

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ  
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ  
ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ**

**ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ  
ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ  
ΜΕ ΕΛΚΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΑ  
*DROSOPHILA MELANOGASTER* ΚΑΙ  
*RHYNCHOPHORUS SPP.***

**ΚΑΛΛΕΡΓΗ ΜΑΡΙΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΣΜΟΝΟΥ ΙΟΥΛΙΑ**

**2011**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**  
**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΜΕ**  
**ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ**

**ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ**  
**ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΜΕ ΕΛΚΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΑ**  
***DROSOPHILA MELANOGASTER* ΚΑΙ *RHYNCHOPHORUS SPP.***

**ΚΑΛΛΕΡΓΗ ΜΑΡΙΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ : ΣΜΟΝΟΥ ΙΟΥΛΙΑ**

**2011**



**UNIVERSITY OF CRETE**  
**DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

**GRADUATE PROGRAM**  
**ISOLATION AND SYNTHESIS OF NATURAL PRODUCTS WITH**  
**BIOLOGICAL ACTIVITY**

**BIOCATALYTIC APPLICATIONS IN THE SYNTHESIS OF**  
**NATURAL PRODUCTS WITH TRACTIVE ACTIVITY IN**  
**INSECTS *DROSOPHILA MELANOGASTER* AND**  
***RHYNCHOPHORUS SPP.***

**KALLERGI MARIA**

**SUPERVISOR PROFESSOR: SMONOU I.**

**2011**

# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

## ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

1. **Σμόνου Ιουλία**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)  
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας.
2. **Στρατάκης Εμμανουήλ**, Καθηγητής,  
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας
3. **Βασιλικογιαννάκης Γεώργιος**, Αναπληρωτής Καθηγητής,  
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Σμόνου Ιουλίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την επιβλέπουσα, Καθηγήτρια Ι. Σμόνου, όχι μόνο για την ανάθεση του θέματος της διατριβής αυτής, αλλά και για την υλικοτεχνική υποδομή και την οικονομική βοήθεια που μου παρείχε. Την ευχαριστώ επίσης για την υποστήριξη και ενθάρρυνση της στις δυσκολίες που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της διατριβής.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Μ. Στρατάκη για τις πολύτιμες συμβουλές, για τη διδασκαλία του στα μεταπτυχιακά μαθήματα καθώς και που δέχτηκε να είναι μέλος της εξεταστικής επιτροπής.

Ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γ. Βασιλικογιαννάκη για τις εποικοδομητικές συζητήσεις στο συνθετικό μέρος της διατριβής, για τα μεταπτυχιακά μαθήματα και που δέχτηκε να είναι μέλος της εξεταστικής επιτροπής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μ. Ορφανόπουλο όχι μόνο για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε, αλλά και για τα μεταπτυχιακά μαθήματα

Ευχαριστώ την Κ. Βελώνια για την ευγενική προσφορά της CAL-B, για τις εποικοδομητικές συζητήσεις και για την υποστήριξη της.

Καθοριστικό ρόλο στην πραγματοποίηση της διατριβής αυτής είχε ο Δρ. Δ. Καλαϊτζάκης. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την σημαντική βοήθεια και συμπαράσταση του, το ενδιαφέρον που επέδειξε στην επίλυση όλων των προβλημάτων που παρουσιάστηκαν θεωρώ ότι ήταν καθοριστικά στην διεκπεραίωση της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τους φίλους και συνεργάτες Α. Μπαριωτάκη και Χ. Μάρκου, για την άγιοη συνεργασία τους, τις εποικοδομητικές συζητήσεις και κυρίως για το θαυμάσιο κλίμα που υπήρχε στο εργαστήριο.

Τέλος ευχαριστώ βαθύτατα τον σύζυγο μου Γιώργο και την οικογένεια μου για την υπομονή, και την υποστήριξη όλο αυτό το διάστημα

# ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

## Καλλέργη Μαρία

**Διεύθυνση** Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης  
Βούτες – Ηράκλειο 71003, Κρήτη

**Τηλέφωνο** 00302810545009 (Lab), 00306947377176 (Mob)

**E-MAIL** Kallergi\_ma1@yahoo.gr

**Ημερομηνία γέννησης** 09/02/1984

## ΣΠΟΥΔΕΣ

- 2001-2006** Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτική παραγωγής και αγροτικού περιβάλλοντος. Βαθμός πτυχίου 6,86
- 2005** Διπλωματική εργασία στο Εργαστήριο Εντομολογίας με τίτλο: “Μελέτη της γενετικής πληθυσμών της αφόδας *Myzus persicae* (Hemiptera:Aphididae) με μοριακές μεθόδους” με επιβλέποντα Καθηγητή τον κ. Ι. Τσιτσιπή, καθηγητής Εντομολογίας.
- 27/04–01/05 2011** Εκπαίδευση στο Ευρωπαϊκό Σεμινάριο εκμάθησης, με θέμα: Διαδοχικές Χημειοενζυμικές Διαδικασίες – Νέες Συνεργίες μεταξύ Χημείας και Βιοχημείας, Σιένα, Ιταλία
- 2008-2011** Δίπλωμα ειδίκευσης στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών “Απομόνωση και σύνθεση φυσικών προϊόντων με βιολογική δραστικότητα” με επιβλέπουσα την Καθηγήτρια. Ι. Σμόνου.

## ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Μέλος ερευνητικής ομάδας σε εργαστήριο Εντομολογίας 1/9/2005 – 31/12/2005. Έργο: Πυθαγόρας II - Ερευνητικές Ομάδες στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Συντονιστής Ι. Τσιτσιπής, Καθηγητής Εντομολογίας Τμήμα Γεωπονίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Βοηθός προπτυχιακού εργαστηρίου Οργανικής Χημείας II, Εαρινό εξάμηνο 2009, Υπεύθυνος Α. Καταχανάκης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

### ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ – ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 4<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Λιβαδοπονικό Συνέδριο, 10 - 12 Νοεμβρίου **2004**, Βόλος
- Νέες τεχνολογίες για την θερμοκήπια φιλικά στο περιβάλλον, με έμφαση στην υδροπονία, 16 Δεκεμβρίου, **2004**, Λάρισα
- 14<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Ζιζανιολογικής Εταιρίας, 7 - 8 Δεκεμβρίου **2006**, Βόλος
- Συστήματα Ολοκληρωμένης Διαχείρισης στις γεωργικές εκμεταλλεύσεις, EUREPGAP, AGRO 2.1 & AGRO 2.2 . TUV HELLAS, ΓΕΩΤ.Ε.Ε Παράρτημα Κρήτης. 12 - 13 Μαΐου **2007**, Ηράκλειο
- Αρχές Επιθεώρησης και Πιστοποίησης προϊόντων Βιολογικής Γεωργίας, ΒΙΟΕΛΛΑΣ, 23-24 Μαΐου **2009**, Ξενοδοχείο Capsis, Θεσσαλονίκη.

### ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ – ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- **Καλλέργη Μ.**, Καλαϊτζάκης Δ., Σμόνου Ι., « Χημειοενζυμική Σύνθεση του (R)-3-υδροξυεξανικού (S)-2- πεντυλεστέρα» 3ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Κύπρου Ελλάδας, 23 - 27 Ιουνίου **2010**, Πρωταράς, Κύπρος, *oral presentation*.
- **Kallergi M.** Kalaitzakis D. Smonou I. "Enzymatic Total Synthesis of Banana's Volatile (S)-2-Pentyl (R)-3-Hydroxyhexanoate" CASCADE Chemoenzymatic Processes - New Synergies Between Chemistry and Biochemistry, 27 Apr – 01 May **2011**, Siena, Italy, *poster presentation*.
- **Kallergi M.** Kalaitzakis D. Smonou I. "Enzymatic Total Synthesis of Banana's Volatile (S)-2-Pentyl (R)-3-Hydroxyhexanoate" 17th European Symposium on Organic Chemistry, 10 – 15 July **2011**, Crete, Greece, *poster presentation*.

### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- **Kallergi, M.**; Kalaitzakis, D.; Smonou, I. "Enzymatic Total Synthesis of Banana's Volatile (S)-2-Pentyl (R)-3-Hydroxyhexanoate". *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3946-3950.

# CURRICULUM VITAE

## Kallergi Maria

**Address** Department of Chemistry, University of Crete  
Heraklion 71003, Crete, GREECE

**Telephone** 00302810545009 (Lab), 00306947377176 (Mob)

**E-MAIL address** Kallergi\_ma1@yahoo.gr

**Nationality** Greek

**Date of Birth** 09/02/1984

## EDUCATION AND TRAINING

- 2001-2006** Bachelor in Agriculture, University of Thessaly  
School of Agricultural Sciences, Department of Crop Production  
and Rural Environment
- 2005** Diploma thesis “Study of population genetics of the aphid *Myzus persicae* (Hemiptera:Aphididae) by molecular methods.”
- 27/04–01/05 2011** Training school on CASCADE Chemoenzymatic Processes-New  
Synergies Between Chemistry and Biochemistry, Siena, Italy
- 2008-present** Graduate student performing research for MSc. Degree  
University of Crete, Department of Chemistry, Graduate Program  
“Isolation and Synthesis of Natural Products with Biological  
Activity” Supervisor: Prof. Smonou I.

## PROFESSIONAL EXPERIENCE

- Research work, 1/9/2005 – 31/12/2005,  
University of Thessaly, Project: Pythagoras II - Research Groups at the  
University of Thessaly, Coordinator John A. Tsitsipis, Professor of  
Entomology
- Teaching assistant, Spring semester 2009,  
University of Crete, Dept. of Chemistry, Organic Chemistry II undergraduate  
Laboratory. Instructor: A. Katachanakis



### SEMINARS – CONFERENCES ATTENDED

- 4th National Rangeland Congress, 10 to 12 November **2004**, Volos
- New technologies for greenhouse-friendly environment with emphasis on hydroponics, December 16, **2004**, Larissa
- 14th Scientific Conference of the Greek Company of Weed, 7 to 8 December **2006**, Volos
- Integrated Management Systems in farms, EUREPGAP, AGRO 2.1 & AGRO 2.2 . TUV HELLAS, GEOT.E.E Crete Branch. 12 to 13 May **2007**, Heraklion
- Principles of Inspection and Certification of organic produce, BIOHELLAS, 23-24 May **2009**, Hotel Capsis, Thessaloniki

### PRESENTATION IN CONFERENCES

- **Kallergi M.** Kalaitzakis D. Smonou I.” Formal Enzymatic Synthesis of Banana’s Volatile (S)-2-Pentyl (R)-3-Hydroxyhexanoate” 3rd Congress of Graduate Students in Chemistry Cyprus Greece ,23-27 June **2010**, Protaras, Cyprus, *oral presentation*.
- **Kallergi M.** Kalaitzakis D. Smonou I.”Enzymatic Total Synthesis of Banana’s Volatile (S)-2-Pentyl (R)-3-Hydroxyhexanoate” CASCADE Chemoenzymatic Processes - New Synergies Between Chemistry and Biochemistry, 27 Apr – 01 May **2011**, Siena, Italy, *poster presentation*.
- **Kallergi M.** Kalaitzakis D. Smonou I.”Enzymatic Total Synthesis of Banana’s Volatile (S)-2-Pentyl (R)-3-Hydroxyhexanoate” 17th European Symposium on Organic Chemistry, 10 – 15 July **2011**, Crete, Greece, *poster presentation*.

### PUBLICATIONS

- **Kallergi, M.;** Kalaitzakis, D.; Smonou, I. “Enzymatic Total Synthesis of Banana’s Volatile (S)-2-Pentyl (R)-3-Hydroxyhexanoate ” *Eur. J. Org. Chem.* **2011**. 3946-3950.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν οι στερεοεκλεκτικές ενζυμικές αναγωγές με NAD(P)H-εξαρτώμενες, απομονωμένες κετορεδουκτάσες για τη σύνθεση πολύτιμων χειρόμορφων ενδιάμεσων, οπτικώς ενεργών. Επίσης πραγματοποιήθηκε χημειοενζυμική σύνθεση φυσικών προϊόντων

Τα φρούτα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης εκλύουν ένα χαρακτηριστικό άρωμα που οφείλεται σε πτητικούς εστέρες. Οι ώριμες μπανάνες εκλύουν τον εστέρα (*R*)-3-υδροξυεξανοϊκού (*S*)-2- πεντυλεστέρα γνωστό σαν **Banana volatile**, το οποίο είναι φυσικό προϊόν και έλκει την κοινή μύγα των φρούτων, *Drosophila melanogaster*. Στο πρώτο κεφάλαιο παρουσιάζεται η πρώτη σύνθεση αυτού του φυσικού προϊόντος με χημειοενζυμική μέθοδο. Στην μέθοδο αυτή τα στάδια-κλειδιά για την δημιουργία των δύο στερεογονικών κέντρων περιλαμβάνουν βιοκαταλυτικούς μετασχηματισμούς με συνδυασμό οξειδοαναγωγικών και υδρολυτικών ενζύμων. Η συνολική σύνθεση αποτελείται από τέσσερα στάδια και το προϊόν συντίθεται σε υψηλές αποδόσεις και υψηλή στερεοεκλεκτικότητα.

Οι σημαντικότεροι εχθροί των φοινικοειδών θεωρούνται σήμερα ο Κόκκινος Ρυγχωτός Κάνθαρος των Φοινικοειδών *Rhynchophorus ferrugineus* (red palm weevil), ο γίγας ρυγχωτός κάνθαρος *R. Cruentatus*, (giant palm weevil) και ο Αφρικανικός ρυγχωτός κάνθαρος *R. Phoenix* (African palm weevil). Στο δεύτερο κεφάλαιο παρουσιάζεται η χημειοενζυμική σύνθεση των φερομονών **Ferrugineol**, **Cruentol** και **Phoenicol**, οι οποίες είναι φερομόνες συνάθροισης και παράγονται από τα αρσενικά έντομα των *Rhynchophorus spp.* Στη σύνθεση χρησιμοποιήθηκε σαν αντίδραση κλειδί η ενζυμική αναγωγή με απομονωμένες κετορεδουκτάσες για την στερεοεκλεκτική αναγωγή 1,3-δικετοεστέρων.

## SUMMARY

In the present dissertation the stereoselective enzymatic reductions by using NAD(P)H-dependent isolated ketoreducases were studied for the synthesis of valuable chiral intermediates optically active. Also the chemoenzymatic synthesis of natural products.

