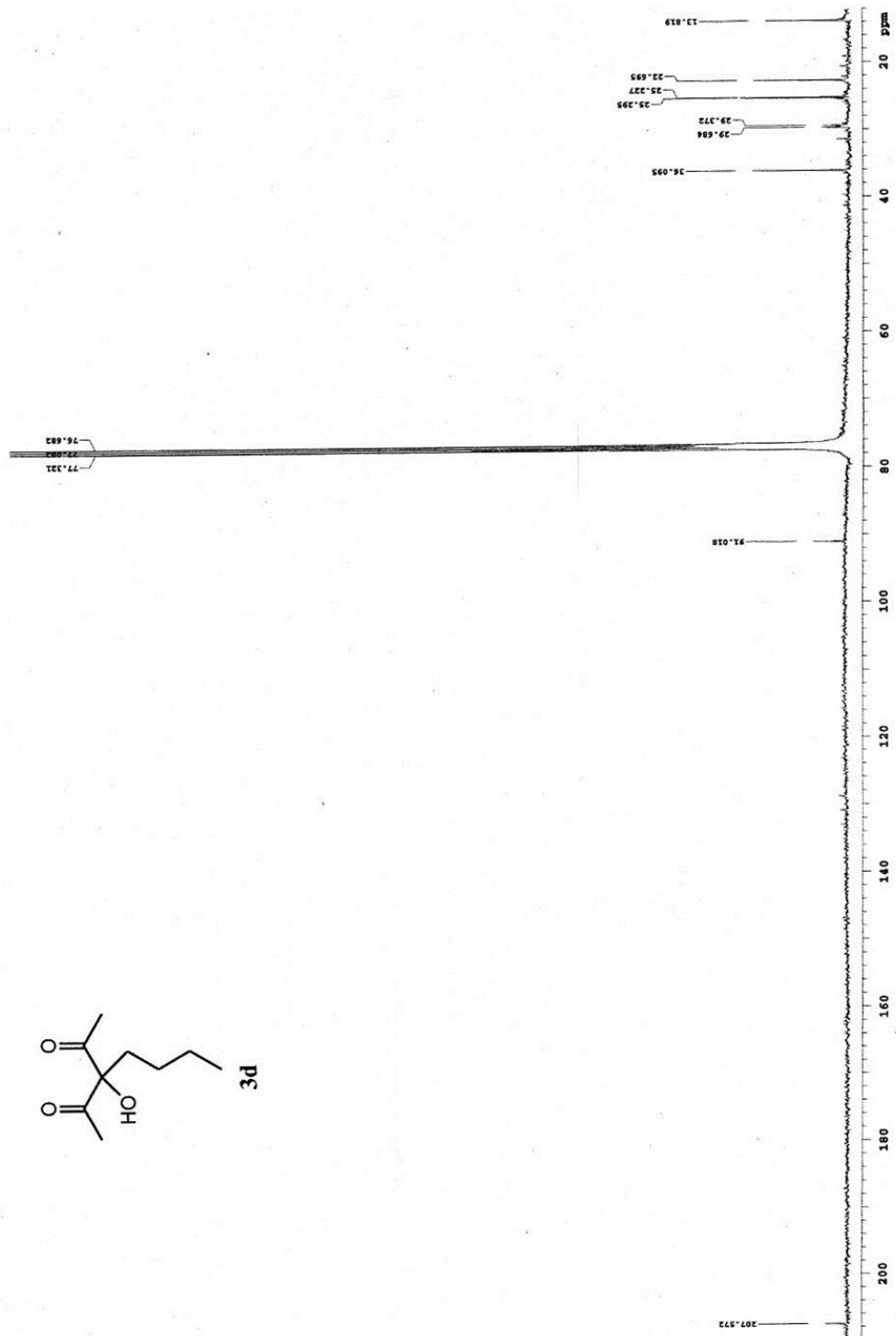


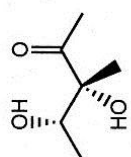




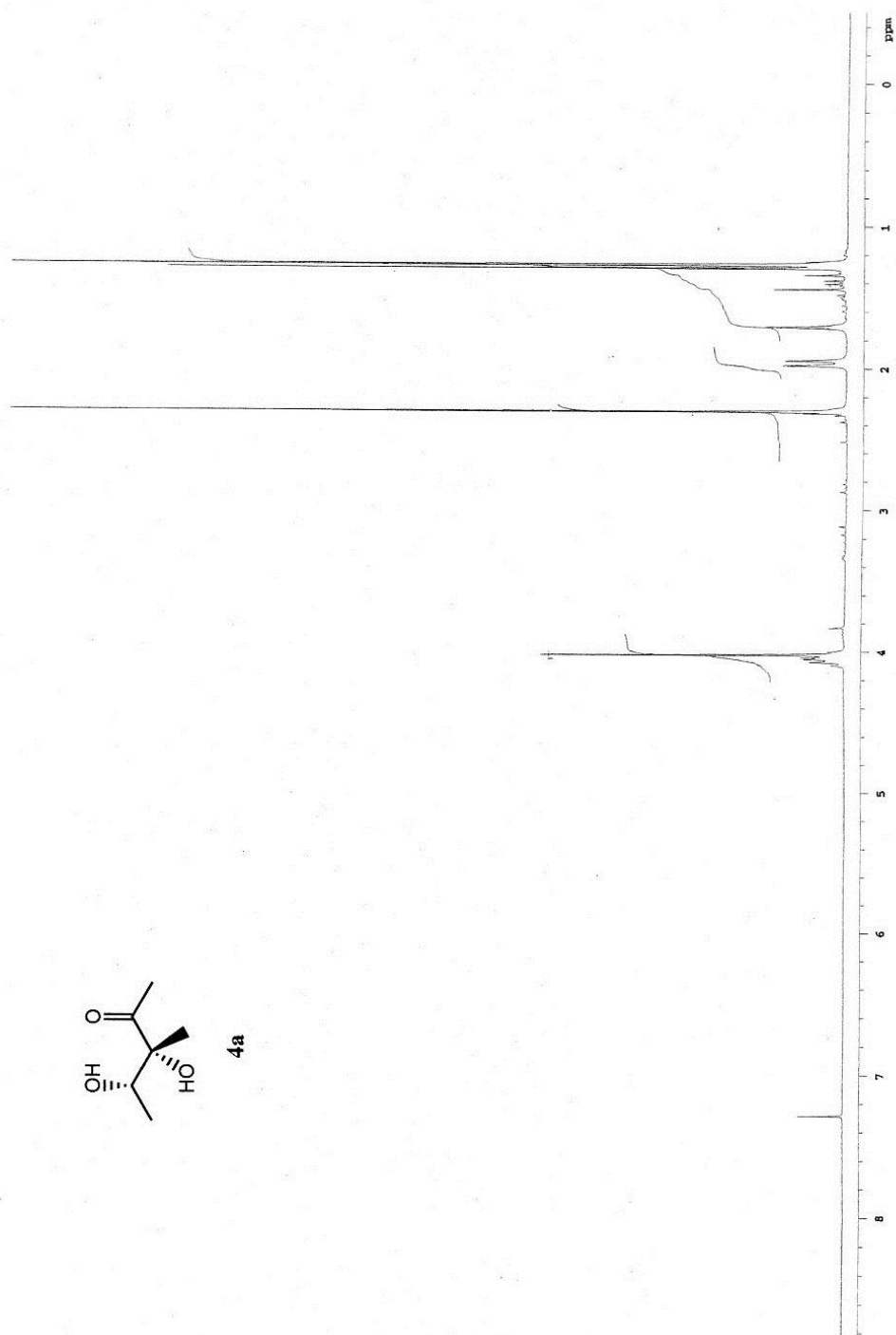
3d

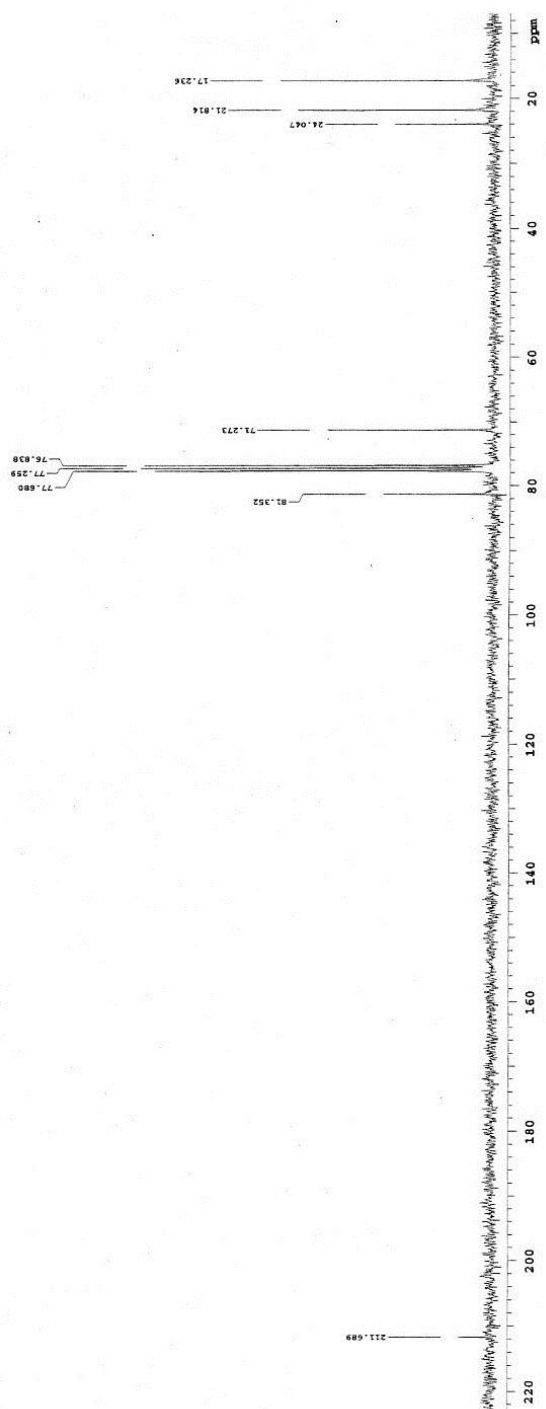
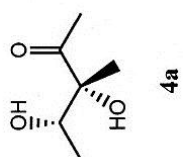


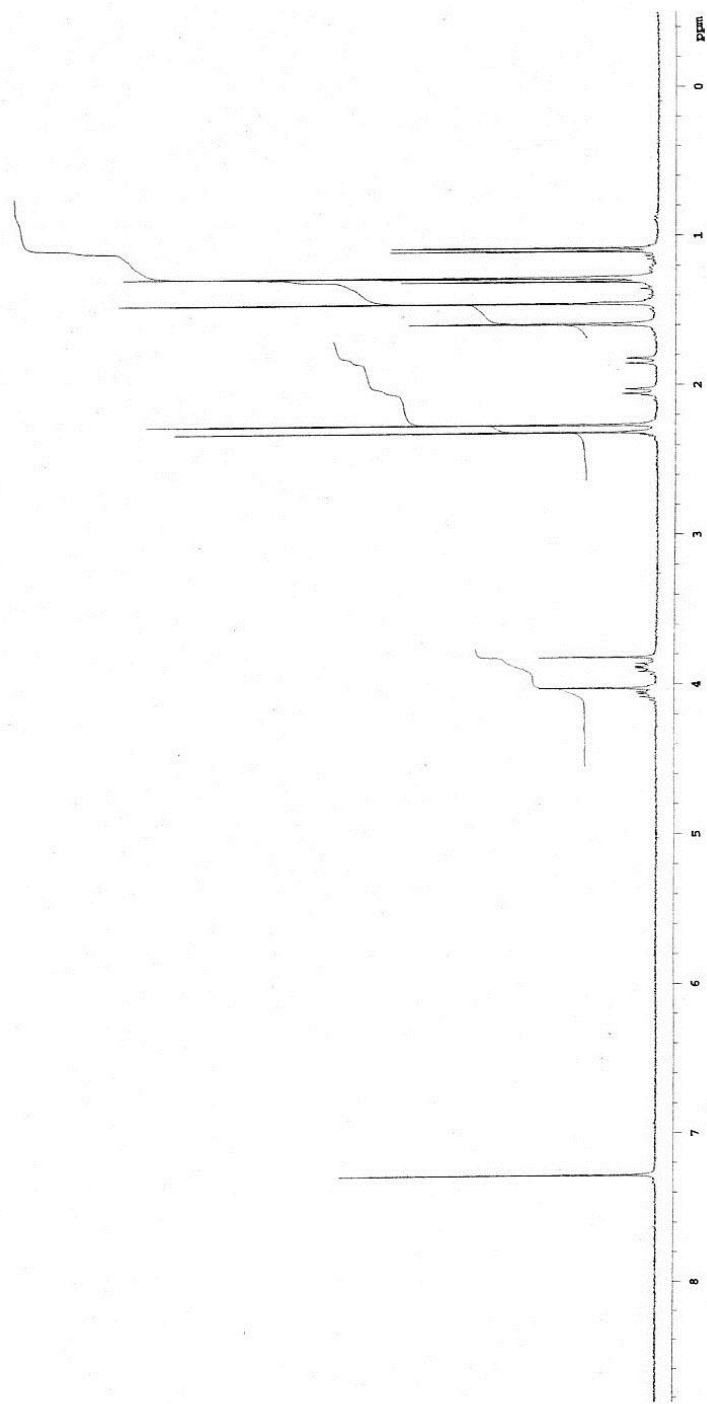
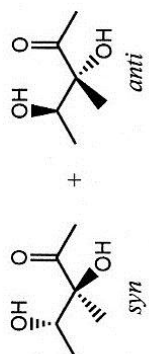


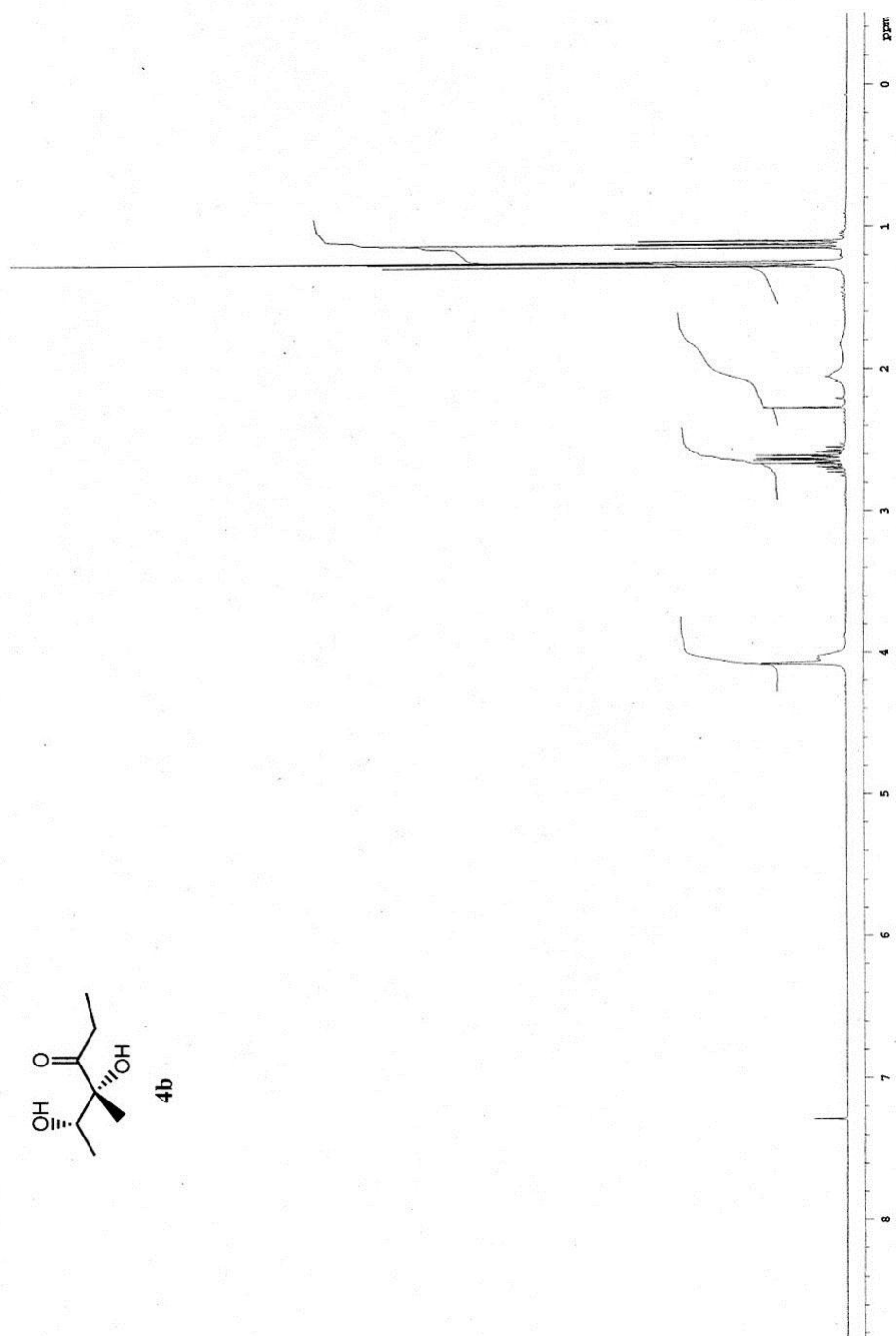
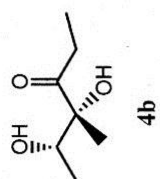


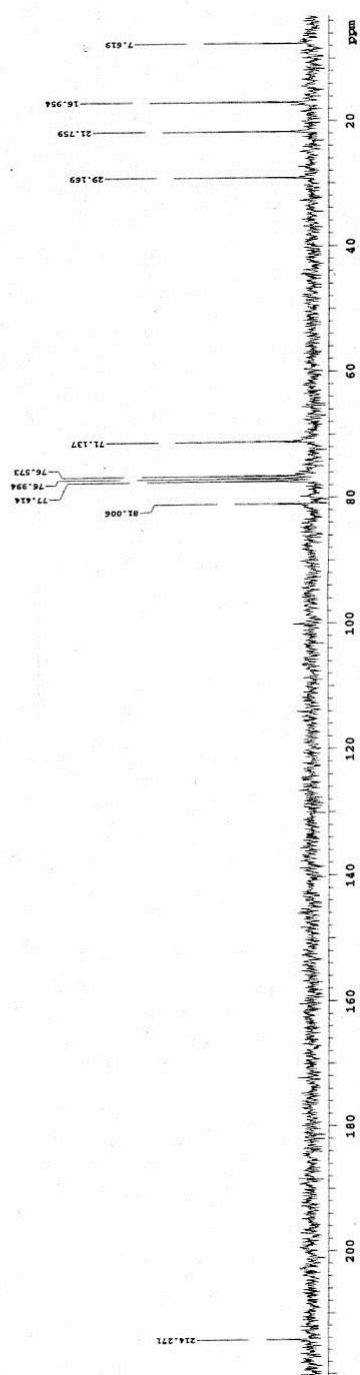
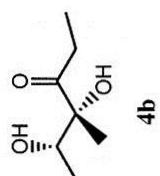
4a

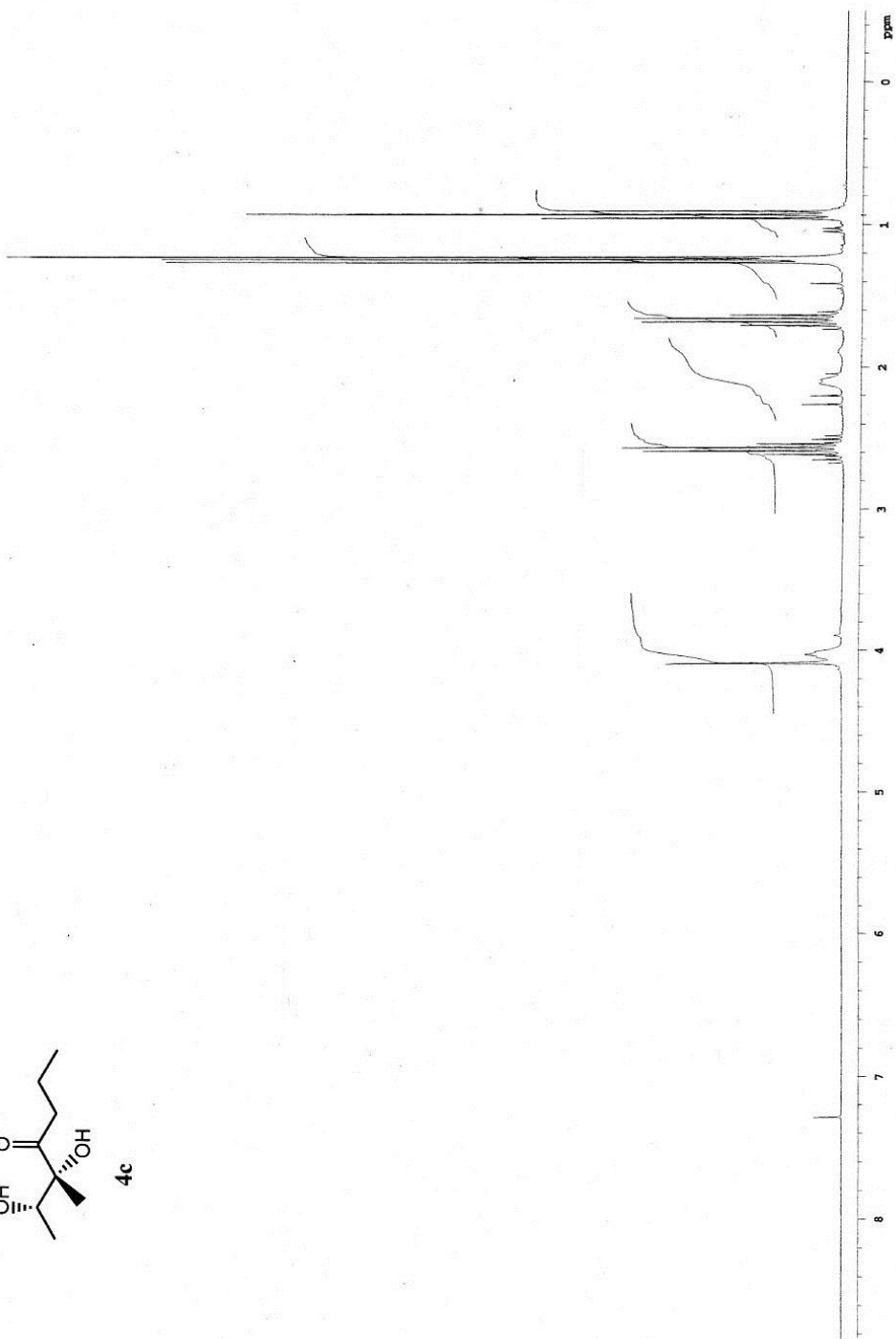
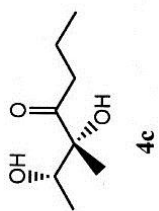


