

**CHIRALNE LAKTONY  
Z UKŁADEM BICYKLONONANU  
JAKO POTENCJALNE DODATKI DO ŻYWNOŚCI**



**TERESA OLEJNICZAK**

**CHIRALNE LAKTONY  
Z UKŁADEM BICYKLONONANU  
JAKO POTENCJALNE DODATKI DO ŻYWNOŚCI**



*Autor*  
dr Teresa Olejniczak

*Opiniodawca*  
dr hab. Wanda Peczyńska-Czoch

*Redaktor merytoryczny*  
prof. dr hab. Ewelina Dziuba

*Opracowanie redakcyjne*  
Anna Piskor

*Łamanie*  
Alina Gebel

*Projekt okładki*  
Małgorzata Smuga

Monografie CXIII

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,  
Wrocław 2010

ISSN 1898-1151  
ISBN 978-83-7717-036-6

**WYDAWNICTWO UNIWERSYTETU PRZYRODNICZEGO WE WROCŁAWIU**

**Redaktor Naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki**  
**ul. Sopocka 23, 50-344 Wrocław, tel. 71 328-12-77**  
**e-mail: [wyd@up.wroc.pl](mailto:wyd@up.wroc.pl)**

---

Nakład 100 + 16 egz. Ark. wyd. 7,4. Ark. druk. 6,75  
Druk i oprawa: F.P.H. „ELMA”

# SPIS TREŚCI

Przedmowa .....	9
<b>1. Wprowadzenie i cel badań .....</b>	<b>11</b>
<b>2. Materiały i metody.....</b>	<b>18</b>
2.1. Materiały .....	18
2.1.1. Biokatalizatory.....	18
2.1.2. Substraty.....	19
2.2. Metody .....	19
2.2.1. Metody analizy i rozdziału mieszanin poreakcyjnych.....	19
2.2.2. Ustalanie struktury otrzymanych produktów .....	19
2.2.3. Transformacje mikrobiologiczne .....	20
2.2.4. Biotransformacje przy użyciu enzymów .....	21
2.2.5. Testy na aktywność fungistatyczną .....	22
2.2.6. Metody syntezy chemicznej.....	22
<b>3. Przedstawienie i dyskusja wyników.....</b>	<b>23</b>
3.1. Zastosowanie mikrobiologicznej redukcji w chemoenzymatycznej syntezie enancjomerów 2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-onu ( <b>4a</b> ) i jego analogów z ugrupowaniem <i>gem</i> -dimetylowym ( <b>4b-d</b> ) .....	23
3.1.1. Dobór mikroorganizmów zdolnych do enancjoselektywnej redukcji ugrupowania karbonylowego w estrze dietylowym kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego ( <b>2a</b> ) i jego <i>gem</i> -dimetylowych pochodnych ( <b>2b-d</b> ).....	23
3.1.2. Dobór optymalnych warunków redukcji estrów dietylowych kwasów: 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego ( <b>2a</b> ) oraz 2-(2,2-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego ( <b>2b</b> ) przy użyciu <i>Absidia coerulea</i> AM 93 .....	30
3.1.3. Wpływ wybranych induktorów na efektywność bioredukcji estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego ( <b>2a</b> ) .....	36
3.1.4. Dobór optymalnych warunków redukcji estrów dietylowych kwasów: 2-(3,3-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego ( <b>2c</b> ) oraz 2-(4,4-dimetylo-3-oksocykloheksylo)malonowego ( <b>2d</b> ) przy użyciu <i>Rhodotorula rubra</i> AM 4.....	41
3.1.5. Laktonizacja (+)- i (-)-izomerów estru dietylowego kwasu 2-(3-hydroksycykloheksylo)malonowego ( <b>3a</b> ) oraz ich <i>gem</i> -dimetylowych pochodnych ( <b>3b-d</b> ) ....	44
3.1.6. Ustalenie konfiguracji absolutnej otrzymanych enancjomerów.....	46

3.2. Zastosowanie mikrobiologicznego lub enzymatycznego rozdziału mieszaniny racemicznej epoksyestrów do otrzymywania enancjomerów 9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu ( <b>12a</b> ) oraz jego <i>gem</i> -dimetylowych analogów ( <b>12b-d</b> ) .....	48
3.2.1. Synteza substratów i mechanizm laktonizacji.....	48
3.2.2. Dobór biokatalizatorów zdolnych do rozdziału mieszanin racemicznych epoksyestrów ( <b>9a-d</b> ) .....	54
3.3. Zastosowanie enzymatycznego lub mikrobiologicznego utleniania <i>mezo</i> -dioli w syntezie chiralnych laktonów z układem 8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu ( <b>17, 19</b> ) i ich <i>gem</i> -dimetylo-pochodnych ( <b>18, 20</b> ).....	64
3.3.1. Enzymatyczne utlenianie dioli ( <b>21, 22</b> ) .....	65
3.3.2. Mikrobiologiczne utlenianie <i>cis</i> -1,2-bis(hydroksymetylo)cykloheksanu ( <b>21</b> ) i biotransformacje bezwodników ( <b>23-26</b> ) .....	67
3.3.3. Synteza racemicznych laktonów z układem 8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu ( <b>17, 19</b> ) i ich <i>gem</i> -dimetylo-pochodnych ( <b>18, 20</b> ) .....	71
3.3.4. Synteza chiralnych laktonów ( <b>17, 17a, 17b, 19, 20</b> ) z układem 8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu .....	74
3.4. Aktywność fungistatyczna laktonów uzyskanych w pracy .....	75
<b>4. Podsumowanie.....</b>	<b>82</b>
<b>5. Literatura .....</b>	<b>88</b>
Apendyks.....	98

## Wykaz skrótów:

DMSO	dimetylosulfotlenek
Et	etyl
Et <sub>2</sub> O	eter dietylowy
HMPA	heksametylofosforoamid
MCPBA	kwasy <i>m</i> -chloronadbenzoesowy
Me	metyl
MPTA	kwasy $\alpha$ -metoksy- $\alpha$ -trifluorometylofenylooctowy
NBS	N-bromoimid kwasu bursztynowego
PhH	benzen
py	pirydyna
THF	tetrahydrofuran
TsCl	chlorek kwasu <i>p</i> -toluenosulfonowego
TsOH	kwasy <i>p</i> -toluenosulfonowy





## PRZEDMOWA

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie mają charakter interdyscyplinarny i obejmują syntezę chemoenzymatyczną, biotransformację przy użyciu zarówno mikroorganizmów, jak i izolowanych enzymów oraz badanie aktywności fungistatycznej otrzymanych laktonów.

Większość opisanych badań zamieszczonych w niniejszej pracy została zrealizowana w ramach grantu habilitacyjnego N N312 2200 33 przyznanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, realizowanego w latach 2007–2010. Rozprawa powstała na podstawie sześciu poniższej wymienionych prac i licznych nieopublikowanych wyników badań.

- [132] Olejniczak T., Grabarczyk M., Wawrzeńczyk C., 2001. Lactones 7. Enantioselective lactonization of racemic ethyl (5,5-dimethyl-2,3-epoxycyclohex-1-yl)acetate. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic.*, 11, 243–247.
- [162] Szczepanik M., Olejniczak T., Jurków K., 2008. Feeding deterrent activity of bicyclic lactones obtained from anhydrides of amber- and glutaric acid against colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* say). *Progress in Plant Protection*, 48 (2), 742–746.
- [127] Olejniczak T., 2010. Chemoenzymatic synthesis of 2-oxabicyclo[3.3.1]nonan-3-one enantiomers *via* microbial reduction by *Absidia coerulea* AM 93. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic.*, 63, 1–10.
- [128] Olejniczak T., 2010. Microbial hydroxylation of non-activated carbon atoms in racemic 2-dodeceno-1-yl-succinic anhydride by *Mortierella isabellina* AM 212. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 2053–2060.
- [129] Olejniczak T., Białońska A., 2010. (–)-(1*S*,5*R*)-2-Oxabicyclo[3.3.1]nonan-3-one. *Acta Crystallographica E*. DOI, 10.1107/S11600536810014339.
- [130] Olejniczak T., Boratyński F., Białońska A. Fungistatic activity of bicycles lactones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Wyślana do recenzji.

Wnioski o ochronę patentową:

1. Olejniczak T., Białońska A. Nowy związek *trans*-3,4-dibromo-*cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-on i sposób jego otrzymywania. P-392578.
2. Olejniczak T. Nowy związek 7,7-dimetylo-3,4-epoksy-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-on i sposób jego otrzymywania. P-392579.



# 1. WPROWADZENIE I CEL BADAŃ

Dodatki do żywności podnoszą jej walory sensoryczne [152, 155], uatrakcyjnijają barwę, ułatwiają procesy wytwarzania oraz zwiększają trwałość, chroniąc przed rozwojem mikroorganizmów.

Szacuje się, że patogenne grzyby są przyczyną co najmniej dwudziestoprocentowej straty w produkcji żywności i uprawach rolnych [26], a ponadto powodują skażenie części żywności mikotoksynami. Rolnicy i technolodzy żywności próbują zmniejszyć te straty, używając preparatów hamujących rozwój mikroorganizmów. Zadanie nie jest proste, ponieważ związki te powinny być zarówno obojętne dla organizmu człowieka, jak i bezpieczne dla środowiska, a zatem podatne na biodegradację. Wielu badaczy uważa, że powyższe warunki spełniają związki naturalne lub ich analogi.

W praktyce do ochrony mikrobiologicznej żywności stosuje się dwa antybiotyki: polipeptyd nizinę (E 234) [41, 42, 94, 142] i makrolid natamycynę (E 235). Właściwości hamujące rozwój drobnoustrojów wykazują także kwasy: mrówkowy, benzoesowy, sorbowy oraz siarczany, azotyny, a także bifenole [156].

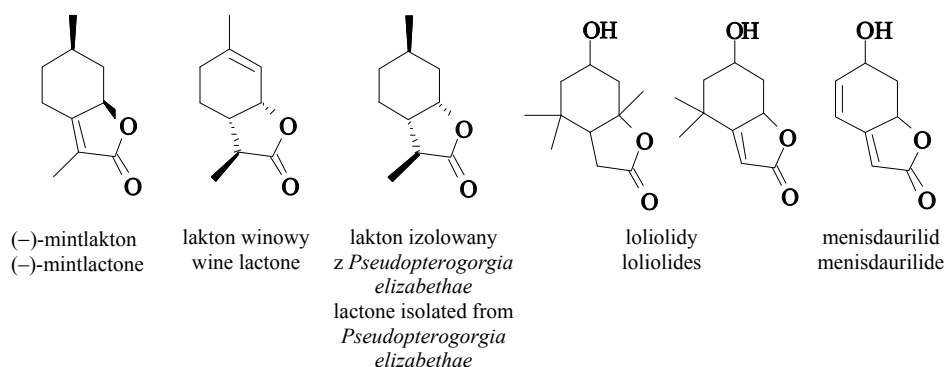
W związku z rosnącymi wymaganiami konsumentów i koniecznością ustawowego ograniczenia (określenia) dozwolonych dawek wzrasta liczba badań dotyczących dodatków do żywności, w tym również o charakterze konserwującym, a szczególnie zabezpieczającym przed rozwojem drobnoustrojów. Duże nadzieje w tym zakresie pokłada się w związkach naturalnych i ich strukturalnych analogach. Związki te otrzymywane są metodami syntezy asymetrycznej lub biosyntezy zalecanej przez *Green Chemistry*.

Wśród potencjalnych dodatków do żywności szczególnie interesującą grupę stanowią laktony, identyfikowane jako naturalne składniki olejków roślinnych, warzyw, owoców i produktów żywnościowych [3, 6, 13, 20, 31, 70, 115, 178]. Laktony, np. terpenoidowe, są nośnikami interesujących zapachów [18], głównie owocowych, mają najczęściej smak słodki, kokosowy lub ziołowy.

Związki z ugrupowaniem laktonowym mają, prócz właściwości sensorycznych, także inne aktywności biologiczne [35, 47, 63, 68, 81, 109, 110, 117, 134, 146, 164, 165] – najbardziej znane to grzybobójcze, bakteriobójcze, cytostatyczne. Liczne z nich są feromonami w świecie owadów [15, 16, 21, 43, 48, 95, 97, 114]. Laktony, szczególnie seskwiterpenowe [5, 25, 39, 62, 124, 138, 143, 149, 158], posiadają również właściwość deterentów pokarmowych owadów.

Wśród laktonów wyizolowanych ze środowiska naturalnego najbardziej znane są laktony z ugrupowaniem *p*-mentanu [38, 64, 69, 92, 96, 116, 119, 184] (rys. 1), będące kluczowymi produktami w biosyntezie pseudopterosiny A i E [26, 46]: (-)-mintlaktonu występującego w olejku mięty pieprzowej oraz laktonu winowego [69] biosyntezerowanego w różnych gatunkach białych win. Ich nasycony analog, izolowany z rośliny morskiej *Pseudopterogorgia elizabethae*, wykazuje aktywność przeciwwzapalną [32]. Używany

jest on także do syntezy laktonu o aktywności przeciwmalarycznej, naturalnie występującego w *Artemisia annua* [91, 188]. Laktony z układem *p*-mentanu mają także zdolność repelentną w stosunku do owadów [33, 112].

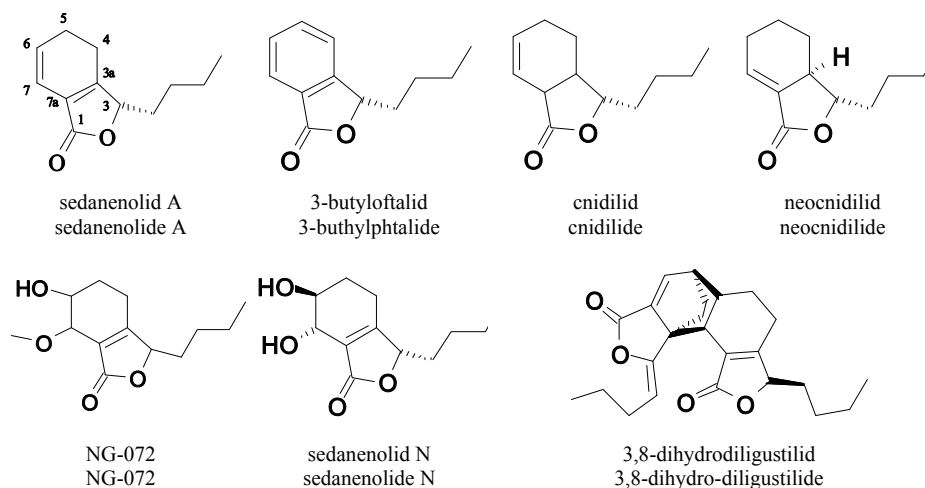


Rys. 1. Naturalne laktony z układem *p*-mentanu  
Fig. 1. Natural lactones with *p*-mentane system

Znane są również laktony z grupy loliolidów: nasycony hydroksylakton izolowany z liści słonecznika (*Helianthus annuus*) i lakton różniący się od poprzedniego obecnością wiązania podwójnego w pierścieniu  $\gamma$ -laktonowym. Wyizolowano go z filipińskiego krzewu *Malachra fasciata* oraz trawy rajgras (*Lolium penne*) i stwierdzono, że jest feromonem czerwonej mrówki z gatunku *Solenopsis invicta*. Innym przykładem naturalnie występującego laktonu z układem cykloheksanu jest menisdaurilid [67] ograniczający procesy transpiracji u rośliny *Phyllanthus urinaria*.

Inną grupą naturalnych laktonów są laktony o strukturze bicyklo[4.3.0]nonanu (rys. 2). Stanowią one liczną grupę pochodnych fталidu [5, 8–10, 14, 30, 51, 52, 72, 79–82, 89, 90, 93, 99, 103–107, 110, 111, 113, 120–123, 126, 140, 142, 145, 154, 161, 166, 172, 179] i izoluje się je z roślin z rodziny *Apiaceae* Lindl. (w tym *Ligusticum officinale* – lubczyka lekarskiego, *Ligusticum chuanxiong*, *L. wallichii* – chińskich odmian lubczyka, *Angelica sinensis* – dzięgła chińskiego, *Apium graveolens* – selera zwyczajnego, *Petroselinum crispum* – pietruszki zwyczajnej). Są to głównie rośliny używane w ziołolecznictwie, szczególnie w chińskiej medycynie ludowej. Udokumentowano ponad 70 struktur tych laktonów i przeprowadzano z nimi testy biologiczne. Badacze podkreślają, że zaletą tej grupy związków chemicznych jest łatwa, wydajna synteza i możliwość wprowadzania nowych grup funkcyjnych, ze względu na obecność wiązań podwójnych.

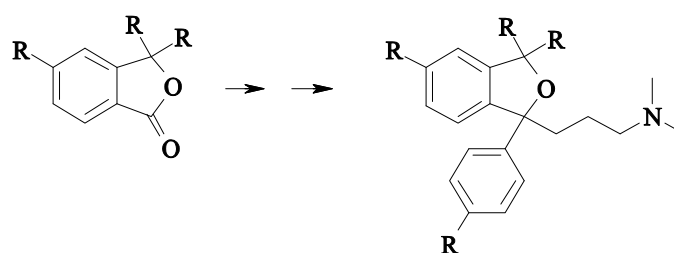
Sedanenolid A nadający selerowi charakterystyczny zapach [14, 72, 10] wykazuje aktywność w stosunku do moskitów, pasożytów, grzybów [113]. Aromatyczne 3-butyloftalid [51, 52, 72, 82, 103, 122, 179], cnidilid [110, 120, 166, 172] oraz neocnidilid [30, 72, 79, 80, 106, 142, 166] mają aktywność owadobójczą [172]. Wśród nich neocnidilid także grzybobójczą [161]. Sedanenolid A i jego dihydroksylowa pochodna, sedanenolid N [5, 111, 121, 122, 123], są inhibitorami topoizomerazy I i II [88] – grupy enzymów rozplątujących i przecinających podwójną helisę DNA, umożliwiając replikację i transkrypcję. Zablokowanie topoizomeraz powoduje, że komórki nowotworowe nie namnażają się.



Rys. 2. Laktony izolowane z *Apiaceae* Lindl.  
Fig. 2. Lactones isolated from *Apiaceae* Lindl.

Trwają badania nad zastosowaniem laktonu NG-072 izolowanego z *A. graveolens* [104] jako leku łagodzącego objawy choroby Alzheimera. Wiele z wyizolowanych struktur ma budowę dimerów, tak jak na przykład 3,8-dihydrodiligustilid [93, 145] o aktywności zbliżonej do progesteronu [93].

Syntetyczne pochodne tej grupy laktonów: paroksetyna, citalopram, fluwoksamina, sertralina (rys. 3) znalazły zastosowanie w terapii depresji i napadów lękowych [147], stanowiąc selektywne inhibitory zwrotnego wychwyty serotoniny i norepinefryny, powodując zwiększenie stężenia neuroprzekaźnika w przestrzeni międzysynaptycznej.

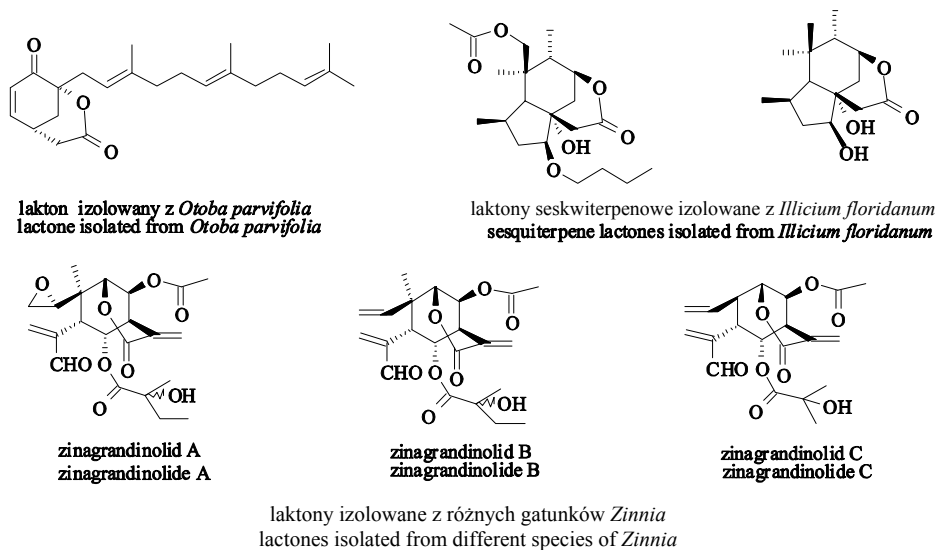


Rys. 3. Syntetyczne pochodne ftalidów  
Fig. 3. Synthetic derivatives of phthalides

Ze względu na właściwości, interesującymi analogami strukturalnymi powyższych  $\gamma$ -laktonów są bicykliczne, sześcioczołowe  $\delta$ -laktony o strukturze bicyklo[3.3.1]nonanu (rys. 4).

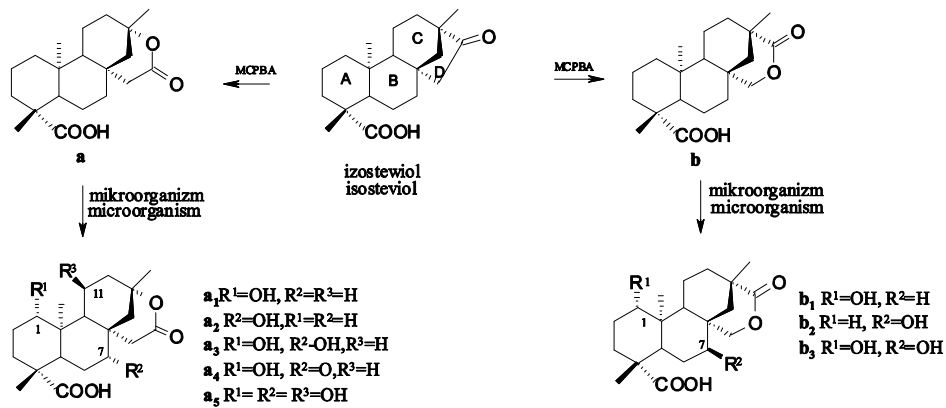
Najprostszą budowę ma nienasycony bicykliczny lakton otrzymany z ziaren owoców *Otoba parvifolia* [54–56, 101, 102] wykazujący antybiotyczną aktywność w stosunku do tak chorobotwórczych mikroorganizmów jak *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* i *Peptococcus sp.* Struktura bicyklo[3.3.1]nonanu występuje także w seskwiterpenowych laktonach izolowanych z *Illicium floridanum* [6, 60, 61, 78, 84–86, 151], znanych jako antagonisty GABA (kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego) [149].

Dalszą interesującą grupę analogicznych  $\delta$ -laktonów stanowią zinagrandinolidy A-C ( $\delta$ -elemanolidy) [186], laktony izolowane z różnych gatunków *Zinnia* (*Compositae*), w tym *Z. grandiflora* [71], *Z. juniperifolia* [134], *Z. citrea* [135]. Wykazują one silną aktywność cytostatyczną w stosunku do linii komórkowych nowotworów złośliwych płuc NCI-H460, piersi MCF-7, trzustki MIA Pa Ca-2 i glejaka mózgu SF-268 [11].



Rys. 4. Naturalne bicykliczne  $\delta$ -laktony  
Fig. 4 Natural bicyclic  $\delta$ -lactones

Inną, znaczącą grupę biologicznie aktywnych  $\delta$ -laktonów stanowią związki otrzymane przez zmodyfikowanie struktury przy zastosowaniu transformacji mikrobiologicznej. Nieznaczna modyfikacja struktury często zmienia biologiczną aktywność, co stwierdzono np. w izostewioli – tetracyklicznym diterpenie z ugrupowaniem karbonylowym w pierścieniu D [28], związku podobnym do steroidów (rys. 5). Laktonowe hydroksypochodne naturalnego izostewioli [19, 75, 108, 125] zostały otrzymane poprzez jego utlenienie kwasem *m*-chloronadbenzoesowym do laktonów, które następnie poddawano mikrobiologicznym przekształceniom przy użyciu *Cunninghamella bainieri* ATCC 9244 i *Aspergillus niger* BCRC 32720.



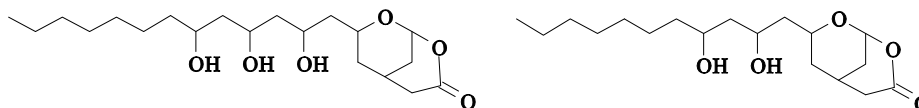
Rys. 5. Mikrobiologiczna hydroksylacja pochodnych izostewiolu  
Fig. 5. Microbial hydroxylation of isosteviols derivatives

W laktonach **a** i **b** (rys. 5) hydroksylacji ulegały atomy węgla w pozycjach C-1 i C-7, rzadziej C-11. Wszystkie otrzymane produkty są agonistami androgenów. Lakton **b** i jego dihydroksylowa pochodna w pozycjach C-1, C-7 wykazują wyższą aktywność niż testosteron.

Kolejną grupę  $\delta$ -laktonów stanowią laktony styrylowe (rys. 6) izolowane z kory *Goniothalamus giganteus* (*Annonaceae*) [4, 8, 49, 50, 139, 182, 183] wykazujące aktywność cytostatyczną w stosunku do kilkunastu nowotworowych linii komórkowych [83, 182].



laktony styrylowe izolowane z *Goniothalamus giganteus*  
styryle lactones isolated from *Goniothalamus giganteus*



laktony izolowane z różnych gatunków *Polyathia*  
lactones isolated from different species of *Polyathia*

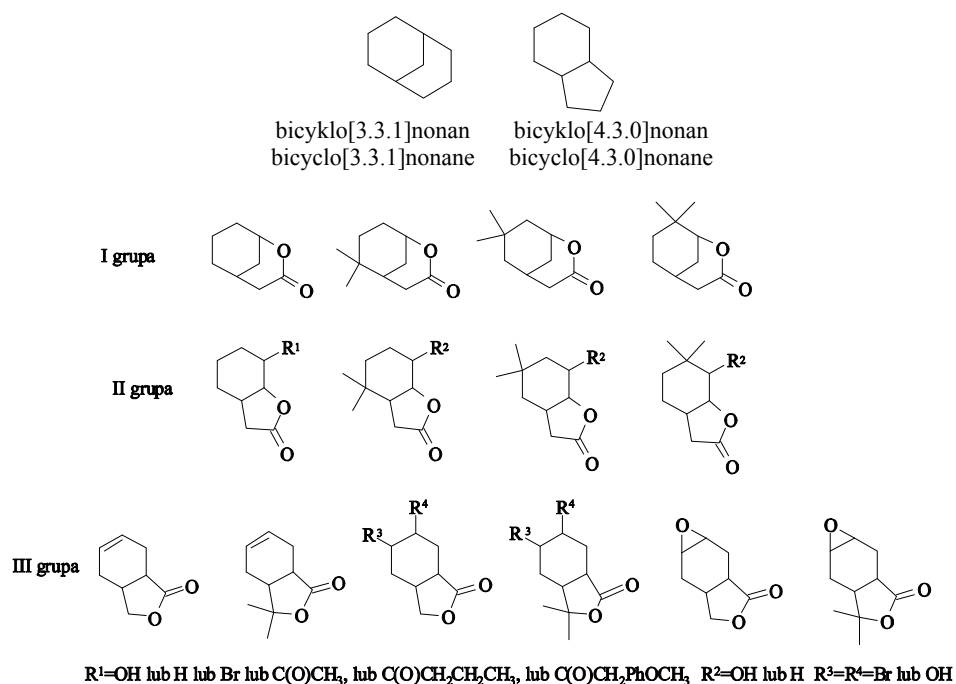
Rys. 6. Naturalne bicykliczne  $\delta$ -laktony styrylowe  
Fig. 6. Natural bicyclic styryle  $\delta$ -lactones

Identyczny bicykliczny układ zidentyfikowano w związkach występujących w różnych gatunkach *Polyathia* [173] (rys. 6), a także w mrówkach *Polyrhacis lamellidens*, używanych w tradycyjnej chińskiej medycynie w leczeniu reumatyzmu, artretyzmu, w wirusowym zapaleniu wątroby [65, 77].

Uznaną metodą pozyskiwania nowych, aktywniejszych biologicznie związków jest opisana wyżej synteza strukturalnych analogów naturalnych laktonów. Przed zastosowaniem nowo pozyskanych związków konieczne jest otrzymanie, oprócz mieszaniny racemicznej, także obu form enancjomerycznych, ponieważ udowodniono, że (+)- i (-)-izomery mają różną aktywność biologiczną, aromat, a czasami smak [6, 13, 21, 35, 43, 47, 68, 115, 117, 136, 148, 163, 165, 167].

W literaturze wiele uwagi poświęcono naturalnym laktonom powstającym w procesie  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych [31, 73, 74, 178], a także powszechnie występującym laktonom seskwiterpenowym [5, 25, 39, 62, 124, 138, 143, 158]. Natomiast, zgodnie z wiedzą autorki, relatywnie mało przebadaną grupą związków są bicykliczne terpenoidowe  $\gamma$ - i  $\delta$ -laktony, a te nieliczne, które są znane, wykazują atrakcyjne (dla człowieka) aktywności biologiczne.

**Idea przeprowadzonych badań było otrzymanie nowych chiralnych laktonów z układem bicyklononanu i zarekomendowanie tych, które okażą się biologicznie aktywne, jako potencjalnych dodatków do żywności zabezpieczających ją przed rozwojem drobnoustrojów.**



Rys. 7. Otrzymane bicykliczne laktony  
Fig. 7. Obtained bicyclic lactones



W tym celu w niniejszych badaniach dokonano chemoenzymatycznej syntezy trzech grup bicyklicznych laktonów. Zsyntezowano dwadzieścia siedem laktonów (rys. 7), wiele związków przejściowych oraz monocykliczne  $\delta$ -laktony służące do wykonania porównawczych testów fungistatycznych.

Wszystkie laktony otrzymano w formach racemicznych oraz czystych optycznie bądź wzbogaconych enancjomerycznie, stosując nowe lub modyfikując znane z literatury metody syntezy [7, 29, 63, 105, 118, 146, 147, 171].

Przeprowadzone badania obejmują syntezę oraz testy bioaktywności. Otrzymanie chiralnych laktonów było możliwe dzięki zastosowaniu biotransformacji, czyli katalizowanych przez enzymy reakcji chemicznych, w których przekształceniu ulegał określony fragment substratu. Uzyskano w ten sposób związki o wysokiej aktywności i czystości optycznej.

Przy zastosowaniu tej metody otrzymano chiralne  $\delta$ -hydroksydiestry (synteza I grupy laktonów),  $\gamma,\delta$ -epoksyestry (synteza II grupy laktonów) i bicykliczne laktony (III grupa laktonów). Zsyntezowane w ten sposób chirony mogą znaleźć szerokie zastosowanie w syntezie leków, dodatków do żywności i nowoczesnych agrochemikaliów. W badaniach skринingowych użyto szerokiej gamy mikroorganizmów lub izolowanych enzymów, tworząc w ten sposób bazę pomocną w badaniach z tej dziedziny.

Testy na aktywność fungistatyczną w stosunku do wytwarzających mikotoksyny grzybów z rodzajów *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* wykonano zarówno na mieszaninach racemicznych, jak i na enancjomerach. Wyniki badań pozwoliły ustalić wpływ budowy przestrzennej (położenia funkcji laktonowej, obecności i pozycji ugrupowania *gem*-dimetylowego oraz oddziaływania centrum stereogenicznego) na aktywność fungistatyczną.

## 2. MATERIAŁY I METODY

### 2.1. Materiały

#### 2.1.1. Biokatalizatory

##### Mikroorganizmy

Użyte w biotransformacjach i badaniu aktywności fungistatycznej mikroorganizmy pochodziły z Kolekcji Katedry Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, utworzonej na bazie przekazanej kolekcji mikroorganizmów Instytutu Botaniki Akademii Medycznej we Wrocławiu oraz Kolekcji Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności UP. Nazwy mikroorganizmów podano w opisie badań.

##### Enzymy i koenzymy

W badaniach nad zastosowaniem hydrolaz do rozdziału racemicznych mieszanin epoksyestrów użyto:

- lipaz izolowanych z: *Rhizopus arrhizus* (Fluka), *Rhizopus niveus* (Fluka), *Pseudomonas cepacia* (Fluka), *Candida cylindracea* (Fluka), *Candida antarctica* (Fluka), *Candida antarctica* (enzym rekombinowany z *Aspergillus niger*) (Sigma), *Mucor javanicus* (Fluka), *Mucor miehei* (Fluka), trzustki wieprzowej (Fluka), *Penicillium roqueforti* (Fluka), *Aspergillus oryzae* (Fluka), *Aspergillus* (Fluka), *Rhizomucor miehei* (enzym rekombinowany z *Aspergillus oryzae*) (Fluka);
- lipaz lipoproteinowych z *Pseudomonas sp.* (Fluka) i *Chromobacterium viscosum* (Fluka);
- esteraz izolowanych z wątroby końskiej (Fluka), *Thermoanaerobium brockii* (Fluka), *Mucor miehei* (Fluka).

W badaniach nad enancjoselektywnym utlenieniem dioli wykorzystano następujące dehydrogenazy alkoholowe: HLADH – enzym rekombinowany z *Escherichia coli* (IVO), PADH 3000-screening kit (Codexis), LKADH z *Lactobacillus kefir* (Fluka), YADH z drożdży piekarskich (Sigma –Aldrich).

Koenzymy: dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD<sup>+</sup>) i mononukleotyd flawinowy (FMN) były zakupione w Sigma Chemical Co.

### 2.1.2. Substraty

Substraty do biotransformacji – estry etylowe kwasów: 2-(3-okso-cykloheksylo)malonowego (**2a**) i jego *gem*-dimetylowe pochodne **2b-d**, 2-(2,3-epoksy-cykloheksylo)octowego (**9a**), a także jego *gem*-dimetylowe pochodne (**9b-d**) oraz cykliczne *mezo*-diole **21**, **22** zostały zsyntezowane przez autorkę z odczynników zakupionych w firmie Merck, Sigma-Aldrich.

## 2.2. Metody

### 2.2.1. Metody analizy i rozdziału mieszanin poreakcyjnych

Skład ekstrahowanych mieszanin po biotransformacjach czy syntezach oraz czystość produktów ustalono na podstawie uzupełniających się analiz chromatografii gazowej (GC) i cienkowarstwowej (TLC). Analizy TLC były wykonywane na szklanych płytkach pokrytych silikażelem (silikażel 60 F<sub>254</sub> (Merck)) i rozwijane w układach heksan : aceton : *izo*-propanol : octan etylu lub dichlorometan : metanol. Związki były wizualizowane przez spryskanie płytek 1-procentowym Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> i 2-procentowym H<sub>3</sub>[P(Mo<sub>3</sub>O<sub>10</sub>)<sub>4</sub>] w 10-procentowym H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a następnie wygrzane. Te same eluenty były używane do chromatografii kolumnowej (silikażel: 60, 230–400 mesh).

Analizy GC wykonano za pomocą aparatu Agilent 6890N GC wyposażonego w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID) i kolumny kapilarne: Carbowax (30 m, 0,53 mm, 0,88 μm), HP-1 (25 m, 0,32 mm, 0,25 μm). Jako gazu nośnego użyto H<sub>2</sub> o przepływie 2 cm<sup>3</sup>/min.

Skreślalność właściwa była mierzona na polarymetrze Autopol IV Automatic Polarimeter (Rudolph) wyposażonym w system termostatujący. Analizy wykonano w chloroformie, w stężeniu wyrażanym w g/100 cm<sup>3</sup>.

Nadmiar enancjomeryczny wyznaczono, opierając się na analizie GC z zastosowaniem kolumn chiralnych: CP-Chirasil-DEX CB (25 m, 0,25 mm, 0,25 μm), Supelco GAMMA DEX<sup>TM</sup> 225 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μm), Supelco BETA DEX<sup>TM</sup> 120 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μm).

### 2.2.2. Ustalanie struktury otrzymanych produktów

Struktury związków ustalono na podstawie danych z analizy widm<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, COSY, HMQC, IR, GC/MS. Widma NMR wykonano na aparacie Bruker Avance DRX-500 spectrometer, używając roztworów w CDCl<sub>3</sub>. Widma IR zmierzono na spektrofotometrze Mattson FTIR-300 Thermo Nicolet. Masa cząsteczkowa otrzymanych związków była wyznaczana na podstawie widma GC/MS przy energii jonizacji 70eV wykonanego na aparacie Varian Chrompack GC MS CP-3800 Saturn 2000.

Pomiary rentgenostrukturalne monokryształów wykonano na dyfraktometrze cztero-kołowym Kuma KM4CCD.

### 2.2.3. Transformacje mikrobiologiczne

#### Badanie skriningowe

Badania skriningowe obejmowały wyselekcjonowanie mikroorganizmów zdolnych do:

- enancjoselektywnej redukcji grupy karbonylowej w  $\delta$ -oksodiestrach (26 mikroorganizmów),
- rozdziąłu mieszanin racemicznych epoksyestrów (22 mikroorganizmy),
- enancjoselektywnego utleniania dioli (54 mikroorganizmy).

Mikroorganizmy były hodowane w kolbach Erlenmeyera (300 cm<sup>3</sup>) zawierających 75 cm<sup>3</sup> podłoża hodowlanego (1% peptonu i 3% glukozy). Po 3–5 dniach wzrostu do wstrząsanej hodowli dodawano 20 mg substratu w 0,5 cm<sup>3</sup> acetonu. Transformacje były kontynuowane w czasie 3, 6, 9, 12, 21 i 72 godzin. Produkty były ekstrahowane eterem etylowym, analizowane technikami TLC i GC. Nadmiar enancjomeryczny wyznaczano z analiz GC na kolumnach z wypełnieniem chiralnym (CP-cyclodextrin). Warunki biotransformacji dla wyselekcjonowanych mikroorganizmów były optymalizowane, a zakres optymalizacji zależał od enancjoselektywności i wydajności transformującego substrat mikroorganizmu [127, 128, 131, 132].

#### Optymalizacja warunków biotransformacji

Optymalizując warunki biotransformacji, modyfikowano przebieg badań skriningowych, każdorazowo przygotowując *inoculum* i oznaczając stopień przereagowania, nadmiar enancjomeryczny, suchą masę i aktywność enzymatyczną:

- Inoculum* przygotowywano poprzez zmycie roztworem soli fizjologicznej zarodników mikroorganizmów hodowanych na agarowym skosie. Ilości zarodników rozcieńczano do stężenia 10<sup>7</sup>/cm<sup>3</sup>.
- Stopień przereagowania*, *nadmiar enancjomeryczny* był oznaczany po ekstrakcji mieszaniny poreakcyjnej eterem lub chloroformem.
- Suchą masę* grzybni wyznaczono jako masę odmytej i liofilizowanej grzybni.
- Efektywność biotransformacji* wyznaczano według wzoru:

$$A=a \cdot b \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$$

gdzie:

- a – ilość substratu [ $\mu$ mol];
- b – procent przereagowania/100;
- h – czas [godziny];
- g – masa liofilizowanej grzybni [g].

Optymalizacja warunków biotransformacji obejmowała także:

- *Podłoża hodowli (C, E, G, M, P, S)*
  - C** 3 g NaNO<sub>3</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g KCl, 0,01 g FeSO<sub>4</sub>, 0,5 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 30 g sacharozy/1000 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O
  - E** 4 g ekstraktu drożdżowego, 10 g skrobi, 0,1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O/1000 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O
  - G** 10 g glukozy, 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g, asparaginy/1000 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O
  - M** 40 g glukozy, 2 g asparaginy, 0,5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,5 g tiaminy/1000 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O
  - P** 30 g glukozy, 10 g peptonu/1000 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O
  - S** 2,5 mg genisteina, 2,5 g NaNO<sub>3</sub>, 2,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 g glukozy/1000 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O.
- *Temperaturę*  
Hodowle mikroorganizmu były inkubowane w następujących temperaturach: 21°C, 25°C, 28°C, 30°C i 32°C, przy wstrząsaniu 150 rpm.
- *pH*  
Wyhodowaną biomasę odmywano i w sterylnych warunkach przenoszono do kolby Erlenmeyera zawierającej 75 cm<sup>3</sup> jednego z czterech buforów fosforanowych o pH: 4,5; 6,2; 7,2; 8,5.
- *Stężenie substratu*  
Po pięciu dniach hodowli do każdej z kolb dodawano jedną z następujących ilości substratu: 20 mg, 40 mg, 60 mg, 80 mg, 100 mg lub 150 mg.
- *Stosowane inhibitory/aktywatory*  
Po pięciu dniach wzrostu hodowli do każdej z kolb dodawano 10, 30 lub 50 mg aktywatora/inhibitora, inkubowano 1 godzinę, następnie dodawano 20 mg substratu. Analizy porównywano z biotransformacjami kontrolnymi bez dodatku aktywatora/inhibitora.

#### **Biotransformacja na skalę preparatywną**

Warunki biotransformacji preparatywnej dobierano indywidualnie dla każdego substratu, opierając się na opisanej wyżej optymalizacji.

#### **2.2.4. Biotransformacje przy użyciu enzymów**

##### **Badania skringowe**

*Rozdział mieszaniny racemicznej epoksyestrów:* 5 mg epoksyestru dodawano do enzymu (patrz 2.1.1.) odpowiadającego pięciu jednostkom aktywności, rozpuszczonego w 0,5 cm<sup>3</sup> buforu fosforanowego o pH 7,2. Reakcję przeprowadzano w temperaturze 20–28°C przy ciągłym mieszaniu. Mieszaninę reakcyjną filtrowano przez celit, wmywając produkty biotransformacji eterem etylowym. Stopień przereagowania substratu oraz nadmiar enancjomeryczny substratu i produktu określono na podstawie analiz GC z zastosowaniem kolumn z wypełnieniem chiralnym [1, 136].

*Przykładowa procedura utleniania enzymatycznego:* do 40 cm<sup>3</sup> buforu (glicyna – NaOH) o pH=9 dodawano: 8 mg HLADH, 0,11 mmol NAD<sup>+</sup>, 2,03 mmol FMN i 1,4

mmol diolu. Bioutlenienie prowadzono w temperaturze pokojowej, przy ciągłym mieszaniu, kontrolując pH. Postęp reakcji monitorowano na GC. Po zakończeniu bioutlenienia podwyższano pH do 12 i ekstrahowano chloroformem nieprzereagowany diol, a po zakwaszeniu do pH=3 ekstrahowano chloroformem lakton [17, 76, 160].

### **Biotransformacja na skalę preparatywną przy użyciu enzymów**

Po wyborze enzymu dobierano liczbę jednostek aktywności bioreagenta w stosunku do ilości substratu. Postęp reakcji monitorowano przy użyciu GC na kolumnach z wypełnieniem chiralnym.

#### **2.2.5. Testy na aktywność fungistatyczną**

Do płynnego agarowego podłoża (45°C) dodawano potencjalnie grzybobójczy lakton w stężeniach 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  i mechanicznie mieszano (worteks). Związki były rozpuszczane w 0,5  $\text{cm}^3$  DMSO na 25  $\text{cm}^3$  agaru. Podłoże ze związkiem wylewano na płytkę Petriego o średnicy 9 cm i po zastygnięciu wycinano korkoborem otwory o średnicy 1,1 cm. W kolejnym etapie w wyciętych otworach umieszczano (pobraną z innej płytki) narośniętą grzybnię (*Penicilium*, *Aspergillus* lub *Fusarium*). Równocześnie w ten sam sposób przygotowywano płytki kontrolne, gdzie do podłoża dodawano tylko DMSO. Przygotowywano także płytki z komercyjnie dostępnym fungicydem nystatyną, którą dodawano w ilości 100, 200, 300  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ .

Płytki Petriego umieszczano w cieplarni w temperaturze 28°C. Każdego dnia mierzono linijką średnicę wzrostu grzybni. Na podstawie przeprowadzonych testów wyznaczono  $\text{IC}_{50}$  (zahamowanie wzrostu grzybni w stosunku do próby kontrolnej o 50%) [26, 124, 158, 178].

#### **2.2.6. Metody syntezy chemicznej**

W pracy wykorzystano następujące procedury syntezy:

- addycję Michaela,
- redukcję  $\delta$ -okso diestrów **2a–d**,  $\alpha,\beta$ -nienasyconych ketonów **1a–d** oraz bezwodników **23**, **24** do dioli **21**, **22** przy użyciu wodorków,
- przegrupowanie Claisena-Johsona,
- epoksydację kwasem *m*-chloronadbenzoesowym,
- estryfikację metodą pirydynową,
- syntezę laktonów poprzez: cyklizację  $\delta$ -hydroksy diestrów **3a–d** i epoksyestrów **9a–d** oraz redukcję bezwodników **23**, **24** lub reakcję Gringarda.