The fruit during ripening emit a characteristic smell due to volatile esters. The ripe bananas emit ester (S)-2-pentyl (R)-3-hydroxyhexanoate known as Banana volatile, which is a natural product and attracts the common fruit fly, **Drosophila melanogaster**. Isolation and determination of absolute stereochemistry of optically active product, was recently (2009) by Mowat and his team. In the first chapter presents the first synthesis of this natural product chemoenzymatic method. In this method the key step for the creation of two stereogenic centers Biocatalytic transformations include a combination of oxidation-reduction and hydrolytic enzymes. The whole composition consists of four stages and the product synthesized in high yields and high stereoselectivity

The most important pests of palm trees are now the Red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (red palm weevil), a giant weevil *R. Cruentatus*, (giant palm weevil) and the African weevil *R. Phoenix* (African palm weevil). The second chapter presents the chemoenzymatic synthesis of pheromones Ferrugineol, Cruentol and Phoenicol, which are aggregation pheromones produced by male insects *Rhynchophorus* spp. The composition was used as the key enzymatic reaction with isolated reduction ketoreducases for stereoselective reduction of 1.3-diketoesteron.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΣΕΛΙΔΑ
Τριμελής εξεταστική επιτροπή .....	4
Ευχαριστίες.....	5
Βιογραφικό σημείωμα στα Ελληνικά.....	6
Βιογραφικό σημείωμα στα Αγγλικά.....	8
Περίληψη στα Ελληνικά.....	10
Περίληψη στα Αγγλικά.....	11
Περιεχόμενα.....	12

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένζυμα στην οργανική σύνθεση.....	14
Κετορεδουκτάσες.....	18
Λιπάσες.....	24

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

«Χημειοενζυμική Σύνθεση του (R)-3-υδροξυεξανικού (S)-2-πεντυλεστέρα, πτητικού συστατικού της μπανάνας».....	29
Εισαγωγή.....	30
Αποτελέσματα – Συζήτηση .....	34

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

«Χημειοενζυμική Σύνθεση της Ferrugineol, Φερομόνη συνάθροισης του εντόμου <i>Rhynchophorus ferrugineus</i> ».....	41
Εισαγωγή.....	42
Αποτελέσματα – Συζήτηση .....	48
Πειραματικό μέρος.....	57
Βιβλιογραφία.....	72

# **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## ENZYMA ΣΤΗΝ ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

Η ερευνητική προσπάθεια για την ανακάλυψη πιο αποδοτικών αντιδραστηρίων και καταλυτών, πλαίσια της Οργανικής Χημείας με σκοπό τη σύνθεση πολύπλοκων μορίων, είναι ιδιαίτερα έντονη και διαρκής. Ένας από τους σημαντικότερους στόχους των συνθετικών οργανικών χημικών είναι η ανακάλυψη μεθόδων για την στερεοελεγχόμενη παρασκευή οπτικώς ενεργών ενώσεων. Ιδιαίτερα όσον αφορά στην παρασκευή νέων φαρμακευτικών ενώσεων, όπου η σχέση μεταξύ χειρομορφίας και βιολογικής δραστηριότητας είναι εξαιρετικά σημαντική,<sup>1</sup> η ανάπτυξη μεθόδων σύνθεσης καθαρών εναντιομερών είναι πλέον απαραίτητη. Βασική βέβαια προϋπόθεση είναι οι μέθοδοι σύνθεσης οπτικώς ενεργών μορίων να είναι, εκτός από αποδοτικές, περιβαλλοντικά και οικονομικά αποδεκτές. Τα τελευταία χρόνια γίνονται αρκετές προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων καταλυτών, είτε χημικών<sup>2</sup>, είτε βιοκαταλυτών – ενζύμων<sup>3</sup>.

Η χρήση των ενζυμικών διεργασιών ξεκίνησε από παλιά κατά τη μετατροπή του γάλακτος σε τυρί και την παραγωγή κρασιού και μύρας από του αρχαίους Αιγυπτίους και Έλληνες. Οι παραπάνω διαδικασίες έχουν βασιστεί σε ένζυμα παραγόμενα από μικροοργανισμούς που είτε αναπτύσσονταν στο μέσο της βιομετατροπής είτε είχαν προστεθεί σε αυτό. Η χρήση των φυσικών καταλυτών – κυρίως ενζύμων – για την μετατροπή οργανικών ενώσεων δεν είναι κάτι καινούριο καθώς χρησιμοποιούνται, είτε σαν ολόκληρα κύτταρα είτε σαν απομονωμένα ένζυμα, για περίπου έναν αιώνα.<sup>4</sup>

Τα κύρια χαρακτηριστικά που διακρίνουν τους βιοκαταλύτες από τους χημικούς καταλύτες, παρουσιάζονται στη συνέχεια.<sup>5</sup>

- Είναι πολύ αποτελεσματικοί καταλύτες. Γενικά οι ταχύτητες των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων είναι μεγαλύτερες κατά ένα παράγοντα της τάξης του  $10^8 - 10^{10}$ . Σε κάποιες περιπτώσεις η αύξηση της ταχύτητας μπορεί να υπερβεί τον παράγοντα  $10^{12}$ , τιμή την οποία οι χημικοί καταλύτες δεν είναι εύκολο να την επιτύχουν<sup>6</sup>.
- Τα ένζυμα είναι περιβαλλοντικά αποδεκτοί καταλύτες σε σχέση με τους χημικούς καταλύτες βαρέων μεταβατικών μετάλλων καθώς είναι αποικοδομήσιμα στο περιβάλλον και λειτουργικά σε υδατικά διαλύματα.

- Είναι ενεργά κάτω από ήπιες συνθήκες όπως σε θερμοκρασία 20 – 40 °C καθώς και σε pH 5 – 8. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση των παράπλευρων μη επιθυμητών αντιδράσεων, όπως οι αποικοδομήσεις, ισομεριώσεις, αντικαταστάσεις και ρακεμοποιήσεις.
- Δυνατότητα της χρήσης ενός αριθμού ενζύμων ταυτόχρονα, πραγματοποιώντας πολλά στάδια αντίδρασης, δεδομένου ότι τα περισσότερα ένζυμα δρουν κάτω από παρόμοιες συνθήκες
- Δέχονται αρκετά μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων καταλύοντας αντιδράσεις είτε φυσικών είτε τεχνητών μη φυσικών υποστρωμάτων συμβάλλοντας δυναμικά στην οργανική σύνθεση. Μόλις τη δεκαετία του 1980 άρχισε η δυναμική εφαρμογή των φυσικών καταλυτών για τη μετατροπή μη φυσικών οργανικών ενώσεων και από τότε συνεχίζεται με επιτυχία, με αποτέλεσμα την ραγδαία εξέλιξη του πεδίου της βιοκατάλυσης.
- Πολλοί από τους βιοκαταλύτες είναι εμπορικά διαθέσιμοι και εύκολοι στη χρήση όπως οι χημικοί καταλύτες. Για την ανακάλυψη επιπλέον νέων βιοκαταλυτών είναι απαραίτητη η καλλιέργεια κυττάρων από καλλιέργειες σπόρων (seed cultures), οι οποίοι μπορεί να είναι εμπορικά διαθέσιμοι.

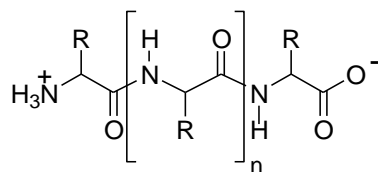
Τα ένζυμα έχουν ταξινομηθεί από τη διεθνή ένωση βιοχημείας (International Union of Biochemistry) σε έξι κύριες ομάδες:

1. **Οξειδοοξειδοκτάσεις**, που καταλύουν τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και τις αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου.
2. **Τρανσφεράσες** που καταλύουν τη μεταφορά λειτουργικών ομάδων, όπως άκυλο και φωσφορικών ομάδων ή σακχάρων, από ένα μόριο σε άλλο
3. **Υδρολάσες** που καταλύουν την υδρόλυση αμιδίων, εστέρων και πεπτιδίων.
4. **Λυάσες** που καταλύουν τις αντιδράσεις προσθήκης σε διπλούς δεσμούς καθώς και τις αντίστροφες αντιδράσεις απόσπασης.
5. **Ισομεράσες** που καταλύουν αντιδράσεις ισομερισμού όπως τη μετακίνηση διπλών δεσμών, Z/E ισομερισμούς και αντιδράσεις ρακεμοποίησης.
6. **Λιγκάσες** που καταλύουν το σχηματισμό δεσμών C-O, C-S, C-N, C-C και δεσμούς φωσφορικών εστέρων.

Από τις έξι κύριες ομάδες ενζύμων, οι οξειδοοδουκτάσες και οι υδρολάσες έχουν αποδειχθεί περισσότερο χρήσιμες στην οπτική ενεργοποίηση ρακεμικών υποστρωμάτων. Οι αλκοολικές αφυδρογονάσες που ανήκουν στην κατηγορία των οξειδοοδουκτάσων χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την ασύμμετρη σύνθεση οπτικά ενεργών αλκοολών. Οι υδρολάσες είναι η κατηγορία των ενζύμων που έχει εκτενέστατα διερευνηθεί για την πραγματοποίηση αντιδράσεων οπτικού διαχωρισμού. Τα αποτελέσματα είναι πολύ ικανοποιητικά εφόσον πληθώρα αλκοολών, εστέρων, καρβοξυλικών οξέων, αμινών, αμιδίων, λακτονών, έχουν διαχωριστεί στα εναντιομερή τους με υψηλή απόδοση, αποτελεσματικότητα και απλές πειραματικές συνθήκες.

### Δομικά χαρακτηριστικά και εκλεκτικότητα των ενζύμων

Τα ένζυμα είναι μακρομόρια πρωτεϊνικής φύσεως και αποτελούνται από αμινοξέα συνδεδεμένα μεταξύ τους με αμιδικούς δεσμούς. (Σχήμα 1). Η αλληλουχία καθώς και το είδος των αμινοξέων καθορίζουν τις ιδιότητες των πρωτεϊνών.



**Σχήμα 1:** Αλληλουχία αμινοξέων σε πρωτεΐνη.

Τα ένζυμα είναι δραστικά σε υδατικά διαλύματα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι στην εξωτερική επιφάνειά τους εντοπίζονται υδρόφιλες πολικές ομάδες, όπως  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{CONH}_2$ , ενώ στην εσωτερική υδρόφοβες, όπως αρυλο και αλκυλο ομάδες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η εξωτερική επιφάνεια του ενζύμου – υδρόφιλη- να είναι καλυμμένη από ένα υδατικό στρώμα. Το νερό αυτό είναι απαραίτητο για να αποκτήσει το ένζυμο την κατάλληλη τρισδιάστατη δομή με την οποία είναι δραστικό. Ολόκληρη η δομή που αποκτά το ένζυμο σταθεροποιείται από αλληλεπιδράσεις Van – Der – Waals των αλειφατικών αλυσίδων, π-π αλληλεπιδράσεις αρωματικών δακτυλίων ή γέφυρες αλάτων μεταξύ φορτισμένων ομάδων του μορίου. Εκτός από τους πολυπεπτιδικούς δεσμούς που αποτελούν τον σκελετό του ενζύμου (πρωτεΐνη), ισχυροί τέτοιοι δεσμοί εντοπίζονται μεταξύ ατόμων



S (S – S) και ονομάζονται δισουλφιδικοί δεσμοί. Τέτοιοι δεσμοί είναι αρκετά σημαντικοί, καθώς ανάλογα με τον αριθμό δισουλφιδικών δεσμών στο ένζυμο επηρεάζεται η σταθερότητά του στη θερμοκρασία.

Τα ένζυμα εξαιτίας της πολύπλοκης δομής τους διαθέτουν αρκετά πλεονεκτήματα τα οποία και φαίνονται μέσα από τις αντιδράσεις που καταλύουν.

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των ενζύμων είναι η κάθε είδους εκλεκτικότητα που επιδεικνύουν:

#### **α) Χημειοεκλεκτικότητα**

Τα ένζυμα έχουν την ικανότητα να δρουν εκλεκτικά σε μια δραστική ομάδα του υποστρώματος χωρίς την μετατροπή άλλων εξίσου δραστικών ομάδων του ίδιου μορίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή καθαρών ενώσεων χωρίς την παρουσία παραπροϊόντων.

#### **β) Τοποεκλεκτικότητα**

Εξαιτίας της πολύπλοκης τρισδιάστατης δομής τους έχουν την ικανότητα να διακρίνουν όμοιες λειτουργικές ομάδες οι οποίες βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις του ίδιου υποστρώματος.

#### **γ) Εναντιοεκλεκτικότητα**

Έχουν την ικανότητα να διακρίνουν ένα από τα δύο εναντιομερή ενός ρακεμικού μίγματος ή μια από τις εναντιοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου.

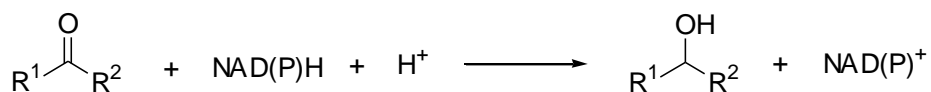
#### **δ) Διαστεροεκλεκτικότητα**

Έχουν την ικανότητα να διακρίνουν ένα από τα διαστερομερή ενός μίγματος ή μία από τις διαστεροτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου.

## ΚΕΤΟΡΕΔΟΥΚΤΑΣΕΣ

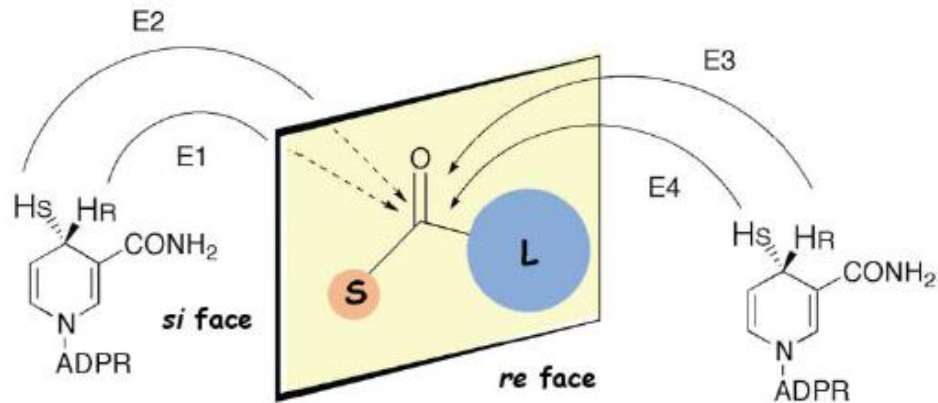
Οι κετορεδουκτάσες είναι ένζυμα που ανήκουν στη κατηγορία των οξειδορεδουκτασών και αποτελούν μέρος της οικογένειας των αφυδρογονασών/ρεδουκτασών. Είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και απομονώνονται από φυτά, βακτήρια, μαγιά, ψάρια αλλά κι από θηλαστικά όπως από ανθρώπους, κουνέλια, ποντίκια. Γενικά οι κετορεδουκτάσες είναι χαμηλού μοριακού βάρους, μονομερή ένζυμα, όμως σε μικρό ποσοστό έχουν απομονωθεί και τετραμερείς κετορεδουκτάσες, κυρίως από θηλαστικά.<sup>7</sup> Ορισμένοι από αυτούς τους βιοκαταλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε μέσα στο φυσικό τους περιβάλλον, όπως είναι οι μικροοργανισμοί και τα κύτταρα, οπότε σε αυτή την περίπτωση το απαραίτητο συνένζυμο προμηθεύεται συνεχώς από τα κύτταρα, είτε μετά από την απομόνωσή τους, οπότε απαιτείται η προσθήκη συνενζύμου.

Ο ρόλος αυτών των βιοκαταλυτών είναι η κατάλυση της αναγωγής καρβονυλικών ενώσεων. Τα φυσικά τους υποστρώματα είναι αλκοόλες όπως αιθανόλη, λακτικό, γλυκερόλη κ.τ.λ. καθώς και οι αντίστοιχες καρβονυλικές ενώσεις. Παρόλα αυτά έχουν τη ικανότητα να ανάγουν εναντιοεκλεκτικά και μη φυσικά υποστρώματα. Για την πραγματοποίηση μιας αναγωγής, τα ένζυμα αυτά απαιτούν τη χρήση συνενζύμων όπως NADH ή NADPH. Η αναγωγή πραγματοποιείται με μεταφορά ενός υδριδίου στο καρβονυλικό υπόστρωμα, σύμφωνα με τη γενική αντίδραση του Σχήματος 2:



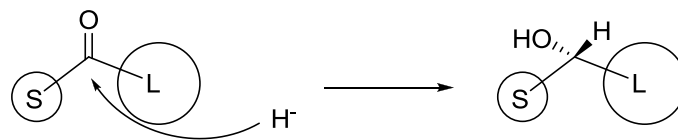
**Σχήμα 2:** Γενική αντίδραση αναγωγής με τις κετορεδουκτάσες.