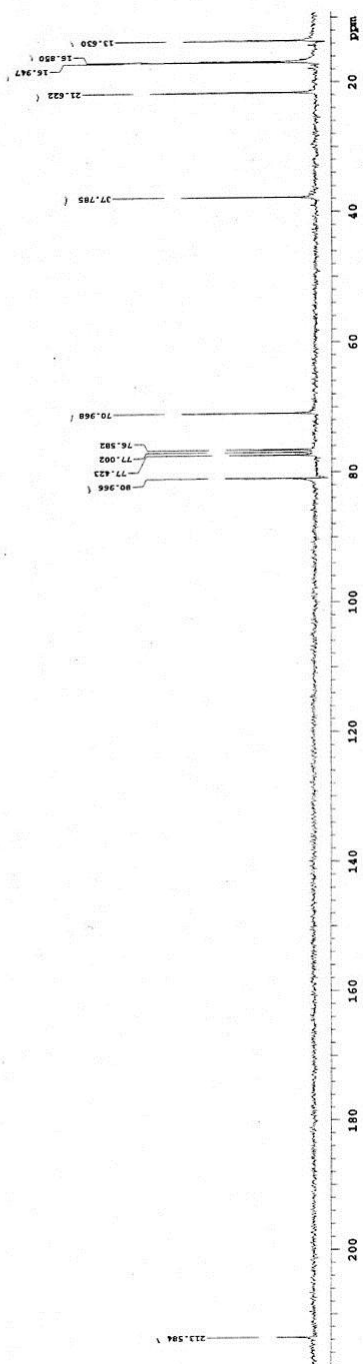
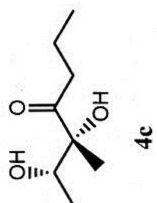


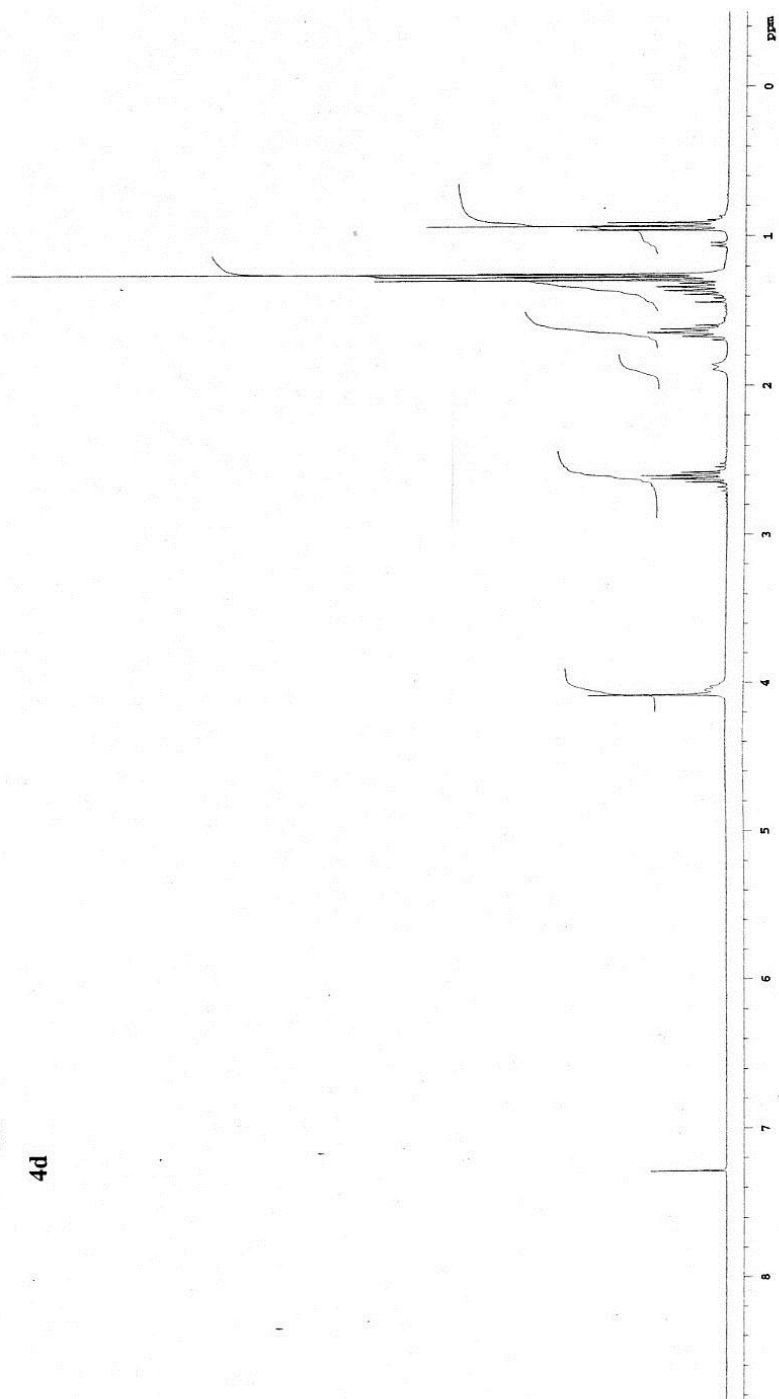
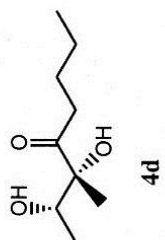


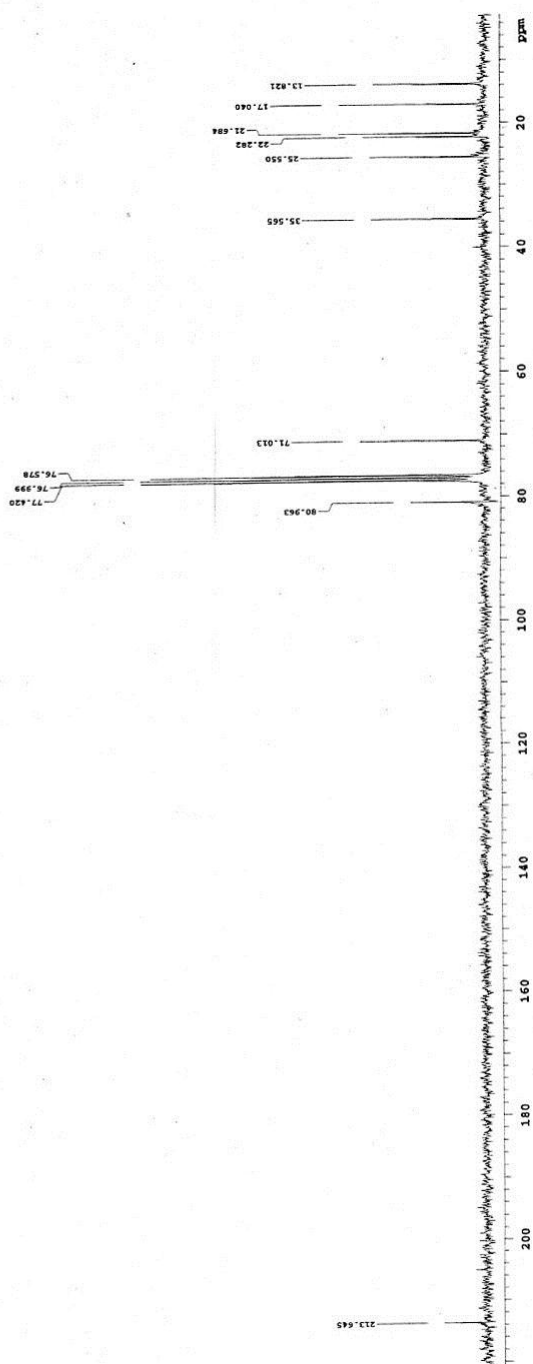
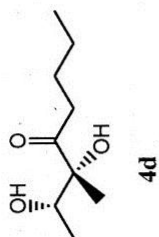


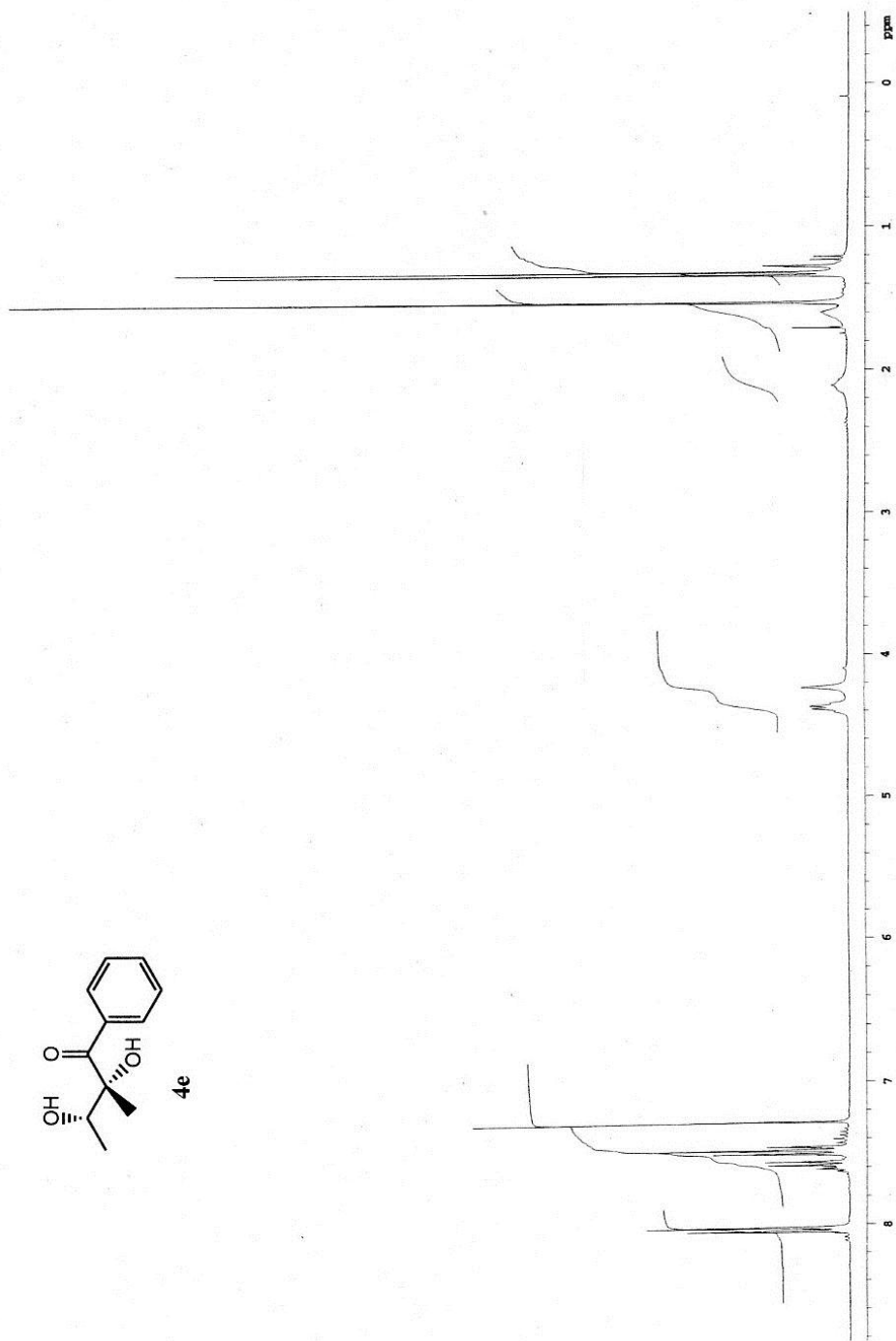
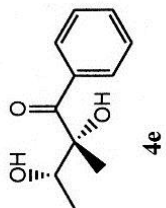


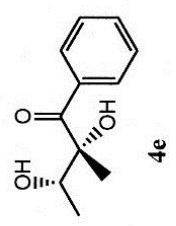
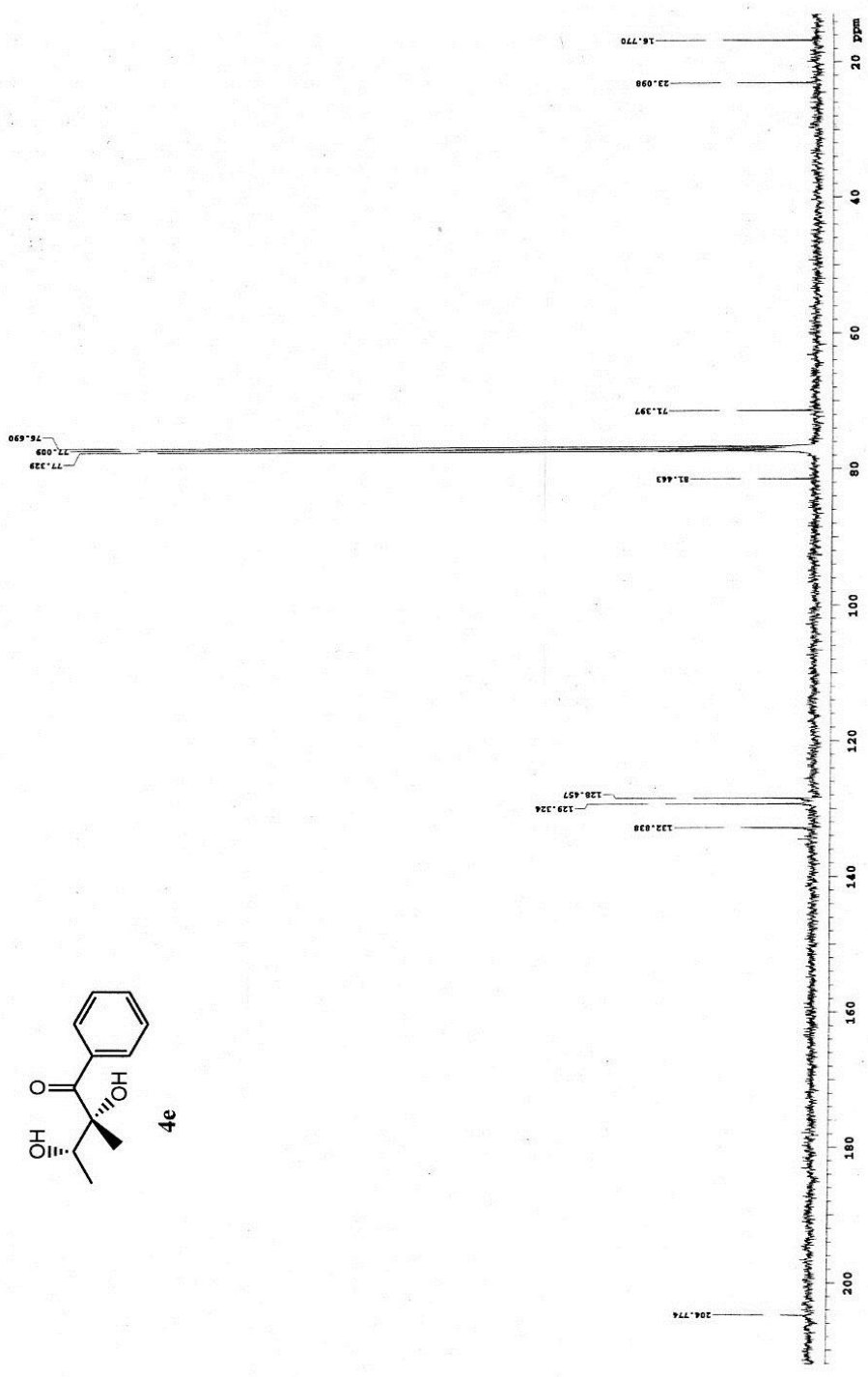


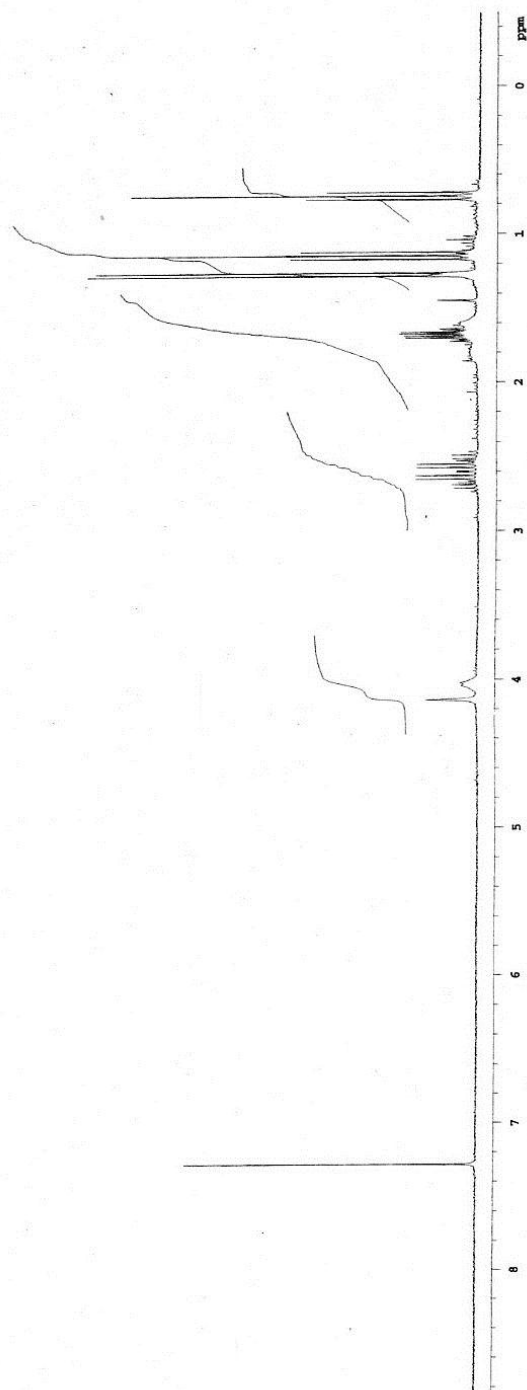
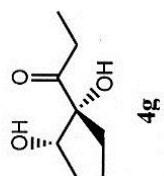


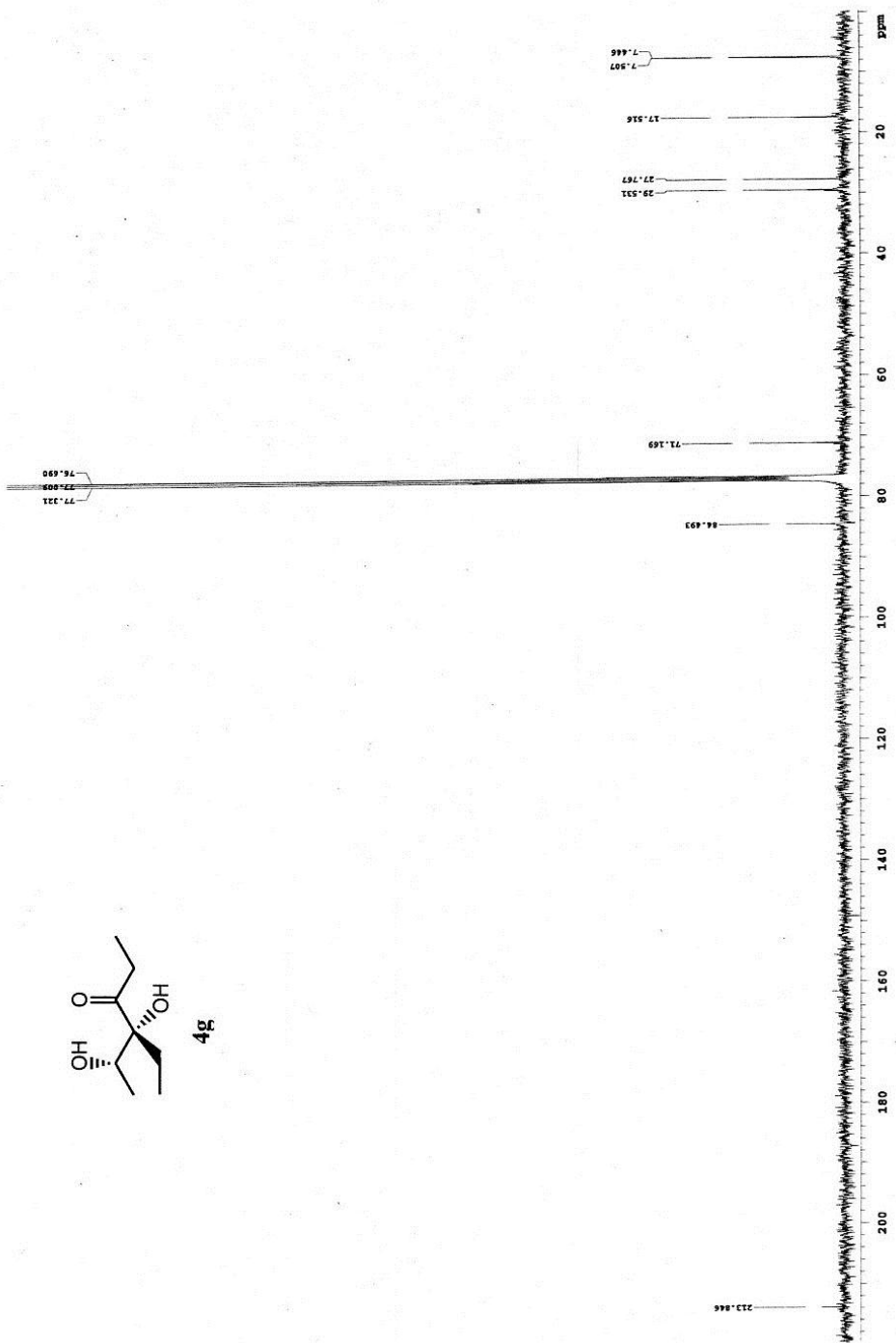


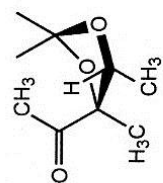




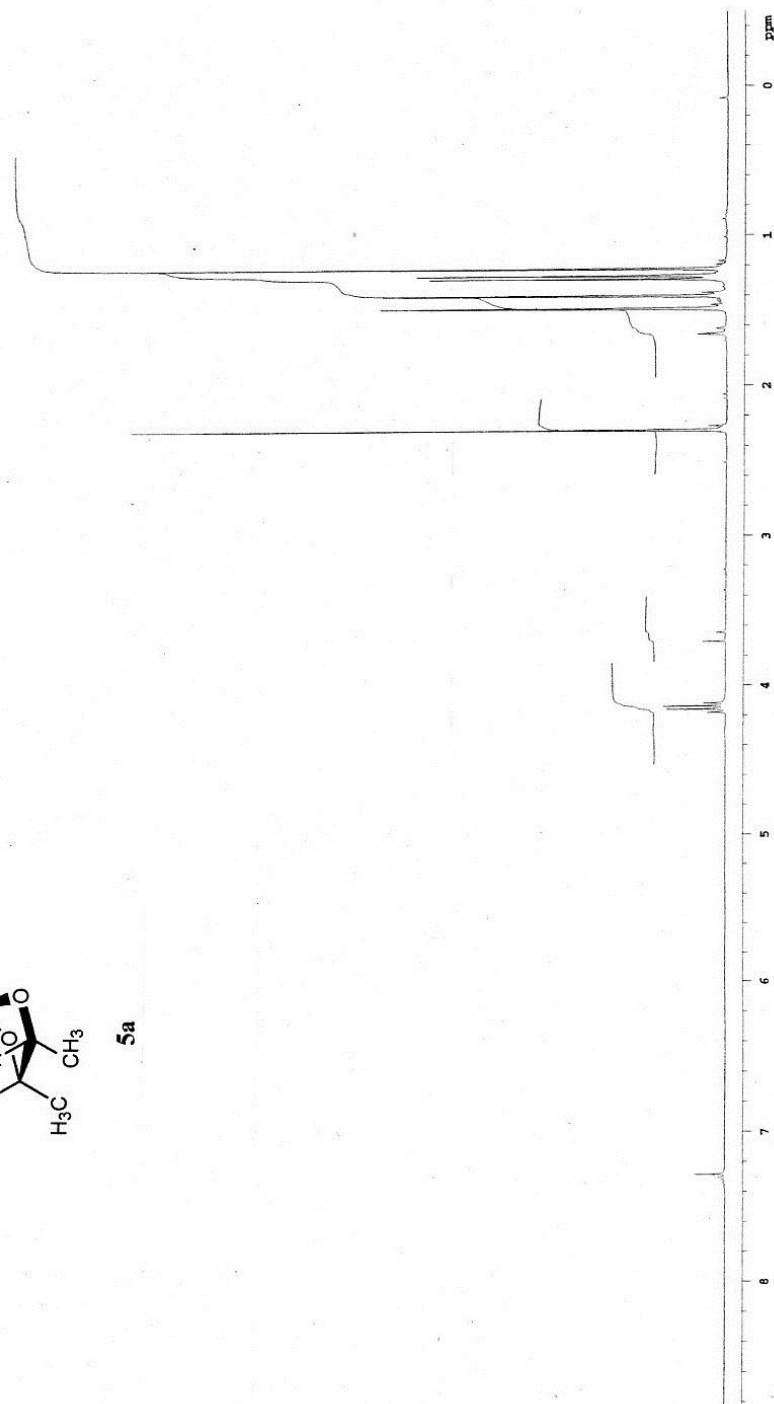


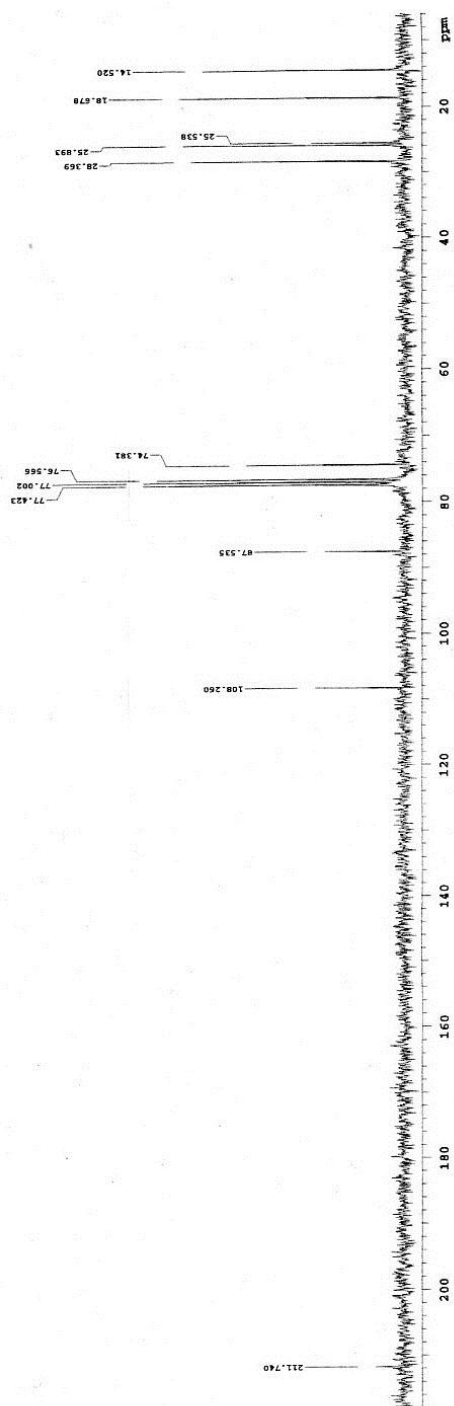
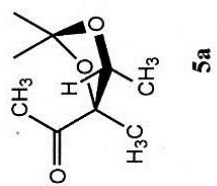