Dodatkowo modyfikowano ich struktury w reakcjach addycji do wiązania podwójnego czy eliminacji grupy hydroksylowej.

Szczegółowy opis syntez znajduje się w opublikowanych pracach [127–130, 132, 162], a dane spektralne otrzymanych laktonów zamieszczono w Apendyksie.

## 3. PRZEDSTAWIENIE I Dyskusja WYNIKÓW

### 3.1. Zastosowanie mikrobiologicznej redukcji w chemoenzymatycznej syntezie enancjomerów 2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-onu (**4a**) i jego analogów z ugrupowaniem *gem*-dimetylowym (**4b-d**)

Zaplanowano otrzymanie obu enancjomerów 2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-onu (**4a**) i ich analogów z ugrupowaniem *gem*-dimetylowym **4b-d** (rys. 8) poprzez laktonizację odpowiednich enancjomerów hydroksydiestrów **3a-d** oraz monocyklicznych  $\delta$ -laktonów **6a-c** jako preparatów porównawczych do planowanych badań aktywności fungi statycznej.

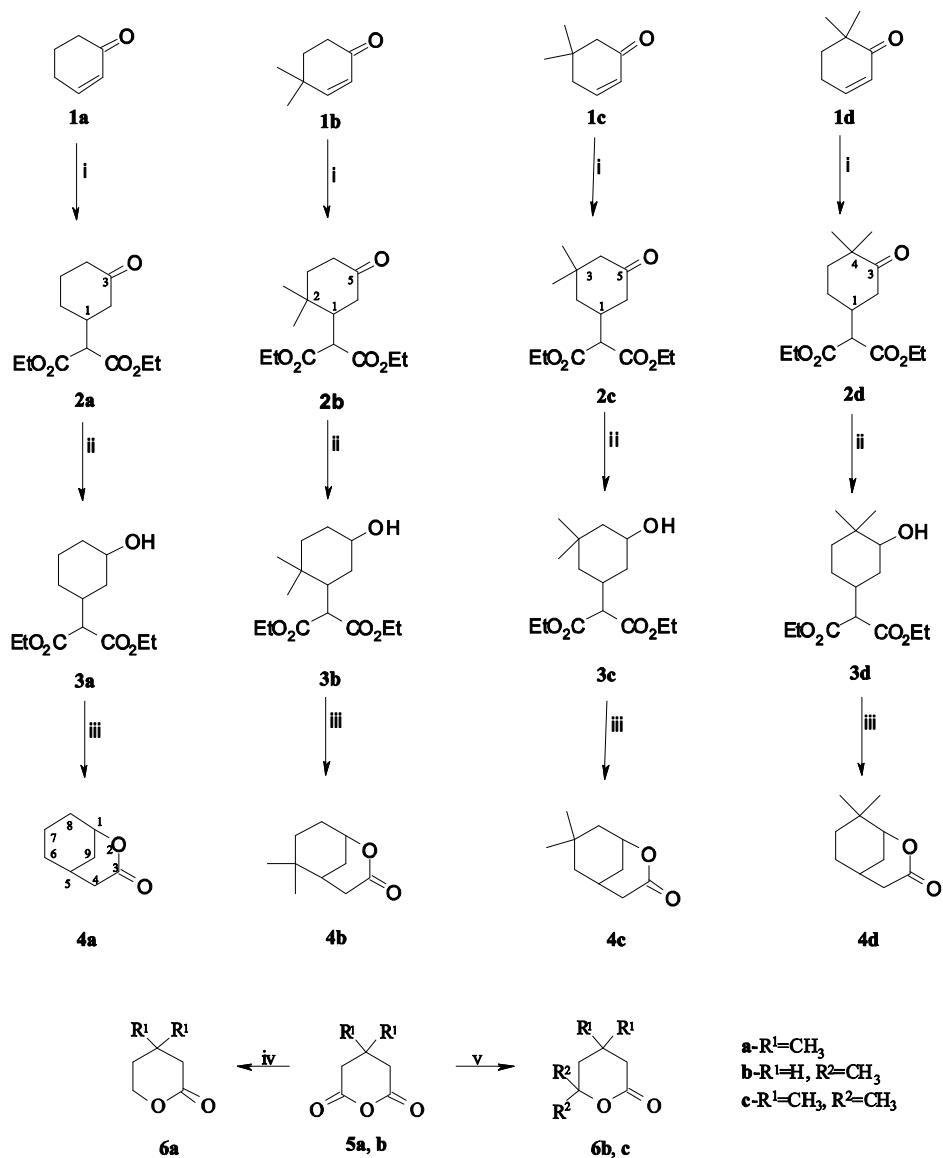
Substratami do tak zaplanowanej syntezy laktonów **4a-d** były produkty addycji Michaela (**2a-d**) otrzymane z  $\alpha,\beta$ -nienasyconych ketonów **1a-d** i estrów kwasu malonowego [137, 175]. Ze względu na obecność centrum asymetrii przy atomie węgla C-1 i prochiralnego ugrupowania karbonylowego (C-3 lub C-5) jeden z enancjomerów **3a-d** może być otrzymany jako produkt mikrobiologicznej redukcji, zaś drugi – poprzez chemiczną redukcję nieprzereagowanego chiralnego substratu **2a-d**.

Niedogodnością takiej strategii jest fakt, że chemiczne metody redukcji 1,3-dipostawionych ketonów prowadzą do powstania *trans*-diastereoizomerów jako głównych produktów reakcji. Ich laktonizacja jest niemożliwa bez uprzedniego przeprowadzenia ich w *cis*-izomery.

Do realizacji takiego planu niezbędne było dobranie (wyselekcjonowanie) mikroorganizmów zdolnych do redukcji ugrupowania karbonylowego niezgodnie z regułą Preloga, czyli do *trans*-hydroksydiestru z wysoką diastereoselektywnością.

#### 3.1.1. Dobór mikroorganizmów zdolnych do enancjoselektywnej redukcji ugrupowania karbonylowego w estrze dietylowym kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (**2a**) i jego *gem*-dimetylowych pochodnych (**2b-d**)

Poszukiwano mikroorganizmów zdolnych do rozdziału mieszaniny racemicznej estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (**2a**) w wyniku bioredukcji do chiralnego *trans*-alkoholu (**3a**). Założono, że te same mikroorganizmy będą redukowały *gem*-dimetylowe pochodne **2b-d** ze zbliżoną enancjoselektywnością.

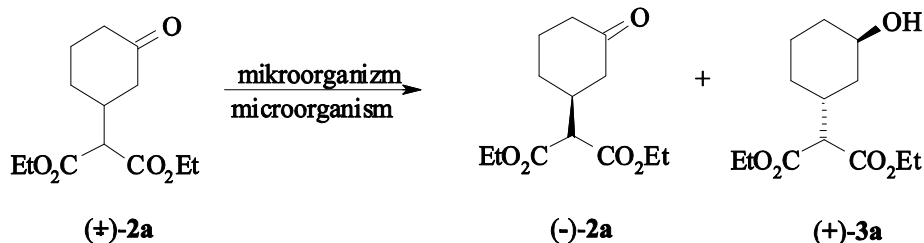


*i*-NaH, CH<sub>2</sub>(CO<sub>2</sub>Et)<sub>2</sub>; *ii*-NaBH<sub>4</sub>, EtOH; *iii*-a) 1% KOH w EtOH; b) TsOH w PhH; *iv*-LiAlH<sub>4</sub>, Et<sub>2</sub>O; *v*-CH<sub>3</sub>MgI, Et<sub>2</sub>O.

Rys. 8. Schemat syntezy δ-laktonów (**4a–d**) oraz (**6a–c**)  
 Fig. 8. Scheme of synthesis of δ-lactones (**4a–d**) and (**6a–c**)



Do badań skringingowych użyto dwudziestu czterech szczepów grzybów należących do dwudziestu rodzajów. Testowane mikroorganizmy, z wyjątkiem *Laetiporus sulphurens* AM 524, szybciej redukowały (+)-*R*-enancjomer racemicznej mieszaniny  $\delta$ -okso diesteru (**2a**) do (+)-*trans*-estru dietylowego kwasu 2-(3-hydroksycykloheksylo)malonowego **3a** (rys. 9).



Rys. 9. Schemat mikrobiologicznej redukcji racemicznego estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (( $\pm$ )-**2a**)

Fig. 9. Scheme of microbial reduction of racemic diethyl 2-(3-oxocyclohexyl)malonate (( $\pm$ )-**2a**)

Spośród przebadanych mikroorganizmów jedenaście (tab. 1a) redukowało ester dietylowy kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (**2a**) do *trans*-diastereoizomeru, produktu redukcji niezgodnego z regułą Preloga (tab. 1a). Cztery spośród tych mikroorganizmów: *Absidia coerulea* AM 93 ( $ee_{2a}=99\%$ ), *Beauveria bassiana* AM 278 ( $ee_{2a}=72\%$ ), *Penicillium notatum* AM 904 ( $ee_{2a}=82\%$ ) i *Rhodotorula rubra* AM 4 ( $ee_{2a}=79\%$ ) transformowały substrat **2a** z wysoką enancjoselektywnością do *trans*-estru dietylowego kwasu 2-(3-hydroksycykloheksylo)malonowego (**3a**) ( $ee=99\%$ ).

Pozostałe trzynaście mikroorganizmów redukowało  $\delta$ -okso diester (**2a**) do mieszaniny *cis*- i *trans*-alkoholi **3a** (tab. 1b). *Cis*-izomer był głównym produktem redukcji jedynie w transformacjach z udziałem *Aspergillus ochraceus* AM 456 (58%), *Fusicoccum amygdale* AM 258 (70,1%) i *Rhodotorula glutinis* AM 242 (45,1%). Nadmiary enancjomeryczne nieprzereagowanego substratu mieściły się w granicach od 62 do 70%.

Bazując na danych zawartych w tabelach 1a, 1b i dodatkowo opierając się na przeprowadzonych eksperymentach, do dalszych badań nad rozdziałem mieszaniny racemicznej estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (( $\pm$ )-**2a**) wytypowano szczep *Absidia coerulea* AM 93.

Zaobserwowano nietypowy przebieg biotransformacji. W ciągu pierwszych trzech godzin proces redukcji był szybki (47%) i przebiegał z wysoką enancjoselektywnością ( $ee_{3a}=99\%$ ), natomiast późniejszy postęp procesu był znacznie wolniejszy (8,9% przereagowania w ciągu następnego dziesięciu godzin). Efektywność biotransformacji drastycznie spadała po trzech godzinach.

W kolejnym etapie badań przetestowano cztery wyselekcjonowane enancjo- i diastereoselektywne szczepy mikroorganizmów: *Absidia coerulea* AM 93, *Beauveria bassiana* AM 278, *Penicillium notatum* AM 904, *Rhodotorula rubra* AM 4 jako biokatalizatory w redukcji grupy karbonylowej w związkach **2b–d** z *gem*-dimetylowym ugrupowaniem estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (( $\pm$ )-**2a**) (rys. 10).

Tabela 1a  
Table 1a

Mikrobiologiczna redukcja estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego ((±)-**2a**) – skład mieszaniny produktów (GC)[127].  
Microbial reduction of racemic diethyl 2-(3-oxocyclohexyl)malonate ((±)-**2a**) – composition of product mixtures (by GC)[127].

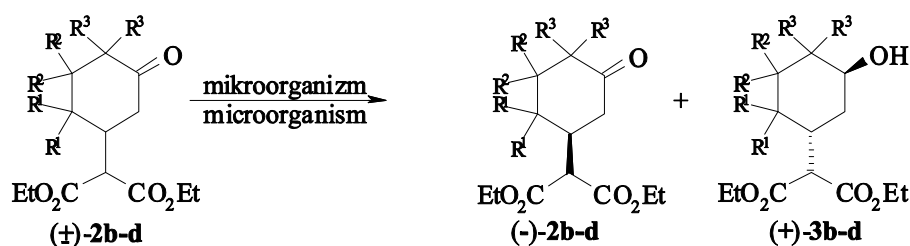
Lp. Entry	Mikroorganizm Microorganism	Czas [godziny] Time [h]	Stopień przereago- wania [%] Conversion of <b>2a</b>	ee <b>2a</b> [%] ee of <b>2a</b>	ee <i>trans</i> - <b>3a</b> [%] ee of <i>trans</i> - <b>3a</b>	de <i>trans</i> - <b>3a</b> [%] de of <i>trans</i> - <b>3a</b>
1.	<i>Absidia</i>	3	47	(-) 82	(+) 99	95
	<i>coerulea</i> AM 93	12	58	(-) 99	(+) 89	92
2.	<i>Aphanocladium</i>	21	24	(-) 14	(+) 22	94
	<i>album</i> AM 417	81	79	(-) 42	(+) 62	95
3.	<i>Beauveria</i>	3	42	(-) 72	(+) 89	76
	<i>bassiana</i> AM 278	6	65	(-) 62	(+) 57	73
4.	<i>Beauveria</i>	6	29	(-) 9	(+) 5	71
	<i>bassiana</i> AM 446	9	47	(-) 8	(+) 10	71
5.	<i>Fusarium</i>	6	37	(-) 29	(+) 99	55
	<i>solani</i> AM 203	12	53	(-) 27	(+) 76	63
6.	<i>Penicillium</i>	6	44	(-) 39	(+) 33	77
	<i>camemberti</i> AM 83	12	74	(-) 19	(+) 44	69
7.	<i>Penicillium</i>	3	35	(-) 42	(+) 20	81
	<i>notatum</i> 904	6	51	(-) 82	(+) 32	83
8.	<i>Rhizopus</i>	9	22	(-) 21	(-) 63	62
	<i>nigricans</i> AM 394	81	80	(-) 51	(-) 35	79
9.	<i>Saccharomyces</i>	6	35	(-) 29	(-) 47	86
	<i>cerevisiae</i> AM 464	21	75	(-) 45	(-) 12	83
10.	<i>Rhodotorula</i>	3	67	(-) 62	(+) 69	61
	<i>rubra</i> AM 4	6	72	(-) 79	(+) 67	61
11.	<i>Yarrowia</i>	9	36	(-) 22	(+) 19	58
	<i>lipolytica</i> AM 71	21	83	(-) 32	(+) 31	75

Tabela 1b

Table 1b

Mikrobiologiczna redukcja estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego  
 ((±)-**2a**) – skład mieszaniny produktów (GC).  
 Microbial reduction of racemic diethyl 2-(3-oxocyclohexyl)malonate ((±)-**2a**) – composition  
 of product mixtures (by GC).

Lp. Entry	Mikroorganizm Microorganisms	Czas [godzi- ny] Time [h]	<b>2a</b>		<i>trans-3a</i>		<i>cis-3a</i>		de <i>trans-3a</i> de <i>trans-3a</i>
			Skład [%] Compo- sition	Izomer ee [%] Isomer ee	Skład [%] Compo- sition	Izomer ee [%] Isomer ee	Skład [%] Compo- sition	Izomer ee [%] Isomer ee	
1.	<i>Ascosphaera</i>	12	21	(-) 54	53	(+) 71	26	(-) 63	33
	<i>apis</i> AM 496	21	5	(-) 80	57	(+) 69	38	(-) 42	21
2.	<i>Aspergillus</i>	3	54	(-) 52	7	(+) 79	40	(-) 71	-72
	<i>ochraceus</i> AM 456	7	25	(-) 33	17	(+) 25	58	(-) 62	-55
3.	<i>Aspergillus</i>	9	44	(-) 80	42	(+)99	14	(-) 67	49
	<i>wenthi</i> AM 413	21	25	(-) 52	49	(+)99	26	(-) 42	31
4.	<i>Circinella</i>	12	64	(-) 18	24	(+) 59	12	(-) 27	32
	<i>muscaes</i> AM 302		21	(-) 24	44	(+) 82	35	(-) 22	11
5.	<i>Fusarium</i>	21	52	(-) 26	33	(+) 79	15	(-) 46	39
	<i>oxysporum</i> AM 13	72	25	(-) 99	59	(+) 52	16	(-) 55	57
6.	<i>Fusicoccum</i>	6	74	(-) 12	7	(+)28	19	(-) 23	-47
	<i>amygdali</i> AM 258	81	18	(-) 38	12	(+) 44	70	(-) 64	-71
7.	<i>Hansenijspora</i>	7	78	(+) 6	13	(+) 24	9	(+) 7	21
	<i>vinaea</i> 912	12	42	(-)20	41	(+) 39	17	(-) 29	41
8.	<i>Laetiporus</i>	6	74	(+) 10	16	(+) 47	11	(+) 15	20
	<i>sulphurens</i> AM 524	9	41	(+) 24	31	(+) 69	28	(+) 38	5
9.	<i>Mortiella</i>	12	91	(-) 10	6	(-) 31	3	(-) 15	27
	<i>vinaceae</i> AM 149	24	54	(-) 14	35	(-) 60	11	(-) 17	52
10.	<i>Mucor</i>	21	37	(-) 21	39	(+) 99	25	(-) 31	21
	<i>circinelloides</i> AM 385	21	18	(-) 14	42	(+) 99	40	(-) 38	3
11.	<i>Papularia</i>	9	85	(-) 40	8	(+) 30	7	(-) 36	3
	<i>rosea</i> 17	81	38	(-) 68	35	(+) 55	27	(-) 75	12
12.	<i>Rhodotorula</i>	3	27	(-) 56	50	(+) 68	24	(-) 89	35
	<i>glutinis</i> AM 242	9	9	(-) 75	46	(+) 56	45	(-) 70	1
13.	<i>Trichoderma</i>	12	53	(-) 52	34	(+) 92	13	(-) 61	43
	<i>viride</i> AM 523	21	13	(-) 70	55	(+) 73	32	(-) 45	27



**2b,3b:**  $R^1=CH_3$ ,  $R^2=R^3=H$ , **2c,3c:**  $R^1=R^3=H$ ,  $R^2=CH_3$ ,; **2d,3d:**  $R^1=R^2=H$ ,  $R^3=CH_3$ .

Rys. 10. Schemat mikrobiologicznej redukcji racemicznych  $\delta$ -oksodiesterów (( $\pm$ )-**2b-d**)

Fig. 10. Scheme of microbial reduction of racemic  $\delta$ -oxodiester (( $\pm$ )-**2b-d**)

Dane otrzymane w wyniku bioredukcji zobrazowano na rysunku 11, przedstawiając rezultaty trzydziestosześciodzinnej transformacji. Dla większej czytelności podano procentową zawartość izomerów **2b-d**, *trans*-**3b-d** i ich nadmiary enancjomeryczne.

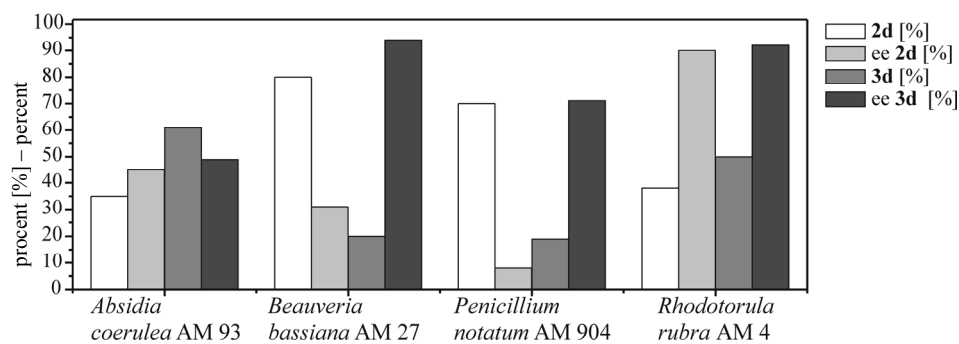
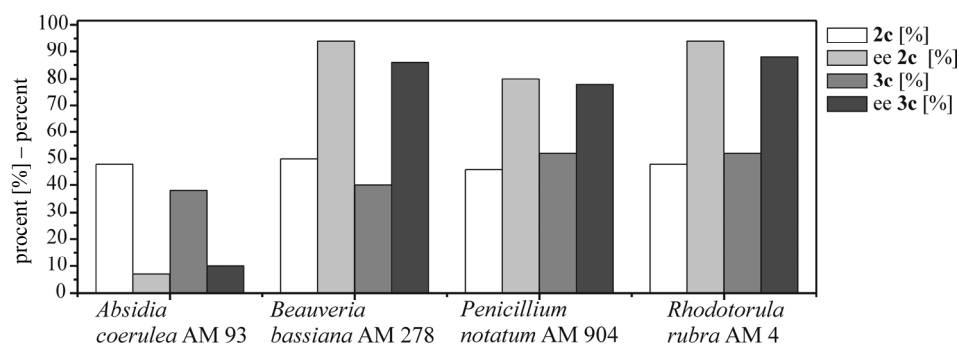
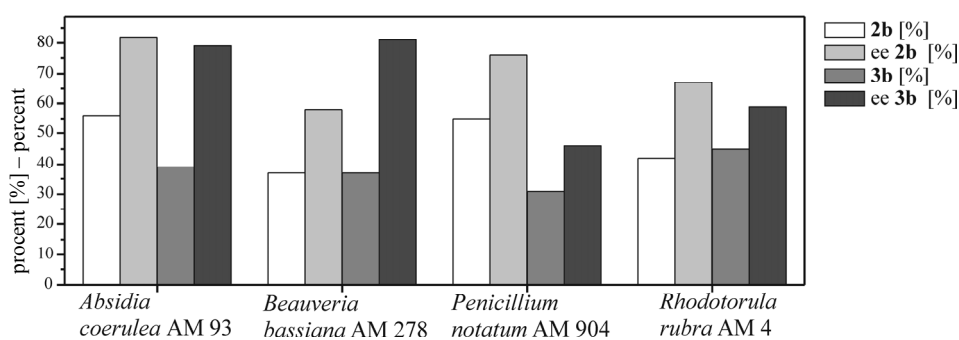
Obecność oraz różne położenie ugrupowania *gem*-dimetylowego w pierścieniu cykloheksanowym wpływa na aktywność i enancjoselektywność dehydrogenaz. We wszystkich bioredukcjach oksodiesterów **2b-d** wydłużył się czas potrzebny na 50-procentowe przereagowanie w stosunku do substratów bez grup metylowych.

Ester etylowy kwasu 2-(2,2-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego (**2b**), podobnie jak ester bez ugrupowania *gem*-dimetylowego **2a**, był redukowany przy użyciu *Absidia coerulea* AM 93 z wysoką enancjoselektywnością ( $ee_{2b}=82\%$ ,  $ee_{3b}=79\%$ ). Ten sam mikroorganizm wykazywał niską enancjoselektywność w transformacjach estru etylowego kwasu 2-(3,3-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego (**2c**) ( $ee_{2c}=7\%$ ;  $ee_{3c}=10\%$ ) oraz estru etylowego kwasu 2-(4,4-dimetylo-3-oksocykloheksylo)malonowego (**2d**) ( $ee_{2d}=45\%$ ;  $ee_{3d}=49\%$ ).

Ester etylowy kwasu 2-(3,3-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego (**2c**) był transformowany z wysoką enancjoselektywnością przez *Beauveria bassiana* AM 278 ( $ee_{2c}=94\%$ ;  $ee_{3c}=86\%$ ), *Penicillium notatum* AM 904 ( $ee_{2c}=80\%$ ;  $ee_{3c}=78\%$ ), *Rhodotorula rubra* AM 4 ( $ee_{2c}=94\%$ ;  $ee_{3c}=88\%$ ).

Stwierdzono, że obecność ugrupowania *gem*-dimetylowego w pozycji  $\alpha$  w stosunku do ugrupowania karbonylowego w estrze etylowym kwasu 2-(4,4-dimetylo-3-oksocykloheksylo)malonowego **2d** nie przeszkadzała w enancjoselektywnej redukcji przy użyciu dehydrogenaz z *Rhodotorula rubra* AM 4 ( $ee_{2d}=90\%$ ;  $ee_{3d}=92\%$ ).

Na podstawie powyższych badań skryningowych wyselekcjonowano szczep *Absidia coerulea* AM 93 do transformacji estrów etylowych kwasów 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (**2a**) i 2-(2,2-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego (**2b**) oraz drożdże *Rhodotorula rubra* AM 4 do bioredukcji estrów etylowych kwasów 2-(3,3-dimetylo-oksocykloheksylo)malonowego (**2c**) i 2-(4,4-dimetylo-3-oksocykloheksylo)malonowego (**2d**).



Rys. 11. Procentowa zawartość i nadmiar enancjomeryczny izomerów **2b–d** i *trans*-**3b–d** w mieszaninach po biotransformacji przy użyciu *Absidia coerulea* AM 93, *Beauveria bassiana* AM 278, *Penicillium notatum* AM 904, *Rhodotorula rubra* AM 4

Fig. 11. Percent composition and enantiomeric excesses of isomers **2b–d** and *trans*-**3b–d** in the mixtures obtained after biotransformation with *Absidia coerulea* AM 93, *Beauveria bassiana* AM 278, *Penicillium notatum* AM 904, *Rhodotorula rubra* AM 4

**3.1.2. Dobór optymalnych warunków redukcji estrów dietylowych kwasów:  
2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (2a) oraz  
2-(2,2-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego (2b)  
przy użyciu *Absidia coerulea* AM 93**

Szczep *Absidia coerulea* AM 93 został wyizolowany z gleby puszczy Kampinoskiej w 1972 r. i wszedł w skład Kolekcji Akademii Medycznej we Wrocławiu. Jest opisany jako biokatalizator w hydroksylacji steroidów, terpenów, laktonów [2, 22, 27, 34, 53, 187].

Drobnoustroje pozyskiwane ze środowiska naturalnego często prowadzą procesy biosyntezy lub biotransformacji z wydajnością niewystarczającą do opracowania ekonomicznego procesu technologicznego. Dobierając warunki hodowli, można częściowo zmienić aktywność metaboliczną szczepów dzikich i uzyskać podwyższenie wydajności badanego procesu. W tym celu przebadano wpływ składu podłoża, temperatury, pH i stężenia substratu na wyniki bioredukcji związków **2a** i **2b**.

**Wpływ podłoża**

Szczep *Absidia coerulea* AM 93 był hodowany w sześciu różnych podłożach wybranych na podstawie danych literaturowych [27, 148, 185, 187]. Oznaczono stopień przereagowania racemicznego estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (**2a**) i jego *gem*-dimetylowej pochodnej **2b** oraz enancjoselektywność procesu przy użyciu metod chromatografii gazowej. Ilość narośniętej grzybni oznaczono jako suchą masę uzyskaną po liofilizacji odmytej grzybni. Dane zostały zaprezentowane w tabelach 2 i 3.

Tabela 2  
Table 2

Wpływ składu podłoża hodowli na wzrost masy grzybni *Absidia coerulea* AM 93, efektywność biotransformacji, stopień przereagowania **2a** i nadmiar enancjomeryczny (-)-**2a** i (+)-**3a** [127]  
Effect of growth medium composition, on dry mass of *Absidia coerulea* AM 93, efficiency of biotransformation, degree of conversion **2a** and enantiomeric excesses of (-)-**2a** and (+)-**3a** [127]

Lp. Entry	Podłoże* Growth medium*	Sucha masa [g]** Dry mass [g]**	Efektywność biotransformacji*** Efficiency of biotransformation***	Stopień przereagowania <b>2a</b> [%] Conversion of <b>2a</b>	Ee <b>2a</b> [%] ee of <b>2a</b>	ee <i>trans-3a</i> [%] ee of <i>trans-3a</i>
1.	C	0,49	7,9	45	(-) 62	(+) 93
2.	E	0,44	5,4	15	(-) 8	(+) 99
3.	G	0,46	6,8	36	(-) 40	(+) 99
4.	M	0,49	7,8	45	(-) 52	(+) 95
5.	S	0,47	10,4	57	(-) 13	(+) 92
6.	P	0,60	7,5	52	(-) 92	(+) 95

\*rozdział 2.2.3

\*see part 2.2.3

\*\* 5-dniowa hodowla *Absidia coerulea* AM 93 w 75 cm<sup>3</sup> podłoża

\*\* 5-days cultures of *Absidia coerulea* AM 93 in 75 cm<sup>3</sup> growth medium

\*\*\*Efektywność biotransformacji  $A = a \cdot b \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$  (a – ilość substratu [μmol]; b – procent przereagowania/100; h – czas [godziny]; g – masa liofilizowanej grzybni [g])

\*\*\* Efficiency of biotransformation  $A = a \cdot b \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$  (a – amount of substrate [μmol]; b – percent of conversion/100; h – time [h]; g – mass of lyophilized mycelium [g])

Tabela 3  
Table 3

Wpływ składu podłoża hodowli na wzrost masy grzybni *Absidia coerulea* AM 93, stopień przereagowania **2b** i nadmiar enancjomeryczny (-)-**2b** i (+)-**3b**  
Effect of growth medium composition on dry mass of *Absidia coerulea* AM 93, degree of conversion **2b** and enantiomeric excesses of (-)-**2b** and (+)-**3b**

Lp. Entry	Podłoże* Growth medium*	Sucha masa [g]** Dry mass **	Stopień przereagowania <b>2b</b> [%] Conversion of <b>2b</b>	ee <b>2b</b> [%] ee of <b>2b</b>	ee <i>trans</i> - <b>3b</b> [%] ee of <i>trans</i> - <b>3b</b>
1.	C	0,53	42	(-) 80	(+) 62
2.	E	0,64	59	(-) 75	(+) 96
3.	G	0,32	12	(-) 67	(+) 22
4.	M	0,45	63	(-) 52	(+) 95
5.	S	0,38	7	(-) 20	(+) 8
6.	P	0,72	44	(-) 82	(+) 79

\* rozdział 2.2.3 – see part 2.2.3

\*\* 5-dniowa hodowla *Absidia coerulea* AM 93 w 75cm<sup>3</sup> podłoża – 5-days cultures of *Absidia coerulea* AM 93 in 75cm<sup>3</sup> growth medium

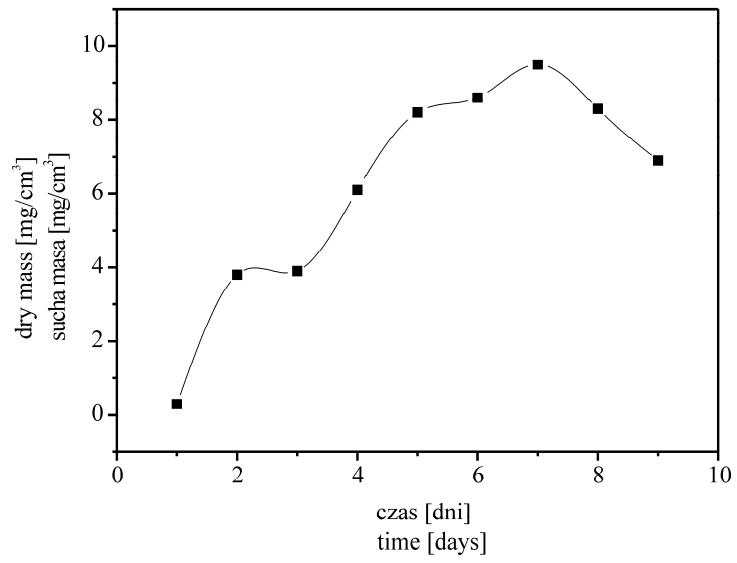
Tak znaczne różnice w enancjoselektywności w zależności od składu podłoża sugerują, że składniki podłoża wpływały na biosyntezę dehydrogenaz i efektywność biotransformacji. Najlepszym podłożem, ze względu na stopień przereagowania oraz nadmiar enancjomeryczny substratu (**2a**, **2b**) i produktu (**3a**, **3b**), był roztwór glukozy i peptonu (podłoże P).

Wykonano krzywą wzrostu *Absidia coerulea* AM 93 hodowanego w podłożu P (rys. 12). Zaobserwowano również, że początkowe pH podłoża P (6,5) maleje w trakcie wzrostu mikroorganizmu (rys. 13).

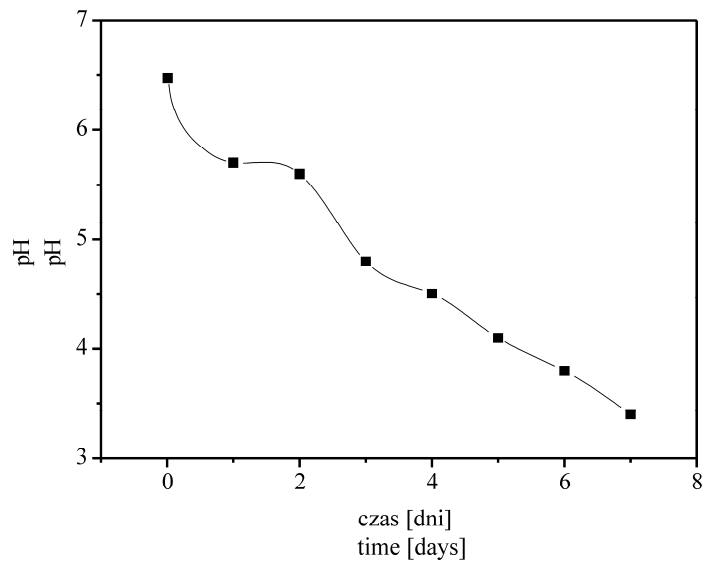
### Wpływ temperatury

W kolejnym eksperymencie wyznaczono optymalną temperaturę, w której aktywność dehydrogenaz jest najwyższa. Stopień przereagowania estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (**2a**) okazał się wprost proporcjonalny do temperatury w zakresie 21–32°C (w przybliżeniu 1% przereagowania na 1°C) (rys. 14).

Ze wzrostem temperatury i stopnia przereagowania ilość (+)-enancjomery **2a** w mieszaninie reakcyjnej maleje, ale gdy temperatura osiągnie 30°C, wielkość nadmiaru enancjomerycznego spada, co sugeruje, że enancjoselektywność dehydrogenaz w wyższej temperaturze obniża się. Nadmiar enancjomeryczny (+)-2-(3-hydroksycykloheksylo)malonowego (**3a**) zaczyna zmniejszać się w temperaturze 30–32°C, kiedy rozpoczyna się redukcja (-)-enancjomery estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego ((-)-**2a**). Na podstawie powyższego eksperymentu wyznaczono 28°C jako optymalną temperaturę procesu.

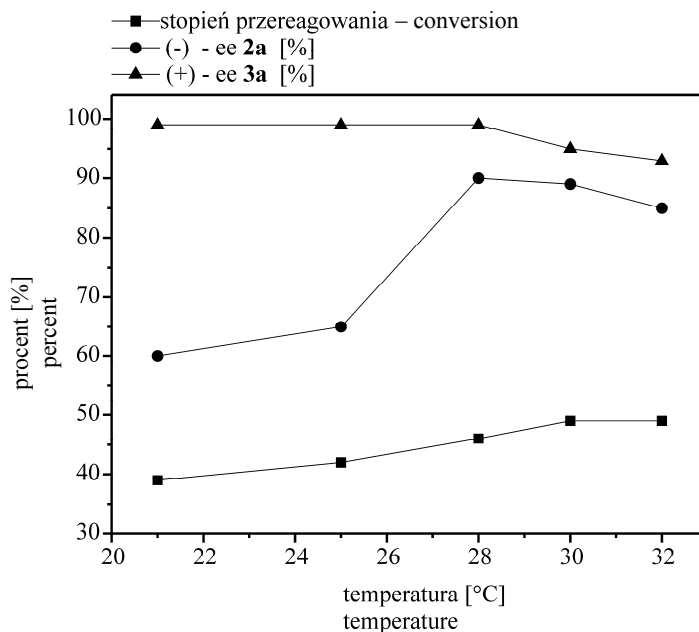


Rys. 12. Krzywa wzrostu *Absidia coerulea* AM 93  
 Fig. 12. Growth curve of *Absidia coerulea* AM 93



Rys. 13. Zmiany pH w hodowli *Absidia coerulea* AM 93  
 Fig. 13. Change of pH during growth of *Absidia coerulea* AM 93





Rys. 14. Wpływ temperatury na stopień przereagowania substratu **2a**, nadmiary enancjomeryczne (-)-**2a**, (+)-**3a** w transformacjach przy użyciu *Absidia coerulea* AM 93

Fig. 14. Effect of temperature on substrate **2a** conversion and enantiomeric excesses of (-)-**2a** and (+)-**3a** in transformation by *Absidia coerulea* AM 93

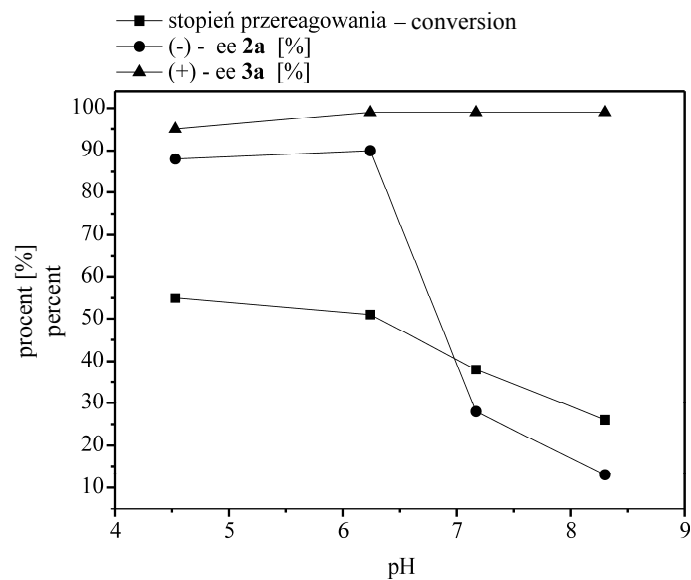
### Wpływ pH

Przeznaczone do biotransformacji hodowle *Absidia coerulea* AM 93 były umieszczone w roztworach buforu fosforanowego o wartościach pH: 4,5, 6,2, 7,2 i 8,5 z zachowaniem sterylnych warunków. Wyniki bioredukcji zilustrowano na rysunkach 15 i 16. Stopień przereagowania estrów dietylowych kwasów 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (**2a**) i 2-(2,2-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego (**2b**) oraz nadmiary enancjomeryczne substratów maleją wraz ze wzrostem pH.

Bioredukcja okazała się bardziej efektywna w środowisku kwaśnym niż w neutralnym czy alkalicznym.

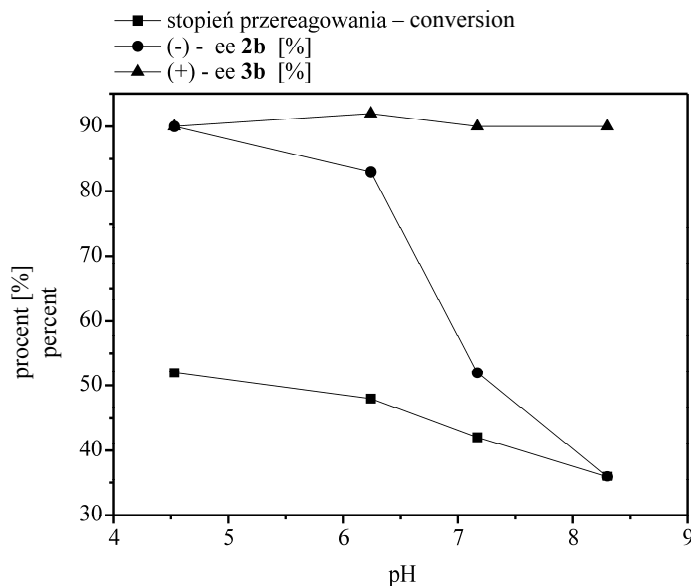
### Wpływ stężenia substratu

Celem tego eksperymentu było ustalenie maksymalnej ilości substratów **2a** i **2b**, jaka może być transformowana przez pięciodniową kulturę *Absidia coerulea* AM 93 hodowaną w 75 cm<sup>3</sup> podłoża P, bez utraty enancjoselektywności w stosunku do badań skринingowych. Określono wpływ ilości substratu na stopień przereagowania i nadmiar enancjomeryczny produktów. Dane zestawiono na rysunkach 17 i 18.



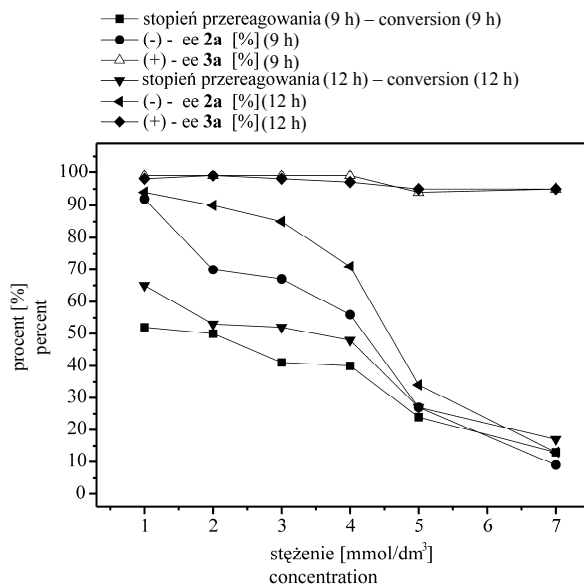
Rys. 15. Wpływ pH na stopień przereagowania **2a**, nadmiar enancjomeryczny (-)-**2a**, (+)-**3a** w transformacjach przy użyciu *Absidia coerulea* AM 93

Fig. 15. Effect of pH on conversion **2a** and enantiomeric excesses of (-)-**2a** and (+)-**3a** in transformation by *Absidia coerulea* AM 93



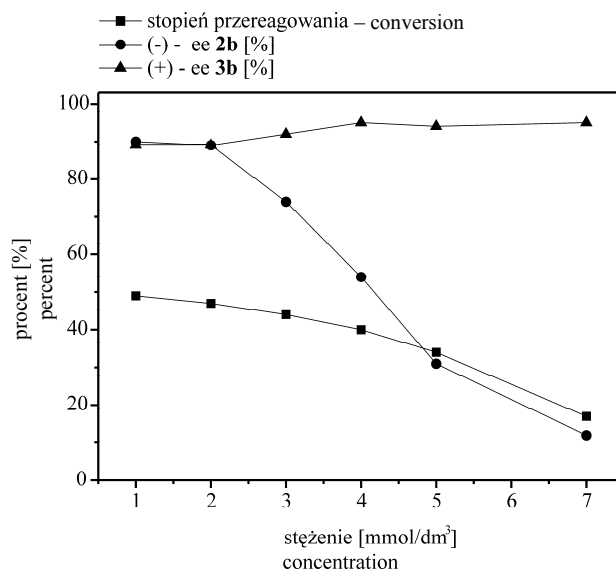
Rys. 16. Wpływ pH na stopień przereagowania **2a**, nadmiar enancjomeryczny (-)-**2b**, (+)-**3b** w transformacjach przy użyciu *Absidia coerulea* AM 93

Fig. 16. Effect of pH on conversion **2a** and enantiomeric excesses of (-)-**2b** and (+)-**3b** in transformation by *Absidia coerulea* AM 93



Rys. 17. Wpływ stężenia substratu ( $\pm$ )-**2a** na stopień przereagowania i nadmiar enancjomeryczny (-)-**2a**, (+)-**3a** w transformacjach przy użyciu *Absidia coerulea* AM 93

Fig. 17. Effect of substrate ( $\pm$ )-**2a** concentration on conversion and enantiomeric excesses of (-)-**2a** and (+)-**3a** in transformation by *Absidia coerulea* AM 93



Rys. 18. Wpływ stężenia substratu ( $\pm$ )-**2b** na stopień przereagowania i nadmiar enancjomeryczny (-)-**2b**, (+)-**3b** w transformacjach przy użyciu *Absidia coerulea* AM 93

Fig. 18. Effect of substrate ( $\pm$ )-**2b** concentration on conversion and enantiomeric excesses of (-)-**2b** and (+)-**3b** in transformation by *Absidia coerulea* AM 93

Optymalnym stężeniem substratu nieobniżającym stopnia przereagowania czy enancjoselektywności okazało się stężenie 4 mmol/dm<sup>3</sup>, czyli około 80 mg substratu w 75 cm<sup>3</sup> hodowli *Absidia coerulea* AM 93 dla estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (**2a**) oraz 2 mmol/dm<sup>3</sup> w wypadku estru dietylowego kwasu 2-(2,2-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego (**2b**).

