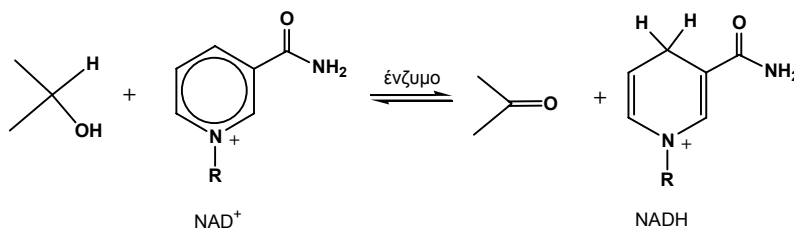


Μηχανισμός και στερεοχημεία των ενζυματικών οξειδοαναγωγών με συνένζυμο νουκλεοτίδια της πυριδίνης. Εφαρμογή σε οργανικές συνθέσεις.

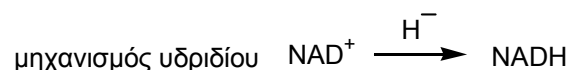
Οι αφυδρογονάσεις που καταλύουν την αντιστρεπτή μετατροπή διάφορων αλκοολών (ανηγμένη μορφή) προς τις αντίστοιχες καρβονυλικές ενώσεις (οξειδωμένη μορφή) απαιτούν για τη λειτουργία τους ένα συνένζυμο (NAD^+), το οποίο ανήκει στην κατηγορία των N-υποκατεστημένων διυδροπυριδινών (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Το οξειδοαναγωγικό ζεύγος αλκοόλη- κετόνη / NAD^+ - NADH .

Το NAD^+ είναι ένα δινουκλεοτίδιο πυριδίνης και αδενίνης και μολονότι το υπόλοιπο μέρος του μορίου είναι απαραίτητο για την κατάλληλη πρόσδεση του στο ένζυμο, η οξειδοαναγωγική αντίδραση επιτελείται στον δακτύλιο της πυριδίνης ο οποίος έτσι βρίσκεται σε δυο μορφές σε οξειδοαναγωγική ισορροπία : την οξειδωμένη (NAD^+) με δομή N-υποκατεστημένου πυριδινίου κατιόντος που ανάγεται σε NADH οξειδώνοντας την αλκοολομάδα σε καρβονυλομάδα. Η αντίδραση είναι αντιστρεπτή και ανάλογα με τις συνθήκες συγκέντρωσης μπορεί να λειτουργήσει είτε ως οξείδωση αλκοόλης προς καρβονυλική ένωση είτε ως αναγωγή της καρβονυλικής ένωσης προς αλκοόλη. Το συνένζυμο, με την μετατόπιση της ισορροπίας προς την μια ή την άλλη κατεύθυνση συσσωρεύεται στην μια από τις δυο μορφές (NAD^+ ή NADH), γι' αυτό στα βιολογικά συστήματα η δράση του κύκλου NAD^+ / NADH είναι συζευγμένη με άλλους οξειδοαναγωγικούς κύκλους ώστε να αποκαθιστάται το συνένζυμο στην αναγκαία μορφή κατά περίπτωση (NAD^+ είτε NADH).

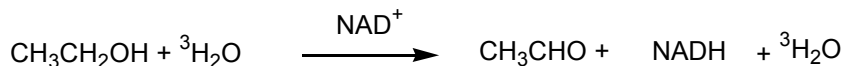
Όσον αφορά το σύστημα NAD^+ / NADH η αντίδραση τυπικά είναι μια μετακίνηση δυο ηλεκτρονίων, την οποία μπορούμε να φαντασθούμε είτε ως μετακίνηση ασύζευκτων ηλεκτρονίων (ριζικός μηχανισμός) είτε ως μετακίνηση ανιόντος υδρογόνου (ιοντικός μηχανισμός υδριδίου).



Η διαμεσολάβηση υδριδίου ιόντος κατά τη λειτουργία ενός μηχανισμού οξειδοαναγωγής σε οργανικό διαλύτη με υδρίδια μετάλλων (π.χ. BH_4^-) είναι γνωστή από την οργανική χημεία, αλλά στην προκειμένη περίπτωση του συνενζύμου όπου το περιβάλλον είναι υδατικό η

δημιουργία και μετακίνηση ιόντων υδριδίου μπορεί να φαίνεται εκ πρώτης όψεως ως μη πιθανός μηχανισμός. Εν τούτοις πολλές παρατηρήσεις συνηγορούν για ένα τέτοιο μηχανισμό υδριδίου:

■ Εάν η αντίδραση οξειδωσης της αιθανόλης προς ακεταλδεύδη γίνει σε περιβάλλον $^3\text{H}_2\text{O}$ παρατηρείται ότι δεν ενσωματώνεται ραδιενέργεια στο παραγόμενο NADH

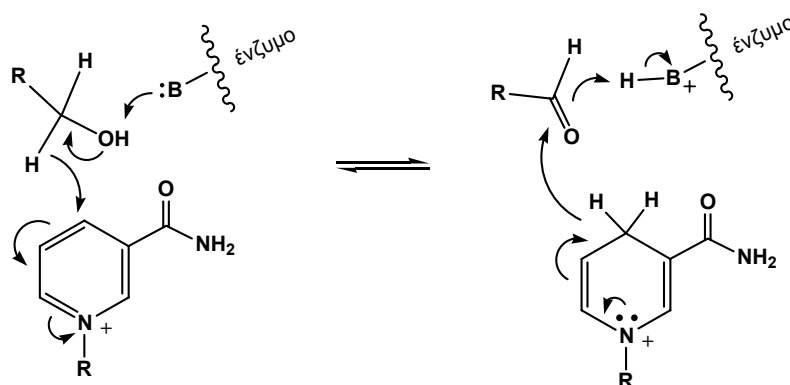


όπως θα ήταν αναμενόμενο αν η μετατροπή γινόταν με μεταφορά ηλεκτρονίου, οπότε αναγκαστικά θα περιλάμβανε και ένα στάδιο πρωτονίωσης. Αφού λοιπόν δεν ανταλλάσσονται πρωτόνια (και άρα ούτε και ασύζευκτα ηλεκτρόνια) θα πρέπει να ανταλλάσσονται υδρίδια ανιόντα.

■ Εάν για την παραπάνω αντίδραση σε κοινό νερό χρησιμοποιηθεί αιθανόλη επισημασμένη στη μεθυλενομάδα με δευτέριο, το ισότοπο βρίσκεται αποκλειστικά στο παραγόμενο NADH και καθόλου στο διαλύτη νερό. Και αντιστρόφως, παρατηρήθηκε ότι δευτεριωμένο $\text{CH}_3\text{CD}_2\text{OH} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{CDO} + \text{NADD}$

συνένζυμο (NADD) που δρα επί ακεταλδεύδης μεταφέρει το ισότοπο αποκλειστικά στην παραγόμενη αιθανόλη και καθόλου στον περιβάλλοντα διαλύτη.

Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν ότι λειτουργεί ένας μηχανισμός μεταφοράς υδριδίου όπως φαίνεται στο σχήμα 2.