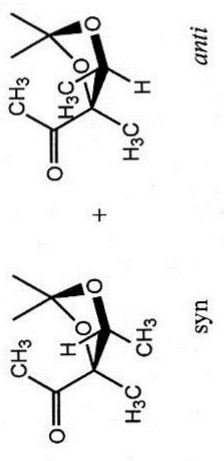
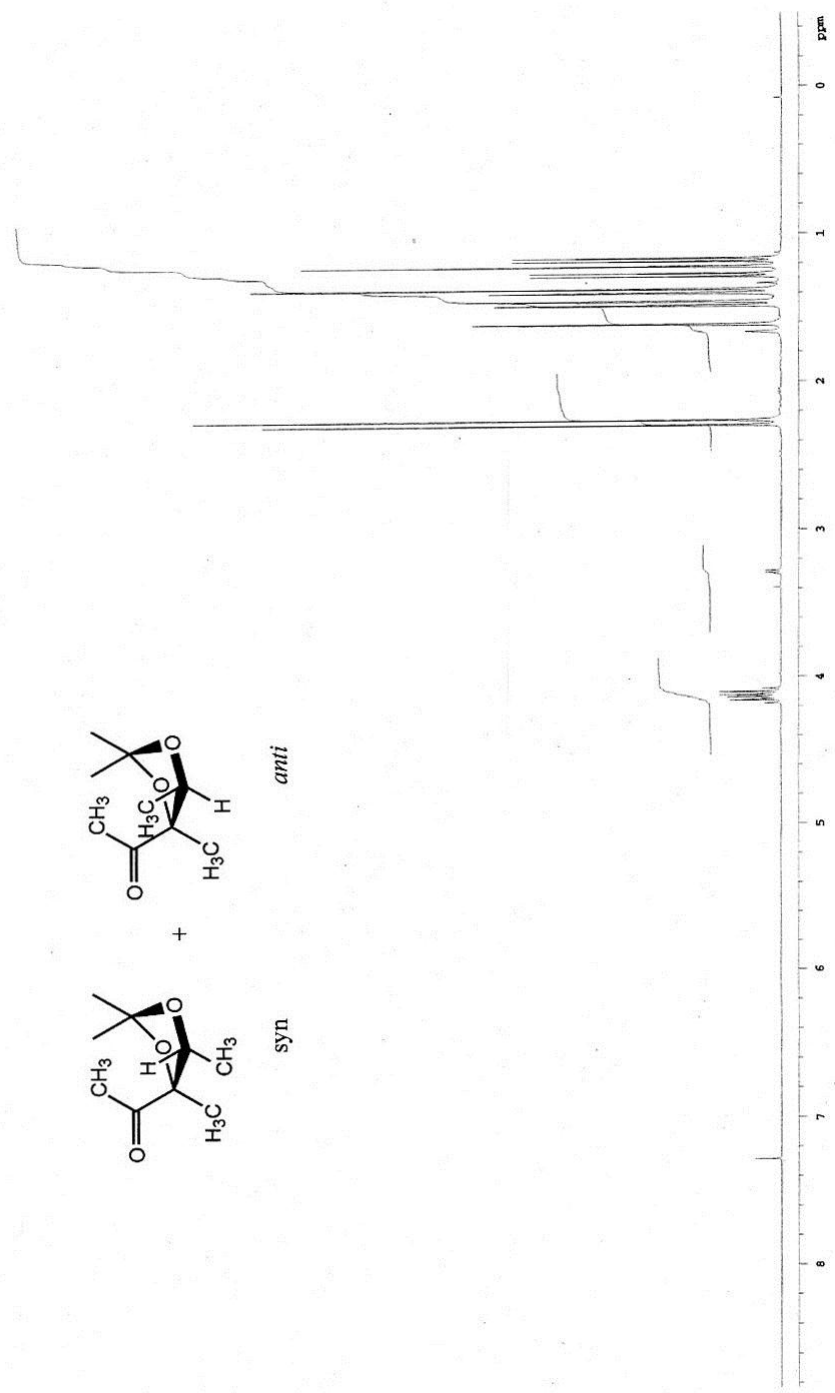


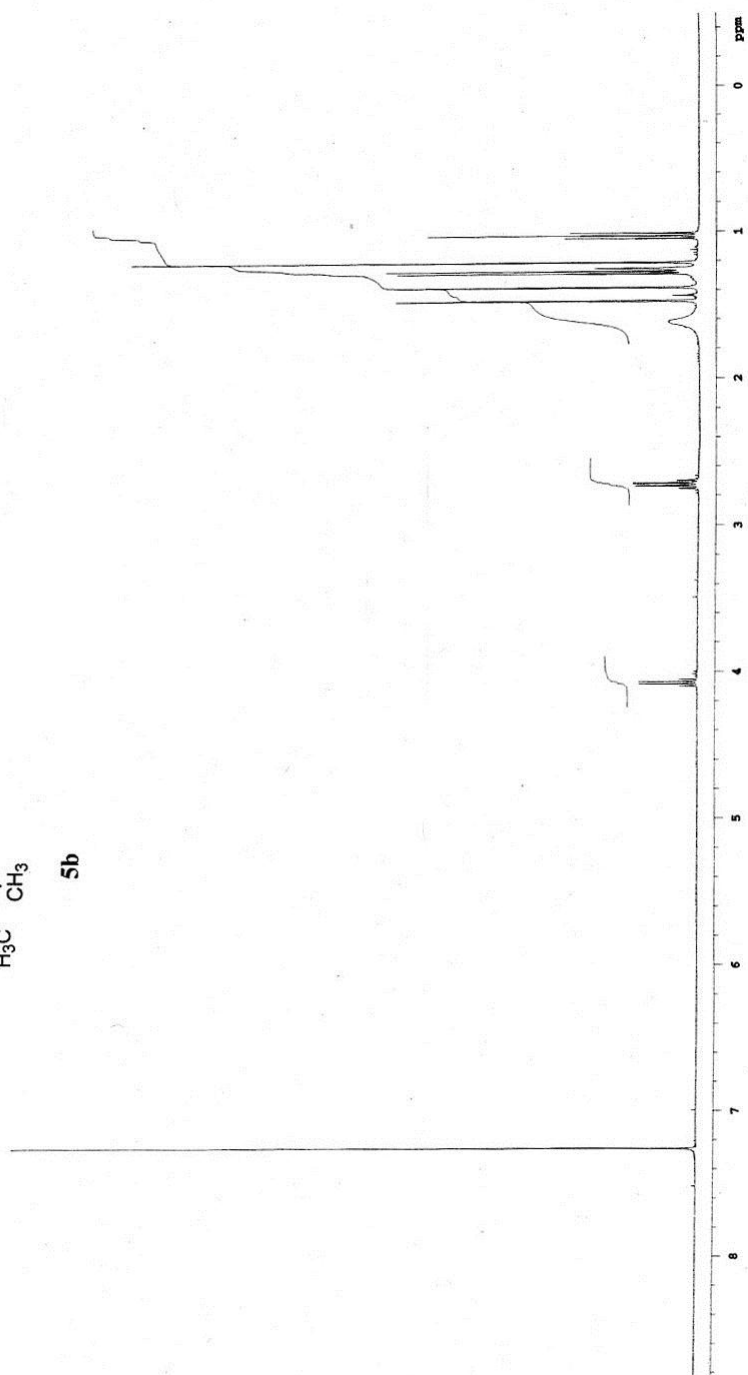
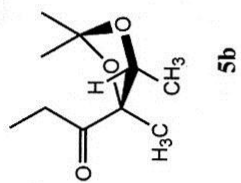


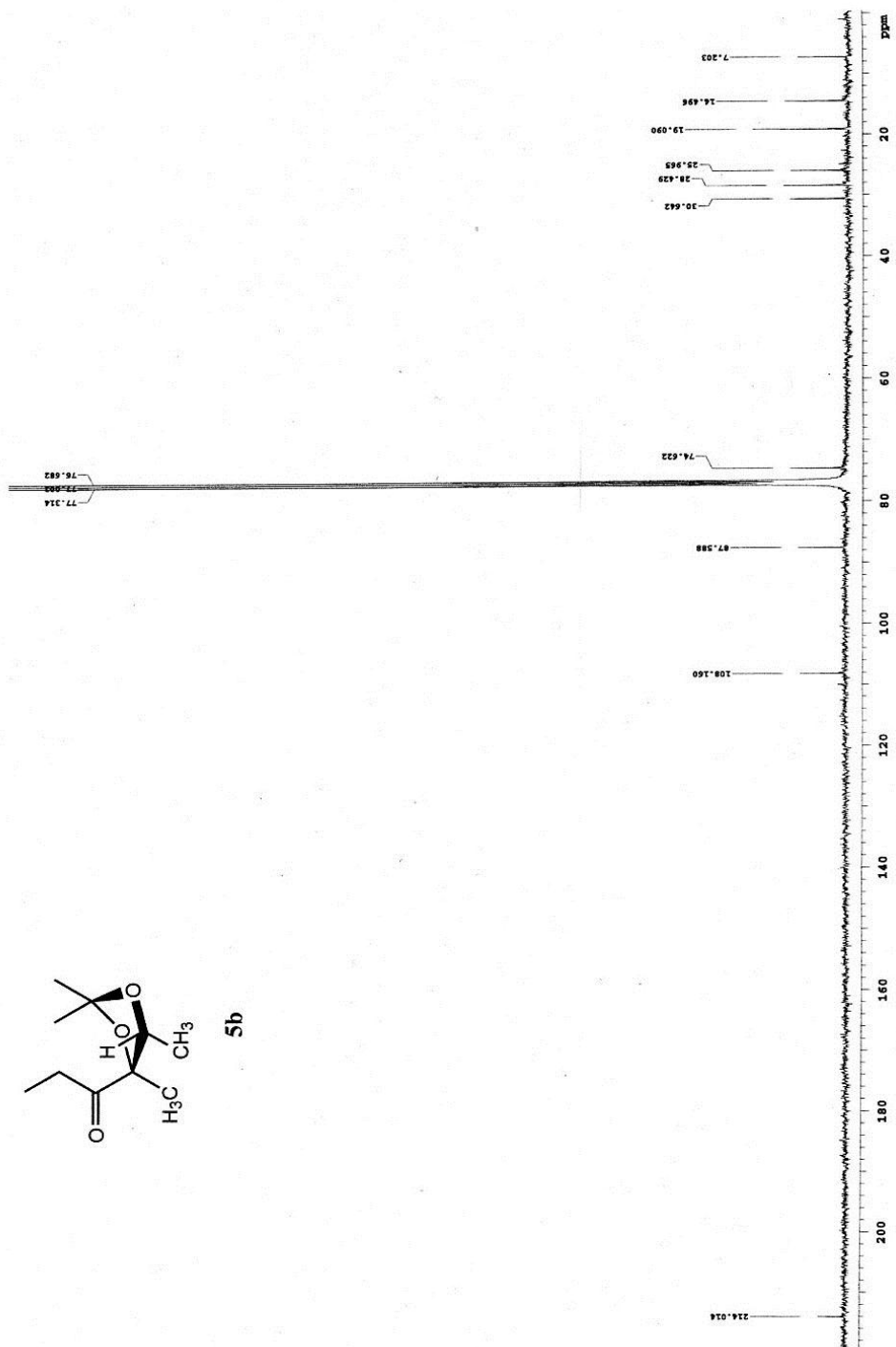
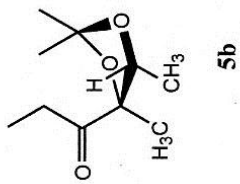
5a

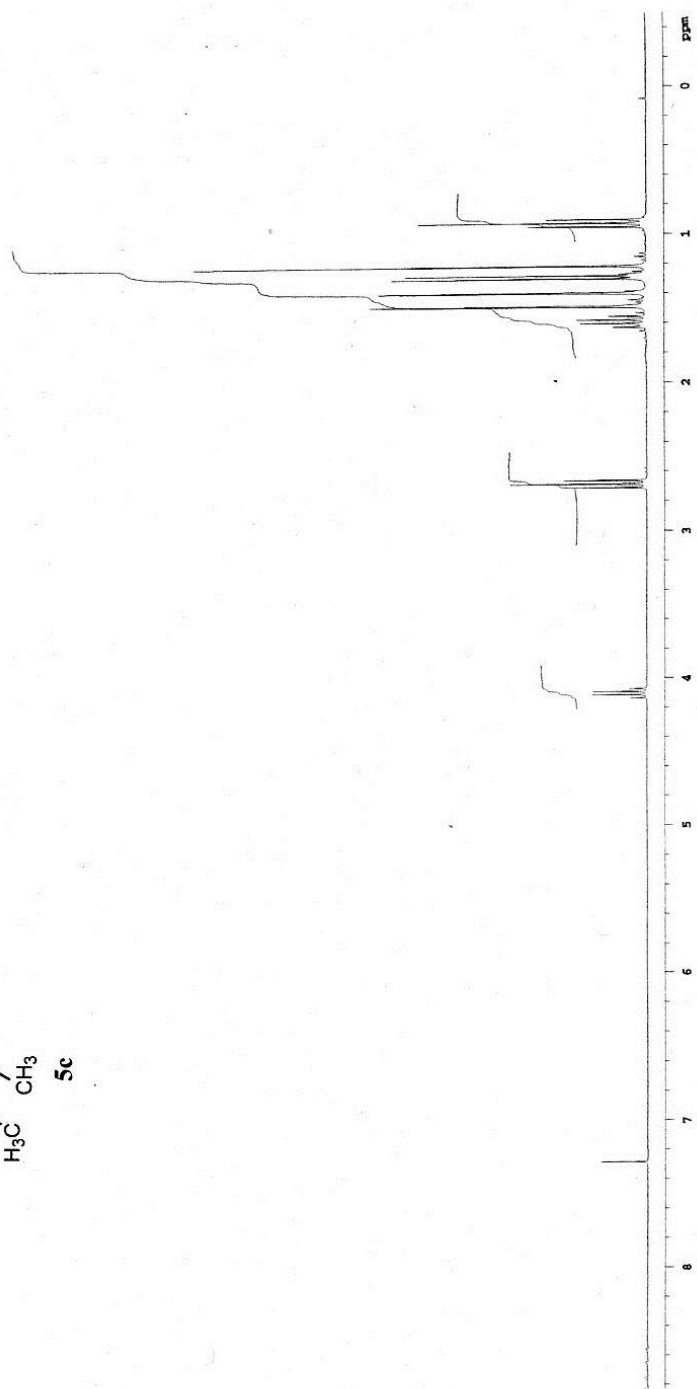
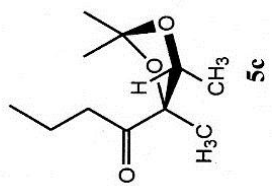


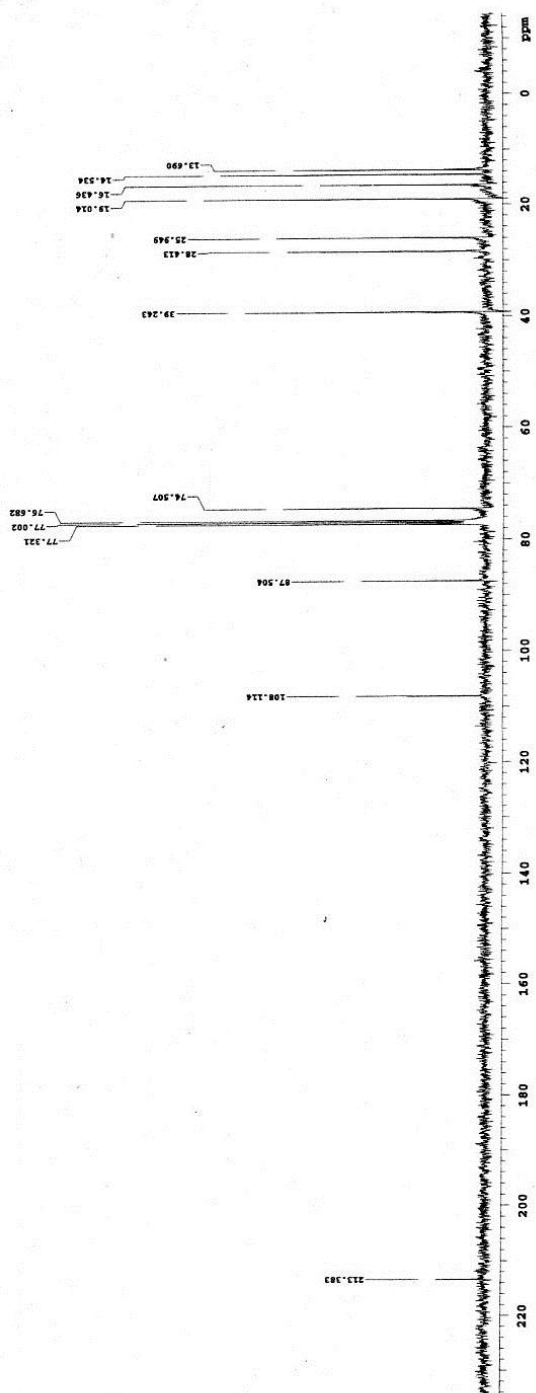
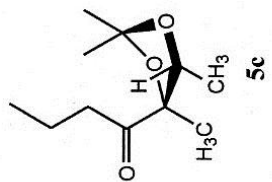


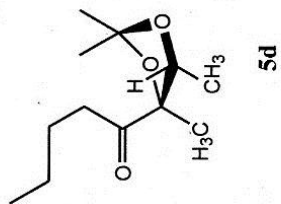




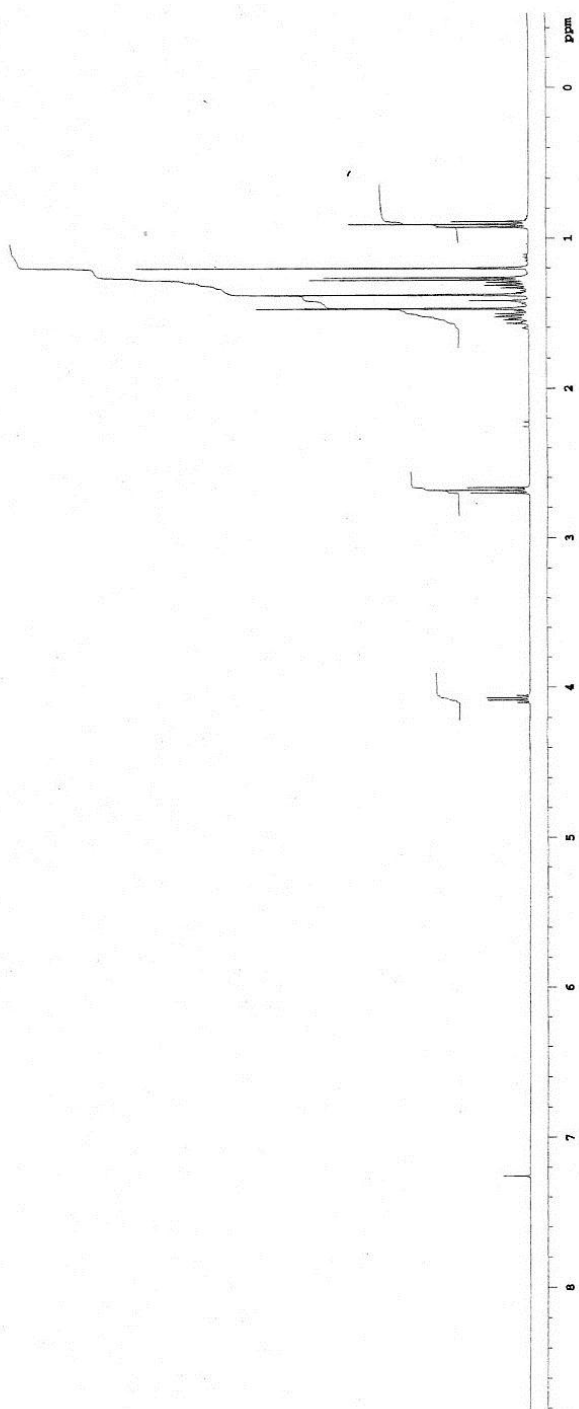


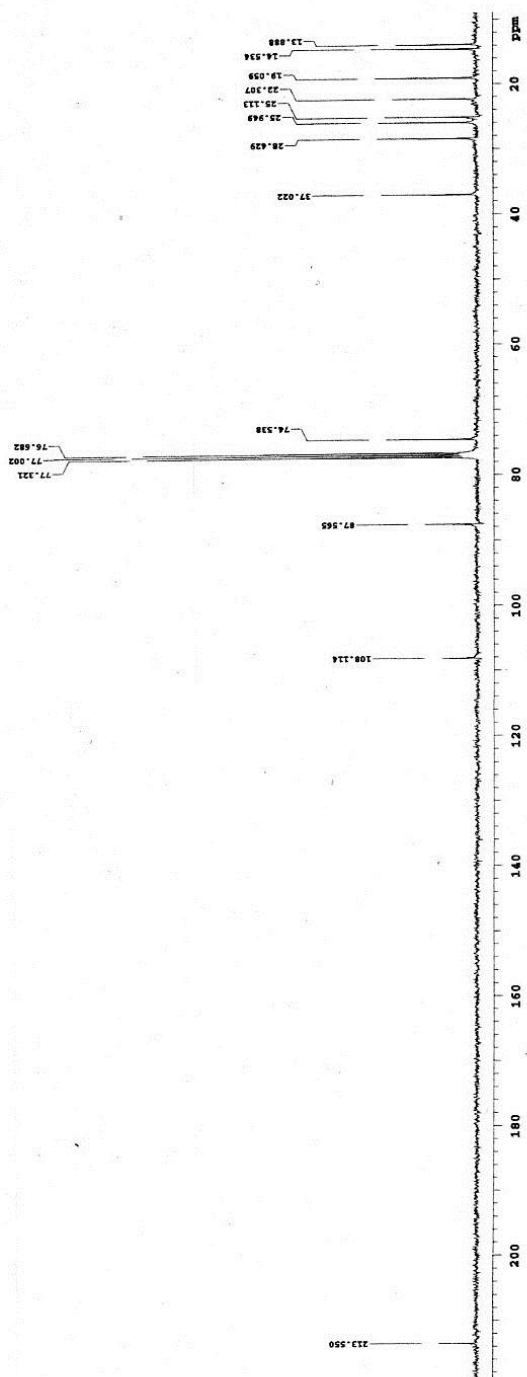
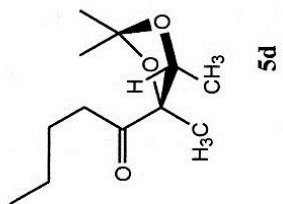