### 3.1.3. Wpływ wybranych induktorów na efektywność bioredukcji estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (**2a**)

Po przeprowadzonej optymalizacji warunków biotransformacji (rozdział 3.1.2.) podjęto próbę zwiększenia efektywności biotransformacji na dwóch drogach:


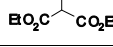


- poprzez pasażowanie badanego szczepu na podłożach zawierających substrat lub keton (cykloheks-2-en-1-on) (tab. 4),
- poprzez inkubację hodowli w obecności niewielkich ilości ksenobiotycznych związków (rys. 19).

Do badań wybrano oksodiester **2a** ze względu na krótki czas jego bioredukcji.

Tabela 4

Table 4

Bioredukcja estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (**2a**) przy użyciu szczepu *Absidia coerulea* AM 93 hodowanego na podłożu agarowym w obecności dodatków  
Bioreduction of diethyl ester 2-(3-oxocyclohexyl)malonate (**2a**) by cultures from *innoculum* of *Absidia coerulea* AM 93 from agar medium with additives

Lp. Entry	Dodatki Additives	Sucha masa [g]* Dry mass*	Czas [godziny] Time [h]	Stopień przereagowania [%] Conversion of <b>2b</b>	ee <b>2b</b> [%] ee of <b>2b</b>	ee <i>trans</i> - <b>3b</b> [%] ee of <i>trans</i> - <b>3b</b>
1a.		0,49	1,5	28	(-) 36	(+) 98
			3,0	46	(-) 75	(+) 99
1b.		0,44	1,5	30	(-) 41	(+) 99
			3,0	47	(-) 84	(+) 98
2a.		0,46	1,5	21	(-) 24	(+) 98
			3,0	34	(-) 46	(+) 99
2b.		0,49	1,5	28	(-) 34	(+) 99
			3,0	40	(-) 61	(+) 99
3.	- (kontrola)	0,47	1,5	39	(-) 57	(+) 99
			3,0	46	(-) 88	(+) 98

\* 5-dniowa hodowla *Absidia coerulea* AM 93 w 75 cm<sup>3</sup> podłoża

\* 5-days cultures of *Absidia coerulea* AM 93 in 75 cm<sup>3</sup> growth medium

Sądzone, że stała obecność substratu lub analogicznego do niego ketonu będzie aktywowała biosyntezę dehydrogenaz. W tym celu przeprowadzono sześciokrotne pasażowanie szczepu *Absidia coerulea* AM 93 na skosach agarowych z podłożem P, z dodatkiem 0,1% substratu lub 0,05% ketonu (cykloheks-2-en-1-onu). Wyniki porównano z analizami kontrolnymi wykonanymi w identycznych warunkach. Uzyskane w ten sposób szczepy użyto do biotransformacji estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (**2a**), a dane zestawiono w tabeli 4.

Biotransformacja przy użyciu pasażowanego szczepu kontrolnego charakteryzowała się wyższym stopniem przereagowania i enancjoselektywnością w porównaniu do szczepów aktywowanych substratem lub  $\alpha,\beta$ -nienasyconym ketonem.

Powyższy eksperyment wykazał, że długotrwałe pasażowanie jest niekorzystne. Zastąpiono go godzinną inkubacją hodowanej grzybni ksenobiotycznym induktorem.

W kolejnej serii biotransformacji określono aktywujący bądź inhibujący wpływ czterdziestu ośmiu związków o strukturach przedstawionych na rysunku 19, na przebieg bioredukcji estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (**2a**). Aktywność katalityczna większości z nich nie była wcześniej badana, pozostałe wybrano na podstawie danych literaturowych [18, 40, 46, 57, 58, 87, 159].

Próby podwyższenia nadmiaru enancjomerycznego przeprowadzono dla estru dietylowego 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (**2a**). Enancjoselektywność (-)-**2a** była wyliczona jako różnica produktu uzyskanego po biotransformacji z dodatkiem aktywatora (bądź inhibitora) w stosunku do próby kontrolnej. Efektywność bioredukcji wyliczono według metody Stampfera [159] i przedstawiono na rysunku 20.

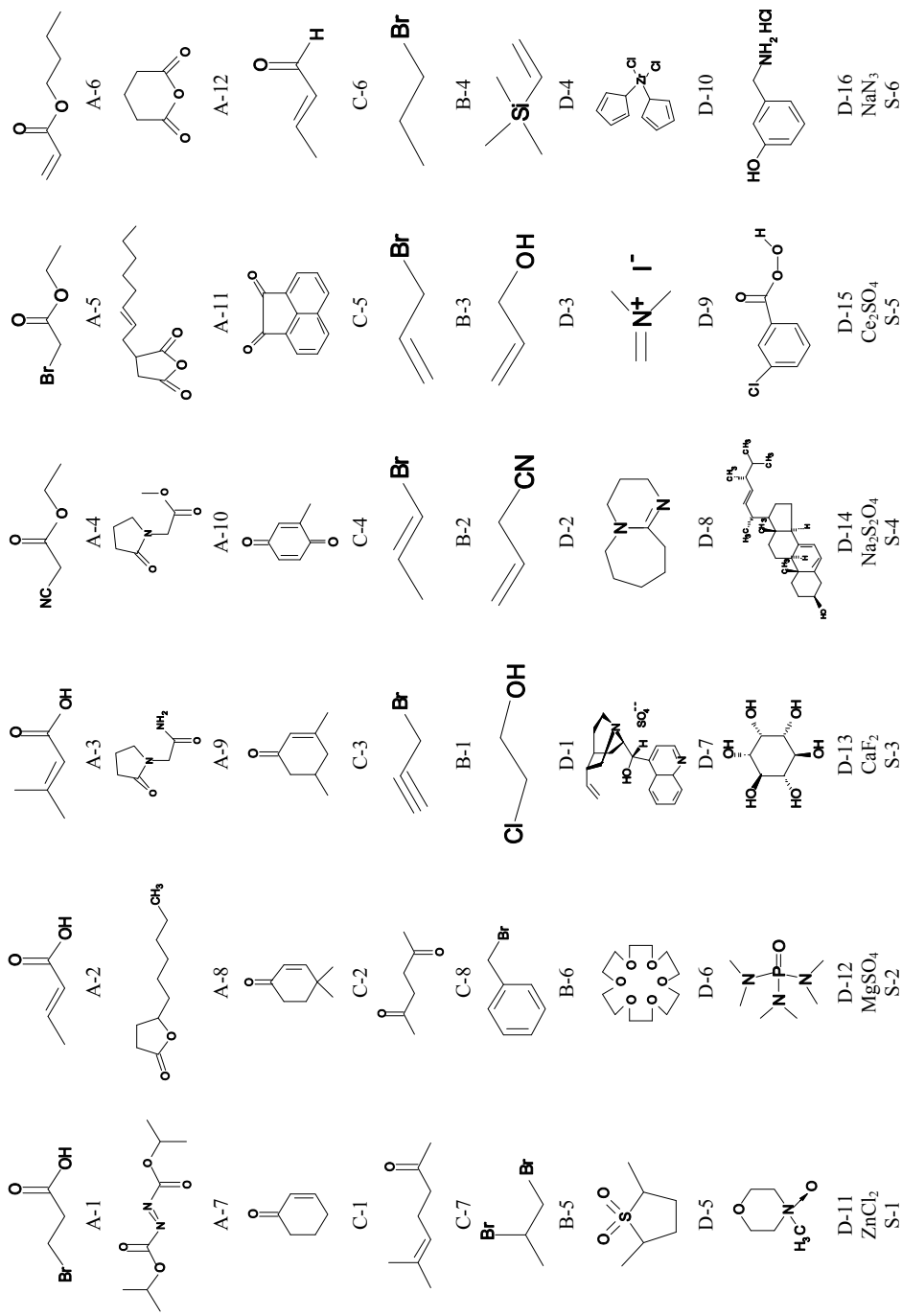
Wśród badanych związków użytych do inkubacji (rys. 19) można wyodrębnić następujące grupy: kwasy organiczne (akrylowy, propionowy, krotonowy) i ich pochodne, pięcio- lub sześcioczłonowe pierścieniowe związki z atomami tlenu i azotu jako heteroatomami (symbol A), związki z karbonylowym atomem węgla (symbol C) i bromopochodne (symbol B). Do kolejnej grupy aktywatorów/inhibitorów (symbol D) przypisano związki o różnorodnej budowie. Są tu między innymi naturalne związki, jak ergosterol (D-14), *myo*-inozytol (D-13), sole z organicznym fragmentem, jak sól Eschenmoshera (D-9), siarczan cynchoniny (D-7) czy dichlorocyrcocen (D-10). Ostatnią grupę stanowią nieorganiczne sole (symbol S).

Wszystkie przebadane nieorganiczne sole (symbol S) inhibowały aktywność i enancjoselektywność dehydrogenaz. Natomiast sole z organicznym ligandem: siarczan cynchoniny (D-7), sól Eschenmoshera (D-9) czy dichlorocyrcocen (D-10) powodowały wzrost efektywności biotransformacji.

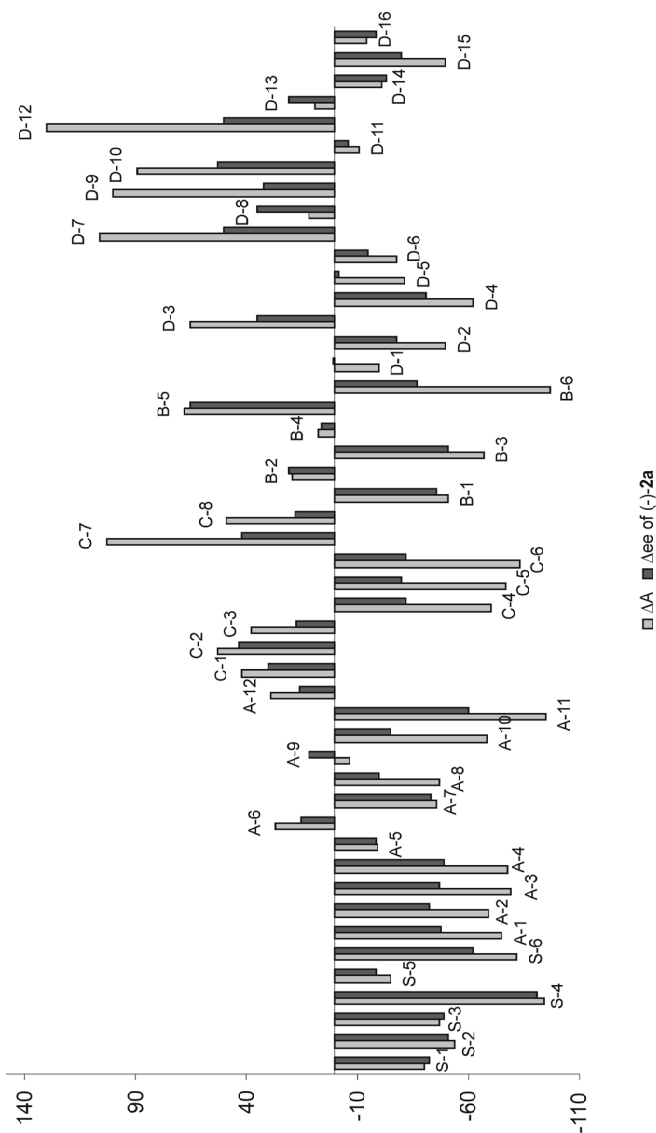
Oczekiwano, że związki z ugrupowaniem karbonylowym dodawane do biotransformacji będą aktywowały dehydrogenazy. Przebadano osiem związków o różnej strukturze, wśród nich cztery cykliczne ketony z  $\alpha,\beta$ -nienasyconym wiązaniem (C-1, C-2, C-3, C-4). Trzy pierwsze zwiększają efektywność biotransformacji o 40–50%, a nadmiar enancjomeryczny estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (-)-**2a** rośnie o 17–43%. Czwarty keton – toluchinon (C-4) inhibował redukcję.

Związek C-2 (4,4-dimetylocykloheks-2-en-1-on) znacznie zmieniał diastereoselektywność redukcji: uaktywniał działanie dehydrogenazy odpowiadającej za redukcję do *cis*-alkoholu, nie hamując redukcji do *trans*-pochodnej.

Wśród alifatycznych związków z ugrupowaniem karbonylowym zaobserwowano, że aldehyd krotonowy (C-6) z wiązaniem  $\alpha,\beta$ -nienasyconym hamuje bioredukcję, podczas gdy podobny związek z przesuniętym wiązaniem podwójnym w stosunku do ugrupowania karbonylowego w cząsteczce 6-metylohept-5-en-2-onu (C-7) zmienia efektywność bioredukcji z -83% dla ketonu C-6 na +103% w przypadku C-7, a  $\Delta_{ee}$  z -32% (C-6) do +42% (C-7).



Rys.19. Struktury chemiczne i symbole użytych induktorów [127]  
 Fig. 19. Chemical structures and symbols of the additives used [127]



$\Delta A = (A_A - A_C) / 100\% / A_C$ ,  $A_A$  – efektywność biotransformacji z induktorem;  $A_C$  – efektywność biotransformacji – kontrola; efektywność biotransformacji a  $A = a \cdot b \cdot h^{-1}$   $g^{-1}$  (a – ilość substratu [ $\mu mol$ ]; b – procent przereagowania/100; h – czas [godziny]; g – masa liofilizowanej grzybni [g])  
 $\Delta ee = (ee_A - ee_C) / 100\% / ee_C$ ,  $ee_A$  – nadmiar enancjomeryczny (-)-2a w transformacjach z induktorem,  $ee_C$  – nadmiar enancjomeryczny (-)-2a – kontrola,  
 $\Delta A = (A_A - A_C) / 100\% / A_C$ ,  $A_A$  – Efficiency of biotransformation with additives  $A_C$  – efficiency of biotransformation – control  
 Efficiency of biotransformation  $A = a \cdot b \cdot h^{-1}$  (a – amount of substrate [ $\mu mol$ ]; b – percent of conversion/100; h – time [h]; g – mass of lyophilized mycelium [g])  
 $\Delta ee = (ee_A - ee_C) / 100\% / ee_C$ ,  $ee_A$  – enantiomeric excess of (-)-2a in transformation with additives  $ee_C$  – enantiomeric excess of (-)-2a – control

Rys. 20. Różnice w efektywności bioredukcji przy użyciu *Absidia coerulea* AM 93 w obecności aktywatorów/inhibitorów [%] (w porównaniu z próbami kontrolnymi) podczas biotransformacji oksodiestru 2a [127]

Fig. 20. Differences in efficiency of biotransformation of the *Absidia coerulea* AM 93 in the presence of the activators/inhibitors [%] by biotransformation of oxodiester 2a [127]

Podobne zależności obserwowano przy indukcji bromopochodnymi (symbol B). Wraz ze zmianą położenia nienasyconego wiązania z pozycji  $\alpha,\beta$  na pozycję  $\beta,\gamma$  pojawia się inhibujące działanie tych ostatnich.  $\beta,\gamma$  – nienasycone związki B-1 i B-3 hamują efektywność bioredukcji, natomiast  $\alpha,\beta$  – nienasycony związek B-2 oraz nasycony B-4 powodują wzrost aktywności enzymu. Zaobserwowano, że wprowadzenie drugiego atomu bromu (B-5) do cząsteczki 1-bromopropanu (B-4) zwiększa efektywność bioredukcji o +50% i enancjoselektywność redukcji estru etylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego **2a** o +59%.

Użyte kwasy organiczne i ich pochodne, oprócz akrylanu *n*-butylu (A-6,  $\Delta A=27\%$ ,  $\Delta ee=15\%$ ) i bezwodnika kwasu glutaminowego (A-12,  $\Delta A=29\%$ ,  $\Delta ee=16\%$ ), hamują aktywność dehydrogenaz. Wykluczono wpływ pH na te właściwości.

Przebadane związki (rys. 19) pozwalają także wnioskować o wpływie podstawników w pozycji allilowej na efektywność bioredukcji. Alkohol allilowy (D-3) aktywuje działanie oksydoreduktaz ( $\Delta A=38\%$ ,  $\Delta ee=17\%$ ), natomiast zastąpienie grupy hydroksylowej CN (D-2) lub Br (B-3) hamuje bioredukcję.

Związki aromatyczne: acenaften-1,2-dion (C-5), bromek benzylu (B-6), kwas 3-chloroadbenzoesowy (D-15) wykazują działanie hamujące zarówno efektywność, jak i enancjoselektywność procesu.

Podsumowanie: spośród czterdziestu ośmiu przebadanych związków (rys. 19, 20) dziewiętnaście to silne inhibitory dehydrogenaz. Wyselekcjonowano pięć związków: C-7 ( $\Delta A=103\%$ ,  $\Delta ee=42\%$ ), D-7 ( $\Delta A=106\%$ ,  $\Delta ee=50\%$ ), D-9 ( $\Delta A=100\%$ ,  $\Delta ee=32\%$ ), D-10 ( $\Delta A=89\%$ ,  $\Delta ee=53\%$ ) oraz D-12 ( $\Delta A=130\%$ ,  $\Delta ee=50\%$ ), które znacznie podwyższają efektywność i enancjoselektywność badanego procesu bioredukcji, prowadzonego przez *Absidia coerulea* AM 93.

Jako aktywator do dalszych badań wybrano sól Eschenmoshera (D-9) ze względu na małą cząsteczkę, niepowodującą zanieczyszczeń produktów reakcji.

Na podstawie wyżej opisanych eksperymentów (rozdziały 3.1.2. i 3.1.3.) ustalono następujące parametry biotransformacji oksodiestru **2a**: temperatura 28°C, podłoże o składzie: 1% peptonu i 3% glukozy w dejonizowanej wodzie, pH=3,4–3,8. Do mikroorganizmu inkubowanego przez jedną godzinę solą Eschenmoshera (D-9) dodawano substrat w stężeniu 1 g/dm<sup>3</sup>.

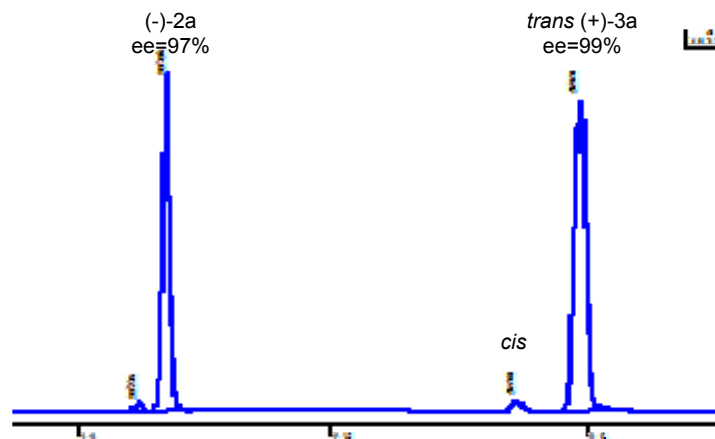
W ten sposób otrzymano enancjomery (-)-**2a**, (+)-**3a**, (-)-**2b** i (+)-**3b**.

Po 12 godzinach bioredukcji obserwowano prawie idealny rozdział mieszaniny racemicznej ( $\pm$ )-**2a** (GC) (rys. 21).

Za pomocą chromatografii kolumnowej otrzymano (-)-enancjomer estru etylowego kwasu 2-((1*S*)-3-oksocykloheksylo)malonowego ((-)-**2a**):  $[\alpha]_{589}^{20} = -3.4^\circ$  ( $c=4.25$ , CHCl<sub>3</sub>) ( $ee=98\%$ ) i (+)-izomer estru dietylowego kwasu 2-((1*R*,3*R*)-3-hydroksycykloheksylo)malonowego ((+)-**3a**):  $[\alpha]_{589}^{20} = +1.2^\circ$  ( $c=3.7$ , CHCl<sub>3</sub>) ( $ee=99\%$ ).

Dla substratu ( $\pm$ )-**2b** (estru etylowego kwasu 2-(2,2-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego) ustalono optymalne stężenie substratu 0,5 g/dm<sup>3</sup> (rys. 18) oraz czas trwania biotransformacji na 36 godzin.





Rys. 21. Chromatogram produktów preparatywnej redukcji ( $\pm$ )-**2a** przy użyciu *Absidia coerulea* AM 93

Fig. 21. Chromatogram of crude product mixture of preparative reduction of ( $\pm$ )-**2a** with *Absidia coerulea* AM 93

Otrzymano (-)-enancjomer estru etylowego kwasu 2-(2,2-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego ((-)-**2b**):  $[\alpha]_{589}^{20} = -12.1^\circ$  ( $c=2.15$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) ( $ee=93\%$ ) i (+)-izomer estru dietylowego kwasu 2-(5-hydroksy-2,2-dimetylocykloheksylo)malonowego ((+)-**3b**):  $[\alpha]_{589}^{20} = +10.3^\circ$  ( $c=2.7$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) ( $ee=95\%$ ).

#### 3.1.4. Dobór optymalnych warunków redukcji estrów dietylowych kwasów: 2-(3,3-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego (**2c**) oraz 2-(4,4-dimetylo-3-oksocykloheksylo)malonowego (**2d**) przy użyciu *Rhodotorula rubra* AM 4

Optimalizując warunki transformacji estrów etylowych kwasów: 2-(3,3-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego (**2c**) i 2-(2,2-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego (**2d**), określono wpływ podłoża i temperatury na przebieg transformacji oraz wyznaczono maksymalne stężenie substratu niepowodujące obniżenia enancjoselektywności procesu.

##### Wpływ podłoża

Szczep *Rhodotorula rubra* AM 4 hodowano na sześciu różnych podłożach (rozdział 2.2.3). Oznaczono stopień przereagowania racemicznych estrów dietylowych kwasów 2-(3,3-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego (**2c**) i 2-(4,4-dimetylo-3-oksocykloheksylo)malonowego (**2d**) oraz enancjoselektywność procesu biotransformacji. Dane umieszczono w tabeli 5.

Tabela 5  
Table 5

Wpływ składu podłoża hodowli na stopień przereagowania i nadmiar enancjomeryczny (-)-**2c**, **2d** i (+)-**3c**, **3d**  
Effect of growth medium composition on the degree of conversion and enantiomeric excesses of (-)-**2c**, **2d** and (+)-**3c**, **3d**

Lp. Entry	Podłoże* Growth medium*	Stopień przereagowania <b>2c</b> [%] Conversion of <b>2c</b>	ee <b>2c</b> [%] ee of <b>2c</b>	ee <i>trans</i> - <b>3c</b> [%] ee of <i>trans</i> - <b>3c</b>	Stopień przereagowania <b>2d</b> [%] Conversion of <b>2d</b>	ee <b>2d</b> [%] ee of <b>2d</b>	ee <i>trans</i> - <b>3d</b> [%] ee of <i>trans</i> - <b>3d</b>
1.	C	47	(-) 62	(+) 72	40	(-) 78	(+) 56
2.	E	50	(-) 95	(+) 89	61	(-) 98	(+) 90
3.	G	10	(-) 25	(+) 99	18	(-) 5	(+) 16
4.	M	68	(-) 5	(+) 5	62	(-) 5	(+) 76
5.	S	25	(-) 20	(+) 27	43	(-) 70	(+) 42
6.	P	49	(-) 98	(+) 90	62	(-) 90	(+) 92

\* rozdział 2.2.3. – part 2.2.3

Optymalnym podłożem, ze względu na stopień przereagowania substratów **2c** i **2d** oraz nadmiar enancjomeryczny substratu (**2c**, **2d**) i produktu (**3c**, **3d**), było podłoże E, czyli roztwór ekstraktu drożdżowego, skrobi, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>. Co najmniej 90-procentowe nadmiary enancjomeryczne obserwowano w hodowlach na podłożu P (roztwór glukozy i peptonu), podobnie jak dla substratu **2a** i **2b**.

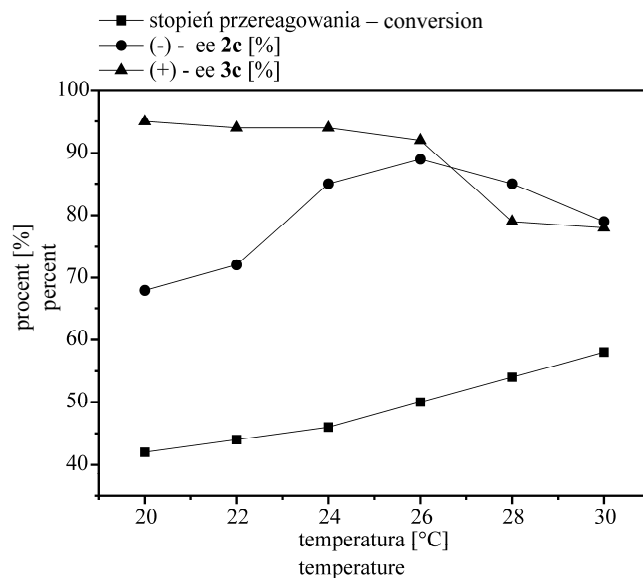
#### Wpływ temperatury

Przebieg bioredukcji estru etylowego kwasu 2-(3,3-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego (**2c**) badano w zakresie temperatur 20–32°C. Dane zobrazowano na rysunku 21. W transformacjach przy użyciu *Rhodotorula rubra* AM 4, podobnie jak w eksperymentach z udziałem *Absidia coerulea* AM 93, stopień przereagowania racemicznego substratu **2c** okazał się wprost proporcjonalny do temperatury (w przybliżeniu 1% przereagowania na 1°C) (rys. 22).

Ze wzrostem temperatury w zakresie 20–26°C zwiększa się stopień przereagowania i nadmiary enancjomeryczne (-)-**2c** oraz (+)-**3c**. Powyżej tej temperatury nadmiar enancjomeryczny (+)-*trans*-estru dietylowego kwasu 2-(3-hydroksycykloheksylo)malonowego (**3c**) zaczyna maleć na skutek redukcji (-)-enancjomeru estru **2c**. W temperaturze powyżej 26°C selektywność dehydrogenaz odpowiedzialnych za redukcję (+)-izomeru **2c** obniża się; aby ograniczyć ten proces należy prowadzić bioredukcję w temperaturze do 26°C.

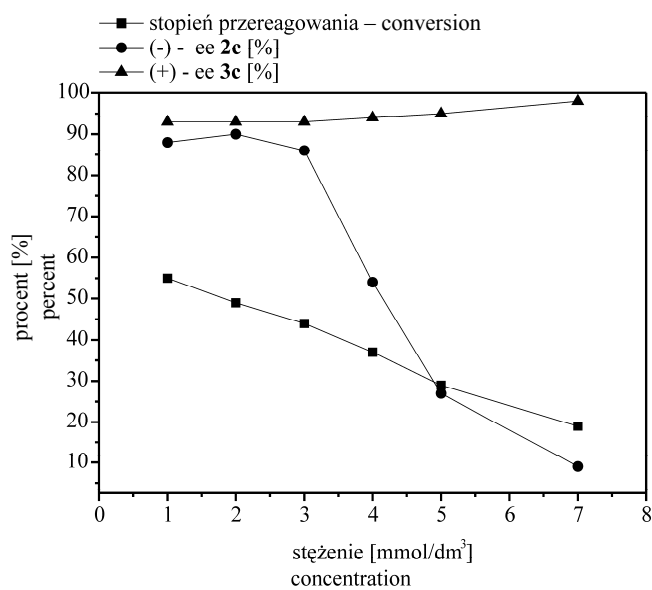
#### Wpływ stężenia substratu

W poniższym eksperymencie określono wpływ stężenia estru etylowego kwasu 2-(3,3-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego (**2c**) na stopień przereagowania i nadmiar enancjomeryczny produktów. Dane zestawiono na rysunku 23.



Rys. 22. Wpływ temperatury na stopień przereagowania substratu **2c** i nadmiary enancjomeryczne (-)-**2c**, (+)-**3c** w transformacjach przy użyciu *Rhodotorula rubra* AM 4

Fig. 22. Effect of temperature on substrate **2c** conversion and enantiomeric excesses of (-)-**2c** and (+)-**3c** in transformation by *Rhodotorula rubra* AM 4



Rys. 23. Wpływ stężenia substratu ( $\pm$ )-**2a** na stopień przereagowania i nadmiar enancjomeryczny (-)-**2c**, (+)-**3c** w transformacjach przy użyciu *Rhodotorula rubra* AM 4

Fig. 23. Effect of substrate concentration ( $\pm$ )-**2a** on conversion and enantiomeric excesses of (-)-**2c** and (+)-**3c** in transformation by *Rhodotorula rubra* AM 4

Maksymalnym stężeniem substratu nieobniżającym stopnia przereagowania czy enancjoselektywności okazało się stężenie 3 mmol/dm<sup>3</sup>, czyli około 60 mg substratu w 75 cm<sup>3</sup> hodowli *Rhodothorula rubra* AM 4.

Opierając się na wynikach wyżej opisanych eksperymentów, ustalono następujące parametry biotransformacji mieszanin racemicznych ( $\pm$ )-**2c**, ( $\pm$ )-**2d**: temperatura 26°C, podłoże o składzie: 4 g ekstraktu drożdżowego, 10 g skrobi, 0,1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O w 1000 cm<sup>3</sup> dejonizowanej wody. Do pięciodniowej hodowli *Rhodothorula rubra* AM 4 dodawano substrat w stężeniu 0,8 g/dm<sup>3</sup>. Po 26–28 godzinach bioredukcji obserwowano rozdział mieszaniny racemicznej **2c**, **2d** (GC). Po chromatograficznym rozdziale otrzymano (-)-enancjomer estru etylowego kwasu 2-(3,3-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego((-)-**2c**): [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>20</sup> = -13.0° (c=4.25, CHCl<sub>3</sub>) (ee=95%) i (+)-izomer estru dietylowego kwasu 2-(5-hydroksy-3,3-dimetylocykloheksylo)malonowego ((+)-**3c**): [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>20</sup> = +11.12° (c=3.7, CHCl<sub>3</sub>) (ee=92%) oraz (-)-enancjomer estru etylowego kwasu 2-(4,4-dimetylo-3-oksocykloheksylo)malonowego ((-)-**2d**): [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>20</sup> = -12.7° (c=1.2, CHCl<sub>3</sub>) (ee=92%) i (+)-enancjomer estru dietylowego kwasu 2-(3-hydroksy-4,4-dimetylocykloheksylo)malonowego ((+)-**3d**): [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>20</sup> = +9.7° (c=1.6, CHCl<sub>3</sub>) (ee=90%).

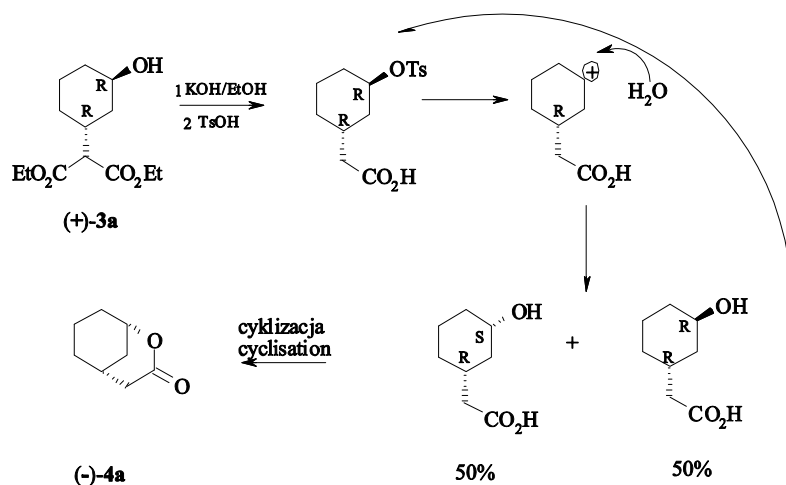
### 3.1.5. Laktonizacja (+)- i (-)-izomerów estru dietylowego kwasu 2-(3-hydroksycyklo-heksylo)malonowego (**3a**) oraz ich *gem*-dimetylowych pochodnych (**3b-d**)

Chemiczna redukcja estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (**2a**) solami borowodorków prowadzi do otrzymania diastereoizomerycznej mieszaniny *trans*- i *cis*-alkoholi (**3a**) w stosunku 9:1. Stwierdzono, że pod wpływem kwaśnych katalizatorów (15% BF<sub>3</sub> w eterze dietylowym lub THF : H<sub>2</sub>O : HClO<sub>4</sub> (pH=1), a także TsOHxH<sub>2</sub>O w benzenie lub toluenie) [170] racemiczny *cis*-ester dietylowy kwasu 2-(3-hydroksycykloheksylo)malonowego (*cis*-**3a**) cyklizuje do bicyklicznego laktonu: 2-ok-sabicyklo[3.3.1]nonan-3-onu ( $\pm$ )-**4a**. Pod wpływem tych samych warunków reakcji *trans*-diastereoizomer *trans*-**3a** nie ulega laktonizacji, a ogrzewanie mieszaniny reakcyjnej z kwasem *p*-toluenosulfonowym w benzenie prowadzi do otrzymania nienasyconych diestrów jako głównych produktów (80%). Laktonizacja **3a** wymaga bezpośredniego sąsiedztwa grupy diestrowej i hydroksylowej, co w przypadku izomeru *trans* jest sterycznie niemożliwe. Aby uzyskać oczekiwany lakton **4a**, najpierw zhydrolizowano *trans*-ester dietylowy kwasu 2-(3-hydroksycykloheksylo)malonowego (**3a**) do odpowiedniego monokwasu, a następnie przeprowadzono laktonizację (TsOHxH<sub>2</sub>O), otrzymując zaplanowany *cis*-lakton (**4a**).

Opracowaną dla mieszanin racemicznych metodę laktonizacji zastosowano do laktonizacji związków optycznie czynnych. Rysunek 24 wyjaśnia mechanizm reakcji [127].

W zhydrolizowanym diestrze pod wpływem kwasu *p*-toluenosulfonowego zachodzi inwersja konfiguracji na C-3. Pierwszym jej etapem jest formowanie się tosylanu, grupy łatwo odchodzącej. Powstały karbokation, atakowany przez cząsteczkę wody, jest substratem do powstania mieszaniny *cis*- i *trans*-diastereoizomerów kwasów 2-(3-hydroksycykloheksylo)propionowych. *Cis*-izomer zamyka się do *cis*-laktonu (-)-(1*S*,5*R*)-2-

-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-onu ((-)-**4a**) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>20</sup> = -18.6° (c=2.05, CHCl<sub>3</sub>), ee=95%, natomiast *trans*-hydroksykwas ponownie jest przekształcany w tosyłan, następnie w karbokation, mieszaninę diastereoizomerów *cis*- i *trans*-pochodnych kwasu propionowego (rys. 24).

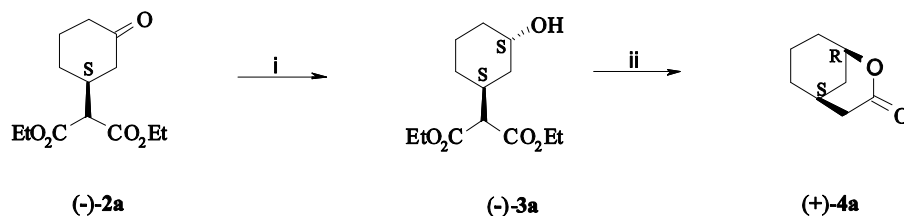


Rys. 24. Mechanizm laktonizacji (+)-izomeru estru dietylowego kwasu 2-(3-hydroksycykloheksylo) malonowego ((+)-**3a**)

Fig. 24. Mechanism of lactonization of (+)-isomer of diethyl 2-(3-hydroxycyclohexyl)malonate ((+)-**3a**)

Strukturę *cis*-laktonu ((-)-**4a**) potwierdzono analizą rentgenowską (rys. 28; rozdział 3.1.5.) [129].

Lakton o przeciwnym znaku skręcalności właściwej, (+)-(1*R*,5*S*)-2-oksabicyklo[3.3.1]nonano-3-on ((+)-**4a**), uzyskano z nieprzereagowanego w biotransformacji estru dietylowego kwasu (-)-2-(3-oksocykloheksylo)malonowego ((-)-**2a**), w takiej samej sekwencji reakcji, jak jego lewoskrętny izomer (-)-**4a**.



i-NaBH<sub>4</sub>, EtOH; ii-KOH/EtOH, TsOH/PhH

Rys. 25. Schemat syntezy (+)-(1*R*,5*S*)-2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-onu ((+)-**4a**)

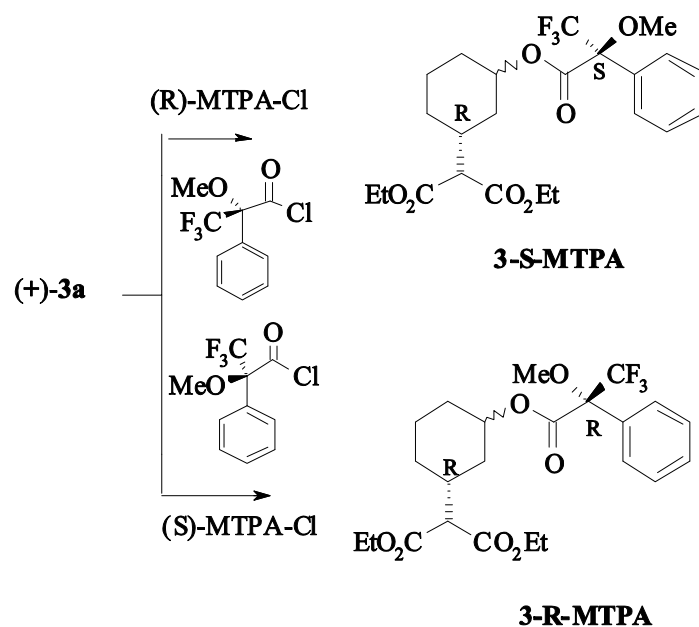
Fig. 25. Scheme of synthesis of (+)-(1*R*,5*S*)-2-oxabicyclo[3.3.1]nonan-3-one ((+)-**4a**)

Najpierw po redukcji uzyskano *trans*-hydroksydiester (-)-**3a** [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>20</sup> = -1.04° (c=3.11, CHCl<sub>3</sub>) z 95% ee, a następnie po cyklizacji otrzymano lakton (+)-(1*R*,5*S*)-2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-on ((+)-**4a**) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>20</sup> = +17.9° (c=1.5, CHCl<sub>3</sub>), ee=93% (rys. 25).

Laktonizację (+)- i (-)-izomerów *gem*-dimetylopo pochodnych estru dietylowego kwasu 2-(3-hydroksycykloheksylo)malonowego (**4b-d**) przeprowadzono w analogicznych sekwencjach reakcji. Strukturę potwierdzono danymi spektralnymi (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, IR, GC-MS), otrzymując związki o następujących skręcalnościach właściwych i nadmiarach enancjomerycznych: 7,7-dimetylo-2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-on ((+)-**4b**):  $[\alpha]_{589}^{20} = +28.3^\circ$  (c=0.5, CHCl<sub>3</sub>), ee=94%; ((-)-**4b**):  $[\alpha]_{589}^{20} = -27.9^\circ$  (c=0.5, CHCl<sub>3</sub>), ee=91%; 8,8-dimetylo-2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-on, ((+)-**4c**):  $[\alpha]_{589}^{20} = +31.0^\circ$  (c=1.5, CHCl<sub>3</sub>), ee=93%; ((-)-**4c**):  $[\alpha]_{589}^{20} = -26.9^\circ$  (c=0.6, CHCl<sub>3</sub>), ee=91%; 9,9-dimetylo-2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-on, ((+)-**4d**):  $[\alpha]_{589}^{20} = +26.3^\circ$  (c=1.4, CHCl<sub>3</sub>), ee=90%; ((-)-**4d**):  $[\alpha]_{589}^{20} = -24.8^\circ$  (c=0.7, CHCl<sub>3</sub>), ee=90%.

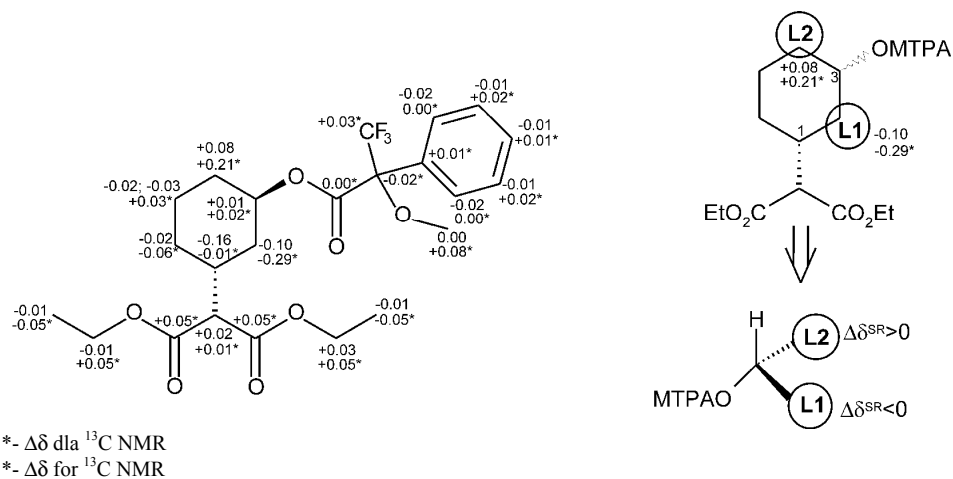
### 3.1.6. Ustalenie konfiguracji absolutnej otrzymanych enancjomerów

Konfigurację absolutną estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (**2a**) ustalono na podstawie znaku skręcalności właściwej podanego w literaturze [174, 176, 180 185]. Natomiast konfigurację absolutną atomu węgla z podstawnikiem hydroksylowym w cząsteczce estru dietylowego kwasu 2-(3-hydroksycykloheksylo)malonowego ((+)-**3a**) określono metodą z zastosowaniem estrów Moshera [36, 37, 153]. Diastereoizomeryczne estry otrzymano w reakcji grupy hydroksylowej z *R* i *S* enancjomerami chlorków kwasu Moshera (rys. 26) [127].



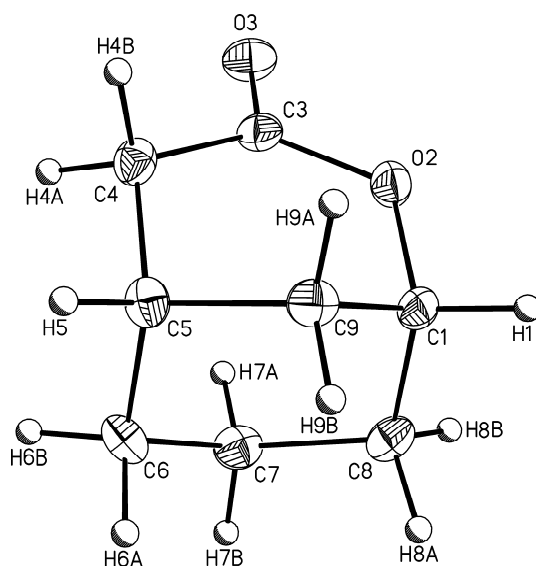
Rys. 26. Schemat syntezy estrów Moshera: **3-S-MTPA** oraz **3-R-MTPA**

Fig. 26. Schematic presentation of synthesis of Mosher's esters: **3-S-MTPA** and **3-R-MTPA**



Rys. 27. Wartości  $\Delta\delta$  dla **3a-S-MTPA** i **3a-R-MTPA** wyliczone na podstawie danych z widm  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR [127]

Fig. 27.  $\Delta\delta$  values for **3a-S-MTPA** and **3a-R-MTPA** calculated from  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra [127]



Rys. 28. Struktura krystaliczna (-)-(*1S,5R*)-2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-onu ((-)-**4a**)

Fig. 28. Crystal structure of (-)-(*1S,5R*)-2-oxabicyclo[3.3.1]nonan-3-one ((-)-**4a**)

Parę diastereizomerycznych estrów (**3a-S-MTPA**, **3a-R-MTPA**) analizowano przy użyciu  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, COSY, DEPT i HMQC z zastosowaniem  $\text{CDCl}_3$  jako rozpuszczalnika.