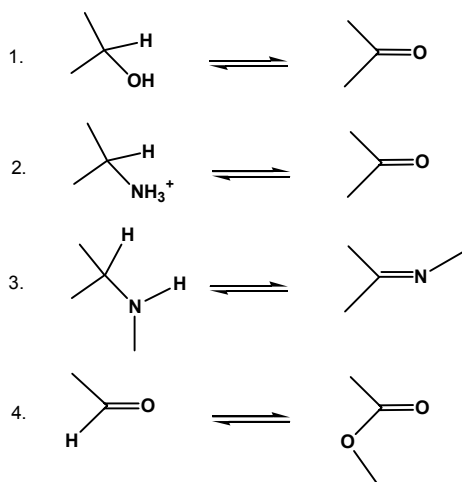


Σχήμα 2. Αλληλομετατροπή (οξειδοαναγωγική) πρωτοταγούς αλκοόλης- αλδεύδης καταλυόμενη από αλκοολικές αφυδρογονάσες με συνένζυμο NAD⁺.

Το κύριο χαρακτηριστικό του μηχανισμού όπως παρουσιάζεται στο παραπάνω σχήμα 2 είναι η μετακίνηση ηλεκτρονικής πυκνότητας προς το δακτύλιο του πυριδινίου κατιόντος με πυρηνόφιλη προσθήκη ενός υδριδίου στη θέση 4 του δακτυλίου, τετραεδροποίηση του άνθρακα 4 και ταυτοχρόνως και του αζώτου και εξουδετέρωση (συνολικά) του φορτίου, αλλά ταυτοχρόνως και απώλεια της αρωματικότητας του δακτυλίου. Στην αντίστροφη αντίδραση (από δεξιά προς αριστερά) το άζωτο είναι πλούσιο σε ηλεκτρονική πυκνότητα και την αποδίδει από τη θέση 4, μέσω ενός υδριδίου, προς τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του αλδευδικού καρβονυλίου, ενώ ταυτόχρονα ο ετεροκυκλικός δακτύλιος ανακτά την

αρωματικότητα. Τα δυο φαινόμενα (εξουδετέρωση φορτίου και απώλεια αρωματικότητας) είναι αντίθετα από άποψη ενεργειακού οφέλους για το μόριο και στη συγκεκριμένη δομή του NAD^+ βρίσκονται σε ισορροπία περίπου, ώστε το σύστημα να μπορεί εύκολα να μετακινηθεί προς την μια ή την άλλη κατεύθυνση υπό την επήρεια παραγόντων που επηρεάζουν δευτερευόντως την ισορροπία (π.χ. συγκεντρώσεις).

Τα συνένζυμα νικοτιναμιδίου (NAD^+ καθώς και το φωσφορυλιωμένο ανάλογό του, το NADP^+) συνεργάζονται με πολλά ένζυμα της οικογένειας των αφυδρογονασών και καταλύουν γενικά τις αντιδράσεις δημιουργίας διπλού δεσμού άνθρακα-ετεροατόμου από οξείδωση του απλού δεσμού άνθρακα ετεροατόμου. (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Αντιδράσεις καταλυόμενες από ένζυμα που περιέχουν νουκλεοτίδια του νικοτιναμιδίου ως συνένζυμα.

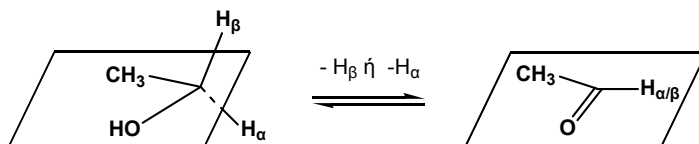
Η μετακίνηση υδριδίου που προτάθηκε για το μηχανισμό δράσης του νικοτιναμιδίου συμφωνεί και με τη στεreoχημεία των δομών που συμμετέχουν, τόσο για το υπόστρωμα όσο και για το ίδιο το συνένζυμο όπως θα φανεί στη συνέχεια.

Στεreoχημεία του υποστρώματος

Οι απλούστερες πρωτοταγείς αλκοόλες (π.χ. αιθανόλη), που είναι τυπικά υποστρώματα του NAD^+ , είναι αχειρικές δομές με προχειρικό τον τετραεδρικό άνθρακα C-1, που φέρει την υδροξυλομάδα. Ο άνθρακας C-1 μετατρέπεται σε τριγωνικό, προχειρικό επίσης, άνθρακα αλδεϋδομάδας. Ο άνθρακας C-1 της αλκοόλης έχει δυο ίδιους αλλά τοπολογικά διαφορετικούς υποκαταστάτες (τα δυο υδρογόνα) καθώς αυτοί βρίσκονται σε διαφορετικές πλευρές του επιπέδου συμμετρίας που ορίζεται από τα άτομα C-2/ C-1/O και συνεπώς είναι ετεροτοπικοί και συγκεκριμένα εναντιοτοπικοί. Ομοίως, στην αλδεϋδομάδα το επίπεδο που ορίζεται από τα ίδια άτομα C-2/ C-1/O είναι επίπεδο συμμετρίας και έχει δυο πλευρές που χαρακτηρίζονται ως εναντιοτοπικές. Η πρόσδεση νέου υποκαταστάτη στον καρβονυλικό άνθρακα θα γίνει από την μια ή την άλλη πλευρά του επιπέδου και ο υποκαταστάτης θα βρεθεί στην αντίστοιχη θέση στο τετράεδρο που θα δημιουργηθεί. (Σχήμα 4)

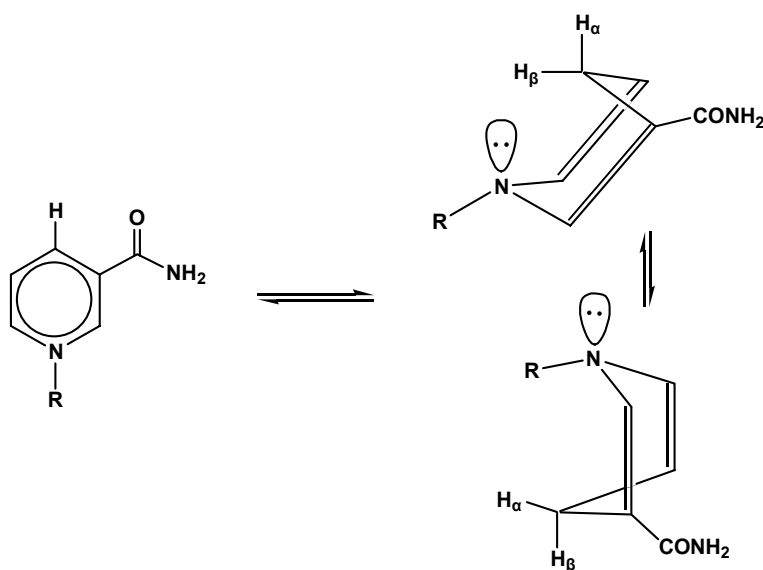
Επειδή στην προκειμένη αντίδραση ο υποκαταστάτης που μετακινείται (άτομο H) συνυπάρχει με όμοιό του (δεύτερο άτομο H) η προχειρικότητα δεν εκδηλώνεται ώστε να οδηγήσει σε χειρικότητα (εναντιομερή). Έτσι οι δομές παραμένουν μεν αχειρικές οι υποκαταστάτες όμως κατέχουν διακριτές θέσεις στο χώρο (εναντιοτοπικές θέσεις).

Από ενεργειακή άποψη δεν υπάρχει καμία διαφοροποίηση στην απόσπαση του ενός ή του άλλου ατόμου υδρογόνου, υπό την προϋπόθεση ότι το περιβάλλον του μορίου είναι αχειρικό και το ίδιο ισχύει και για την αντίστροφη αντίδραση της προσθήκης του υδριδίου στην μια ή την άλλη πλευρά της αλδεΐδης (Σχήμα 4).