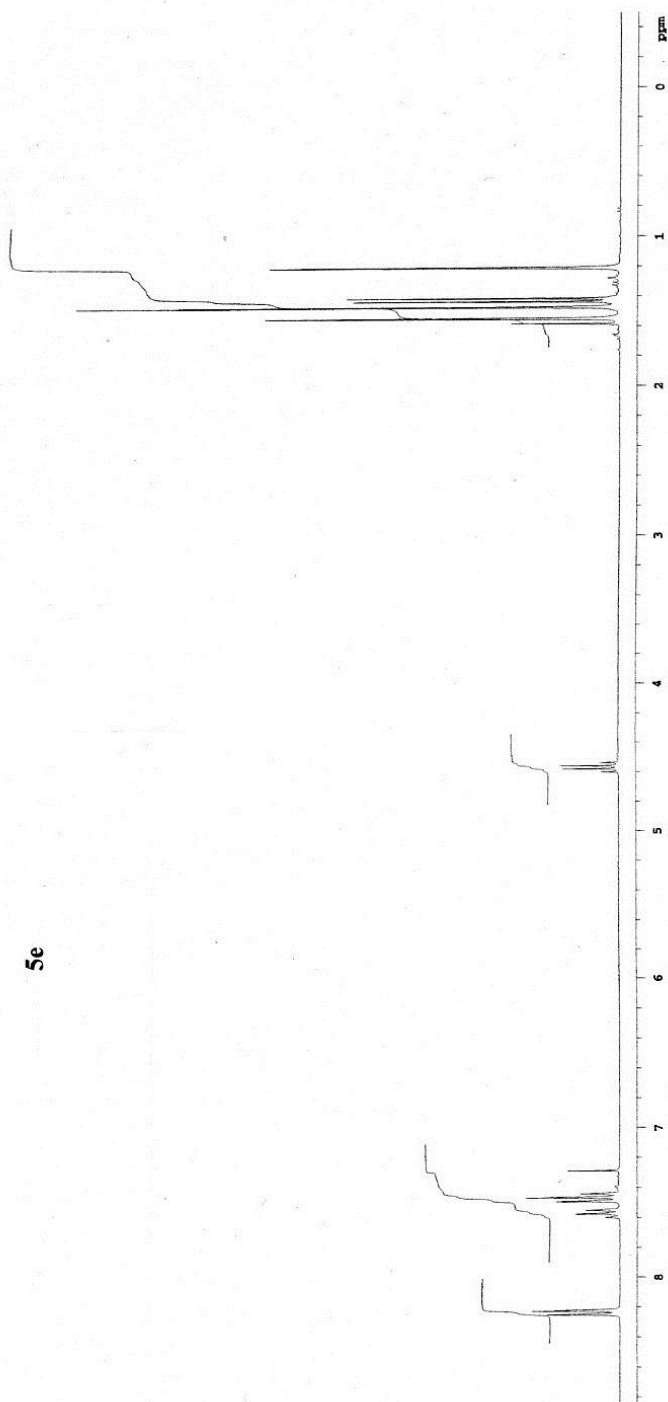
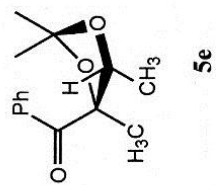


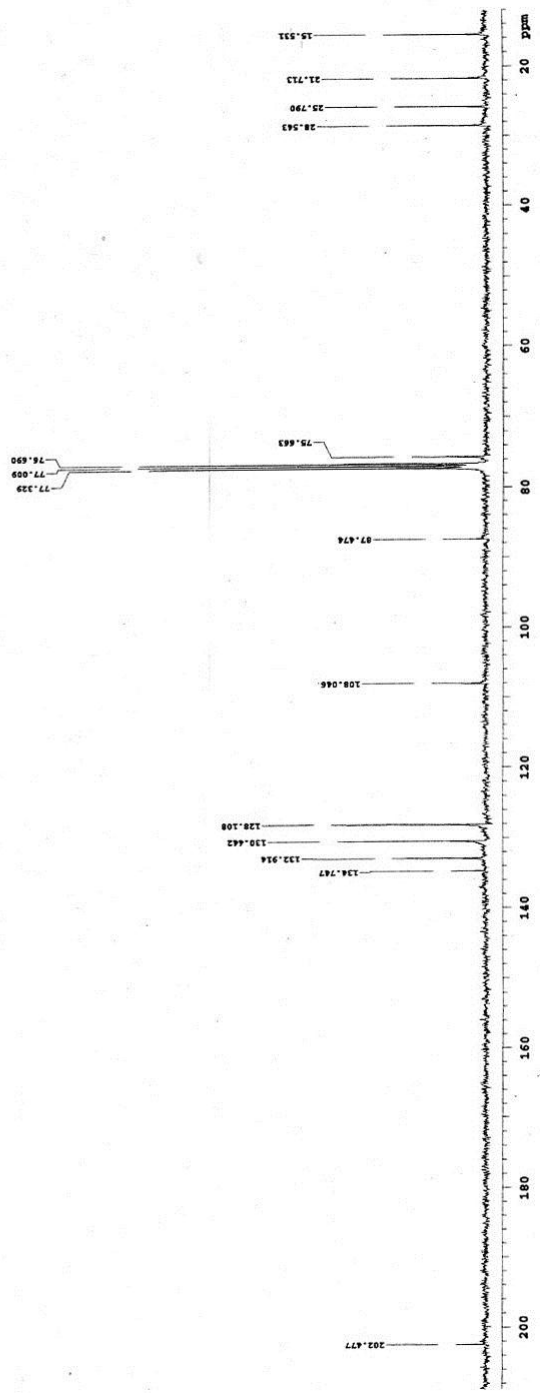
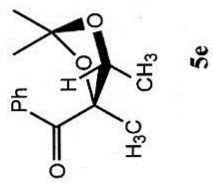


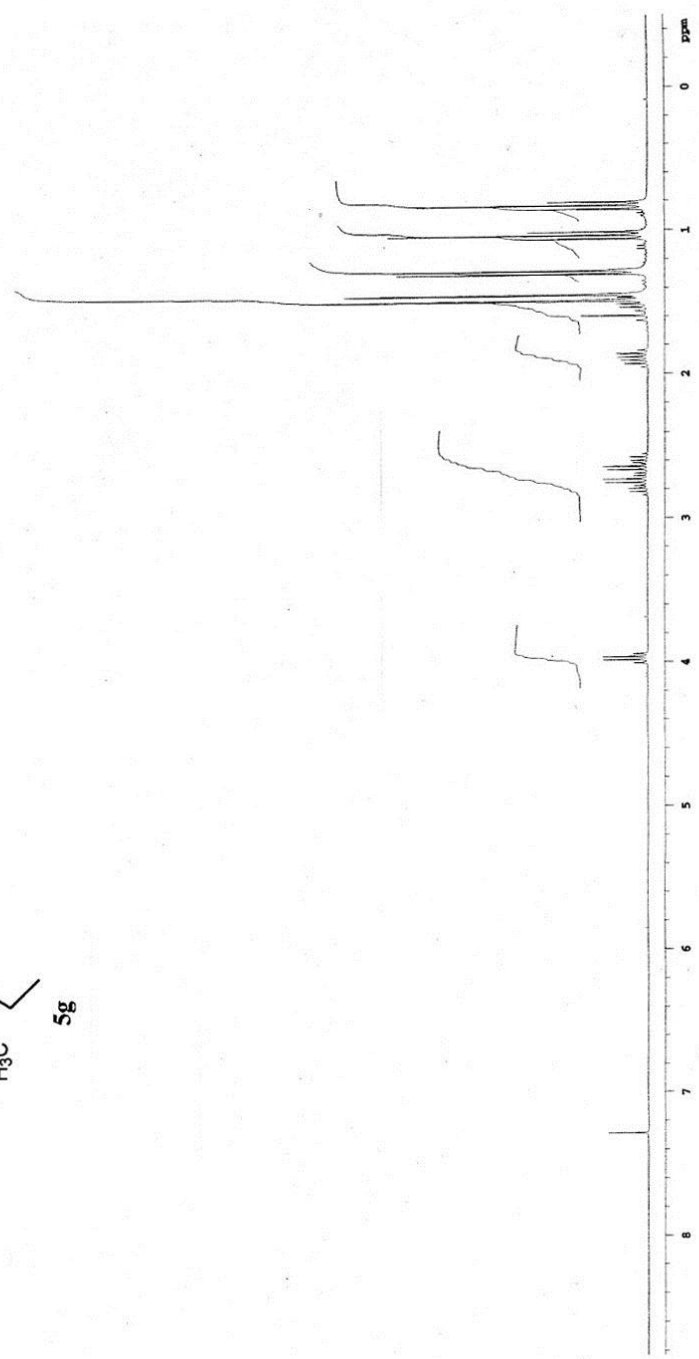
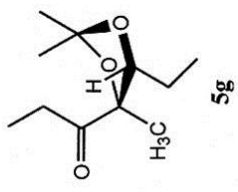
5d

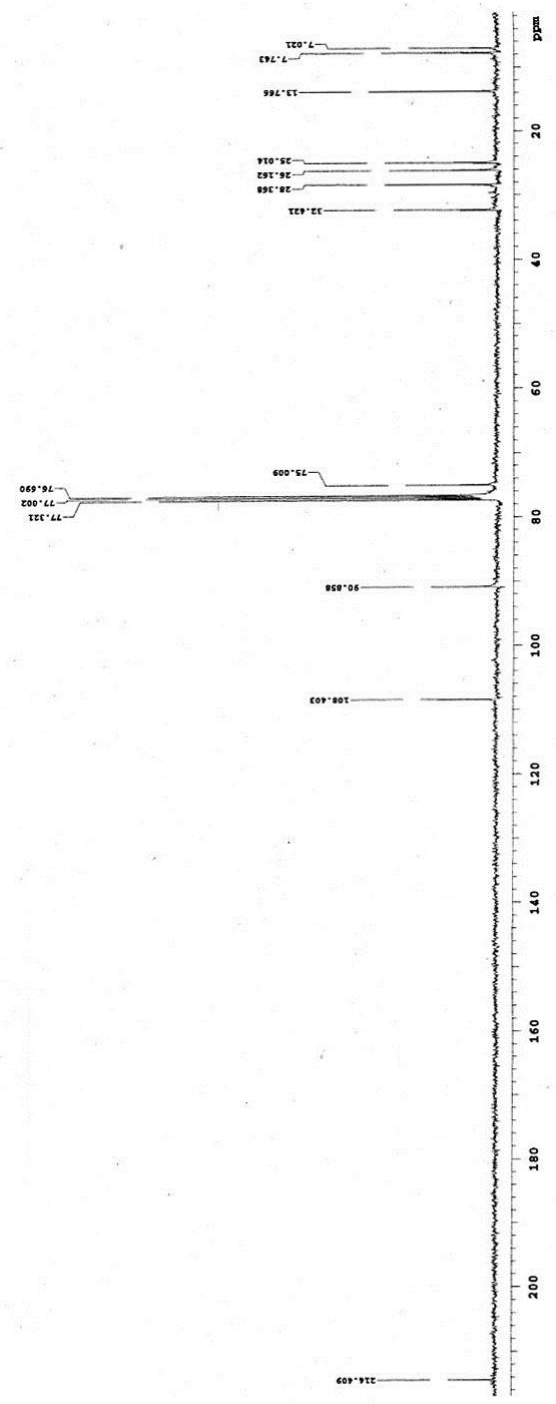
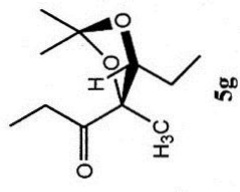


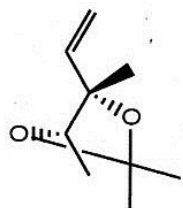




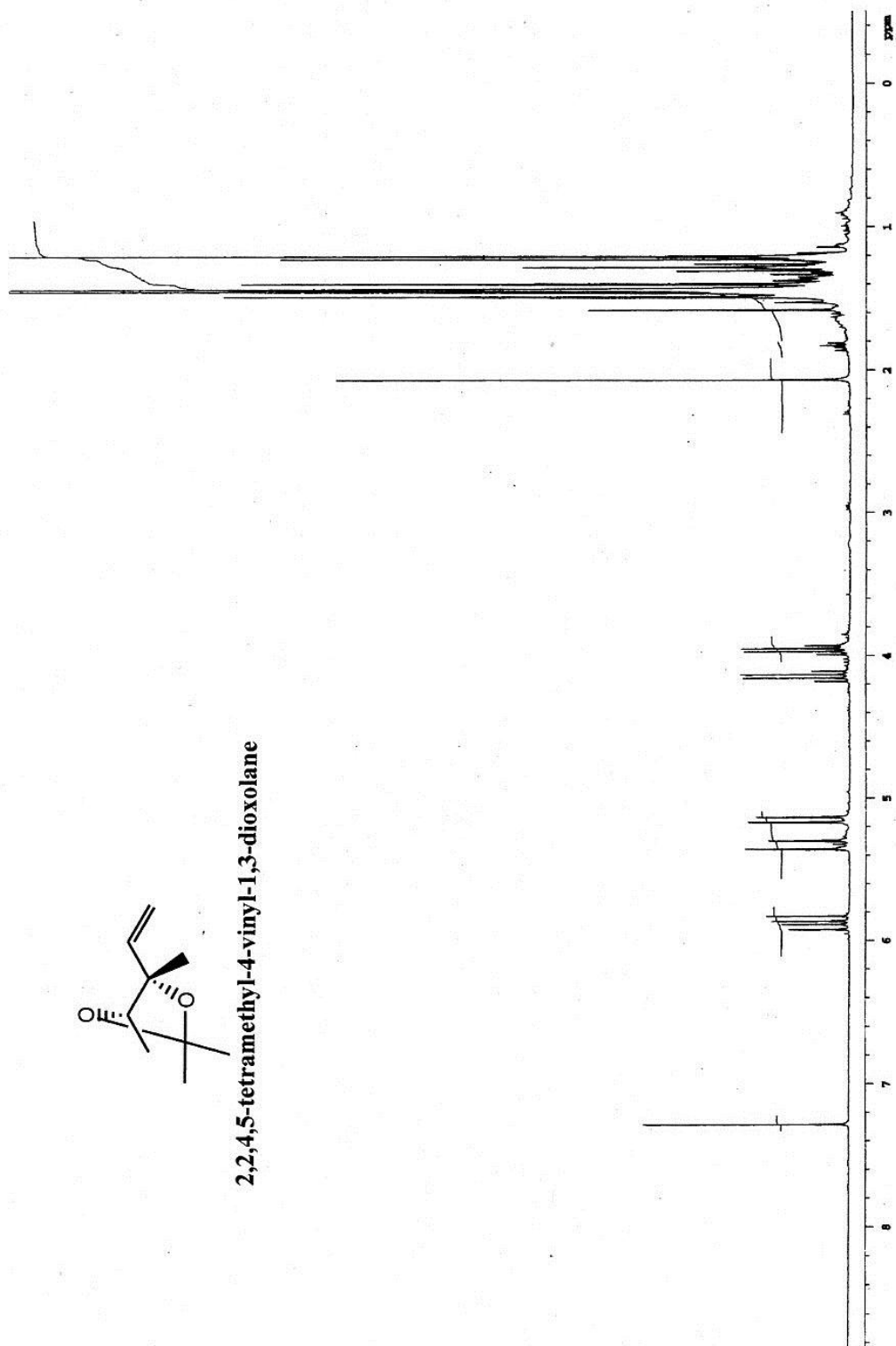


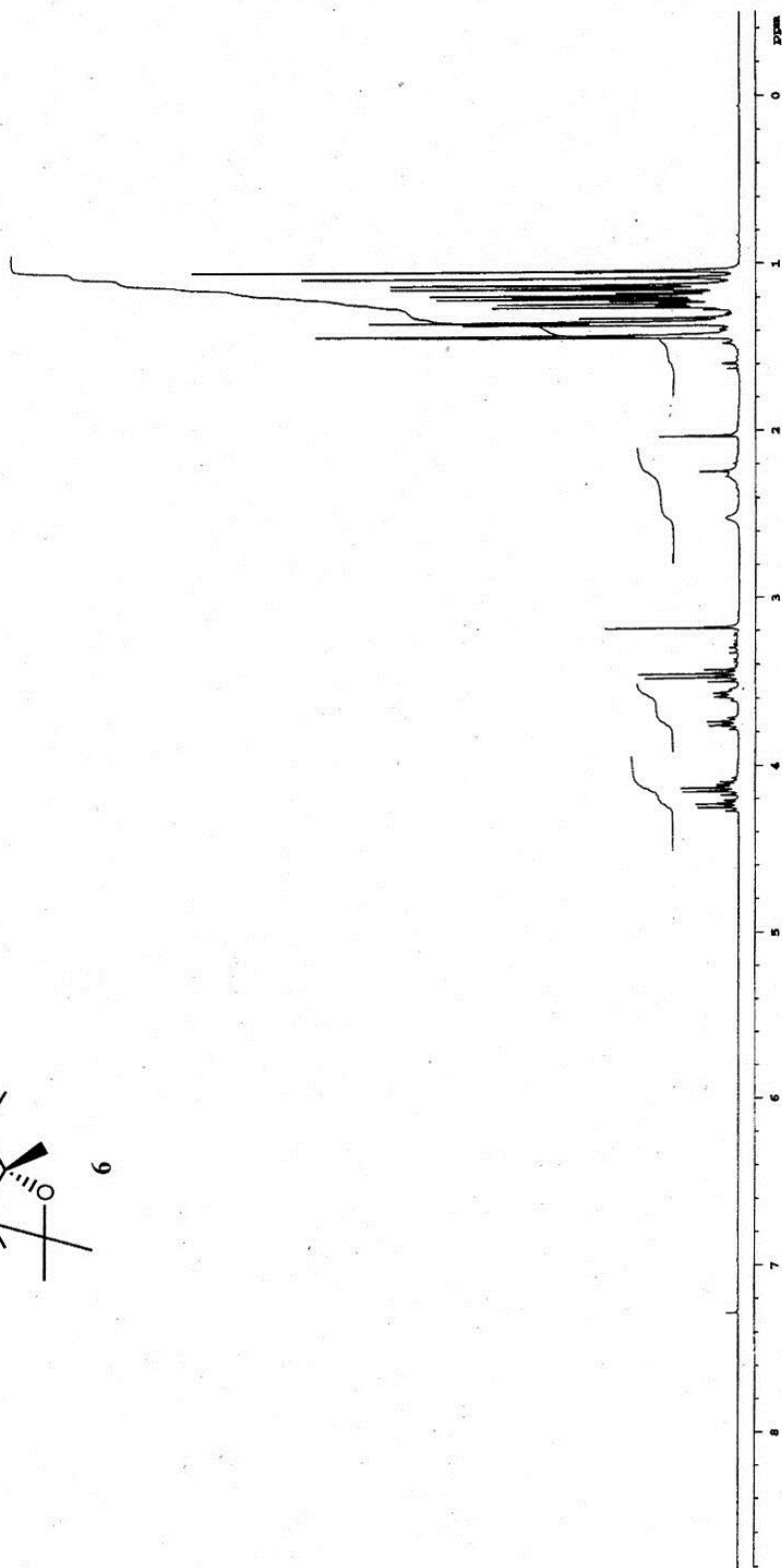
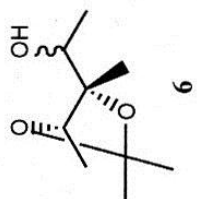


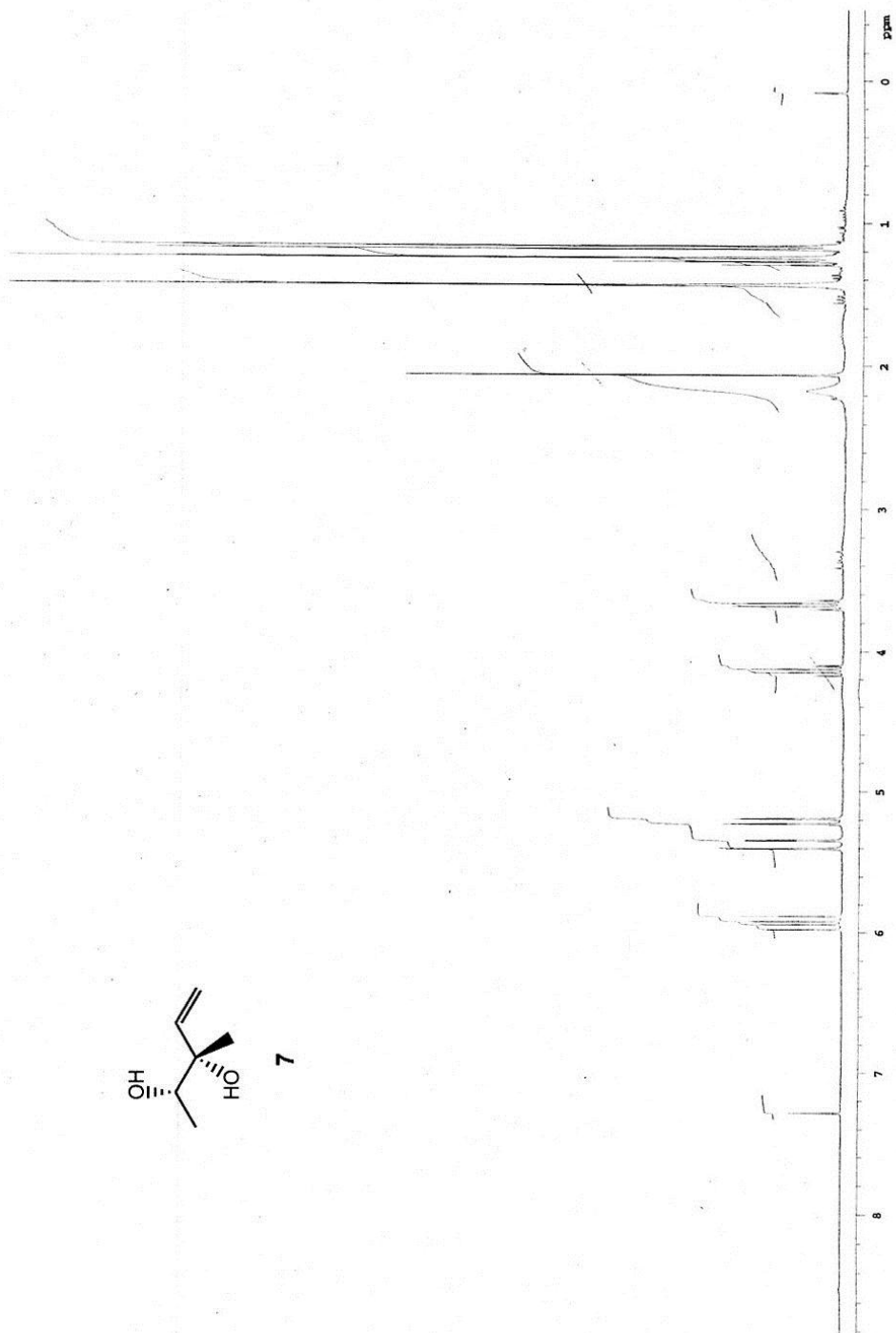
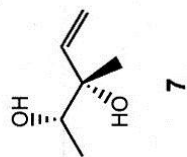