Οι τέσσερις κατηγορίες ενζύμων που ενεργοποιούν την προσβολή του υδριδίου από το συνένζυμο NAD(P)H στο υπόστρωμα παρουσιάζονται στο σχήμα 3.<sup>8</sup> Στα ένζυμα τύπου E1 και E2, η προσβολή του υδριδίου γίνεται από την si-επιφάνεια της καρβονυλομάδας και στα τύπου E3 και E4, η προσβολή γίνεται από την re-επιφάνεια, προκύπτοντας αντίστοιχα οι R και S αλκοόλες. Τα ένζυμα τύπου E1 και E3 μεταφέρουν το pro-(R)-υδρίδιο του συνενζύμου, ενώ τα τύπου E2 και E4 χρησιμοποιούν το pro-(S)-υδρίδιο.



**Σχήμα 3:** Αναγωγή καρβονυλίου από NADH.

Στις περισσότερες απομονωμένες αφυδρογονάσες, το στεreoχημικό αποτέλεσμα της αντίδρασης μπορεί να προβλεφθεί από ένα απλό μοντέλο, αναφερόμενο σαν “κανόνας του Prelog”. Σύμφωνα με τον κανόνα αυτό η αφυδρογονάση μεταφέρει το υδρίδιο από την *re*-επιφάνεια της προχειρόμορφης κετόνης<sup>9</sup>. Το αποτέλεσμα της αναγωγής με ένα ένζυμο που υπακούει στον κανόνα του Prelog είναι ο σχηματισμός της *S* αλκοόλης (Σχήμα 4).

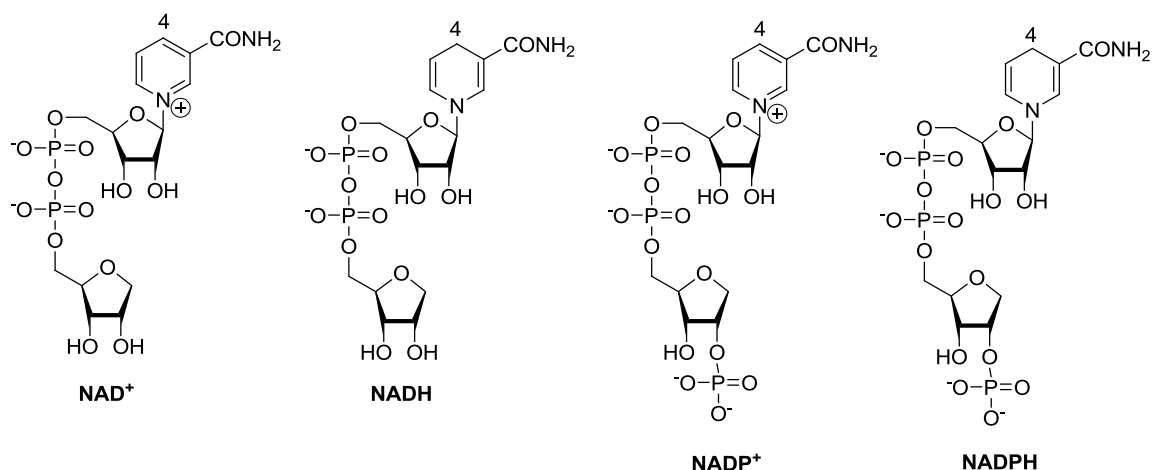


**Σχήμα 4:** Κανόνας του Prelog.

Οι πλειοψηφία των αφυδρογονασών υπακούει στον κανόνα του Prelog (Prelog ένζυμα) παράγοντας *S* αλκοόλες, ενώ ελάχιστα είναι τα ένζυμα με αντίθετη εκλεκτικότητα (*anti*-Prelog ένζυμα). Αυτό σημαίνει ότι οι περισσότερες κετορεδουκτάσες ανήκουν στην κατηγορία E3 (Σχήμα 3). Πάντως σε κάθε περίπτωση, για την πραγματοποίηση μιας ενζυμικής αντίδρασης αναγωγής, είναι απαραίτητη η ύπαρξη συνενζύμου NADH ή NADPH.

## Συνένζυμα $\text{NADP}^+$ - $\text{NADPH}$

Το νικοτιναμιδο αδενινο δινουκλεοτίδιο ( $\text{NAD}^+$ ) και το 2'-φωσφορυλιωμένο άλας ( $\text{NADP}^+$ ) (Σχήμα 5) συμμετέχουν σε πολλές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις καταλυόμενες από αφυδρογονάσες. Ο νικοτιναμιδικός δακτύλιος των ενώσεων αυτών είναι οξειδοαναγωγικά ενεργός, μπορώντας να δεχτεί ένα υδρίδιο (ή δυο ηλεκτρόνια και ένα πρωτόνιο) για το σχηματισμό των υδρογονωμένων παραγώγων  $\text{NADH}$  και  $\text{NADPH}$ . Η αντίστροφη μεταφορά υδριδίου από ένα αναγωγικό υπόστρωμα στο  $\text{NAD(P)}^+$ , και αυτή από το  $\text{NAD(P)H}$  σε ένα οξειδωτικό, είναι στερεοεκλεκτική και χαρακτηριστική για κάθε ένζυμο ξεχωριστά. Κάθε ένζυμο είναι ικανό να μεταφέρει στερεοεκλεκτικά ένα από τα διαστερεοτοπικά υδρογόνα που βρίσκονται στη θέση C-4 του  $\text{NAD(P)H}$  σε μια καρβονυλομάδα ενός υποστρώματος.<sup>10</sup>



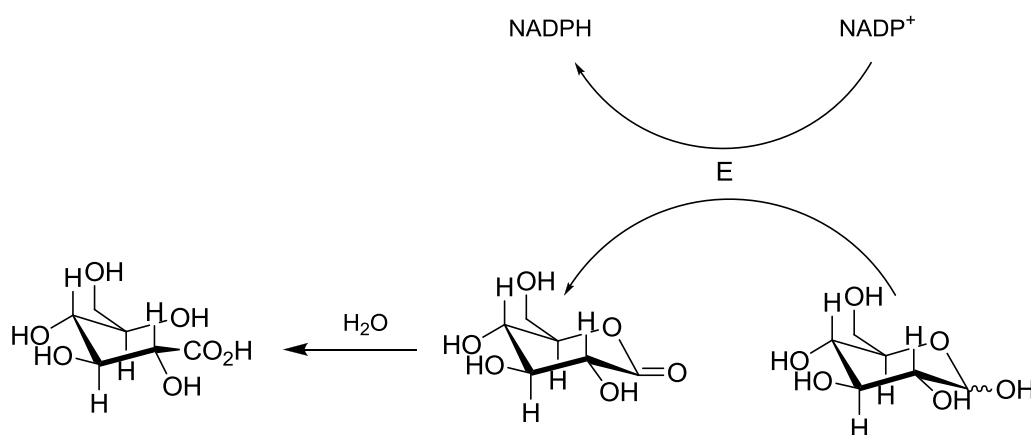
Σχήμα 5: Νικοτιναμιδικοί Συμπαράγοντες.

Η ανηγμένη και η οξειδωμένη μορφή των νικοτιναμιδικών συμπαράγοντων είναι και οι δυο αποικοδομίσιμες σε υδατικά διαλύματα. Γενικά οι ανηγμένες μορφές είναι σταθερές σε βασικά διαλύματα, αλλά ασταθείς σε όξινα, σε αντίθεση με τις οξειδωμένες μορφές που είναι σταθερές σε όξινα διαλύματα και ασταθείς σε βασικά.<sup>11</sup> Γι' αυτό οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται συνήθως σε pH περίπου 7, σε μια ενδιάμεση δηλαδή τιμή σταθερότητας.

Τα συνένζυμα είναι ενώσεις εμπορικά διαθέσιμες εδώ και πολλά χρόνια. Παρόλα αυτά, το κόστος τους είναι αρκετά υψηλό και για αυτό το λόγο απαιτούνται τρόποι αντιμετώπισης του προβλήματος αυτού. Ένας τέτοιος τρόπος είναι τα συστήματα αναγέννησης των συνενζύμων.<sup>12</sup>

Για να είναι μια μέθοδος αναγέννησης συνενζύμων αποτελεσματική θα πρέπει να είναι αρκετά εκλεκτική ως προς το υπόστρωμα, σε σχέση με την επιθυμητή ενζυμική αντίδραση, και να έχει την ικανότητα να ανακυκλώνει τον συμπαράγοντα  $10^2 - 10^5$  φορές. Προς το παρόν, μόνο η ενζυμική κατάλυση παρέχει τέτοια μεγάλη εκλεκτικότητα για την αναγωγή του  $\text{NAD(P)}^+$  σε  $\text{NAD(P)H}$ . Το μόνο μειονέκτημα των ενζυμικών ανακυκλώσεων είναι η δαπάνη και η περιορισμένη σταθερότητα των ενζύμων.

Υπάρχουν αρκετά ενζυμικά συστήματα για την ανακύκλωση του  $\text{NADH}$  και  $\text{NADPH}$ <sup>8,13,14</sup>. Το σύστημα αναγέννησης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία περιλαμβάνει γλυκόζη, αφυδρογονάση της γλυκόζης (E) από *Bacillus* (για  $\text{NAD(P)H}$ ) (Σχήμα 6).<sup>15</sup> Με τη χρήση του συγκεκριμένου συστήματος ανακύκλωσης απαιτείται καταλυτική ποσότητα του συνενζύμου βοηθώντας στην ελάττωση του κόστους των ενζυμικών αντιδράσεων.



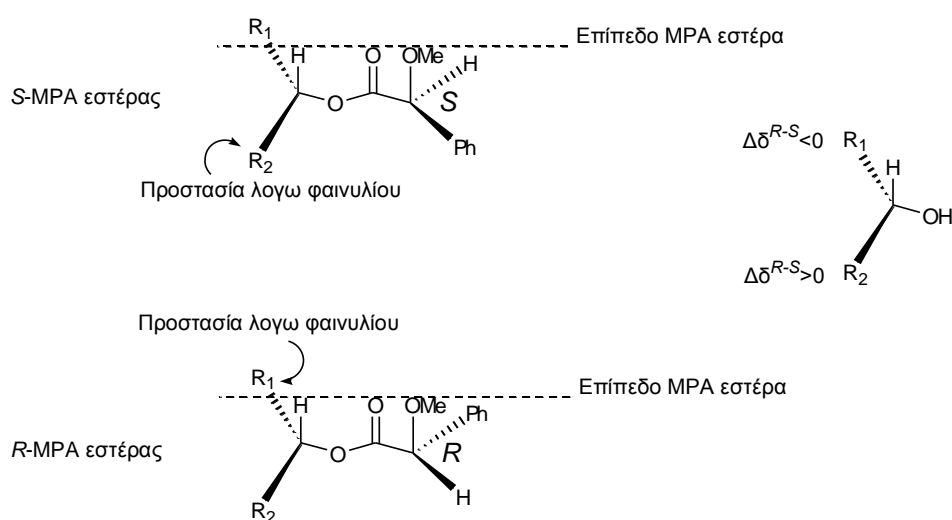
Σχήμα 6

### Προσδιορισμός απόλυτης στερεοδομής

Για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής οργανικών ενώσεων υπάρχουν στην βιβλιογραφία αρκετές απλές και αξιόπιστες μέθοδοι.<sup>16</sup> Για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής δευτεροταγών αλκοολών η απλούστερη και πιο αξιόπιστη μέθοδος είναι η κλασική μέθοδος ανισοτροπίας Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων (στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR) των δυο διαστερομερών εστέρων οι οποίοι προκύπτουν με παραγοντοποίηση της αλκοόλης με τα δυο εναντιομερή ενός χειρόμορφου αντιδραστήριου ανισοτροπίας, όπως το α-

μεθοξυ-τριφθορομεθυλο-φαινυλοξικό οξύ (MTPA) ή α-μεθοξυ-φαινυλοξικό οξύ MPA.

Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα διαμόρφωσης για διάφορα χειρόμορφα αντιδραστήρια ανισοτροπίας τα οποία εξηγούν τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR και προβλέπουν την απόλυτη στερεοδομή των ενώσεων. Το χειρόμορφο αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το α-μεθοξυ-φαινυλοξικό οξύ (MPA) το οποίο είναι κατάλληλο για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής των ενώσεων που μελετήθηκαν. Το μοντέλο διαμόρφωσης που προτείνεται για το αντιδραστήριο αυτό φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



**Σχήμα 7.** Μοντέλο διαμόρφωσης για τους (R)-MPA και (S)-MPA εστέρες των δευτεροταγών αλκοολών.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 7, μετά την εστεροποίηση της δευτεροταγούς αλκοόλης και με τα δυο εναντιομερή του MPA, η διαμόρφωση των MPA-εστέρων βρίσκει το υδρογόνο της αλκοόλης, το καρβονύλιο και την μεθοξυ ομάδα στο ίδιο επίπεδο. Αυτό σημαίνει ότι κάθε ομάδα της αλκοόλης ( $R_1$ ,  $R_2$ ) έχει απέναντί της ένα συγκεκριμένο υποκαταστάτη, είτε υδρογόνο, είτε φαινύλιο. Για παράδειγμα η ομάδα  $R_1$  του (R)-MPA εστέρα έχει απέναντι ένα φαινύλιο, ενώ η  $R_2$  ένα υδρογόνο. Αντιθέτως η ομάδα  $R_1$  του (S)-MPA εστέρα έχει απέναντι ένα υδρογόνο, ενώ η  $R_2$  ένα φαινύλιο.

Γενικά οι ομάδες οι οποίες είναι εκλειπτικές ως προς το φαινύλιο εμφανίζονται σε υψηλότερα πεδία στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR, λόγω προστασίας. Έτσι στη συγκεκριμένη περίπτωση, η ομάδα  $R_1$  του (R)-MPA εστέρα, λόγω του φαινυλίου,

εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία (χαμηλότερα ppm) σε σχέση με την αντίστοιχη του (*S*)-MPA εστέρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η διαφορά στις μετατοπίσεις στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR για την ομάδα  $R_1$  μεταξύ του (*R*)-MPA και του (*S*)-MPA εστέρα να είναι αρνητική ( $\Delta\delta^{R-S} < 0$ ).

Αντιθέτως για την ομάδα  $R_2$ , στον (*S*)-MPA εστέρα, λόγω του φαινυλίου, εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με την αντίστοιχη του (*R*)-MPA εστέρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η διαφορά στις μετατοπίσεις για την ομάδα  $R_2$  μεταξύ του (*R*)-MPA και του (*S*)-MPA εστέρα να είναι θετική ( $\Delta\delta^{R-S} > 0$ ). Εξαιτίας των διαφοροποιήσεων αυτών στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR μεταξύ του (*R*)-MPA και του (*S*)-MPA εστέρα είναι δυνατός ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοχημείας των δευτεροταγών αλκοολών.

Η μέθοδος αυτή εκτός από αξιόπιστη και αποτελεσματική, είναι εύκολη και γρήγορη στη χρήση. Όλα αυτά την καθιστούν ένα εξαιρετικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοχημείας χειρόμορφων δευτεροταγών αλκοολών.