Σχήμα 4. Οι δυο εναντιοτοπικές πλευρές των μορίων της αιθανόλης (καταλαμβάνονται από εναντιοτοπικούς υποκαταστάτες) και της ακεταλδεΐδης (δεν περιέχουν υποκαταστάτες).

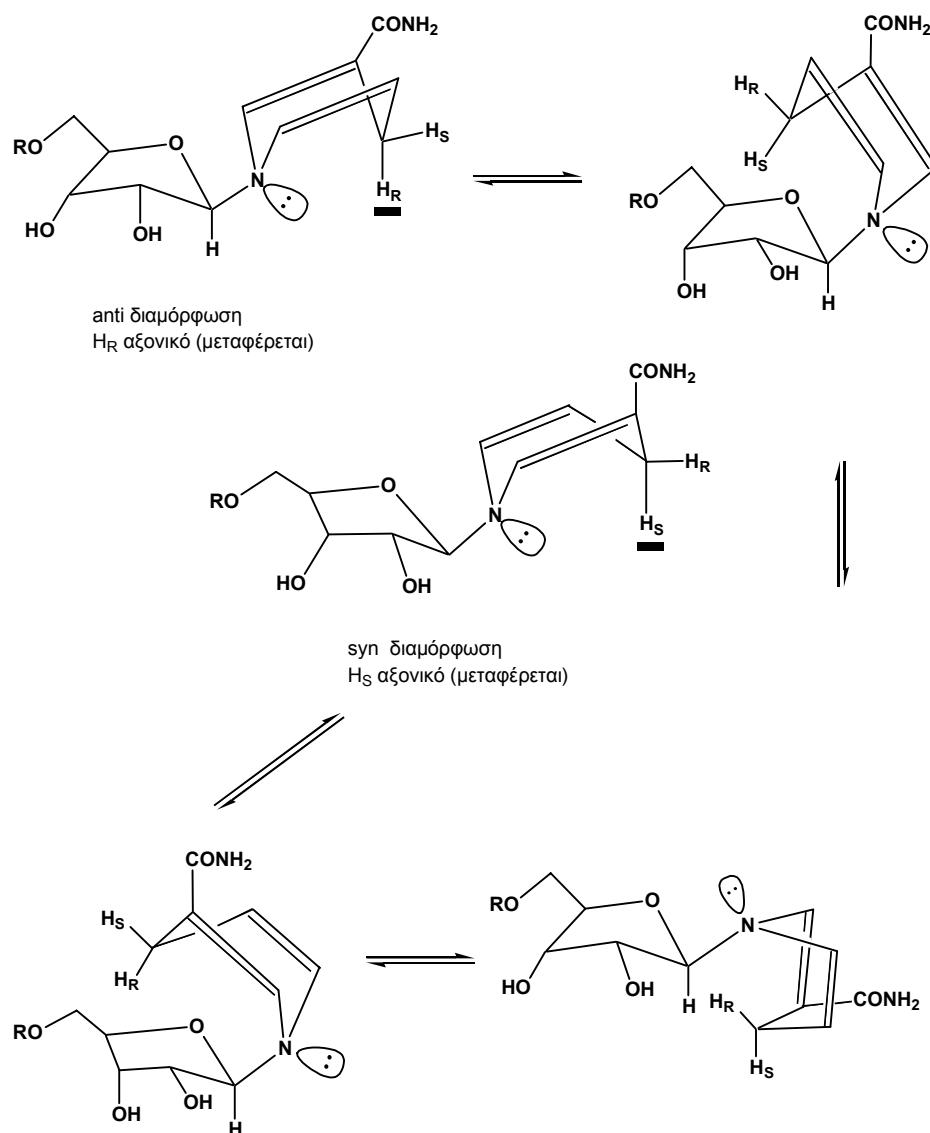
Στην οξειδωμένη του μορφή (NAD^+) το συνένζυμο περιέχει τον επίπεδο δακτύλιο του πυριδινίου με ένα άτομο υδρογόνου στη θέση 4. Οι δυο πλευρές του δακτυλίου στο απομονωμένο συνένζυμο, και εφ' όσον αγνοηθεί ο χειρικός υποκαταστάτης του N θα χαρακτηρίζονταν ως εναντιοτοπικές και θα υποδέχονταν την προσέγγιση του πυρηνόφιλου H^- με την ίδια ευκολία για να δώσουν την ανηγμένη μορφή με δομή διυδροπυριδίνης. Τυπικά βεβαίως ο δυο όψεις του δακτυλίου είναι διαστερεοτοπικές αφού ο υποκαταστάτης του N περιέχει και χειρικό τμήμα (την D-ριβόζη). Η ανηγμένη μορφή έχει δομή λουτήρα όπως όλα τα εξαμελή 1,4-διένια (Σχήμα 5) και είναι διαμορφωτικά ευκίνητη (τόσο με αναστροφή του



Σχήμα 5. Οι δυο διαστερεοτοπικές πλευρές του NAD^+ και τα διαστερεοτοπικά υδρογόνα του C-4 στις διαμορφώσεις λουτήρα του NADH .

λουτήρα και εναλλαγή των διδύμων υδρογόνων της θέσης 4 μεταξύ αξονικής και ισημερινής θέσης όσο και με πυραμιδική αναστροφή του τετραεδρικού αζώτου και εναλλαγή του ζεύγους ηλεκτρονίων μεταξύ αξονικής και ισημερινής τοποθέτησης).

Η διαστερεοτοπικότητα των υδρογόνων του C-4 γίνεται καλύτερα αντιληπτή με πληρέστερη αναπαράσταση του μορίου, όπως φαίνεται στο σχήμα 6. από το σχήμα γίνεται φανερό πως πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν και το ανωμερικό φαινόμενο που λειτουργεί με επικάλυψη του ζεύγους ηλεκτρονίων του N με το αντιδεσμικό τροχιακό του δεσμού C—O της ριβοφουρανόζης. Δηλαδή το ζεύγος πρέπει να είναι αντιπαράλληλο στο δεσμό C—O του δακτυλίου.

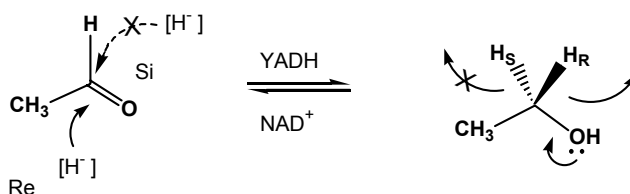


Σχήμα 6. Διαμορφωτικά ισομερή του διυδρονικοτιναμιδικού δακτυλίου στο NADH. Τα σταθερότερα είναι τα anti και syn που αποδίδουν υδρίδιο από τα αξονικά υδρογόνα της θέσης 4 (σημειωμένα έντονα).