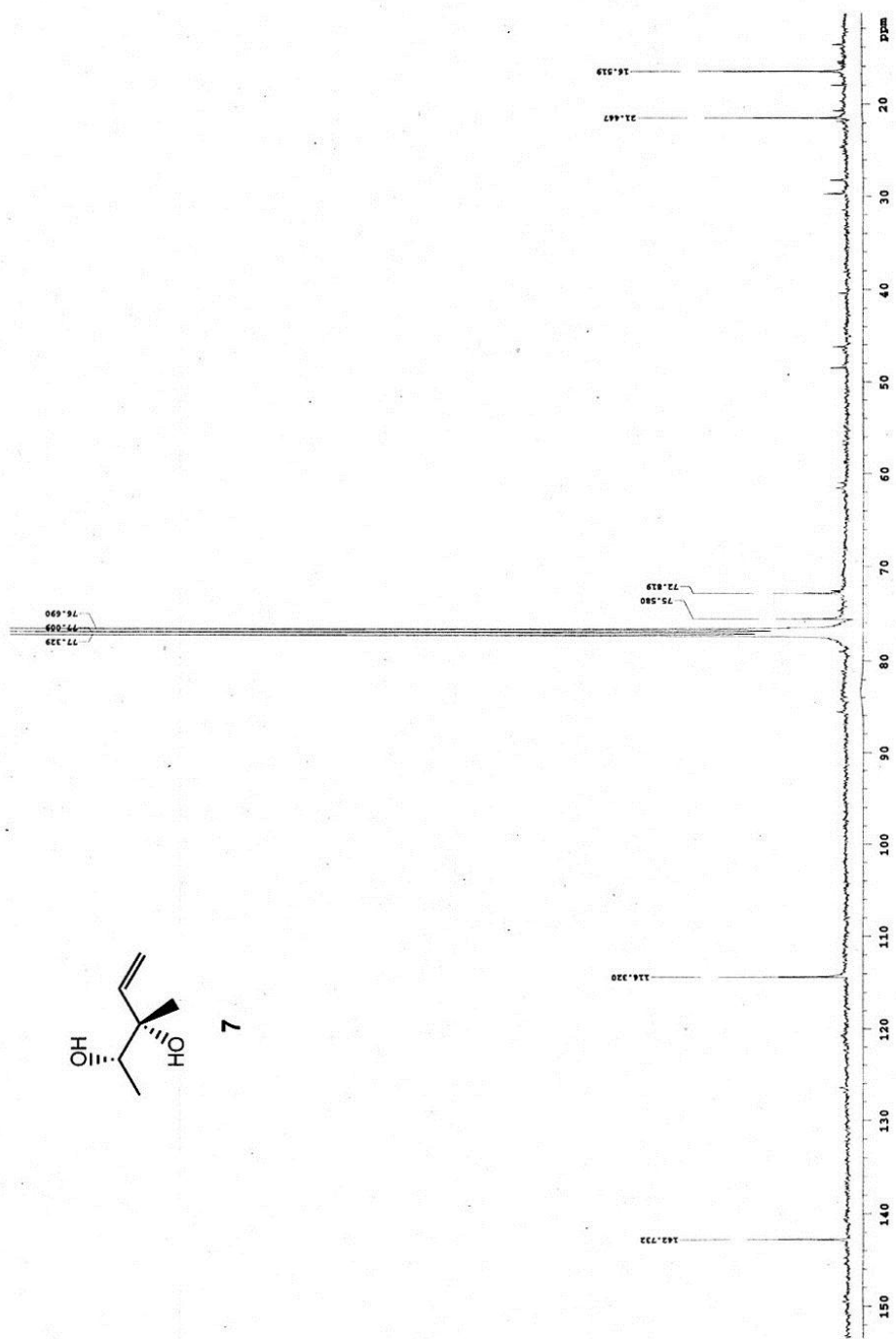


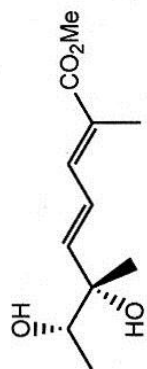
2,2,4,5-tetramethyl-4-vinyl-1,3-dioxolane



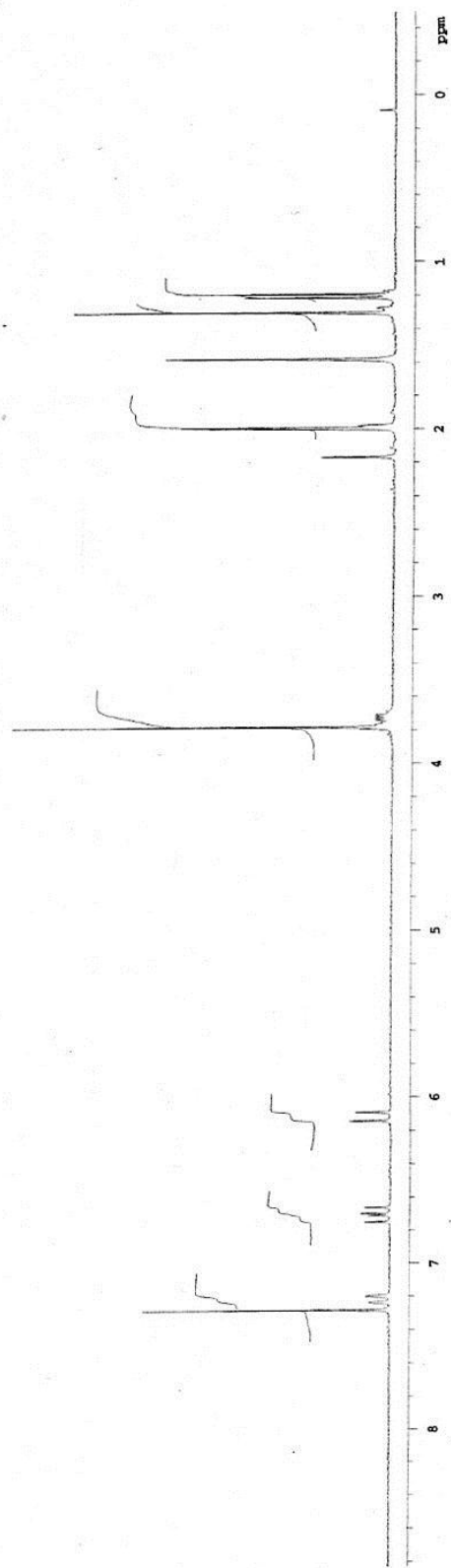








8 (+)-citrodiol



**ACETIL ACETOINO SINTASI NELLA
SINTESI DELL'AROMA DEL TE'**

La chiralità è un aspetto fondamentale nella chimica dei composti biologicamente attivi, sia che siano applicati in campo farmaceutico sia in campo nutraceutico. La maggior parte delle molecole chirali volatili, descritte come profumi ed aromi, sono presenti in natura come miscele enantiomeriche che mostrano spesso una notevole prevalenza di uno dei due stereoisomeri. Quasi sempre solo uno degli enantiomeri è responsabile della percezione del sapore o dell'odore. La possibilità di disporre di tecniche di sintesi o di separazione enantioselettive è di fondamentale importanza per poter stabilire quale dei due enantiomeri sia il responsabile delle proprietà organolettiche di interesse. Una corretta caratterizzazione stereochimica può inoltre fornire importanti informazioni sulla genuinità, origine geografica, biogenesi e qualità dei prodotti alimentari. A fronte di queste importanti implicazioni, recentemente, si è registrato un incremento del numero di pubblicazioni che hanno come oggetto l'indagine stereochimica degli aromi naturali [67].

Nell'ultimo anno di dottorato l'interesse della ricerca si è concentrato sulla sintesi stereoselettiva di un importante componente naturale del tè verde basata sulla catalisi dell'enzima acetilacetoino sintasi (AAS) estratto da *B. licheniformis*; tale approccio, inoltre, rappresenta un esempio di risposta alle problematiche suddette. La molecola in questione è il 3-idrossi-3-metil-2,4-nonandione (**Fig. 1**), presente come componente minoritario nelle miscele di composti ottenuti per estrazione dal tè verde con etere etilico e responsabile delle note dolci e cremose che ne rendono l'infuso così gradevole al gusto [68].

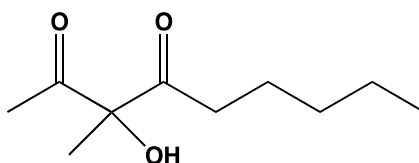
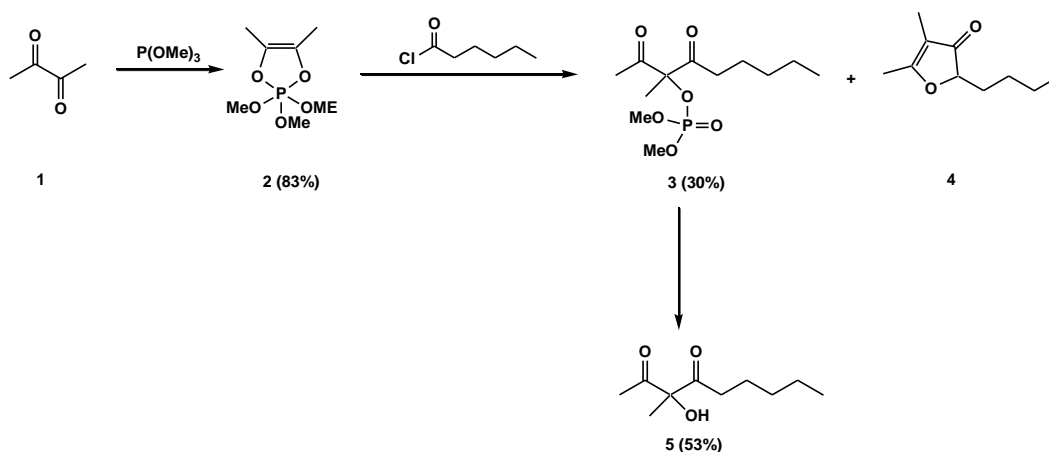


Figura 1. 3-Idrossi-3-metil-2,4-nonandione, aroma naturale del tè verde.

Un brevetto recente ha come oggetto l'impiego del 3-idrossi-3-metil-2,4-nonandione e di suoi analoghi, con la catena alchilica più o meno estesa, come

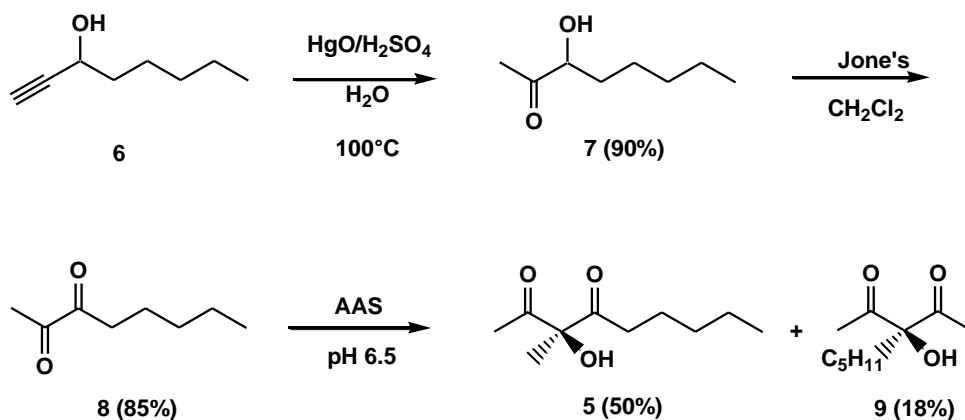
additivi alimentari in grado di aumentare la cremosità di prodotti come lo yogurt [69]. La strategia di sintesi, pubblicata dagli stessi autori del brevetto [70], parte da 2,3-butandione e attraverso tre passaggi che prevedono l'uso del trimetilfosfito e dell'esanoil cloruro permette di isolare il prodotto desiderato **5**, in forma racemica, con una resa globale del 13% (**Schema 1**). La possibilità di disporre di una metodologia per la sintesi stereoselettiva del composto **5** è importante considerando il fatto che in letteratura non è mai fatta menzione della configurazione assoluta del composto naturale.



Schema 1. Sintesi del 3-idrossi-3-metil-2,4-nonandione proposta da Alaini [70]

La sintesi chemo-enzimatica del 3-idrossi-3-metil-2,4-nonandione proposta in questo capitolo (**Schema 2**) prevede un primo passaggio dal quale, attraverso l'idratazione con HgO e H_2SO_4 del triplo legame terminale di 1-octin-3-olo **6**, un prodotto commerciale, si ottiene la formazione dell'idrossichetone **7** con resa del 90%. La successiva ossidazione con piridinio clorocromato (reattivo di Jones) del composto **7** permette di isolare con ottime rese (85%) il 2,3-nonandione **8** [71]. L' α -dichetone **8** viene utilizzato come substrato in una reazione di homo-coupling catalizzata da AAS, condotta seguendo la stessa metodologia illustrata nel capitolo 3. Come previsto si ottiene l'*R*-3-idrossi-3-metil-2,4-nonandione **5** (50%, con resa globale del 18%). Come già riportato per le reazioni di homo-coupling di α -dichetoni non simmetrici (Cap. 3) [40], anche in questo caso il trasferimento

dell'acetil-anione catalizzato da AAS porta alla formazione di **5** e del suo regioisomero simmetrico **9** (18%), con il rilascio di acido esanoico. L'acido esanoico viene eliminato lavando l'estratto organico della miscela di reazione con una soluzione acquosa di NaHCO₃, mentre la separazione dei due regioisomeri si ottiene per cromatografia flash.



Schema 2. Sintesi chemo-enzimatica di 3-metil-2,4-nonandione **5**

L'analisi GC-MS su colonna chirale del prodotto **5** purificato indica un eccesso enantiomerico del 70% che, sulla base di quanto precedentemente affermato sull'enantioselettività delle reazioni catalizzate da AAS (Cap. 3 e 5), è attribuibile all'enantiomero con configurazione *R* (**Fig. 2**).

Il composto **5** è stato utilizzato direttamente come standard per determinare la configurazione assoluta del prodotto naturale presente negli estratti ottenuti da alcuni tipi di tè disponibili in commercio e provenienti sia dalla grossa distribuzione che da erboristerie (**Fig. 3**).

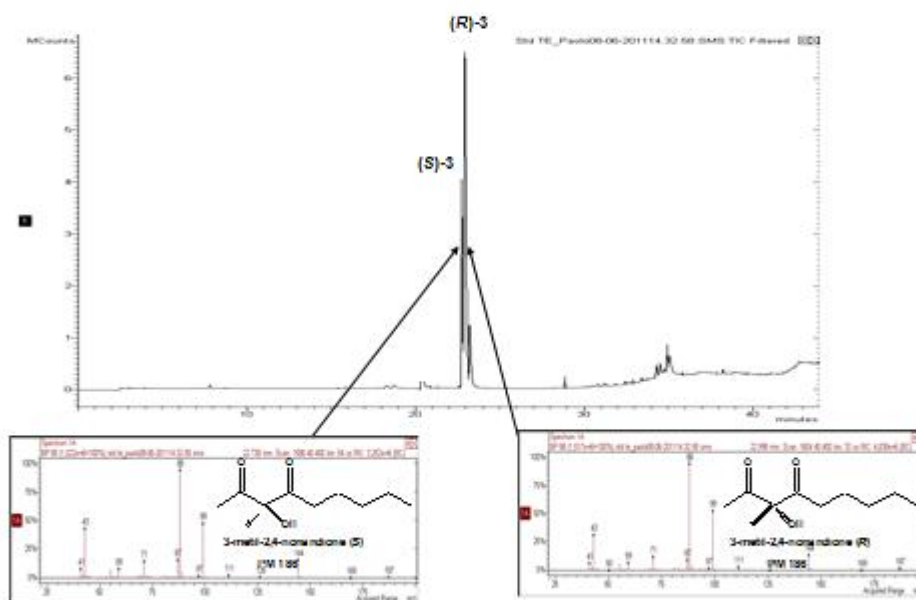


Figura 2. Analisi GC-MS chirale della miscela enantiomerica di 3-idrossi-3-metil-2,4-nonandione **5** ottenuto da sintesi enzimatica con AAS

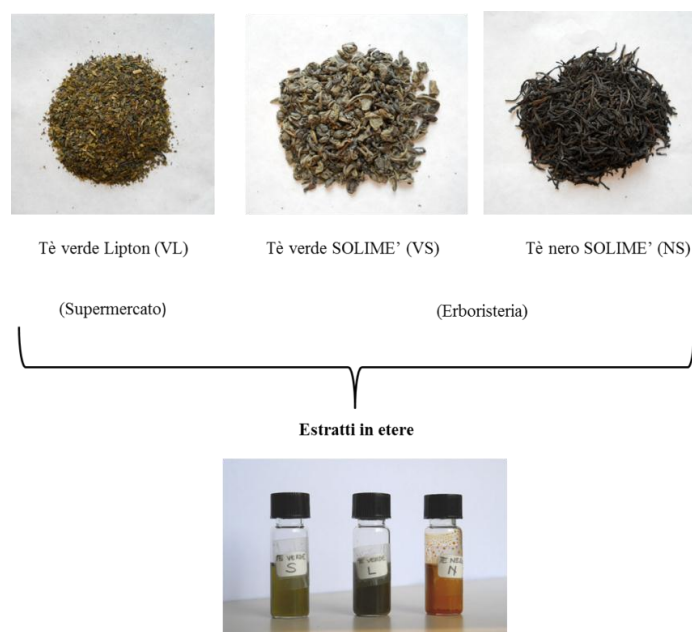


Figura 3. Estratti in etere ottenuti da tre differenti campioni di tè

L'analisi comparata tra il composto **5** ottenuto per sintesi e quello presente negli estratti dei campioni di tè commerciale è stata eseguita per GC-MS su colonna chirale. I dati attualmente a nostra disposizione sono quelli ottenuti dall'analisi di tre differenti campioni (VL, VS, NS), ma è in programma l'estensione dell'analisi ad un maggior numero di estratti. I risultati sono riportati nella **Figura 4**.

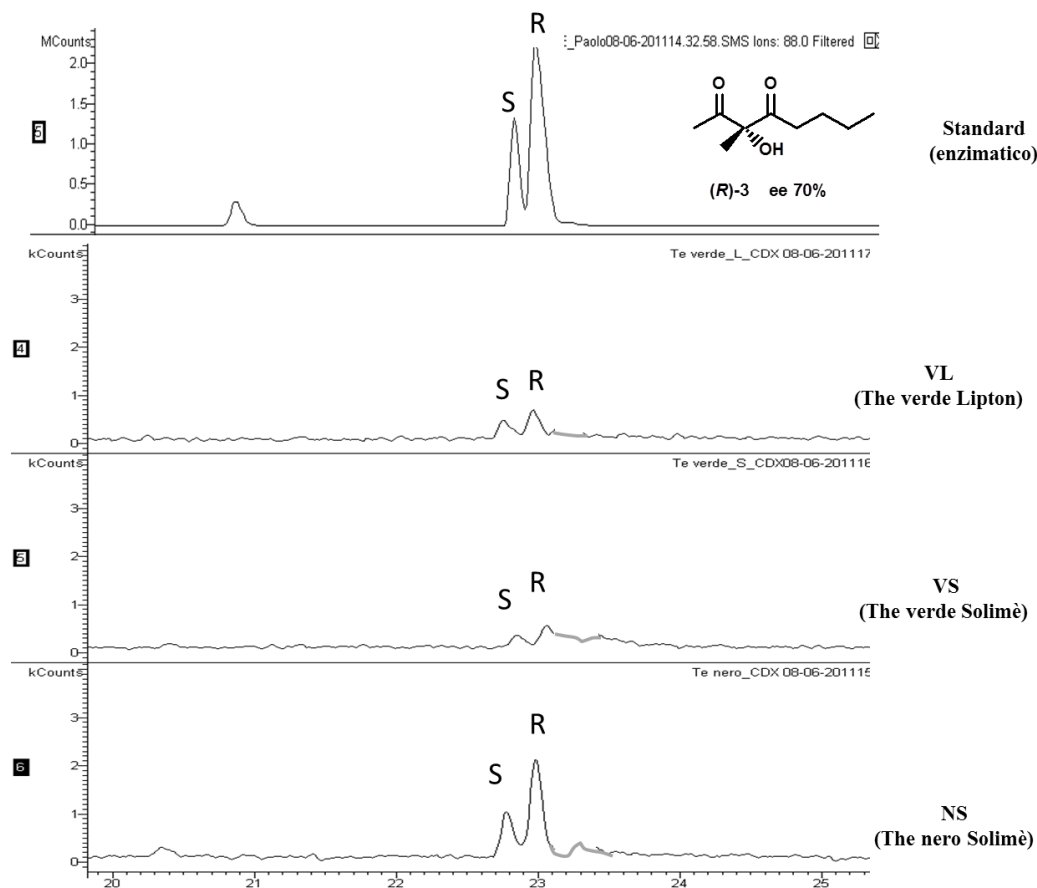
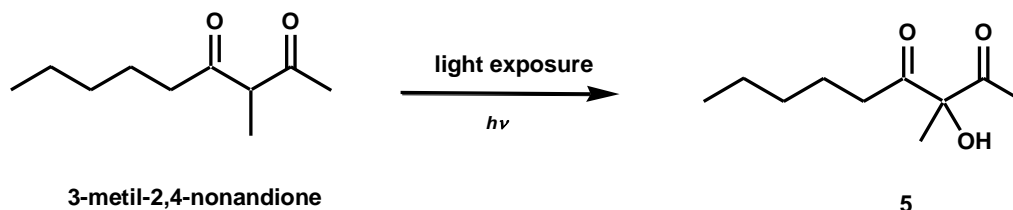


Figura 4. Analisi GC-MS chirale comparate del 3-idrossi-3-metil-2,4-nonandione **5** per sintesi chemo-enzimatica e per estrazione dalla matrice naturale

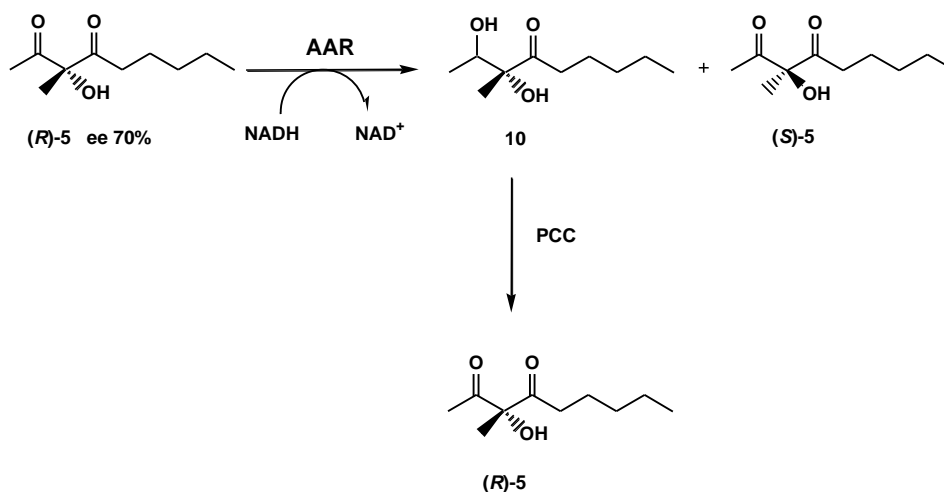
E' molto interessante notare che il composto **5** presente nei diversi estratti ha approssimativamente la stessa composizione enantiomerica di quello ottenuto per sintesi chemo-enzimatica. L'ipotesi attualmente accreditata sulla formazione del

composto **5** nelle foglie di tè [68] prevede che esso abbia origine dalla foto-ossidazione del precursore 3-metil-2,4-nonandione (**Schema 3**).