## ΛΙΠΑΣΕΣ

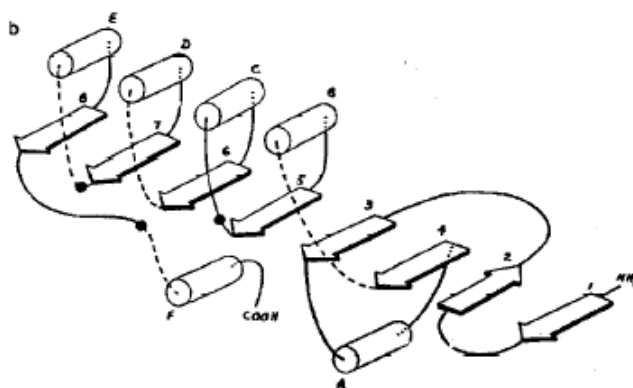
Στην ευρύτερη κατηγορία των υδρολυτικών ενζύμων ανήκουν ένζυμα που υδρολύουν εστερικούς δεσμούς όπως οι λιπάσες και οι εστεράσες, γλυκοσιδικούς δεσμούς όπως οι α-αμυλάσες, εποξειδά όπως οι εποξειδικές υδρολάσες, πεπτίδια όπως οι πρωτεάσες και νιτρίλια όπως οι νιτριλάσες. Εκτεταμένες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για τις λιπάσες<sup>17,18</sup> και τις εστεράσες,<sup>17</sup> των οποίων η φυσική αποστολή είναι η υδρόλυση τριγλυκεριδίων σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα. Η διαδεδομένη χρήση των ενζύμων αυτών, οφείλεται στους παρακάτω λόγους:

- Στην υψηλή καταλυτική τους ικανότητα και στερεοεκλεκτικότητα
- Στην ικανότητα τους να καταλύουν αντιδράσεις σε ευρύ φάσμα υποστρωμάτων
- Στην ικανότητα τους να καταλύουν αντιδράσεις διαφορετικές από την φυσική τους αποστολή
- Στο χαμηλό τους κόστος
- Στην υψηλή σταθερότητα
- Στο γεγονός ότι δεν απαιτούν συμπάροντες
- Στην ικανότητα να δρουν σε οργανικούς διαλύτες.

Ιδιαίτερα η ικανότητα τους να υδρολύουν μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων σε συνδυασμό με τη διατήρηση υψηλής εναντιοεκλεκτικότητας καθιστούν τα ένζυμα αυτά ιδανικούς καταλύτες στην ασύμμετρη οργανική σύνθεση.<sup>19,5</sup> Οι λιπάσες και οι εστεράσες χρησιμοποιούνται από τους συνθετικούς οργανικούς χημικούς για τη σύνθεση χειρόμορφων ενώσεων με υψηλή εναντιομερική περίσσεια, όπως αντιβιοτικών<sup>20,21</sup> και συνθετικών ενδιάμεσων,<sup>22</sup> στη σύνθεση πολυμερών<sup>23</sup> καθώς και στη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων,<sup>24</sup> χαρτιού<sup>25</sup> και απορρυπαντικών.<sup>26</sup>

Η κρυσταλλογραφική δομή αρκετών λιπασών είναι γνωστή.<sup>27,28</sup> Παρόλο που διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ως προς το μέγεθος, την αλληλουχία αμινοξέων και την προέλευση, παρουσιάζουν μια όμοια κεντρική καταλυτική μονάδα, όμοια σε όλες τις περιπτώσεις και τριτοταγή δομή με μεγάλες δομικές ομοιότητες.<sup>29,30</sup> Η τριτοταγής τους δομή περιέχει μια βασική χαρακτηριστική δευτεροταγή δομή η οποία ονομάζεται α/β αναδίπλωση και αποτελείται από 8 β-πτυχωτές επιφάνειες που εναλλάσσονται με α-έλικες (Σχήμα 8).





**Σχήμα 8:** Σχηματική παρουσίαση της  $\alpha/\beta$  αναδίπλωσης των λιπασών.

Με βέλη αναπαριστώνται οι  $\beta$ -πτυχωτές επιφάνειες και με κυλίνδρους οι  $\alpha$ -έλικες.

Οι λιπάσες υδρολύουν τριγλυκερίδια λιπαρών οξέων με μεγάλη ανθρακική αλυσίδα, επίσης εμφανίζουν μικρή δραστηριότητα σε υδατικά διαλύματα με υδατοδιαλυτά υποστρώματα. Όταν η συγκέντρωσή τους αυξηθεί σημαντικά και αρχίζει η δημιουργία μηκυλίων, παρατηρείται μια εκθετική αύξηση της καταλυτικής τους ικανότητας (*Interfacial activation*)<sup>31,32</sup>.

Το ενεργό κέντρο των λιπασών είναι καλυμμένο από μία ή περισσότερες ελικοειδείς ολιγοπεπτιδικές μονάδες. Όταν αυτή έρθει σε επαφή με τη διεπιφάνεια νερού – μηκυλίου μετακινείται αποκαλύπτοντας το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η αλλαγή αυτή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης διευθετεί και τα αμινοξέα που σταθεροποιούν το τετραεδρικό ενδιάμεσο. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η διαμόρφωση που θεωρείται καταλυτικά ενεργή. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι το κάλυμμα αυτό του ενεργού κέντρου αποτελείται από ένα υδρόφοβο τμήμα που στη ανενεργή μορφή του ενζύμου είναι στραμμένο προς το εσωτερικό του, και ένα υδρόφοβο που είναι στραμμένο προς το νερό. Κατά την ενεργοποίηση της λιπάσης το κάλυμμα στρέφεται αυξάνοντας τον υδρόφοβο χαρακτήρα του βιοκαταλύτη κοντά στο ενεργό κέντρο καθιστώντας με τον τρόπο αυτό ευκολότερη την πρόσβαση του υδρόφοβου υποστρώματος σε αυτό<sup>33</sup>.

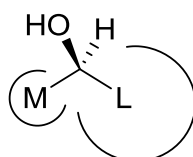
Η διεπιφανειακή ενεργοποίηση δεν παρατηρείται σε όλες τις λιπάσες. Για παράδειγμα η λιπάση από το μικροοργανισμό *Candida antarctica* (CAL-B) δεν παρουσιάζει αυτή την ενεργοποίηση αν και περιέχει μικρό κάλυμμα, ενώ η λιπάση από το *Staphylococcus hyicus* παρουσιάζει την ενεργοποίηση αυτή με κάποια υποστρώματα.<sup>34</sup>

Όπως ήδη αναφέρθηκε η φυσική αποστολή λιπασών και εστερασών είναι η υδρόλυση τριγλυκεριδίων. Η ικανότητα τους όμως να δρουν σε οργανικούς διαλύτες έχει διευρύνει σημαντικά τη χρήση τους στην ασύμμετρη οργανική σύνθεση.<sup>35,36</sup> Στις αρχές της δεκαετίας του '90 όταν ακόμα λίγες κρυσταλλογραφικές μελέτες λιπασών ήταν γνωστές, η επιλογή του κατάλληλου ενζύμου για μια στερεοεκλεκτική κατάλυση απαιτούσε χρονοβόρα σύγκριση. Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκαν εμπειρικά μοντέλα πρόβλεψης της στερεοεκλεκτικότητας των λιπασών έναντι μη φυσικών υποστρωμάτων. Τα μοντέλα αυτά στηρίζονταν στην εκλεκτικότητα που επιδεικνύουν οι λιπάσες κατά τις αντιδράσεις υδρόλυσης, εστεροποίησης και μετεστεροποίησης.

### Μοντέλα πρόβλεψης στερεοεκλεκτικότητας λιπασών

- ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΕΙΣ ΑΛΚΟΟΛΕΣ

Βασιζόμενοι στην παρατηρούμενη στερεοεκλεκτικότητα των λιπασών κατά τις αντιδράσεις υδρόλυσης, εστεροποίησης και μετεστεροποίησης ο Kazlauskas και οι συνεργάτες του πρότειναν ένα μοντέλο πρόβλεψης του εναντιομερούς της δευτεροταγούς αλκοόλης που αντιδρά ταχύτερα<sup>37</sup> (Σχήμα 9). Το μοντέλο αυτό βασίζεται στο αντίστοιχο μοντέλο του Prelog για τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις των αλκοολικών αφυδρογονασών.<sup>9</sup>



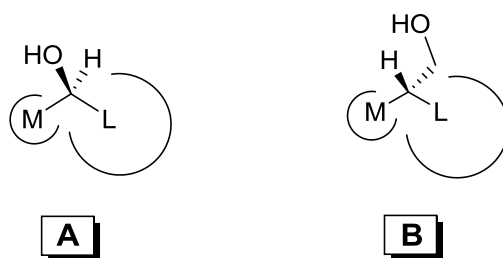
**Σχήμα 9:** Εμπειρικό μοντέλο πρόβλεψης της στερεοχημείας του ταχύτερα αντιδρώντος εναντιομερούς κατά την ενζυμική αντίδραση λιπασών με δευτεροταγείς αλκοόλες. Ο M είναι υποκαταστάτης μικρού ή μεσαίου μεγέθους, ενώ ο L είναι υποκαταστάτης μεγάλου μεγέθους.

Στο παραπάνω μοντέλο με L συμβολίζεται ο ογκώδης και με M ο μεσαίου μεγέθους υποκαταστάτης. Όταν η διαφορά μεγέθους μεταξύ των υποκαταστατών L και M αντικατοπτρίζει και την προτεραιότητα στον καθορισμό της απόλυτης στερεοδομής το μοντέλο προβλέπει προϊόντα με στερεοχημεία **R**. Η αξιοπιστία του μοντέλου είναι ιδιαίτερα υψηλή εφόσον προβλέπει τη στερεοεκλεκτικότητα των

παραπάνω ενζύμων με υψηλή ακρίβεια (>90%). Σύμφωνα με το παραπάνω μοντέλο η στερεοεκλεκτικότητα των λιπασών καθορίζεται από τη διαφορά μεγέθους μεταξύ των υποκαταστατών του στερεογονικού κέντρου.

- **ΠΡΩΤΟΤΑΓΕΙΣ ΑΛΚΟΟΛΕΣ**

Οι περισσότερες λιπάσες εμφανίζουν μικρή εναντιοεκλεκτικότητα ως προς τις πρωτοταγείς αλκοόλες. Οι μόνες λιπάσες που εμφανίζουν μέτρια εναντιοεκλεκτικότητα ως προς τις πρωτοταγείς αλκοόλες είναι οι λιπάσες από *Pseudomonas cepasia* (PCL)<sup>38a</sup> και πάγκρεας χοίρου *porcine pancreas lipase*, (PPL).<sup>38b</sup> Ακόμα όμως και στην περίπτωση αυτή η εναντιοεκλεκτικότητά τους παραμένει μικρότερη από την αντίστοιχη ως προς τις δευτεροταγείς αλκοόλες. Το 1995 ο Kazlauskas<sup>38</sup> και οι συνεργάτες του πρότειναν ένα μοντέλο πρόβλεψης της στερεοεκλεκτικότητας της λιπάσης PCL κατά την ενζυμική εστεροποίηση πρωτοταγών αλκοολών και υδρόλυσης των αντίστοιχων εστέρων τους (Σχήμα 10).

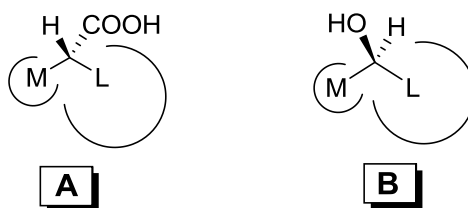


**Σχήμα 10:** Εμπειρικό μοντέλο πρόβλεψης της στερεοχημείας του ταχύτερα αντιδρώντος εναντιομερούς των πρωτοταγών αλκοολών **B** και δευτεροταγών **A**. Ο M είναι υποκαταστάτης μικρού ή μεσαίου μεγέθους, ενώ ο L είναι υποκαταστάτης μεγάλου μεγέθους.

Το παραπάνω μοντέλο προβλέπει αντίθετη στερεοχημεία για τις πρωτοταγείς αλκοόλες από ότι για τις δευτεροταγείς. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι υποκαταστάτες (L) και (M) του στερεογονικού κέντρου των πρωτοταγών και δευτεροταγών αλκοολών προσαρμόζονται στους ίδιους θύλακες του ενεργού κέντρου, και η μεθυλενομάδα επιτυγχάνει την απαραίτητη στροφή του υδροξυλίου ώστε να μεταβεί στην κατάλληλη απόσταση από την καταλυτική τριάδα αμινοξέων. Το εμπειρικό μοντέλο που πρότειναν προβλέπει τη στερεοχημεία της πρωτοταγούς αλκοόλης που αντιδρά ταχύτερα με ιδιαίτερα υψηλή αξιοπιστία, εφόσον αυτή δεν περιέχει οξυγόνο στο στερεογονικό κέντρο της αντίδρασης.

- **ΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΑ ΟΞΕΑ ΚΑΙ ΕΣΤΕΡΕΣ**

Το εμπειρικό μοντέλο πρόβλεψης του ταχύτερα αντιδρώντος εναντιομερούς ενός οξέος σε μια αντίδραση εστεροποίησης ή ενός εστέρα για μια αντίδραση υδρόλυσης προτάθηκε από τον Kazlauskas<sup>39</sup> και τους συνεργάτες του για την λιπάση CRL (Σχήμα 11). Ανάλογα με τα προηγούμενα εμπειρικά μοντέλα και στην περίπτωση αυτή η στερεοεκλεκτικότητα καθορίζεται από τη διαφορά μεγέθους των υποκαταστατών του στερεογονικού κέντρου. Οι δύο υποκαταστάτες του στερεογονικού κέντρου προσαρμόζονται στους ίδιους θύλακες με αυτούς των δευτεροταγών αλκοολών.



**Σχήμα 11:** Εμπειρικό μοντέλο πρόβλεψης της στερεοχημείας του ταχύτερα αντιδρώντος εναντιομερούς κατά την ενζυμική αντίδραση οξέων (A) και δευτεροταγών αλκοολών (B). Ο M είναι υποκαταστάτης μικρού ή μεσαίου μεγέθους, ενώ ο L είναι υποκαταστάτης μεγάλου μεγέθους.

Τα παραπάνω εμπειρικά μοντέλα αποτελούν ικανοποιητική μέθοδο πρόβλεψης της στερεοεκλεκτικότητας των λιπασών έναντι μη φυσικών υποστρωμάτων. Παράλληλα παρέχουν μια στρατηγική για τη βελτίωση της παρατηρούμενης εναντιοεκλεκτικότητας, βασιζόμενη στην αύξηση της διαφοράς μεγέθους των υποκαταστατών του στερεογονικού κέντρου του υποστρώματος.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>**

### **ΧΗΜΕΙΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ (*R*)-3 ΟΞΟΕΞΑΝΙΚΟΥ (*S*)-2 ΠΕΝΤΥΛΕΣΤΕΡΑ ΠΤΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟΥ ΤΗΣ ΜΙΑΝΑΝΑΣ**

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το είδος *Drosophila melanogaster* ανήκει στην τάξη των Δίπτερων και στην οικογένεια Drosophilidae. Στα Δίπτερα που περιλαμβάνουν 90.000 περίπου είδη υπάγονται οι μύγες, τα μυγάκια, τα κουνούπια και πολλά άλλα είδη εντόμων. Είναι μικρού ως μετρίου μεγέθους έντομα με ένα ζευγάρι μεμβρανοειδών πτερύγων, το δεύτερο ζευγάρι πτερύγων είναι ατροφικό και έχει διαμορφωθεί σε αλτήρες που τις χρησιμοποιούν για να κανονίζουν την ταχύτητα και την ισορροπία τους, όταν πετούν. Τα Δίπτερα είναι μεγάλης υγειονομικής και γεωργικής σημασίας. Τα ενήλικα πολλών ειδών είναι αιμοβόρα και όχι μόνο ενοχλητικά στον άνθρωπο και σε ωφέλιμα θερμόαιμα ζώα, αλλά και φορείς ασθενειών όπως η ελονοσία, ο κίτρινος πυρετός, η ασθένεια του ύπνου και πολλές εγκεφαλίτιδες. Αρκετά είδη, ως προνύμφες ή ως ενήλικα, είναι βλαβερά στη γεωργία. Η μύγα της Μεσογείου, ο δάκος της ελιάς, η μύγα των κερασιών, οι κηκιδόμυγες των οπωροφόρων δέντρων είναι ανάμεσα στους σοβαρότερους εχθρούς της γεωργικής παραγωγής.<sup>40</sup>