R= ADP (Διφωσφορική αδενosίνη)

Στο σχήμα 6 δείχνονται οι δυο ευνοϊκότερες διαμορφώσεις του NADH. Η ονομαζόμενη *syn* με την καρβοξαμιδική ομάδα προς την πλευρά του δακτυλίου της ριβόζης και το ζεύγος του N αντιπαράλληλο στο δεσμό C—O, και το ονομαζόμενο *anti* με το καρβοξαμίδιο μακριά από το δακτύλιο ριβόζης. Στο σχήμα επισημαίνονται τα διαστερεοτοπικά υδρογόνα με τους στερεοχημικούς τους δείκτες R και S. Έχει βρεθεί ότι το υδρογόνο που θα μεταφερθεί ως ανιόν υδριδίου, κατά την αναγωγική δράση του NADH, είναι το αξονικό (ακριβέστερα ιστιαίο) στη δομή λουτήρα. Αυτό πιστεύεται ότι συμβαίνει λόγω υποβοήθησης από το σχεδόν συμπαράλληλο ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου. Από το σχήμα 6 φαίνεται ότι αξονική θέση μπορεί να υιοθετήσουν και τα δυο υδρογόνα της μεθυλενομάδας μέσω των εναλλακτικών διαμορφώσεων *anti* και *syn*. Εξαρτάται από το συγκεκριμένο ένζυμο ποιά από τις δυο διαμορφώσεις (*anti* ή *syn*) θα επιβληθεί κατά την προσρόφηση του συνενζύμου. Για ένα συγκεκριμένο ένζυμο είναι πάντα η ίδια και άρα πάντα μεταφέρεται το αντίστοιχο αξονικό υδρογόνο. Έχει βρεθεί π.χ. ότι η αλκοολική αφυδρογονάση της ζύμης (YADH) είναι απολύτως στερεοειδική ως προς τη μεταφορά του αξονικού *pro-R* υδρογόνου με πρόσδεση του συνενζύμου στην *anti* διαμόρφωση (δες σχήμα 6). Αντίθετα, άλλα ένζυμα όπως η αφυδρογονάση της 3-φωσφογλυκεριναλδεϋδης χρησιμοποιούν το NADH στην *syn* διαμόρφωση του και είναι στερεοειδικά στην απόδοση του *pro-S* υδρογόνου.

Ανάλογη στερεοειδικέυση (και πολύ σημαντικότερη ως προς τις συνέπειες) παρατηρείται και από την πλευρά του υποστρώματος. Η προσθήκη υδριδίου πραγματοποιείται προς τη μια μόνο πλευρά του αλδεϋδικού καρβονυλίου ανάλογα με το ένζυμο. Η στερεοειδικέυση αυτή είναι χαρακτηριστική για κάθε αφυδρογονάση που χρησιμοποιεί NADH. Η αλκοολική αφυδρογονάση της ζύμης (YADH) π.χ. αποδίδει το υδρίδιο πάντα προς *Re* πλευρά της ακεταλδεϋδης (Σχήμα 7) δηλαδή την εμπρός πλευρά όταν η ακεταλδεϋδη είναι σχεδιασμένη στο επίπεδο του χαρτιού με τη μεθυλομάδα αριστερά, το οξυγόνο δεξιά και το υδρογόνο προς τα άνω. Αφυδρογονάσες άλλης προέλευσης εμφανίζουν την αντίθετη στερεοειδικέυση.



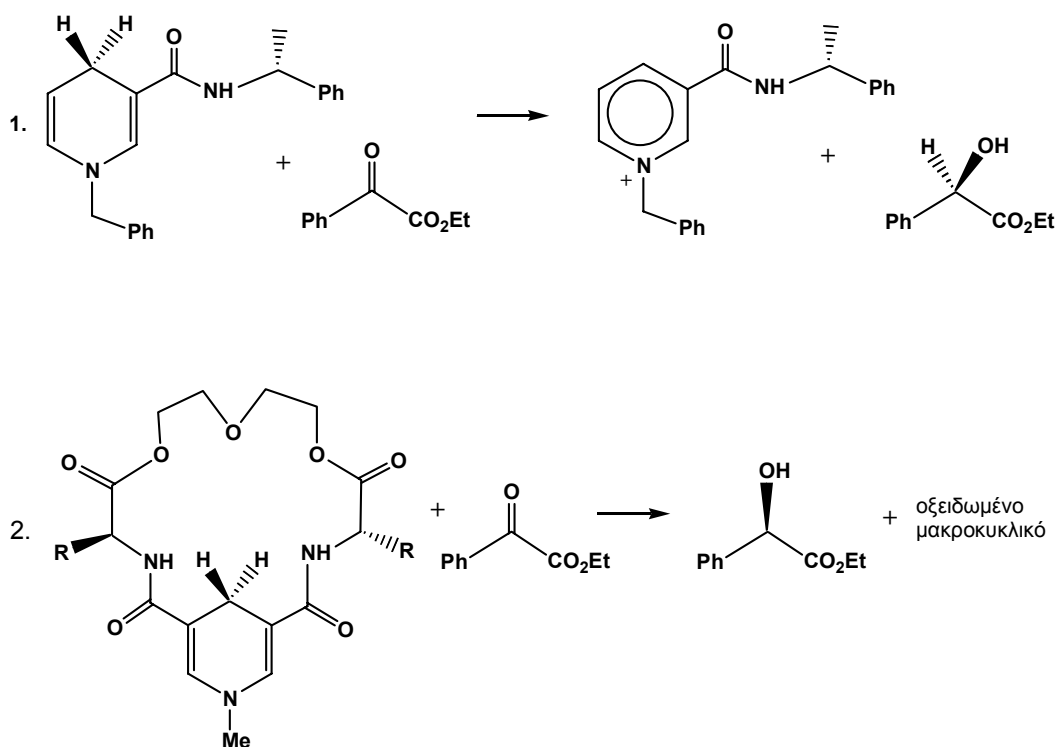
Σχήμα 7. Στερεοειδική μετακίνηση υδριδίου (οξειδοαναγωγή) στο ζεύγος αιθανόλης – ακεταλδεϋδης με τη διαμεσολάβηση ενζύμου.

Επειδή τόσο το NAD^+ όσο και το NADH είναι χειρικά μόρια (λόγω του χειρικού δακτυλίου ριβοφουρανόζης που περιέχουν) η αλληλεπίδραση τους με τα χειρικά μόρια της ακεταλδεϋδης και της αιθανόλης θεωρητικά αναμένεται να γίνεται μέσω διαστερεοτοπικών μεταβατικών καταστάσεων ανεξάρτητα από την παρουσία του ενζύμου. Είναι επίσης άσχετο το γεγονός ότι αυτή η εκλεκτικότητα (πλευράς ή υποκαταστάτη) δεν οδηγεί σε χειρικά

προϊόντα στη συγκεκριμένη περίπτωση της ακεταλδεΐδης / αιθανόλης. Για την καλύτερη κατανόηση των παραπάνω μπορούν να χρησιμεύσουν τα συγκεκριμένα παραδείγματα που θα ακολουθήσουν.

Δομικά ανάλογα του NADH / NAD⁺.

Έχουν παρασκευασθεί διάφορα χειρικά 1,4-διυδρονικοτιναμίδια τα οποία βρέθηκε ότι μπορούν να ανάγουν (εναντιοεκλεκτικά) κετονικά και αλδεϋδικά καρβονύλια όπως στο (Σχήμα 8), απουσία ενζύμου.



Σχήμα 8. 1,4-διϋδροπυριδινικά ανάλογα του NADH.

Στα παραδείγματα του σχήματος 8 τα χειρικά κέντρα του μορίου βρίσκονται στην πλευρική αλυσίδα του καρβοξαμιδίου και όχι στο άζωτο του δακτυλίου όπως στο NADH, αυτό όμως δεν αλλάζει καθόλου την ουσία του παραδείγματος.