Schema 3. Origine foto-ossidativa di 3-idrossi-3-metil-2,4-nonandione [68]

Il fatto che l' α -idrossi-dichetone **5** presente negli estratti non si presenti in forma racemica potrebbe essere spiegato ipotizzando che il processo foto-ossidativo risenta dell'ambiente intrinsecamente chirale all'interno del quale avviene. Nei nostri laboratori, è in corso il tentativo di separare completamente i due enantiomeri del composto **5**. La strategia ideata è illustrata nello **Schema 4**.



Schema 4. Strategia enzimatica per la risoluzione cinetica di 3-idrossi-3-metil-2,4-nonandione **5**

Il composto **5** ottenuto con un ee del 70% verrà ridotto al corrispondente diolo **10** utilizzando AAR come catalizzatore. Vista l'alta enantioselettività mostrata

dall'enzima nelle riduzioni degli omologhi inferiori (Cap. 5), ci si attende di ottenere il diolo *trans*-2*S*,3*R*-**11** con un elevato grado di purezza ottica e, di conseguenza, di poter recuperare l'enantiomero 3*S*-**5** con un altrettanto elevato eccesso enantiomerico. L'ossidazione chimica del diolo **11**, infine, permetterà di avere il composto 3*R*-**5** otticamente puro. Partendo dai due enantiomeri perfettamente separati sarà possibile intraprendere lo studio delle proprietà organolettiche ad essi associate.

Di seguito è riportata la parte sperimentale (**Allegato A**) relativa alla sintesi chemo-enzimatica dell'aroma naturale 3-idrossi-3-metil-2,4-nonandione **5** e l'analisi ¹H-NMR e ¹³C NMR (**Allegato B**).

A) Parte sperimentale

Sintesi di 2,3-ottandione **8**

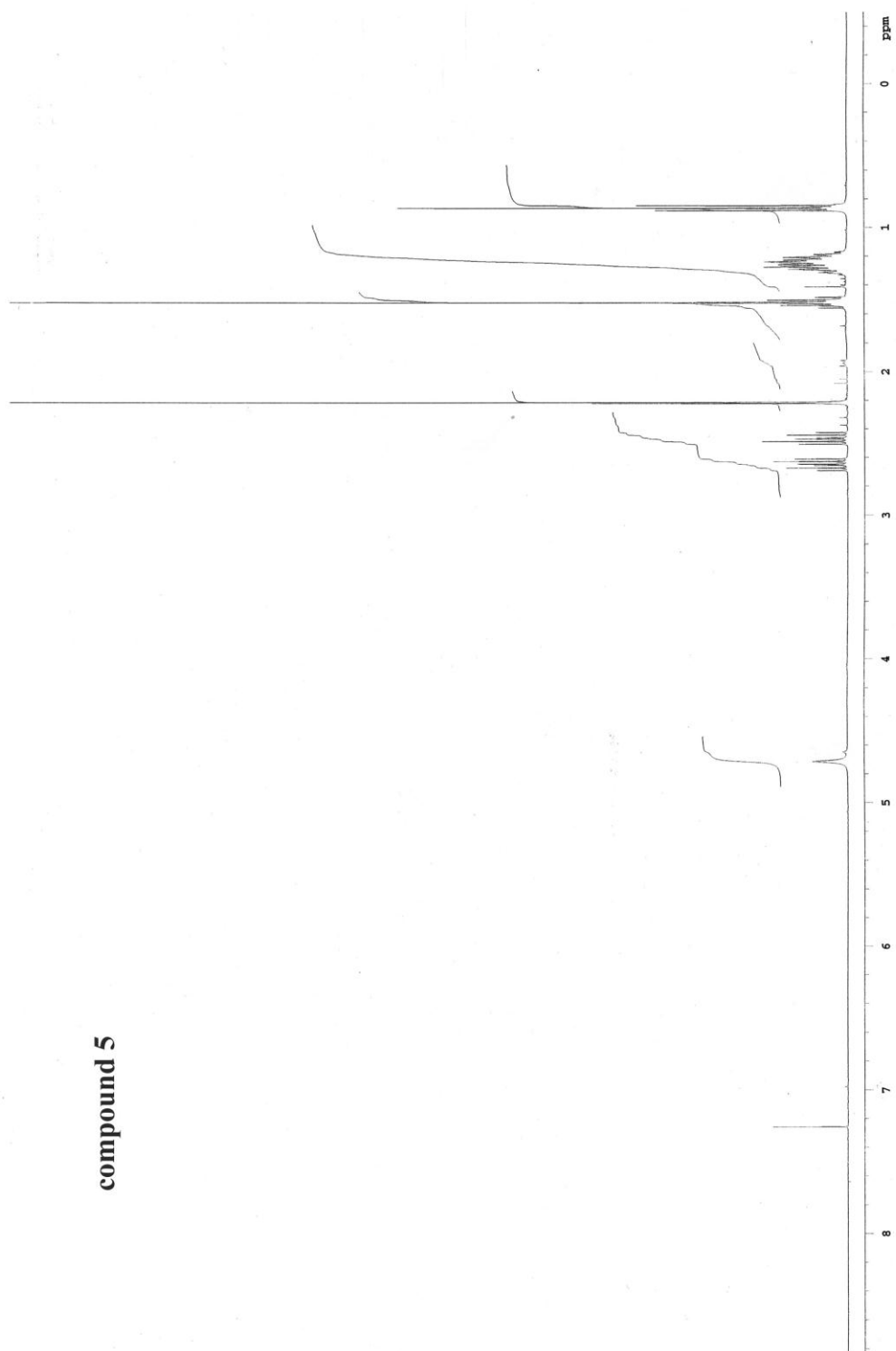
1-Ottin-3-olo **6** (1.0 g, 7.9 mmoli) viene aggiunto goccia a goccia ad una soluzione di HgO (6.9 g, 32 mmoli) e H₂SO₄ (1.7 ml) in H₂O (50 ml) e distillato in corrente di vapore. Il distillato viene saturato con NaCl e la fase organica separata mentre la fase acquosa viene estratta nuovamente con etere etilico (2 x 30 ml). Gli estratti organici riuniti vengono anidrificati con Na₂SO₄ anidro ed evaporati ottenendo il 3-idrossiottan-2-one **7**, come olio giallo (1.02 g, 7.1 mmoli, 90%): ¹H NMR (CDCl₃) δ 4.20 (t, *J* = 6 Hz, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.80 (br s, 1H, OH), 1.60-1.40 (m, 2H), 1.40-1.20 (m, 6H), 0.90 (t, *J* = 7 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 210.0, 76.8, 33.4, 31.6, 25.1, 24.3, 22.4, 13.9. Al composto **7** (1.0 g, 6.9 mmoli) sciolto in CH₂Cl₂ (50 ml) viene aggiunto piridinio clorocromato (4.3 g, 20 mmoli) e si lascia sotto agitazione per 3 h a temperatura ambiente. Si diluisce la reazione con etere etilico (200 ml) e la miscela viene filtrata su una colonna di gel di silice (4x6 cm) usando come eluente etere etilico. Dopo evaporazione si ottiene 2,3-ottandione **8** (0.93 g, 6.0 mmoli, 85%): ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.70 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.65-1.55 (m, 2H), 1.40-1.20 (m, 6H), 0.90 (t, *J* = 6 Hz, 3H); ¹³C NMR (CDCl₃) 199.5, 197.6, 35.6, 31.2, 23.7, 22.7, 2.3, 13.8.

Sintesi di 3-idrossi-3-metil-2,4-nonandione **5**

Il composto **8** (0.94 g, 2.0 mmoli) viene aggiunto ad una soluzione contenente tiammina difosfato (14 mg, 30 μmoli), MgSO₄ (10 mg, 80 μmoli) in tampone fosfato 50 mM a pH 6.5 (50 ml). Alla soluzione si aggiunge il lisato cellulare, ottenuto con trattamento ad alta pressione (Frech-press, 1380 bar) e centrifugazione della sospensione (10.000 rpm, 10 minuti), di *B. licheniformis* DSM13 (3.5 g) in tampone fosfato 50 mM a pH 6.5 (50 ml). La miscela viene posta sotto agitazione a 30°C per 12 h, poi scaldata a 70°C per 1 h ed infine centrifugata (10.000 rpm, 10 minuti). Il supernatante viene estratto con acetato di etile (3 x 30 ml). Gli estratti organici riuniti vengono lavati con una soluzione

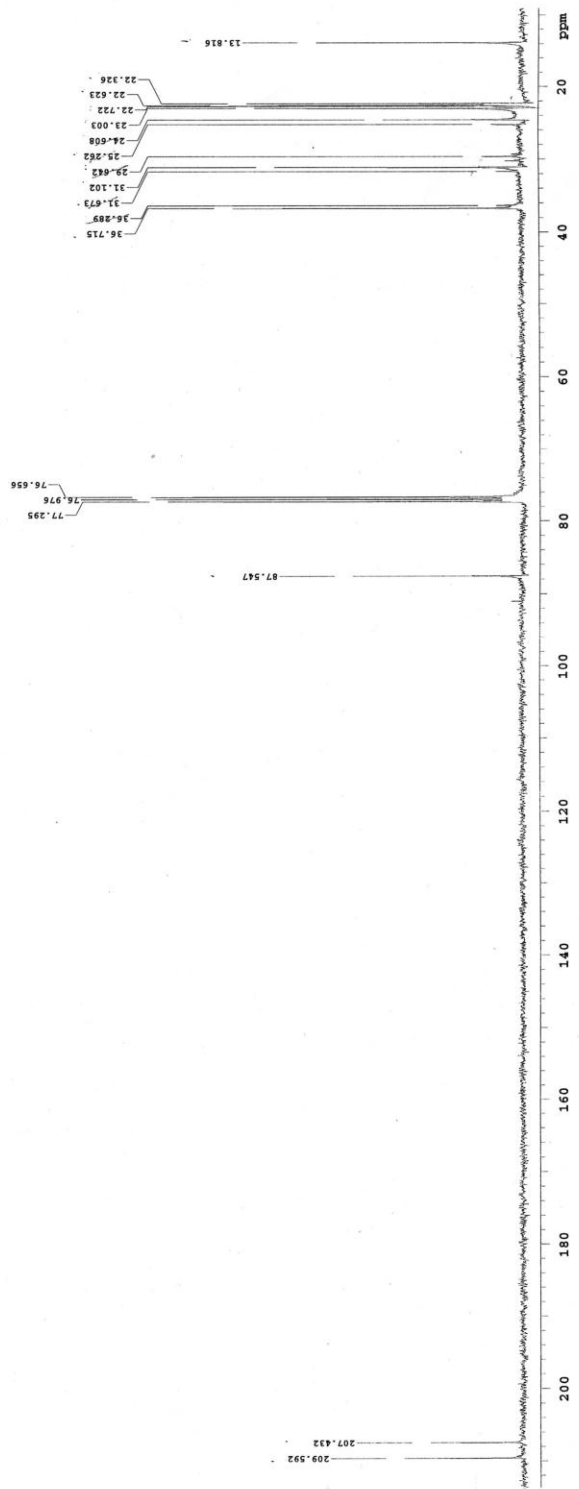
satura di NaHCO_3 ed anidrificati con Na_2SO_4 anidro. Dopo evaporazione del solvente, il residuo viene cromatografato su colonna di gel di silice (eluente cicloesano/acetato di etile 7:1) ottenendo 3-idrossi-3-metil-2,4-nonandione **5** (93 mg, 0.5 mmoli, 25%): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 4.70 (br s, 1H, OH), 2.50 (dt, 1H, $J = 17.5$ Hz, $J = 7.5$ Hz, CH_2CO), 2.68 (dt, 1H, $J = 17.5$ Hz, $J = 7.5$ Hz, CH_2CO), 2.20 (s, 3H, CH_3CO), 1.55 (s, 3H, CH_3), 1.60-1.10 (m, 6H), 0.91 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, CH_3), 1.56. Dalla stessa cromatografia è stato possibile isolare con bassa resa e leggermente contaminato il 3-idrossi-3-pentil-2,4-pentandione **9**: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) segnali significativi: δ 4.65 (br s, 1H, OH), 2.22 (s, 6H, $2\text{CH}_3\text{CO}$), 2.00-1.90 (m, 2H).

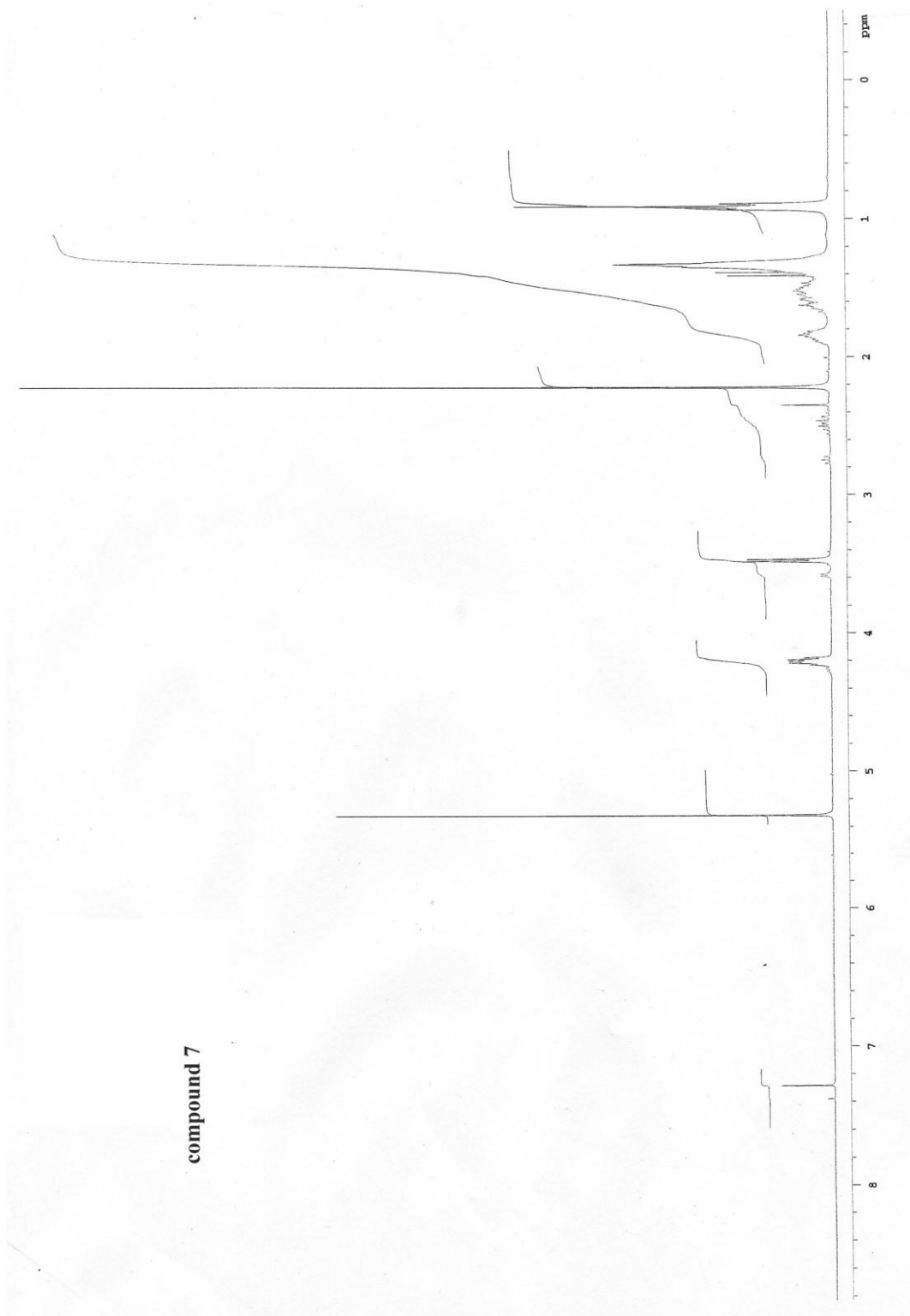
B)



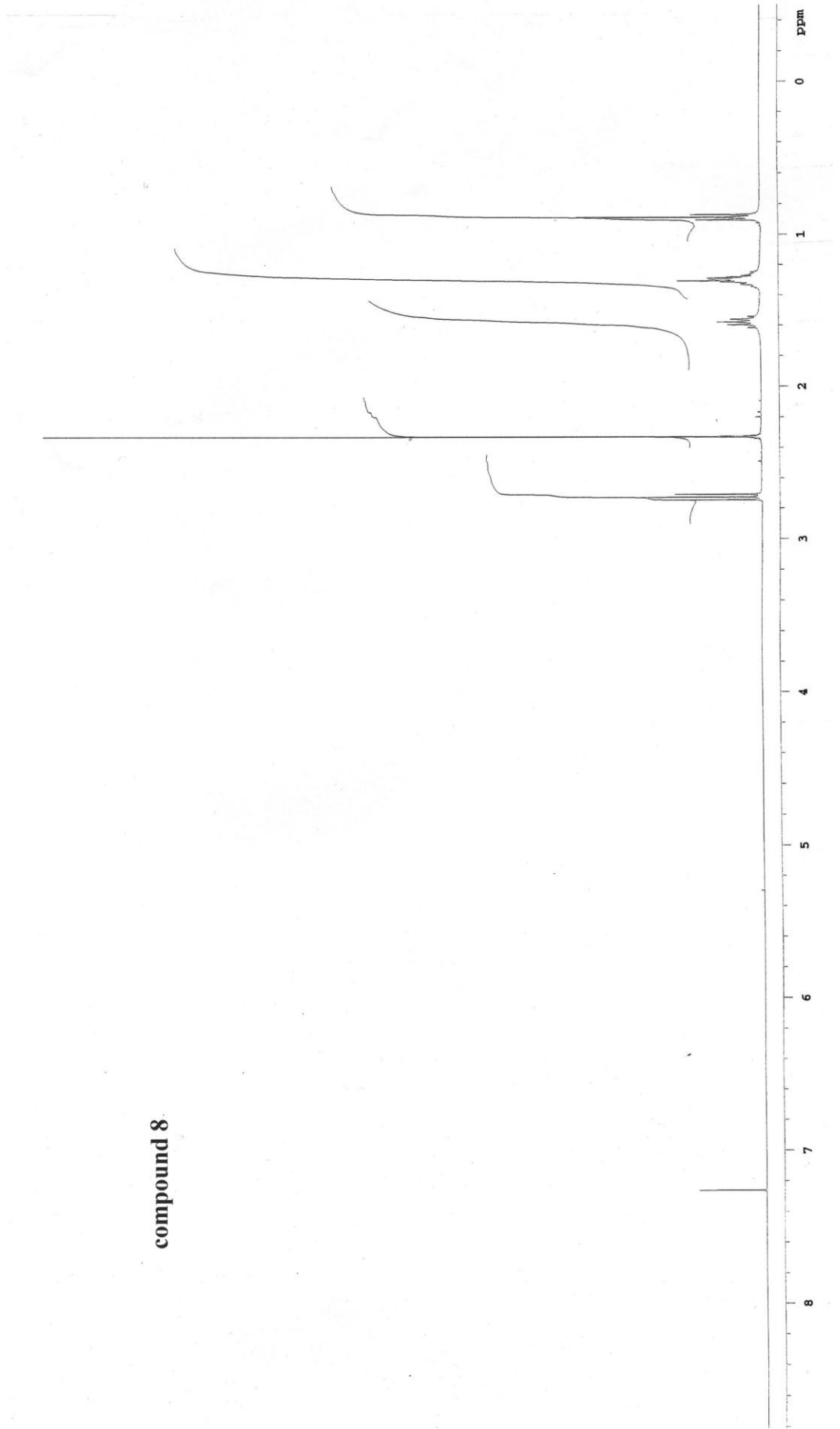
compound 5

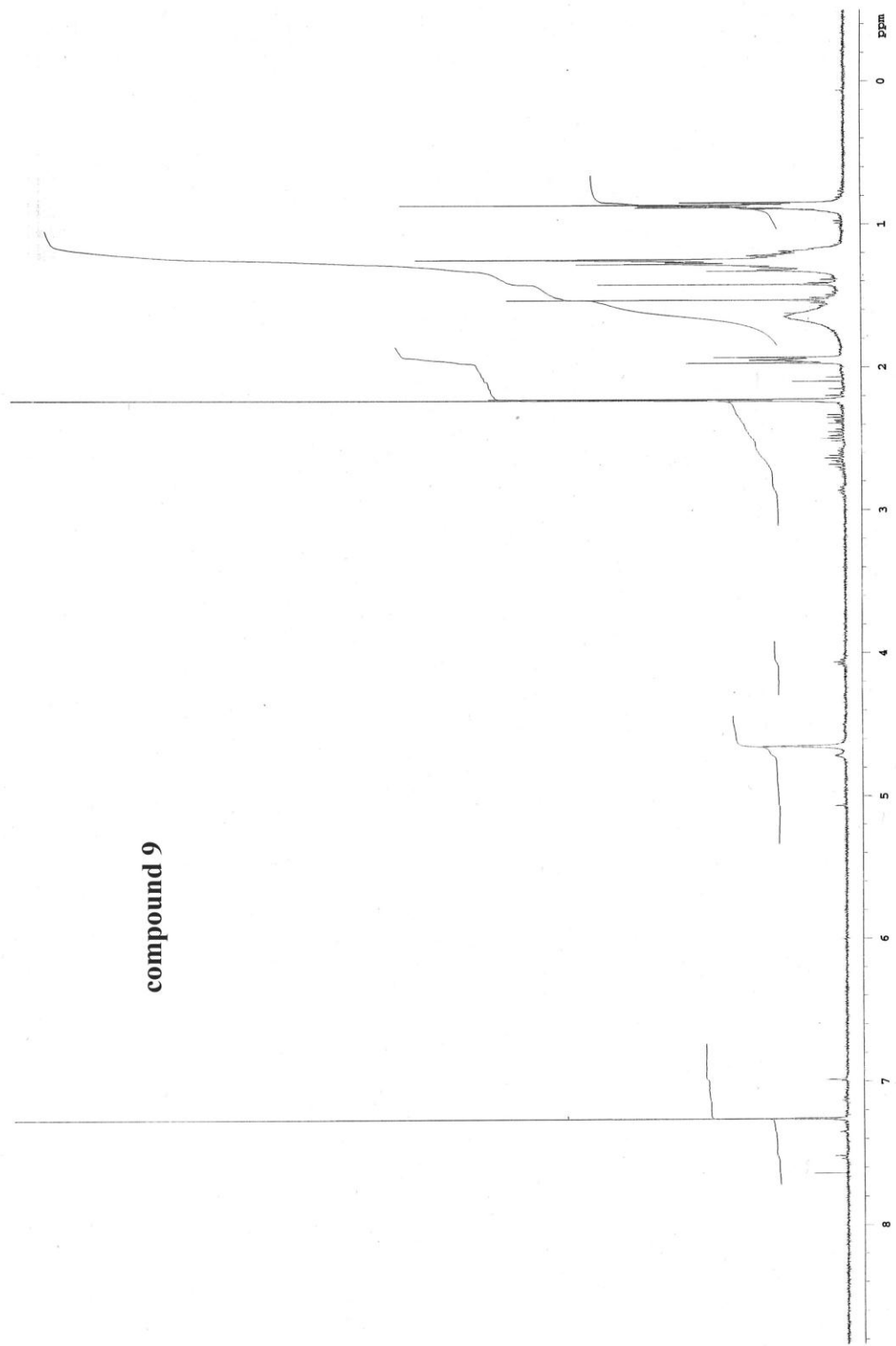
compound 5





compound 8





compound 9

PURIFICAZIONE ACETILACETOINO
SINTASI DA *Bacillus Licheniformis*

Nei capitoli precedenti è stata messa in luce l'importanza di acetilacetoino sintasi (AAS) da *Bacillus licheniformis* per la formazione di legami carbonio-carbonio.

