

# Réduction énantiosélective d'une cétone grâce à la levure de boulanger : un exemple de bioconversion

## Problématique :

En quoi la réduction du benzoylformate d'éthyle par la levure de boulanger permet-elle d'illustrer simplement l'intérêt et les enjeux de la catalyse enzymatique dans une synthèse énantiosélective ?

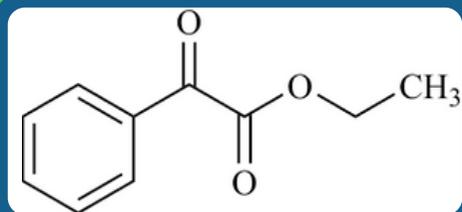


Figure 1 -  
Réactif : benzoylformate d'éthyle

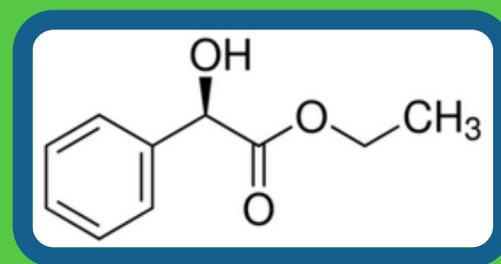


Figure 2 -  
Produit : (R)-mandélate d'éthyle

# Introduction

- Différentes méthodes de synthèse asymétrique :
  - **Dédoublement racémique** par séparation de deux énantiomères
  - Synthèse stoechiométrique à partir d'**intermédiaires chiraux** ou **prochiraux**
  - **Catalyse asymétrique**
- Intérêts de la catalyse enzymatique :
  - **Coût modéré** de la synthèse
  - **Temps** de la réaction, **conditions expérimentales douces**
  - Inscription dans les principes de la **chimie verte**
  - Utilité grandissante dans **l'industrie pharmaceutique**

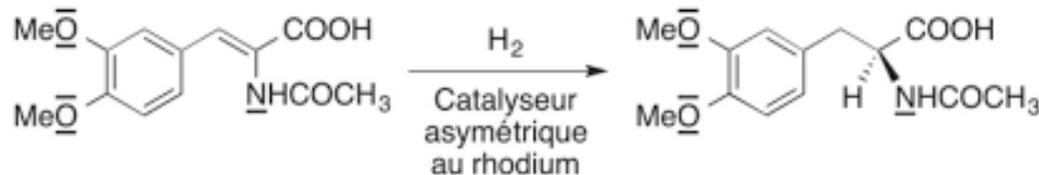


Figure 3 - Synthèse de la L-DOPA (traitement parkinsonien) par catalyseur chiral (Knowles, 1968)

**Objectifs :** Démontrer la **stéréosélectivité** induite par la levure de boulanger en comparant les produits obtenus par les deux voies de synthèse et en modélisant l'interaction par la **théorie des orbitales moléculaires**.

## 1. Présentation des deux protocoles de réduction

- a. Réduction par  $\text{NaBH}_4$
- b. Réduction par la levure de boulanger

## 2. Analyse comparative des produits obtenus à l'issue des deux méthodes

- a. A-t-on obtenu le bon produit ? Caractérisation par IR, RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , indice de réfraction
- b. Mise en évidence de l'énantiosélectivité : pouvoir rotatoire et CLHP chirale

## 3. Interprétation théorique de la stéréosélectivité

- a. Rôle de la levure et de la fermentation
- b. Modélisation orbitalaire de l'interaction entre le site actif de l'enzyme et le substrat

# Protocole de réduction par $\text{NaBH}_4$

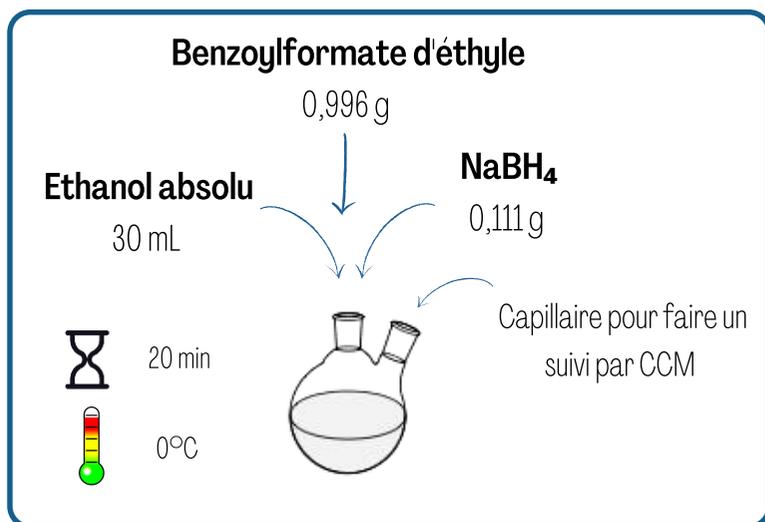


Figure 4 - Schéma du protocole de synthèse

Figure 5 - Photo du montage



réfrigérant à eau

ballon bicol

bain eau-glace

agitateur magnétique

support élévateur

Réactif	Masse (g)	Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	Quantité de matière (mol)	Equivalents
Benzoylformate d'éthyle	0,996	178,18	$5,56 \cdot 10^{-3}$	1
$\text{NaBH}_4$	0,111	37,83	$2,93 \cdot 10^{-3}$	0,5

Figure 6 - Tableau d'engagement de la synthèse

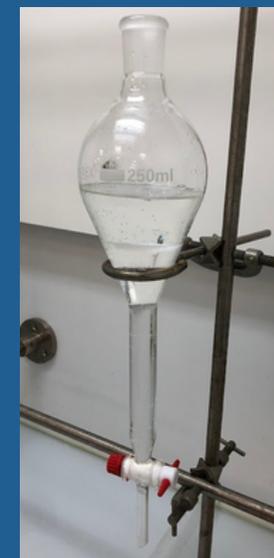


Figure 7 - Extraction de la phase organique



Figure 8 - Passage à l'évaporateur rotatif

# Protocole de réduction par la levure

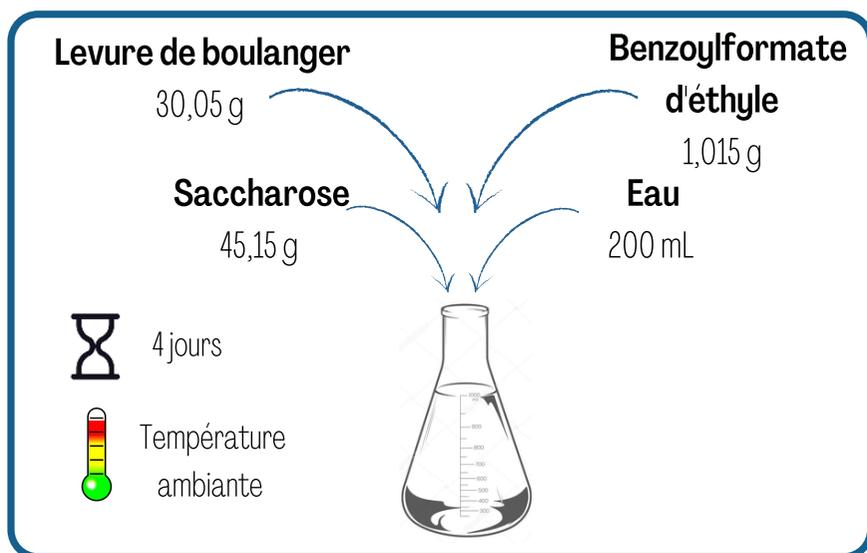
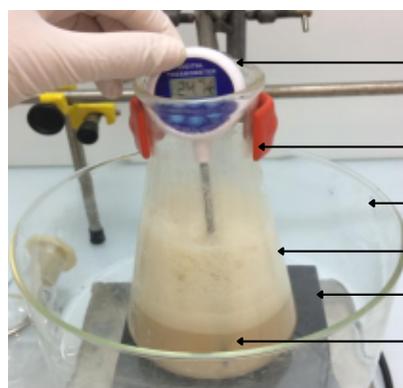


Figure 9 - Schéma du protocole de synthèse



Figure 12 - Filtration sur fritté avec de la Célite

Figure 10 - Photo du montage



- thermomètre
- erlenmeyer
- cristallisoir
- mousse
- agitateur magnétique
- milieu réactionnel

Réactif	Masse (g)	Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	Quantité de matière (mol)	Equivalents
Benzoylformate d'éthyle	1,115	178,18	$5,70 \cdot 10^{-3}$	1
Saccharose	45,15	342,3	0,13	23
Levure	30,05	-	-	-

Figure 11 - Tableau d'engagement de la synthèse



Figure 13 - Extraction de la phase organique

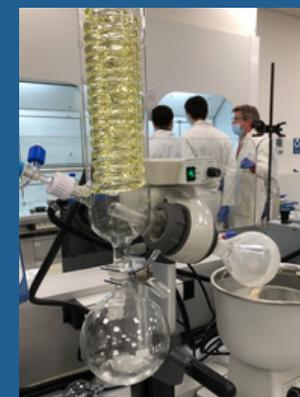


Figure 14 - Passage à l'évaporateur rotatif

# Bilan des deux protocoles

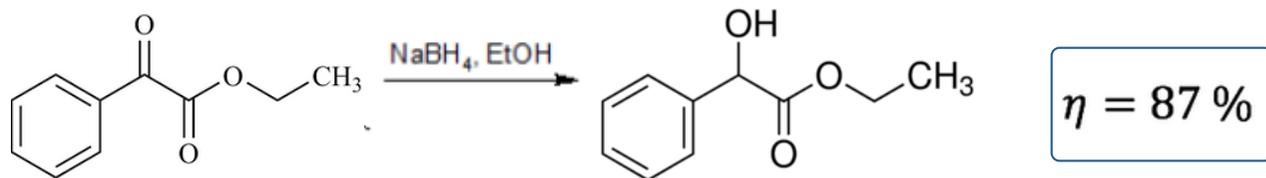


Figure 15 - Bilan de la réaction de réduction par NaBH<sub>4</sub>

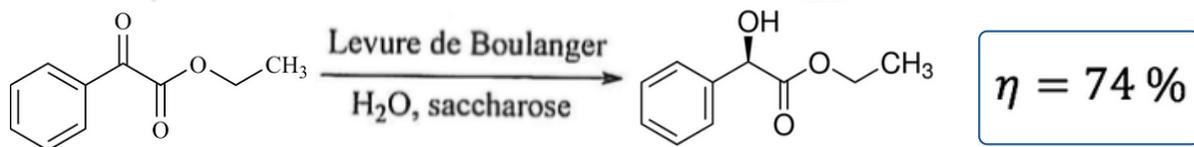
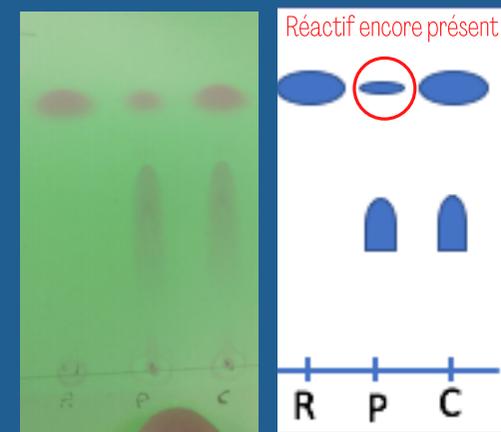
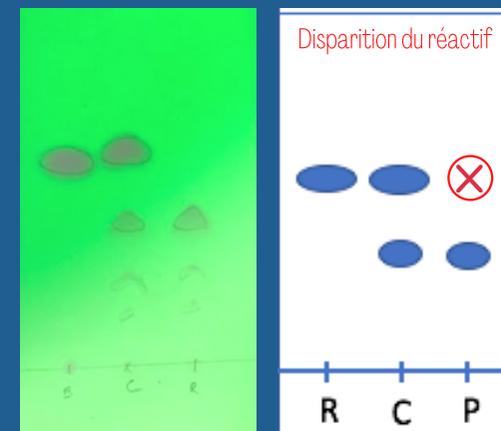


Figure 16 - Bilan de la réaction de réduction par la levure de boulanger

Figure 17 - Suivi de la réaction de réduction par NaBH<sub>4</sub> par CCM



A t = 1 minute



A t = 4 minutes

R : Substrat

C : Co-dépôt

P : Brut réactionnel

**Objectifs :** Démontrer la **stéréosélectivité** induite par la levure de boulanger en comparant les produits obtenus par les deux voies de synthèse et en modélisant l'interaction par la **théorie des orbitales moléculaires**.