Konfiguracja absolutna atomu węgla C-3 alkoholu (+)-**3a** została wyznaczona poprzez interpretację znaku  $\Delta\delta^{\text{SR}}$ , czyli różnicę przesunięć chemicznych diastereoizomerycznych estrów Moshera uzyskaną na podstawie empirycznego modelu [153]. Powyższa metoda bazuje na anizotropowym efekcie między ugrupowaniem fenylowym chiralnego podstawnika MTPA i ligandami L1 i L2, czyli ( $^2\text{CH}_2$ ), ( $^6\text{CH}_2$ ). Mosher założył, że *R*- i *S*-MTPA, estry drugorzędowych alkoholi, istnieją w konformacji, w której  $\text{CH}(\text{OR})$ , grupa karbonylowa i  $\text{CF}_3$  ułożone są w jednej płaszczyźnie. Przy takim założeniu, jeżeli wartość różnicy przesunięć ( $\Delta\delta^{\text{SR}}$ ) wyznaczona z  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR dla *S* i *R* estru ligandu L1 ( $^2\text{CH}_2$ ) jest większa niż L2 ( $^4\text{CH}_2$ ), to konfiguracja atomu węgla C-3 połączonego z grupą hydroksylową (+)-**3a** jest *R* (rys. 27).

Konfigurację absolutną laktonu (+)-**4a** wyznaczono, bazując na powyższych danych i strukturze krystalicznej (rys. 28) [129]. Dane te pozwalają przypisać konfigurację absolutną laktonu (-)-**4a** jako (1*S*, 5*R*).

## 3.2. Zastosowanie mikrobiologicznego lub enzymatycznego rozdziału mieszaniny racemicznej epoksyestrów do otrzymania enancjomerów 9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu (**12a**) oraz jego *gem*-dimetylowych analogów (**12b-d**)

### 3.2.1. Synteza substratów i mechanizm laktonizacji

Optyczne izomery laktonu 9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu (**12a**) i jego *gem*-dimetylowych pochodnych **12b-d** zostały otrzymane z  $\alpha,\beta$ -nienasyconych ketonów **1a-d** w sześciostopowej chemoenzymatycznej syntezie (rys. 29).

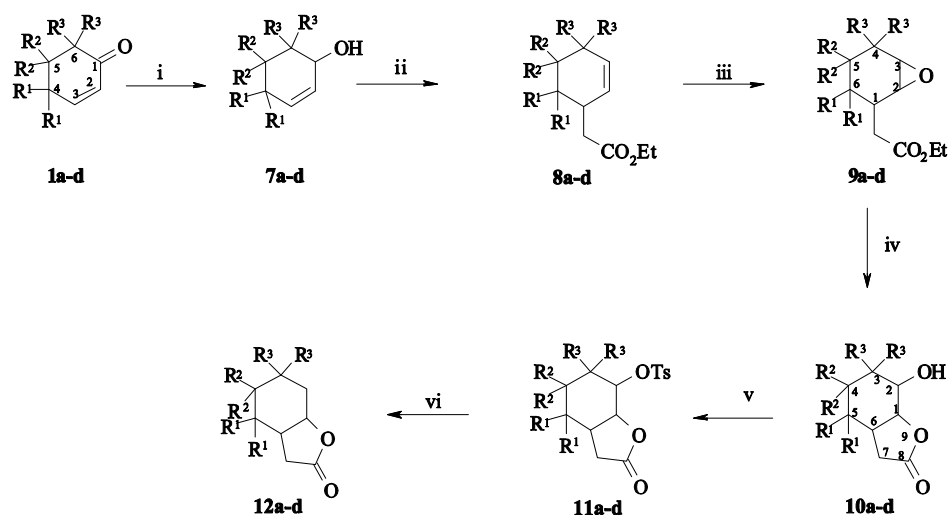
Ketony **1a-d** zostały zredukowane do odpowiednich alkoholi allilowych **7a-d** i poddane przegrupowaniu Claisena-Johsona. Uzyskane w ten sposób cykliczne  $\gamma,\delta$ -nienasycone estry **8a-d** utleniono kwasem *m*-chloronadbenzoesowym do odpowiednich *cis*- i *trans*-epoksyestrów **9a-d** [66, 131, 132, 177].

Uznano, że najdogodniejszą drogą syntezy pozwalającą uzyskać izomery optyczne **9a-d** będzie enzymatyczny lub mikrobiologiczny rozdział mieszaniny racemicznej epoksyestrów **9a-d**, prowadzący do otrzymania optycznie czynnych hydroksy- $\gamma$ -laktonów **10a-d** (rozdział 3.2.2.).

Laktony te estryfikowano kwasem *p*-toluenosulfonowym i zredukowano  $\text{NaB}(\text{CN})\text{H}_3$  w HMPA, otrzymując laktony **12a-d** z układem 9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu.

W celu sprawdzenia, jak zablokowanie grupy hydroksylowej laktonu **10a** wpłynie na aktywność fungistatyczną, przeprowadzono go w trzy estry: **14**, **15**, **16**, estryfikując grupę hydroksylową odpowiednio chlorkami kwasu octowego, masłowego oraz *p*-metoksyfenylooctowego (rys. 30).





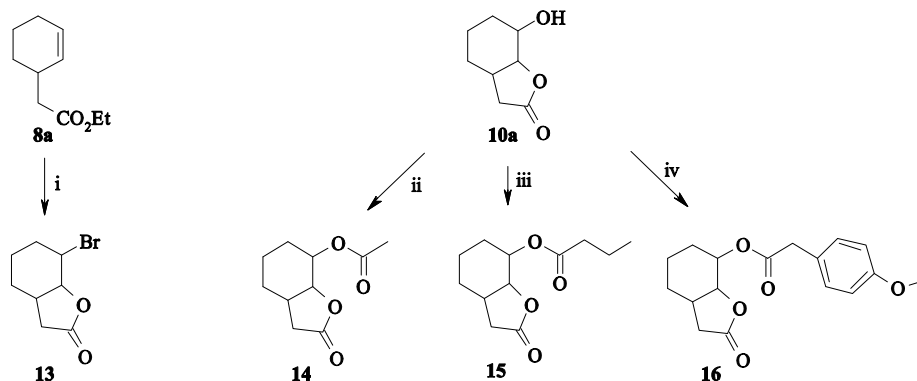
a)  $R^1=R^2=R^3=H$ , b)  $R^1=CH_3$ ,  $R^2=R^3=H$ , c)  $R^1=H$ ,  $R^2=CH_3$ ,  $R^3=H$ ; d)  $R^1=R^2=H$ ,  $R^3=CH_3$

i-LiAlH<sub>4</sub>, Et<sub>2</sub>O, ii-CH<sub>3</sub>C(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>COOH, iii-MCPBA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, iv-biokatalizator lub THF: HClO<sub>4</sub> : H<sub>2</sub>O, v-TsCl, py, vi-NaB(CN)H<sub>3</sub>, HMPA.

i-LiAlH<sub>4</sub>, Et<sub>2</sub>O, ii-CH<sub>3</sub>C(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>COOH, iii-MCPBA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, iv-biocatalyst or THF: HClO<sub>4</sub> : H<sub>2</sub>O, v-TsCl, py, vi-NaB(CN)H<sub>3</sub>, HMPA.

Rys. 29. Schemat syntezy nasyconych bicyklicznych- $\gamma$ -laktonów **12a-d**

Fig. 29. Scheme of synthesis of saturated bicyclic- $\gamma$ -lactones **12a-d**



i-THF : H<sub>2</sub>O, NBS, ii-CH<sub>3</sub>C(O)Cl, py, iii-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>C(O)Cl, py, iv-CH<sub>3</sub>OPhCH<sub>2</sub>C(O)Cl, py.

Rys. 30. Schemat syntezy laktonów **13-16**

Fig. 30. Scheme of synthesis of lactones **13-16**

Zsyntezowano również lakton 2-bromo-*cis*-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on (**13**), w którym w miejsce grupy hydroksylowej wbudowano większy objętościowo podstawnik w postaci atomu bromu. Lakton **13** otrzymano w reakcji  $\gamma,\delta$ -nienasyconego estru **8a** z N-bromoimidem kwasu bursztynowego.

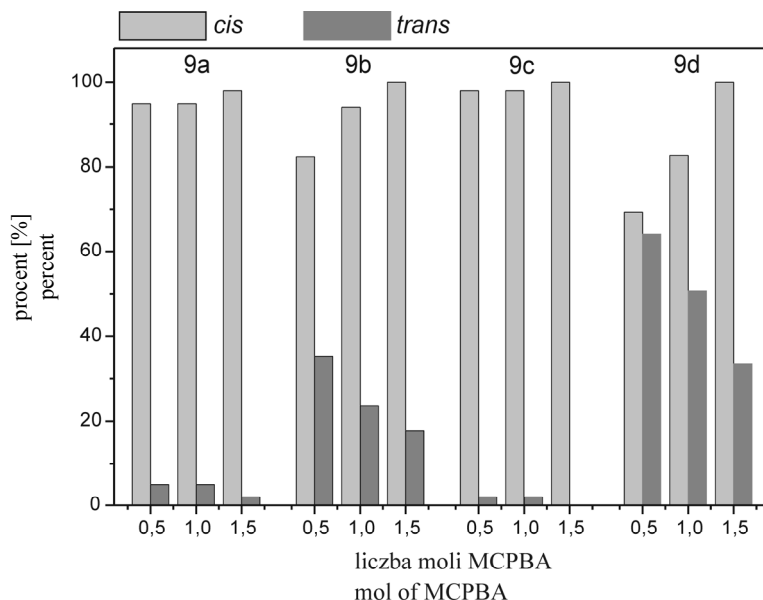
Przed przystąpieniem do biotransformacji (iv, rys. 29) wykonano szereg eksperymentów mających na celu poznanie budowy epoksyestrów **9a–d** i mechanizmu laktonizacji w środowisku wodnym.

Kluczowym etapem tej strategii były epoksydacja  $\gamma,\delta$ -nienasyconych estrów **8a–d**, a następnie cyklizacja do  $\delta$ -hydroksy- $\gamma$ -laktonów **10a–d**. Przeanalizowanie stereochemii na tym etapie było konieczne do określenia konfiguracji absolutnej i porównania mechanizmu katalizy chemicznej i enzymatycznej.

Substratami do syntezy epoksyestrów **9a–d** były otrzymane w wyniku przegrupowania Claisena-Johsona: *cis*- $\gamma,\delta$ -nienasycony ester etylowy kwasu 2-(cykloheks-2-enylo)octowego (**8a**) oraz jego analogi z ugrupowaniem *gem*-dimetylowym w pozycjach C-4 (**8b**), C-5 (**8c**) i C-6 (**8d**).

Ze względu na obecność grupy  $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$  przy C-1 utlenienie wiązania podwójnego kwasem *m*-chloronadbenzoesowym może prowadzić do powstania *cis*- i *trans*-epoksyestrów **9a–d**.

Z estrów **8a** i **8c** uzyskano *cis*-epoksyestry z bardzo wysoką diastereoselektywnością (*de*>90%). Dla pozostałych dwóch estrów (**8b**, **8d**) obserwowano powstanie mieszanin *cis*- i *trans*-izomerów (**9b**, **9d**).

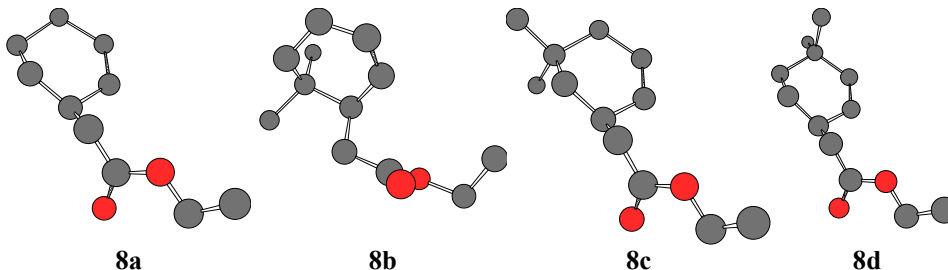


Rys. 31. Zależność składu procentowego izomerów *cis*- i *trans*-epoksyestrów **9a–d** od ilości moli MCPBA

Fig. 31. The dependence of composition of *cis*- and *trans*-isomers of epoxyesters **9a–d** on the amount of moles the MCPBA

Zaobserwowano, że stosunek izomerów *cis*- do *trans*-epoksydów **9b** i **9d** zależy od warunków prowadzonej syntezy, a szczególnie od użytej ilości moli substratu i kwasu *m*-chloronadbenzoesowego. Przy mniejszym stężeniu utleniacza powstawało więcej izomeru *trans* (rys. 31) **9b**, **9d**.

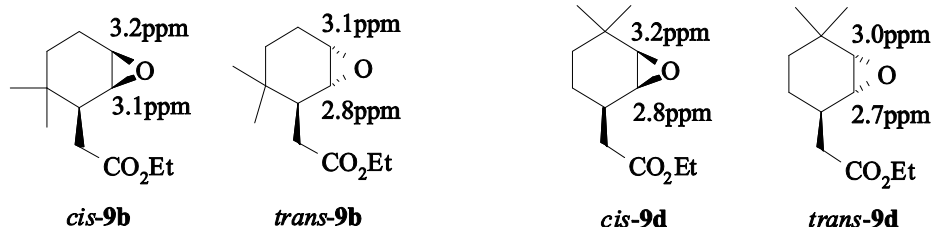
Próbując wyjaśnić przyczynę takiego przebiegu epoksydacji, wygenerowano w programie ChemOffice najbardziej prawdopodobne obrazy struktur estrów **8a–d** (rys. 32).



Rys. 32. Struktury estrów **8a–d** wygenerowane w programie ChemOffice  
Fig. 32. Structures of esters **8a–d** generated in programme ChemOffice

Uzyskane tą drogą obrazy struktur estrów etylowych kwasów 2-(cykloheks-2-enylo)octowego (**8a**) i 2-(5,5-dimetylocykloheks-2-enylo)octowego (**8c**) są prawie identyczne, a ugrupowanie *gem*-dimetylowe nie zmienia konformacji pierścienia. W przypadku tych estrów nie istnieją żadne przeszkody w termodynamicznie uprzywilejowanej *cis*-epoksydacji wiązania podwójnego. Inaczej jest w estrze etylowym kwasu 2-(4,4-dimetylocykloheks-2-enylo)octowego (**8d**), gdzie powstanie *cis*-izomeru może być zahamowane przez podstawniki przy pierwszym i czwartym atomie węgla. Natomiast obecność ugrupowania *gem*-dimetylowego przy szóstym atomie węgla w estrze etylowym kwasu 2-(6,6-dimetylocykloheks-2-enylo)octowego (**8b**) powoduje inną deformację pierścienia cykloheksanowego niż w przypadku struktur **8a–c**.

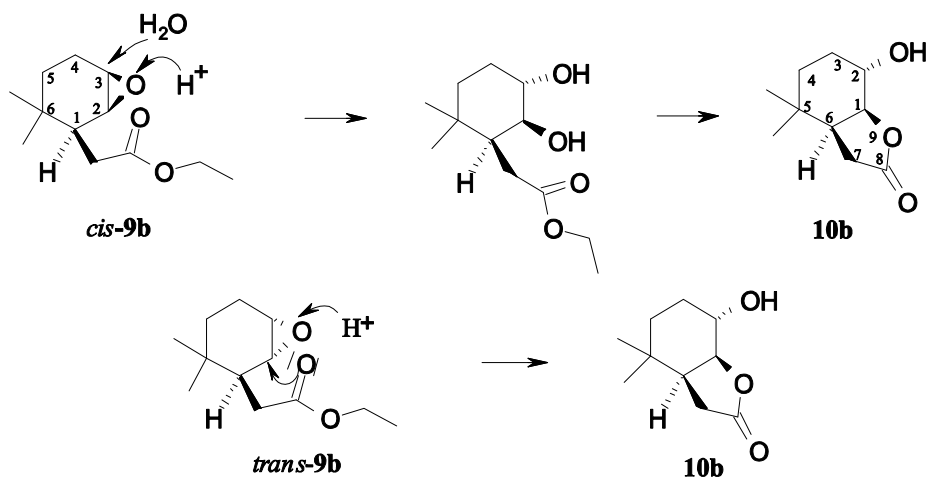
W celu udowodnienia struktury porównano widma  $^1\text{H}$  NMR *cis*- i *trans*-epoksyestrów **9b** i **9d**. Zaobserwowano, że sygnały pochodzące od protonów przy C-2 i C-3 dla *cis*-diastereoizomerów, w porównaniu z *trans*-diastereoizomerami, ze względu na odsłaniający efekt atomu tlenu grupy estrowej, znajdującej się po tej samej stronie pierścienia cykloheksanowego, są przesunięte w stronę niższych częstotliwości (rys. 33).



Rys. 33. Porównanie przesunięć chemicznych odczytanych z widma  $^1\text{H}$  NMR dla *cis*- i *trans*-izomerów epoksyestrów **9b**, **9d**

Fig. 33. Comparison of chemical shifts from  $^1\text{H}$  NMR spectrum for *cis*- and *trans*-isomers of epoxiesters **9b**, **9d**

Chemiczna laktonizacja *cis*- lub *trans*-epoksyestrów **9b** bądź **9d** prowadziła do powstania tego samego  $\delta$ -hydroksy-*cis*- $\gamma$ -laktonu **10b**. Taki przebieg cyklizacji wyjaśniono odmiennymi mechanizmami katalizy dla *cis*- i *trans*-epoksyestrów (rys. 34).



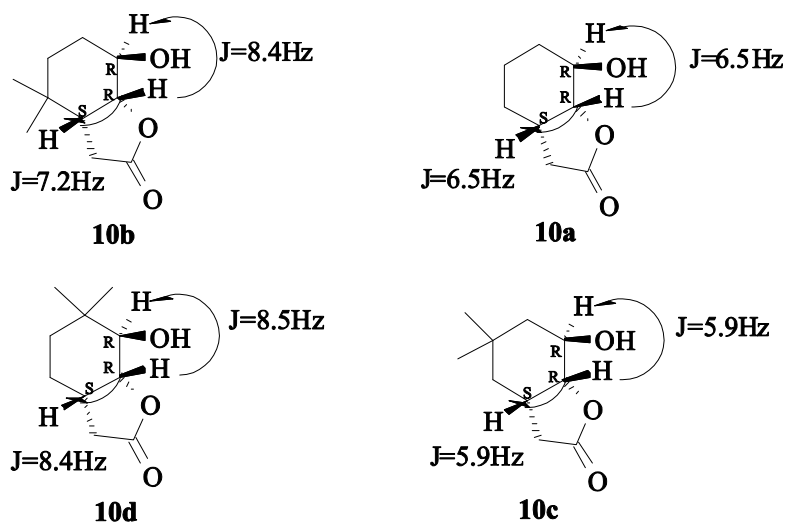
Rys. 34. Mechanizm laktonizacji *cis*- i *trans*-estru etylowego kwasu 2-(6,6-dimetylo-2,3-epoksy-cykloheksylo)octowego (**9b**)

Fig. 34. Mechanism of lactonization of *cis*- and *trans*- ethyl 2-(6,6-dimethyl-2,3-epoxycyclohexyl) acetate (**9b**)

Do tlenu pierścienia oksiranowego *cis*-epoksyestru **9b** przyłącza się proton katalizujący nukleofilowy atak cząsteczki wody na odsłonięty atom węgla C-3. Prowadzi to do inwersji konfiguracji absolutnej na trzecim atomie węgla, otwarcia pierścienia oksiranowego do diolu i powolnej laktonizacji. W przypadku *trans*-epoksyestru **9b** nie obserwowano powstawania diolu. Laktonizacja zachodziła szybciej i powstawał ten sam produkt, co przy cyklizacji *cis*-epoksyestru. Proponowany mechanizm laktonizacji *trans*-epoksyestru **9b** (rys. 34) zakłada nukleofilowy atak tlenu karbonylowego na drugi atom węgla C-2. Atak ten jest możliwy od strony przeciwnej do płaszczyzny pierścienia oksiranowego, co prowadzi do inwersji konfiguracji na C-2 i wewnątrzcząsteczkowej laktonizacji, a w konsekwencji do otrzymania hydroksylaktonu **10b**.

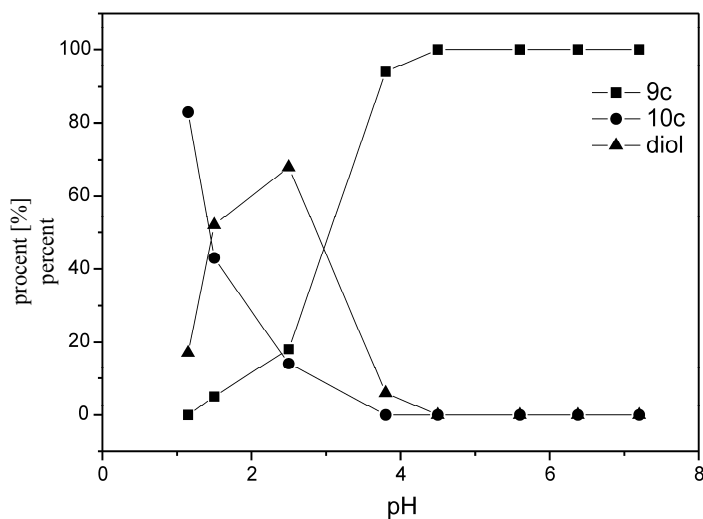
Taki przebieg laktonizacji (rys. 34) potwierdza analiza danych  $^1\text{H}$  NMR, na podstawie których wyznaczono konfiguracje względne w cząsteczkach hydroksylaktonów **10b**, **10d** (rys. 35) i porównano je z budową laktonów **10a** i **10c**.

Stała sprzężenia sąsiadujących aksjalnych protonów w sześcioczłonowym pierścieniu wynosi 6–14Hz w przeciwieństwie do stałej sprzężenia dla protonów w położeniu ekwatorialnym lub aksjalno-ekwatorialnym o wartości zaledwie 0–5Hz [157]. W otrzymanych hydroksylaktonach **10a–d** stałe sprzężenia między protonami przy C-1 i C-2 mieszczą się w zakresie 5,9–8,4Hz, co potwierdza ich diaksjalne położenie, a także ekwatorialne położenie grupy hydroksylowej.



Rys. 35. Porównanie stałych sprzężenia odczytanych z widm  $^1\text{H}$  NMR dla hydroksylaktonów **10a–d**

Fig. 35. Comparison of chemical shifts from  $^1\text{H}$  NMR spectrum for hydroxy lactones **10a–d**



Rys. 36. Skład procentowy (według GC) mieszaniny produktów kwasowej laktonizacji epoksyestu *cis*-**9c**

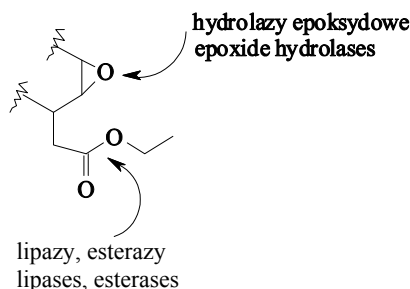
Fig. 36. Composition (in % according to GC) of the product mixtures of acidic lactonization of epoxyester *cis*-**9c**

W pięcioczłonowym pierścieniu, ze względu na brak możliwości rotacji, protony w położeniu *cis* i *trans* mają identyczną stałą sprzężenia między 5 a 10Hz [157].

Badając mechanizm laktonizacji *cis*-epoksyestru **9c**, zaobserwowano, że stopień laktonizacji, ilość powstającego diolu zależy od pH (rys. 36). Chemiczna laktonizacja zachodzi poniżej pH 4. Oznacza to, że w transformacjach mikrobiologicznych (pH=4–8) czy przy użyciu izolowanych enzymów (pH=7,2) nie zachodzą dodatkowe chemiczne procesy.

### 3.2.2. Dobór biokatalizatorów zdolnych do rozdziału mieszanin racemicznych epoksyestrów (9a–d)

Przy wyborze biokatalizatorów planowanych do laktonizacji epoksyestrów **9a–d** rozważano użycie dwóch grup enzymów: hydrolaz epoksydowych (enzymów wewnątrzkomórkowych katalizujących enancjoselektywne otwarcie epoksyestrów) oraz hydrolaz (preparatów enzymatycznych lipaz, esteraz) [20, 24, 100] katalizujących hydrolizę grupy estrowej, a także wewnątrzcząsteczkową estryfikację [1, 88] (rys. 37).



Rys. 37. Enzymatyczna kataliza przy udziale hydrolaz epoksydowych lub lipaz i esteraz  
Fig. 37. Enzymatic catalysis by epoxide hydrolases or lipases and esterases

W badaniach z zastosowaniem hydrolaz epoksydowych użyto szczepów dwóch gatunków mikroorganizmów, wyselekcjonowanych w trakcie badań skринingowych nad laktonizacją epoksyestrów cyklicznych [132] i alifatycznych [131,133] *Fusarium avenaceum* AM 11, *F. avenaceum* AM 12, pięciu szczepów *F. culmorum*: AM 7, AM 9, AM 10, AM 196, AM 282, *F. equiseti* AM 15, *F. equiseti* AM 22, *F. oxysporum* AM 13, *F. oxysporum* AM 21, *F. scripi* AM 199, *F. semitectum* AM 20, *F. solani* AM 203, *F. tricinctum* AM 16 oraz trzech szczepów drożdży: *Rhodotorula rubra* AM 4, *R. rubra* AM 82, *R. glutinis* AM 242.

W badaniach nad zastosowaniem hydrolaz użyto lipaz izolowanych z: *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus niveus*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida cylindracea*, *Candida antarctica*, *Candida antarctica* (enzym rekombinowany z *Aspergillus niger*), *Mucor javanicus*, *Mucor miehei*, trzustki wieprzowej, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus*, *Rhizomucor miehei* (enzym rekombinowany z *Aspergillus oryzae*), lipoproteinowych lipaz z: *Pseudomonas sp.*, *Chromobacterium viscosum* oraz esteraz izolowanych z wątroby końskiej, *Thermoanaerobium Brockii* i *Mucor miehei*.

Biotransformacje przy użyciu mikroorganizmów prowadzono według opracowanych wcześniej metod [130–132]. Warunki biotransformacji przy użyciu enzymów opisano w rozdziale 3.2.2.1.

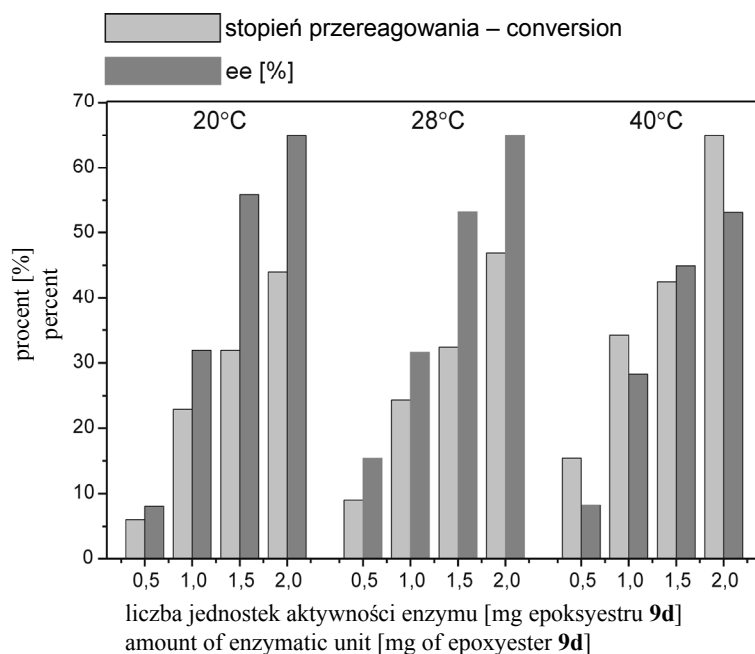
### 3.2.2.1. Dobór optymalnych warunków transformacji epoksyestru 9d przy użyciu preparatów enzymatycznych

Dobór optymalnych warunków transformacji przy użyciu lipaz obejmował wpływ rozpuszczalnika, rodzaju buforu, liczby użytych jednostek aktywności enzymu, temperatury.

Zaobserwowano, że dodatek acetonu jako rozpuszczalnika substratu ma wpływ na enancjoselektywność procesu: bądź nieznacznie aktywujący, bądź (jak w przypadku lipazy *Candida antarctica*) inhibujący, dlatego zrezygnowano z użycia rozpuszczalnika.

We wstępnych badaniach enzymy rozpuszczano lub zawieszano w buforze fosforanowym (pH=7,2) i trisie (pH=8,3). Nie zaobserwowano znaczących różnic w stopniu przereagowania substratu oraz nadmiarze enancjomerycznym produktów. Ponieważ w wyższym pH mogą zachodzić dodatkowe niepożądane procesy chemiczne, wybrano neutralny bufor fosforanowy.

Przeprowadzono serie eksperymentów, w których transformowano *cis*-ester etylowy kwasu 2-(4,4-dimetylo-2,3-epoksycykloheksylo)octowego (**9d**) różnymi ilościami jednostek aktywności lipazy izolowanej z *Candida antarctica*. Badania prowadzono w trzech różnych temperaturach (rys. 38).



Rys. 38. Wpływ liczby jednostek aktywności lipazy izolowanej z *C. antarctica* na stopień przereagowania i nadmiar enancjomeryczny estru etylowego kwasu 2-(4,4-dimetylo-*cis*-2,3-epoksycykloheksylo)octowego **9d**

Fig. 38. Effect of amount of enzymatic unit of lipase isolated from *C. antarctica* for conversion and enantiomeric excesses of ethyl 2-(4,4-dimethyl-*cis*-2,3-epoxycyclohexyl)acetate **9d**

Stopień przereagowania epoksyestru **9d** okazał się wprost proporcjonalny do ilości enzymu i temperatury. Nadmiar enancjomeryczny nieprzereagowanego *cis*-epoksyestru **9d** był najwyższy w przedziale temperatur 20–28°C. W temperaturze 40°C, mimo wzrostu stopnia przereagowania, malał nadmiar enancjomeryczny nawet o 10%.

### 3.2.2.2. Biotransformacje *cis*- i *trans*-estrów etylowych kwasów: 2-(2,3-epoksycykloheksylo)octowego (**9a**), 2-(6,6-dimetylo-2,3-epoksycykloheksylo)octowego (**9b**), 2-(5,5-dimetylo-2,3-epoksycykloheksylo)octowego (**9c**) oraz 2-(4,4-dimetylo-2,3-epoksycykloheksylo)octowego (**9d**)

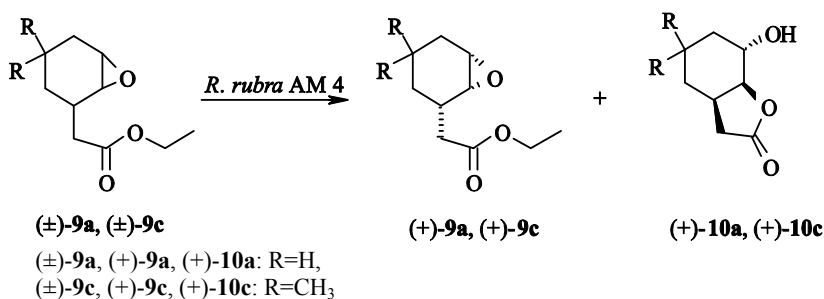
Analizowane w rozdziale 3.2.1. różnice w budowie epoksyestrów **9a–d** oraz dwa odmienne mechanizmy ich laktonizacji (rys. 34) znalazły odzwierciedlenie w przebiegu prowadzonych biotransformacji.

Zaobserwowano jednak pewne podobieństwa w biotransformacjach epoksyestrów: *cis*-**9a**, *cis*-**9c** (rys. 39, tab. 6, 7) i *cis*-**9b**, *cis*-**9d** (rys. 41, 42, tab. 8, 9). Odmienne przebiegała transformacja epoksyestrów *trans*-**9b**, *trans*-**9d** (rys. 43, 44, tab. 10, 11). W tabelach 6-11 opisano tylko biotransformacje o enancjoselektywnym przebiegu.

Wszystkie wymienione powyżej mikroorganizmy i preparaty enzymatyczne (rozdział 3.2.2) transformowały *cis*-epoksyestery **9a–d** do mieszanin produktów, w których identyfikowano nieprzereagowany substrat, powstający z niego diol, produkty hydrolizy oraz hydroksy- $\gamma$ -laktony **10a–d**.

Enancjoselektywność rozdzielanych mieszanin racemicznych *cis*-epoksyestrów **9a**, **9c** była niska, a wartości nadmiarów enancjomerycznych izolowanych produktów były często mniejsze niż 10%. Zastosowanie innych biokatalizatorów (trzech szczepów *Fusarium*, drożdży *Rhodotorula rubra* AM 4 i lipazy z *Candida antarctica*, rekombinowaną z *Aspergillus niger*) dało obiecujące rezultaty w transformacjach estru etylowego kwasu 2-(2,3-epoksycykloheksylo)octowego **9a** (rys. 39, tab. 6).

Podobny przebieg miały transformacje estru etylowego kwasu 2-(5,5-dimetylo-2,3-epoksycykloheksylo)octowego **9c**. Wyselekcjonowane dwa szczepy *Fusarium* i *Rhodotorula rubra* AM 4 transformowały *cis*-epoksyester **9c** z wysoką enancjoselektywnością (tab. 7, rys. 40).



Rys. 39. Mikrobiologiczna transformacja *cis*-estru etylowego kwasu 2-(2,3-epoksycykloheksylo)octowego (*cis*-( $\pm$ )-**9a**) i *cis*-estru etylowego kwasu 2-(5,5-dimetylo-2,3-epoksycykloheksylo)octowego (*cis*-( $\pm$ )-**9c**) przy użyciu *Rhodotorula rubra* AM 4

Fig. 39. Microbial transformation of *cis*-ethyl 2-(2,3-epoxycyclohexyl)acetate (( $\pm$ )-**9b**) and *cis*-ethyl 2-(5,5-dimethyl-2,3-epoxycyclohexyl)acetate (( $\pm$ )-**9c**) by *Rhodotorula rubra* AM 4



Tabela 6  
Table 6

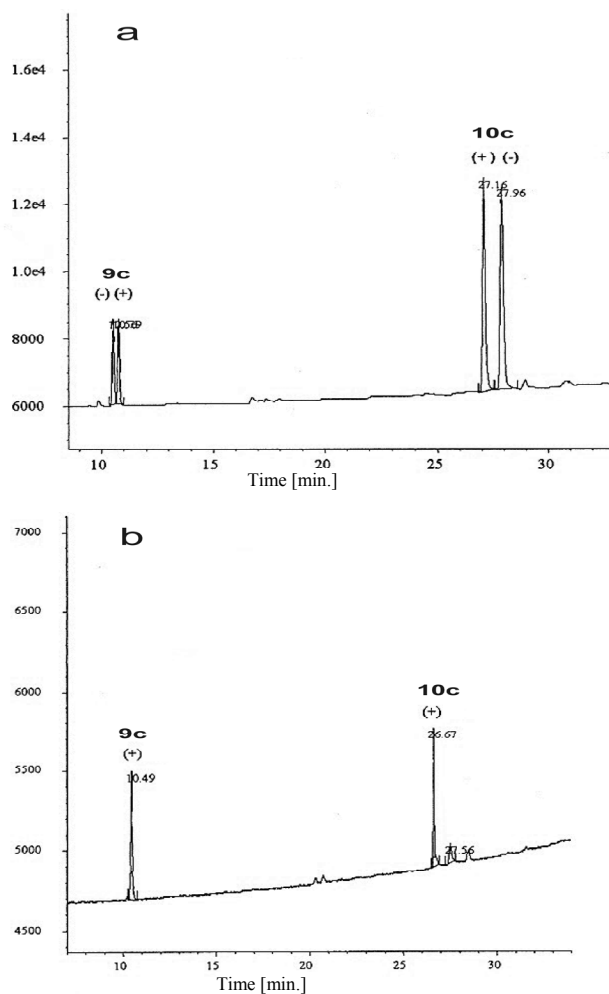
Skład mieszaniny produktów enzymatycznej lub mikrobiologicznej transformacji racemicznego *cis*-estru etylowego kwasu 2-(2,3-epoksycykloheksylo)octowego (*cis*-(±)-**9a**)  
Compositions of the product mixtures of enzymatic and microbial transformation of racemic *cis*-ethyl 2-(2,3-epoxycyclohexyl)acetate (*cis*-(±)-**9a**)

Lp. Entry	Biokatalizator Biocatalyst	Czas [godziny] Time [h]	Stopień przereagowania <i>cis</i> -(±)- <b>9a</b> [%] Conversion of <i>cis</i> -(±)- <b>9a</b>	ee <i>cis</i> - <b>9a</b> [%] ee of <i>cis</i> - <b>9a</b>	ee <b>10a</b> [%] ee of <b>10a</b>
1.	<i>Fusarium equiseti</i> AM 22	56	50	(+) 89	(+) 76
		11	71	(+) 99	(+) 82
2.	<i>Fusarium scripi</i> AM 199a	56	44	(+) 68	(+) 99
			67	(+) 81	(+) 61
3.	<i>Fusarium solani</i> AM 203	7d	49	(+) 64	(+) 86
		11	70	(+) 78	(+) 73
4.	<i>Rhodotorula rubra</i> AM 4	4	52	(+) 86	(+) 80
		11	67	(+) 91	(+) 69
5.	Lipaza z <i>Candida antarctica</i>	56	59	(+) 99	(+) 67
		11	80	(+) 99	(+) 46

Tabela 7  
Table 7

Skład mieszaniny produktów enzymatycznej lub mikrobiologicznej transformacji racemicznego *cis*-estru etylowego kwasu 2-(5,5-dimetylo-2,3-epoksycykloheksylo)octowego (*cis*-(±)-**9c**)  
Compositions of the product mixtures of enzymatic and microbial transformation of racemic *cis*-ethyl 2-(5,5-dimethyl-2,3-epoxycyclohexyl)acetate (*cis*-(±)-**9c**)

Lp. Entry	Biokatalizator Biocatalyst	Czas [godziny] Time [h]	Stopień przereagowania <i>cis</i> -(±)- <b>9c</b> [%] Conversion of <i>cis</i> -(±)- <b>9c</b>	ee <i>cis</i> - <b>9c</b> [%] ee of <i>cis</i> - <b>9c</b>	ee <b>10c</b> [%] ee of <b>10c</b>
1.	<i>Fusarium avanaceum</i> AM 11	3	31	(+) 56	(+) 65
		4	48	(+) 46	(+) 51
2.	<i>Fusarium semitectum</i> AM 20	3	18	(-) 20	(-) 36
		11	81	(-) 99	(-) 22
3.	<i>Rhodotorula rubra</i> AM 4	3	38	(+) 99	(+) 78
		4	45	(+) 99	(+) 62
4.	Lipoproteina z <i>Chromobacterium viscosum</i>	2	23	(-) 15	(+) 99
		11	48	(-) 67	(+) 81
5.	Lipoproteina z <i>Pseudomonas sp.</i>	2	39	(-) 12	(+) 39
		11	72	(-) 65	(+) 31



Rys. 40. Chromatogramy: (a) racemiczne mieszaniny epoksyestru **9c** i laktonu **10c**, (b) mieszanina produktów ekstrakcji preparatywnej laktonizacji przy użyciu *R. rubra* AM 4 [132]  
 Fig. 40. Chromatograms: (a) racemic mixture of epoxy ester **9c** and racemic hydroxy lactone **10c**, (b) crude product mixture of preparative lactonization of **9c** with *R. rubra* AM 4 [132]

Brak enancjoselektywności w transformacjach przy użyciu lipaz, esteraz, choć przy zadawalającym stopniu przereagowania, związany jest z umiarkowaną enancjoselektywnością indukcji w trakcie hydrolizy. Centrum stereogeniczne jest w pozycji  $\beta$  w stosunku do miejsca katalizy, a proces wewnętrznej estyfikacji nie jest katalizowany. Oba *cis*-epoksydy **9a**, **9c** mają bardzo zbliżoną konformację pierścienia cykloheksanowego. Dla obu dobrano warunki transformacji przy udziale mikroorganizmów.

Biotransformację preparatywną estru etylowego kwasu 2-(2,3-epoksycykloheksylo)octowego (**9a**) przeprowadzono przy użyciu *Rhodotorula rubra* AM 4, uzyskując (+)-enanjomer hydroksylaktonu **10a** o nadmiarze enancjomerycznym 78%,  $[\alpha]_{589}^{20} = +13.3^\circ$  ( $c=1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) i nieprzereagowany substrat o nadmiarze enancjomerycznym 65%,  $[\alpha]_{589}^{20} = +8.1^\circ$  ( $c=0.7$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

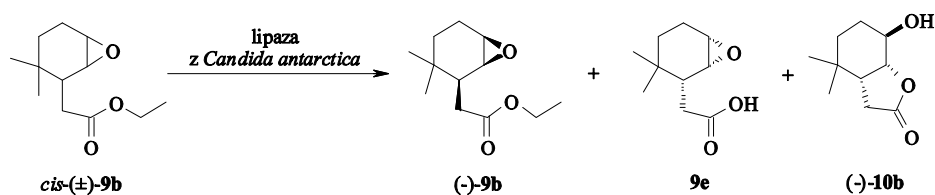
Ten sam szczep drożdży *R. rubra* AM 4 zastosowano w biotransformacji racemicznego epoksyestru **9c**, otrzymując (+)-izomer 2-hydroksy-4,4-dimetylo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu (**10c**) o nadmiarze enancjomerycznym 92%,  $[\alpha]_{589}^{20} = +15.9^\circ$  ( $c=0.9$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) i nieprzereagowany substrat **9c** o nadmiarze enancjomerycznym 95%,  $[\alpha]_{589}^{20} = +34.9^\circ$  ( $c=0.6$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

Biotransformacje izomerów *cis*-estrów etylowych kwasów: 2-(6,6-dimetylo-2,3-epoksycykloheksylo)octowego (**9b**) (rys. 41, tab. 8) oraz 2-(4,4-dimetylo-2,3-epoksycykloheksylo)octowego (**9d**) (rys. 42, tab. 9) miały bardziej enancjoselektywny przebieg niż izomery **9a**, **9c**, głównie dzięki enzymom izolowanym z *Candida antarctica*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizomucor miehei*, które w przypadku tych epoksyestrów enancjoselektywnie hydrolizowały grupę estrową, a nawet katalizowały wewnątrzcząsteczkową cyklizację.

Niedogodnością przedstawionych powyżej transformacji *cis*-epoksyestrów **9b**, **9d** były właściwości otrzymywanych produktów hydrolizy. Epoksykwasy są związkami kłopotliwymi nie tylko do izolowania, ale ze względu na ich polarność trudno je oczyścić na drodze chromatografii kolumnowej z użyciem silikazelu. Zrezygnowano tu z biotransformacji na skalę preparatywną, a oczekiwane enancjomeryczne laktony **10b**, **10d** z powodzeniem uzyskano w kolejnych transformacjach, gdzie substratami były *trans*-epoksyestry **9b**, **9d**.

Biotransformacje *trans*-estrów etylowych kwasów 2-(6,6-dimetylo-2,3-epoksycykloheksylo)octowego (**9b**) (rys. 43, tab. 10) oraz 2-(4,4-dimetylo-2,3-epoksycykloheksylo)octowego (**9d**) (rys. 44, tab. 11) miały odmienny przebieg niż powyżej opisany dla *cis*-epoksyestrów **9a–d**.

W cząsteczkach *trans*-epoksyestrów grupa estrowa i ugrupowanie epoksydowe nie leżą w jednej płaszczyźnie, co ułatwia atak enzymów. Mechanizm laktonizacji *trans*-epoksyestrów jest prawdopodobnie identyczny jak przy chemicznej laktonizacji, ponieważ w trakcie biokatalizy nie obserwowano powstawania dioli. W epoksyestrach **9b**, **9d** ugrupowanie *gem*-dimetylowe przy czwartym lub szóstym atomie węgla stanowi zawadę przestrzenną deformującą pierścień cykloheksanu, dzięki czemu biotransformacje estru etylowego kwasu 2-(4,4-dimetylo-2,3-epoksycykloheksylo)octowego (**9d**) mają wysoce enancjoselektywny przebieg. W biotransformacji preparatywnej wykorzystano lipazę izolowaną z trzustki wieprzowej, otrzymując: (+)-enanjomer laktonu **10d** o skręcalności właściwej  $[\alpha]_{589}^{20} = +14.1^\circ$  ( $c=1.2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) i nadmiarze enancjomerycznym 84% oraz nieprzereagowany (-)-enanjomer - *trans*-epoksyester **9d** o nadmiarze enancjomerycznym 68% i  $[\alpha]_{589}^{20} = -11.3^\circ$  ( $c=0.52$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).