Un requisito fondamentale, affinché una metodologia biocatalitica possa avere un'ampia diffusione, è rappresentato dalla facile disponibilità del biocatalizzatore. In quest'ottica, parte dell'attività sperimentale dell'ultimo anno di dottorato si è concentrata sulla purificazione dell'enzima al fine di porre le basi per un lavoro di biologia molecolare volto al clonaggio del gene di AAS e alla sua over-espressione in cellule ospite ricombinanti. Le tecniche di biologia molecolare, infatti, sono oggi imprescindibili per poter disporre facilmente e in tempi rapidi di quantità considerevoli dell'enzima desiderato, preservandone l'efficienza catalitica e semplificando enormemente le procedure di purificazione. Partendo dalla sequenza putativa del gene codificante l'enzima, ottenuto dall'analisi comparata delle informazioni contenute nelle banche genomiche dei microrganismi, si procede al clonaggio in vettori plasmidici, e poi alla trasformazione di cellule ospiti per l'espressione. Il clonaggio del gene target in una cellula ospite è un passaggio cruciale che deve tener conto di alcuni aspetti fondamentali:

- i) riproducibilità ed affidabilità dell'espressione proteica;
- ii) stabilità della proteina così che risulti biologicamente attiva (mantenendo struttura e conformazione);
- iii) facilità di recupero in fase di purificazione.

Di solito vengono scelti ceppi di *E. coli* ricombinanti come cellule ospite dal momento che offrono i requisiti migliori in termini di ottenimento di grandi quantità di biomassa (crescita cellulare) e facilità di recupero/purificazione della proteina. Il genoma di *B. licheniformis* DSM 13 è stato completamente sequenziato ed esistono molte sequenze codificanti geni di cui ancora non si conosce la funzione (ORF_s) (Cap. 2). Dall'analisi comparata dei genomi di altri microrganismi produttori di 2,3-butandiolo, appartenenti al medesimo albero filogenetico di *B. licheniformis*, è stato possibile identificare tra le ORF_s alcune

sequenze putative codificanti geni del metabolismo dell'acetoino e, con buona probabilità, tra queste si dovrebbe trovare quella codificante per AAS (Cap. 2).

A tutt'oggi in letteratura non esiste un microrganismo per il quale sia stata descritta una sequenza codificante una acetilacetoino sintasi, nonostante sia noto che diversi batteri oltre a *B. licheniformis* possiedano questo enzima [36,38,39]. Questo dato di partenza, di conseguenza, rende più complicato il progetto di clonaggio ed espressione; per questo motivo che si è pensato di risalire alla sequenza del gene di AAS da *B. licheniformis* partendo dalla purificazione dell'enzima. Una volta ottenuta la proteina pura, infatti, esistono diverse tecniche che permettono dalla sequenza amminoacidica primaria di risalire alla sequenza genica codificante.

Il lavoro che viene descritto in questo capitolo riguarda la purificazione di AAS. In futuro, a seguito della purificazione, si procederà con l'analisi della proteina pura per stabilire la sequenza amminoacidica (analisi in massa o sequenziamento N-terminale) e, quindi, si tenterà poi di risalire almeno ad una parte della sequenza genica codificante AAS. Su questa sequenza poi si potrebbero disegnare i primers da utilizzare in reazioni di PCR per amplificare e clonare il gene di AAS del cromosoma batterico di *B. licheniformis*.

La purificazione dell'enzima AAS da *B. licheniformis* DSM 13 è stata condotta ispirandosi ad una procedura descritta in letteratura per una AAS da *Bacillus sp.* YUF-4 [39]. Il protocollo seguito per la AAS da *B. licheniformis*, ha permesso di raggiungere un buon grado di purezza della proteina, attraverso un ridotto numero di passaggi.

Il lisato cellulare, ottenuto trattando ad alta pressione (French-press) una sospensione di cellule di *B. licheniformis* in tampone fosfato a pH 6.5, rappresenta il punto di partenza della procedura di purificazione. Tale lisato è stato sottoposto ad una precipitazione frazionata con solfato d'ammonio. L'enzima, che precipita tra il 40 ed il 60% della concentrazione saturante, attraverso questo passaggio viene purificato circa 6 volte con un recupero del 93%. Nel passaggio successivo il precipitato proteico è stato sciolto sempre in tampone fosfato a pH 6.5, la soluzione è stata desalata per ultrafiltrazione e caricata su una colonna di

dietilamminoetil-sefarosio (DEAE-Sepharose). La colonna è stata lavata con il tampone, poi con una soluzione di NaCl 0.2 M sempre in tampone fosfato a pH 6.5, quindi l'enzima AAS è stato eluito con una concentrazione di NaCl 0.4 M (Fig. 1).

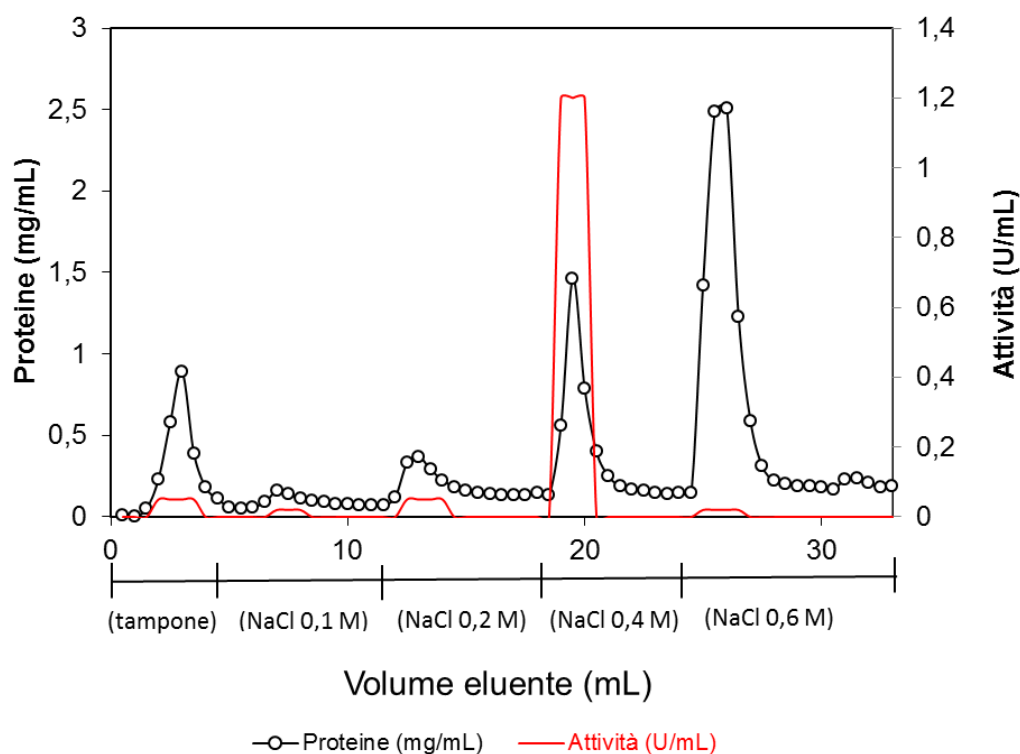


Figura 1. Profilo di eluizione di AAS da DEAE-Sepharose

Le frazioni attive sono state concentrate e desalate per ultrafiltrazione; quindi diluite con tampone fosfato 50 mM a pH 7.0 e caricate su una colonna di idrossiapatite equilibrata con lo stesso tampone. La colonna è stata lavata con concentrazioni di fosfato crescenti e l'enzima è stato eluito con una concentrazione pari a 120 mM (Fig. 2).

Purtroppo il metodo generalmente utilizzato per l'analisi dell'attività degli enzimi tiammina difosfato-dipendenti, basato sull'ossidazione degli α -idrossichetoni prodotti ad opera del 2,3,5-trifeniltetrazolo, con formazione del rispettivo

formazano (Red formazan, λ 500 nm) [72-74], non può essere applicato per le reazioni catalizzate da AAS in quanto gli idrossichetoni prodotti recano un gruppo alcolico terziario.

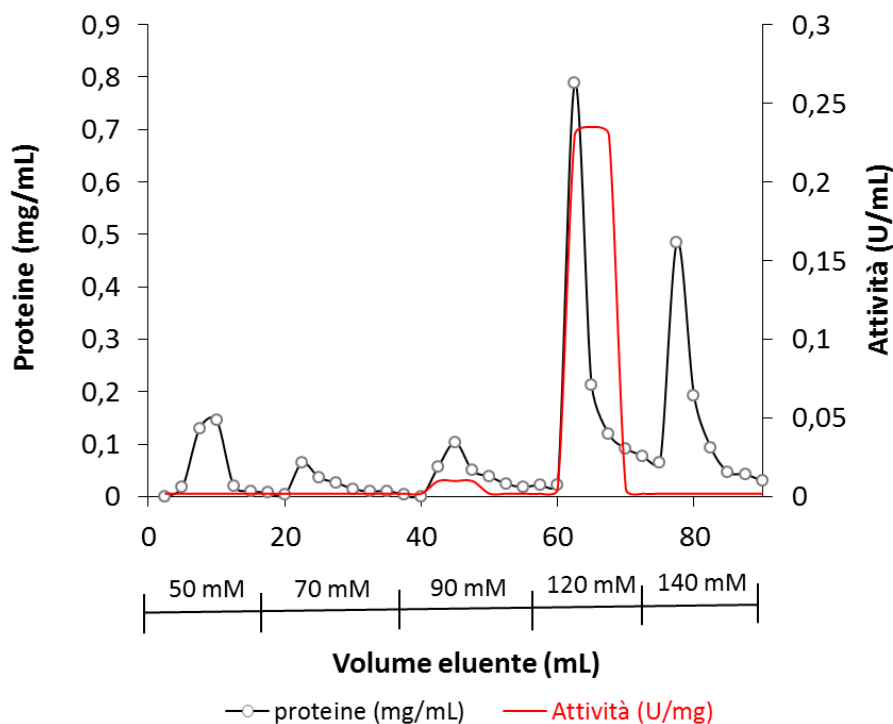


Figura 2. Profilo di eluizione di AAS da idrossiapatite

Per questo motivo, in fase di purificazione, l'attività enzimatica delle frazioni eluite è stata determinata seguendo per gas cromatografia la reazione di homocoupling di 3,4-esandione, come descritto nella parte sperimentale. Vista la complessità del metodo, l'analisi non è stata eseguita su ogni singola frazione ma sulle frazioni riunite dei vari picchi di eluizione delle proteine (**Figure 1 e 2**). Al termine della procedura l'enzima viene purificato 90 volte con un recupero del 13%. I risultati della purificazione sono riportati nella **Tabella 1**.

L'analisi elettroforetica dell'enzima ottenuto al termine della procedura di purificazione mostra, infatti, un'unica banda (**Fig. 3**, campione 2) con un peso

molecolare compreso tra 70-90 KDa (per confronto con standard proteici a peso molecolare noto).

Tabella 1. Purificazione di acetilacetoino sintasi (AAS)

Step	ml	Prot. tot. (mg)	U tot ($\mu\text{moli/min} \times \text{ml tot}$)	As (U/mg)	Purific. (volte)	Recupero (%)
Estratto cellulare	20	165.3	5.1	0.031	0	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	26.55	4.8	0.18	5.8	94.1
DEAE-sepharose	3.6	3.45	1.97	0.57	18.5	38.6
Idrossiapatite	5.1	0.25	0.69	2.79	90.2	13.6

I risultati ottenuti sono paragonabili a quanto descritto per lo stesso enzima da *Bacillus sp.* YUF-4 [39].

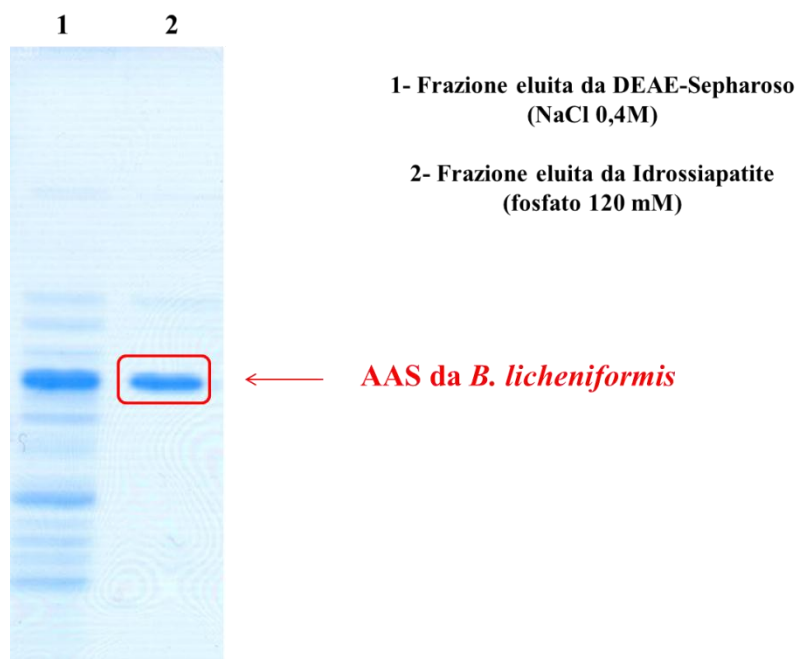


Figura 3. SDS-PAGE al 10% delle frazioni contenenti AAS eluite da DEAE-sefarosio (1) e da idrossiapatite (2)

Per quanto riguarda la caratterizzazione dell'enzima sono in corso prove per la determinazione dei principali parametri cinetici. Allo stato attuale è stato determinato il pH ottimale conducendo la reazione di homo-coupling di 3,4-esandione a valori di pH variabili tra 4.5 e 9.5 utilizzando come tamponi il fosfato e la dietanolammina. La massima velocità di reazione viene raggiunta a pH 6.5 (Fig. 4).

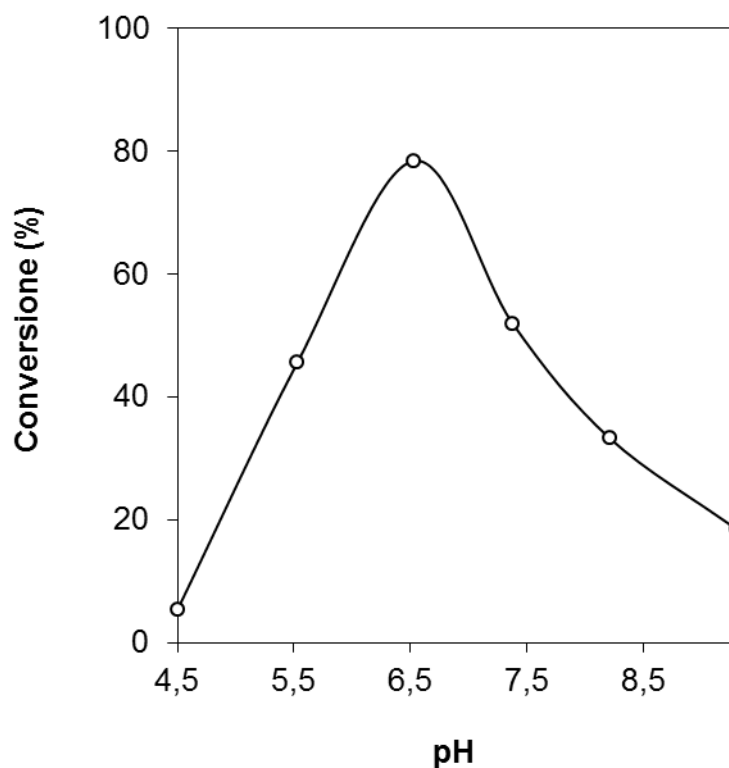


Figura 4. Effetto del pH sulla velocità di reazione

Di seguito è riportata la parte sperimentale (**Allegato A**) relativa alla purificazione di acetilacetoino sintasi.

A) Parte sperimentale

I componenti dei terreni di coltura quali glucosio, estratto di lievito, peptone e sono stati acquistati dalla ditta Oxoid. I sali KH_2PO_4 , MgSO_4 , NaHCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e Na_2SO_4 sono prodotti acquistati presso la ditta Carlo Erba. 3-Idrossi-2-butanone (acetoino), 2,3-butandione (diacetile) e 3,4-esandione sono prodotti Fluka. Le cellule batteriche sono state lisate usando una “French-press cell disrupter” della Thermo Electron Corporation. Le lastre per le analisi cromatografiche su strato sottile sono del tipo Kiesegel 60F₂₅₄ Merck e per la rivelazione dei prodotti è stata utilizzata una miscela di acido fosfomolibdico ($\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$), acido solforico ed acetico in proporzioni 2.5 : 2.5 : 5. Per le analisi gascromatografiche è stato utilizzato uno strumento Carlo Erba 6000 GC dotato di rilevatore a ionizzazione di fiamma (FID) ed equipaggiato con colonna capillare chirale (25m x 0.25 mm) con fase stazionaria composta da dimetil n-pentil- β -ciclodestrine su OV 1701 fornita dalla ditta Mega s.n.c. Come gas di trasporto è stato utilizzato He alla pressione di 68 kPa, la temperatura dell’iniettore è stata impostata a 200°C e quella del rilevatore a 250°C.

Per l’ultrafiltrazione sono stati utilizzati filtri Amicon Ultra-4 della Millipor con cut-off di 10 kDa. Per la preparazione del gel denaturante SDS-PAGE è stato utilizzato il protocollo e i componenti contenuti nell’SDS Gel Preparation Kit 08091 fornito dalla Fluka. Come standard di riferimento per il peso molecolare proteico è stato utilizzato S8445-1VL (Sigmamarker, wide range) fornito dalla Sigma-Aldrich che contiene Miosina (200 kDa), β -galattosidasi (116 kDa), β -fosforilasi da muscolo di coniglio (97 kDa), albumina da siero bovino (66 kDa), ovalbumina (45 kDa) e anidrasi carbonica (29 kDa).

Il *Bacillus licheniformis* DSM 13 è conservato ad una temperatura di 4° C su terreno solido agarizzato Plate Count Agar.

Attività enzimatica

La determinazione dell'attività dell'enzima AAS da *B. licheniformis* è stata misurata nell'estratto cellulare grezzo e nelle frazioni corrispondenti ai diversi passaggi della purificazione sulla base della conversione del 3,4-esandione in 4-idrossi-4-etil-3,5-eptandione. Alla miscela di reazione (1 ml) composta da tampone fosfato 50 mM a pH 6.5 contenente EDTA (0.1 mM), β -mercaptoetanololo (1 mM), tiammina pirofosfato (1 mM), $MgSO_4$ (1.7 mM) e 3,4-esandione (22 mM) viene aggiunto un volume della soluzione in esame compreso tra 10 e 100 μ l. La miscela viene incubata per un'ora a 30°C in leggera agitazione dopo di che viene estratta con acetato d'etile (1 ml). La fase organica separata e anidrificata per aggiunta di sodio solfato anidro viene analizzata per gas cromatografia (gradiente di temperatura $T_{iniz} = 80^\circ C$, $T_{fin} = 200^\circ C$, $1.5^\circ C/min$) per misurare la percentuale di conversione del substrato nel prodotto.

L'andamento della purificazione di AAS è stato seguito misurando la concentrazione proteica con il metodo di Bradford [75] per il lisato cellulare e attraverso l'assorbanza a 280 nm per le frazioni purificate (assumendo l'assorbanza di 1.00 per una concentrazione proteica di 1 mg/ml).

Elettroforesi in condizioni denaturanti: SDS-PAGE (tipo Laemli)

La purezza della proteina dopo i diversi passaggi di purificazione è stata controllata mediante SDS-PAGE (Running gel 10%, stacking gel 3%) su mini gels (80 x 80 mm) preparati secondo protocollo descritto nel SDS Gel Preparation Kit della Fluka. La corsa elettroforetica è stata condotta per circa 1 ora a 200 volts (V), 25mA. Il gel è stato poi colorato utilizzando una soluzione colorante (staining solution) preparata con Blue di Comassie G-250 precedentemente preparata sciogliendo 45 mg di colorante in 500 ml di H_2O bidist., e lasciandola 3 ore in agitazione su piastra magnetica. Il gel nella soluzione colorante viene scaldato per qualche minuto ad 80°C e poi lasciato over night su agitatore oscillante (110 rpm).

Il giorno seguente il gel viene decolorato con un paio di lavaggi in H₂O bidist. rendendo così visibili le bande proteiche presenti nel campione (**Figura 3**).

Purificazione di acetilacetoino sintasi (AAS) da *B. licheniformis*

a) Coltivazione cellule di *B. licheniformis*.