Το είδος *drosophila melanogaster* είναι μικρή μύγα με μήκος περίπου 3-8 χιλιοστά, συμπεριλαμβανομένων των φτερών της. Το βασικό χαρακτηριστικό της μύγας φρούτων είναι τα μάτια της, τα οποία είναι κόκκινα στο χρώμα. Το κεφάλι και ο θώρακας έχουν μαυριδερό χρώμα, η κοιλιά είναι κάπως σκοτεινότερη και διακρίνονται εγκάρσια μαύρα δαχτυλίδια πέρα από την κοιλιά (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1.** *Drosophila melanogaster*

Το είδος αυτό αναπαρήχθη αρχικά σε ποσότητα το 1900-1901 από τον Charles W. Woodworth και σίγουρα είναι ένας από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους οργανισμούς μοντέλα στον τομέα της Βιολογίας, συμπεριλαμβανομένων των μελετών στη γενετική, τη φυσιολογία, τη μικροβιακή παθογένεση και την εξέλιξη ιστορίας ζωής.<sup>41</sup> Η σημασία της για την ανθρώπινη υγεία αναγνωρίστηκε από την απονομή του βραβείου Νόμπελ στον τομέα της Ιατρικής/Φυσιολογίας στους Ed Lewis, Christiane Nusslein-Volhard και Eric Wieschaus το 1995. Αυτό το είδος είναι γνωστό ως κοινή μύγα των φρούτων ή μύγα «ξυδιού», το οποίο είναι ενοχλητικό έντομο για τον άνθρωπο. Συνήθως εμφανίζεται σε σπίτια, εστιατόρια, οπωροπωλεία, κονσερβοποιεία, οινοποιεία, οξοποιείες και γενικά οπουδήποτε υπάρχουν εκτεθειμένα φρούτα και φυτικές ουσίες έξω από τα ψυγεία ή τα δοχεία ψύξης.<sup>42</sup> Ένας από τους λόγους για τους οποίους οι επιστήμονες εργάζονται πάνω σ' αυτό το είδος είναι θεωρητικός, έχουν γνωστοποιηθεί πάρα πολλές πληροφορίες γι' αυτό, έτσι είναι εύκολο να χειριστεί και αρκετά κατανοητό. Ένας άλλος λόγος είναι πρακτικός, είναι ένα μικρό έντομο, με έναν σύντομο κύκλο ζωής ακριβώς δύο εβδομάδων, και είναι φτηνό και εύκολο να κρατηθεί σε μεγάλους πληθυσμούς. Πρόσφατη έρευνα οδήγησε στις φυσικές πτητικές ουσίες των φρούτων που προσελκύουν τις μύγες αυτές, με την πρόθεση να εκμεταλλευτούν αυτές τις ενώσεις στις εμπορικές παγίδες. Οι οσμηρές αυτές παγίδες έχουν ως ελκυστικό πτητική ουσία που δεν είναι φερομόνη ούτε τροφικό ελκυστικό και τα ελκυσόμενα έντομα είναι είτε του ενός είτε και των δύο φύλων. Τα διάφορα προσελκυστικά ανακαλύφθηκαν, συμπεριλαμβανομένων αιθανόλης, οξικού αιθυλεστέρα, οξικό οξύ (HOAc) και ακεταλδεύδη.<sup>43</sup> Πτητικές ουσίες εκλύονται από άνθη και από καρπούς. Η σύσταση και η συγκέντρωση πτητικών ουσιών στα άνθη επηρεάζεται από πρόσκαιρους ή ωφέλιμους στο χώρο παράγοντες, ενώ η συγκέντρωση των διαφόρων αυτών ουσιών είναι σημαντική, γιατί το βέλτιστο αυτής μπορεί να είναι καθοριστικό για την προσέλκυση των εντόμων. Οι αλδεύδες ήταν οι πρώτες πτητικές ουσίες λουλουδιών που παρατηρήθηκε ότι προσελκύουν τους θρίπες *Frankliniella occidentali*. Παλαιότερες έρευνες έδειξαν ότι παγίδες με κινναμάλδεύδη, βενζαλδεύδη, σαλικαλδεύδη και ανισαλδεύδη έλκουν αποτελεσματικά τους θρίπες,<sup>44</sup> ενώ οι πτητικές ουσίες όλων των ποικιλιών τριανταφυλλιάς που εξετάστηκαν, δεν τον προσελκύουν.<sup>45</sup> Τα φρούτα καθώς ωριμάζουν παράγουν μεγάλες ποσότητες πτητικών ουσιών όπως αλδεύδες, κετόνες, εστέρες και τερπένια. Οι συνολικές ποσότητες πτητικών αρωματικών ουσιών είναι λιγότερο από 1% της συνολικής ποσότητας του

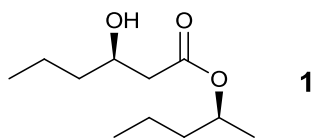
παραγόμενου CO<sub>2</sub>. Από τις πτητικές ουσίες το 50-75% αντιστοιχεί σε αιθυλένιο, χωρίς όμως η ουσία αυτή να συμμετέχει στην ανάπτυξη του αρώματος. Επομένως η ποσότητα των αρωματικών πτητικών ουσιών που δίνουν το χαρακτηριστικό άρωμα σε κάθε καρπό είναι εξαιρετικά μικρή.<sup>46</sup> Έρευνες απέδειξαν ότι το νικοτινικό αιθυλένιο, πτητική ουσία που βρίσκεται στα φρούτα του φυτού *carambola*, αύξησε την συλληπτική ικανότητα των παγίδων για τον *Thrips obscuratus*, ένα είδος που ελκύεται από τα άνθη και τα ώριμα φρούτα ροδακινιάς.<sup>47</sup>

Οι πτητικοί εστέρες παράγονται από σχεδόν όλα τα είδη μαλακών φρούτων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Διαδραματίζουν έναν διπλό ρόλο στα ώριμα φρούτα, που χρησιμεύουν και ως «βιολογικά μέσα επικοινωνίας» για την έλξη των εντόμων και ως προστατευτικά ενάντια στα παθογόνα. Σε μερικά φρούτα, όπως το μήλο (*Malus domestica*), το αχλάδι (*Pyrus communis*), και την μπανάνα (*Musa sapientum*), οι εστέρες είναι τα σημαντικότερα συστατικά στο χαρακτηριστικό άρωμά τους. Σε άλλα φρούτα, όπως τη φράουλα (*Fragaria ananassa*), συμβάλλουν στο μίγμα των πτητικών ουσιών που αποτελούν το άρωμα. Συχνά, ένα μόνο φρούτο εκπέμπει ένα ευρύ φάσμα από εστέρες. Για παράδειγμα, περισσότεροι από 100 διαφορετικοί εστέρες έχουν ανιχνευθεί σε ώριμους καρπούς φράουλας.<sup>48</sup> Πολύ συχνά εκπέμπονται από τα βλαστικά μέρη του φυτού, είτε ως μέσο ωρίμανσης είτε ως αντίδραση στην πίεση και την προσβολή εντόμων.<sup>49</sup> Η διπλή βιολογική δραστηριότητα (σημαντική αρωματική ουσία, προσελκυστική ουσία εντόμων) των πτητικών εστέρων εξαρτάται από την απόλυτη στερεοχημική δομή τους. Η βιοκατάλυση είναι ένα σημαντικό εργαλείο στην ασύμμετρη σύνθεση των βιολογικά ενεργών ενώσεων, δεδομένου ότι τα ένζυμα καταλύουν χημικούς μετασχηματισμούς με υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα.<sup>50</sup>

Η ανάπτυξη αποτελεσματικών μέσων για την απομάκρυνση της *Drosophila* από περιοχές προετοιμασίας και αποθήκευσης τροφίμων παραμένει σημαντική πρόκληση. Από το 1930 πολλός μπανάνας που έχει υποστεί ζύμωση με μαγιά έχει χρησιμοποιηθεί ως δόλωμα για να προσελκύσει τις μύγες των φρούτων.<sup>51</sup> Σαν προοίμιο στην ανάπτυξη ενός αποδοτικού χημικού ελκτικού για τη *Drosophila*, έχει αρχίσει μια έρευνα για τις πτητικές ουσίες που παράγονται από τις ώριμες μπανάνες, οι οποίες λειτουργούν σαν υποκινητές του εντόμου μέσω των κεραιών του. Πρόσφατα ένας πτητικός εστέρας εκλυόμενος από μπανάνες απομονώθηκε και βρέθηκε ότι προκαλεί την αντίδραση μέσω των κεραιών του εντόμου *Drosophila*



melanogaster.<sup>52</sup> Ο προσδιορισμός της δομής του επιβεβαιώθηκε από την σύνθεση του νέου φυσικού προϊόντος και είναι ο (*R*)-3-υδροξυεξανικός (*S*)-2- πεντυλεστέρας (Σχήμα 20).



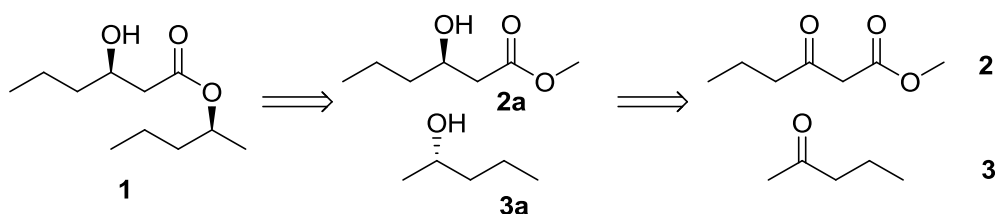
**Σχήμα 20:** (*R*)-3-υδροξυεξανικός (*S*)-2- πεντυλεστέρας. **1**

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η πρώτη ενζυμική σύνθεση του πτητικού εστέρα (*R*)-3-υδροξυεξανικός (*S*)-2- πεντυλεστέρας, πραγματοποιώντας τρία διαδοχικά ενζυμικά στάδια, μια αναγωγή, μια μετεστεροποίηση ακολουθούμενη από μια δεύτερη αναγωγή σαν αντίδραση κλειδί.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

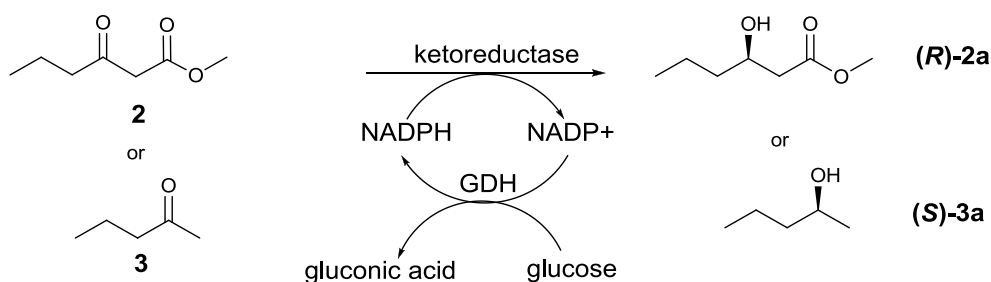
Βασιζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου πάνω σε ασύμμετρες αναγωγές, σε 1,3-δικετόνες, 1,3-κετο-εστέρες, α-αλκυλο-β-υδροξυ κετόνες, 1,3 διόλες, καταλυόμενες από απομονωμένες NADPH-εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες, αποδείχθηκε ότι επιδεικνύουν εξαιρετική εναντιο- και διαστερεοεκλεκτικότητα με ποσοτικές (~100%) μετατροπές, υψηλή καταλυτική ικανότητα.<sup>53</sup> Οι οπτικά ενεργοί β-υδροξυ εστέρες είναι σημαντικές ενώσεις στην ασύμμετρη οργανική σύνθεση, όπου χρησιμοποιούνται ως χειρόμορφα δομικά στοιχεία για τη σύνθεση των σημαντικών φυσικών και των φαρμακευτικών προϊόντων.<sup>54</sup> Πρόσφατα δημοσιεύτηκε στερεοεκλεκτική αναγωγή των α-αλκυλο-β-κετοεστέρων αξιοποιώντας απομονωμένες, NADPH εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες.<sup>53a</sup> Αυτή η μέθοδος έχει αποδειχθεί ότι είναι πολύ αποτελεσματική για τη σύνθεση διαφόρων οπτικά και χημικά καθαρών α-αλκυλο-β-υδροξυεστέρων. Εφαρμόζοντας τη μέθοδο αυτή, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της φυσικής φερομόνης sitophilate του εντόμου *Sitophilus Granarius*, με δύο διαδοχικά ενζυματικά βήματα, μια αναγωγή που ακολουθείται από υδρόλυση, ως αντίδραση κλειδί.<sup>53d</sup> Οι βιοκαταλυτικές αναγωγές μπορούν να προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα και έχουν χρησιμοποιηθεί για στερεοεκλεκτική αναγωγή σε μια ποικιλία κετονών.<sup>55</sup>

Δεδομένου ότι αυτό το φυσικό προϊόν είναι ένας οπτικά ενεργός β-υδροξυ εστέρας, θα μπορούσε εύκολα να συντεθεί από τον εμπορικά διαθέσιμο 3-οξοεξανικό μεθυλεστέρα (**2**) και την 2-πεντανόνη (**3**), πραγματοποιώντας κατάλληλη ασύμμετρη αναγωγή ως στάδιο για την επίτευξη της σύνθεσης οπτικά ενεργού προϊόντος. (Σχήμα 21).



**Σχήμα 21:** Πετροσύνθεση του (R)-3-υδροξυεξανικού (S)-2-πεντυλεστέρα

Για αυτόν το λόγο, χρησιμοποιήθηκαν NADPH-εξαρτώμενες κετορεδοκτάσες ως καταλύτες για τη στερεοεκλεκτική αναγωγή των ενώσεων **2** και **3**. Σε όλες τις περιπτώσεις συνδυάστηκε το ανακυκλωτικό σύστημα γλυκόζης/αφυδρογονάση της γλυκόζης, για την ανακύκλωση των νικοτιναμδικών συμπαραγόντων (Σχήμα 22).<sup>15</sup> Τα αντιπροσωπευτικότερα αποτελέσματα αυτών των ενζυμικών αναγωγών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.



**Σχήμα 22:** Ενζυμική αναγωγή του 3-οξοεξανοικού μεθυλεστέρα (**2**) και της 2-πεντανόνης (**3**)

Η απαιτούμενη διαμόρφωση *R* του υδρόξυ εστέρα **2a** προϋποθέτει ότι τα αναγωγικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται πρέπει να παρουσιάζουν εκλεκτικότητα anti-Prelog.

**Πίνακας 1.** Ενζυμική αναγωγή του 3-οξοεξανοικού μεθυλεστέρα (**2**) και της 2-πεντανόνης (**3**).

Υπόστρωμα	KRED	Ποσοστό μετατροπής (χρόνος) <sup>[α]</sup>	Απόδοση	Εναντιομερική περίσσεια ee% <sup>[α]</sup> (διαμόρφωση)	Προϊόν
<b>2</b>	A1C, A1D 108	>99% (24h) >99% (24h)	90% 92%	93% ( <i>R</i> ) >99% ( <i>S</i> )	<b>(R)-2a</b> <b>(S)-2a</b>
<b>3</b>	108,116, 117 107	>99% (24h) >99% (24h)	92% 89%	>99% ( <i>S</i> ) >99% ( <i>R</i> )	<b>(S)-3a</b> <b>(R)-3a</b>

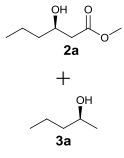
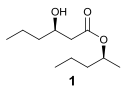
[α] Η εναντιομερική περίσσεια και τα ποσοστά μετατροπής προέκυψαν από αέρια χρωματογραφία με χειρόμορφη κολώνα.