## 1. Présentation des deux protocoles de réduction

a. Réduction par  $\text{NaBH}_4$

b. Réduction par la levure de boulanger

## 2. Analyse comparative des produits obtenus à l'issue des deux méthodes

a. A-t-on obtenu le bon produit ? Caractérisation par IR, RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , indice de réfraction

b. Mise en évidence de l'énantiosélectivité : pouvoir rotatoire et CLHP chirale

## 3. Interprétation théorique de la stéréosélectivité

a. Rôle de la levure et de la fermentation

b. Modélisation orbitalaire de l'interaction entre le site actif de l'enzyme et le substrat

# Analyse IR - NaBH<sub>4</sub>

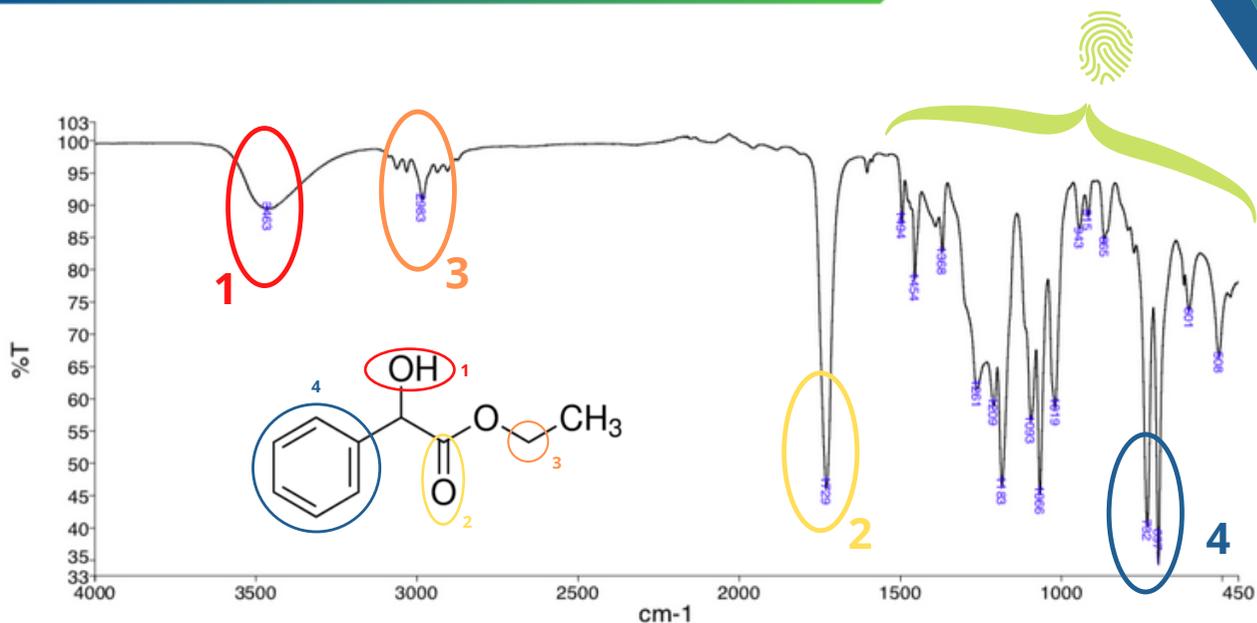
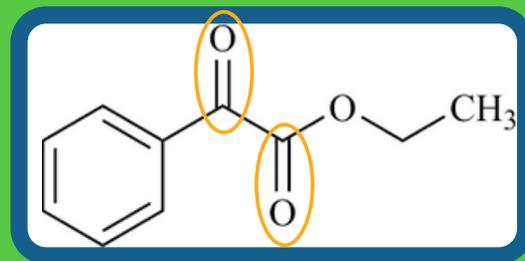


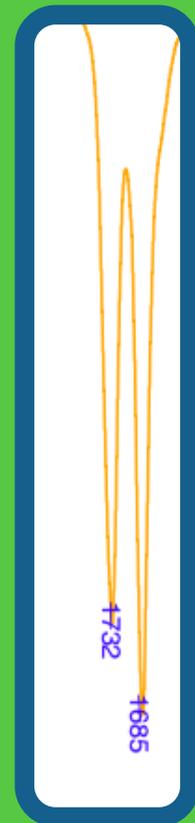
Figure 18 - Spectre infrarouge du produit racémique

Bande d'absorption (cm <sup>-1</sup> )	Caractérisation	Attribution
3 463	Bande O-H d'alcool	1
1 729	Liaison C=O ester non conjuguée	2
2 983	Elongation C-H	3
697 - 732	Déformation hors du plan des H aromatiques	4

Figure 19 - Tableau d'attribution des signaux caractéristiques



Benzoylformate d'éthyle



Disparition de la double bande

# Analyse IR - Levure

Figure 20 - Tableau d'attribution des signaux caractéristiques

Bande d'absorption (cm <sup>-1</sup> )	Caractérisation	Attribution
3 453	Bande O-H d'alcool	1
1 728	Liaison C=O ester non conjuguée	2
2 982 et 3 033	Elongation C-H et C-H aromatique	3 et 4
696 - 731	Déformation hors du plan des H aromatiques	4

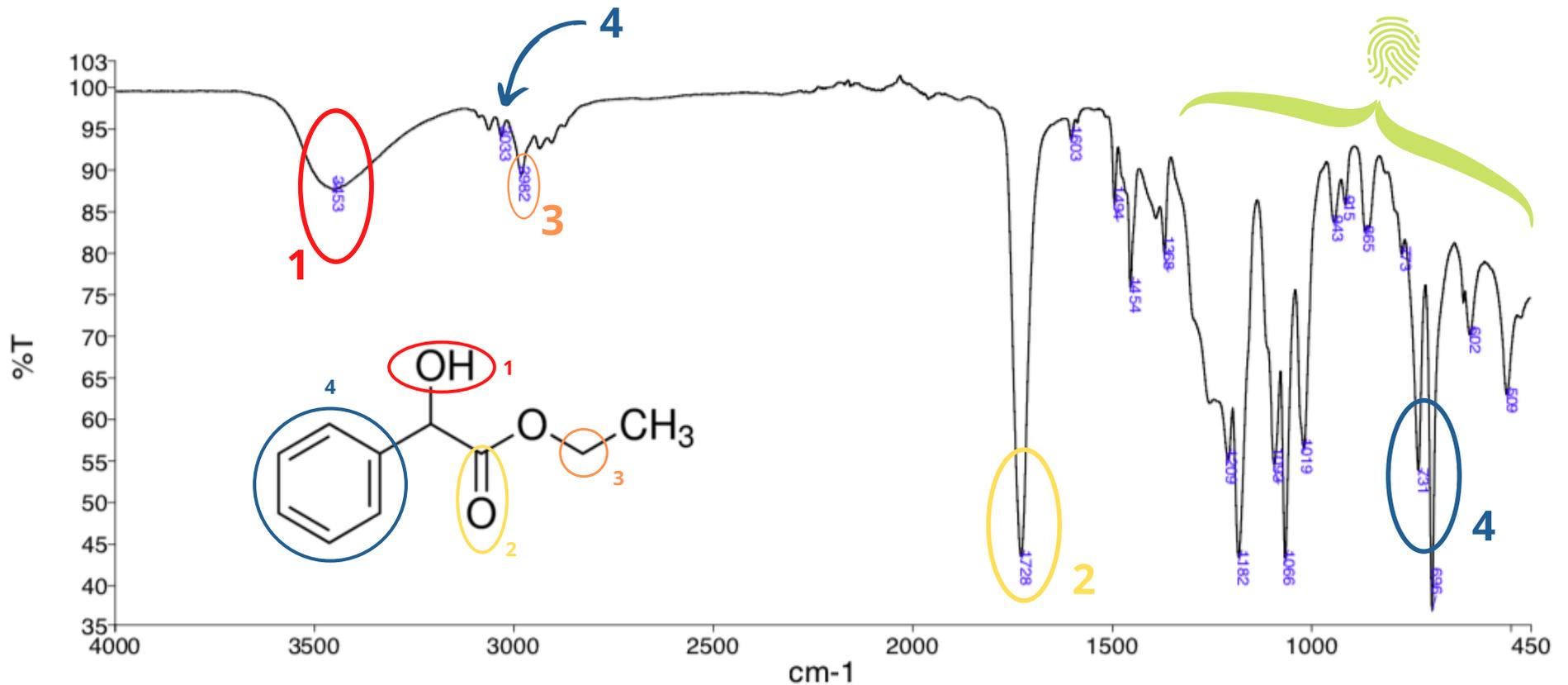


Figure 21- Spectre infrarouge du produit non racémique

# Analyse RMN $^1\text{H}$ - $\text{NaBH}_4$

Déplacement (ppm)	Intégration	Multiplicité	Constantes de couplage	Proposition
7,27 / 7,45	5H	Multiplet	-	Groupe 1
5,17	1H	Singulet	-	Groupe 3
4,15 / 4,3	2H	Deux doublets de quadruplet dédoublé	J = 6 Hz J = 9 Hz	Groupe 4
3,55	1H	Singulet	-	Groupe 2
1,23	3H	Triplet	J = 6 Hz	Groupe 5