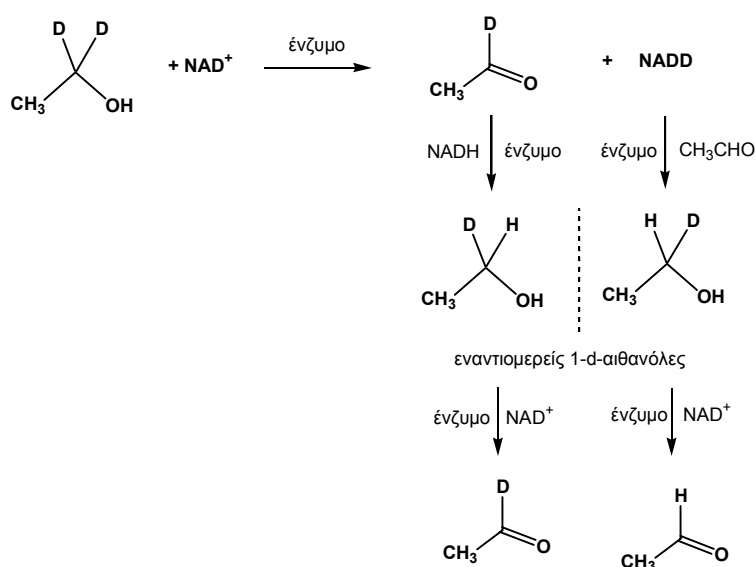
Ισοτοπικά επισημασμένα υποστρώματα του NAD⁺.

Η στερεοειδική απόσπαση υδρογόνου από την προχειρική μεθυλενομάδα της αιθανόλης μπορεί να αποκαλυφθεί εάν χρησιμοποιηθεί εναντιοεκλεκτικά μονοδευτεριωμένη αιθανόλη στον C-1. Για τη σύνθεση τέτοιου παραγώγου υπάρχουν συνθετικά σχήματα τα οποία έχουν

αναφερθεί στο κεφάλαιο των στεreoχημικών συσχετισμών. Στο παράδειγμα που ακολουθεί μπορεί να εφαρμοσθεί μια διαφορετική προσέγγιση, όπου χρησιμοποιώντας το ίδιο το ενζυμικό σύστημα παράγεται μια εναντιομερικά επισημασμένη αλκοόλη και αυτή χρησιμοποιείται στη συνέχεια για την ανάδειξη της στερεοειδίκευσης, χωρίς όμως να μπορεί να βγει συμπέρασμα για την απόλυτη στερεοχημεία της (R ή S). Είναι σχετικά απλή η παρασκευή

C-1 δευτεριωμένης αλκοόλης $\text{CH}_3\text{CD}_2\text{OH}$ π.χ. με αναγωγή οξικού εστέρα από δευτερίδιο του Αργιλίου LiAlD_4 .

Εάν αυτή η αλκοόλη οξειδωθεί με το σύστημα συνενζύμου / ενζύμου παράγεται δευτεριωμένη ακεταλδεΐδη στη θέση C-1, όπως φαίνεται στο Σχήμα 9, και ένα ισοδύναμο δευτερίου

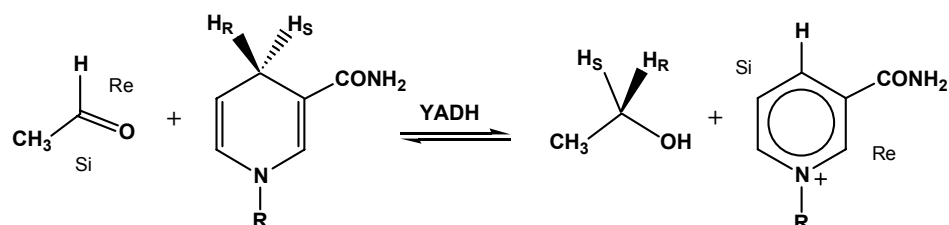


Σχήμα 9. Η εναντιοεκλεκτική ισοτοπική επισήμανση της αιθανόλης αποδεικνύει τη στερεοειδικότητα της ενζυμικής οξειδοαναγωγής αιθανόλη – ακεταλδεΐδη.

μεταφέρεται στο NAD^+ και το επισημαίνει έτσι ως NADD. Εάν το επισημασμένο NADD ανάγει κοινή ακεταλδεΐδη το ισότοπο μεταφέρεται ποσοτικά και παράγεται οπτικά ενεργή μονοεπισημασμένη αιθανόλη. Εάν η 1-δευτεριοακεταλδεΐδη αναχθεί με κοινό NADH παράγεται επίσης μονοεπισημασμένη οπτικά ενεργή αιθανόλη που όμως είναι εναντιομερής με την πρώτη. Οι δυο αντιδράσεις αναγωγής διαφέρουν κατά το ότι στην μια προϋπάρχει το πρώτιο και εισάγεται δευτέριο ενώ στην άλλη προϋπάρχει το δευτέριο και εισάγεται πρώτιο. Αφού τα χειρικά κέντρα που δημιουργούνται στις δυο περιπτώσεις είναι εναντιομερή θα πρέπει η εισαγωγή να γίνεται από την ίδια πλευρά, δηλαδή στερεοειδικά.

Όσον αφορά το συνένζυμο η ποσοτική μεταφορά του ισότοπου στο υπόστρωμα υποδεικνύει την στερεοειδίκευση. Πρέπει να ξανατονισθεί εδώ ότι οι προηγούμενες παρατηρήσεις δείχνουν την στερεοειδίκευση αλλά όχι και την απόλυτη στερεοχημεία της αντίδρασης. Για να διαπιστωθεί η απόλυτη δομή (γεωμετρία) στο χώρο, χρειάζεται πρόσθετη πληροφορία π.χ. να

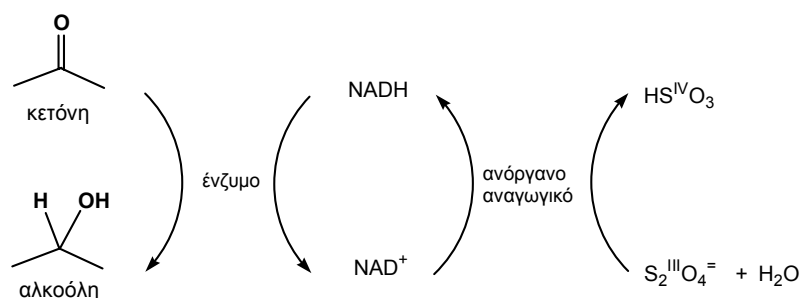
συσχετισθεί η χειρική δευτεροαιθανόλη που παράγεται με τις συνθετικές δευτεροαιθανόλες που είναι ήδη γνωστές από άλλους ανεξάρτητους στερεοχημικούς συσχετισμούς. Η διαπίστωση της απόλυτης στερεοχημείας του επισημασμένου διυδρονικοτιναμιδίου είναι πιο δύσκολο πρόβλημα το οποίο μπορεί να απαντηθεί εμμέσως με γνώση του μηχανισμού και της δομής της μεταβατικής κατάστασης με την συμμετοχή και του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Έχει διαπιστωθεί λοιπόν ότι π.χ. για την αλκοολική αφυδρογονάση της ζύμης (YADH) με τα φυσικά της υποστρώματα, αφαιρείται το pro-R υδρογόνο της αιθανόλης και μεταφέρεται στη re όψη του NAD^+ δημιουργώντας NADH στο οποίο το εισαχθέν υδρογόνο είναι το pro-R. Αντίστροφα, είναι το pro-R υδρογόνο του NADH που μεταφέρεται στη Re όψη του αλδεϋδικού καρβονυλίου δημιουργώντας αιθανόλη στην οποία το εισαχθέν υδρογόνο είναι το pro-R. (Σχήμα 10).