In una beuta da 50 ml contenente 10 ml di terreno liquido composto da estratto di lievito (10 g/L), peptone (10 g/L), NaCl (5 g/L), tappata con cotone idrofobo e sterilizzata in autoclave viene inoculato *B. licheniformis* DSM 13, prelevato con ansa sterile e sotto cappa a flusso laminare dalle colture di conservazione su terreno solido (slants). La coltura viene agitata per 24 h (110 rpm) alla temperatura di 28°C, quindi, sempre in condizioni di sterilità, viene versata in una beuta da 250 ml contenente 100 ml del medesimo terreno addizionato di 3-idrossi-2-butanone (5 g/L), al fine di ottenere l'induzione dell'espressione di AAS [36]. Dopo 24 h in agitazione a 28°C le cellule vengono separate per centrifugazione (7000 rpm, 15 minuti) sospese in 5 ml di soluzione fisiologica e la sospensione è stata nuovamente centrifugata (7000 rpm, 15 minuti). Il supernatante viene allontanato e le cellule così ottenute (0.3 g) vengono conservate in congelatore (-20°C) e rappresentano lo stock di riferimento per la preparazione del lisato cellulare per la purificazione di AAS.

b) Preparazione del lisato cellulare

Le cellule (1.0 g) sono scongelate e sospese in tampone fosfato 50 mM a pH 6.5 (10 ml) contenente EDTA 0.1 mM e β-mercaptoetanololo 1 mM. La sospensione viene omogeneizzata (vortex) e trattata per estrusione ad alta pressione per mezzo di una French-press (1380 bar) per ottenere un omogenato grezzo che viene centrifugato (10.000 rpm, 20 minuti, 10°C) per dare il lisato cellulare (10 ml) utile alla purificazione.

c) Precipitazione con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Da prove sperimentali preliminari condotte a diverse concentrazioni di ammonio solfato, è risultato che l'enzima AAS precipita nel lisato cellulare in presenza di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ tra il 40 e il 60%. Si aggiunge pertanto ai 10 ml di lisato la quantità di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ necessaria a raggiungere la concentrazione suddetta attraverso piccole aggiunte successive: il procedimento deve essere fatto mantenendo il campione in ghiaccio sotto lenta e costante agitazione. Quando il $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ risulta completamente sciolto, il campione viene lasciato a 4°C per almeno 4 h così da permettere la lenta precipitazione delle proteine. Si centrifuga (10.000 rpm, 20 minuti, 10°C), il surnatante viene scartato mentre il precipitato viene conservato a 4°C fino al momento dell'utilizzo per il successivo passaggio.

d) Cromatografia a scambio ionico: DEAE-Sepharose

Il precipitato ottenuto dal passaggio precedente viene risospeso in 5 ml di tampone fosfato 20 mM a pH 7 ed opportunamente desalato ripetendo 4 cicli di centrifugazione (10000 rpm, 10 minuti, 10 °C) su membrane Amicon Ultra-4 Millipore. L'estratto cellulare viene cromatografato su una colonna DEAE-sepharose (3.0 x 1.5 cm) preventivamente equilibrata con tampone fosfato 20 mM a pH 7. La colonna viene eluita con concentrazioni crescenti di NaCl (0.1 M, 0.2 M, 0.4 M, 0.6 M, 1 M). L'enzima viene eluito con la soluzione 0.4 M (**Figura 1**). Le frazioni contenenti l'AAS vengono riunite (4 ml) e concentrate per ultrafiltrazione.

e) Cromatografia di adsorbimento: Idrossiapatite

L'enzima parzialmente purificato ottenuto dalla cromatografia su DEAE-sepharose viene diluito in tampone fosfato 50 mM, fino ad un volume finale di 2.0 mL, quindi caricato su una colonna di idrossiapatite (2.5 x 1.0 cm) equilibrata con lo stesso tampone. La colonna viene lavata con tampone a pH 7.0 con concentrazioni crescenti di fosfato (50, 70, 90, 120 e 140 mM). L'enzima viene eluito alla concentrazione di 120 mM (**Figura 2**).

Effetto del pH

Le velocità della reazione di homo-coupling del 3,4-esandione è stata misurata aggiungendo 20 μ l di estratto cellulare grezzo ad una miscela di reazione (1 ml) composta da tiammina pirofosfato (1 mM), MgSO_4 (1.7 mM) e 3,4-esandione (22 mM), utilizzando tampone acetato 50 mM per pH compresi tra 4.4 e 5.5, tampone fosfato 50 mM per pH compresi tra 6.5 e 8.1 e dietanolammina 50 mM per i pH 8.2 e 9.3 (**Figura 4**).

CONCLUSIONI

In questa tesi acetilacetoino sintasi (AAS) da *B. licheniformis*, enzima tiamina difosfato (ThDP) dipendente, è stato per la prima volta descritto come nuovo biocatalizzatore in grado di catalizzare reazioni di formazione di legami C-C in reazioni di tipo aciloinico. AAS è stato impiegato nella sintesi enzimatica di una serie di α -idrossi- β -dichetoni ottenuti a partire da 1,2-dichetoni attraverso reazioni di homo- e cross-coupling. Ad eccezione di acetilacetoino, prodotto naturale di AAS, gli α -idrossi- β -dichetoni ottenuti sono tutti composti nuovi che sono stati completamente caratterizzati. Si tratta di una serie di alcoli terziari, chirali e prochirali, che costituiscono degli interessanti building blocks per la sintesi asimmetrica grazie alla presenza di diverse funzionalità chimiche che possono essere elaborate sinteticamente in maniera indipendente. Gli eccessi enantiomerici dei nuovi α -idrossi- β -dichetoni chirali sono stati determinati attraverso analisi GC-MS su colonna chirale. Il meccanismo catalitico di AAS prevede l'uso di tiamina come cofattore; l'enzima è in grado di accettare α -dichetoni come donatori di acil anioni nelle reazioni di coupling portando alla formazione di composti che presentano un carbonio quaternario difficilmente ottenibile attraverso approcci sintetici tradizionali. L'interessante ed innovativa strategia di sintesi proposta ha ispirato lo sviluppo di un approccio biomimetico od organocatalitico ispirato al meccanismo catalitico ThDP-dipendente di AAS. Nell'approccio biomimetico si è dimostrato che, anche in assenza dell'enzima, gli α -dichetoni fungono da donatori di acil-anioni che sono trasferiti dalla tiamina su una seconda molecola di substrato. La funzionalità dell'approccio sintetico biomimetico è stata dimostrata in reazioni di homo-coupling a partire dai medesimi α -dichetoni utilizzati nella sintesi enzimatica ed ha permesso di ottenere gli α -idrossi- β -dichetoni precedentemente descritti e caratterizzati ovviamente, data l'assenza dell'enzima, in forma racemica. La versatilità dell'approccio biomimetico è stata anche dimostrata in reazioni di cross-coupling, utilizzando acetilacetoino e vari α -chetoesteri, da cui sono stati ottenuti α -idrossi- β -chetoesteri. Nell'approccio biomimetico i risultati migliori si sono ottenuti impiegando come pre-catalizzatore 3-benzil-5-(2-idrossietil)-4-metiltiazolio

cloruro, un prodotto commerciale analogo della tiamina, accoppiandolo alla trietilammina che riproduce la forza basica naturalmente presente nel sito catalitico degli enzimi ThDP-dipendenti. Polietilenglicole (PEG₄₀₀) è stato scelto come solvente per le reazioni poiché, oltre ad essere uno dei mezzi di reazione preferiti dalla “green chemistry”, ha permesso il riciclo del catalizzatore per molteplici cicli di reazione, mantenendo quantitative le rese dei prodotti.

Una parte fondamentale della sintesi enzimatica con AAS di questi nuovi sintoni chirali è la determinazione della loro configurazione assoluta. La strategia utilizzata per questo scopo è stata la riduzione regio- ed enantioselettiva degli α -idrossi- β -dichetoni con acetilacetoino reductasi (AAR), una reductasi NADH-dipendente e nota per la sua *S*-stereospecificità, ottenuta sempre da *B. licheniformis*. Si sono ottenuti nuovi α -alchil- α,β -diidrossichetoni con buone rese ed ottimi eccessi diastereomerici ed enantiomerici; la configurazione relativa *syn* dei suddetti composti è stata determinata attraverso esperimenti NOE condotti sui corrispondenti derivati diossolanici. Ammettendo quindi la *S*-stereospecificità di acetilacetoino reductasi (AAR), la stereochimica del carbonio quaternario avrebbe dovuto essere *R*. La conferma di questa attribuzione si è avuta trasformando uno dei α -alchil- α,β -diidrossichetoni ottenuti in un prodotto naturale a stereochimica nota, il (+)-citrediololo.

Recenti sviluppi del lavoro di ricerca hanno permesso anche di proporre una strategia innovativa chemo-enzimatica per la sintesi di 3-idrossi-3-metil-2,4-nonandione, presente come componente minoritario nelle miscele ottenute per estrazione dal tè verde con etere etilico e responsabile delle note dolci e cremose che rendono l'infuso così gradevole al gusto. L' α -dichetone 2,3-ottandione, ottenuto per sintesi chimica, è stato utilizzato come substrato della reazione di homo-coupling catalizzata da AAS che ha portato all'ottenimento del 3-idrossi-3-metil-2,4-nonandione con un eccesso enantiomerico del 70%. Questa è la prima sintesi chemo-enzimatica descritta per questo aroma naturale e l'aspetto interessante di questo approccio è quello di produrre il composto in forma enantio-arricchita. La possibilità di disporre di una metodologia per la sintesi stereoselettiva della molecola è importante considerando il fatto che, in letteratura,

non è mai fatta menzione della sua configurazione assoluta. Il 3-idrossi-3-metil-2,4-nonandione chirale da noi sintetizzato è stato utilizzato direttamente come standard per determinare la configurazione assoluta del prodotto naturale presente negli estratti eterei ottenuti da alcuni tipi di tè; è molto interessante notare che la composizione enantiomerica di tale prodotto nei diversi estratti è risultata approssimativamente la stessa di quello ottenuto per sintesi chemo-enzimatica. Attualmente, nei nostri laboratori, è in corso il tentativo di separare completamente i due enantiomeri e di studiare le proprietà organolettiche ad essi associate.

Infine, vista la versatilità dimostrata da AAS, come nuovo biocatalizzatore per la sintesi di legami C-C, è stato intrapreso lo studio volto all'individuazione della sequenza genica codificante per questa proteina. AAS è stata isolata con un soddisfacente grado di purezza ed attualmente sono state identificate alcune sequenze putative nel genoma di *B. licheniformis* che potrebbero essere quelle codificanti per l'enzima. Partendo dalla proteina purificata, si cercherà di risalire alla parziale sequenza amminoacidica di AAS ed, in seguito, confrontandola con quella delle sequenze putative, arrivare per tentativi a clonare il gene e ad over-esprimerlo in opportune cellule ospite.

BIBLIOGRAFIA

1. W. H. Brown, C. S. Foote, B. L. Iverson, E. V. Anslyn, *Chimica organica*, 4a ediz., EdiSES.
2. J. M. Berg, J. L. Timoczko, L. Stryer, *Biochimica*, 5a ediz., Zanichelli.
3. J. Sukumaran, U. Hanefeld, *Chem. Soc. Rev.* **34**, 530–542 (2005).
4. W.-D. Fessner, *Current Opinion in Chemical Biology* **2**, 85-97 (1998).
5. A. S. Bommarius, B. R. Riebel-Bommarius, *Biocatalysis. Fundamentals and Application*, Wiley-VCH, 2004.
6. W.-D. Fessner, C. Walter, *Topics in Current Chemistry* **184**, 97-194 (1996).
7. A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotrasformations*, Wiley-VHC, Weinheim, 2000.
8. W. Aehle, *Enzymes in Industry: Production and Applications*, Wiley-VHC, Weinheim, 2003.
9. R. N. Patel, *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*, CRC Press, Boca Raton, 2006.
10. H. J. M. Gijzen, L. Quiao, W. Fitz, C.-H. Wong, *Chem. Rev.* **96**, 443-473, (1996).
11. N. Wymer, E. J. Toone, *Current Opinion in Chemical Biology* **4**, 110-119, (2000).
12. V. Gotor, I. Alfonso, E. Garcia-Urdiales, *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, Wiley-VHC, Weinheim, 2008.
13. D. J. Kuo, I. A. Rose, *Biochemistry*, **24**, 3947-3952, (1985).
14. W.-D. Fessner, A. Schneider, H. Held, G. Sinerius, C. Walter, M. Hixon, J. V. Schloss, *Angew. Chem. Int. Ed.* **35**, 2219-2221 (1996).
15. S. Blayer, J. M. Woodley, M. D. Lilly, M. J. Dawson, *Biotechnology Progress* **12**, 758-763 (1996).

16. S. Blayer, J. M. Woodley, M. D. Lilly, M. J. Dawson, *Biotech. & Bioeng.* **66**, 131-136 (1999).
17. W.-D. Fessner, In "Modern Aldol Reactions" (ed. R. Mahrwald), Vol.1 Wiley-VHC, Weinheim, pp. 201-272, 2004.
18. R. Schoevaart, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *J. Org. Chem.* **65**, 6940-6943 (2000).
19. W.-D. Fessner, *Current Opinion in Chemical Biology* **2**, 85-87 (1998).
20. M. Pohl, G. A. Sprenger, M. Müller, *Current Opinion in Biotechnology* **15**, 335-342 (2004).
21. R. Kluger, K. Tittmann, *Chem. Rev.* **108**, 1797-1883 (2008).
22. S. J. Costelloe, J. M. Ward, P. A. Dalby, *J. Mol. Evol.* **66**, 36-49 (2008).
23. A. S. Demir, P. Ayhan, S. B. Sopaci, *Clean* **35**, 406-412 (2007).
24. A. S. Demir, O. Sesenoglu, P. Dunkelmann, M. Müller, *Org. Lett.* **5**, 2047-2050 (2003).
25. a) Z. G. Hajos, D. R. Parrish, *J. Org. Chem.* **39**, 1615-1621 (1974); b) U. Deer, G. Sauer, R. Wiechert, *Angew. Chem.* **83**, 492-493 (1971).
26. A. Dondoni, A. Massi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 4638-4660 (2008).
27. M. Movassaghi, Eric N. Jacobsen, *Science* **298**, 1904-1905 (2002).
28. D. Enders, A. A. Narine, *J. Org. Chem.* **73**, 7857-7870 (2008).
29. J. Seayad, B. List, *Org. Biomol. Chem.* **3**, 719-724 (2005).
30. D. Enders, T. Balensiefer, *Acc. Chem. Res.* **37**, 534- 541 (2004).
31. G. Fantin, M. Fogagnolo, A. Medici, P. Pedrini, S. Poli, *Tetrahedron: Asymm.* **4**, 1607-1612 (1993).
32. G. Fantin, M. Fogagnolo, A. Medici, P. Pedrini, G. Rosini, *Tetrahedron: Asymm.* **5**, 1635-1638 (1994).
33. G. Fantin, M. Fogagnolo, P.P. Giovannini, A. Medici, P. Pedrini, S. Poli, *Tetrahedron Lett.* **36**, 441-442 (1995).
34. P. P. Giovannini, A. Medici, C. M. Bergamini, M. Rippa, *Bioorg. & Med. Chem.* **4**, 1197-1201 (1996).
35. O. Bortolini, G. Fantin, M. Fogagnolo, P.P. Giovannini, A. Guerrini, A. Medici, *J. Org. Chem.* **62**, 1854-1856 (1997).

36. S. Ui, T. Hosaka, K. Mizutani, *J. Biosc. Bioeng.* **93**, 248-251 (2002).
37. M. Mantovani, “Fermentazione con *Bacillus stearothermophilus*: produzione di 2,3-butandiolo, studio della via metabolica ed applicazioni biocatalitiche”. Tesi di Dottorato, Ferrara, ciclo XXI.
38. E. Juni, G.A Heym, *J. Bacteriol.* **72**, 452-432 (1956).
39. S. Ui, T. Hosaka, K. Mizutani, A. Mimura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 795-797 (1998).
40. P. P. Giovannini, P. Pedrini, V. Venturi, G. Fantin, A. Medici, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **64**, 113-117 (2010).
41. M. Schallmey, A. Singh, O.P. Ward, *Can. J. Microbiol.* **50**, 1-17 (2004).
42. O. Froyshov, S. G. Laland, *Eur. J. Biochem.* **46**, 235-242 (1974).
43. B. Veith, C. Herzberg, S. Steckel, J. Feesche, K. H. Maurer, P. Ehrenreich, S. Bäumer, A. Henne, H. Liesegang, R. Merkl, A. Ehrenreich, G. Gottschalk, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **7**, 204-211 (2004).
44. T. N. Thanh, B. Jurgen, M. Bauch, M. Liebeke, M. Lalk, A. Ehrenreich, S. Evers, K. H. Maurer, H. Antelmann, F. Ernst, G. Homuth, M. Hecker, T. Schweder, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 2227-2235 (2010).
45. P. Perego, A. Converti, M. Del Borghi, *Biores. Technol.* **89**, 125-131 (2003).
46. I. Christoffers, A. Baro, *Adv. Synth. Catal.* **347**, 1473-1482 (2005).
47. P.G. Cozzi, R. Hilgra, N. Zimmerman, *Eur. J. Org. Chem.* 5969-5994 (2007).
48. C. Dresen, M. Richter, M. Pohl, S. Ludeke, M. Müller *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 6600-6603 (2010).
49. H. Takikawa, A. Takada, K. Hikita, K. Suzuki, *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 7446-7449 (2008).
50. Y. Monguchi, T. Takahashi, Y. Iida, Y. Fujiwara, Y. Inagaki, T. Maegawa, H. Sajiki, *Synlett* 2291-2294 (2008).
51. K. A. Ahrendt, C. J. Borths, D. W. C. MacMillan, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4243-4244 (2000).

52. a) *Acc. Chem. Res.*, 37, vol. 8, 487-631 (2008), special issue on asymmetric organocatalysis; b) A. Berkessel; H. Gröger, *Asymmetric Organocatalysis - From Biomimetic Concepts to Applications in Asymmetric Synthesis*, Wiley-VHC: Weinheim, 2005.
53. J. C. Sheehan, D. H. Hunneman, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 3666-3667 (1966).
54. G. Bredig, W. S. Fiske, *Biochem. Z.*, **46**, 7-23 (1912).
55. a) B. List, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 2395-2396 (2000); b) W. Notz, B. List, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 7386-7387 (2000).
56. G. Fantin, M. Fogagnolo, P. P. Giovannini, V. Venturi, S. Pacifico, A. Massi, O. Bortolini, *Tetrahedron* **67**, 8110-8115 (2011).
57. W. A. Herrmann, C. Köcher, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **36**, 2162-2187 (1997).
58. J. C. Sheehan, D. H. Hunneman, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 3666-3667 (1966).
59. D. Enders; A. Henseler, *Adv. Synth. Catal.* **351**, 1749-1752 (2009).
60. S. E. O'Toole, C. A. Rose, S. Gundala, K. Zeitler, S. J. Connon, *J. Org. Chem.* **76**, 347-357 (2011).
61. (a) M. B. Rubin, S. Inbar, *J. Org. Chem.* **53**, 3355-3558 (1988); (b) M. B. Rubin; S. Inbar, *Tetrahedron Lett.* **20**, 5021-5024 (1979).
62. P. Ghosh, J. R. Cusick, J. Inghrim, L. J. Williams, *Org. Lett.* **11**, 4672-4675 (2009).
63. (a) F. Cohen, D. W. C. MacMillan, L. E. Overman, A. Romero, *Org. Lett.* **3**, 1225-1228 (2001); (b) N. Hanaki, J. T. Link, D. W. C. MacMillan, L.E. Overman, W. G. Trankle, J. A. Wurster, *Org. Lett.* **2**, 223-226 (2000); (c) L. E. Overman, G. M. Rishton, *Organic Syntheses*, Wiley, New York, Collect. Vol. 9, p. 4, 1998; (d) M. H. Hopkins, L. E. Overman, G. M. Rishton, *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 5354-5365 (1991).
64. Y. Shizuri, S. Nishiyama, D. Imai, S. Yamamura, H. Furukawa, K. Kawai, N. Okada, *Tetrahedron Lett.* **25**, 4771-4774 (1984).
65. M. Handa, K. A. Scheidt, M. Bossart, N. Zheng, W. R. Roush, *J. Org. Chem.* **73**, 1031-1035 (2008).

- 66.** P. P. Giovannini, G. Fantin, A. Massi, V. Venturi, and P. Pedrini, *Org. Biomol. Chem.* **9**, 8038-8045 (2011).
- 67.** R. Zawirska-Wojtasiak, *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* **5**, 21-36 (2006).
- 68.** I. A. Sigrist, G. G. G. Manzardo, R. Amadò, *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3426-3428 (2003).
- 69.** N. Regula, J. Alaini, European Patent Office N° 18 58351 A0 (WO 2006/092749).
- 70.** N. Regula, J. Alaini, V. Alain, M. Bruno, *J. Agric. Food Chem.* **54**, 9201-9205 (2006).
- 71.** O. Bortolini, G. Fantin, M. Fogagnolo, P. P. Giovannini, A. Guerrini, A. Medici, *J. Org. Chem.* **62**, 1854-1856 (1997).
- 72.** M. Breuer, M. Pohl, B. Hauer, B. Lingen, *Anal. Bioanal. Chem.*, **374**, 1069-1073 (2002).
- 73.** M. E. B. Smith, U. Kaulmann, J. M. Ward, H. C. Hailes, *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 7062-7065 (2006).
- 74.** D. Gocke, Doctoral Thesis, University of Düsseldorf, Germany (2008).
- 75.** M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).

RINGRAZIAMENTI

Sento dal cuore di dover ringraziare molte persone che hanno fatto parte di questo lungo percorso della mia vita fuori e dentro l'Università. Come si addice ad un'occasione così importante i ringraziamenti non possono essere retorici:

un grazie sincero,

alla *Prof. Paola Pedrini*,

per aver creduto sin dall'inizio nelle mie potenzialità e per avermi pazientemente seguito nella stesura di questa tesi,

al *Dott. Pier Paolo Giovannini*,

per aver lavorato operativamente al mio fianco nell'ambito della biocatalisi trasferendomi conoscenze tecniche ma soprattutto stimolandomi a sviluppare l'autonomia critica che deve essere propria di un ricercatore;

al *Prof. Marco Fogagnolo*,

per le pazienti lezioni di organocatalisi dalle quali ho imparato che la chimica è sempre meglio studiarla su un buon libro anche se non va più di moda, perché “*Ad sal, ad mel, ad piper, semper cucurbita est!*”;

al *Dott. Giancarlo Fantin*,

per l'imprescindibile supporto nell'interpretazione dei risultati della mia ricerca e per aver suggerito strategie di successo che hanno permesso sempre di non “gettare la spugna”.

Voglio inoltre ringraziare in modo particolare il *Dott. Alessandro Massi* che ha valorizzato questo lavoro dimostrando l'importanza dell'interdisciplinarietà della ricerca basata sul lavoro "in team".

Infine, il mio grazie e il mio riconoscimento vanno a tutti coloro che all'interno dell'Università di Ferrara hanno contribuito allo sviluppo del mio progetto di tesi di dottorato e del mio personale bagaglio culturale:

alla *Dott. Tatiana Bernardi* per le analisi di spettroscopia di massa,

alla *Dott. Ercolina Bianchini* per il suo lavoro nel campo della microbiologia,

al *Dott. Paolo Formaglio* per le analisi NMR,

alla *Dott. Monica Squerzanti* ed a tutto il gruppo di ricerca del *Prof. Carlo Bergamini* del Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare per la straordinaria disponibilità dimostrata nel fornire supporto tecnico-scientifico per gli aspetti biochimici e di biologia molecolare.

La mia vita privata è stata contornata di persone dalla rara umanità, nel senso più profondo della parola,....così 'grandi' dentro che voglio restino per sempre su queste pagine....

Alla mia mamma Donatella,

andrà per sempre il mio grazie.... per essermi stata sempre amica, offrendomi nel buio l'alternativa che talvolta non riuscivo a vedere, per avermi sostenuta fin qui accompagnandomi con la dedizione più profonda e per avermi insegnato la dignità di vivere rifiutando il compromesso;

Al mio compagno Mattia,

che in questi anni di dottorato è cresciuto con me, dedico un grazie immenso per aver creduto costantemente nella mia persona e nel mio sogno, per avermi amato tanto da farmi crescere come donna, così che io potessi abbandonare le mie difese e provare la gioia di fidarsi davvero di qualcuno.