Figure 22 - Tableau d'attribution des signaux caractéristiques

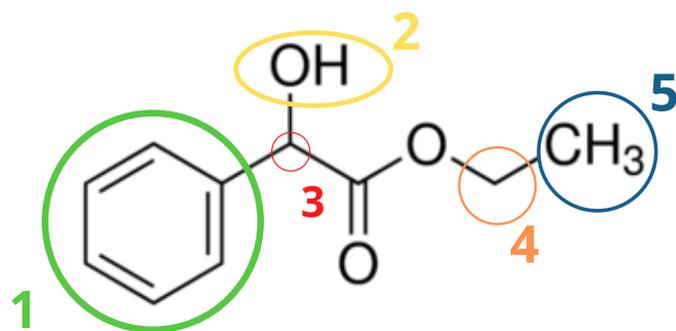
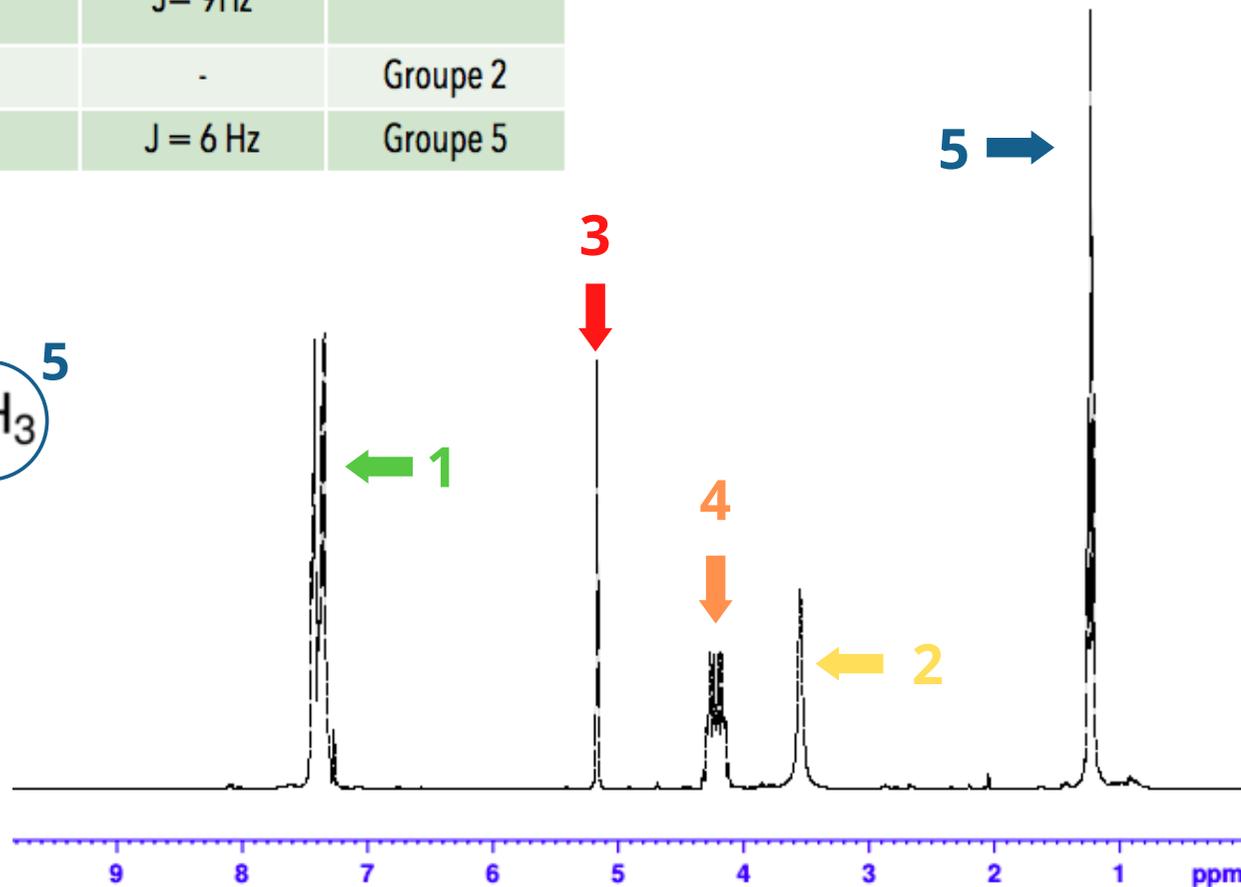


Figure 23 - Spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit racémique à 300 MHz dans le chloroforme deutéré



# Analyse RMN $^1\text{H}$ - Levure

Déplacement (ppm)	Intégration	Multiplicité	Constantes de couplage	Proposition
7,27 / 7,45	5H	Multiplet	-	Groupe 1
5,17	1H	Singulet	-	Groupe 3
4,15 / 4,3	2H	Deux doublets de quadruplet dédoublé	J = 6 Hz J = 9 Hz	Groupe 4
3,31	1H	Singulet	-	Groupe 2
1,23	3H	Triplet	J = 6 Hz	Groupe 5

Figure 24 - Tableau d'attribution des signaux caractéristiques

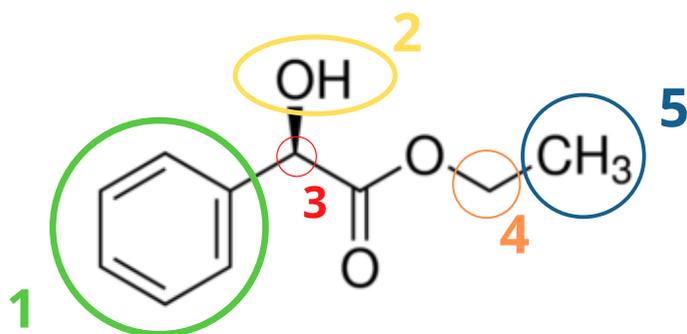
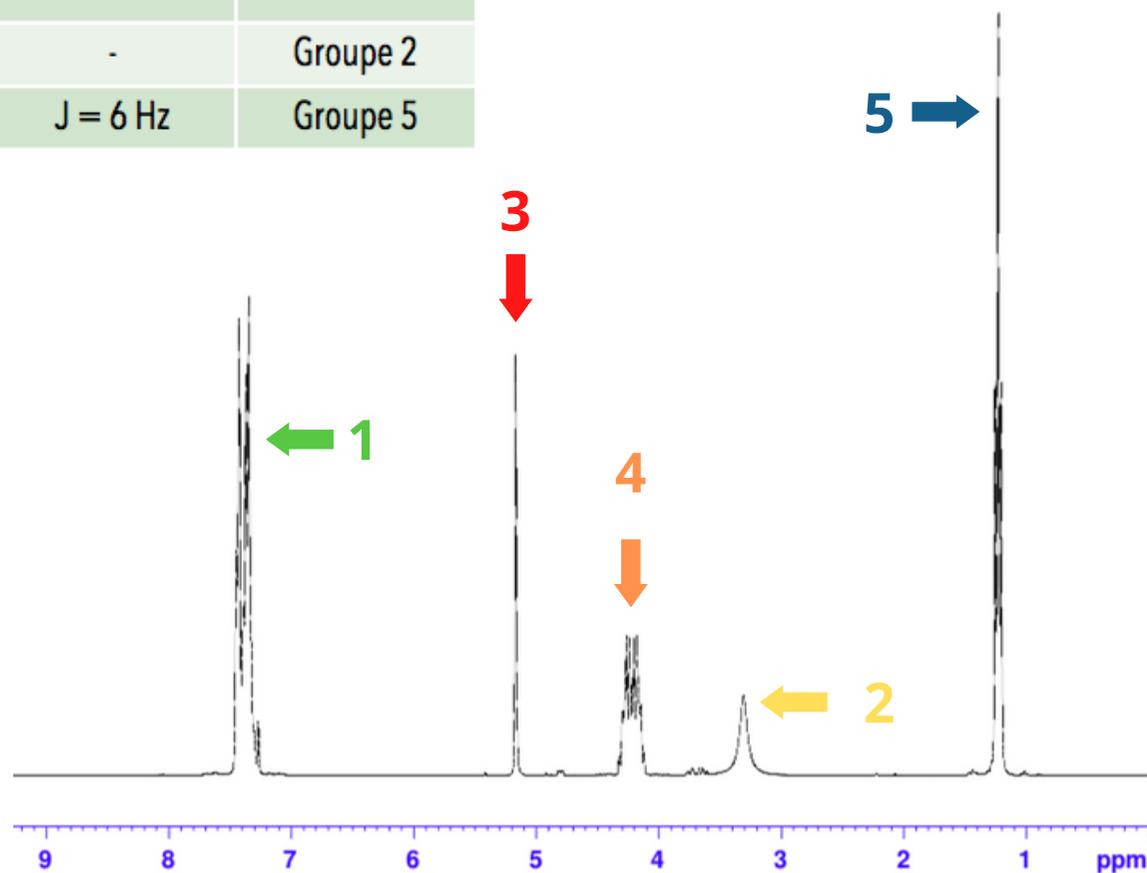


Figure 25 - Spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit non racémique à 300 MHz dans le chloroforme deutéré



# Zoom sur le massif superposé

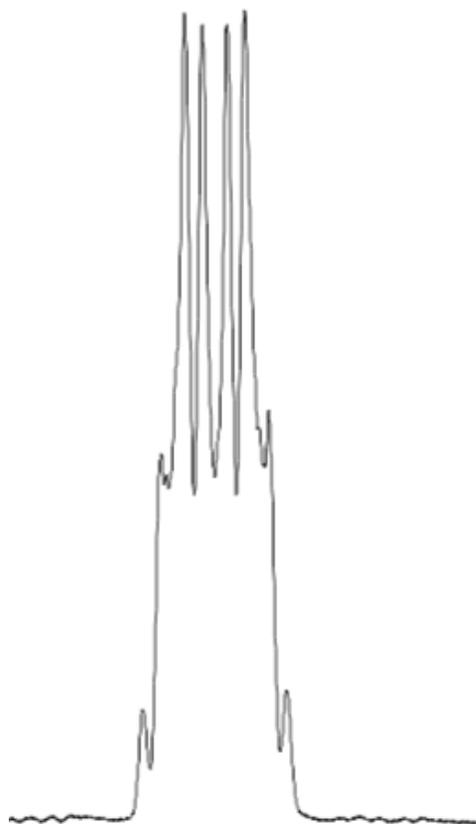


Figure 26 - Doublet de quadruplet  
dédoublé superposé (8 pics  
apparents à 300 MHz)