Σχήμα 10. Η απόλυτη στερεοειδίκευση της αφυδρογονάσης της ζύμης (YADH).

Μη φυσικά υποστρώματα των αφυδρογονασών με συνένζυμο το NAD^+ . Εφαρμογές στη στερεοεκλεκτική οργανική σύνθεση.

Οι NAD^+ αφυδρογονάσες παρά τη στερεοειδίκευση που εμφανίζουν είναι ταυτόχρονα μέτριας εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα το οποίο αποδέχονται. Έτσι είναι δυνατόν, να χρησιμοποιηθούν για το στερεοεκλεκτικό μετασχηματισμό πλήθους οργανικών ενώσεων με συνθετικό ή θεωρητικό ενδιαφέρον. Επειδή στις αντιδράσεις καταναλώνεται συνένζυμο (π.χ. το NADH όταν χρησιμοποιούνται για αναγωγές) για να είναι δυνατόν να παραχθούν σημαντικές ποσότητες προϊόντος πρέπει να βρεθεί ένας τρόπος αναγωγής του σχηματιζόμενου NAD^+ πάλι σε NADH . Το ζήτημα αυτό είναι κρίσιμο διότι το NAD^+ δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στοιχειομετρικά αφού είναι ένα εξαιρετικά δαπανηρό αντιδραστήριο. Τρέχουσες τιμές είναι της τάξεως 300 € ανά gr, ή περίπου 250.000€ για ένα mol ! (Σχήμα 11).



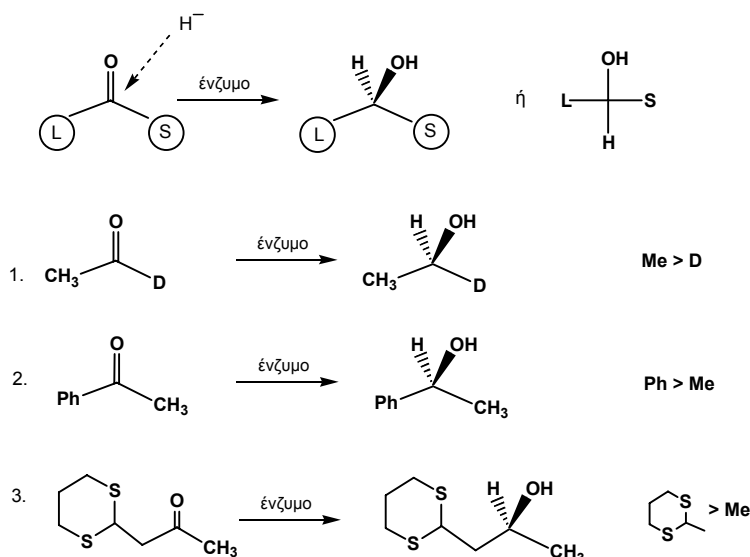
Σχήμα 11. Σχήμα ανακύκλωσης του NAD^+ με διθειονικό άλας.

Σε μια από τις μεθόδους που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιείται το ανόργανο αναγωγικό (πολύ φθινό) διθειονικό νάτριο ως πηγή των απαιτούμενων ηλεκτρονίων για την αναγωγή.

Μια διαφορετική προσέγγιση που εφαρμόζεται συχνά είναι η χρήση ολόκληρης κυτταρικής καλλιέργειας και όχι απομονωμένου ενζύμου, όπως π.χ. ζύμη αρτοποιίας που αναπτύσσεται σε αραιό διάλυμα γλυκόζης. Στην περίπτωση αυτή αναλαμβάνει ο κυτταρικός μηχανισμός την αναγέννηση του NADH με αρχική πηγή των ηλεκτρονίων το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Τέτοιες μέθοδοι είναι ελκυστικά απλές και εύκολες στην υλοποίησή τους και έχουν παρασκευαστική αξία. Όμως οι NAD^+ /αφυδρογονάσες δεν είναι τα μόνα οξειδοαναγωγικά ένζυμα του κυττάρου και γι' αυτό στα παραδείγματα που ακολουθούν αναφέρονται κυρίως αντιδράσεις με απομονωμένα - καθαρισμένα ένζυμα. Οι αντιδράσεις παρουσιάζονται κατά τη φορά της αναγωγής καρβονυλίου προς αλκοόλη και συνεπώς θα χρησιμοποιείται ο όρος επιλογή όψης (επιλογή πλευράς του καρβονυλίου).

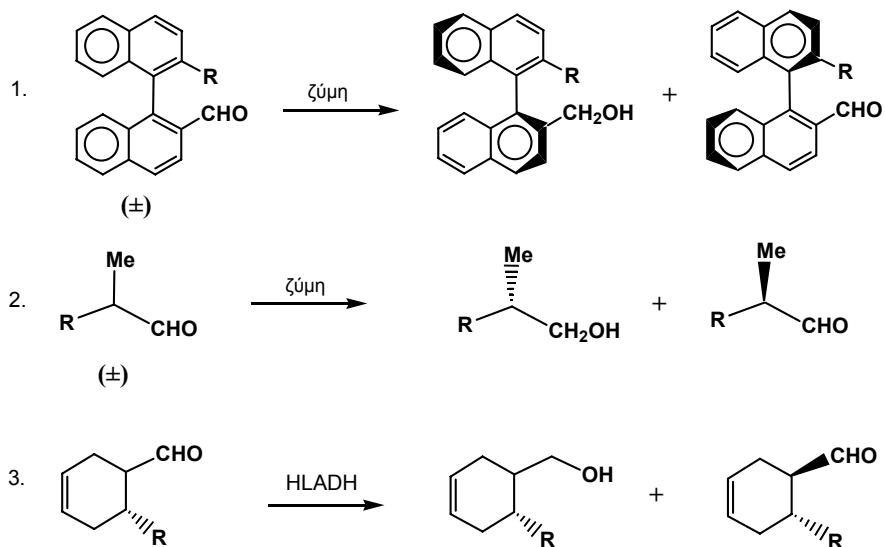
Επιλογή εναντιοτοπικής όψης. Εμπειρικός κανόνας επιλογής.

Στα απλούστερα παραδείγματα (Σχήμα 12) χρησιμοποιούνται προχειρικές κετόνες που ανάγονται σε χειρικές δευτεροταγείς αλκοόλες με προτίμηση του ενός εναντιομερούς. Με τη συλλογή δεδομένων από πολλές αναγωγές έγινε δυνατό να διαπιστωθεί ότι το επικρατέστερο εναντιομερές της αλκοόλης προκύπτει από εισαγωγή του υδρογόνου στην "κάτω" πλευρά του καρβονυλίου εάν η κετόνη σχεδιασθεί στο επίπεδο του χαρτιού με την ογκωδέστερη ομάδα (L) αριστερά, όπως φαίνεται στο σχήμα 12. Αυτό ισχύει για τις περισσότερες αφυδρογονάσες, έχουν όμως βρεθεί και ένζυμα που επιλέγουν κατά προτίμηση την αντίθετη όψη.