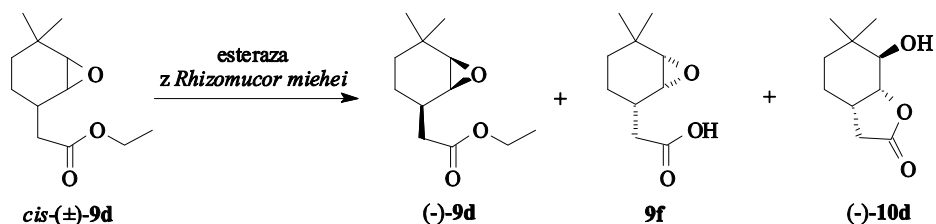
Rys. 41. Transformacja *cis*-estru etylowego kwasu 2-(6,6-dimetylo-2,3-epoksykloheksylo)octowego ((±)-**9b**) przy użyciu lipazy z *Candida antarctica*

Fig. 41. Transformation of *cis*-ethyl 2-(6,6-dimethyl-2,3-epoxycyclohexyl)acetate ((±)-**9b**) by lipase from *Candida antarctica*

Tabela 8  
Table 8

Skład mieszaniny produktów enzymatycznej lub mikrobiologicznej transformacji racemicznego *cis*-estru etylowego kwasu 2-(6,6-dimetylo-2,3-epoksykloheksylo)octowego *cis*-(±)-**9b**  
Compositions of the product mixtures of enzymatic and microbial transformation of racemic *cis*-ethyl 2-(6,6-dimethyl-2,3-epoxycyclohexyl)acetate (*cis*-(±)-**9b**)

Lp. Entry	Biokatalizator Biocatalyst	Czas [dni] Time [days]	Stopień przereagowania <i>cis</i> -(±)- <b>9b</b> [%] Conversion of <i>cis</i> -(±)- <b>9b</b>	ee <i>cis</i> - <b>9b</b> [%] ee of <i>cis</i> - <b>9b</b>	<b>9e</b> [%] <b>9e</b>	ee <b>10b</b> [%] ee of <b>10b</b>
1.	<i>Fusarium</i> <i>avenaceum</i> AM 11	2	37	(+) 39	37	0
		4	50	(+) 54	50	0
2.	<i>Fusarium</i> <i>avenaceum</i> AM 12	6	25	(+) 84	25	0
		6	48	(+) 52	48	0
3.	<i>Fusarium</i> <i>equiseti</i> AM 15	4	58	(+) 62	57	0
		4	73	(+) 89	73	0
4.	<i>Fusarium</i> <i>oxyспорum</i> AM 13	4	56	(+) 46	56	0
		6	65	(+) 60	65	0
5.	Lipaza z <i>Aspergillus</i> <i>oryzae</i>	4	11	(-) 34	11	0
		11	29	(-) 40	29	0
6.	Lipaza z <i>Candida</i> <i>antarctica</i>	7	50	(-) 20	0	(-) 20
		7	76	(-) 67	0	(-) 15
7.	Lipaza z <i>Mucor</i> <i>javanicus</i>	4	11	(-) 12	0	(-) 99
		11	32	(-) 40	0	(-) 99



Rys. 42. Transformacja *cis*-estru etylowego kwasu 2-(4,4-dimetylo-2,3-epoksycykloheksylo)octowego ((±)-**9d**) przy użyciu lipazy z *Rhizomucor miehei*

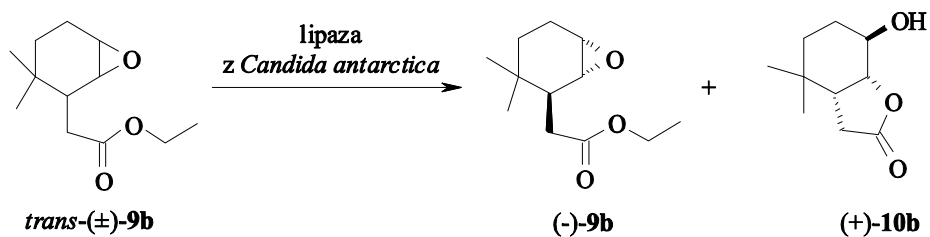
Fig. 42. Transformation of *cis*-ethyl 2-(4,4-dimethyl-2,3-epoxycyclohexyl)acetate ((±)-**9d**) by lipase from *Rhizomucor miehei*

Tabela 9

Table 9

Skład mieszaniny produktów enzymatycznej lub mikrobiologicznej transformacji racemicznego *cis*-estru etylowego kwasu 2-(4,4-dimetylo-2,3-epoksycykloheksylo)octowego (*cis*-(±)-**9d**)  
 Compositions of the product mixtures of enzymatic and microbial transformation of racemic *cis*-ethyl 2-(4,4-dimethyl-2,3-epoxycyclohexyl)acetate (*cis*-(±)-**9d**)

Lp. Entry	Biokatalizator Biocatalyst	Czas [dni] Time [h]	Stopień przereagowania <i>cis</i> -(±)- <b>9d</b> [%] Conversion of <i>cis</i> -(±)- <b>9d</b>		ee <i>cis</i> - <b>9d</b>	<b>9f</b> [%]	ee <b>10d</b>
					[%] ee of <i>cis</i> - <b>9d</b>		[%] ee of <b>10d</b>
1.	Esteraza z <i>Mucor miehei</i>	4	47	(+) 56	40	(+) 7	
		11	80	(+) 19	0	(+) 100	
2.	<i>Fusarium scripti</i> AM 199	2	50	(+) 99	0	(+) 75	
		4	72	(+) 99	0	(+) 44	
3.	Lipaza z <i>Aspergillus oryzae</i>	4	29	(-) 40	0	(-) 99	
		11	63	(-) 66	0	(-) 99	
4.	Lipaza z <i>Candida antarctica</i>	0.5	47	(-) 44	47	0	
		1	68	(-) 85	68	0	
5.	Lipaza z <i>Mucor javanicus</i>	4	11	(-) 12	11	0	
		11	32	(-) 40	32	0	
6.	Lipaza z <i>Rhizopus arrhizus</i>	4	25	(-) 16	25	0	
		11	29	(-) 40	29	0	
7.	Lipaza z <i>Rhizomucor miehei</i>		41	(-) 27	41	0	
			67	(-) 93	15	(-) 99	
8.	Lipoprotein z <i>Pseudomonas sp.</i>	1	12	(-) 7	0	(-) 25	
		3	52	(-) 67	0	(-) 99	
9.	Lipaza z trzustki wieprzowej	2	27	(+) 34	8	(+) 32	
		4	50	(+) 55	0	(+) 56	



Rys. 43. Transformacja *trans*-estru etylowego kwasu 2-(6,6-dimetylo-2,3-epoksykloheksylo)-*octowego* ((±)-**9b**) przy użyciu lipazy z *Candida antarctica*

Fig. 43. Transformation of *trans*-ethyl 2-(6,6-dimethyl-2,3-epoxycyclohexyl)acetate ((±)-**9b**) by lipase from *Candida antarctica*

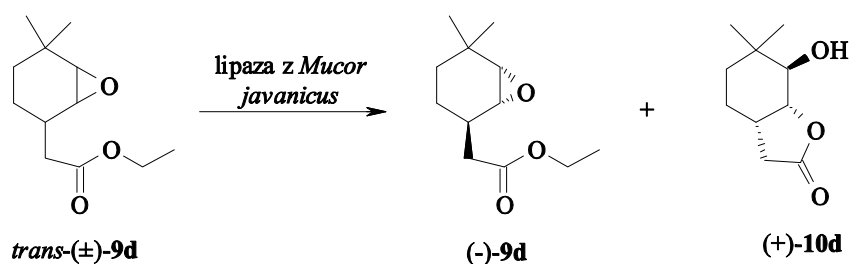
Tabela 10

Table 10

Skład mieszaniny produktów enzymatycznej lub mikrobiologicznej transformacji racemicznego *trans*-estru etylowego kwasu 2-(6,6-dimetylo-2,3-epoksykloheksylo)*octowego* (*trans*-(±)-**9b**)

Compositions of the product mixtures of enzymatic and microbial transformation of racemic *trans*-ethyl 2-(6,6-dimethyl-2,3-epoxycyclohexyl)acetate (*trans*-(±)-**9b**)

Lp. Entry	Biokatalizator Biocatalyst	Czas [dni] Time [days]	Stopień przereagowania		
			<i>trans</i> -(±)- <b>9d</b> [%] Conversion of <i>trans</i> -(±)- <b>9d</b>	ee <b>9d</b> [%] ee of <b>9d</b>	ee <b>10d</b> [%] ee of <b>10d</b>
1.	<i>Fusarium equiseti</i> AM 15	1	48	(-) 8	(-) 33
		3	84	(-) 47	(-) 48
2.	<i>Fusarium equiseti</i> AM 22	2	50	(-) 99	(-) 67
		4	69	(-) 99	(-) 39
3.	<i>Fusarium culmorum</i> AM 9	1	31	(-) 28	(-) 44
		2	74	(-) 100	(-) 12
4.	<i>Fusarium scripi</i> AM 199	2	44	(-) 75	(-)-99
		4	67	(-) 92	(-)-82
5.	<i>Fusarium solani</i> AM 203	7	49	(-) 64	(+) 86
		11	89	(-) 89	(+) 74
6.	Lipaza z <i>Aspergillus</i>	4	35	(-) 40	(+) 30
		11	65	(-) 65	(+) 38
7.	Lipaza z <i>Candida antarctica</i>	1	32	(-) 74	(+) 99
		2	50	(-) 99	(+) 87
8.	Lipaza z trzustki wieprzowej	4	21	(+) 5	(-) 50
		11	43	0	0



Rys. 44. Transformacja *trans*-estru etylowego kwasu 2-(4,4-dimetylo-2,3-epoksy-cykloheksylo)-octowego ((±)-**9d**) przy użyciu lipazy z *Mucor javanicus*

Fig. 44. Transformation of *trans*-ethyl 2-(6,6-dimethyl-2,3-epoxycyclohexyl)acetate ((±)-**9d**) by lipase from *Mucor javanicus*

Tabela 11

Table 11

Skład mieszaniny produktów enzymatycznej lub mikrobiologicznej transformacji racemicznego *trans*-estru etylowego kwasu 2-(4,4-dimetylo-2,3-epoksy-cykloheksylo)octowego (*trans*-(±)-**9d**)

Compositions of the product mixtures of enzymatic and microbial transformation of racemic *trans*-ethyl 2-(4,4-dimethyl-2,3-epoxycyclohexyl)acetate (*trans*-(±)-**9d**)

Lp. Entry	Biokatalizator Biocatalyst	Czas [dni] Time [days]	Stopień przereagowania <i>trans</i> -(±)- <b>9d</b> [%] Conversion of <i>trans</i> -(±)- <b>9d</b>	ee <b>9d</b> [%] ee of <b>9d</b>	ee <b>10d</b> [%] ee of <b>10d</b>
1.	Esteraza z <i>Thermoanaerobium brockii</i>	4	67	(+) 64	(-) 72
		11	80	(+) 78	(-) 45
2.	Lipaza z <i>Aspergillus</i>	4	45	(-) 93	(+) 61
		11	74	(-) 77	(+) 49
3.	Lipaza z <i>Candida antarctica</i>	1	53	(-) 89	(+) 87
		2	87	(-) 99	(+) 69
4.	Lipaza z <i>Mucor javanicus</i>	4	66	(-) 99	(+) 50
		11	72	(-) 99	(+) 22
5.	Lipaza z <i>Pseudomonas cepacia</i>	4	18	(-) 10	(+) 26
		11	33	(-) 13	(+) 20
6.	Lipaza z <i>Penicillium roqueforti</i>	4	64	(-) 88	(+) 62
		11	69	(-) 87	(+) 62
7.	Lipaza z <i>Rhizopus arrhizus</i>	4	33	(-) 11	(+) 30
		11	57	(-) 40	(+) 19
8.	Lipaza z <i>R. niveus</i>	4	17	(-) 6	(+) 35
		11	24	(-) 13	(+) 33
9.	Lipaza z trzustki wieprzowej	4	50	(-) 60	(+) 80
		11	62	(-) 68	(+) 81
10.	Lipoproteina z <i>Ch. viscosum</i>	4	23	(-) 2	(+) 29
		4	23	(-) 2	(+) 29
11.	Lipoproteina z <i>Pseudomonas sp.</i>	4	46	(-) 80	(+) 41
		11	85	(-) 91	(+) 27

Powodzeniem zakończył się dobór warunków transformacji *trans*-estru etylowego kwasu 2-(6,6-dimetylo-2,3-epoksycykloheksylo)octowego (**9b**) przy użyciu lipazy izolowanej z *Candida antarctica* rekombinowanej w szczepie *Aspergillus niger*. Po biotransformacji na skalę preparatywną wyizolowano (+)-enancjomer 2-hydroksy-5,5-dimetylo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu (**10b**) o skręcalności właściwej  $[\alpha]_{589}^{20} = +21,2^\circ$  ( $c=0.94$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) oraz nieprzereagowany *trans*-epoksyester **9b** o skręcalności właściwej  $[\alpha]_{589}^{20} = -26,5^\circ$  ( $c=0.52$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) i nadmiarze enancjomerycznym 92%.

W celu uzyskania enancjomerów laktonów **12b–d** otrzymane na drodze biotransformacji (+)-izomery laktonów **10b–d** przeprowadzono w estry kwasu *p*-toluenosulfonowego i zredukowano  $\text{NaB}(\text{CN})\text{H}_3$  (rys. 29), uzyskując z hydroksylaktonu (+)-**10b** (+)-izomer 5,5-dimetylo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on ((+)-**12b**) o  $[\alpha]_{589}^{20} = +25,9^\circ$  ( $c=0,3$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) i  $ee=81\%$ . Natomiast z hydroksylaktonu (+)-**10c** otrzymano izomer (+)-**12c** o  $[\alpha]_{589}^{20} = +31,4^\circ$  ( $c=1,7$ ,  $\text{CHCl}_3$ ),  $ee=93\%$ . Kolejny hydroksylakton (+)-**10d** przeprowadzono w nasycony lakton (+)-3,3-dimetylo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on ((+)-**12d**) o  $[\alpha]_{589}^{20} = +29,9^\circ$  ( $c=0,9$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) z 95%  $ee$ .

### 3.3. Zastosowanie enzymatycznego lub mikrobiologicznego utleniania *mezo*-dioli w syntezie chiralnych laktonów z układem 8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (**17**, **19**) i ich *gem*-dimetylo pochodnych (**18**, **20**)

Na tym etapie badań zsyntezowano  $\gamma$ -laktony o układzie 8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (**17**, **19**) oraz ich *gem*-dimetylo pochodne **18**, **20** (rys. 45). Związki te są izomerami strukturalnymi laktonów **12a–d**, których otrzymywanie opisano w rozdziale 3.2. Porównanie aktywności fungistatycznej tych grup związków dało możliwość stwierdzenia, jak usytuowanie atomu tlenu w pięcioczłonowym pierścieniu laktonowym wpływa na aktywność biologiczną.

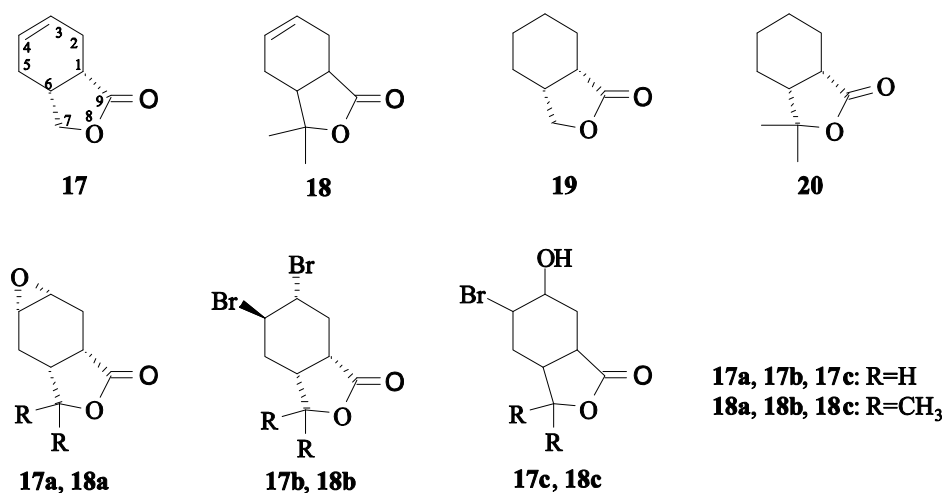
Nowym elementem, w stosunku do opisanych wcześniej struktur, jest tu obecność wiązania podwójnego w laktonach **17**, **18**, które wykorzystano przy syntezie pochodnych do wprowadzenia atomu halogenu, ugrupowań epoksydowego lub hydroksylowego.

W literaturze opisano metody otrzymywania obu enancjomerów: *cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]non-3-en-9-onu (**17**) i *cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (**19**), między innymi poprzez chemoenzymatyczną syntezę, gdzie kluczowym etapem była enancjoselektywna hydroliza bezwodników przy użyciu lipaz [23, 59].

Innym, wydajniejszym sposobem uzyskania chiralnego produktu jest utlenienie *mezo*-dioli przez HLADH [17, 44, 76]. Wadą tej metody jest otrzymanie tylko jednego z dwóch optycznych izomerów. Drugi enancjomer planowano otrzymać poprzez utlenienie innym komercyjnie dostępnym enzymem (tab. 12).

W trakcie realizacji badań izolowany z wątroby końskiej HLADH użyty we wstępnych badaniach skringingowych został wycofany ze sprzedaży, dlatego w zamian użyto enzymu rekombinowanego w *Escherichia coli*.

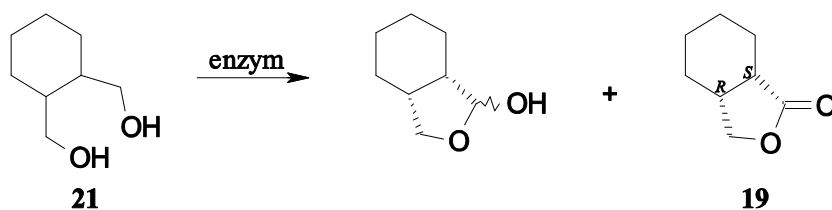




Rys. 45. Laktony 17–20  
 Fig. 45. Lactones 17–20

### 3.3.1. Enzymatyczne utlenianie dioli (21, 22)

W skryningu przy użyciu HLADH (por. rozdział 2.2.4.1.) sprawdzono, czy 1,2-bis-(hydroksymetylo)cykloheksan **21** (rys. 46) otrzymany przez redukcję odpowiedniego bezwodnika **24**, można utlenić do obu enancjomerów *cis*-laktonu **19**, używając komercyjnych alkoholowych dehydrogenaz. Wyniki zestawiono w tabeli 12.



Rys. 46. Schemat utlenienia 1,2-bis(hydroksymetylo)cykloheksanu **21** przez komercyjnie dostępne dehydrogenazy alkoholowe  
 Fig. 46. Scheme of oxidation of 1,2-bis(hydroxymethyl)cyclohexane **21** using commercially available alcohol dehydrogenases

Tabela 12  
Table 12

Utlenianie 1,2-bis(hydroksymetylo)cycloheksanu **21** przez komercyjnie dostępne dehydrogenazy alkoholowe  
Oxidation of 1,2-bis(hydroxymethyl)cyclohexane **21** using commercially available alcohol dehydrogenases

Lp. Entry	Biokatalizator Biocatalyst	Czas [dni] Time [days]	Stopień przereagowania <b>21</b> [%] Conversion of <b>21</b>	Laktol [%] Lactol	<b>19</b> [%]	ee <b>19</b> [%] ee of <b>19</b>
1.	<b>HLADH</b>	1	95	67	28	(+) 92
		7	100	35	65	(+) 92
		14	100	5	95	(+) 92
2.	<b>PADH I</b>	1	2	2	0	0
		7	11	11	0	0
		14	11	11	0	0
3.	<b>PADH II</b>	1	36	0	36	(-) 26
		7	42	0	42	(-) 26
		14	43	0	43	(-) 25
4.	<b>PADH III</b>	1	6	4	2	(+) 95
		7	26	0	26	(+) 54
		14	100	10	90	(+) 16
5.	<b>YADH</b>	1	0	0	0	0
		7	14	5	9	(+) 58
		14	46	2	44	(+) 34
6.	<b>LKADH</b>	1	0	0	0	0
		7	0	0	0	0
		14	83*	19	24	(-) 82

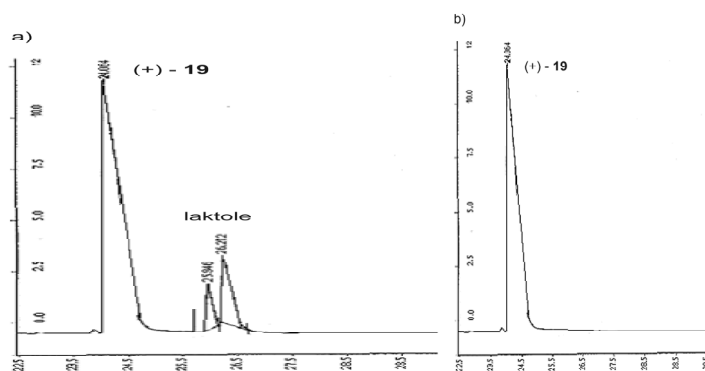
\* dodatkowe produkty – additional products

W tabeli 12 podano wyniki zoptymalizowanego bioutlenienia **21**. Pięć spośród sześciu enzymów było zdolne do katalizowania utlenienia diolu **21** do (+)- lub (-)-izomeru 2-oksabicyklo[4.3.0]nonan-2-onu (**19**) o nadmiarach enancjomerycznych od 25 do 92%.

Najefektywniejszym enzymem okazał się HLADH firmy EVO, utleniający *mezo*-diol **21** do (+)-izomeru *cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (**19**) z nadmiarem enancjomerycznym 90%. Drugi (-)-izomer laktonu **19** można było uzyskać z nadmiarem enancjomerycznym ee=82% poprzez utlenienie diolu **21** enzymem LKADH izolowanym z *Lactobacillus kefir*. Nie podjęto jednak tej drogi syntezy z powodu obserwowanych ubocznych produktów.

Użyty w badaniach wstępnych HLADH izolowany z wątroby końskiej był enancjoselektywny – zachodziło utlenianie *mezo*-dioli do laktonów o nadmiarze enancjomerycznym 99% (rys. 47). Jego odpowiednik, obecnie dostępny na rynku, uzyskany przez

rekombinację w *Escherichia coli*, jest mniej enancjoselektywny i prowadzi do otrzymania produktów o niższym, co najmniej 10% nadmiarze enancjomerycznym. Po licznych modyfikacjach warunków bioutlenienia otrzymano 250 mg (-)-izomeru *cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu ((-)-**17**) o skręcalności właściwej  $[\alpha]_{589}^{20} = -58.3^\circ$  ( $c=2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) [76]  $[\alpha] = -67.1^\circ$ ) oraz 365 mg (+)-izomeru *cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]non-3-en-9-onu (+)-**19**) o skręcalności właściwej  $[\alpha]_{589}^{20} = +42.5^\circ$  ( $c=2.2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) [76]  $[\alpha] = +48.8^\circ$ ) i z 90% ee. Konfigurację absolutną otrzymanych związków **17** i **19** jako *S* dla pierwszego atomu węgla i *R* dla szóstego atomu węgla przypisano na podstawie wartości skręcalności właściwej oraz danych literaturowych [76].



Rys. 47. Chromatogramy produktów utleniania mezo-diolu **21** HLADH do laktonu (+)-**19** (a) w trakcie utleniania, (b) po wyizolowaniu

Fig. 47. Chromatograms of oxidation of meso-diol **21** to lactone (+)-**19** using HLADH (a) by oxidation, (b) after isolation

Koszt wytworzenia niezbędnej do dalszych badań ilości laktonów **17–19**, będących substratami do kolejnych syntez (rys. 45, 52) przy użyciu czystych preparatów enzymatycznych i koenzymów jest wysoki, dlatego próbowano dobrać tańszą metodę mikrobiologicznego utlenienia dioli.

W tym celu przystąpiono do poszukiwania mikroorganizmów prowadzących reakcję enancjoselektywnego utleniania dioli (rozdział 3.3.2.).

Prowadzono także syntezę na mieszaninach racemicznych (rozdział 3.3.3.), w których zoptymalizowano warunki syntezy i uzyskano preparaty do badań biologicznych.

### 3.3.2. Mikrobiologiczne utlenianie *cis*-1,2-bis(hydroksymetylo)cykloheksanu (**21**) i biotransformacje bezwodników (**23–26**)

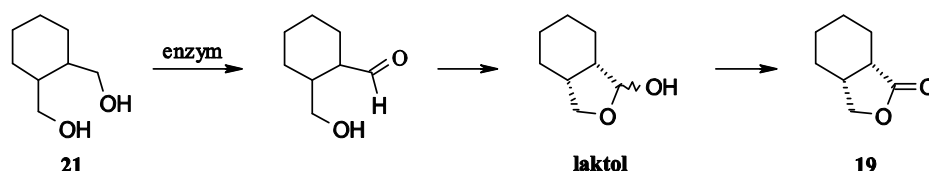
#### Mikrobiologiczne utlenianie *cis*-1,2-bis(hydroksymetylo)cykloheksanu (**21**)

Badania skryningowe przeprowadzono na pięćdziesięciu czterech mikroorganizmach należących do czterdziestu pięciu rodzajów.

<i>Absidia coerulea</i> AM 93	<i>Epithyrium resinae</i> AR 51	<i>Rhizopus nigricans</i> AM 394
<i>Absidia cylindrospora</i> AM 336	<i>Fusarium oxysporum</i> AM 21	<i>Rhodotorula glutinis</i> AM 242
<i>Acremonium roseum</i> AM 346	<i>Fusicoccum amygdali</i> AM 258	<i>Rhodotorula rubra</i> AM 4
<i>Aphanocladium album</i> AM 417	<i>Hanseniaspora vinarea</i> 912	<i>Rhodotorula rubra</i> AM 82
<i>Armillaria mellea</i> AM 296	<i>Humicola grisea</i> AM 560	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AM 464
<i>Ascosphaera apis</i> AM 496	<i>Laetiporus sulphureus</i> AM 515	<i>Saccharomyces pastorianus</i> NCAIM 1125
<i>Aspergillus ochraceus</i> AM 456	<i>Marasmius scorodonius</i> AM 497	<i>Saccharomyces bayanus</i> CBS 380
<i>Bacillus subtilis</i> AR 901	<i>Melogramma camphylosporum</i> AM 563	<i>Saccharomyces sp.</i> 907
<i>Beauveria bassiana</i> AM 278	<i>Mortierella vinaceae</i> AM 149	<i>Sparassis crispa</i> AM 535
<i>Botrytis cinerea</i> AM 235	<i>Mucor circinelloides</i> AM 385	<i>Spicaria divaricata</i> AM 423
<i>Candida sake</i> 908	<i>Mucor spinosus</i> AM 398	<i>Stemphylium botryosum</i> AM 279
<i>Candida viswanathi</i> AM 120	<i>Papularia rosea</i> AM 17	<i>Syncephalastrum racemosum</i> AM 105
<i>Cenangium ferruginosum</i> AR 56	<i>Penicillium lilacinum</i> AM 111	<i>Trametes versicolor</i> AM 536
<i>Chaetomium indicum</i> AM 32	<i>Pezicula cinnamomea</i> AR 53	<i>Trichoderma viride</i> AM 523
<i>Circinella muscae</i> AM 302	<i>Piptoporus betulinus</i> AM 475	<i>Verticillium sp.</i> AM 424
<i>Cunninghamella japonica</i> AM 472	<i>Pleurotus ostreatus</i> AM 482	<i>Xylaria longipes</i> AM 564
<i>Diatrype decorticata</i> AM 539	<i>Poria placenta</i> AR 37	<i>Yarrowia lipolytica</i> AR 71
<i>Dothiorella ribis</i> AM 273	<i>Pycnidium resinae</i> AR 50	<i>Yarrowia lipolytica</i> AR 72

W tabeli 13 zestawiono dane tylko odnośnie do wybranych mikroorganizmów, efektywnie prowadzących enancjoselektywne utlenienie diolu **21**. Wyselekcjonowano jedenaście mikroorganizmów prowadzących enancjoselektywne utlenienie diolu **21**. Są to głównie grzyby należące do rodzaju *Fungi imperfectii*. We wszystkich przypadkach obserwowano powstawanie laktolu, co dowodzi, że mechanizm utlenienia jest identyczny z proponowanym dla HLAD (rys. 48).

W pierwszym etapie następuje utlenienie jednej z pierwszorzędowych grup hydroksylowych substratu **21** do aldehydu, po czym powstaje hemiacetal, który jest następnie utleniany do laktonu **19**.



Rys. 48. Mechanizm mikrobiologicznego utlenienia *meso*-diolu **21**

Fig. 48. Mechanism of microbial oxidation of meso-diol **21**

Tabela 13

Table 13

Mikrobiologiczne utlenianie 1,2-bis(hydroksymetylo)cykloheksanu **21**

Microbial oxidation of 1,2-bis(hydroxymethyl)cyclohexane **21**

Lp. Entry	Biokatalizator Biocatalyst	Podłoże Growth medium	Stopień przereagowania <b>21</b> [%] Conversion of <b>21</b>	Laktol [%] Lactol	<b>19</b> [%]	ee <b>19</b> [%] ee of <b>19</b>
1.	<i>Aphanocladium album</i> AM 417	P	65	15	50	(+)-35
2.	<i>Candida sake</i> KCh 908	P	100	5	95	(-) 80
3.	<i>Papularia rosea</i> AM 17	P	5	6		(+) 15
4.	<i>Rhodotorula glutinis</i> AM 242	P	37	14	25	(-) 80
C		10	6	4	(-) 49	
E		6	5	1	(-) 35	
5.	<i>Rhodotorula rubra</i> AM 4	G	32	2	30	(+) 67
P		35	19	16	(-) 35	
S		5	2	3	(-) 16	
P		46	18	28	(+) 3	
6.	<i>Rhodotorula rubra</i> AM 82	P	46	18	28	(+) 3
7.	<i>Saccharomyces bayanus</i> CBS 380	P	70	4	26	(+) 57
8.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AM 464	P	17	6	11	(+) 73
9.	<i>Saccharomyces pastorianus</i> NCAIM 1125	P	47	4	43	(+) 89
10.	<i>Saccharomyces sp.</i> 907	P	34	3	31	(+) 10
11.	<i>Yarrowia lipolytica</i> AR 71	P	88	4	82	(-) 33

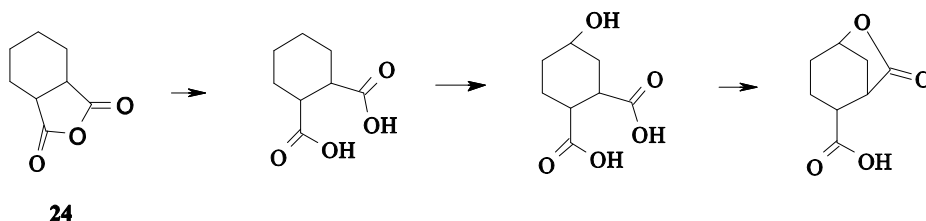
We wstępnych badaniach podłoże buforowano do pH=9,5, aby uzyskać podobne warunki jak przy utlenieniu HLADH, ale w transformacjach mikrobiologicznych przy pH=7,2 produkty były identyczne jak przy pH 9,5, dlatego hodowle mikroorganizmów były buforowane do pH=7,2.

Sprawdzono wpływ podłoża hodowli na bioutlenienie diolu **21** przy użyciu drożdży *Rhodotorula rubra* AM 4 (rozdział 2.2.3). Najefektywniejsze podłoża to S i G ze stopniem przereagowania ponad 30% oraz ee produktu odpowiednio 35% i 67%.

Wyselekcjonowane mikroorganizmy utleniały diol **21** zarówno do (+)- jak i (-)-izomerów optycznych laktonu **19** z nadmiarem enancjomerycznym 89%. Zastosowanie *Saccharomyces pastorianus* NCAIM 1125 pozwoliło otrzymać (+)-**19**, analogicznie jak przy użyciu HLADH. Natomiast produktem bioutlenienia **21** przy użyciu szczepu *Candida sake* 908 był (-)-enancjomer *cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu ((-)-**19**) o odwrotnej konfiguracji absolutnej w stosunku do izomeru uzyskanego poprzez katalizę przy użyciu HLADH.

### Mikrobiologiczne przekształcenia bezwodników (23–26)

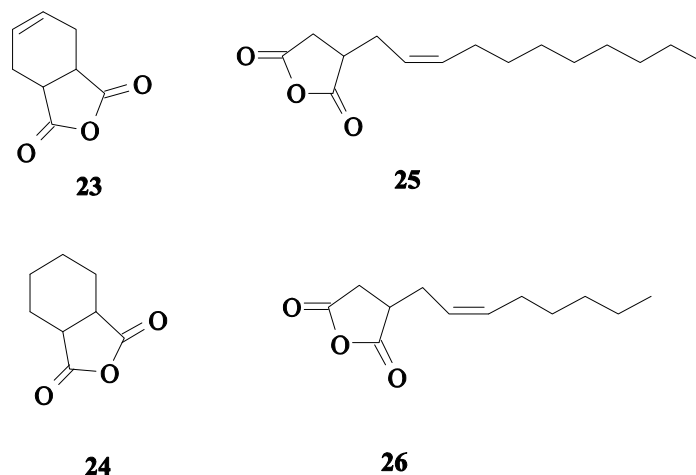
Dodanie ksenobiotycznego związku do hodowli mikroorganizmu często powoduje, że uaktywniają się enzymy hydroksylujące. Założono, że cząsteczki bezwodników po mikrobiologicznej hydroksylacji mogą być izolowane jako optycznie czynne laktony, po hydroksylacji i wewnętrzcząsteczkowej laktonizacji na przykład według założonego mechanizmu (rys. 49).



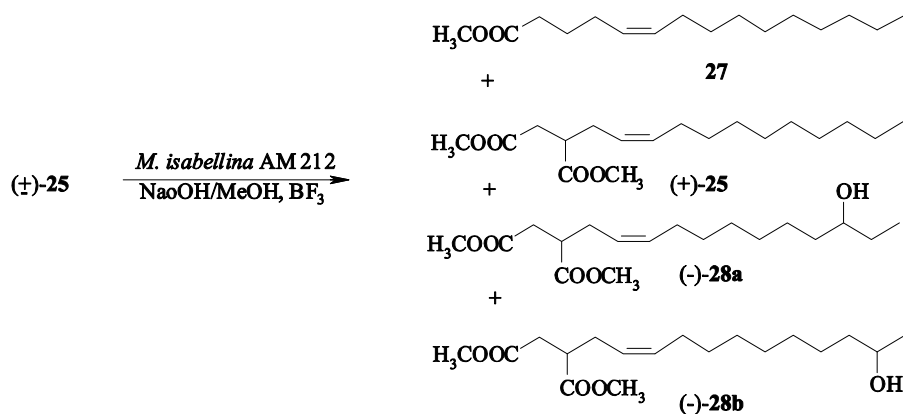
Rys. 49. Proponowany przebieg mikrobiologicznej laktonizacji cyklicznych bezwodników  
Fig. 49. Proposed course of microbial lactonization of cyclic anhydrides

Do badań skringingowych użyto czterech bezwodników (rys. 50), a transformację prowadzono przy użyciu czternastu mikroorganizmów: *Absidia glauca* AM 177, *Aphanocladium album* AM 417, *Aspergillus ochraceus* AM 456, *Chaetomium indicum* AM 158, *Cenangium ferruginosum* AM 56, *Fusarium culmorum* AM 7, *Fusarium culmorum* AM 196, *Fusarium oxysporum* AM 13, *Mortierella isabellina* AM 212, *Mortierella vinaceae* AM 149, *Mucor angulisporus* AM 455, *Penicillium chermesinum* AM 113, *Piptoporus betulinus* AM 39 i *Rhodotorula rubra* AM 82.

Dotychczas udało się wyizolować tylko produkty hydroksylacji i dekarboksylacji dla bezwodnika z łańcuchem alifatycznym (rys. 51) [128].



Rys. 50. Bezwodniki użyte w biotransformacjach mikrobiologicznych  
Fig. 50. Anhydrides used in microbial biotransformations



Rys. 51. Mikrobiologiczne przekształcenia racemicznego bezwodnika kwasu 2-dodeceno-1-yl-bursztynowego przy użyciu *Mortierella isabellina* AM 212  
Fig. 51. Microbial transformation of racemic 2-dodeceno-1-yl-succinic anhydride by *Mortierella isabellina* AM 212

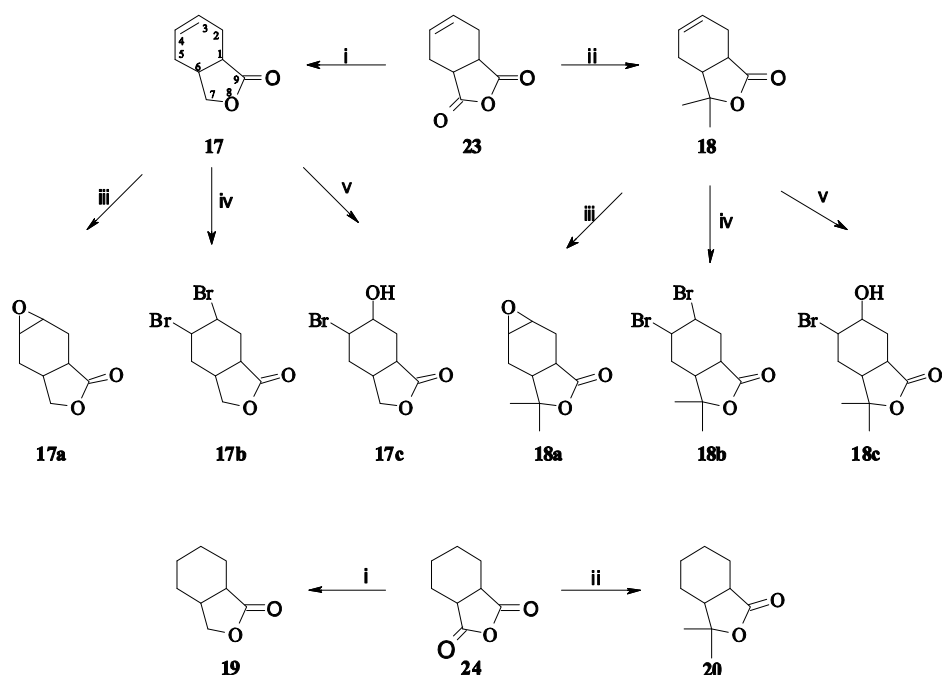
### 3.3.3. Synteza racemicznych laktonów z układem 8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (17, 19) i ich *gem*-dimetylopo pochodnych (18, 20)

Do otrzymania serii dziesięciu bicyklicznych  $\gamma$ -laktonów (rys. 52) użyto bezwodników dwóch kwasów: *cis*-1,2-cykloheks-4-endikarboksylowego (23) i *cis*-1,2-cykloheksano-dikarboksylowego (24).

Z bezwodnika kwasu *cis*-1,2-cykloheks-4-endikarboksylowego (23) otrzymano racemiczny lakton *cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]non-3-en-9-on ((±)-17) (rys. 52). Strukturę produktu 17 ustalono na podstawie analizy widm IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR. Obecność

pierścienia laktonowego w związku **17** potwierdzają: pojedyncze pasmo absorpcji przy  $1771\text{ cm}^{-1}$  w widmie IR, sygnał ( $\delta=175\text{ ppm}$ ) od karbonylowego atomu węgla w widmie  $^{13}\text{C}$  NMR oraz dwa sygnały w postaci dubletu dubletów o przesunięciach 4,0 i 4,3 ppm w widmie  $^1\text{H}$  NMR świadczące o obecności dwóch protonów przy atomie węgla C-7. Obecność wiązania podwójnego potwierdzają zarówno multiplet przy 5,7 ppm w widmie  $^1\text{H}$  NMR, jak i dwa sygnały przy 125 i 125,3 ppm w widmie  $^{13}\text{C}$  NMR.

7,7-Dimetylo-*cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]non-3-en-9-on (**18**), analog strukturalny laktonu **17** z ugrupowaniem *gem*-dimetylowym przy siódmym atomie węgla, uzyskano w reakcji Grignarda z dwoma molami jodku metylomagnezowego i bezwodnikiem **23**. Jego budowę potwierdzono badaniami spektroskopowymi. Sygnały od grup metylowych występują w widmie  $^1\text{H}$  NMR w postaci singletu pochodzącego od sześciu protonów przy przesunięciu 1,38 ppm. Protony przy wiązaniu podwójnym tworzą multiplet przy przesunięciu 5,63–5,89 ppm.



i- $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , ii-2 mol  $\text{MeMgI}$ ,  $\text{Et}_2\text{O}$ , iii- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MCPBA, iv- $\text{Br}_2$ ,  $\text{CCl}_4$ , v- $\text{THF} : \text{H}_2\text{O}$ , NBS.

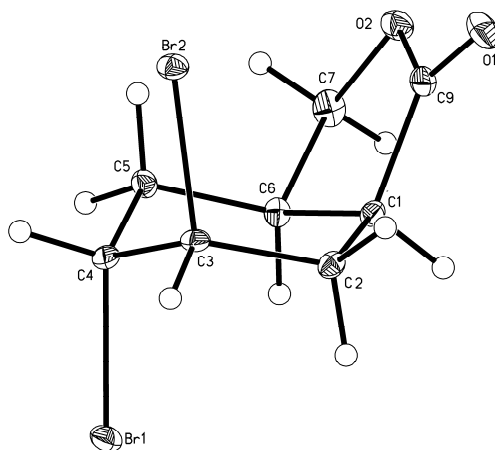
Rys. 52. Schemat syntez racemicznych bicyklo- $\gamma$ -laktonów: **17–20**, **17a–c**, **18a–c**

Fig. 52. Scheme of synthesis of racemic bicycles- $\gamma$ -lactones: **17–20**, **17a–c**, **18a–c**

Na kolejnych etapach syntezy wiązanie podwójne w laktonach **17** i **18** zostało utlenione kwasem *m*-chloronadbenzoesowym do *cis*-epoksydów [160] **17a** i **18a** (rys. 52, iii). widmach  $^1\text{H}$  NMR sygnały od protonów przy atomach węgla C-3 i C-4 tworzą triplety o stałej sprzężenia 7 Hz dla 3,4-epoksy-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (**17a**) i stałej sprzężenia 4 Hz dla 3,4-epoksy-7,7-dimetylo-*cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (**18a**).



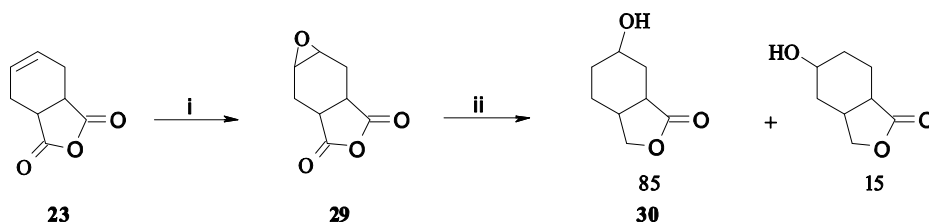
W reakcji bromowania nienasyconych laktonów **17** i **18** uzyskano z wysoką diastereo-selektywnością *trans*-dibromopochodne: 3,4-dibromo-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-on (**17b**), 3,4-dibromo-7,7-dimetylo-*cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-on (**18b**) (rys. 52, iv). W związkach tych, podobnie jak w epoksy-laktonach, sygnały od protonów przy atomach węgla C-3 i C-4 nakładają się, tworząc niediagnostyczne multiplety. W celu ustalenia struktury wykonano analizę rentgenowską dla dibromolaktonu **17b** (rys. 53).