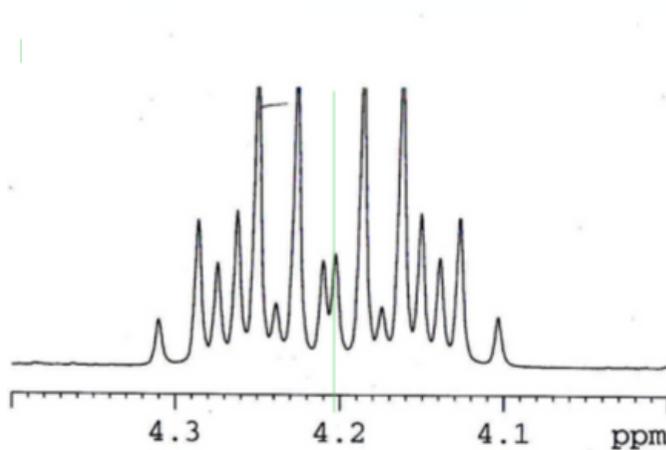
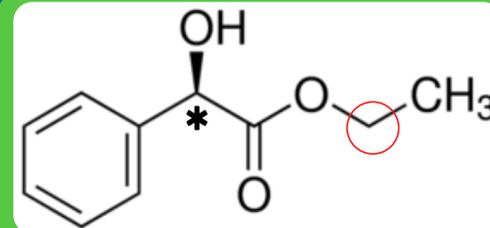
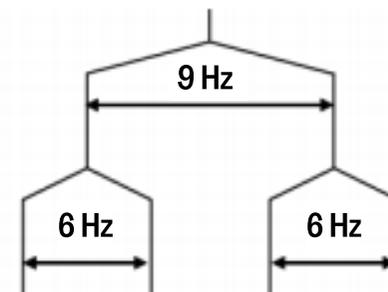


Figure 27 - Doublet de quadruplet  
dédoublé non superposé (16 pics  
apparents à 450 MHz)



Protons  
diastéréotopiques :  
les hydrogènes du  
groupe -CH<sub>2</sub> ne sont  
pas équivalents



# Analyse RMN $^{13}\text{C}$ - $\text{NaBH}_4$

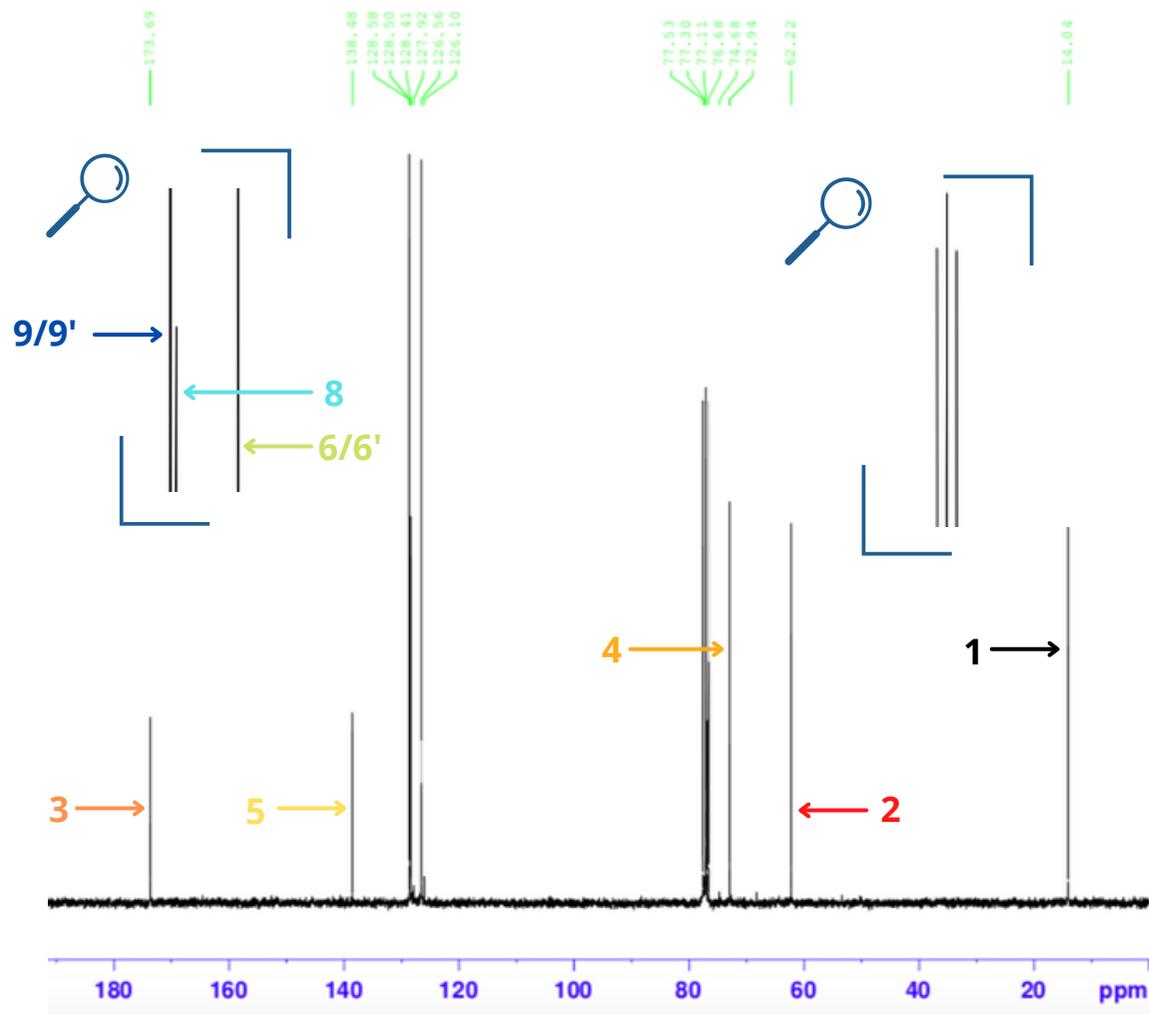
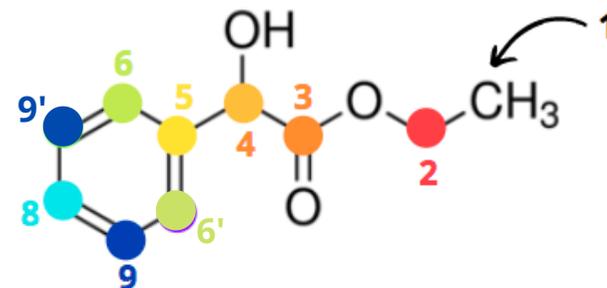


Figure 28 - Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du produit racémique à 300 MHz dans le chloroforme deutéré



Déplacement (ppm)	Proposition
14,04	1
62,22	2
72,94	4
76,67 / 77,52	Solvant
126,56	6 et 6'
128,41	8
128,58	9 et 9'
138,48	5
173,69	3

Figure 29 - Tableau d'attribution des signaux caractéristiques

# Analyse RMN $^{13}\text{C}$ - Levure

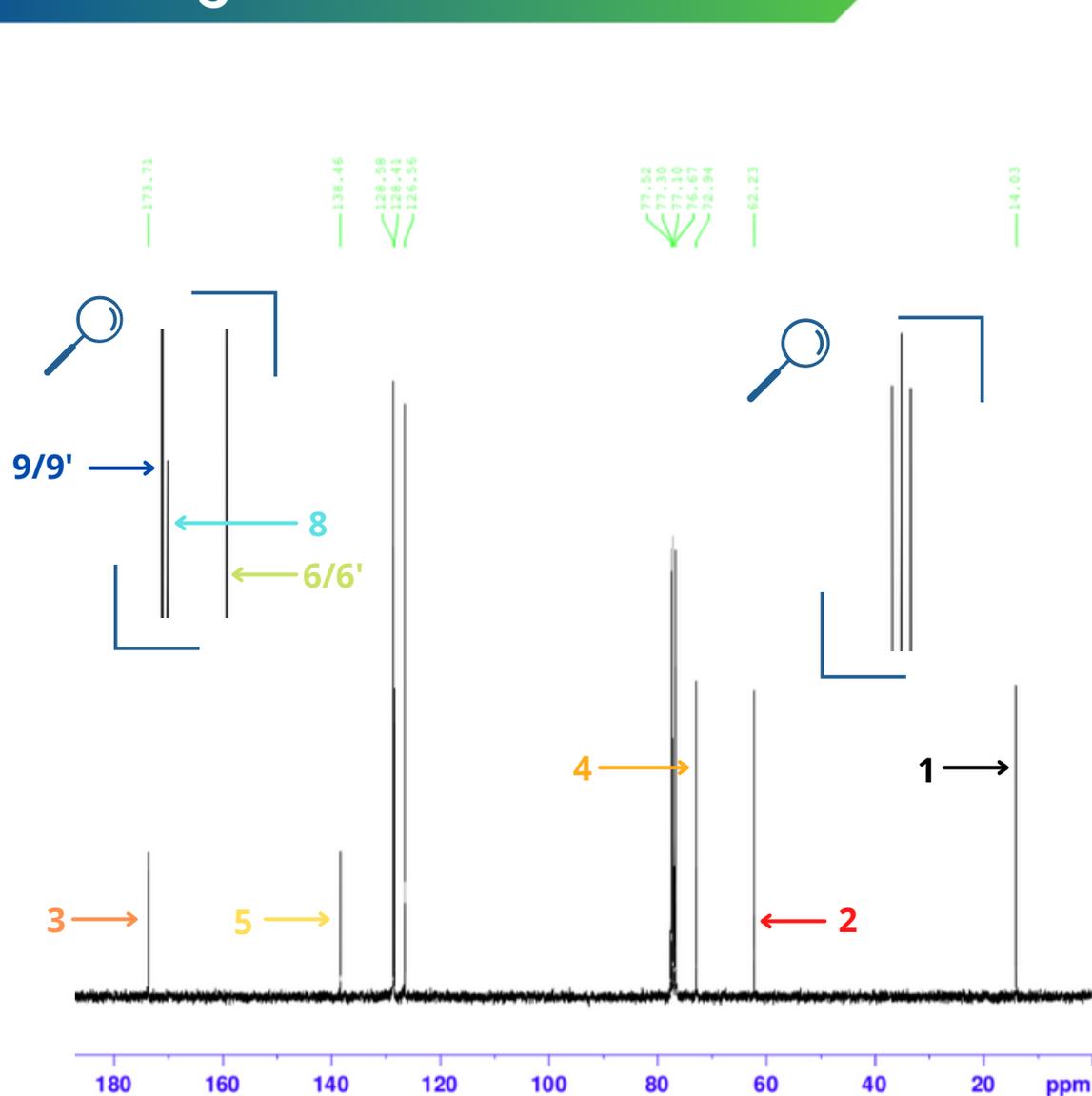
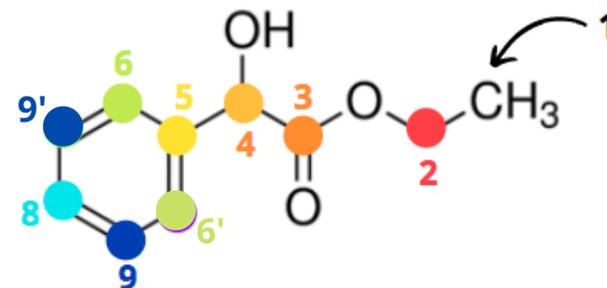


Figure 30 - Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du produit non racémique à 300 MHz dans le chloroforme deutéré



Déplacement (ppm)	Proposition
14,03	1
62,23	2
72,94	4
76,67 / 77,52	Solvant
126,56	6 et 6'
128,41	8
128,58	9 et 9'
138,46	5
173,71	3