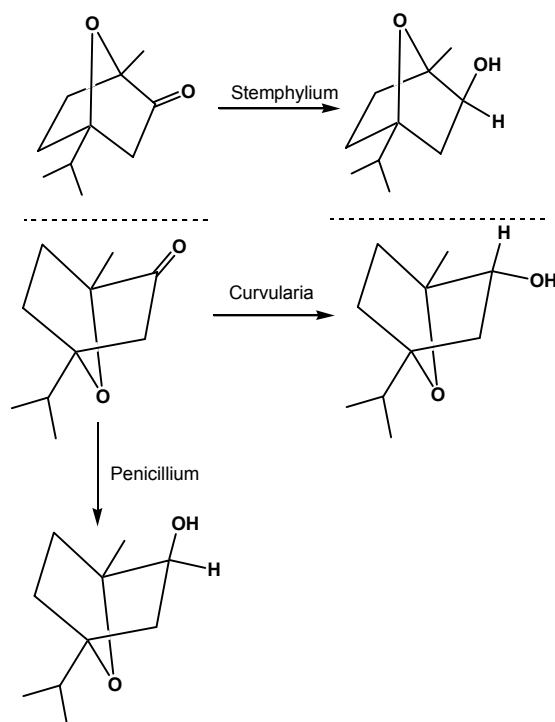
Σχήμα 12. Επιλογή όψης κατά την αναγωγή προχειρικής κετόνης από ζύμη και άλλες αφυδρογονάσες που επιβάλλεται από τους σχετικούς όγκους των υποκαταστατών (L = μεγάλο S= μικρό).

Στα παραδείγματα του Σχήματος 12 η χειρικότητα δημιουργείται στον καρβονυλικό άνθρακα. Υπάρχουν όμως περιπτώσεις που ο αναγόμενος άνθρακας δεν γίνεται χειρικός αλλά υπάρχει ήδη στοιχείο ασυμμετρίας στο μόριο. Σ' αυτές τις περιπτώσεις και πάλι παρατηρείται επιλεκτική αναγωγή του ενός από τα δυο εναντιομερή και η αντίδραση ισοδυναμεί με ανάλυση του ρακεμικού μίγματος. Σχήμα 13.



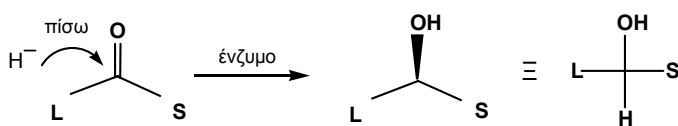
Σχήμα 13. Αναλύσεις ρακεμικών μιγμάτων αλδεύδων με επιλεκτική καταστροφή (αναγωγή) του ενός εναντιομερούς με τη βοήθεια αφυδρογονάσης (YADH= αλκοολική αφυδρογονάση του ήπατος αλόγου).

Στα παραδείγματα του σχήματος 13 οι δυο όψεις του αλδευδικού καρβονυλίου είναι διαστερεοτοπικές λόγω του στοιχείου χειρικότητας που υπάρχει στο μόριο (άξονας χειρικός στο 1 και κέντρα χειρικά στα 2 και 3), επειδή όμως με την αναγωγή δεν εισάγεται νέο χειρικό κέντρο η αναγωγή συνολικά χαρακτηρίζεται ως εναντιοεκλεκτική και όχι διαστερεοεκλεκτική. Στο σχήμα 14 φαίνονται δυο αναγωγές κετονών με διαστερεοεπιλογή όψης σε συστήματα αναγωγής με χρήση καλλιέργειας μικροοργανισμών.



Σχήμα 14. Διαστερεοεκλεκτική ενζυματική αναγωγή της οξοκινεόλης με διάφορους μικροοργανισμούς.

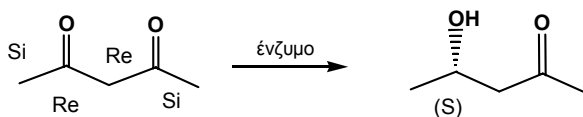
Όπως φαίνεται από τα παραδείγματα που έχουν προηγηθεί υπάρχουν ένζυμα και των δυο στερεοειδικεύσεων, Re ή Si για ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα. Τα πλέον διαδεδομένα όμως φαίνεται πως είναι αυτά που λειτουργούν όπως αναφέρθηκε για την αφυδρογονάση της ζύμης, δηλαδή απόδοση υδριδίου από την πίσω πλευρά του καρβονυλίου όταν σχεδιασθεί κατακόρυφο με τον μεγαλύτερο υποκαταστάτη αριστερά, ώστε να προκύψει αλκοόλη που να έχει το μεγαλύτερο υποκαταστάτη αριστερά στην προβολή Fischer με το υδροξύλιο άνω. (Σχήμα 15)



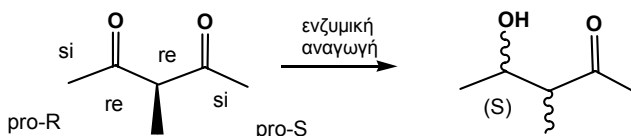
Σχήμα 15. Η συνηθέστερη στερεοειδίκευση των NAD^+ / αφυδρογονασών.

Ωστε για να προβλεφθεί η δομή της χειρικής αλκοόλης που θα προκύψει από την αναγωγή πρέπει να συγκριθούν τα μεγέθη των δυο υποκαταστατών, κάτι το οποίο συχνά γίνεται εύκολα, αλλά όχι πάντοτε.

Μερικά σύνθετα παραδείγματα ενζυμικών αναγωγών.

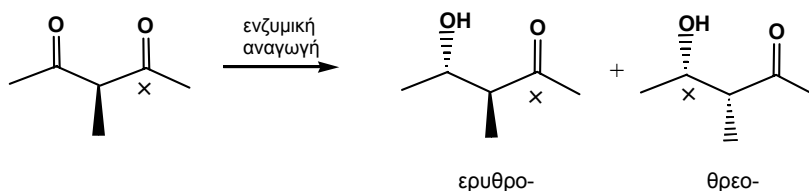


Η ακετυλακετόνη είναι ασφαλώς χειρική ένωση τόσο στη δικετονική μορφή όσο και σε αυτή της συζυγιακής μονοενόλης. Τα δυο καρβονύλια έχουν το καθένα δυο εναντιοτοπικές πλευρές που είναι ομοτοπικές με τις αντίστοιχες πλευρές του άλλου καρβονυλίου, λόγω του άξονα συμμετρίας C_2 που διέρχεται από το μεσαίο άνθρακα. Ώστε τα προϊόντα που αναμένονται από την αναγωγή της μιας μόνο από τις δυο καρβονυλομάδες είναι οι δυο εναντιομερείς β-υδροξυκετόνες. Επειδή η ακετυλομάδα είναι ογκωδέστερη από την απλή μεθυλομάδα, η προσθήκη H^- αναμένεται να γίνεται από τη Re πλευρά και να παράγεται το (S) εναντιομερές της υδροξυκετόνης.

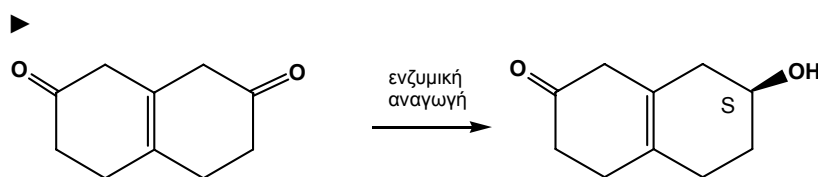


Η 3-μεθυλο-πεντανοδιόνη-2,4 έχει δυο εναντιοτοπικά καρβονύλια (βρίσκονται σε δυο εναντιοτοπικούς κλάδους του μεσαίου άνθρακα) ο οποίος έτσι είναι και αυτός προχειρικός, όπως και οι άνθρακες των δυο καρβονυλίων. Το μόριο δεν έχει άξονα συμμετρίας και με την αναγωγή αποκτά ταυτόχρονα δυο διαφορετικά στερεογονικά κέντρα.