Rys. 53. Struktura krystaliczna 3,4-dibromo-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (**17b**) [130]  
Fig. 53. Crystal structure of 3,4-dibromo-8-oxabicyclo[4.3.0]nonan-9-one (**17b**) [130]

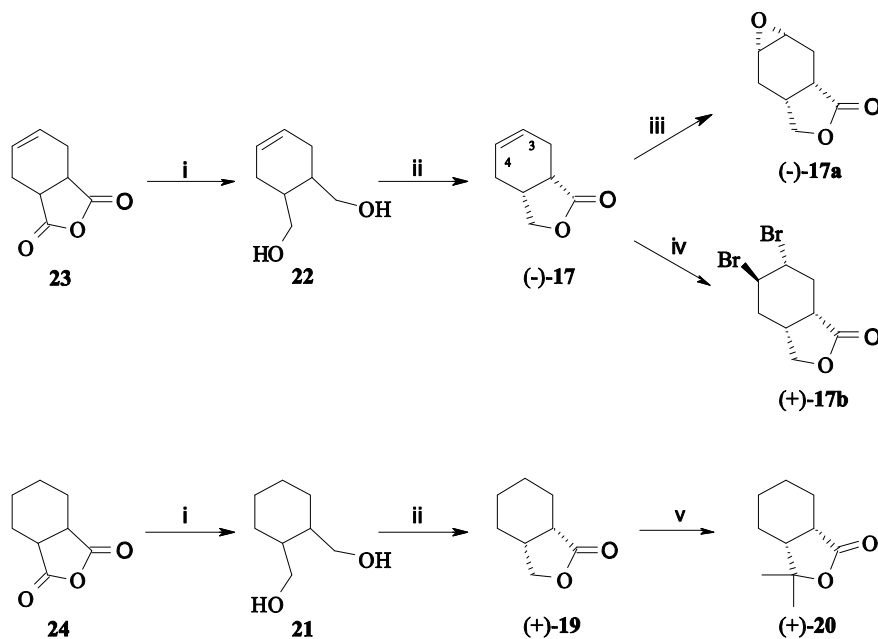
Struktura krystaliczna potwierdza mechanizm *trans* addycji bromu do *cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]non-3-en-9-onu (**17**). W kolejnych reakcjach addycji N-bromoimidu kwasu bursztynowego otrzymano bromohydryny laktonów **17** i **18**. W obu syntezach **17c** i **18c** otrzymano pojedyncze diastereoizomery. Świadczą o tym widma IR, <sup>13</sup>C NMR. Nasycone laktony **19**, **20** otrzymano z bezwodnika kwasu *cis*-1,2-cykloheksanodikarboksylowego (**24**), analogicznie jak ich nienasycone odpowiedniki **17**, **18**.

Aby porównać aktywność fungistatyczną dwóch izomerycznych hydroksylaktonów (**26**, **10a**) różniących się położeniem atomów tlenu w pięcioczłonowym pierścieniu, wykonano syntezę obu tych laktonów.



i-LiAlH<sub>4</sub>, Et<sub>2</sub>O, i-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MCPBA, ii-LiAlH<sub>4</sub>, Et<sub>2</sub>O.

Rys. 54. Schemat syntezy racemicznego hydroksy- $\gamma$ -laktonu **30**  
Fig. 54. Scheme of synthesis of racemic hydroxy- $\gamma$ -lactone **30**



i-LiAlH<sub>4</sub>, Et<sub>2</sub>O, ii-HLADH, iii-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MCPBA, iv-Br<sub>2</sub>, CCl<sub>4</sub>, v- MeMgI, Et<sub>2</sub>O, dichromian pirydyny, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

i-LiAlH<sub>4</sub>, Et<sub>2</sub>O, ii-HLADH, iii-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MCPBA, iv-Br<sub>2</sub>, CCl<sub>4</sub>, v- MeMgI, Et<sub>2</sub>O, pyridine dichromate, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Rys. 55. Schemat chemoenzymatycznej syntezy bicyklo- $\gamma$ -laktonów: (-)-**17a**, (+)-**17b**, (+)-**19**, (+)-**20**  
 Fig. 55. Schemat of chemoenzymatic synthesis of bicyclo- $\gamma$ -lactones: (-)-**17a**, (+)-**17b**, (+)-**19**, (+)-**20**

Pierwszy z hydroksylaktonów 8-hydroksy-*cis*-3-oksabicyklo[4.3.0]nonan-2-on (**30**) otrzymano w dwuetapowej syntezie (rys. 54). W pierwszym etapie utleniono bezwodnik kwasu *cis*-1,2-cykloheks-4-endikarboksyowego (**23**) kwasem *m*-chloronadbenzoesowym do *cis*-epoksybezwodnika **29**. Związek ten poddano redukcji glinowodorkiem litu, uzyskując mieszaninę dwóch diastereoizomerycznych laktonów w stosunku 15:85. Wyizolowano tylko główny produkt: 3-hydroksy-*cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-on (**30**), ustalając położenie grupy hydroksylowej przy atomie węgla C-3 na podstawie danych spektralnych <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR.

Czteroetapową syntezę drugiego hydroksylaktonu, 2-hydroksy-*cis*-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu (**10a**), opisano w rozdziale 3.2.

### 3.3.4. Synteza chiralnych laktonów (**17**, **17a**, **17b**, **19**, **20**) z układem 8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu

Po przeprowadzeniu testów na aktywność fungistatyczną dla mieszanin racemicznych podjęto decyzję o syntezie pięciu enancjomerycznie wzbogaconych laktonów (ee=90%): **17**, **17a**, **17b** oraz **19** i **20** (rys. 55). Laktony **17** i **19** otrzymano, utleniając

enzymatycznie odpowiednie diole (rozdział 3.3.1.), a kolejne etapy syntezy przeprowadzono zgodnie z wcześniej dobranymi warunkami (rozdział 3.3.3.). Wprowadzenie ugrupowania *gem*-dimetylowego uzyskano w dwuetapowej syntezie, gdzie w wyniku syntezy Grignarda otrzymano diol [170], który utleniono do (+)-laktonu **20**.

Nowo powstałym związkom przypisano konfigurację absolutną na podstawie skręcalności właściwych oraz mechanizmu reakcji, pozwalającego określić położenie w przestrzeni wprowadzonych heteroatomów, dlatego w epoksy-laktonie **17a** o skręcalności właściwej  $[\alpha]_{589}^{20} = -11.1^\circ$  ( $c=2.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ), [44]  $[\alpha]_{589}^{20} = -12.9^\circ$  przypisano konfigurację absolutną jako *1S*, *3S*, *4R*, *6R*.

Przy ustalaniu konfiguracji absolutnej laktonu **17b** o skręcalności właściwej  $[\alpha]_{589}^{20} = +27.8^\circ$  ( $c=1.1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) wzięto pod uwagę, że addycja atomów bromu zachodzi w pozycję *trans*, stąd laktonowi **17b** przypisano konfigurację absolutną: *1S*, *3R*, *4R*, *6R*.

Z kolei konfigurację absolutną laktonu **20** o skręcalności właściwej  $[\alpha]_{589}^{20} = +35.2^\circ$  ( $c=1.2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ) [44]  $[\alpha] = +40.1^\circ$  ustalono na *1S*, *6R*, ponieważ w trakcie wprowadzania ugrupowania *gem*-dimetylowego w pozycję C-7 nie zmienia się konfiguracja na atomach węgla C-1 i C-6.

### 3.4. Aktywność fungistatyczna laktonów uzyskanych w pracy

#### Związki racemiczne

Zsyntezowane racemiczne laktony: **4a–d**, **6a–c** (rozdział 3.1), **10a–d**, **12a–d** (rozdział 3.2), **13–16** (rozdział 3.2), **17**, **17a–c**, **18**, **18a–c**, **19**, **20** (rozdział 3.3) poddano testom na aktywność fungistatyczną wobec trzech gatunków fitopatogenów: *Aspergillus ochraceus* AM 456, *Fusarium culmorum* AM 282, *Penicillium citrinum* AM 354 (rozdział 2.2.5). Większość testowanych związków wykazywała wysoką aktywność wobec *Fusarium culmorum* AM 282, dlatego przebadano dwa kolejne szczepy *Fusarium*: *Fusarium oxysporum* 13, *Fusarium tricinctum* 16.  $\text{IC}_{50}$  (stężenie związku wywołujące pięćdziesięcioprocentowe zahamowanie wzrostu grzybni) wyliczono na podstawie stopnia zahamowania wzrostu na podłożu z dodatkiem badanego związku w stosunku do próby kontrolnej (tab. 14).

Aktywność fungistatyczną badanych związków określono w odniesieniu do czterech stężeń. Dla wszystkich związków wykonano testy przy stężeniu 150  $\mu\text{g/ml}$ , kolejne stężenia dobierano indywidualnie. Wszystkie analizy powtórzono trzykrotnie.

#### $\delta$ -Laktony

Przebadano cztery  $\delta$ -laktony o strukturze bicyklo[3.3.1]nonanu **4a–d** i porównano ich aktywność fungistatyczną z monocyklicznymi  $\delta$ -laktonami **6a–c** (tab. 14, rys. 56).

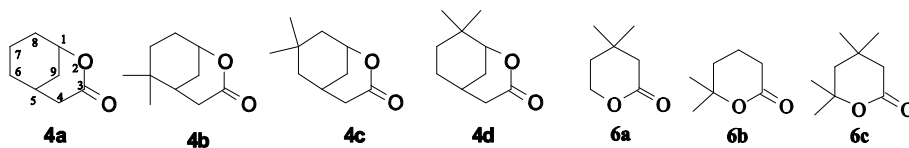
Zaobserwowano, że obecność grup metylowych w cząsteczkach laktonów **4b–d** powoduje wzrost aktywności fungistatycznej w stosunku do laktonu 2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-onu (**4a**). Szczególnie na uwagę zasługują pod tym względem laktony 5,5-dimetylo-2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-onu (**4c**) 6,6-dimetylo-2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-onu (**4d**) hamujące w pięćdziesięciu procentach wzrost grzybni *Fusarium oxysporum* AM 13 i *Fusarium tricinctum* AM 16 przy stężeniu 94–116  $\mu\text{g/cm}^3$ .

Tabela 14  
Table 14

IC<sub>50</sub> w µg/cm<sup>3</sup> racemicznych laktonów wobec *A. ochraceus* 456, *F. culmorum* 282,  
*F. oxysporum* 13, *F. tricinctum* 16, *P. citrinum* 354  
IC<sub>50</sub> in µg/cm<sup>3</sup> for racemic lactones against *A. ochraceus* 456, *F. culmorum* 282,  
*F. oxysporum* 13, *F. tricinctum* 16, *P. citrinum* 354

Lp. Entry	Symbol Symbol	IC <sub>50</sub> [µg/cm <sup>3</sup> ]				
		<i>Aspergillus ochraceus</i> AM 456	<i>Fusarium culmorum</i> AM 282	<i>Fusarium oxysporum</i> AM 13	<i>Fusarium tricinctum</i> AM 16	<i>Penicillium citrinum</i> AM 354
1.	<b>4a</b>	220.0	161.1	171.9	156.0	216.3
2.	<b>4b</b>	163.1	132.3	127.1	122.7	232.2
3.	<b>4c</b>	153.9	146.1	116.4	111.2	283.9
4.	<b>4d</b>	172.2	133.4	108.3	94.4	247.1
5.	<b>6a</b>	120.0	100.7	135.0	110.0	158.2
6.	<b>6b</b>	109.9	115.2	127.0	119.3	171.9
7.	<b>6c</b>	107.8	107.5	125.5	107.5	168.2
8.	<b>10a</b>	>350	>350	196.3	220.2	211.0
9.	<b>10b</b>	202.3	120.0	114.8	154.1	310.0
10.	<b>10c</b>	219.0	110.3	130.3	114.3	285.3
11.	<b>10d</b>	189.4	98.2	93.4	91.8	>350
12.	<b>12a</b>	186.5	142.0	137.0	120.2	180.2
13.	<b>12b</b>	164.7	109.8	139.1	142.1	175.4
14.	<b>12c</b>	127.2	103.4	141.3	138.0	192.3
15.	<b>12d</b>	158.3	126.3	160.1	153.2	174.1
16.	<b>13</b>	244.7	132.1	183.3	174.6	280.8
17.	<b>14</b>	227.7	145.3	300.7	147.0	281.3
18.	<b>15</b>	283.0	173.8	220.4	110.8	>350
19.	<b>16</b>	172.5	152.0	263.0	181.1	264.4
20.	<b>17</b>	171.2	184.6	280.0	221.4	>350
22.	<b>17a</b>	141.0	90.1	72.4	155.3	310.5
23.	<b>17b</b>	218.7	81.3	30.1	110.0	305.3
24.	<b>17c</b>	141.4	172.0	141.5	210.2	290.0
25.	<b>18</b>	159.1	183.5	189.1	205.8	271.8
26.	<b>18a</b>	142.0	142.7	95.0	181.0	>350
27.	<b>18b</b>	121.5	155.0	80.4	190.1	251.6
28.	<b>18c</b>	220.9	166.4	170.9	161.4	210.1
29.	<b>19</b>	186.5	148.3	314.9	221.3	>350
30.	<b>20</b>	160.4	135.0	180.1	211.3	292.7
31.	<b>23</b>	287.1	310.8	220.5	290.1	>350
32.	<b>24</b>	341.9	292.7	240.0	303.6	>350
33.	<b>30</b>	212.1	121.0	126.1	160.4	>350
	Nystatyna*	200	150	155	120	250
	DDAC**	50.1	2.41	24.0	28.2	41.4

\* jednostki aktywności – activity units; \*\* DDAC – chlorek didecyldimetyloammoniumowy – didecyldimetylammonium chloride

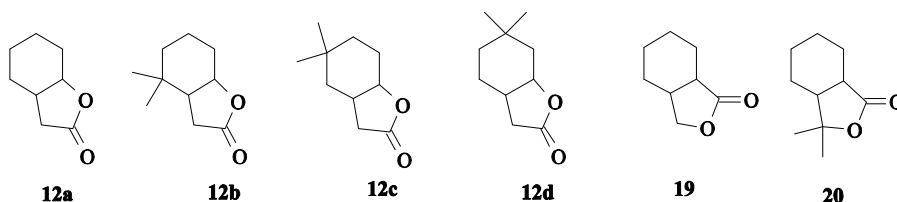


Rys. 56.  $\delta$ -Laktony o strukturze bicyklo[3.3.1]nonanu **4a–d** i monocykliczne  $\delta$ -laktony **6a–c**  
 Fig. 56.  $\delta$ -Lactones with bicyclo[3.3.1]nonane **4a–d** structure and monocyclic  $\delta$ -lactones **6a–c**

Monocykliczne laktony **6a–c** wykazywały silniejszy wpływ hamujący rozwój grzybni patogenu w porównaniu z bicyklicznymi związkami, również wobec opornego na działanie badanych laktonów mikroorganizmu *Aspergillus ochraceus* AM 456 (tab. 14).

### $\gamma$ -Laktony

W kolejnych testach porównano dwie grupy bicyklicznych  $\gamma$ -laktonów o strukturze *cis*-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu (**12a–d**) i *cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (**19**, **20**), różniących się położeniem funkcji laktonowej w pięcioczłonowym pierścieniu  $\gamma$ -laktonowym oraz położeniem ugrupowania *gem*-dimetylowego lub jego brakiem (rys. 57).



Rys. 57. Nasycone  $\gamma$ -laktony o strukturze *cis*-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu (**12a–d**) i *cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (**19**, **20**)

Rys. 57. Saturated  $\gamma$ -lactones with *cis*-9-oxabicyclo[4.3.0]nonan-8-ones (**12a–d**) and *cis*-8-oxabicyclo[4.3.0]nonan-9-ones (**19**, **20**) structures

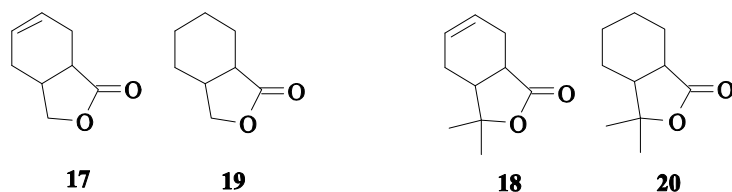
Następnie poddano testom związki nienasycone (**17**, **18**) (rys. 58) zawierające pierścień epoksydowy (**17a**, **18a**), atomy bromu (**13**, **17b**, **18b**), grupy hydroksylowe (**10a–d**, **26**, **17c**, **18c**) oraz estrowe (**14–16**) (rys. 59).

**Wpływ położenia funkcji laktonowej** w pięcioczłonowym pierścieniu oceniono, porównując laktony: **12a–d** z **19**, **20** (rys. 57). Bicykliczne  $\gamma$ -laktony o strukturze *cis*-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu (**12a–d**) hamują wzrost grzybni *Fusarium culmorum* AM 282, *Fusarium oxysporum* AM 13, *Fusarium tricinctum* AM 16 przy stężeniu 120–160  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ . W stosunku do tych samych fitopatogenów lakton o strukturze *cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (**19**) oraz jego analog **20** hamują wzrost grzybni o 50% przy wyższym stężeniu 135–315  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ . Na podstawie tego fragmentu badań stwierdzono, że wzrost grzybni badanych szczepów *Fusarium* silniej hamują laktony o strukturze 9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu.

**Wprowadzenie ugrupowania *gem*-dimetylowego** do laktonu **12a** (rys. 57) powoduje, że jego analogi **12b–d** są aktywniejsze w stosunku do *Aspergillus ochraceus* AM 456 i *Fusarium culmorum* AM 282. Przeanalizowano aktywność laktonu 7,7-dimetylo-

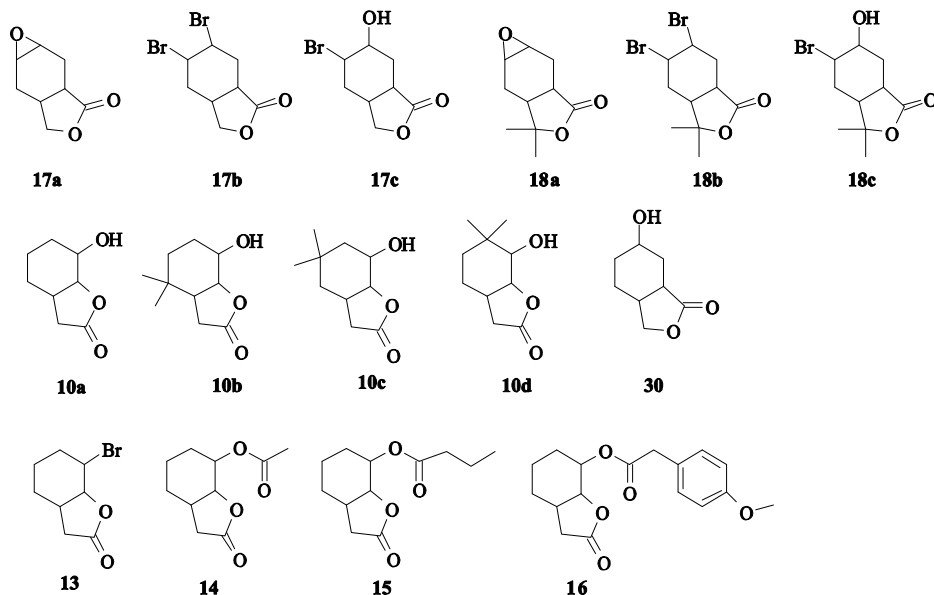
-*cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (**20**) i nieposiadającego ugrupowania *gem*-dimetylowego *cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (**19**). Lakton **20** jest aktywniejszy w stosunku do wszystkich pięciu badanych mikroorganizmów.

Porównano aktywność fungistatyczną *laktonów różniących się obecnością wiązania podwójnego* w parach laktonów *cis*-3-oksabicyklo[4.3.0]non-3-en-9-onu (**17**) *cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (**19**) oraz 4,4-dimetylo-*cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]non-3-en-9-onu (**18**) 4,4-dimetylo-*cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (**20**) (rys. 58) nie zauważono istotnych różnic.



Rys. 58. Nasycone i nienasycone laktony  
Fig. 58. Saturated and unsaturated lactones

Znaczące różnice w aktywności fungistatycznej obserwowano w laktonach z *pierścieniem epoksydowym* (**17a**, **18a**), *atomami bromu* (**13**, **17b**, **18b**), *grupami hydroksylową* (**10a–d**, **30**, **17c**, **18c**) oraz *estrową* (**14–16**) (rys. 59).



Rys. 59. Pochodne  $\gamma$ -laktonów z układem 9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu oraz 8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu

Fig. 59. Derivatives of  $\gamma$ -lactones with 9-oxabicyclo[4.3.0]nonan-8-one and 8-oxabicyclo[4.3.0]nonan-9-one systems

Najwyższą aktywność fungistyczną stwierdzono dla *trans*-3,4-dibromo-*cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (**17b**). Lakton ten w 50% hamował wzrost *Fusarium oxysporum* 13 przy stężeniu 30 µg/cm<sup>3</sup>, a przy stężeniu 80–110 µg/cm<sup>3</sup> wobec pozostałych gatunków *Fusarium*. Analog strukturalny (**18b**) z ugrupowaniem *gem*-dimetylowym przy atomie węgla C-7 wykazał dwukrotnie niższą aktywność.

Aktywność IC<sub>50</sub> poniżej 100 µg/ml wobec *Fusarium oxysporum* AM 13, *Fusarium culmorum* AM 282 wykazał 3,4-epoksy-*cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-on (**17a**), natomiast jego *gem*-dimetylowa pochodna (**18a**) była mniej efektywna.

Wymiana jednego bromu na grupę hydroksylową przy atomie węgla C-3 w laktonach *trans*-4-bromo-3-hydrokso-*cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (**17c**) i 7,7-dimetylo-*trans*-4-bromo-3-hydrokso-*cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (**18c**) negatywnie wpływała na aktywność fungistyczną.

Analog laktonu **17c**, pozbawiony atomu **bromu**, 3-hydrokso-*cis*-3-oksabicyklo[4.3.0]nonan-2-on (**26**), powinien, według obserwacji, mieć niższą aktywność niż lakton **17c**. Taką zależność zaobserwowano wobec *Aspergillus ochraceus* 456 i *Penicillium citrinum* 354, jednak wartości IC<sub>50</sub> laktonu **30** wobec badanych szczepów *Fusarium* były niższe. Próba zsyntezowania związku bez grupy hydroksylowej, ale z atomem bromu, 4-bromo-*cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu, nie powiodła się, dlatego do badań włączono lakton 2-bromo-*cis*-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu **13**, dodatkowo analizując, czy położenie tlenu w pięcioczłonowym pierścieniu laktonowym na wpływ wartość IC<sub>50</sub>.

Negatywny wpływ **ugrupowania hydroksylowego** na aktywność fungistyczną potwierdzono w testach z hydroksylaktonem **10a**, który w niewielkim stopniu hamował wzrost badanych fitopatogenów. Zablockowanie grupy hydroksylowej poprzez jej **estryfikację** (**14**, **15**, **16**) czy zastąpienie ugrupowania hydroksylowego bromem (**13**) zwiększało aktywność fungistyczną wobec gatunków *Fusarium culmorum* AM 282, *Fusarium tricinctum* AM 16.

Wprowadzenie ugrupowania *gem*-dimetylowego do hydrokso- $\gamma$ -laktonu **10a** zmienia drastycznie jego aktywność. Hydrokso- $\gamma$ -laktony **10b–d** intensywniej hamowały wzrost wszystkich pięciu badanych grzybów. Najaktywniejszym laktonem z tej grupy okazał się 2-hydrokso-3,3-dimetylo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on (**10d**), hamujący wzrost grzybnii *Fusarium culmorum* AM 282, *Fusarium oxysporum* AM 13 oraz *Fusarium tricinctum* AM 16 o pięćdziesiąt procent przy stężeniu 92–98 µg/cm<sup>3</sup>.

#### Wpływ konfiguracji centrów stereogenicznych na aktywność fungistyczną

Przeanalizowano również wpływ centrów stereogennych optycznie czynnych laktonów (**4a–d**, **10b–d**, **12b–d**, **17**, **17a**, **17b**, **19**, **20**) na aktywność fungistyczną wobec badanych dwóch fitopatogenów: *Fusarium oxysporum* 13 i *Fusarium culmorum* 282. Dane z testów zestawiono w tabeli 15, obliczając różnicę między aktywnością mieszaniny racemicznej a jednym z jej enancjomerów.

Tabela 15  
Table 15

IC<sub>50</sub> w µg/cm<sup>3</sup> dla chiralnych laktonów wobec *F. culmorum* AM 282, *F. oxysporum* AM 13  
IC<sub>50</sub> in µg/cm<sup>3</sup> for chiral lactones against *F. culmorum* AM 282, *F. oxysporum* AM 13

Lp. Entry	Symbol Symbol	<i>Fusarium culmorum</i> AM 282		<i>Fusarium oxysporum</i> AM 13	
		IC <sub>50</sub> [µg/cm <sup>3</sup> ]	ΔIC <sub>50</sub> *	IC <sub>50</sub> [µg/cm <sup>3</sup> ]	ΔIC <sub>50</sub> *
1.	(+)- <b>4a</b>	152.1	+9	143.0	+29
2.	(-)- <b>4a</b>	172.9	-12	184.1	-12
3.	(+)- <b>4b</b>	110.0	+22	100.4	+27
4.	(-)- <b>4b</b>	138.2	-6	119.3	-8
5.	(+)- <b>4c</b>	112.8	+33	98.0	+18
6.	(-)- <b>4c</b>	153.9	-8	125.1	-9
7.	(+)- <b>4d</b>	131.3	+2	97.9	+10
8.	(-)- <b>4d</b>	160.1	-27	132.1	-24
9.	(+)- <b>10b</b>	100.3	+10	112.3	+3
10.	(+)- <b>10c</b>	137.2	+27	151.0	+21
11.	(+)- <b>10d</b>	77.9	+20	81.3	+8
12.	(+)- <b>12b</b>	120.8	+11	151.0	-12
13.	(+)- <b>12c</b>	117.3	+14	155.8	-11
14.	(+)- <b>12d</b>	139.0	+13	181.9	-14
15.	(-)- <b>17</b>	170.1	+14	220.3	+60
16.	(-)- <b>17a</b>	60.4	+30	53.1	+19
17.	(+)- <b>17b</b>	90.1	-9	46.9	-17
18.	(+)- <b>19</b>	170.2	-22	260.3	+54
19.	(+)- <b>20</b>	120.0	+15	160.3	+20

\*ΔIC<sub>50</sub>=IC<sub>50</sub>racemat - IC<sub>50</sub> enancjomer

Największą różnicę między aktywnościami fungistatycznymi (+)- i (-)-enancjomerów **4a–d** a aktywnościami dla mieszanin racemicznych wykazały laktony (+)-**4c**, (-)-**4d** wobec *Fusarium culmorum* AM 282 oraz (+)-**4a**, (+)-**4b**, (-)-**4d** wobec *Fusarium oxysporum* AM 13.

Wśród przetestowanych (+)-enancjomerów nasyconych laktonów z układem 9-oksa-bicyklo[4.3.1]nonan-8-onu (**12b–d**) oraz ich hydroksypochodnych (**10b–d**) najwyższe różnice w aktywności obserwowano w wypadku enancjomerów (+)-**10b** i (-)-**10d** w testach wobec *Fusarium culmorum* AM 282.

Enancjomery laktonów (-)-**17**, (+)-**17b**, (+)-**19**, (+)-**20** wykazywały wzrost aktywności fungistatycznej w stosunku do mieszanin racemicznych. Otrzymany (-)-*trans*-3,4-dibromo-*cis*-8-oksabicyclo[4.3.0]nonan-9-on (**17b**) w mniejszym stopniu hamował wzrost grzybni niż mieszanina racemiczna.



Wśród przebadanych racemicznych i enancjomerycznych laktonów najwyższą aktywność wykazywały: 3,4-epoksy-*cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-on (**17a**), jego *gem*-dimetylowa pochodna **18a** oraz 3,4-dibromo-*cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-on (**17b**) wobec *Fusarium oxysporum* AM 13 i *Fusarium culmorum* 282. (+)-Enancjomer 2-hydroksy-3,3-dimetylo-9-oksabicyklo[4.3.1]nonan-8-onu ((+)-**10d**) hamował wzrost fitopatogenów *Fusarium oxysporum* AM 13, *Fusarium culmorum* AM 282. Natomiast  $\delta$ -laktony: 7,7-dimetylo-2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-onu (**4c**) oraz 8,8-dimetylo-2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-onu (**4d**) hamowały wzrost grzybni *Fusarium tricinctum* AM 16, a (+)-enancjomer **4d** *Fusarium oxysporum* AM 13.

## 4. PODSUMOWANIE

### Synteza

Zgodnie z założonym celem badań zsyntezowano związki będące laktonami o szkieletcie bicyklo[3.3.1]- i bicyklo[4.3.0]nonanu. Ze względu na możliwość wystąpienia różnic we właściwościach biologicznych otrzymano izomery optycznie oraz mieszaniny racemiczne.

Powodzenie zaplanowanych syntez okazało się możliwe dzięki dobraniu optymalnych warunków biotransformacji (w tym dokonaniu wyboru mikroorganizmów lub izolowanych enzymów oraz induktorów), zastosowaniu nieopisanych wcześniej w literaturze metod syntezy organicznej oraz udokumentowaniu mechanizmów reakcji i ustaleniu struktur nowo otrzymanych związków.

**Pierwsza grupa** syntezowanych laktonów zawierała układ bicyklo[3.3.1]nonanu.

(+)- i (-)-Enancjomery 2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-onu (**4a**) i jego *gem*-dimetylowe analogi **4b–d** uzyskano w czteroetapowej syntezie, w trakcie której dobrano optymalne warunki mikrobiologicznej redukcji estrów dimetylowych kwasów: 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (**2a**), 2-(2,2-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego (**2b**), 2-(3,3-dimetylo-5-oksocykloheksylo)malonowego (**2c**) oraz 2-(4,4-dimetylo-3-oksocykloheksylo)malonowego (**2d**).

Spośród dwudziestu czterech testowanych mikroorganizmów wyselekcjonowano dwa szczepy *Absidia coerulea* AM 93 i *Rhodotorula rubra* AM 4 zdolne do redukcji prochiralnej grupy karbonylowej w pożądanym – choć niezgodnym z regułą Preloga – sposobie do *trans*-diastereoizomerów **3a–d**.

Warunki bioredukcji optymalizowano, określając wpływ składu podłoża hodowli, temperatury, pH, stężenia substratu oraz induktorów.

Wśród przebadanych czterdziestu ośmiu induktorów – dziewiętnaście wykazało silnie inhibujące działanie względem dehydrogenaz. Korzystną zmianę efektywności biotransformacji i enancjoselektywności w prowadzonych procesach wykazało pięć induktorów: 6-metylohept-5-en-2-on (**C-7**;  $\Delta A=103\%$ ,  $\Delta ee=42\%$ ), siarczan cynchoniny (**D-7**;  $\Delta A=106\%$ ,  $\Delta ee=50\%$ ), sól Eschenmoshera (**D-9**;  $\Delta A=100\%$ ,  $\Delta ee=32\%$ ), dichlorocyrcocen (**D-10**;  $\Delta A=89\%$ ,  $\Delta ee=53\%$ ) i HMPA (**D-12**;  $\Delta A=130\%$ ,  $\Delta ee=50\%$ ).

Opracowano nieopisane w literaturze warunki cyklizacji (+)- i (-)-enancjomerów *trans*-hydroksydiestrów **3a–d**. Zaproponowano mechanizm laktonizacji, częściowo potwierdzając go przez badania rentgenostrukturalne monokryształu (-)-**4a**. Określono absolutną konfigurację estru dietylowego kwasu 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego (**2a**).

**Druga grupa** syntezowanych laktonów zawierała układ bicyklo[4.3.0]nonanu.

Enancjomerycznie wzbogacone laktony z układem 2-oksabicyklo[4.3.0]nonan-3-onu (**12a**) oraz ich *gem*-dimetylowe pochodne (**12b–d**) otrzymano poprzez eliminację grupy hydroksylowej laktonów **10a–d** otrzymanych przy użyciu biotransformacji *cis*- i *trans*-epoksyestrów **9a–d**.

Przed wykonaniem biotransformacji określono strukturę epoksyestrów (**9a–d**) i zaproponowano mechanizm laktonizacji w środowisku wodnym. Porównano mechanizm katalizy mikrobiologicznej, gdzie oczekiwano produktów działania hydrolaz epoksydowych (enzymów enancjoselektywnie otwierających pierścień epoksydowy do diolu) oraz preparatów enzymatycznych (lipaz, esteraz) katalizujących hydrolizę wiązania estrowego lub wewnętrzną transestryfikację.

Zaobserwowano, że przebieg transformacji różni się dla *cis* i *trans*-epoksyestrów. Spośród 37 biokatalizatorów – 5 było zdolnych do prowadzenia biotransformacji, w wyniku której otrzymano (+)-enancjomery hydroksylaktonów **10a–d**.

**Trzecia grupa** syntezowanych laktonów będących pochodnymi ftalidów zawierała układ bicyklo[4.3.0]nonan-2-onu. Uzyskanie tych związków było niezbędne do przeprowadzenia porównawczych testów biologicznych.

(+)- i (-)-Izomery trzeciej grupy laktonów z układem 8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-onu (**17**, **19**) otrzymano przez bioutlenienie dehydrogenazą HLADH (izolowaną po rekombinacji *Escherichia coli*), wybraną po wcześniejszym przetestowaniu sześciu komercyjnie dostępnych oksydoreduktaz. Otrzymano laktony **17** i **19** o konfiguracji absolutnej 1*S*, 6*R*, z nadmiarem enancjomerycznym 90%.

Aby otrzymać ich pozostałe enancjomery, przetestowano 54 mikroorganizmy, z których 11 było zdolne do selektywnego utlenienia *mezo*-diolu **21**.

Obecność podwójnego wiązania w laktonach **17**, **18** pozwoliła na otrzymanie nowych związków z ugrupowaniem epoksydowym, hydroksylowym oraz atomami bromu.

### Testy biologiczne

Uzyskane laktony poddano testom na aktywność fungistatyczną wobec fitopatogenów zasiedlających produkty żywnościowe, ze szczególnym uwzględnieniem tych drobnoustrojów, które są zdolne do wytwarzania mikotoksyn.

Uzyskane laktony, ze względu na różnice strukturalne, pozwoliły na ocenę wpływu tych różnic na aktywność biologiczną. Testom biologicznym poddano oddzielnie każdy z enancjomerów oraz mieszaniny racemiczne otrzymanych laktonów. Określono wpływ następujących czynników:

- konfiguracji centrów stereogenicznych laktonów,
- budowy szkieletu bicyklononanu,
- położenia funkcji laktonowej w pięcioczłonowym pierścieniu  $\gamma$ -laktonowym o strukturze [4.3.0],
- obecności i położenia ugrupowania *gem*-dimetylowego,
- obecności pierścienia epoksydowego, atomów bromu, grup hydroksylowej oraz estrowej.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że aktywność biologiczną wobec *Fusarium culmorum* AM 282, *Fusarium oxysporum* AM 13, *Fusarium tricinctum* AM 16 wykazują: 3,4-epoksy-*cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-on (**17a**), jego *gem*-dimetylowa pochodna **18a** oraz 3,4-dibromo-*cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-on (**17b**), (+)-enancjomer 2-hydroksy-3,3-dimetylo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu ((+)-**10d**), 7,7-dimetylo-2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-onu (**4c**) oraz (+)-enancjomer 8,8-dimetylo-2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-onu ((+)-**4d**).

Uzyskane dane pozwalają rekomendować te związki do dalszych badań nad ich przydatnością w roli dodatków do żywności.

Podsumowując – w wyniku syntezy zaplanowanych laktonów uzyskano 20 nieopisanych w literaturze związków i udokumentowano ich strukturę. Zaproponowano mechanizmy cyklizacji estrów dimetylowych pochodnych kwasów: 2-(3-oksocykloheksylo)malonowego oraz *cis*- i *trans*-estrów etylowych pochodnych kwasu 2-(2,3-epoksyhykloheksylo)octowego.

W badaniach skringingowych sprawdzono zdolność ponad siedemdziesięciu mikroorganizmów i dwudziestu trzech izolowanych enzymów do prowadzenia pożądanych etapów syntezy oraz wpływ czterdziestu ośmiu induktorów na podniesienie efektywności biotransformacji.

Uzyskano 27 racemicznych i 19 enancjomerycznych laktonów (o szkielecie bicyklo[3.3.1]- lub bicyklo[4.3.0]nonanu); właściwości wielu z nich pozwalają sugerować ich przydatność jako dodatków do żywności.

**Słowa kluczowe:** transformacja mikrobiologiczna, lipazy, esterazy, HLADH, bicykliczne laktony, aktywność fungistatyczna

## SUMMARY

### Synthesis

According to the aim of this research, lactones of bicyclo[3.3.1]- and bicyclo[4.3.0] nonane skeleton were synthesized. Optically pure (or enantiomerically enriched) lactones and their racemic mixtures were obtained via chemoenzymatic synthesis, in order to assess possible differences in their biological activity.

The syntheses were successful due to determining optimum biotransformation conditions (including selection of microorganisms or isolated enzymes and inductors), use of new synthetic methods, not reported in the literature, and determination of chemical structures of newly obtained compounds.

**The first group** of synthesized lactones contains bicyclo[3.3.1]nonane ring system.

(+)- and (-)-Enantiomers of 2-oxabicyclo[3.3.1]nonan-3-one (**4a**) and its *gem*-dimethyl analogues **4b–d** were obtained in a four-step synthesis in which optimal microbial reduction conditions were determined. Dimethyl esters of the following acids were obtained: 2-(3-oxacyclohexyl)malonic (**2a**), 2-(2,2-dimethyl-5-oxacyclohexyl)malonic (**2b**), 2-(3,3-dimethyl-5-oxacyclohexyl)malonic (**2c**) and 2-(4,4-dimethyl-3-oxacyclohexyl)malonic (**2d**).

Two out of twenty four tested strains: *Absidia coerulea* AM 93 and *Rhodotorula rubra* AM 4 were selected, because they were able to reduce the prochiral carbonyl group in the desired manner to the *trans* diastereoisomers **3a–d** (with anti-Prelog stereospecificity).

Bioreduction conditions were optimized with respect to cultivation medium composition, temperature, pH, substrate concentration and influence of inductors.

Nineteen out of the tested forty eight inductors have strong inhibiting effect on dehydrogenases. Five inductors showed positive effect on biotransformation efficiency and enantioselectivity of the biotransformation processes: 6-methylhept-5-en-2-one (**C-7**;  $\Delta A=103\%$ ,  $\Delta ee=42\%$ ), *cinchonine sulphate* (**D-7**;  $\Delta A=106\%$ ,  $\Delta ee=50\%$ ), Eschenmosher salt (**D-9**;  $\Delta A=100\%$ ,  $\Delta ee=32\%$ ), dichlorocircocene (**D-10**;  $\Delta A=89\%$ ,  $\Delta ee=53\%$ ) and HMPA (**D-12**;  $\Delta A=130\%$ ,  $\Delta ee=50\%$ ).

The reaction conditions for cyclization of (+)- and (-)-enantiomers of *trans*-hydroxydiesters **3a–d**, not reported in the literature so far, were determined. Mechanism of the lactonisation was proposed and partially confirmed by the single-crystal X-ray diffraction analysis of (-)-**4a**. The absolute configuration of diethyl ester of 2-(3-oxacyclohexyl)malonic acid (**2a**) was established.

**The second group** of synthesized lactones contains bicyclo[4.3.0]nonane system.

Enantiomerically enriched lactones with 2-oxabicyclo[4.3.0]nonan-3-one system (**12a**) and their *gem*-dimethyl derivatives (**12b–d**) were obtained by elimination of the hydroxyl group in lactones **10a–d**, obtained in biotransformation of *cis* and *trans*-epoxyesters **9a–d**.

Before the biotransformation, the structures of epoxyesters (**9a–d**) were established. The mechanism of lactonization in water conditions was proposed. The mechanism of microbial catalysis (with the expected activity of epoxide hydrolases, enzymes which enantioselectively open epoxide ring to diols) was compared with the enzymatic preparations (lipases, esterases) which catalyze ester bond hydrolysis or intramolecular transesterification.

It was observed that the course of transformation is different for *cis*- and *trans*-epoxyesters. Five out of 37 tested biocatalysts were capable of biotransformation leading to (+)-enantiomers of hydroxylactones **10a–d**.

**The third group** of the synthesized lactones are phthalide derivatives containing bicyclo[4.3.0]nonan-2-one system. These compounds were important to perform comparative biological tests.

(+)- and (-)-isomers of the third group of lactones with 8-oxabicyclo[4.3.0]nonan-9-one ring system (**17**, **19**) were obtained via biooxidation by means of HLADH (isolated after recombination with *Escherichia coli*). This dehydrogenase was selected after testing six commercially available oxidoreductases. Lactones **17** and **19** of *1S*, *6R* configuration were obtained with 90% of enantiomeric excess.

In order to obtain the other enantiomers of lactones, 54 microorganisms were tested. Eleven microorganisms were capable of selective oxidation of *meso*-diol **21**.

The presence of a double bond in lactones **17** and **18** led to obtaining new compounds with epoxide ring, hydroxyl group and bromine atoms.

### Biological tests

The lactones obtained were subjected to biological tests on fungistatic activity towards phytopathogens living in food products. A special attention was paid to those microorganisms that can produce mycotoxins.

The tested lactones, due to their structural differences, allowed to assess how the structure influence biological activity. The biological tests were performed on each of enantiomers separately and on the racemic mixtures. An impact of the following factors was determined:

- configuration of stereogenic center of lactones
- structure of bicyclononane skeleton
- location of lactone function in the five-member  $\gamma$ -lactone ring of [4.3.0]structure
- the presence and location of *gem*-dimethyl moiety
- the presence of epoxide ring, bromine atoms, hydroxyl group and ester group.

As a result of the biological tests it was found that the following compounds are active towards *Fusarium culmorum* AM 282, *Fusarium oxysporum* AM 13 and *Fusarium tricinctum* AM 16: 3,4-epoxy-*cis*-8-oxabicyclo[4.3.0]nonan-9-one (**17a**), its *gem*-dimethyl derivative **18a** and 3,4-dibromo-*cis*-8-oxabicyclo[4.3.0]nonan-9-one (**17b**),

(+)-enantiomer of 2-hydroxy-3,3-dimethyl-9-oxabicyclo[4.3.1]nonan-8-one ((+)-**10d**, 7,7-dimethyl-2-oxabicyclo[3.3.1]nonan-3-one (**4c**) and (+)-enantiomer of 8,8-dimethyl-2-oxabicyclo[3.3.1]nonan-3-one ((+)-**4d**).

The information obtained suggest that these compounds are promising for further research on their usefulness as food additives.

To sum up – the planned syntheses led to 20 compounds, not described in literature so far. Their structures have been documented. The mechanisms of cyclization of dimethyl esters of 2-(3-oxacyclohexyl)malonic acid derivatives and *cis* and *trans* ethyl esters of 2-(2,3-epoxycyclohexyl)acetic acid derivatives were proposed.

In screening tests the ability of over seventy microorganisms and twenty three isolated enzymes to conduct the desired synthetic steps were checked, as well as an impact of forty eight inductors on enhancement of biotransformation effectiveness.

The compounds obtained include 27 racemic and 19 enantiomeric lactones of bicyclo[3.3.1]- or bicyclo[4.3.0]nonane skeleton. Many of them have properties that may suggest their usefulness as food additives.