Figure 31 - Tableau d'attribution des signaux caractéristiques

# Indice de réfraction

## Résultats pour l'expérience avec $\text{NaBH}_4$

$$n_{\text{mesuré}} = 1,499 \pm 0,001$$

Dans la littérature :  $n_{\text{tabulée}} = 1,513$

D'où un écart relatif :

$$\Delta = 0,93 \%$$

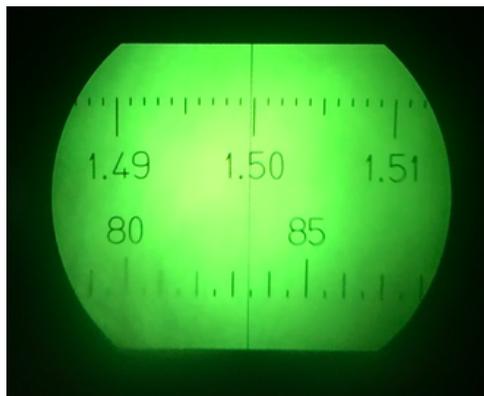


Figure 32 - Mesure de l'indice de réfraction du produit racémique

## Résultats pour l'expérience avec la levure

$$n_{\text{mesuré}} = 1,508 \pm 0,001$$

Dans la littérature :  $n_{\text{tabulée}} = 1,513$

D'où un écart relatif :

$$\Delta = 0,33 \%$$

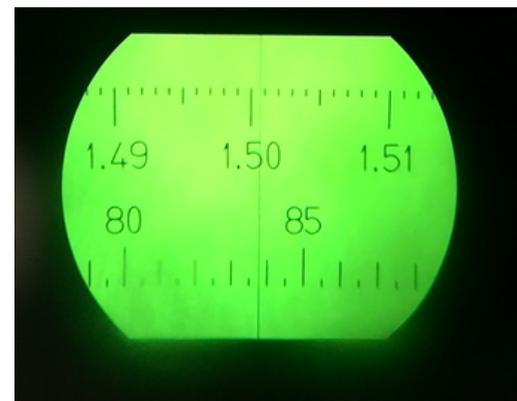


Figure 33 - Mesure de l'indice de réfraction du produit non racémique

**Objectifs :** Démontrer la **stéréosélectivité** induite par la levure de boulanger en comparant les produits obtenus par les deux voies de synthèse et en modélisant l'interaction par la **théorie des orbitales moléculaires**.

## 1. Présentation des deux protocoles de réduction

a. Réduction par  $\text{NaBH}_4$

b. Réduction par la levure de boulanger

## 2. Analyse comparative des produits obtenus à l'issue des deux méthodes

a. A-t-on obtenu le bon produit ? Caractérisation par IR, RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , indice de réfraction

**b. Mise en évidence de l'énantiosélectivité : pouvoir rotatoire et CLHP chirale**

## 3. Interprétation théorique de la stéréosélectivité

a. Rôle de la levure et de la fermentation

b. Modélisation orbitalaire de l'interaction entre le site actif de l'enzyme et le substrat

# Pouvoir rotatoire

## Résultats pour l'expérience avec $\text{NaBH}_4$

On mesure :

$$\alpha = 0^\circ$$

➔ Obtention d'un produit racémique

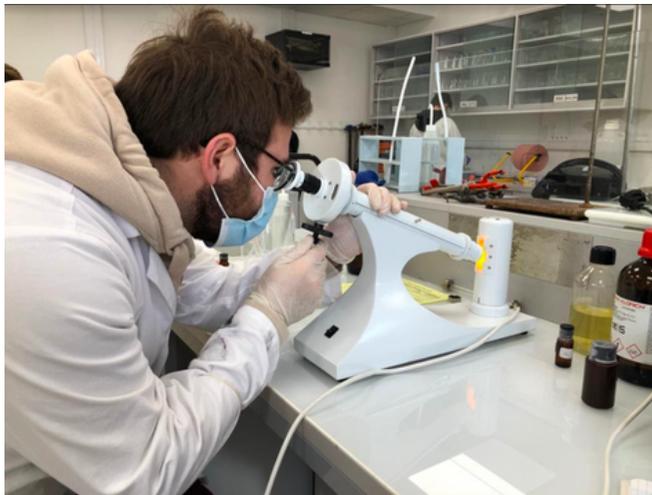


Figure 34 - Mesure du pouvoir rotatoire du produit racémique

## Résultats pour l'expérience avec la levure

On observe en fait non pas une équipénombre mais une plage d'équipénombre pour les valeurs extrêmes :

$$\begin{cases} \alpha_1 = -168,7^\circ \\ \alpha_2 = -171,9^\circ \end{cases}$$

$$\Rightarrow \bar{\alpha} := \frac{\alpha_1 + \alpha_2}{2} = (-170,3 \pm 0,1)^\circ$$

Loi de Biot ( $c = 0,63 \text{ mg/mL}$ ):

$$\eta = \frac{\bar{\alpha}}{l \cdot c} - [\alpha_+]_D^{21}$$
$$[\alpha_-]_D^{21} - [\alpha_+]_D^{21}$$

$$\Rightarrow \eta = 97 \%$$

# CLHP sur phase chirale

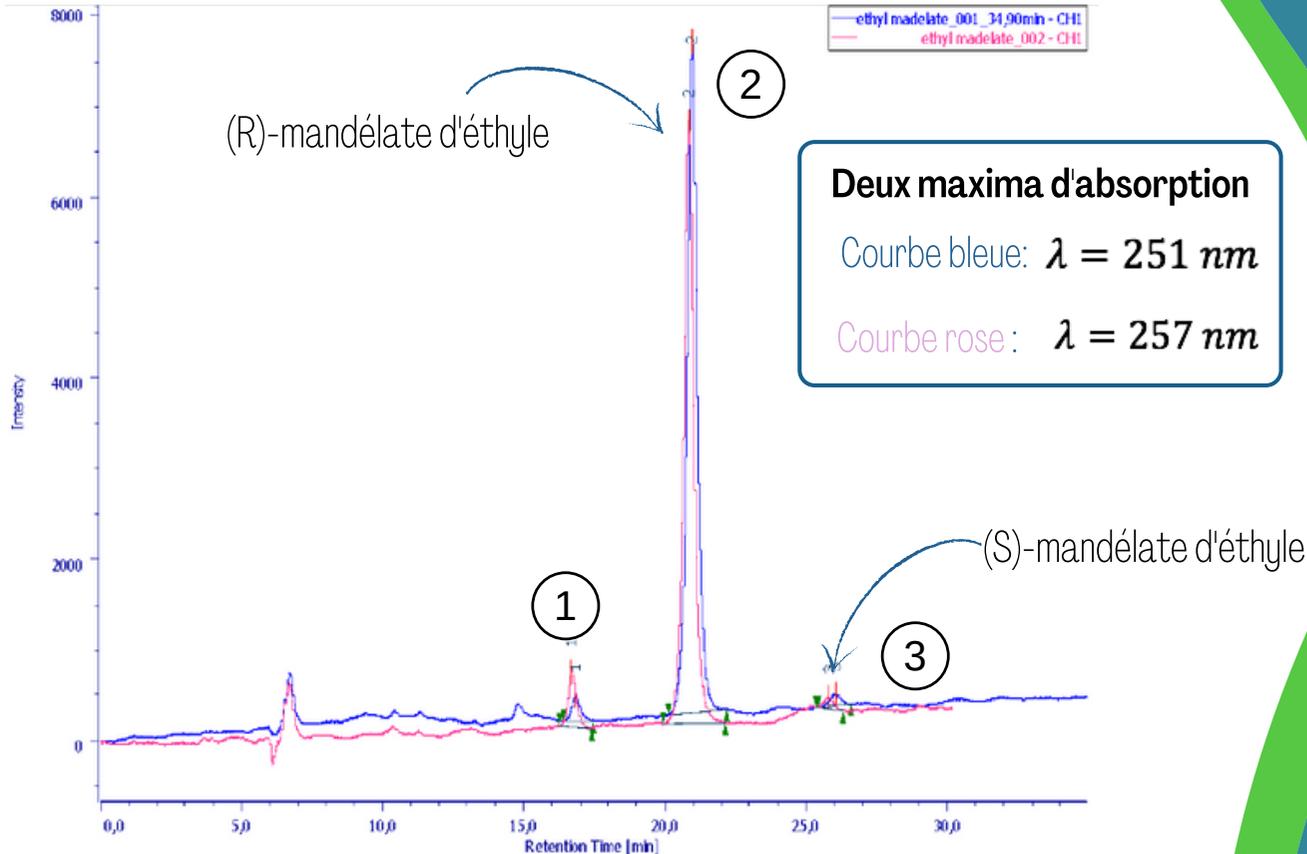


Figure 35 - Chromatogramme du mandélate d'éthyle pour le produit non racémique

Pic	Temps de rétention (min)	Aire (V.sec)	Aire (%)	Pic	Temps de rétention (min)	Aire (V.sec)	Aire (%)
1	16,683	5 690. 10 <sup>6</sup>	6,701	1	16,683	12 580. 10 <sup>6</sup>	6,701
2	20,827	190 150. 10 <sup>6</sup>	91,649	2	20,827	172 043. 10 <sup>6</sup>	91,649
3	25,785	3 371. 10 <sup>6</sup>	1,65	3	25,785	3 096. 10 <sup>6</sup>	1,65

Figure 36 - Tableau des caractéristiques du chromatogramme pour la courbe bleue et rose

Quel est l'autre énantiomère ?

Courbe 1:  $\frac{\text{Aire 2}}{\text{Aire 3}} = 56,4$      $\frac{\text{Aire 2}}{\text{Aire 1}} = 33,4$

Courbe 2:  $\frac{\text{Aire 2}}{\text{Aire 3}} = 55,5$      $\frac{\text{Aire 2}}{\text{Aire 1}} = 13,6$

Le pic 3 est celui du (S)-mandélate d'éthyle

Définition et calcul de l'excès énantiomérique :

$$ee := \frac{|R - S|}{R + S}$$

où R : Concentration du produit (R)  
S : Concentration du produit (S)

i.e  $ee = \frac{\text{Aire}_2 - \text{Aire}_3}{\text{Aire}_2 + \text{Aire}_3}$

**ee = 96 %**

**Objectifs :** Démontrer la **stéréosélectivité** induite par la levure de boulanger en comparant les produits obtenus par les deux voies de synthèse et en modélisant l'interaction par la **théorie des orbitales moléculaires**.