Πολλά ένζυμα παρουσίασαν δραστικότητα ως προς την αναγωγή του 3-οξοεξανοικού μεθυλεστέρα (**2**) και της 2-πεντανόνης (**3**). Ανάλογα με το ένζυμο, στα υποστρώματα **2** και **3** πραγματοποιήθηκε στερεοεκλεκτική αναγωγή με παραγόμενα προϊόντα είτε το *S* είτε το *R* εναντιομερές της επιθυμητής αλκοόλης. Ειδικότερα ο κετο εστέρας **2** ανάχθηκε, σχηματίζοντας και τα δύο εναντιομερή **(R)-2a** και **(S)-2a**

με τις κετορεδουκτάσες A1C, A1D και 108 αντίστοιχα. Τα ίδια αποτελέσματα ολοκληρώθηκαν επίσης στην περίπτωση της 2-πεντονόνης (**3**), η οποία μετατράπηκε στην *S* αλκοόλη **3a** από τις κετορεδουκτάσες 108, 116, 117 και στην *R* αλκοόλη **3a** από την 107. Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις έδωσαν μόνο ένα προϊόν με υψηλές χημικές αποδόσεις, και με υψηλή χημική και οπτική καθαρότητα. Για το υπόστρωμα **2**, το (*R*)-**2a** εναντιομερές σχηματίστηκε με απόδοση 90%, εναντιομερική περίσσεια 93% και το (*S*)-**2a** εναντιομερές με απόδοση 92%, εναντιομερική περίσσεια >99%. Όσο για το υπόστρωμα **3**, η αναγωγή ολοκληρώθηκε μέσα σε 24 ώρες σχηματίζοντας το (*S*)-**3a** εναντιομερές με απόδοση 92%, εναντιομερική περίσσεια >99% και το (*R*)-**3a** εναντιομερές με απόδοση 89%, εναντιομερική περίσσεια >99%. Η απόλυτη στερεοδομή αυτών των προϊόντων προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας χειρόμορφα αντιδραστήρια ανισοτροπίας. Το χειρόμορφο αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το α-μεθοξυ-φαινυλοξικό οξύ (MPA).<sup>16</sup>

Έχοντας τις ενώσεις **2a** και **3a** με την επιθυμητή απόλυτη διαμόρφωση, μελετήθηκε η άμεση σύνθεση του φυσικού προϊόντος με αντίδραση μετεστεροποίησης αποφεύγοντας το στάδιο προστασίας. Χρησιμοποιήθηκε ως καταλύτης η ακινητοποιημένη λιπάση *Candida antarctica* B (CAL-B Novozym 435) και η αντίδραση μελετήθηκε σε τρεις διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες, τολουόλιο, εξάνιο και TBME(tert-βουτυλο μεθυλο αιθέρα). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

**Πίνακας 2.** Ενζυμική μετεστεροποίηση του (*R*)-3-υδροξυ εξανοικού μεθυλεστέρα (**2a**) με την (*S*)-2-πεντανόλη (**3a**) καταλύομενη από την λιπάση CAL-B στους 45°C.

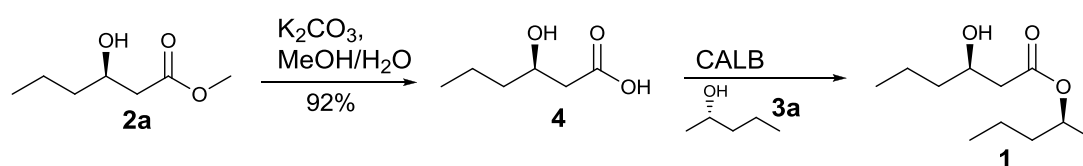
Υπόστρωμα	Αναλογία <b>2a/3a</b> (mol)	Διαλύτης	Ποσοστό μετατροπής (χρόνος) <sup>[a]</sup>	Προϊόν
 <chem>CCCC(O)C(=O)OC</chem> ( <b>2a</b> ) + <chem>CCCC(O)C</chem> ( <b>3a</b> )	1/2	Toluene	50% (7days)	 <chem>CCCC(O)C(=O)C</chem> ( <b>1</b> )
		Hexane	50% (7days)	
		TBME	10% (7days)	

[a] Τα ποσοστά μετατροπής προέκυψαν από προέκυψαν από αέρια χρωματογραφία με χειρόμορφη κολώνα μετρώντας την κατανάλωση του αρχικού υδρόξυ εστέρα **2a**.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, η CAL-B κατέλυσε σε διαφορετικούς διαλύτες την αντίδραση μετεστεροποίησης, παράγοντας τον επιθυμητό, οπτικά ενεργό υδρόξυ εστέρα χωρίς το σχηματισμό οποιουδήποτε παραπροϊόντος. Υπό τις ανωτέρω

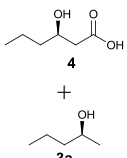
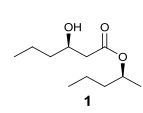
συνθήκες αυτή η αντίδραση αποδείχθηκε αποδοτικότερη σε μη πολικούς διαλύτες. Εντούτοις, η ενζυμική δραστηριότητα ήταν πολύ χαμηλή (μετατροπή 50%, 7 ημέρες).

Μετά από μια απλή υδρόλυση του εστέρα **2a** στο αντίστοιχο υδροξύ οξύ **4**, μελετήθηκε η ενζυμική εστεροποίηση με την αλκοόλη **3a** χρησιμοποιώντας πάλι τη λιπάση CAL-B, (σχήμα 23), προκειμένου να βελτιστοποιηθεί το ποσοστό μετατροπής και ο χρόνος της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα της εστεροποίησης υπό τις διαφορετικές συνθήκες αντίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.



**Σχήμα 23:** Υδρόλυση του εστέρα **2a** στο αντίστοιχο υδροξύ οξύ **4**, ενζυμική εστεροποίηση με την αλκοόλη **3a**.

**Πίνακας 3.** Ενζυμική εστεροποίηση του (*R*)-3-υδροξύ εξανικό οξύ (**4**) με την (*S*)-2-πεντανόλη (**3a**) καταλυόμενη από την λιπάση CAL-B στους 45°C.

Υπόστρωμα	Αναλογία <b>4/3a</b> (mol)	Διαλύτης	Ποσοστό μετατροπής (χρόνος) <sup>[a]</sup>	Απόδοση <sup>[b]</sup>	Προϊόν
	1.1/1	Toluene	>99% (5 days)	82%	
		Hexane	>99% (5 days)	85%	
		TBME	20% (7 days)	nd	

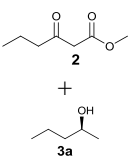
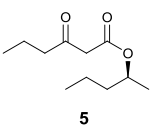
[a] Τα ποσοστά μετατροπής προέκυψαν από αέρια χρωματογραφία με χειρόμορφη κολώνα και το φάσμα  $^1H$  NMR μετρώντας την κατανάλωση της αλκοόλης **3a**. [b] Η απόδοση αναφέρεται στο απομονωμένο, καθαρό προϊόν **1**.

Συγκρίνοντας τους χρόνους αντίδρασης, είναι προφανές ότι στην προκειμένη περίπτωση η δραστηριότητα του ενζύμου βελτιώθηκε όταν η εστεροποίηση πραγματοποιήθηκε σε μη πολικούς διαλύτες σε μια χρονική περίοδο αντίδρασης 5 ημερών, σχηματίζοντας τον επιθυμητό εστέρα **1** με υψηλή απόδοση (85% σε εξάνιο). Θα πρέπει να τονιστεί εδώ ότι μέσω ενός απλού σταδίου εστεροποίησης, που καταλύεται από CAL-B, η ένωση **1** σχηματίστηκε σε υψηλή οπτική καθαρότητα (99 ee%, 99% de) και χωρίς κανένα παραπροϊόν. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι ο

β-υδροξυ εστέρας **2a** (Πίνακας 2) ή το β-υδροξυ οξύ **4** (Πίνακας 3) δεν μπορούν να συμπυκνωθούν, προκειμένου να σχηματίσουν οποιοδήποτε παραπροϊόν. Αν και η ενζυμική συμπύκνωση είτε των υποστρωμάτων **2a** και **3a** (Πίνακας 2) είτε των υποστρωμάτων **4** και **3a** (Πίνακας 3) παρήγαγε το φυσικό προϊόν **1** με υψηλή εναντιομερική (99% ee) και διαστεreoμερική (99% de) καθαρότητα, ο χρόνος των αντιδράσεων επτά και πέντε ημέρες αντίστοιχα, ήταν μάλλον μεγάλος. Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα του μεγάλου χρόνου της αντίδρασης, δοκιμάστηκε μια εναλλακτική προσέγγιση για την σύνθεση του φυσικού προϊόντος **1**. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την αντίδραση μετεστεροποίησης του 3-οξοεξανικού μεθυλεστέρα (**2**) με τη (*S*)-2-πεντανόλη (**3a**), που ακολουθείται από την ενζυμική αναγωγή (σχήμα 24).

Είναι φανερό ότι αυτός ο τρόπος αποδείχθηκε αποδοτικότερος καθώς ολοκληρώθηκε σε μόνο 24 ώρες, παράγοντας τον οπτικά καθαρό κετοεστέρα **5**, (Πίνακας 4). Η απόδοση ειδικά στην περίπτωση του εξανίου, ήταν 90% μετά από έναν χρωματογραφικό καθαρισμό του προϊόντος **5**. Αξιοσημείωτο είναι ότι το 95% του κετοεστέρα **2** που δεν αντέδρασε ανακτήθηκε μετά από τον καθαρισμό.

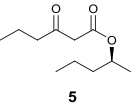
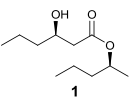
**Πίνακας 4.** Ενζυμική μετεστεροποίηση του 3-οξοεξανικού μεθυλεστέρα (**2**) με την (*S*)-2-πεντανόλη (**3a**) καταλυόμενη από την λιπάση CAL-B στους 45°C.

Υπόστρωμα	Αναλογία <b>2/3a</b> (mol)	Διαλύτης	Ποσοστό μετατροπής (χρόνος) <sup>[a]</sup>	Απόδοση <sup>[b]</sup>	Προϊόν
	2.2/1	Toluene	>99% (24h)	85%	
		Hexane	>99% (24h)	90%	

[a] Τα ποσοστά μετατροπής προέκυψαν από αέρια χρωματογραφία με χειρόμορφη κολώνα και το φάσμα <sup>1</sup>H NMR μετρώντας την κατανάλωση της αλκοόλης **3a**. [b] Η απόδοση αναφέρεται στο απομονωμένο, καθαρό προϊόν **1**.

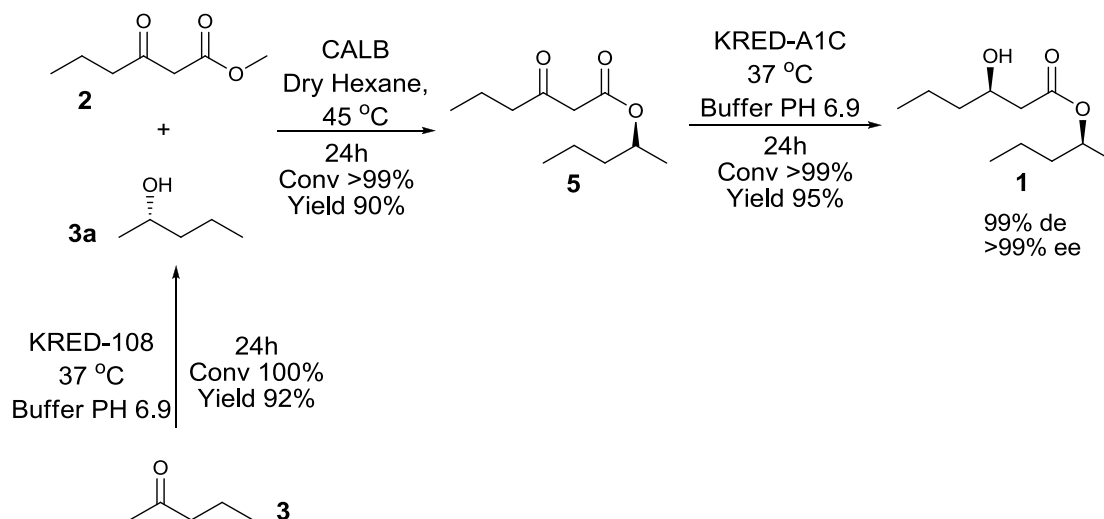
Το τελικό βήμα ήταν η ενζυμική αναγωγή του οπτικά καθαρού κετοεστέρα **5**. Αυτή η αντίδραση ολοκληρώθηκε χρησιμοποιώντας τις ίδιες κετορεδουκτάσες όπως στην περίπτωση της αναγωγής 3-οξοεξανικού μεθυλεστέρα (**2**) (A1C και A1D, Πίνακας 1). Αυτά τα ένζυμα παρουσίασαν εκλεκτικότητα anti-Prelog, η οποία είναι απαραίτητη για την παραγωγή μιας (*R*) δευτεροταγούς αλκοόλης. Τα αποτελέσματα της αναγωγής του κετοεστέρα **5** παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

**Πίνακας 5.** Ενζυμική αναγωγή του κετοεστέρα **5**

Υπόστρωμα	Kred	Ποσοστό μετατροπής (χρόνος) <sup>[a]</sup>	Απόδοση	Διαστερομερική περίσσεια de% <sup>[a]</sup> (διαμόρφωση)	Product
 <b>5</b>	A1C	>99% (24h)	95%	>99% (R)	 <b>1</b>
	A1D	>99% (24h)	92%	>99% (R)	

[a] Τα ποσοστά μετατροπής και η διαστερομερική περίσσεια προέκυψαν από αέρια χρωματογραφία με χειρόμορφη κολώνα.