**Key words:** microbial transformation, lipases, esterases, HLADH, bicyclic lactones, fungistatic activity

## 5. LITERATURA

- [1] Abate A., Brenna E., Fuganti C., Gatti F.G., Serra S., 2004. Lipase-catalysed preparation of enantiomerically enriched odorants. *J. Mol. Catal. B, Enzym.*, 32, 33–51.
- [2] Ahmed F., Ralph A.D., Smith W., Smith K.E., 1996. Microbial transformations of steroids – X. Cytochromes P-450 11 $\alpha$ -hydroxylase and C17-C20 lyase and a 1-ene dehydrogenase transform steroids in *Nectria haematococca*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 59, 337–349.
- [3] Alewijn M., Smit B.A., Sliwinski E.E.L., Wouters J.T.M., 2007. The formation mechanism of lactones in Gouda cheese. *Internat. Dairy J.*, 17, 59–66.
- [4] Alkofahi A., Ma W.W., Mckenzie A.T., Byrn S.R., McLaughlin J.L., 1989. Goniatriol from *Goniothalamus giganteus*. *J. Nat. Prod.*, 52, 1371–1373.
- [5] Appendino G., Tagliatalata-Scafati O., Romano A., Pollastro F., Avonto C., Rubiolo P., 2009. Genepolide, a sesterpene  $\gamma$ -lactone with a novel carbon skeleton from Mountain Wormwood (*Artemisia umbelliformis*). *J. Nat. Prod.*, 72, 340–344.
- [6] Augustyn O.P.H., Van Wyk C.J., Muller C.J., Kepner R.E., Webb A.D., 1971. Structure of solerone [5-acetyldihydro-2(3H)-furanone], a substituted  $\gamma$ -lactone involved in wine aroma. *J. Agr. Food Chem.*, 19, 1128–1130.
- [7] Ayralkaloustian S., Agosta W. C., 1981. Two efficient methods for replacement of sulfur by oxygen in a thionolactone. *Synth. Commun.*, 11, 1011–1016.
- [8] Bartschat D., Beck T., Mosandl A., 1997. Stereoisomeric flavor compounds. 79. Simultaneous enantioselective analysis of 3-butylphthalide and 3-butylhexahydrophthalide stereoisomers in celery, celeriac, and fennel. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4554–4557.
- [9] Bartschat D., Maas B., Smietana S., Mosandl A., 1996. Stereoisomeric flavour compounds LXXIII, 3-Butylphthalide, chiroselective analysis, structure and properties of the enantiomers. *Phytochem. Anal.*, 7, 131–135.
- [10] Bartschat D., Wust M., Hanssum H., Mosandl A., 1997. Stereoisomeric flavor compounds LXXVII, 3-Butylhexahydrophthalides, simultaneous enantioselective analysis, structure elucidation, and sensorial properties of the stereoisomers. *J. High Resolut. Chrom.*, 20, 251–256.
- [11] Bashyal B.P., McLaughlin S.P., Gunatilaka A.A.L., 2006. Zinagrandinolides A-C, cytostatic  $\delta$ -elemanolide-type sesquiterpene lactones from *Zinnia grandiflora*. *J. Nat. Prod.* 69, 1820–1822.
- [12] Beck J.J., Chou S.C., 2007. The structural diversity of phthalides from the Apiaceae. *J. Nat. Prod.*, 70, 891–900.
- [13] Belitz H.-D., Grosch W., 1987, *Food chemistry*. Springer Verlag, London, Berlin.
- [14] Bjeldanes L.F., Kim I.-S., 1977. Phthalide components of celery essential oil. *J. Org. Chem.*, 42, 2333–2335.
- [15] Bonini C., Pucci P., Racioppi R., Viggani L., 1992. Enzyme catalyzed lactonization of 3,5 dihydroxy esters – enantioselective synthesis of naturally-occurring 3-hydroxy-5-decanolide, (-)-massoialactone, and 3-hydroxy-5-icosanolide. *Tetrahedron, Asymmetry*, 3, 29–32.
- [16] Bonini C., Righi G., 2002. A critical outlook and comparison of enantioselective oxidation methodologies of olefins. *Tetrahedron*, 58, 4981–5021.



- [17] Boratyński F., Kielbowicz G., Wawrzęczyk C., 2010. Lactones 34 [1]. Application of alcohol dehydrogenase from horse liver (HLADH) in enantioselective synthesis of  $\delta$ - and  $\epsilon$ -lactones. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 65, 30–36
- [18] Boutin J.A., Chatelain-Egger F., Vella F., Delagrance P., Ferry G., 2005. Quinone reductase 2 substrate specificity and inhibition pharmacology. *Chem. Biol. Interact.*, 151, 213–228.
- [19] Braguini W.L., Gomes M.A.B., de Oliveira B.H., Carnieri E.G.S., Rocha M.E.M., de Oliveira M.B.M., 2003. Activity of isosteviol lactone on mitochondrial metabolism. *Toxicol. Lett.*, 143, 83–92.
- [20] Brenna E., Dei Negri C., Fuganti C., Serra S., 2001. Baker's yeast-mediated approach to (-)-*cis*- and (+)-*trans*-aerangis lactones. *Tetrahedron: Asymmetry*, 12, 1871–1879.
- [21] Brown H.C., Kulkarni S.V., Racherla U.S., 1994. Chiral synthesis via organoboranes. 39. A facile synthesis of  $\delta$ -substituted- $\gamma$ -butyrolactones in exceptionally high enantiomeric purity. *J. Org. Chem.*, 59, 365–369.
- [22] Brzezowska E., Dmochowska-Gladysz J., Kołek T., 1996. Biotransformation XXXIX. Metabolism of testosterone, androstenedione, progesterone and testosterone derivatives in *Absidia coerulea* culture. *J. Steroid Biochem.*, 57, 357–362.
- [23] Canonne P., Lemay G., Belanger D., 1980. Reaction of di(bromomagnesium)alkanes with unsymmetrically substituted cyclic anhydrides. *Tetrahedron Lett.* 21, 4167–4170.
- [24] Carlquist M., Olsson C., Bergdahl B., van Niel E.W.J., Gorwa-Grauslund M.F., Frejd T., 2009. Kinetic resolution of racemic 5,6-epoxy-bicyclo[2.2.1]heptane-2-one using genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 58, 98–102.
- [25] Castaneda-Acosta J., Fischer N.H., Vargas D., 1993. Biomimetic transformations of parthenolide. *J. Nat. Prod.*, 56, 90–98.
- [26] Chattapadhyay T.K., Dureja P., 2006. Antifungal activity of 4-methyl-6-alkyl-2H-pyran-2-ones. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 2129–2133.
- [27] Chen K., Tong W., Wei D., Jiang W., 2007. The 11 $\beta$ -hydroxylation of 16,17 $\alpha$ -epoxyprogesterone and the purification of the 11 $\beta$ -hydroxylase from *Absidia coerulea* IBL02. *Enzyme Microb. Tech.*, 41, 71–79.
- [28] Chou B-H., Yang L-M., Chang S-F., Hsu F-L., Lo C-H., Lo C-H., Liaw J-H, Liu P-C., Lin S-J., 2008. Microbial transformation of Isosteviol lactone and evaluation of the transformation products on androgen response element. *J. Nat. Prod.*, 71, 602–607.
- [29] Clive D.L.J., Wang J., 2002. A tin hydride designed to facilitate removal of tin species from products of stannane-mediated radical reactions. *J. Org. Chem.*, 67, 1192–1198.
- [30] Cocker W., Sainsbury D.M., 1965. Synthesis of 3-*n*-butyltetrahydrophthalides. *Chem. Commun.*, 479–480.
- [31] Cooke R.C., van Leeuwen K.A., Capone D.L., Gawel R., Elsey G.M., Sefton M.A., 2009. Odor detection thresholds and enantiomeric distributions of several 4-alkyl substituted  $\gamma$ -lactones in Australian red wine. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 2462–2467.
- [32] Corey E.J., Carpino P., 1989. Enantiospecific total synthesis of pseudopterins A and E. *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 5472–5474.
- [33] Coulston F., Korte F., 1985. Insect repellent comprising a lactone. Patent nr, AU4289285 (A).
- [34] Dai J., Zhang S., Sakai J., Bai J., Oku Y., Ando M., 2003. Specific oxidation of C-14 oxygenated 4(20), 11-taxadienes by microbial transformation. *Tetrahedron Lett.* 44, 1091–1094.
- [35] Dais P., Perlin A.S., 1985. Relaxation and related  $^1\text{H}$  NMR studies on "asperlin." Configuration and conformation of the epoxypropyl side-chain. *Can. J. Chem.*, 63, 1009–1012.
- [36] Dale J.A., Dull D.L., Mosher H.S., 1969.  $\alpha$ -Methoxy- $\delta$ -trifluoromethylphenylacetic acid, a versatile reagent for determination of enantiomeric composition of alcohols and amines. *J. Org. Chem.*, 34, 2543–2549.

- [37] Dale J.A., Mosher H.S., 1973. Nuclear magnetic-resonance enantiomer reagents – configurational correlations *via* nuclear magnetic-resonance chemical-shifts of diastereomeric mandelate, O-methylmandelate, and  $\alpha$ -methoxy- $\delta$ -trifluoromethylphenylacetate (MTPA) esters. *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 512–519.
- [38] Dams I., Białońska A., Ciunik Z., Wawrzęńczyk C., 2005. Lactones 23: Synthesis of *cis*-fused bicyclic hydroxy lactones with a *p*-menthane system. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16, 2087–2097.
- [39] Daniewski W.M., Gumułka M., Przesmycka D., Ptaszyńska K., Błoszyk E., Drożdż B., 1995. Sesquiterpenes of *Lactarius* origin, antifeedant structure-activity relationships. *Phytochem.*, 38, 1161–1168.
- [40] Davoli P., Forni A., Moretti I., Prati F., Torre G., 1999. (*R*)-(+ and (*S*)-(-) ethyl 4,4,4-trifluoro-3-hydroxy butanoate by enantioselective Baker's yeast reduction. *Enzyme Microb. Tech.*, 25, 149–152.
- [41] De Vuyst L., 1994. Nisin production variability between natural *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains. *Biotech. Lett.*, 16, 287–292.
- [42] Delves-Broughton J., 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Techn.*, 44, 100–117.
- [43] Ebata T., Matsumoto K., Yoshikoshi H., Koseki K., Kawakami H., Okano K., Matsushita H., 1993. Synthesis of (+)-trans-whisky lactone, (-)-*cis*-whisky lactone, (+)-cognac lactone and (+)-eldanolide. *Heterocycles.*, 36, 1017–1026.
- [44] Edelsbacher A., Urban E., Weidenauer W., 1992. Preparation of enantiomerically pure 5,6-dihydroxy-iso-benzofuranones and 5,6-dihydroxy-4,7-methano-isobenzofuranones. *Monat. Chem.*, 123, 741–747.
- [45] Eildal J.N.N., Andersen J., Kristensen A.S., Jorgensen A.M., Bang-Andersen B., Jorgensen M., Stromgaard K., 2008. From the selective serotonin transporter inhibitor citalopram to the selective norepinephrine transporter inhibitor talopram: synthesis and structure-activity relationship studies. *J. Med. Chem.*, 51, 3045–3048.
- [46] Engelking H., Pfaller R., Wich G., Weuster-Botz D., 2006. Reaction engineering studies on ketoester reductions with whole cells of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Tech.*, 38, 536–544.
- [47] Evans R.H., Ellestad G.A., Kunstmann M.P., 1969. Two new metabolites from an unidentified nigrospora species. *Tetrahedron Lett.*, 10, 1791–1794.
- [48] Fang X., Ying Q., Chen Y., Yang X., Yang X., Wu F., 2008. Synthesis of fluoroalkyl- $\gamma$ -lactones from polyfluoroalkyl iodides and 5-hexenoic acids. *J. Fluorine Chem.*, 129, 280–285.
- [49] Fang X.P., Anderson J.E., Chang C.J., Franwick P.E., McLaughlin J.L., 1990. Novel bioactive styryl-lactones - goniofufurone, goniopyprone, and 8-acetylgoniotriol from *Goniothalamus giganteus* (annonaceae). X-Ray molecular structure of goniofufurane and of goniopyprane. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1, 1655–1661.
- [50] Fang X.P., Anderson J.E., Chang C.J., McLaughlin J.L., 1991. Two new styryl lactones, 9-deoxygoniopyprone and 7-epi-goniofufurone, from *Goniothalamus giganteus*. *J. Nat. Prod.*, 54, 1034–1043.
- [51] Fehr D., 1979. Study on the aroma substances of celery (*Apium Graveolens L.*) Part 1. *Pharmazie*, 34, 658–662.
- [52] Fehr D., 1981. Study on the aroma substances of celery (*Apium graveolens L.*) Part 2., *Pharmazie*, 36, 374–376.
- [53] Fernandes P., Cruz A., Angelova B., Pinheiro H.M., Cabral J.M.S., 2003. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme Microb. Tech.*, 32, 688–705.
- [54] Marques F.A., Wendler E.P., Maia B.H.L.N., Ventura M.U., Gatti I.C., 2007. Identification of defensive compounds in metathoracic glands of adults of the stink bug *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae). *J. Braz. Chem. Soc.*, 18, 1242–1246.

- [55] Ferreira A.G., Motidome M., Gottlieb O.R., Fernandes J.B., Vieira P.C., Cojocarú M., Gottlieb H.E., 1989. The chemistry of brazilian myristicaceae. 30. Farnesyl-homogentisic acid derivatives from *Otoba parvifolia*. *Phytochemistry*, 28, 579–583.
- [56] Ferreira D., Fernandes J.B., Vieira P.C., Gottlieb O.R., Gottlieb H.E., 1995. Further farnesyl-homogentisic acid derivatives from *Otoba parvifolia*. *Phytochem.*, 40, 1723–1728.
- [57] Filho E.P.S., Rodrigues J.A.R., Moran P.J.S., 2001. Effect of additives on the bioreduction of 2-chloro-1-phenyl-2-propen-1-one by Baker's yeast. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 15, 23–28.
- [58] Fogal E., Forzato C., Nitti P., Pitacco G., Valentin E., 2000. Synthesis of enantiomerically pure bicyclic condensed  $\delta$ -lactones via microbial reduction and enzymic resolution strategies. *Tetrahedron: Asymmetry*, 11, 2599–2614.
- [59] Ąryszkowska A., Komar M., Koszelewski D., Ostaszewski R., 2005. Enzymatic desymmetrization of 3-arylgutaric acid anhydrides. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16, 2475–2485.
- [60] Fukuyama Y., Shida N., Kodama M., Kido M., Sigawara M., 1992. Illicinolide A and B, novel sesquiterpene lactones from the wood of *Illicium tashiroi*. *Tetrahedron*, 48, 5847–5854.
- [61] Fukuyama Y., Shida N., Kodama M., 1993. Isodunnianin – a new sesquiterpene enhancing neurite outgrowth in primary culture of fetal-rat cerebral hemisphere from *Illicium tashiroi*. *Planta Med.*, 59, 181–182.
- [62] Gan L.-S., Zheng Y.-L., Mo J.-X., Liu X., Li X.-H., Zhou C.-X., 2009. Sesquiterpene lactones from the root tubers of *Lindera aggregata*. *J. Nat. Prod.*, 72, 1497–1501.
- [63] Ganaha M., Funabiki Y., Motoki M., Yamauchi S., Kinoshita Y., 1998. Reduction of alkyl (2-oxocyclohexyl)acetates by baker's yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 181–184.
- [64] Gaudin J.-M., 2000. Synthesis and organoleptic properties of *p*-menthane lactones. *Tetrahedron*, 56, 4769–4776.
- [65] Ghosh S., Nageswara Rao Ch., 2010. Stereoselective total synthesis of polyrhacitide A. *Tetrahedron Lett.*, 51, 2052–2054.
- [66] Gładkowski W., Grabarczyk M., Wińska K., Białońska A., Ciunik Z., Wawrzeńczyk C., 2006. Lactones 27[1] Transformation of  $\gamma$ -lactones fused to a dimethylcyclohexane ring in *Absidia cylindrospora* cultures. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 39, 31–39.
- [67] Gładkowski W., 2006. Mikrobiologiczna funkcjonalizacja bicyklicznych laktonów z układem alkilopodstawionego cykloheksanu. Praca Doktorska, Akademia Rolnicza we Wrocławiu.
- [68] Gravier-Pelletier Ch., Saniere M., Charvet I., Le Merrer Y., Depezay J.-C., 1994. Synthesis of (-)-Muricatacin and (-)-(5*R*,6*S*)-6-acetoxy-5-hexadecanolide, the Mosquito oviposition attractant pheromone, from D-isoascorbic acid. *Tetrahedron Lett.*, 35, 115–118.
- [69] Guth H., 1996. Determination of the configuration of wine lactone. *Helv. Chim. Acta*, 79, 1559–1571.
- [70] Heinemann C., Escher F., Conde-Petit B., 2003. Structural features of starch-lactone inclusion complexes in aqueous potato starch dispersions: the role of amylose and amylopectin. *Carbohydr. Polym.*, 51, 159–168.
- [71] Herz W., Govindan S.V., 1982. An elemanolide from *Zinnia grandiflora*. *Phytochem.*, 21, 787–788.
- [72] Hon P.-M., Lee C.-M., Choang T.F., Chui K.-Y., Wong H.N.C., 1990. A ligustilide dimer from angelica-sinensis. *Phytochem.*, 29, 1189–1191.
- [73] Isbell T.A., Plattner B.A., 1997. A highly regioselective synthesis of  $\delta$ -lactones from Meadowfoam fatty acids. *J. Am. Org. Chem. Soc.*, 74, 153–158.
- [74] Isbell T.A., Plattner B.A., 1998. The rate of ring opening of  $\gamma$  and  $\delta$ -lactones derived from Meadowfoam fatty acids. *J. Am. Org. Chem. Soc.*, 75, 63–66.
- [75] Jada S.R., Subur G.S., Matthews C., Hamzah A.S., Lajis N.H., Saad M.S., Stevens M.F.G., Stanslas J., 2007. Semisynthesis and *in vitro* anticancer activities of andrographolide analogues. *Phytochem.*, 68, 904–912.

- [76] Jakovic I.J., Goodbrand H.B., Lok K.P., Jones J.B., 1982. Enzymes in organin synthesis 24<sup>1</sup>. Preparation of Pure Chiral Lactones via Stereospecific Horse liver alcohol dehydrogenase catalyzed oxidations of monocyclic meso diols. *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 4659–4666.
- [77] Jiang Z.-H., Yang Q.-X., Tanaka T., Kouno I., 2008. Bicyclic polyketide lactones from chinese medicinal ants, *Polyrhacis lamellidens*. *J. Nat. Prod.*, 71, 724–727.
- [78] Jianmei H., Chunshu Y., 1996. Pseudoanisatin-like sesquiterpene lactones from the pericarps of *Illicium dunnianum*. *Phytochem.*, 42, 1375–1376.
- [79] Jiao X.-Z., Xie P., Zu L.-S., Liang X.-T., 2003. Stereoselective synthesis of (+/-) neocnidilide. *Chin. Chem. Lett.*, 14, 127–129.
- [80] Jiao X.-Z., Xie P., Zu L.-S., Liang X.-T., 2003. Study of stereoselective synthesis of (+/-)-neocnidilide. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 5, 165–169.
- [81] Kalinova B., Kindl J., Jiros P., Zacek P., Vasickova S., Budesinky M., Valterova I., 2009. Composition and electrophysiological activity of constituents identified in male wing gland secretion of the Bumblebee Parasite *Aphomia sociella*. *J. Nat. Prod.*, 72, 8–13.
- [82] Kitayama T., 1997. Microbial asymmetric syntheses of 3-alkylphthalide derivatives. *Tetrahedron Asymmetry*, 8, 3765–3774.
- [83] Kolodiaznyi O., 2003. Multiple stereoselectivity and its application in organic synthesis. *Tetrahedron*, 59, 5953–6018.
- [84] Kouno I., Irie H., Kawano N., 1984. The structures of pseudoanisatin and its novel base-catalyzed rearrangement product. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1, 2511–2515.
- [85] Kouno I., Kawano N., Yang C.-S., 1988. New pseudoanisatin-like sesquiterpene lactones from the bark of *Illicium dunnianum*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1, 1537–1539.
- [86] Kouno I., Mori K., Akiyama T., Hashimoto M., 1991. Sesquiterpene lactones from *Illicium anisatum*. *Phytochem.*, 30, 351–353.
- [87] Kuhbeck F., Muller M., Back W., Kurz T., Krottenthaler M., 2007. Effect of hot trub and particle addition on fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Tech.*, 41, 711–720.
- [88] Leonard-Nevers A., Marton Z., Lamare S., Hult K., Graber M., 2009. Undertaning water effect on *Candida antarctica* lipase B activity and enantioselectivity towards secondary alcohols. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 59, 90–95.
- [89] Lescop C., Nguyen-Kim P.P., Huet F., 2000. Stereolective synthesis of a [3.3.0]-fused  $\gamma$ -butyrolactone. Application in the preparation of bicyclic nucleosides. *Tetrahedron Lett.*, 3057–3060.
- [90] Li S., Wang Z., Fang X., Li Y., 1993. Synthesis of (Z)-ligustilide. *Synth. Commun.*, 23, 2909–2913.
- [91] Li Y., Huang H., Wu Y.-L., 2006. Qinghaosu (Artemisinin) - A fantastic antimalarial drug from a traditional chinese medicine, [in:] *Medicinal Chemistry of Bioactive Natural Products*, Wiley-VCH Verlag GmbH. & Co. KGaA, Hoboken, New Jersey, 183–256.
- [92] Li Y., Yang Ch.-S., Teng S.-J., Zhao G., Ding Y., 2001. Total synthesis of four diastereoisomers of Goniofufurone from D-(-)- or L-(+)-tartaric acid. *Tetrahedron*, 57, 2147–2153.
- [93] Lim L.S., Shen P., Gong Y.H., Yong E.L., 2006. Dimeric progestins from rhizomes of *Ligusticum chuanxiong*. *Phytochem.*, 67, 728–734.
- [94] Lipińska E., Gudkow A.W., Karlinkowska S.N., 1972. *Zastosowanie nizyny w serowarstwie*, WNT, Warszawa.
- [95] Lohray B.B., Venkateswarlu S., 1997. Intramolecular S<sub>N</sub>2 ring opening of a cyclic sulfate: Synthesis of erythro-(-)-6-acetoxy-5-hexadecanolide - A major component of mosquito oviposition attractant pheromone. *Tetrahedron: Asymmetry*, 8, 633–638.
- [96] Macias F.A., Oliva R.M., Varela A., Torres J., Molinillo M.G., 1999. Allelochemicals from sunflower leaves cv. Peredovick. *Phytochem.*, 52, 613–621.

- [97] Macias F.A., Galindo J.L.G., Galindo J.C.G., 2007. Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochem.*, 68, 2917–2936.
- [98] MacDonald J.F., Akre R.D., Hill W.B., 1973. Attraction of yellowjackets (*Vespula* spp.) to heptyl butyrate in Washington State (Hymenoptera: Vespidae). *Environ. Entomol.* 2, 375–379.
- [99] MacLeod G., Ames J.M., 1989. Volatile components of celery and celeriac. *Phytochem.*, 28, 1817–1824.
- [100] Marco J.A., Carda M., Murga J., Falomir E., 2007. Stereoselective syntheses of naturally occurring 5,6-dihydropyran-2-ones. *Tetrahedron*, 63, 2929–2958.
- [101] Marques F.A., Lenz C.A., Simonelli F., Maia B.H.L., Vallasco, A.P., Eberlin M.N., 2004. Structure confirmation of a bioactive lactone isolated from *Otoba parvifolia* through the synthesis of a model compound. *J. Nat. Prod.*, 67, 1939–1941.
- [102] Marques D., Steyberg J.P., Burger J.F.W., Young D.A., 1989. Base-catalysed pyran rearrangements of profisetinidins. Chemistry and significance of condensed tannins. Plenum Press, New York, 285.
- [103] Martinez M.M., Onega M.G., Tellado M.F., Seijas J.A., Vazquez-Tato M.P., 1997. 1,6-conjugate addition to *o*-vinylphenyloxazolines. Syntheses of chuangxinol and 3-*n*-butylphthalide. *Tetrahedron.*, 53, 14127–14130.
- [104] Maruhashi M., Hanada K., Mizogami K., Nagakura A., 1992. New phthalide derivative. Patent nr: JP 04334378.
- [105] Mazzini C., Lebreton J., Furstoss R., 1996. Flavin-catalyzed Baeyer-Villiger reaction of ketones: Oxidation of cyclobutanones to  $\gamma$ -lactones using hydrogen peroxide. *J. Org. Chem.*, 61, 8–9.
- [106] McClure C.K., Jung K.-Y., 1991. Pentacovalent oxaphosphorane chemistry in organic synthesis. 2. Total syntheses of (+/-)-*trans*-neocnidilide and (+/-)-*cis*-neocnidilide. *J. Org. Chem.*, 56, 2326–2332.
- [107] McCluskey A., Ackland S.P., Bowyer M.C., Baldwin M.L., Garner J., Walkom C.C., Sakoff J.A., 2003. Cantharidin analogues: synthesis and evaluation of growth inhibition in a panel of selected tumour cell lines. *Bioorg. Chem.*, 31, 68–79.
- [108] Militsina O.I., Kovylyajeva G.I., Bakaleynik G.A., Strobykina I.Y., Kataev V.E., Alfonsov V.A., Musin R.Z., Beskrovny D.V., Litvinov I.A., 2005. Transformation of isosteviol oxime to a lactone under Beckmann reaction conditions. *Mendeleev Commun.*, 9, 27–29.
- [109] Min B.S., Lee S.Y., Kim J.H., Kwon O.K., Park B.Y., An R.B., Lee J.K., Moon H.I., Kim T.J., Kim Y.H., Joung H., Lee H.K., 2003. Lactones from the leaves of *Litsea japonica* and their anti-complement activity. *J. Nat. Prod.*, 66, 1388–1390.
- [110] Mitsuhashi H., Muramatsu T., 1964. Studies constituents umbelliferae plants- .9. Structure cnidilide (+)- neocnidilide. *Tetrahedron*, 20, 1971–1982.
- [111] Momin R.A., Nair M.G., 2002. Antioxidant, cyclooxygenase and topoisomerase inhibitory compounds from *Apium graveolens* Linn. Seeds. *Phytomedicine*, 9, 312–318.
- [112] Momin R.A., Nair M.G., 2001. Mosquitocidal, nematocidal, and antifungal compounds from *Apium graveolens* L. Seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 142–145.
- [113] Momin R.A., Ramsewak R.S., Nair M.G., 2000. Bioactive compounds and 1,3-di[(*cis*)-9-octadecenoyl]-2-[(*cis*, *cis*)-9,12-octadecadienoyl]glycerol from *Apium graveolens* L. seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3785–3788.
- [114] Mori K., Senda S., 1985. Pheromone synthesis. 70. Synthesis of the enantiomers of *cis*-2-methyl-5-hexanolide, the major component of the sex-pheromone of the carpenter bee. *Tetrahedron Lett.*, 41, 541–546.
- [115] Mosandl A., Gunther C., 1989. Stereoisomeric flavor compounds. 20. Structure and properties of  $\gamma$ -lactone enantiomers. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 413–418 .

- [116] Mosandl A., 1997. Progress in the authenticity assessment of wines and spirits. *Anal.*, 25, 31–39.
- [117] Mukaiyama T., 1981. Asymmetric synthesis based on chiral diamines having pyrrolidine ring. *Tetrahedron*, 37, 4111–4119.
- [118] Mukhopadhyaya J.K., Mukhopadhyay C., Ghatak U.R., 1994. Electron-transfer-induced reductive cleavage of  $\gamma$ -lactones to carboxylic acids by sodium-hexamethylphosphoric triamide (HMPA). *Indian. J. Chem. Sect. B*, 33, 132–136.
- [119] Naf R., Velluz A., 1998. Phenols and lactones in Italo-Mitcham peppermint oil *Mentha piperita* L. *Flavour Frag. J.*, 13, 203–208.
- [120] Nagai U., Shishido T., Chiba R., Mitsunashi H., 1965. Studies on constituents of umbelliferae plants. II. Stereochemistry of 3-butylhydrophthalides. *Tetrahedron.*, 21, 1701–1709.
- [121] Naito T., Ikeya Y., Okada M., Mitsunashi H., Maruno M., 1996. Two phthalides from *Ligusticum chuanxiong*. *Phytochem.*, 41, 233–236.
- [122] Naito T., Katsuhara T., Niitsu K., Ikeya Y., Okada M., Mitsunashi H., 1991. Phthalide dimers from *ligusticum-chuanxiong hort.* *Heteroc.*, 32, 2433–2442.
- [123] Naito T., Niitsu K., Ikeya Y., Okada M., Mitsunashi H., 1992. A phthalide and 2-farnesyl-6-methyl benzoquinone from *ligusticum-chuanxiong*. *Phytochem.*, 31, 1787–1789.
- [124] Neerman M.F., 2003. Sesquiterpene lactones: a diverse class of compounds found in essential oils possessing antibacterial and antifungal properties. *Inter. J. Arom.*, 13, 114–120.
- [125] Nobilec E., Anioł M., Wawrzeńczyk C., 1994. Lactones. I. Hydroxylation of dihydro- $\gamma$ -campholenolactone by *Fusarium culmorum*. *Tetrahedron*, 50, 10339–10344.
- [126] Ogawa Y., Maruno M., Wakamatsu T., 1995. Efficient synthesis of naturally-occurring ligustilide. *Synlett*, 871–872.
- [127] Olejniczak T., 2010. Chemoenzymatic synthesis of 2-oxabicyclo[3.3.1]nonan-3-one enantiomers *via* microbial reduction by *Absidia coerulea* AM 93. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 63, 1–10.
- [128] Olejniczak T., 2010. Microbial hydroxylation of non-activated carbon atoms in racemic 2-dodeceno-1-yl-succinic anhydride by *Mortierella isabellina* AM 212. *World J. Microb. Biotech.*, 26, 2053–2060.
- [129] Olejniczak T., Białońska A., 2010. (-)-(1S,5R)-2-Oxabicyclo[3.3.1]nonan-3-one. *Acta Crystall. E*. DOI: 10.1107/S11600536810014339.
- [130] Olejniczak T., Boratyński F., Białońska A. Fungistatic activity of bicyclic lactones. *J. Agri. Food Chem.*, wysłana do druku.
- [131] Olejniczak T., Gawroński J., Wawrzeńczyk C., 2001. Lactones 6. Microbial Lactonization of  $\gamma,\delta$ -Epoxy Esters, *Chirality.*, 13, 302–307.
- [132] Olejniczak T., Grabarczyk M., Wawrzeńczyk C., 2001. Lactones 7. Enantioselective lactonization of racemic ethyl (5,5-dimethyl-2,3-epoxycyclohex-1-yl) acetate. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 11, 243–247.
- [133] Olejniczak T., Mironowicz A., Wawrzeńczyk C., 2003. Lactones 12. Lactonization of  $\gamma,\delta$ -epoxyesters by the enzymatic system of apple fruit and *Jerusalem* artichoke bulb. *Bioorg. Chem.*, 31, 199–205.
- [134] Ortega A., Maldonado E., 1982. A sesquiterpene  $\delta$ -lactone from *Zinnia juniperifolia*. *Phytochem.*, 21, 785–786.
- [135] Ortega A., Vazquez A., Gavino R., Maldonado E., 1995. An elemadiolide from *Zinnia citrea*. *Phytochem.*, 39, 1479–1481.
- [136] Papageorgiou Ch., Benezra C., 1985. Use of enzymatic-hydrolysis of dimethyl malates for a short synthesis of Tulipalin B and of its enantiomer. *J. Org. Chem.*, 50, 1144–1146.
- [137] Paras N.A., MacMillan D.W.C., 2001. New strategies in organic catalysis: The first enantioselective organocatalytic Friedel-Crafts alkylation. *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 4370–4371.

- [138] Passreiter C.M., Isman M.B., 1997. Antifeedant bioactivity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* and their antagonism by  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Biochem. Syst. Ecol.*, 25, 371–377.
- [139] Pospisil J., Marko I.E., 2006. Total synthesis of (*R*)-(+)-goniothalamine and (*R*)-(+)-goniothalamine oxide: first application of the sulfoxide-modified Julia olefination in total synthesis. *Tetrahedron Lett.*, 47, 5933–5937.
- [140] Pour M., Spulak M., Buchta V., Kubanova P., Voprsalova M., Wsól V., Fakova H., Koudelka P., Pourova H., Schiller R., 2001. 3-Phenyl-5-acyloxymethyl-2H,5H-furan-2-ones: Synthesis and Biological activity of a novel group of potential antifungal drugs. *J. Med. Chem.*, 44, 2701–2706.
- [141] Prasad K.R., Anbarasan P., 2007. Stereoselective synthesis of (-)-6-acetoxyhexadecanolide: a mosquito oviposition attractant pheromone. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18, 2479–2483.
- [142] Pushan W., Xuanliang G., Yixiong W., Fukuyama Y., Miura I., Sugawara M., 1984. Phthalides from the rhizome of *Ligusticum-wallichii*. *Phytochem.*, 23, 2033–2038.
- [143] Rabe T., Mullholland D., van Staden J., 2002. Isolation and identification of antibacterial compounds from *Vernonia colorata* leaves. *J. Ethnopharmacol.*, 80, 91–94.
- [144] Rayman K., Hurst A., 1984. Nisin, properties, biosynthesis and fermentation, [in:] *Biotechnology of industrial antibiotics*. Marcel Dekker Inc. New York, 607–629.
- [145] Rios M.Y., Delgado G., Toscano R.A., 1998. Chemical reactivity of phthalides. Relay synthesis of diligustilide, Rel-(3'*R*)-3',8'-dihydrodilgustilide and wallichilide. *Tetrahedron*, 54, 3355–3366.
- [146] Robinson R., Zaki A., 1927. 3-Hydroxycyclohexylacetolactone. *J. Chem. Soc. (Resumed)*, 2411–2413.
- [147] Rosemund K.W., Herzberg H., Schütt H., 1954. Synthesen in der Reihe der Anthelmintika. IV. Die Darstellung von Enol-lactonen cyclischer 1.3-Diketone und deren katalytische Hydrierung. *Chem. Ber.*, 87, 1258–1267.
- [148] Saiah M., Bessodes M., Antonakis K., 1993. Regioselective opening of chiral hydroxy epoxides: A short route to muricatacin and its diastereomer *epi*-muricatacin. *Tetrahedron Lett.*, 34, 1597–1598.
- [149] Saroglou V., Karioti A., Rancic A., Dmas K., Koukoulitsa, C., Zervou M., Skaltsa H., 2010. Sesquiterpene lactones from *Anthemis melanolepis* and their antibacterial and cytotoxic activities. Prediction of pharmacokinetic profile. *J. Nat. Prod.*, 73, 242–246.
- [150] Schmidt T., Peters W., Fronczek F.R., Fischer N.H., 1997. Revision of the structure of dunnianin and related sesquiterpene lactones from *Illicium* species. *J. Nat. Prod.*, 60, 783–787.
- [151] Schmidt T.J., Schmidt H.M., Muller E., Peters W., Fronczek F.R., Truesdale A., Fischer N.H., 1998. New sesquiterpene lactones from *Illicium floridanum*. *J. Nat. Prod.*, 61, 230–236.
- [152] Schrankel K.R., 2004. Safety evaluation of food flavorings. *Toxicology*, 198, 203–211.
- [153] Seco J.M., Quinoa E., Riguera R., 2004. The assignment of absolute configuration by NMR, *Chem. Rev.*, 104, 17–118.
- [154] Sekiya K., Tezuka Y., Tanaka K., Prasain J.K., Namba T., Katayama K., Koizumi T., Maeda M., Kondo T., Kadota S., 2000. Distribution, metabolism and excretion of butylydenephthalide of *Ligustici chuanxiong* rhizoma in hairless mouse after dermal application. *J. Ethnopharmacol.*, 71, 401–409.
- [155] Serra S., Fuganti C., Brenna E., 2005. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends in Biotechnol.*, 23, 193–198.
- [156] Sikorski Z.E., 2002. *Chemia żywności*. WNT, Warszawa
- [157] Silverstein R.M., Webster F.X., Kiemle D.J., 2007. *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.

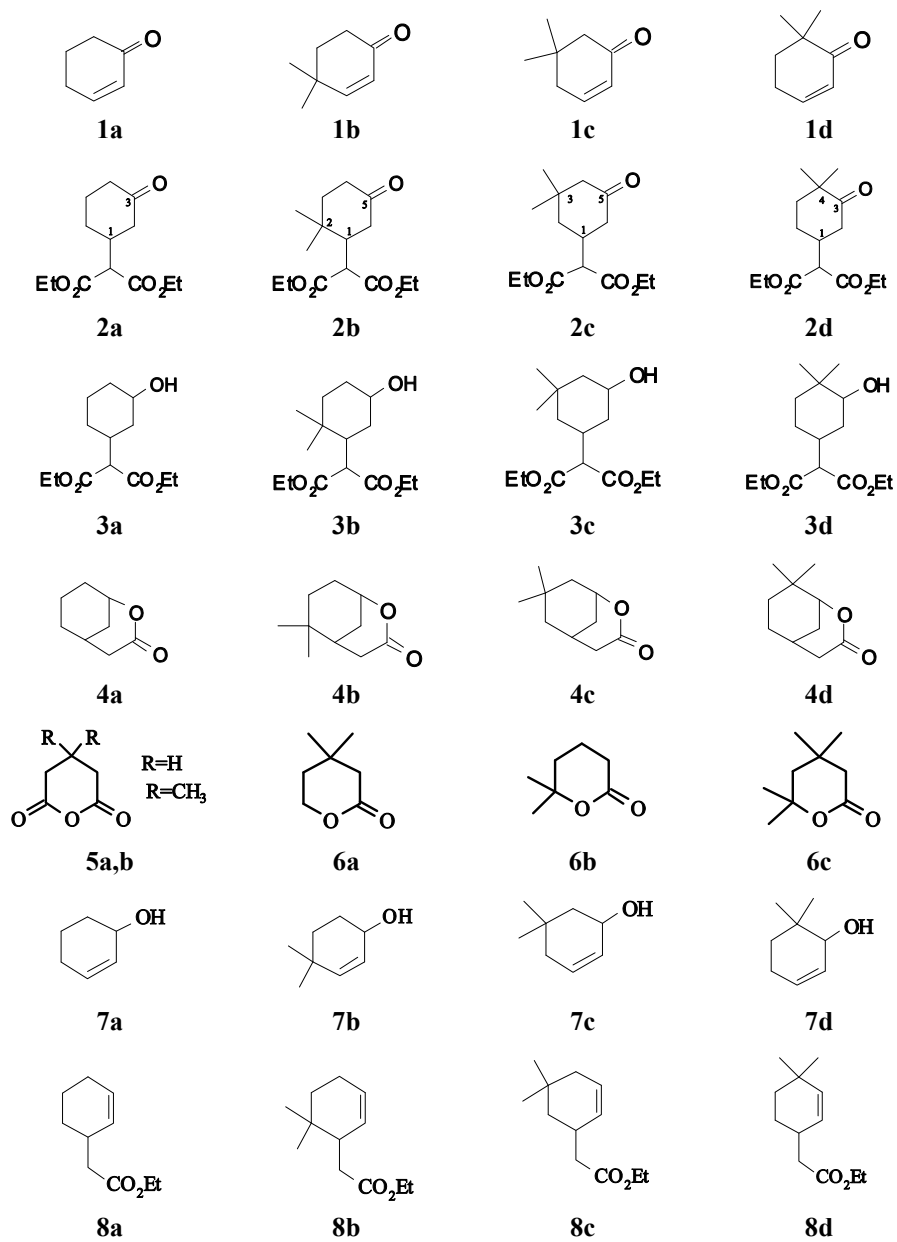
- [158] Skaltsa H., Lazari D., Panagouleas C., Georgiadou E., Garcia B., Sokovic M., 2000. Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity. *Phytochem.*, 55, 903–908.
- [159] Stampfer W., Kosjek B., Faber K., Kroutil W., 2003. Biocatalytic asymmetric hydrogen transfer employing *Rhodococcus ruber* DSM 44541. *J. Org. Chem.*, 68, 402–406.
- [160] Stejskal R., Urban E., 1991. Vollenkle Synthese und Konfigurationszuordnung von potentiell antimikrobiellen 5,6-dihydroxyisobenzofuranonen. *Monat. Chem.*, 122, 145–156
- [161] Suzuki H., Tanaka A., Yamashita K., 1987. Synthesis and absolute configuration of neocnidilide. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 3369–3373.
- [162] Szczepanik M., Olejniczak T., Jurków K., 2008. Feeding deterrent activity of bicyclic lactones obtained from anhydrides of amber- and glutaric acid against colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* say). *Prog. Plant Protect.*, 48 (2), 742–746.
- [163] Tabuchi H., Ichihara A., 1992. Stereochemistry of alternaric acid; Synthesis of the C(9)-C(14) fragment. *Tetrahedron Lett.*, 33, 4933–4936.
- [164] Takahata H., Uchida Y., Momose T., 1995. Concise syntheses of natural  $\gamma$ -butyrolactones, (+)-trans-whisky lactone, (+)-trans-cognac lactone, (-)-methylenolactocin, (+)-nephrosteranic acid, and (+)-roccellaric acid using novel chiral butenolide synthons. *J. Org. Chem.*, 60, 5628–5633.
- [165] Tanabe M., Hamasaki T., Thomas D., Johnson L., 1971. Biosynthetic studies with carbon-13. Asperlin. *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 273–274.
- [166] Tanaka A., Suzuki H., Yamashita K., 1989. Synthesis of (-)-*cis*-neocnidilide. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2253–2256.
- [167] Tanaka A., Yamashita K., 1980. Synthesis of (S)-(+)-methyl  $\alpha,\beta$ -dihydroxy- $\gamma$ -methylenebutyrate and (S)-(-)-Tulipalin B. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 199–202.
- [168] Taylor S.K., 2000. Reactions of epoxides with ester, ketone and amide enolates. *Tetrahedron*, 56, 1149–1163.
- [169] Tian Z., Chen S., Zhang Y., Huang M., Shi L., Huang F., Fong C., Yang M., Xiao P., 2006. The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactones. *Phytomedicine*, 13, 181–186.
- [170] Trost M.B., Rivers G.T., Gold J.M., 1980. Regiocontrolled synthesis of hydroxyphalides. Synthesis of ( $\pm$ )-isochracinic acid and a zealeranone intermediate. *J. Org. Chem.*, 45, 1835–1838.
- [171] Tschudi G., Schinz H., 1952. Synthese der Allo-cyclogeraniumsäure, *Helv. Chim. Acta*, 35, 1230–1235.
- [172] Tsukamoto T., Ishikawa Y., Miyazawa M., 2005. Larvicidal and adulticidal activity of alkylphthalide derivatives from rhizome of *Cnidium officinale* against *Drosophila melanogaster*. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 5549–5553.
- [173] Tuchinda P., Munyoo B., Pohmakotr M., Thinapong P., Sophasan S., Santisuk T., Reutrakul V., 2006. Cytotoxic styryl-lactones from leaves and twigs of *Polyalthia crassa*. *J. Nat. Prod.*, 69, 1728–1733.
- [174] Tzvetkov N.T., Schmoldt P., Neumann B., Stammler H.G., Mattay J., 2006. Synthesis of optically active (1*R*,4*S*,6*S*)-6-hydroxybicyclo[2.2.2]octan-2-one. *Tetrahedron: Asymmetry*, 17, 993–998.
- [175] Wang J., Li H., Zu L., Jiang W., Xie H., Duan W., Wang W., 2006. Organocatalytic enantioselective conjugate additions to enones. *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 12652–12653.
- [176] Wascholowski V., Knudsen K.R., Mitchell C.E.T., Ley S.V., 2008. A general organocatalytic enantioselective malonate addition to  $\gamma,\delta$ -unsaturated enones. *Chem. Eur. J.*, 14, 6155–6165.
- [177] Wawrzęńczyk C., Grabarczyk M., Białońska A., Ciunik Z., 2003. Lactones 16: Lactonization of  $\gamma,\delta$ -epoxy ester with p-toluenosulfonic acid monohydrate. *Tetrahedron*, 45, 6595–6501
- [178] Wedge D.E., Galido J.C.G., Macias F.A., 2000. Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. *Phytochem.*, 53, 747–757.

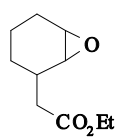


- [179] Wilson C.W., 1970. Relative recovery and identification of carbonyl compounds from celery essential oil. *J. Food Sci.*, 35, 766–768.
- [180] Xu Y., Ohori K., Shibasaki M., 2002. A practical large-scale synthesis of enantiomerically pure 3-[bis(methoxycarbonyl)methyl]cyclohexanone *via* catalytic asymmetric Michael reaction. *Tetrahedron*. 58, 2585–2588.
- [181] Yamamoto T., Ogura M., Amano A., Adachi K., Hagiwara T., Kanisawa T., 2002. Synthesis and odor of optically active 2-*n*-hexyl- and 2-*n*-heptylcyclopentanone and the corresponding  $\delta$ -lactones. *Tetrahedron Lett.*, 43, 9081–9084.
- [182] Yamashita Y., Saito S., Ishitani H., Kobayashi S., 2003. Chiral hetero Diels-Alder products by enantioselective and diastereoselective zirconium catalysis. Scope, limitation, mechanism, and application to the concise synthesis of (+)-prelactone C and (+)-9-deoxygoniopyrone. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 3793–3798.
- [183] Yang Z.C., Zhou W.S., 1996. Asymmetric total syntheses of (+)-goniopyrone and (+)-9-deoxygoniopyrone. *Chinese J. Chem.*, 14, 152–158.
- [184] Yang Z.-C., Zhou W.-S., 1997. Asymmetric total synthesis of antitumor styryl lactones and related natural products. *Heterocycles*, 45, 367–383.
- [185] Yokoi H., Aratake T., Nishio S., Hirose J., Hayashi S., Takasaki Y., 1998. Chitosan production from Shochu distillery wastewater by fungi. *J. Ferment. Bioeng.*, 85, 246–249.
- [186] Zhan J., Gunaherath G.M.K.B., Wijeratne E.M.K., Gunatilaka A.A.L., 2007. Asperpyrone D and other metabolites of the plant-associated fungal strain *Aspergillus tubingensis*. *Phytochemistry*, 68, 368–372.
- [187] Zhang B., Zhu H., Liu X., 2004. Effect to supercritical fluids on C11 $\beta$ -hydroxylation activity of *Absidia coerulea*. *Biotechnol. Prog.*, 1885–1887.
- [188] Zhao Y., Liu C., 2008. Biological production of artemisinin for malaria therapy in medicinal plant biotechnology, [in:] *Medicinal plant biotechnology: From basic research to industrial applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 529–542.
- [189] Zhou W.S., Yang Z.C., 1993. Asymmetric total synthesis of (+)-goniopyrone. *Tetrahedron Lett.*, 34, 7075–7081.