## 1. Présentation des deux protocoles de réduction

a. Réduction par  $\text{NaBH}_4$

b. Réduction par la levure de boulanger

## 2. Analyse comparative des produits obtenus à l'issue des deux méthodes

a. A-t-on obtenu le bon produit ? Caractérisation par IR, RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , indice de réfraction

b. Mise en évidence de l'énantiosélectivité : pouvoir rotatoire et CLHP chirale

## 3. Interprétation théorique de la stéréosélectivité

a. Rôle de la levure et de la fermentation

b. Modélisation orbitalaire de l'interaction entre le site actif de l'enzyme et le substrat

# Importance de la fermentation

- Double rôle de la levure :
  - Permet la **fermentation alcoolique** nécessaire au fonctionnement du cycle catalytique
  - Contient le système enzymatique **YADH** (Yeast Alcohol Dehydrogenase) responsable de l'énantiosélectivité (cf. infra)
- Transfert d'hydrure par le **coenzyme NADH** (Nicotinamide Adénine Dinucléotide), qui est oxydé en  $\text{NAD}^+$
- Fermentation **transforme le sucre en éthanol**, dont l'oxydation permet la régénération de NADH

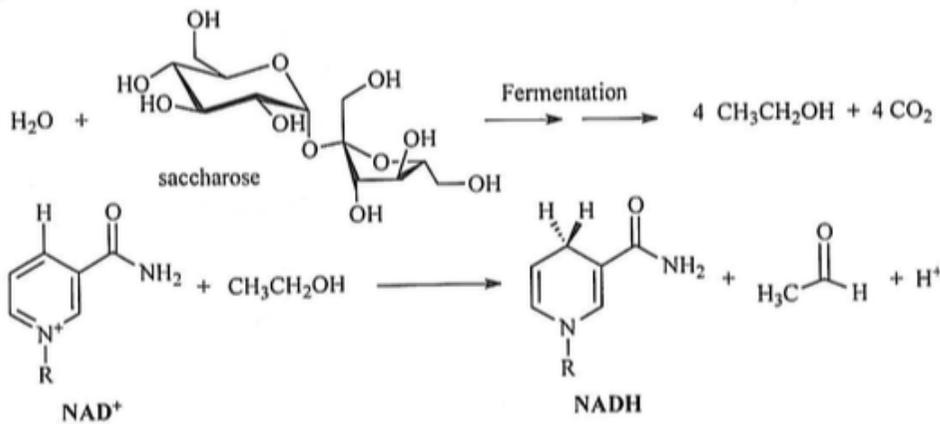


Figure 37 - Bilan de la fermentation alcoolique et équation de l'oxydation de l'éthanol par  $\text{NAD}^+$

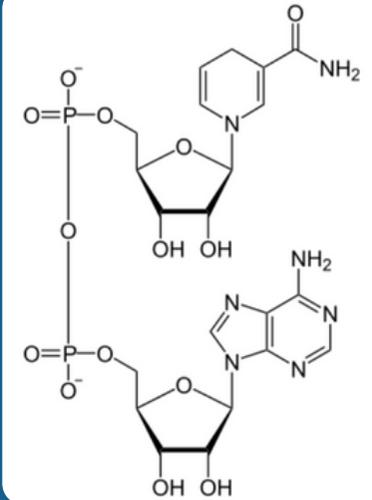
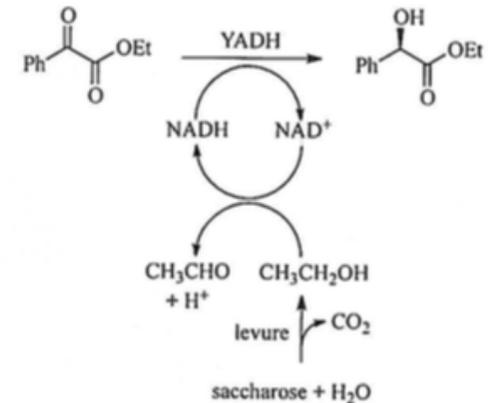


Figure 38 - Représentation du coenzyme de NADH

Figure 39 - Cycle catalytique de la réaction



# Rôle de la levure - YADH

- YADH **transmet l'information chirale** (énantiosélectivité liée à la chiralité du site actif de l'enzyme)
- **Description du site actif :**
  - Contient un  $Zn^{2+}$  et un NADH
  - Liaisons hydrogène (stabilisation et reconnaissance chirale)
- **Formation d'un complexe** avec le zinc : bloque l'orientation, faces *Re* et *Si* plus équivalentes
- **Mécanisme :**
  - Transfert d'hydrure par NADH sur face *Si*
  - Chaîne de transmission le long du site actif (cf. annexe)
- **Énantiosélectivité** : résulte de l'orientation du substrat dans le site actif de l'enzyme

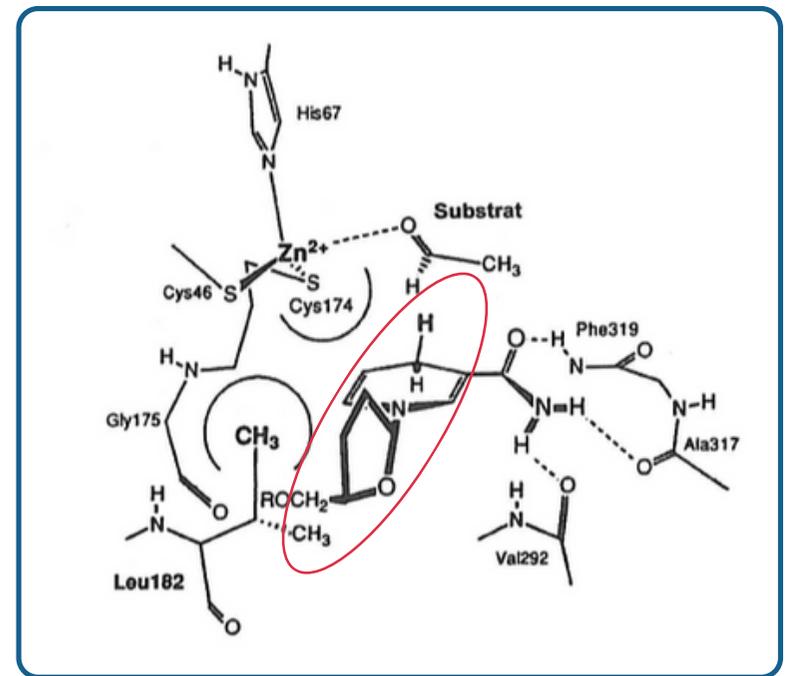


Figure 40 - Modèle du site actif de l'enzyme

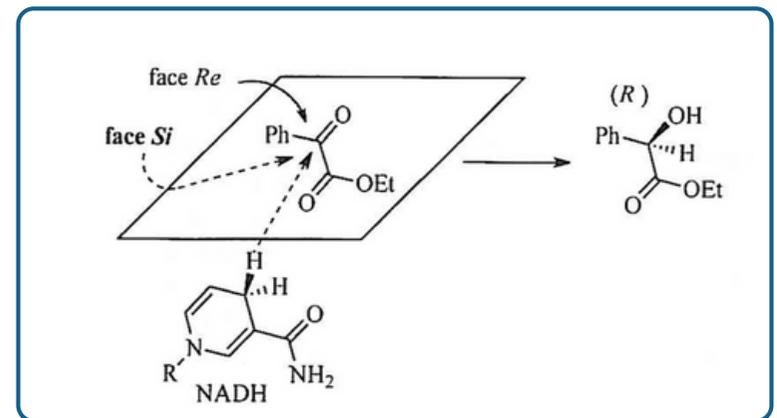


Figure 41 - Schéma du transfert d'hydrure sur la face *Si*

**Objectifs :** Démontrer la **stéréosélectivité** induite par la levure de boulanger en comparant les produits obtenus par les deux voies de synthèse et en modélisant l'interaction par la **théorie des orbitales moléculaires**.

## 1. Présentation des deux protocoles de réduction

a. Réduction par  $\text{NaBH}_4$

b. Réduction par la levure de boulanger

## 2. Analyse comparative des produits obtenus à l'issue des deux méthodes

a. A-t-on obtenu le bon produit ? Caractérisation par IR, RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , indice de réfraction

b. Mise en évidence de l'énantiosélectivité : pouvoir rotatoire et CLHP chirale

## 3. Interprétation théorique de la stéréosélectivité

a. Rôle de la levure et de la fermentation

b. Modélisation orbitale de l'interaction entre le site actif de l'enzyme et le substrat

# Modélisation du réactif

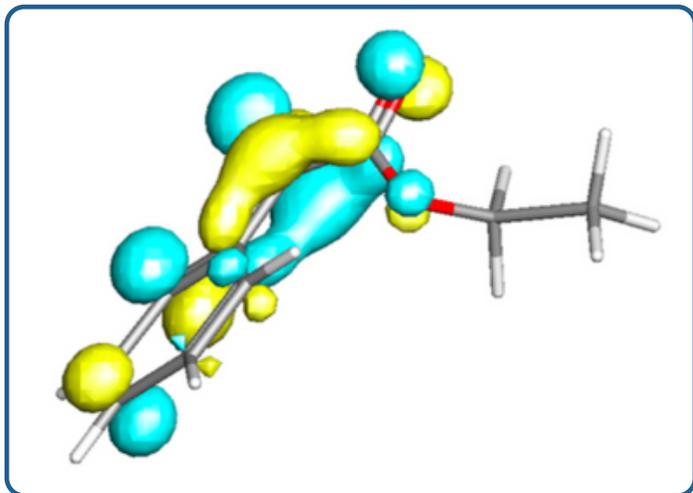
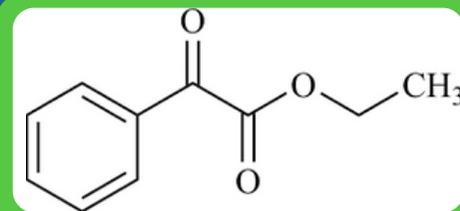
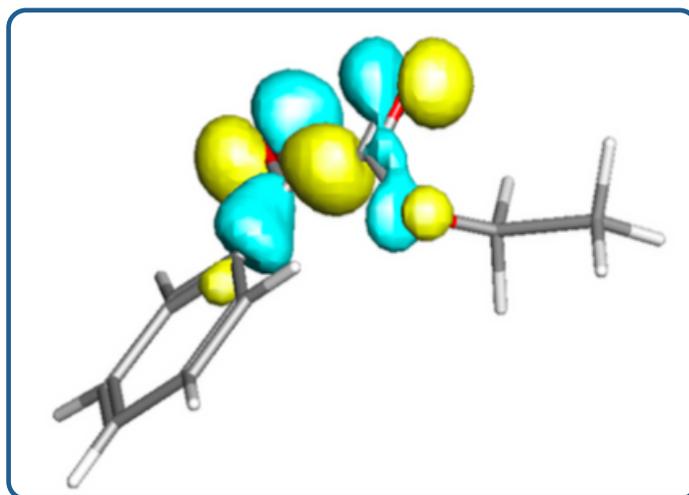