Και οι δύο κετορεδουκτάσες (A1C και A1D) κατέλυσαν τη αναγωγή του κετοεστέρα **5** πολύ αποτελεσματικά. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 5, και οι δύο αντιδράσεις ολοκληρώθηκαν σε μόνο 24 ώρες παράγοντας το φυσικό προϊόν με υψηλή διαστερομερική περίσσεια και χημική απόδοση (απόδοση 92 - 95%, >99% de). Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η Kred-A1C παρουσίασε αυξημένη στερεοεκλεκτικότητα με τον κετοεστέρα **5** (> 99% de, Πίνακας 5), σε σύγκριση με το προηγούμενο αποτέλεσμα (93% ee, Πίνακας 1), δείχνοντας ότι αυτή η συνθετική διαδρομή μπορεί να οδηγήσει στον οπτικά καθαρό (*R*)-3-υδροξυεξανοϊκό (*S*)-2-πεντυλεστέρα **1**. Για αυτόν τον λόγο, η βελτιστοποιημένη γενική διαδικασία για την ενζυμική σύνθεση του φυσικού προϊόντος **1**, παρουσιάζεται στο Σχήμα 24.<sup>56</sup>



**Σχήμα 24:** Ενζυμική σύνθεση του φυσικού προϊόντος (*R*)-3-υδροξυεξανοϊκός (*S*)-2-πεντυλεστέρας.

Συνοψίζοντας για τη σύνθεση της πτητικής ουσίας (*R*)-3-υδροξυεξανοικός (*S*)-2-πεντυλεστέρας, η οποία εκλύεται από ώριμες μπανάνες, χρησιμοποιήθηκαν κετορεδουκτάσες και η ακινητοποιημένη λιπάση CAL-B. Αυτή είναι η πρώτη ενζυμική σύνθεση, η οποία οδήγησε στο φυσικό προϊόν με υψηλή οπτική και χημική καθαρότητα και με ολική απόδοση 79%. Αναπτύχθηκε μία ολική συνθετική μέθοδος, η οποία αρχίζει από τις εύκολα διαθέσιμες αρχικές ενώσεις όπως ο 3-οξοεξανοικός μεθυλεστέρας (**2**) και η 2-πεντανόνη (**3**). Κάθε στάδιο ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα με ποσότητες σε μεγαλύτερη κλίμακα. Επομένως παρουσιάστηκε μια αποτελεσματική και απλή συνθετική πορεία για το φυσικό προϊόν.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>**

**ΧΗΜΕΙΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ  
FERRUGINEOL, CRUENTOL ΚΑΙ PHOENICOL  
ΦΕΡΟΜΟΝΩΝ ΣΥΝΑΘΡΟΙΣΗΣ ΤΩΝ ENTOMΩΝ  
*RHYNCHORHORUS SPP.***

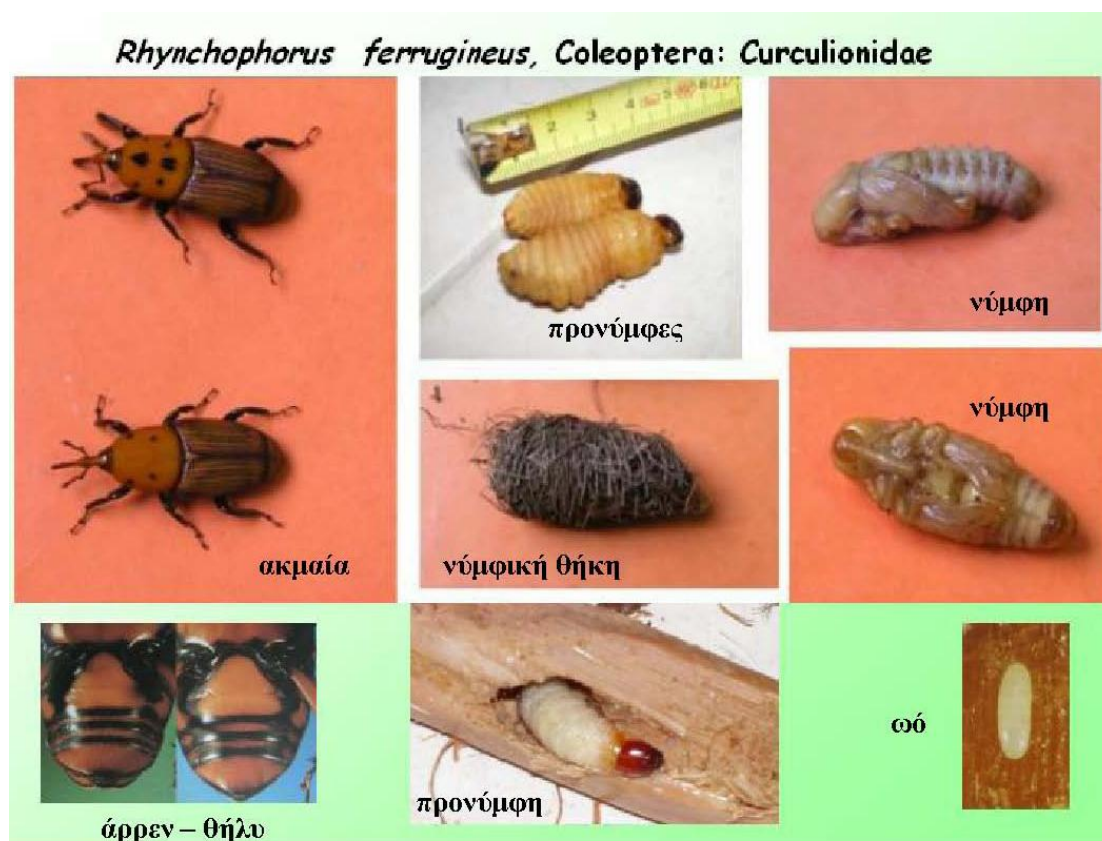
## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα έντομα *Rhynchophorus spp.* ανήκουν στην τάξη των Κολεοπτέρων, της οικογένειας των Curculionidae. Ο κόκκινος ρυγχωτός κάρθαρς των φοινικοειδών *Rhynchophorus ferrugineus* (Asian red palm weevil) θεωρείται σήμερα ως ο σημαντικότερος εχθρός των φοινικοειδών. Είναι έντομο πολυφάγο, με κύριους ξενιστές τα φοινικοειδή (οικογένεια Agecaceae), ενώ προσβάλλει επίσης τον αθάνατο (*Agave americana*, οικογένεια Agavaceae) και το ζαχαροκάλαμο (*Saccharum officinarum*, οικογένεια Poaceae). Έπειτα από πειράματα που έγιναν στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο διαπιστώθηκε ότι καταστρέφει και τον ιθαγενή φοίνικα του Θεόφραστου (*Phoenix Theophrastii*).<sup>57</sup> Έχει καταγραφεί σε πάρα πολλές χώρες, από την Ωκεανία και την Ανατολική Ασία μέχρι την Ινδία και όλη τη Νοτιοδυτική Ασία. Πρόσφατα βρέθηκε και στη λεκάνη της Μεσογείου.<sup>58</sup>

Το *R. ferrugineus* βρέθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα, στην Κρήτη (Χερσόνησος, Ν. Ηρακλείου) το Νοέμβριο του 2005 από τον Γεωπόνο κ. Οικονόμου Δ., σε φοίνικες του γένους *Washingtonia*, που εισήχθησαν από την Αίγυπτο, καθώς και σε φοίνικες του είδους *Phoenix canariensis*. Τα δείγματα προσκομίστηκαν στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο και από εκεί στάλθηκαν στο Μουσείο Φυσικής Ιστορίας του Λονδίνου όπου επιβεβαιώθηκε η ταυτότητα του εντόμου. Ήδη έχει επεκταθεί σε όλη την Κρήτη προκαλώντας μεγάλες καταστροφές. Ιδιαίτερως ανησυχητική είναι η ανεύρεση του συγκεκριμένου εντόμου στο φοινικόδασος του Βάι, που είναι το τελευταίο δάσος στη Γη του Φοίνικα του Θεοφράστου, *Phoenix theophrastii*. Στην υπόλοιπη Ελλάδα έχει προκαλέσει επίσης μεγάλες καταστροφές στη Νήσο Ρόδο, στο Νομό Ηλείας, στην Αττική, τη Βοιωτία και τη Εύβοια.<sup>59</sup>

Το ακμαίο του *R. ferrugineus* έχει χρώμα κοκκινωπό-καφέ, μήκος περίπου 35 mm, πλάτος 12 mm και φέρει μακρύ ευδιάκριτο ρύγχος. Όλα τα στάδια του βιολογικού κύκλου του *R. ferrugineus* (ωό, προνύμφη, νύμφη, ακμαίο) (Εικόνα 2) εξελίσσονται στο εσωτερικό του φοίνικα. Τα θήλεα γεννούν περίπου 300 ωά (μήκος 2.6 mm, πλάτος 1.1 mm) σε ξεχωριστές οπές ή πληγές του φοίνικα στην κορυφή (στεφάνη), στη βάση των νεαρών φύλλων ή στον κορμό. Οι προνύμφες (ευκέφαλες άποδες, μήκος 50 mm, πλάτος 20 mm) εκκολάπτονται σε 2-5 μέρες και ορύττουν οπές στο εσωτερικό των φοινίκων. Μετακινούνται από περισταλτικές μυϊκές συσπάσεις του σώματος τους και τρέφονται από μαλακούς χυμώδεις ιστούς,

απορρίπτοντας όλα τα ινώδη υλικά. Κινούνται προς το εσωτερικό του κορμού ανοίγοντας στοές και μεγάλες κοιλότητες. Οι προνύμφες μπορούν να εντοπιστούν σε οποιοδήποτε μέρος του κορμού ακόμα και στη βάση του, στο σημείο που αρχίζουν οι ρίζες. Τα βαριά προσβεβλημένα φοινικόδενδρα εμφανίζουν πτώση των φύλλων και σήψη του κορμού, με συνέπεια το θάνατο του δένδρου. Συνήθως η ζημιά που προκαλείται από τις προνύμφες είναι ορατή μόνο πολύ μετά την προσβολή όταν η κατάσταση είναι πλέον μη αναστρέψιμη. Η περίοδος που το έντομο βρίσκεται στο στάδιο της προνύμφης κυμαίνεται από 1-3 μήνες. Η νύμφωση γίνεται μέσα ή έξω από τον κορμό, μέσα σε νυμφική θήκη που φτιάχνει η προνύμφη από ξερές ίνες του φοίνικα και διαρκεί 14-21 ημέρες οπότε γίνεται έξοδος των ακμαίων. Στον ίδιο φοίνικα μπορεί να απαντώνται επικαλυπτόμενες γενιές και να συνυπάρχουν όλα τα βιολογικά στάδια του εντόμου μέχρι την πλήρη καταστροφή του φυτού οπότε τα ακμαία μεταναστεύουν σε νέα φοινικόδεντρα.<sup>60</sup>



**Εικόνα 2.** Στάδια βιολογικού κύκλου *R. Ferrugineus*.

Χαρακτηριστικό μακροσκοπικό σύμπτωμα της προσβολής είναι η καταστροφή - ξήρανση της νέας βλάστησης, δηλαδή των κεντρικών φύλλων, και η κάμψη των παλαιών φύλλων που δίνει στο φυτό την όψη ανοικτής ομπρέλας (Εικόνα 3). Οι έντονα προσβεβλημένοι φοίνικες εμφανίζουν ολική απώλεια των φύλλων και σήψη του κορμού, με συνέπεια την ξήρανση του δέντρου. Συνήθως η ζημιά που προκαλείται από τις προνύμφες είναι ορατή πολύ μετά την έναρξη της προσβολής. Όταν εμφανιστούν τα πρώτα συμπτώματα η ζημιά είναι μη αναστρέψιμη και επιφέρει την ολική ξήρανση του δέντρου. Τα ακμαία που βρίσκονται σε ένα φοίνικα δεν μετακινούνται σε άλλο, όσο βρίσκουν τροφή σ' αυτόν. Το ακμαίο δεν πετάει πολύ μέσα στη συστάδα που βρίσκεται αλλά πετάει προς άλλες συστάδες όταν νεκρωθούν όλοι οι φοίνικες της συστάδας του και δεν βρίσκει αρκετή τροφή.<sup>59</sup>



Εικόνα 3. Προσβολή σε κανάριο φοίνικα από προνύμφη *R. Ferrugineus*.

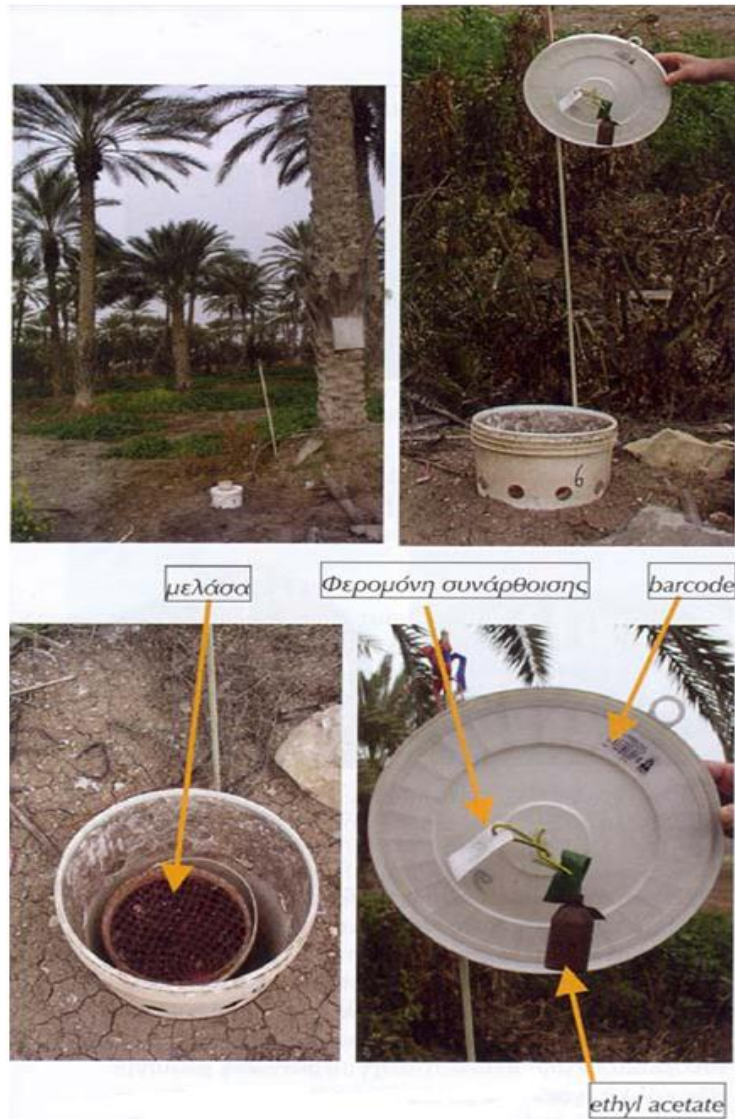
Γενικά, για την πρόληψη και την αντιμετώπιση του *R. ferrugineus* απαιτείται:

- Αυστηρή τήρηση των κανόνων φυτοϋγειονομικού ελέγχου, δηλαδή απαγόρευση εισαγωγής / μετακίνησης φοινικοειδών από περιοχές που έχουν προσβληθεί.
- Άμεση απομάκρυνση του φυτού, κάψιμο και θάψιμο σε περίπτωση εμφάνισης της προσβολής.
- Επεμβάσεις στα γειτονικά φοινικοειδή με εντομοπαθογόνους νηματώδεις ή άλλα εγκεκριμένα σκευάσματα ή μεθόδους.
- Τοποθέτηση κατάλληλα διατεταγμένου δικτύου φερομονικών παγίδων για την παρακολούθηση των πληθυσμών και τον περιορισμό της εξάπλωσης της προσβολής.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στην Ελλάδα δεν επιτρέπεται η χρήση τοξικών εντομοκτόνων εντός του αστικού πρασίνου. Ως εκ τούτου πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη βαρύτητα στη βιολογική αντιμετώπιση του εχθρού, με εντομοπαθογόνους μικροοργανισμούς (νηματώδεις, μύκητες, βακτήρια ή ιούς) και ένα συστηματικό δίκτυο παγίδευσης του εντόμου, με φερομονικές παγίδες.

Στο Ισραήλ όπου η καλλιέργεια της χουρμαδιάς (*Phoenix dactylifera*) είναι μεγάλης οικονομικής σημασίας αφ' ενός έχει στηθεί ένα ιδιαίτερα εκτεταμένο δίκτυο παγίδευσης αφ' ετέρου τηρούνται αυστηρά οι απαγορεύσεις μεταφοράς δενδρυλλίων (παραφυάδων χουρμαδιάς) από τις πληγείσες περιοχές. Το όλο σύστημα παρακολουθείται από εξειδικευμένους επιστήμονες με τη χρήση μεθόδων και τεχνολογίας συστημάτων καταγραφής συντεταγμένων (GPS). Την καταγραφή των συλλήψεων ακολουθεί χημική καταπολέμηση στα πέριξ της παγίδας φοινικόδενδρα με συνθετικό εντομοκτόνο ή στην περίπτωση βιολογικών καλλιεργειών με φυσική εντομοκτόνο ουσία. Πρέπει όμως απαραίτητα να επισημάνουμε κάποιες σημαντικές διαφορές με την προσφάτως παρατηρούμενη κατάσταση στην Ελλάδα. Στο Ισραήλ οι προσβολές είναι στις παραφυάδες της χουρμαδιάς (*Ph. dactylifera*) και ως εκ τούτου οι παγίδες τοποθετούνται στο έδαφος με σκοπό να συλλάβουν τα βαδίζοντα ακμαία. Η κάθε παγίδα περιέχει φερομόνη συνάθροισης και ως προσελκυστικά τροφής οξικό αιθυλεστέρα και μελάσα από χουρμάδες. Επίσης η κάθε παγίδα είναι καταχωρημένη στο σύστημα παρακολούθησης με συγκεκριμένο κωδικό (barcode) (Εικόνα 4)

Στην Ελλάδα όμως οι προσβολές παρατηρούνται σε Κανάριους φοίνικες (*Phoenix canariensis*) στην κορυφή, στεφάνη του δέντρου. Ως εκ τούτου οι παγίδες δεν πρέπει να τοποθετηθούν μόνο στο έδαφος αλλά πρέπει να δοκιμαστούν σε διάφορα ύψη με σκοπό να συλληφθούν τα αναρριχώμενα ή ιπτάμενα ακμαία, επειδή το *R. ferrugineus* έχει ικανότητα ισχυρής πτήσης. Επίσης πριν ολοκληρωθούν πειραματικές δοκιμές (σχετικά με τους τύπους και την πυκνότητα των παγίδων, τα σημεία και τους τρόπους παγίδευσης) καλό είναι να αποφεύγεται η ανάρτηση παγίδων επί των φοινικοδένδρων, η τοποθέτηση υπερβολικού αριθμού παγίδων και η τοποθέτηση παγίδων σε περιοχές που δεν έχουν παρατηρηθεί προσβολές.<sup>61</sup> Η ανάπτυξη αποτελεσματικών φερομονικών παγίδων για την παγίδευση και την απομάκρυνση του σκαθαριού από περιοχές με φοινικοειδή παραμένει σημαντική πρόκληση.