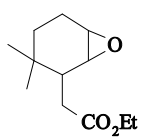
## Apendyks

Wzory i numery substratów i produktów:

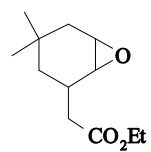




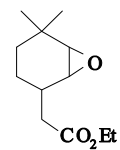
9a



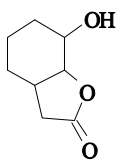
9b



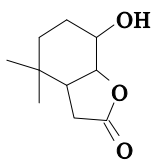
9c



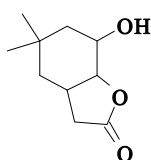
9d



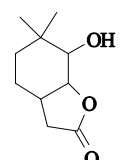
10a



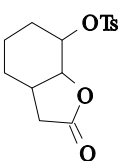
10b



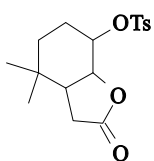
10c



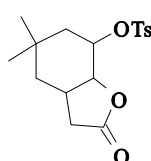
10d



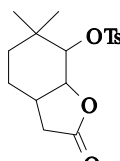
11a



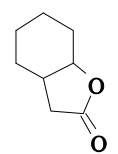
11b



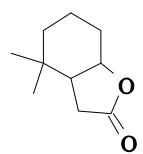
11c



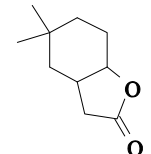
11d



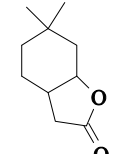
12a



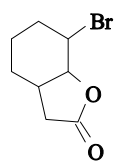
12b



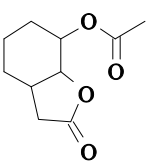
12c



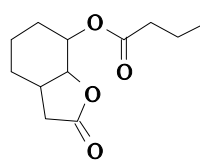
12d



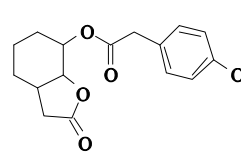
13



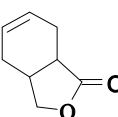
14



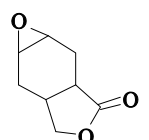
15



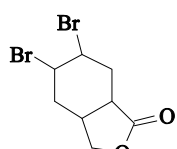
16



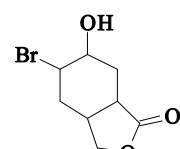
17



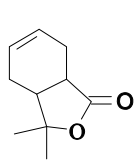
17a



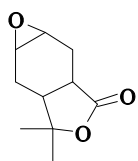
17b



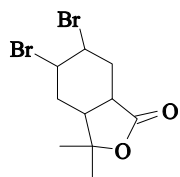
17c



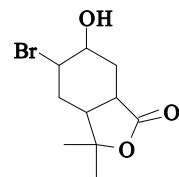
18



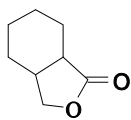
18a



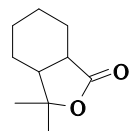
18b



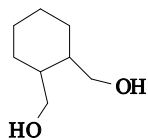
18c



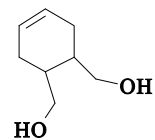
19



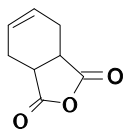
20



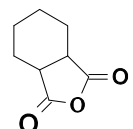
21



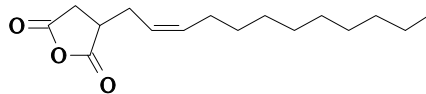
22



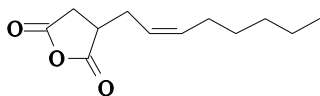
23



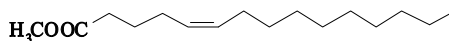
24



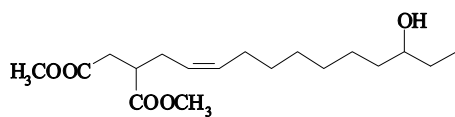
25



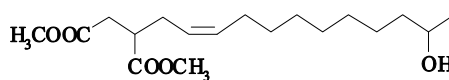
26



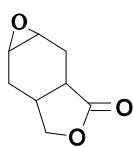
27



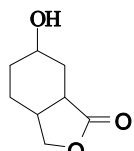
28a



28b

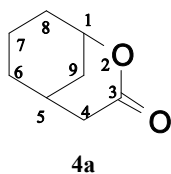


29

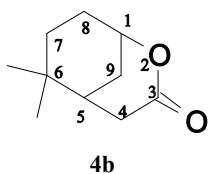


30

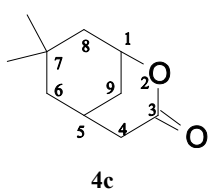
Dane spektralne otrzymanych w badaniach bicyklicznych laktonów:



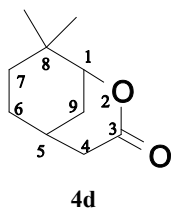
2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-on (**4a**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.74-1.54 (m, 6H,  $^{-7}\text{CH}_2$ -,  $^{-8}\text{CH}_2$ -,  $^{-9}\text{CH}_2$ -), 1.92-2.02 i 2.03-2.08 (dwa m, 2H,  $^{-6}\text{CH}_2$ -), 2.24-2.26 (m, 1H,  $>^5\text{CH}$ -), 2.45 (d,  $J=18.56$  Hz, 1H, jeden z  $^{-4}\text{CH}_2$ -), 2.70 (dd,  $J=18.56$ ,  $J=6.64$  Hz, 1H jeden z  $^{-4}\text{CH}_2$ -), 4.70-4.72 (m, 1H,  $\text{H}^1\text{CO}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 15.93( $^{-8}\text{CH}_2$ -), 25.98 ( $^{-7}\text{CH}_2$ -), 30.31( $^{-9}\text{CH}_2$ -), 30.96 ( $>^5\text{CH}$ -), 35.99 ( $^{-6}\text{CH}_2$ -,  $^{-4}\text{CH}_2$ -), 75.43 ( $\text{H}^1\text{CO}$ ), 171.96 ( $>^3\text{C}=\text{O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1218.14 (s), 1725.55 (s); GC-EIMS: 141 (M+1).



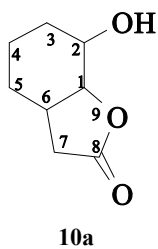
6,6-dimetylo-2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-on (**4b**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 0.86 i 1.04 (dwa s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2^6\text{C}$ <), 1.05-1.15 (m, 4H,  $^{-7}\text{CH}_2$ -,  $^{-8}\text{CH}_2$ -), 1.84-1.88 i 1.90-2.05 (dwa m, 2H,  $^{-9}\text{CH}_2$ -), 2.24-2.26 (m, 1H,  $>^5\text{CH}$ -), 2.45 (dd,  $J=1.8$ , 18.61 Hz, 1H, jeden z  $^{-4}\text{CH}_2$ -), 2.75 (dd,  $J=5.8$ , 18.61 Hz, 1H jeden z  $^{-4}\text{CH}_2$ -), 4.690-4.82 (m, 1H,  $\text{H}^1\text{CO}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 24.3, 25.7( $(\text{CH}_3)_2^6\text{C}$ <), 25.86 ( $^{-8}\text{CH}_2$ -), 28.77( $^{-9}\text{CH}_2$ -), 29.37 ( $^{-4}\text{CH}_2$ -), 41.42 ( $^{-6}\text{CH}_2$ -,  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 49.9 ( $>^5\text{CH}$ -), 75.40 ( $\text{H}^1\text{CO}$ ), 170.7 ( $>^3\text{C}=\text{O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1216.10 (s), 1728.22 (s); GC-EIMS: 169 (M+1).



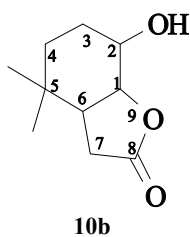
7,7-dimetylo-2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-on (**4c**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 0.85 (dwa s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2^7\text{C}$ <), 1.15-1.20 (m, 4H,  $^{-8}\text{CH}_2$ -,  $^{-9}\text{CH}_2$ -), 1.65-1.89 i (dwa m, 3H,  $^{-6}\text{CH}_2$ -,  $>^5\text{CH}$ -), 2.30 (dd,  $J=6.8$ , 12.6 Hz, 1H, jeden z  $^{-4}\text{CH}_2$ -), 2.50 (dd,  $J=6.8$ , 8.9 Hz, 1H jeden z  $^{-4}\text{CH}_2$ -), 4.44-4.52 (m, 1H,  $\text{H}^1\text{CO}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 22.7, 23.4( $(\text{CH}_3)_2^7\text{C}$ <), 25.54 ( $^{-8}\text{CH}_2$ -), 29.31( $^{-9}\text{CH}_2$ -), 29.87 ( $^{-4}\text{CH}$ -), 40.02 ( $^{-6}\text{CH}_2$ -,  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 48.6 ( $>^5\text{CH}$ -), 76.30 ( $\text{H}^1\text{CO}$ ), 171.2 ( $>^3\text{C}=\text{O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1246.14 (s), 1733.55 (s); GC-EIMS: 169 (M+1).



8,8-dimetylo-2-oksabicyklo[3.3.1]nonan-3-on (**4d**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 0.92 i 1.05 (dwa s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2^8\text{C}$ <), 1.18-1.27 (m, 4H,  $^{-7}\text{CH}_2$ -,  $^{-9}\text{CH}_2$ -), 1.65-1.89 i 1.92-2.15 (dwa m, 3H,  $^{-6}\text{CH}_2$ -,  $>^5\text{CH}$ -), 2.43 (dd,  $J=6.9$ , 18.4 Hz, 1H, jeden z  $^{-4}\text{CH}_2$ -), 2.50 (dd,  $J=3.2$ , 6.9 Hz, 1H jeden z  $^{-4}\text{CH}_2$ -), 4.38-4.51 (m, 1H,  $\text{H}^1\text{CO}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 20.7, 23.7 ( $(\text{CH}_3)_2^8\text{C}$ <), 27.01 ( $^{-9}\text{CH}_2$ -), 28.77 ( $^{-4}\text{CH}$ -), 38.55 ( $^{-6}\text{CH}_2$ -,  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 46.71 ( $>^5\text{CH}$ -), 75.21 ( $\text{H}^1\text{CO}$ ), 170.9 ( $>^3\text{C}=\text{O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1246.14 (s), 1732.22 (s); GC-EIMS: 169 (M+1).

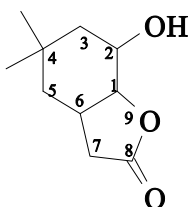


2-hydroksy-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on (**10a**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.34-1.52 (m, 2H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ - i  $-\text{OH}$ ), 1.54-1.74 (m, 4H, jeden z  $^{-3}\text{CH}_2$ -,  $^{-4}\text{CH}_2$ - i jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 1.86-1.92 (m, 1H, jeden z  $^{-3}\text{CH}_2$ -), 2.31 (dd,  $J=9.3$  i 17.1 Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 2.48 (dd,  $J=7.8$  i 17.1 Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 2.70-2.85 (m, 1H,  $>^6\text{CH}$ -), 3.82 (ddd,  $J=4.3$ , 6.5 i 8.9 Hz, 1H,  $>^2\text{CH-OH}$ ), 4.28 (t,  $J=6.5$  Hz, 1H,  $>^1\text{CH}$ -);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 17.9 ( $^{-4}\text{CH}_2$ -), 25.4 ( $^{-5}\text{CH}_2$ -), 29.5 ( $^{-3}\text{CH}_2$ -), 33.8( $^{-7}\text{CH}_2$ -), 34.4( $>^6\text{CH}$ -), 69.3 ( $>^2\text{CHOH}$ ), 84.1 ( $>^1\text{CH}$ -), 177.1 ( $>^8\text{C}=\text{O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3441 (s), 2935 (s), 2252 (m), 1772 (s) 1179 (m), 1010 (m); GC-EIMS: 157 (M+1).



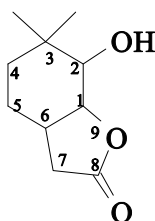
10b

2-hydroksy-5,5-dimetylo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on (**10b**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 0.96 i 1.07 (dwa s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2^5\text{C}$ ), 1.39-1.42 (m, 2H,  $^{-4}\text{CH}_2$ -), 1.50-1.52 (m, 1H,  $^{-3}\text{CH}_2$ -), 1.82 (m, 1H,  $^{-3}\text{CH}_2$ -), 2.29 (dd,  $J=8.2, 17.0$  Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 2.35 (dd,  $J=8.2, 17.0$  Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 2.47 (m, 1H,  $>^6\text{CH}$ -), 3.62 (ddd,  $J=5.1, 8.4, 11.8$  Hz, 1H,  $>^2\text{CH-OH}$ ), 4.37 (dd,  $J=7.5$  i  $8.4$  Hz, 1H,  $>^1\text{CH}$ -);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 17.9 ( $^{-4}\text{CH}_2$ -), 25.4 ( $^{-5}\text{CH}_2$ -), 29.5 ( $^{-3}\text{CH}_2$ -), 33.8 ( $^{-7}\text{CH}_2$ -), 34.4 ( $>^6\text{CH}$ -), 69.3 ( $>^2\text{CHOH}$ ), 83.83 ( $>^1\text{CH}$ -), 175.25 ( $>^8\text{C=O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3430 (s), 2922 (s), 1763 (s), 1169 (m), 1002 (m); GC-EIMS: 185 (M+1).



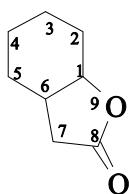
10c

2-hydroksy-4,4-dimetylo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on (**10c**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.01 i 1.04 (dwa s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2^4\text{C}$ ), 1.24-1.42 (m, 3H,  $^{-5}\text{CH}_2$ - i jeden z  $^{-3}\text{CH}_2$ -), 1.59 (dd, 1H,  $J=4.2, 14.0$  Hz, jeden z  $^{-3}\text{CH}_2$ -), 2.26 (d,  $J=13.8$  Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 2.35 (m, 1H,  $>^6\text{CH}$ -), 2.76 (dd, 1H,  $J=13.8$  i  $8.3$  Hz,  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 4.06 (dddd, 1H,  $J=4.2, 5.2, 5.5, 5.9$  Hz,  $>^2\text{CH}$ -), 4.4 (t  $J=5.9$  Hz, 1H,  $>^1\text{CH}$ -); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3464(s), 1784 (s), 1183 (m), 1028 (m); GC-EIMS: 185 (M+1).



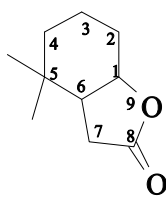
10d

2-hydroksy-3,3-dimetylo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on (**10c**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 0.89 i 1.02 (dwa s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2^3\text{C}$ ), 1.36-1.46 (m, 2H,  $^4\text{CH}_2$ ), 1.60 (ddd, 1H,  $J=3.8, 6.4, 14.9$  Hz, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 1.80 (m, 1H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 2.37-2.40 (m, 2H,  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 2.84 (m, 1H,  $>^6\text{CH}$ -), 3.30 (d,  $J=8.3$  Hz, 1H,  $>^2\text{CH-OH}$ ), 4.36 (dd,  $J=8.3$  i  $8.0$  Hz, 1H,  $>^1\text{CH}$ -);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 18.04 (jeden z  $>^3\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 20.96 ( $^{-5}\text{CH}_2$ -), 28.05 (jeden z  $>^3\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 32.26 ( $^{-7}\text{CH}_2$ -), 32.98 ( $^{-4}\text{CH}_2$ -), 34.97 ( $^{-6}\text{CH}_2$ -), 35.11 ( $^{-3}\text{CH}_2$ -), 77.69 ( $>^2\text{CH-OH}$ ), 83.83 ( $>^1\text{CH}$ -), 175.25 ( $>^8\text{C=O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3430 (s), 2922 (s), 1763 (s), 1169 (m), 1002 (m); GC-EIMS: 185 (M+1).



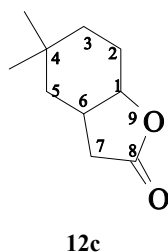
12a

9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on (**12a**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.16-1.71 (m, 7H, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ -,  $^{-3}\text{CH}_2$ -,  $^{-4}\text{CH}_2$ - i  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 2.03 (m, 1H, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ -), 2.19 (dd, 1H,  $J=2.6, 16.7$  Hz, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 2.35 (m, 1H,  $>^6\text{CH}$ -), 2.57 (dd,  $J=6.8, 16.7$  Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 4.45 (m, 1H,  $>^1\text{CH}$ -);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 19.80 i 22.72 ( $^{-2}\text{CH}_2$ - i  $^{-3}\text{CH}_2$ -), 27.06 ( $^{-5}\text{CH}_2$ -), 27.70 ( $^{-4}\text{CH}_2$ -), 34.79 ( $>^6\text{CH}$ -), 37.41 ( $^{-7}\text{CH}_2$ -), 79.09 ( $>^1\text{CH}$ -), 177.53 ( $>^8\text{C=O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1780 (s), 1174 (m), 988 (m); GC-EIMS: 141 (M+1).

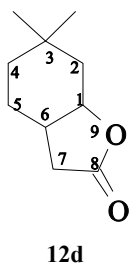


12b

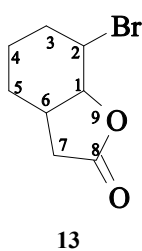
5,5-dimetylo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on (**12b**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 0.90 i 0.96 (dwa s, 6H,  $>^5\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.20-1.65 (m, 6H,  $^{-4}\text{CH}_2$ -,  $^{-3}\text{CH}_2$ -,  $^{-2}\text{CH}_2$ -), 2.01 (m, 1H,  $>^6\text{CH}$ -), 2.28 (m, 2H,  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 4.50 (m, 1H,  $>^1\text{CH}$ -);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 18.36 (jeden z  $>^5\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 27.52 (jeden z  $>^5\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 28.75 ( $^{-2}\text{CH}_2$ -), 28.32 ( $^{-3}\text{CH}_2$ -), 30.21 ( $^{-4}\text{CH}_2$ -), 31.84 ( $^{-5}\text{CH}_2$ -), 33.59 ( $>^6\text{CH}$ -), 45.86 ( $^{-7}\text{CH}_2$ -), 78.34 ( $>^1\text{CH}$ -), 176.97 ( $>^8\text{C=O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1795 (s), 1460 (m), 1160 (m); GC-EIMS: 169 (M+1).



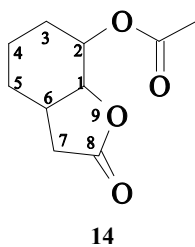
4,4-dimetylo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on (**12c**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 0.90 i 0.93 (dwa s, 6H, ( $>^4\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.04 (dd, 1H,  $J=13.0$  i 12.9 Hz, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 1.26 (dddd, 1H,  $J=2.6, 5.1, 7.5, 13.6$  Hz, jeden z  $^{-3}\text{CH}_2$ -), 1.33-1.43 (m, 2H, jeden z  $^{-3}\text{CH}_2$ - i  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 1.78 (dddd, 1H,  $J=4.0, 5.1, 13.5, 15.6$  Hz, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ -), 2.10 (m, 1H, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ -), 2.16 (d, 1H,  $J=16.7$  Hz, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 2.43 (dddd,  $J=4.4, 6.3, 6.7, 12.9$  Hz, 1H,  $>^6\text{CH}$ -), 2.69 (dd,  $J=6.7, 16.7$  Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 4.49 (m, 1H,  $>^1\text{CH}$ -);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 23.04 (jeden z  $>^4\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 23.61 ( $^{-2}\text{CH}_2$ -), 29.24 ( $^{-4}\text{CH}_2$ -), 31.77 ( $>^6\text{CH}$ -), 32.32 (jeden z  $>^4\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 32.34 ( $^{-3}\text{CH}_2$ -), 38.43 ( $^{-7}\text{CH}_2$ -), 39.93 ( $^{-5}\text{CH}_2$ -), 78.38 ( $>^1\text{CH}$ -), 177.39 ( $>^8\text{C}=\text{O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1784 (s), 1196 (s), 1152 (s), 976 (s), 952 (s); GC-EIMS: 169 (M+1).



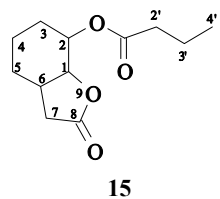
3,3-dimetylo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on (**12d**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 0.89 i 0.94 (dwa s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2^3\text{C}$ ), 1.19 (ddd, 1H,  $J=4.2, 9.4, 13.6$  Hz, jeden z  $^{-4}\text{CH}_2$ -), 1.35 (dddd, 1H,  $J=1.2, 3.9, 7.4, 13.6$  Hz, jeden z  $^{-4}\text{CH}_2$ -), 1.47 (m, 1H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 1.53 (dd, 1H,  $J=5.3$  i 15.0 Hz, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ -), 1.62-1.72 (m, 2H, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ - i jeden z  $^{-3}\text{CH}_2$ -), 2.30 (dd,  $J=5.1, 16.0$  i 5.1 Hz, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 2.42 (m, 1H,  $>^6\text{CH}$ -), 2.51 (dd,  $J=7.0, 16.0$  Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 4.55 (kw,  $J=5.3$  Hz, 1H,  $>^1\text{CH}$ -);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 22.87 ( $^{-2}\text{CH}_2$ -), 28.42 (jeden z  $>^3\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 28.60 ( $^{-2}\text{CH}_2$ -), 29.41 (jeden z  $>^3\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 34.11 ( $>^6\text{CH}$ -), 34.92 ( $^{-4}\text{CH}_2$ -), 35.31 ( $^{-7}\text{CH}_2$ -), 39.92 ( $^{-5}\text{CH}_2$ -), 79.28 ( $>^1\text{CH}$ -), 177.17 ( $>^8\text{C}=\text{O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1775 (s), 1167 (s), 1001 (m), 943 (m); GC-EIMS: 169 (M+1).



2-bromo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on (**13**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.28-1.39 (m, 1H, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ -), 1.48-1.60 (m, 1H, jeden z  $^{-4}\text{CH}_2$ -), 1.71-1.88 (m, 2H, jeden z  $^{-4}\text{CH}_2$ - i jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 1.90-2.11 (m, 2H,  $^{-3}\text{CH}_2$ -), 2.28 (dd,  $J=3.3, 16.9$  Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 2.61 (dd,  $J=6.8, 16.9$  Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 2.70-2.83 (m, 1H,  $>^6\text{CH}$ -), 4.42-4.50 (m, 1H,  $>^2\text{CH}-\text{Br}$ ), 4.60 (dd,  $J=4.3, 4.4$  Hz, 1H,  $>^1\text{C}(\text{O})$ -);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 18.5 ( $^{-4}\text{CH}_2$ -), 26.1 ( $^{-5}\text{CH}_2$ -), 29.3 ( $^{-3}\text{CH}_2$ -), 32.5 ( $^{-7}\text{CH}_2$ -), 36.5 ( $^{-6}\text{CH}_2$ -), 48.2 ( $>^2\text{CHBr}$ ), 81.3 ( $>^1\text{CH}$ -), 175.8 ( $>^8\text{C}=\text{O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1785 (s), 1173 (s), 1019 (s); GC-EIMS: 220, 221 (M+1).

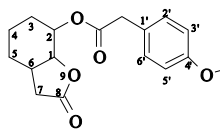


2-acetylo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on (**14**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.34 – 1.59 (m, 1H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 1.60 – 1.76 (m, 4 H, jeden z  $^{-3}\text{CH}_2$ -,  $^{-4}\text{CH}_2$ -, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 1.79 – 1.93 (m, 1H, jeden z  $^{-3}\text{CH}_2$ -), 2.07 (s, 3H,  $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ ), 2.33 (dd,  $J=7.2, 17.1$  Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 2.53 (dd,  $J=7.5, 17$  Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 2.65 – 2.82 (m, 1H,  $>^6\text{CH}$ -), 4.36 (t,  $J=5.9$  Hz, 2H,  $>2\text{CH}$ -,  $>^1\text{CH}-\text{O}$ -);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 17.7 ( $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})$ -), 20.9 ( $^{-4}\text{CH}_2$ -), 25.5 ( $^{-3}\text{CH}_2$ -), 26.5 ( $^{-5}\text{CH}_2$ -), 34.0 ( $^{-7}\text{CH}_2$ -), 34.5 ( $^{-6}\text{CH}_2$ -), 70.4 ( $>^2\text{CH}-\text{O}$ ), 79.4 ( $>^1\text{CH}$ -), 169.8 ( $>\text{C}=\text{O}$ ), 175.9 ( $>^8\text{C}=\text{O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1783 (s), 1730 (s), 1240 (m), 1021 (m); GC-EIMS: 199 (M+1).



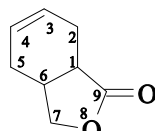
15

2-butyrylo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on (**15**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 0.94 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $^{-4}\text{CH}_3$ ), 1.40 – 1.70 (m, 5H,  $^{-5}\text{CH}_2$ -,  $^{-4}\text{CH}_2$ -, jeden z  $^{-3}\text{CH}_2$ -), 1.65 (sektet,  $J = 7.4$ , 2H,  $^{-3}\text{CH}_2$ -), 2.30 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $-\text{C}(\text{O})$ - $^{-2}\text{CH}_2$ -), 2.31 (dd,  $J = 6.9$ , 17.0 Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 2.53 (dd,  $J = 7.4$ , 17.0 Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 2.64 – 2.76 (m, 1H,  $>^6\text{CH}$ -), 4.35 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H,  $>^1\text{CH}(\text{O})$ -), 4.95 – 5.06 (m, 1H,  $>^2\text{CH}(\text{O})$ -);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 13.4 ( $^{-4}\text{CH}_3$ ), 17.7 ( $^{-3}\text{CH}_2$ -), 18.3 ( $^{-4}\text{CH}_2$ -), 25.6 ( $^{-3}\text{CH}_2$ -), 26.4 ( $^{-5}\text{CH}_2$ -), 34.0 ( $^{-2}\text{CH}_2$ -), 34.7 ( $^{-7}\text{CH}_2$ -), 36.1 ( $>^6\text{CH}$ -), 69.9 ( $^{-2}\text{CH}_2$ -), 79.4 ( $>^1\text{CH}$ -), 172.5 ( $>^8\text{C}=\text{O}$ ), 176.0 ( $>\text{C}=\text{O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1785 (m), 1735 (m), and 1153 (m); GC-EIMS: 227(M+1).



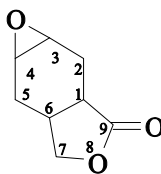
16

2-(p-metoksyfenylo)acetylo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-on (**16**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.30-1.85 (trzy m, 6H,  $^{-5}\text{CH}_2$ -,  $^{-4}\text{CH}_2$ - i  $^{-3}\text{CH}_2$ -), 2.27 (dd,  $J = 6.3$ , 16.8 Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 2.27 (dd,  $J = 7.3$  i 16.8 Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 2.55-2.68 (m, 1H,  $>^6\text{CH}$ -), 3.56 (s, 2H,  $-\text{CH}_2$ -Ph-), 3.77 (s, 3H,  $-\text{O}-\text{CH}_3$ ), 4.31 (t, 1H,  $>^1\text{CH}$ -), 4.98-5.05 (m, 1H,  $^{-2}\text{CH}_2$ -), 6.80-7.20 (cztery m, 4H,  $-\text{C}_6\text{H}_4$ -);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 17.7 ( $^{-4}\text{CH}_2$ -), 25.6 ( $^{-3}\text{CH}_2$ -), 26.2 ( $^{-5}\text{CH}_2$ -), 33.9 ( $^{-7}\text{CH}_2$ -), 34.8 ( $>^6\text{CH}$ -), 40.4 ( $-\text{CH}_2$ -Ph), 55.1 ( $-\text{O}-\text{CH}_3$ ), 70.4 ( $^{-2}\text{CH}_2$ -), 79.1 ( $>^1\text{CH}$ -), 113.8 ( $=^3\text{CH}$ -,  $=^5\text{CH}$ -), 125.7 ( $=^2\text{CH}$ -,  $=^6\text{CH}$ -), 130.1 ( $=^1\text{CH}$ -), 158.6 ( $=^4\text{CH}$ -), 170.7 ( $>\text{C}=\text{O}$ ), 176.0 ( $>^8\text{C}=\text{O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3019 (s), 1782 (m), 1736 (w), 1216 (s); GC-EIMS: 305 (M+1).



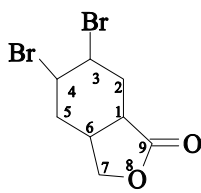
17

8-oksabicyklo[4.3.0]non-4-en-9-on (**17**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.77 – 2.05 (m, 1H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 1.90 – 2.90 (m, 3H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -,  $>\text{CH}$ -, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ -), 2.74 – 2.80 (m, 2H, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ -,  $>^1\text{CH}$ -), 4.0 (dd,  $J = 2.0$ , 8.8 Hz, 1H, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ -), 4.3 (dd,  $J = 5.1$ , 8.8 Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 5.7 (m, 2H,  $=^3\text{CH}$ -,  $-\text{H}^4\text{C}=\text{C}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1771 (s), and 1134 (m); GC-EIMS: 139 (M+1).



17a

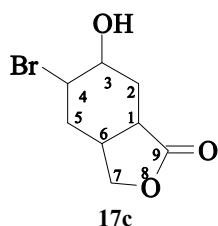
*cis*-3,4-epoksy-*cis*-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-on (**17a**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.66 (dd,  $J = 11.4$ , 15.0 Hz, 1H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 2.17 – 2.26 (m, 1H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 2.31 – 2.37 (m, 1H, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ -), 2.51 (dd,  $J = 7.2$ , 13.9 Hz, 1H, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ -), 2.62 – 2.70 (m, 1H,  $>^1\text{CH}$ -), 3.08 – 3.11 (m, 1H,  $>^6\text{CH}$ -), 3.18 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H,  $-\text{H}^3\text{C}(\text{O})$ -,  $-(\text{O})^4\text{CH}$ -), 3.94 (dd,  $J = 1.1$ , 9.0 Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 4.17 (dd,  $J = 5.1$ , 9.0 Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 20.5 ( $^{-5}\text{CH}_2$ -), 24.6 ( $^{-2}\text{CH}_2$ -), 30.5 ( $>^1\text{CH}$ -), 34.7 ( $>^6\text{CH}$ -), 49.6 ( $-\text{H}^4\text{C}$ -), 51.6 ( $^{-3}\text{CH}$ -), 71.2 ( $^{-7}\text{CH}_2$ -), 178.5 ( $>^9\text{C}=\text{O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1771 (s), 1158 (m); GC-EIMS: 155 (M+1).



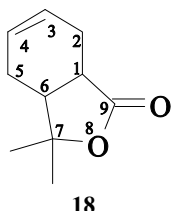
17b

*trans*-3,4-dibromo-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-on (**17b**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.23 (s, 1H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 1.54 (s, 1H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 1.73 – 2.36 (m, 1H, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ -,  $>^1\text{CH}$ -), 3.95 – 4.16 (m, 1H,  $>^6\text{CH}$ -), 4.17 – 4.4 (m, 2H,  $^{-3}\text{CH}(\text{Br})$ -,  $-(\text{Br})^4\text{CH}$ -), 4.53 (d,  $J = 1.6$ , 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 4.62 (d,  $J = 3.0$ , 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 25.4 ( $^{-5}\text{CH}_2$ -), 29.6 ( $^{-2}\text{CH}_2$ -), 32.8 ( $>^6\text{CH}$ -), 36.9 ( $>^1\text{CH}$ -), 47.1 ( $-\text{H}^3\text{C}(\text{Br})$ -), 52.2 ( $-(\text{Br})^4\text{CH}$ -), 70.5 ( $^{-7}\text{CH}_2$ -), 176.9 ( $>^9\text{C}=\text{O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2360 (w), 1767 (m), 1167 (w); GC-EIMS: 299, 300 (M+1).

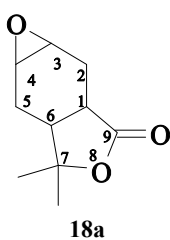




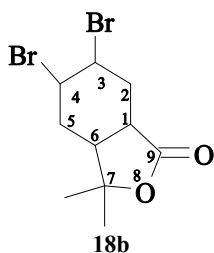
*trans*-4-bromo-3-hydroxy-*cis*-8-oxabicyclo[4.3.0]nonan-9-on (**17c**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.94 – 2.10 (m, 1H, jeden z  $^5\text{CH}_2$ ), 2.11 – 2.25 (m, 1H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ ), 2.26 – 2.56 (m, 3H,  $^{-2}\text{CH}_2$ ,  $>^1\text{CH}$ ), 2.57 – 2.73 (m, 1H,  $>^6\text{CH}$ ), 2.76 – 2.94 (m, 1H,  $>^4\text{CH-Br}$ ), 3.95 – 4.17 (m, 1H,  $>^3\text{CH-OH}$ ), 4.22 (dd,  $J=3.8, 7.6$  Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ ), 4.28 (dd,  $J=5.3, 9.1$  Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 25.0 ( $^{-5}\text{CH}_2$ ), 28.3 ( $^{-2}\text{CH}_2$ ), 31.6 ( $>^6\text{CH}$ ), 36.3 ( $>^1\text{CH}$ ), 50.2 ( $-(\text{Br})^4\text{CH}$ ), 68.0 ( $-\text{H}^3\text{C(OH)}$ ), 71.1 ( $^{-7}\text{CH}_2$ ), 179.0 ( $>^9\text{C=O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3446 (w), 1767 (m); GC-EIMS: 236, 237 (M+1).



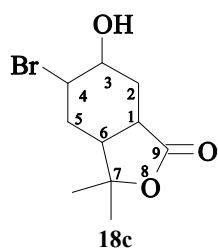
7,7-dimetylo-8-oxabicyclo[4.3.0]non-4-en-9-on (**18**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.38 (s  $J=16.4$  Hz, 6H,  $>\text{C}-(\text{CH}_3)_2$ ), 1.75 – 1.95 (m, 1H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ ), 2.00 – 2.35 (m, 3H, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ , jeden z  $^{-3}\text{CH}_2$ ,  $>^6\text{CH}$ ), 2.36 – 2.56 (m, 1H,  $>^1\text{CH}$ ), 2.95 – 3.18 (m, 1H, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ ), 5.63 – 5.89 (m, 2H,  $=^3\text{CH}$ ,  $-\text{H}^4\text{C=}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 21.9 ( $^{-5}\text{CH}_2$ ), 22.3 ( $^{-2}\text{CH}_2$ ), 23.1 ( $\text{CH}_3$ - $^7\text{C}$ ), 27.1 ( $\text{CH}_3$ - $^7\text{C}$ ), 37.7 ( $>^1\text{CH}$ ), 40.8, ( $>^6\text{CH}$ ), 85.0 ( $>^7\text{C(O)}$ ), 125.0 ( $=^3\text{CH}$ ), 125.3 ( $-\text{H}^4\text{C=}$ ), 178.5 ( $>^9\text{C=O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3019 (s), 1782 (m), 1736 (w), and 1216 (s); GC-EIMS: 167 (M+1).



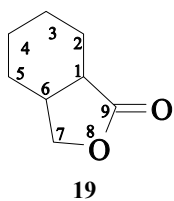
7,7-dimetylo-3,4-epoksy-8-oxabicyclo[4.3.0]nonan-9-on (**18a**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.22 (s, 1H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ ), 1.31 – 1.40 (2s, 6H,  $>\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.56 – 1.74 (m, 1H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ ), 2.10 – 2.25 (m, 1H, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ ), 2.31 – 2.47 (m, 1H, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ ), 2.75 – 2.97 (m, 1H,  $>^1\text{CH}$ ), 3.00 – 3.21 (m, 1H,  $>^6\text{CH}$ ), and 3.25 (t,  $J=4.0$  Hz, 2H,  $-\text{H}^3\text{C(O)}$ -,  $-(\text{O})^4\text{CH}$ -);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 20.9, ( $^{-5}\text{CH}_2$ ), 22.5, ( $\text{CH}_3$ - $^7\text{C}$ ), 23.5 ( $\text{CH}_3$ - $^7\text{C}$ ), 26.7, ( $^{-2}\text{CH}_2$ ), 35.4 ( $>^1\text{CH}$ ), 38.8 ( $>^6\text{CH}$ ), 49.7 ( $-\text{H}^4\text{C}$ ), 51.6 ( $^{-3}\text{CH}$ ), 84.0, ( $-\text{O}^4\text{C(O)}$ ), 178.1 ( $>^9\text{C=O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3019 (w), 2399 (w), 1773 (s), 1215 (m), and 756 (s); GC-EIMS: 183 (M+1).



*trans*-3,4-dibromo-*cis*-7,7-dimetylo-8-oxabicyclo[4.3.0]nonan-9-on (**18b**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.32 – 1.50 (2s, 6H,  $>^7\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.72 – 1.90 (m, 1H,  $^{-5}\text{CH}_2$ ), 2.10 – 2.41 (m, 2H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ , jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ ), 2.44 – 2.60 (m, 1H,  $>^1\text{CH}$ ), 2.89 – 3.04 (m, 1H, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ ), 3.05 – 3.25 (m, 1H,  $>^6\text{CH}$ ), 3.85 – 4.06 (m, 2H,  $>^3\text{CH(Br)}$ -,  $>^4\text{CH(Br)}$ -);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 22.9 ( $\text{CH}_3$ - $^7\text{C}$ ), 25.5 ( $\text{CH}_3$ - $^7\text{C}$ ), 25.9 ( $^{-5}\text{CH}_2$ ), 26.7 ( $^{-2}\text{CH}_2$ ), 36.4 ( $>^1\text{CH}$ ), 38.8 ( $>^6\text{CH}$ ), 47.1 ( $-(\text{Br})^3\text{CH}$ ), 50.8 ( $-\text{H}^4\text{C(Br)}$ ), 83.6 ( $>^7\text{C(O)}$ -) i 176.9 ( $>^9\text{C=O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2977 (s), 1766 (s), 1274 (m), and 1112 (m); GC-EIMS: 326, 327 (M+1).

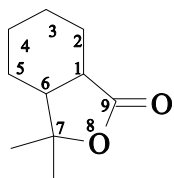


*trans*-4-bromo-3-hydrokso-*cis*-7,7-dimetylo-8-oxabicyclo[4.3.0]nonan-9-on (**18c**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.38 and 1.42 (2s, 6H,  $>\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.87 (ddd,  $J=4.3, 4.4, 14.5$  Hz, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ ), 2.20–2.32 (m, 2H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ , jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ -i  $-\text{OH}$ ), 2.40–2.70 (m, 2H,  $>^1\text{CH}$ - jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ ), 2.96 (dd,  $J=7.0, 7.1$  Hz, 1H,  $>^6\text{CH}$ -) 4.06–4.12 (m, 1H,  $>^4\text{CH-Br}$ ), 4.25–4.32 (m, 1H,  $>^3\text{CH-OH}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 18.7 ( $\text{CH}_3$ - $^7\text{C}$ ), 20.5 ( $\text{CH}_3$ - $^7\text{C}$ ), 20.9 ( $^{-5}\text{CH}_2$ ), 22.0 ( $^{-2}\text{CH}_2$ ), 32.6 ( $>^1\text{CH}$ ), 34.8 ( $>^6\text{CH}$ ), 45.7 ( $-\text{H}^4\text{C(Br)}$ ), 63.3 ( $-(\text{HO})^3\text{CH}$ ), 80.2 ( $-\text{O}^4\text{C(O)}$ -), 174.1 ( $^9\text{C=O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3444 (w), 2253 (m), 1760 (m), 906 (s), and 730 (s); GC-EIMS: 263, 264 (M+1).



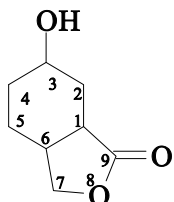
19

8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-on (**19**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 0.80 – 0.98 (m, 1H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 1.05 – 1.30 (m, 5H,  $^{-3}\text{CH}_2$ -,  $^{-4}\text{CH}_2$ -, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ -), 1.34 (d,  $J = 10.2$ , 1H, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ -), 1.45-1.95 (m, 1H, jeden z  $^{-2}\text{CH}_2$ -), 2.10 (dd,  $J = 11.0$ , 23.3 Hz, 1H,  $>^1\text{CH}$ -), 2.35 – 2.70 (m, 1H,  $>^6\text{CH}$ -), 3.92 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 4.16 (dd,  $J = 5.0$ , 8.8 Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 22.4 ( $^{-5}\text{CH}_2$ -), 22.8 ( $^{-3}\text{CH}_2$ -), 23.3 ( $^{-4}\text{CH}_2$ -), 27.1 ( $^{-2}\text{CH}_2$ -), 35.3 ( $>^6\text{CH}$ -), 39.4 ( $>^1\text{CH}$ -), 71.7 ( $^{-2}\text{CH}_2$ -), 178.6 ( $>^9\text{C}=\text{O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2942 (s), 2254 (s), 1766 (s), 1210 (m), and 989 (m); GC-EIMS: 141 (M+1).



20

7,7-dimetyl-8-oksabicyklo[4.3.0]nonan-9-on (**20**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.00 – 1.17 (m, 1H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 1.33 – 1.35 (dwa s, 6H,  $>^7\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.45-1.65 (m, 5H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -,  $^{-4}\text{CH}_2$ -,  $^{-3}\text{CH}_2$ -), 1.65 – 1.79 (m, 2H,  $^{-2}\text{CH}_2$ -), 1.98 – 2.24 (m, 1H,  $>^1\text{CH}$ -), 2.96 (t,  $J = 6.3$  Hz, 1H,  $>^6\text{CH}$ -);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 22.5 ( $^{-3}\text{CH}_2$ -), 22.8 ( $^{-5}\text{CH}_2$ -), 22.9 ( $^{-4}\text{CH}_2$ -), 23.6 ( $\text{CH}_3$ - $^7\text{C}$ ), 25.1 ( $\text{CH}_3$ - $^7\text{C}$ ), 26.1 ( $^{-2}\text{CH}_2$ -), 39.9 ( $>^1\text{CH}$ -), 43.5 ( $>^6\text{CH}$ -), 84.0 ( $>^7\text{C}-\text{O}$ ), 177.6 ( $>^9\text{C}=\text{O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2937 (m), 2254 (m), 1758 (s), 911 (s), and 731 (s); GC-EIMS: 169 (M+1).



30

8-hidroksy-*cis*-3-oksabicyklo[4.3.0]nonan-2-on (**26**):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.54 – 1.6 (m, 1H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 1.82 – 1.98 (m, 1H, jeden z  $^{-5}\text{CH}_2$ -), 2.12 – 2.46 (m, 3H,  $^{-2}\text{CH}_2$ -,  $>^6\text{CH}$ -), 2.60 – 2.67 (m, 1H,  $>^1\text{CH}$ -), 3.65 – 3.84 (m, 1H,  $>^3\text{CH}-\text{OH}$ ), 4.22 (dd,  $J = 3.8$  7.6 Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -), 4.23 (dd,  $J = 7.6$  Hz i  $J = 9.2$  Hz, 1H, jeden z  $^{-7}\text{CH}_2$ -);  $^{13}\text{C}$  NMR (151 Mz),  $\delta$  (ppm): 22.4 ( $^{-5}\text{CH}_2$ -), 25.3, ( $^{-4}\text{CH}_2$ -), 28.7 ( $^{-2}\text{CH}_2$ -), 32.1 ( $>^6\text{CH}$ -), 36.7 ( $>^1\text{CH}$ -), 69.5 ( $-(\text{HO})^3\text{CH}$ -), 72.3 ( $^{-7}\text{CH}_2$ -), 176.2 ( $>^9\text{C}=\text{O}$ ); IR (film,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3443 (s), 2938 (s), 2248 (m), 1768 (s) 1172 (m), 1010 (m) ; GC-EIMS: 157 (M+1).