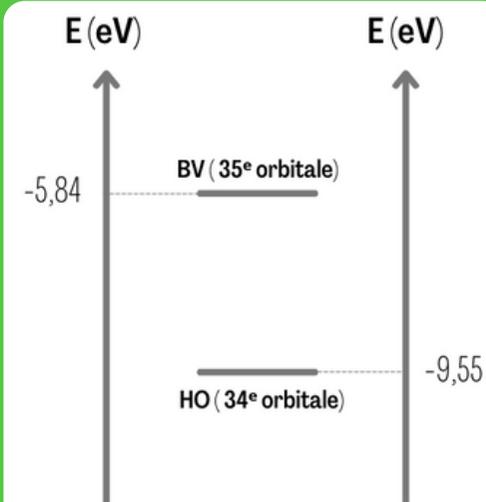
Figure 42 -  
Modélisation de la BV  
du benzoylformate  
d'éthyle sur Jimp2

Figure 43 -  
Modélisation de la  
HO du  
benzoylformate  
d'éthyle sur Jimp2



Formule brute :  $C_{10}H_{10}O_3$   
On a donc **68 électrons de valence** dans la structure

Figure 44 -  
Diagramme énergétique des OF



# Modélisation du site actif

Figure 45 -  
Modélisation de la BV du  
site actif de l'enzyme sur  
Jimp2

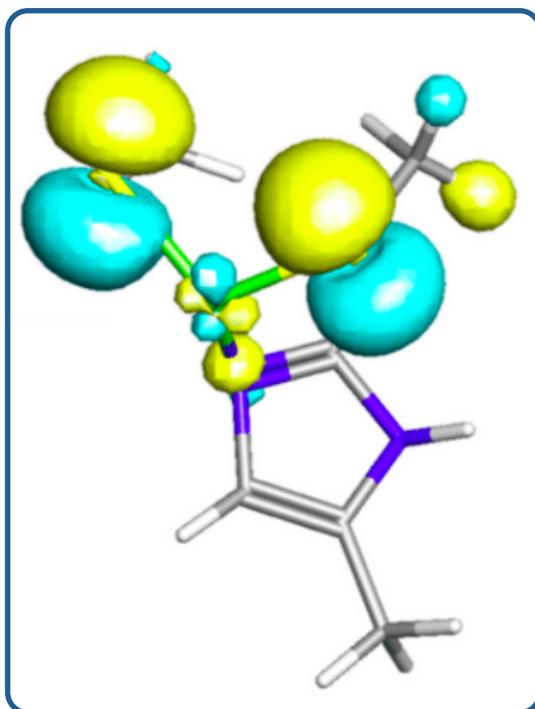
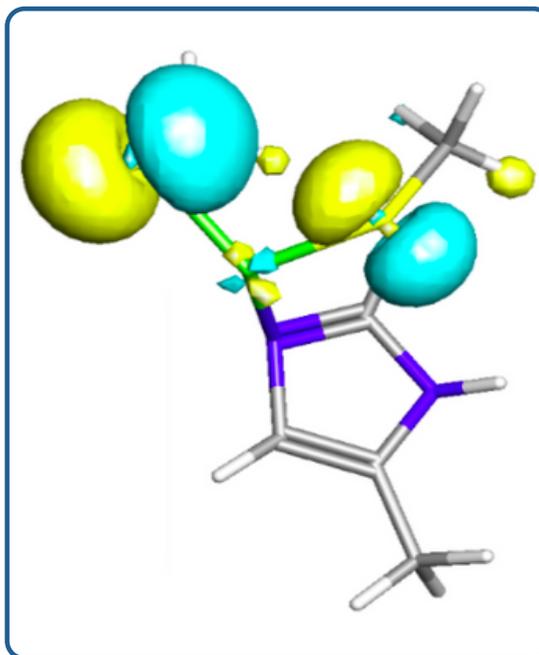


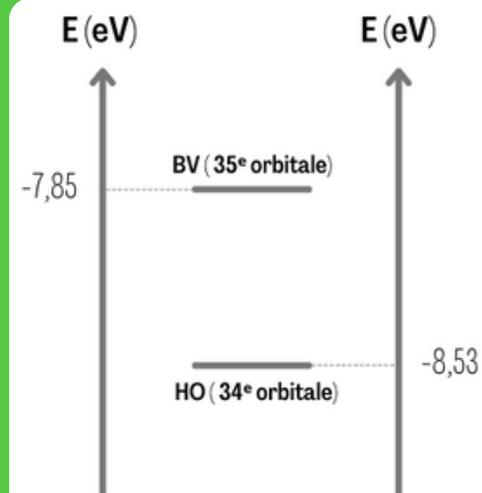
Figure 46 -  
Modélisation de la HO du  
site actif de l'enzyme sur  
Jimp2

On modélise plus simplement le site actif du catalyseur par un complexe de zinc métallique (cf. Figure 41) :



On a donc **68 électrons de valence** dans la structure

Figure 47 -  
Diagramme énergétique des OF



# Interaction entre les orbitales

- **Assistance électrophile** : diminue la BV du catalyseur
- **Théorème de Fukui** : HO du substrat (nucléophile) et BV du catalyseur (électrophile)
- **Modèle clé-serrure et gros coefficient** : complexation par l'atome d'oxygène de la cétone
- **Conséquences de la complexation** : inaccessibilité de la face Re (stéréosélectivité)

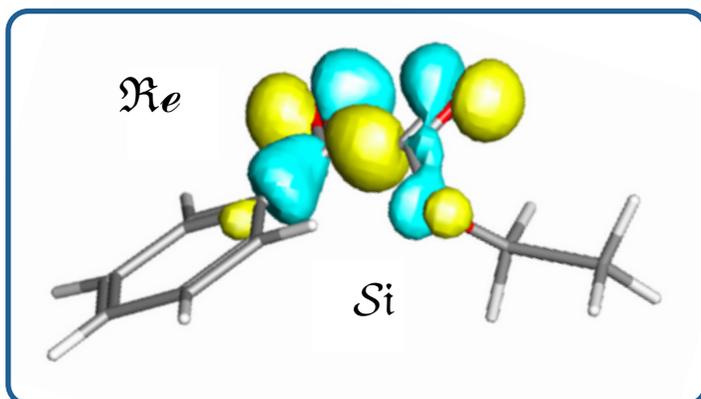


Figure 50 - Modélisation de la stéréosélectivité

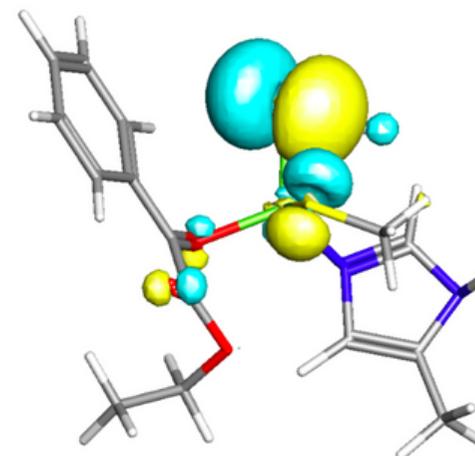


Figure 48 -  
Modélisation de la BV du complexe  
(69<sup>e</sup> orbitale, E = -7,83 eV)

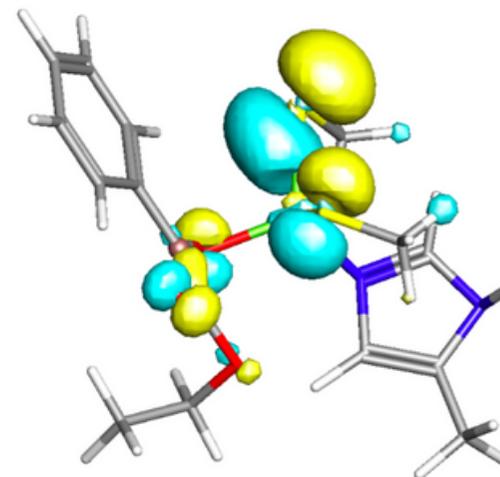


Figure 49 -  
Modélisation de la HO du complexe  
(68<sup>e</sup> orbitale, E = -8,27 eV)

# Conclusion

- Réalisations :

- **Comparaison des deux méthodes** proposées
- **Vérification pratique** de la théorie par CLHP chirale
- **Mise en évidence théorique** de l'énantiosélectivité
- Intérêt de la catalyse enzymatique (chimie verte, facilité à mettre en place)

- A améliorer pour aller plus loin :

- Perfectionner le **modèle du site actif** en tenant compte des acides aminés pour un modèle clé-serrure de fixation du substrat
- Suggérer l'éventuelle **réduction de l'éthanal** et la compétition
- Chercher à interpréter la **chimiosélectivité** en modélisant NADH par un hydrure, éventuellement en contrôle non orbitalaire
- Etudier sur d'autres molécules pour avoir un panel de possibilités

- Spectre IR du substrat :

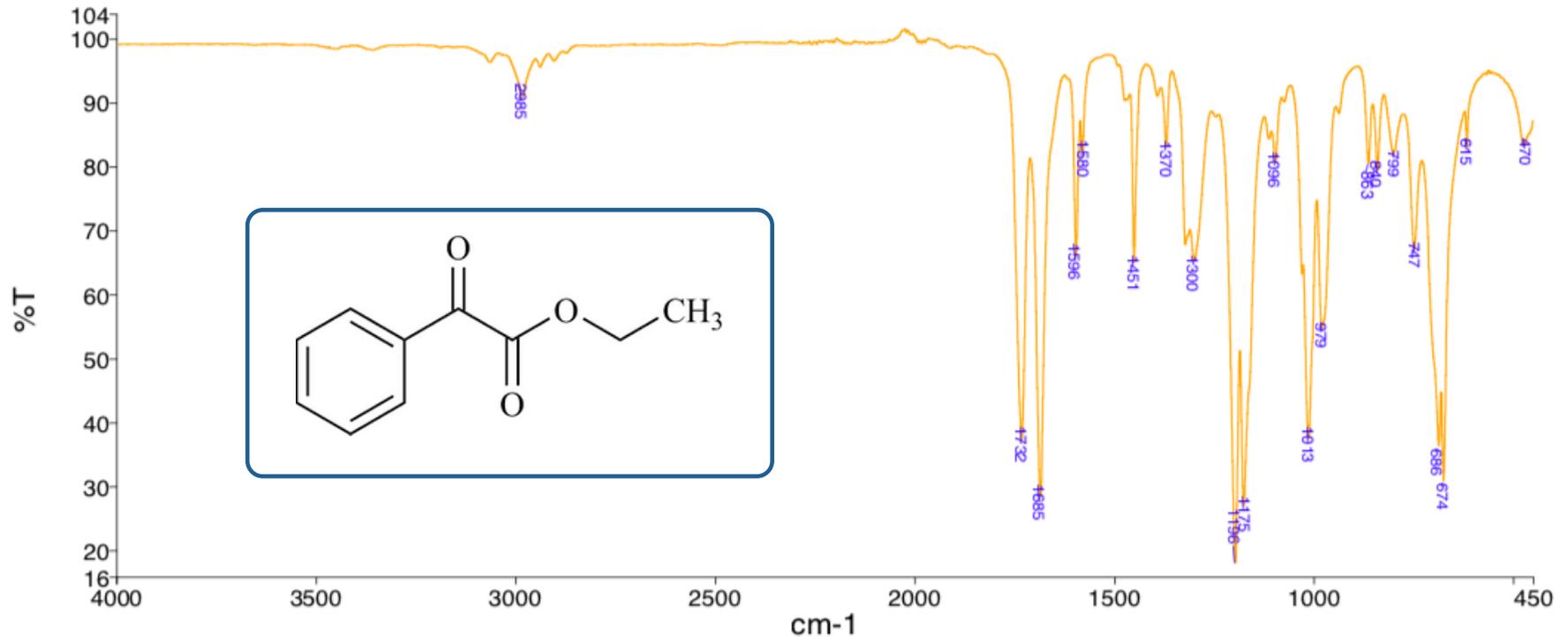


Figure 51 - Spectre infrarouge du benzoyleformate d'éthyle

- **Coenzyme** : molécule organique permettant à des enzymes de catalyser une réaction