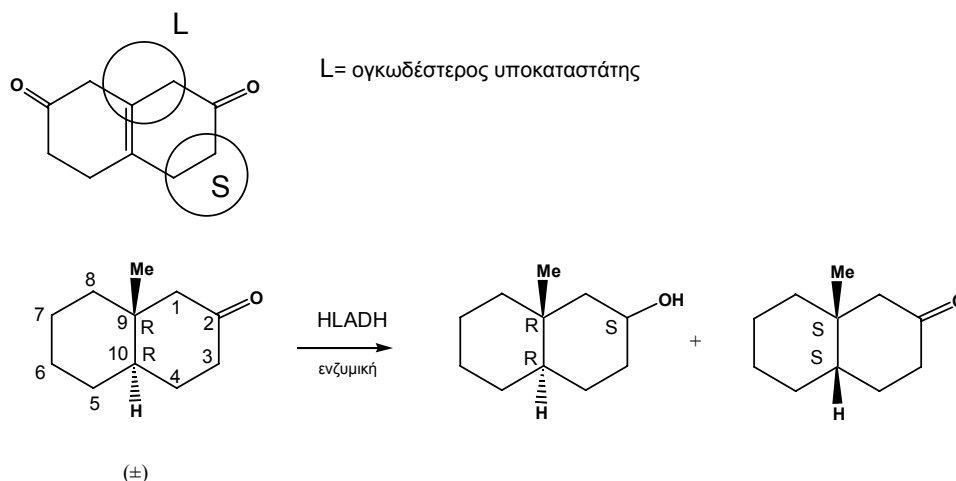
Οι δυο πλευρές κάθε καρβονυλίου είναι διαστερεοτοπικές μεταξύ τους και εναντιοτοπικές με τις αντίστοιχες πλευρές του άλλου καρβονυλίου. Ο μέγιστος αριθμός στερεοϊσομερών είναι 4: δυο διαστερομερή ζεύγη εναντιομερών. Εάν ισχύει για το ένζυμο η ειδικευση που αναφέρθηκε στο προηγούμενο παράδειγμα τότε είναι δυο τα προϊόντα που μπορούν να προκύψουν : τα δυο διαστερομερή ερυθρο- και θρεο- σε εναντιομερικά καθαρή μορφή.



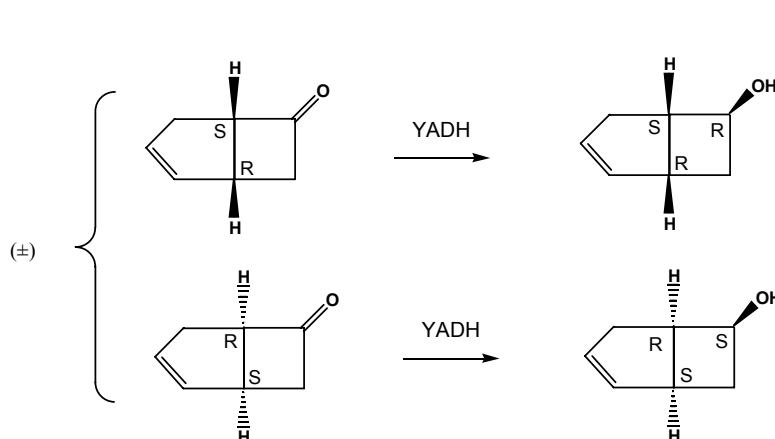
Με x σημειώνεται η προέλευση των ανθράκων στο προϊόν. Μεταξύ των δυο αυτών διαστεροϊσομερών είναι δύσκολο να προβλεφθεί το επικρατέστερο στην κινητική ενζυμική αντίδραση, το ένζυμο όμως παράγει κυρίως την θρεο- αλκοόλη.



Κάθε καρβονύλιο της εικονιζόμενης οκταλινοδιόνης έχει δυο εναντιοτοπικές πλευρές ομοτοπικές με τις αντίστοιχες πλευρές του άλλου, λόγω του άξονα C_2 κατά μήκος του διπλού δεσμού του κυκλοαλκενίου. Έτσι αν ισχύει και πάλι η ίδια στερεοειδίκευση για το ένζυμο το προϊόν πρέπει να είναι η S αλκοόλη επειδή ο δεύτερος δακτύλιος όταν απέχει από το καρβονύλιο κατά μια μεθυλενομάδα παρεμποδίζει περισσότερο (είναι ογκωδέστερος) απ' ότι όταν απέχει κατά δυο μεθυλενομάδες:



Η trans δεκαλόνη που εικονίζεται είναι χειρική ένωση με δυο στερεογονικούς άνθρακες στην ένωση των δακτυλίων και οι δυο πλευρές του καρβονυλίου είναι διαστερεοτοπικές. Εάν η ηπατική αφυδρογονάση του αλόγου (HLADH) έχει την ίδια στερεοειδίκευση που αναφέρεται στα προηγούμενα παραδείγματα, και με βάση την εκτίμηση όγκων των υποκαταστατών του προηγούμενου παραδείγματος θα μπορούσε το προϊόν να είναι μίγμα των δυο διαστερομερών αλκοολών με S στερεοχημεία στον άνθρακα του υδροξυλίου και δομή 9R,10R ή 9S,10S στην ένωση των δακτυλίων. Το συγκεκριμένο ένζυμο όμως έχει αυστηρή στερεοειδίκευση και αναγνωρίζει και τη διαφορά στη δομή των κέντρων της ένωσης των δακτυλίων όπως εμφανίζεται αυτή για τα δυο εναντιομερή της χειρικής κετόνης. Το αποτέλεσμα είναι το ένα από τα δυο εναντιομερή να αντιδρά πολύ ταχύτερα από το άλλο και να είναι αυτό που ανάγεται στην αλκοόλη με S στερεοχημεία, ενώ το άλλο “μη ευνοϊκό” εναντιομερές παραμένει σε μορφή κετόνης και μπορεί να ανακτηθεί μετά το πέρας της αντίδρασης (δηλαδή αναγωγή όλου του “ευνοϊκού” εναντιομερούς). Έτσι παράγεται ως προϊόν ένα συγκεκριμένο διαστερομερές της αλκοόλης (ως καθαρό εναντιομερές) σε ποσότητα μέχρι 50% και παραμένει εναντιοκαθαρή αρχική κετόνη. Μια τέτοια αντίδραση ισοδυναμεί με ανάλυση του ρακεμικού (έστω με απώλεια του ενός εναντιομερούς).



Στο τελευταίο αυτό παράδειγμα και πάλι μια χειρική κετόνη ανάγεται ενζυμικά προς αλκοόλες διαστερομερείς, αλλά δεν μπορεί η μέθοδος να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση του ρακεμικού μίγματος επειδή η ζύμη που χρησιμοποιείται εδώ ανάγει μεν το καρβονύλιο με τοπική στερεοειδίκευση (εισαγωγή H^- από τη γε πλευρά) αλλά αγνοεί τα πιο απομακρυσμένα στερεογονικά κέντρα. (Δεν διαφοροποιεί τα δυο εναντιομερή της κετόνης). Έτσι, και τα δυο εναντιομερή της κετόνης ανάγονται προς αλκοόλες.