- Calcul des incertitudes :

$$\Delta\bar{\alpha} = \sqrt{(\Delta\alpha_{\text{méthode}})^2 + (\Delta\alpha_{\text{matériel}})^2}$$

$$= \sqrt{(0,1)^2 + \left(\frac{0,05}{\sqrt{3}}\right)^2} = 0,1$$

- Réaction de fermentation alcoolique :

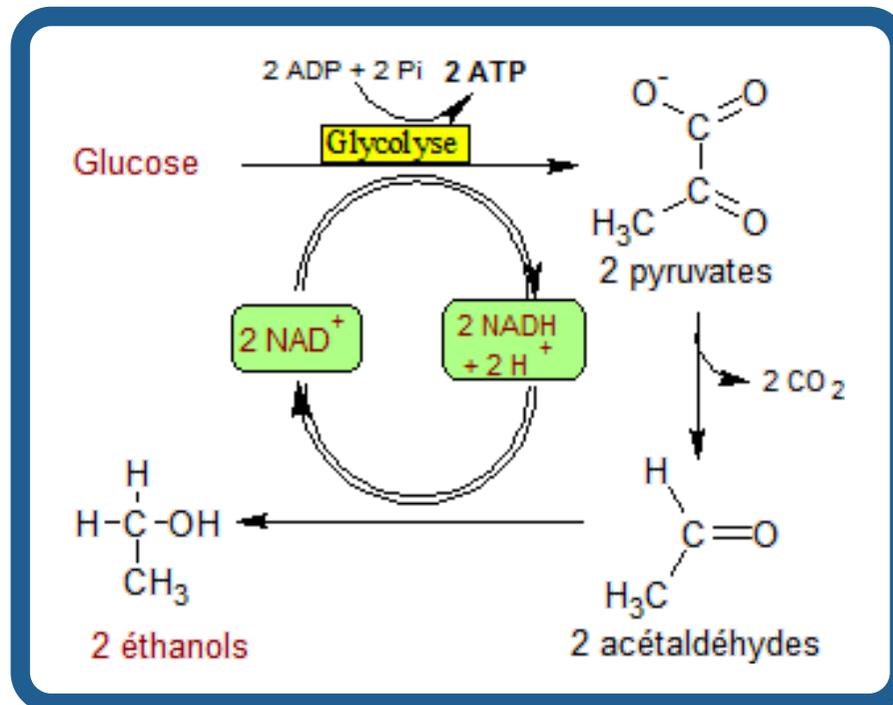


Figure 52 - Schéma bilan de la fermentation alcoolique

- Proposition de mécanisme dans le site actif (d'après [1]) :

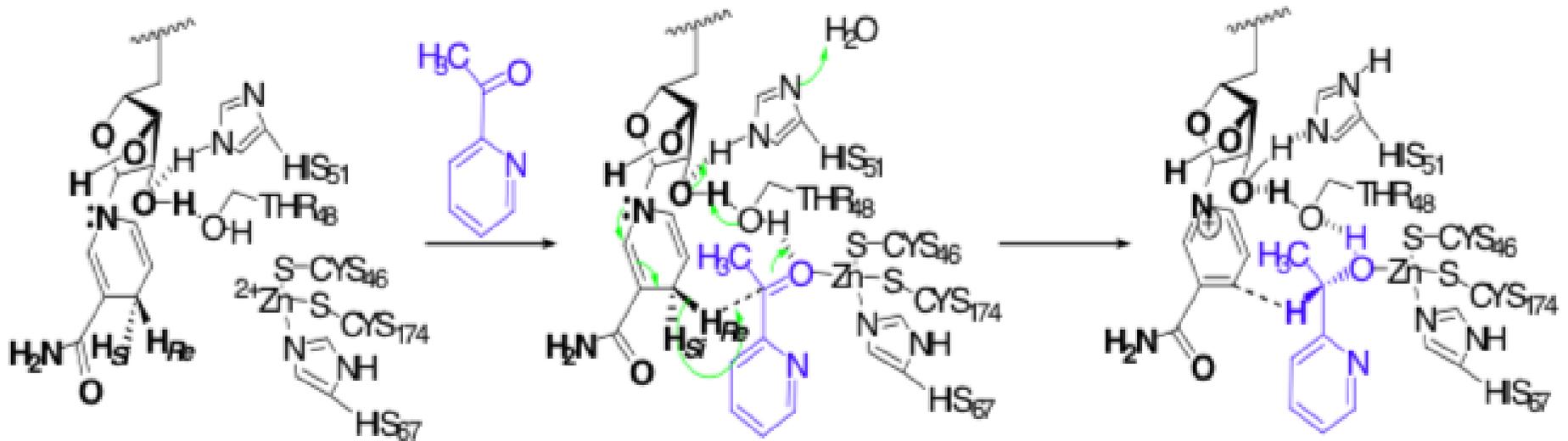


Figure 53 - Proposition de mécanisme par l'équipe du document [1] pour la réduction du 2-acétylpyridine par la levure de boulanger

- Modèle de Michaelis-Menten :

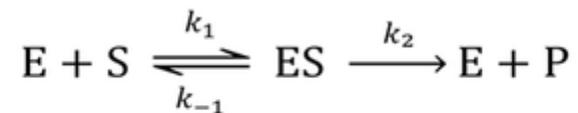


Figure 54 - Illustration du modèle de Michaelis-Menten entre un substrat S et une enzyme E

- Fonctionnement de la CLHP sur phase chirale :

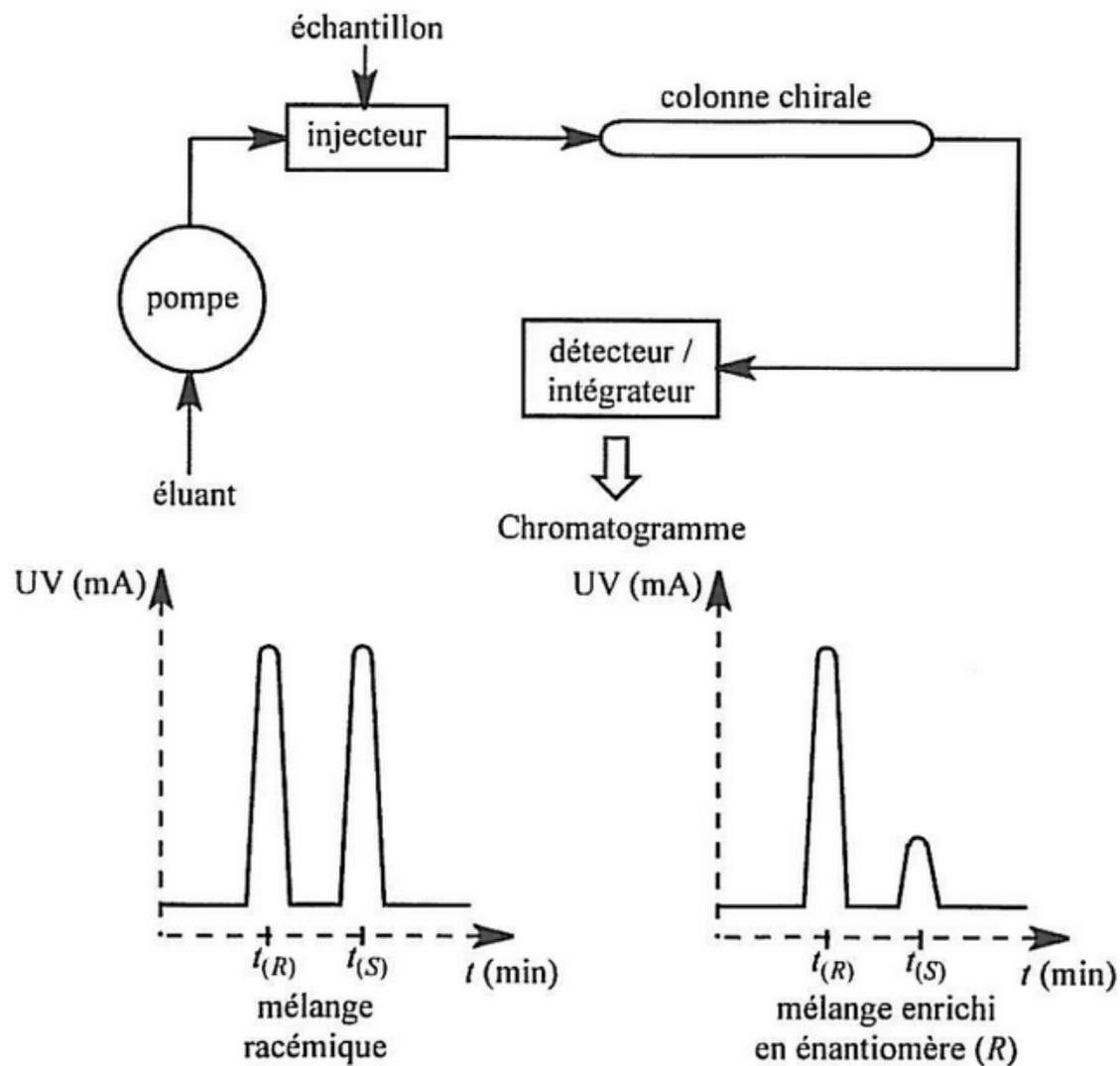


Figure 55 - Schéma de fonctionnement de la CLHP

- [1] Issa Samb et Mohamed Lamine Gaye : *Réduction du 2-acétylpyridine par la levure de boulanger : Une étude de la spécificité de substrat de la YADH (Yeast Alcohol DeHydrogenase)* : Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie, Décembre 2017
- [2] E.G Weinhold, A. Glasfeld, A.D. Ellington : *PNAS, Structural determinants of stereospecificity in yeast alcohol dehydrogenase* : Volume 88 (octobre 1991), p. 8420-8424
- [3] Manson J. M. B., Webster C. E. : *Jimp 2 Version X.XXX* : Department of Chemistry, Texas A&M University, College Station, TX 77842, (<http://www.chem.tamu.edu/jimp2/>)
- [4] Badan S. Deol, Damon D.Riley, Gregory W. Simpson : *Asymmetric reduction of carbonyl compounds by yeast* : Department of Biochemistry, University of Sydney, 2006