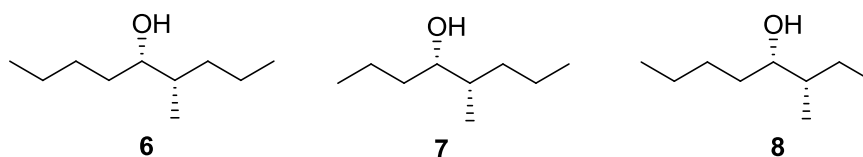


**Εικόνα 4.** Σύστημα παγίδευσης του *R. Ferrugineus*, στο Ισραήλ.

Το 1993 ο Roachat και οι συνεργάτες του απομόνωσαν την φερομόνη συνάρθρωσης του *R. Ferrugineus* και την προσδιόρισαν σαν 4-μέθυλο-5-ενανόλη.<sup>62</sup> Για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής της ένωσης αυτής, ο Mori και οι συνεργάτες του συνέθεσαν και τα δυο εναντιομερή της. Με σύγκριση των φασματοσκοπικών, χρωματογραφικών και βιολογικών δεδομένων μεταξύ της φυσικής φερομόνης και των δυο εναντιομερών ενώσεων, απέδειξαν ότι η βιολογικά δραστική μορφή είναι το (4*S*, 5*S*)-εναντιομερές (Σχήμα 25). Η βιολογικά ενεργή ένωση ονομάστηκε ferrugineol και ταυτοποιήθηκε σαν η (S)-4-μεθυλο-(S)-5-ενανόλη.<sup>63</sup> Από τότε έχουν δημοσιευτεί αρκετές συνθέσεις της ένωσης αυτής,<sup>64</sup> μέσω περίπλοκων συνθετικών πορειών ή σε μικρή διαστερεοεκλεκτικότητα/εναντιοεκλεκτικότητα.

Το *R. Cruentatus*, ρυγχωτός κάρθαρος (giant palm weevil), απαντάται στο νότιο μέρος των Ηνωμένων Πολιτειών, έχει βρεθεί στο νότιο Τέξας προς τα δυτικά και τη Νότια Καρολίνα προς τα βόρεια. Είναι το μεγαλύτερο σκαθάρι στη Βόρεια Αμερική και το μόνο είδος εντόμου *Rhynchophorus* που υπάρχει στις ηπειρωτικές Ηνωμένες Πολιτείες. Θεωρείται σημαντικό παράσιτο και προσβάλλει Κανάριους φοίνικες και χουρμαδιές, αλλά κυρίως επιτίθεται σε μεταμοσχευμένους ή σε στρεσαρισμένους, λόγω μεταφύτευσης, διακοσμητικούς φοίνικες.<sup>65</sup> Η παραχθείσα από το αρσενικό φερομόνη συνάθροισής του *R. Cruentatus*, απομονώθηκε το 1994 από την ομάδα του Weissling, ονομάστηκε *cruentol*, και προσδιορίστηκε ως η 5-μεθυλο-4-οκτανόλη.<sup>66</sup> Ο Oehlschlager και οι συνεργάτες του καθόρισαν την απόλυτη διαμόρφωση του φυσικού προϊόντος *cruentol* ως 4*S*, 5*S*.<sup>67</sup> Από τότε έχουν δημοσιευτεί και άλλες συνθέσεις της ένωσης αυτής<sup>68,64b</sup> (Σχήμα 25).

Το *R. Phoenix* (African palm weevil), ή Αφρικανικός ρυγχωτός κάρθαρος θεωρείται εξίσου σημαντικός εχθρός των φοινικοειδών και εντοπίζεται κυρίως σε Αφρικανικές χώρες. Τα αρσενικά παράγουν την φερομόνη *phoenicol* και προσδιορίστηκε ως η 3-μεθυλο-4-οκτανόλη.<sup>69</sup> Ο Mori και οι συνεργάτες του συνέθεσαν όλα τα στερεοϊσομερή προκειμένου να καθορίσουν την απόλυτη διαμόρφωση του φυσικού ισομερούς (3*S*, 4*S*).<sup>70</sup> (Σχήμα 25). Αργότερα δημοσιεύτηκε μία νέα σύνθεση της φερομόνης αυτής.<sup>64b</sup>

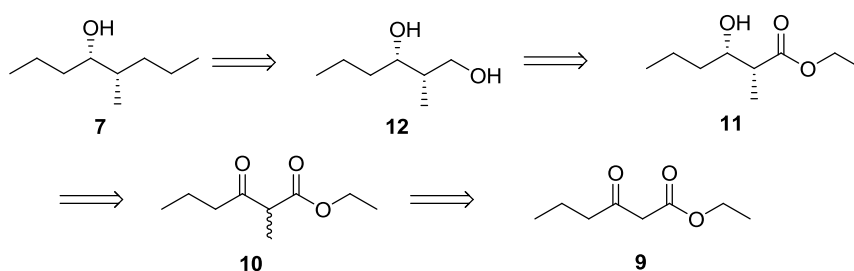


**Σχήμα 25:** Δομές των φερομονών *ferrugineol* (6), *cruentol* (7) και *phoenicol* (8).

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η πρώτη σύνθεση των δευτεροταγών αλκοολών (*S*)-4-μέθυλο-(*S*)-5-ενεανόλη (6), (*S*)-4-μέθυλο-(*S*)-5-οκτανόλη (7) και (*S*)-3-μέθυλο-(*S*)-4-οκτανόλη (8) με τη χρήση απομονωμένων κετορεδουκτασών, χρησιμοποιώντας σαν αντίδραση κλειδί την ενζυμική αναγωγή με κετορεδουκτάσες για την στερεοεκλεκτική αναγωγή 1,3-δικετοεστέρων.

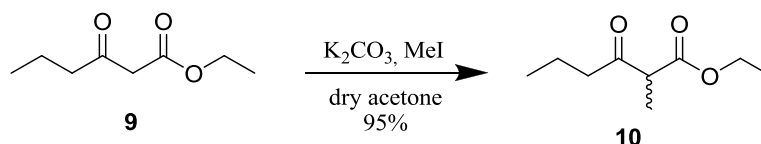
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δεδομένου ότι το φυσικό προϊόν *cruentol* (**7**), είναι μία οπτικά ενεργή αλκοόλη, θα μπορούσε να συντεθεί από τον εμπορικά διαθέσιμο 3-οξοεξανοϊκό αιθυλεστέρα χρησιμοποιώντας ασύμμετρη αναγωγή ως στάδιο κλειδί για την επίτευξη της σύνθεσης οπτικά ενεργού προϊόντος. Βασιζόμενοι στο προηγούμενο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής, όπου παρουσιάστηκε αναλυτικά η ενζυμική αναγωγή με απομονωμένες κετορεδουκτάσες, μια από τις αποτελεσματικότερες μεθόδους για την στερεοεκλεκτική αναγωγή β-κετοεστέρων, επιλέχθηκε αυτή η μεθοδολογία για τη σύνθεση της φερομόνης *cruentol* (**7**). Παρακάτω παρουσιάζεται η ρετροσυνθετική ανάλυση σύνθεσης της (*S*)-4-μεθυλο-(*S*)-5-οκτανόλης (**7**), η οποία μπορεί να ξεκινήσει από τον εμπορικά διαθέσιμο 3-οξοεξανοϊκό αιθυλεστέρα (**9**) (Σχήμα 26).



**Σχήμα 26:** Ρετροσύνθεση της (*S*)-4-μέθυλο-(*S*)-5-οκτανόλης (**7**).

Ο 4-μεθυλο-3-οξοεξανοϊκός αιθυλεστέρας (**10**) δεν είναι εμπορικά διαθέσιμος όμως μπορεί πολύ εύκολα να παρασκευαστεί από τον εμπορικά διαθέσιμο 3-οξοεξανοϊκό αιθυλεστέρα (**9**) με αντίδραση αλκυλίωσης (Σχήμα 27).



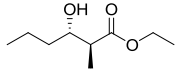
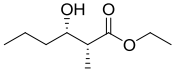
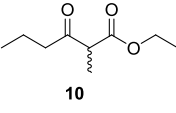
**Σχήμα 27:** Παρασκευή της ένωσης (**10**) με αντίδραση μεθυλίωσης.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές αντιδράσεις με απομονωμένες και εμπορικά διαθέσιμες κετορεδουκτάσες όπως και στο προηγούμενο κεφάλαιο, για τη μελέτη της αναγωγής του 4-μεθυλο-3-οξοεξανοϊκού αιθυλεστέρα με



στόχο τη σύνθεση του *syn* διαστερομερούς. Τα καλύτερα αποτελέσματα αναγράφονται στον Πίνακα 6 που ακολουθεί.

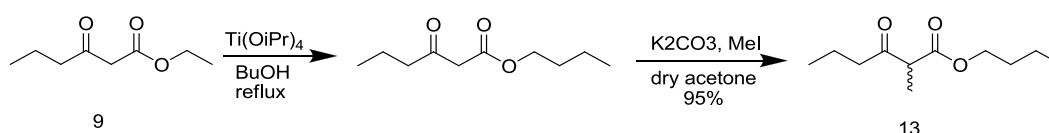
**Πίνακας 6.** Ενζυμική αναγωγή του κετο εστερα **10**.

Υπόστρωμα	KRED	Ποσοστό μετατροπής (24h) <sup>[α]</sup>	Διαστερομερική περίσσεια de% <sup>[α]</sup>	 <i>anti</i>	 <i>syn</i>
 <b>10</b>	101	>99%	24%	62%	38%
	107	46%	>99%	100%	-
	108	58%	76%	88%	12%
	111	>99%	60%	80%	20%
	112	99%	43%	72%	28%
	113	>99%	10%	55%	45%
	114	99%	80%	90%	10%
	115	91%	62%	81%	19%
	116	47%	82%	91%	9%
	118	>99%	81%	90%	10%
	121	>99%	88%	94%	6%
	123	>99%	86%	93%	7%
	127	57%	>99%	100%	-
	128	99%	84%	92%	8%
	A1B	83%	64%	82%	18%
	A1C	97%	66%	83%	17%
	A1D	97%	70%	85%	15%
	A1F	98%	98%	99%	1%
	A1I	86%	98%	99%	1%
	B1E	99%	96%	98%	2%
B1F	58%	10%	45%	55%	

[α] Η διαστερομερική περίσσεια και τα ποσοστά μετατροπής προέκυψαν από αέρια χρωματογραφία με χειρόμορφη κολώνα.

Από τον πίνακα αυτό φαίνεται ότι αρκετά ένζυμα επέδειξαν δραστηριότητα στην αντίδραση αναγωγής του κετοεστερά **10**, με ποσοστά μετατροπής 46%-99%, και σε όλες τις περιπτώσεις κύριο προϊόν είναι το *anti*, όπως αποδείχθηκε από το φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR.<sup>71</sup> Επίσης, όπως φαίνεται με τον τρόπο αυτό χρησιμοποιώντας διαφορετικά ένζυμα, μπορεί να προκύψει μόνο το *anti* διαστερομερές σε οπτικώς καθαρή μορφή και σε πολύ μικρούς χρόνους αντίδρασης, χωρίς το σχηματισμό του επιθυμητού *syn* διαστερομερούς

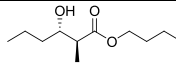
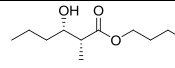
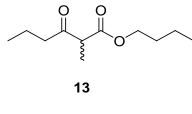
Για τον έλεγχο της διαστεροεκλεκτικότητας των ενζύμων, έτσι ώστε να προκύψει το *syn* διαστερομερές μελετήθηκε η ενζυμική αναγωγή σε υπόστρωμα με διαφορετική δομή και μέγεθος, τον 4-μεθυλο-3-οξοεξανοϊκό βουτυλεστέρα (**13**). Ο εστέρας αυτός δεν είναι εμπορικά διαθέσιμος, όμως μπορεί εύκολα να παρασκευαστεί από τον εμπορικά διαθέσιμο 3-οξοεξανοϊκό αιθυλεστέρα **9** (Σχήμα 28).



**Σχήμα 28:** Παρασκευή της ένωσης (**13**) από τον 3-οξοεξανοϊκό αιθυλεστέρα (**9**)

Στην περίπτωση του κετο εστέρα (**13**) πραγματοποιήθηκαν μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων με απομονωμένες κετορεδουκτάσες. Τα καλύτερα αποτελέσματα της ενζυμικής αναγωγής παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

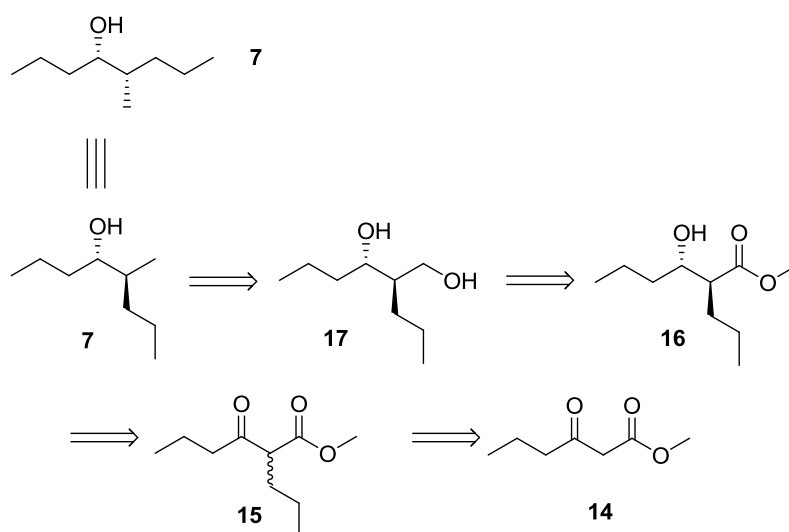
**Πίνακας 7.** Ενζυμική αναγωγή του κετο εστέρα **13**.

Υπόστρωμα	KRED	Ποσοστό μετατροπής (24h) <sup>[α]</sup>	Διαστερομερική περίσσεια de% <sup>[α]</sup>	 <i>anti</i>	 <i>syn</i>
 <b>13</b>	101	94%	18%	59%	41%
	108	95%	>99%	100%	-
	111	95%	34%	67%	33%
	112	95%	30%	65%	35%
	113	92%	6%	53%	47%
	114	93%	60%	80%	20%
	115	90%	64%	82%	18%
	116	70%	>99%	100%	-
	118	85%	40%	70%	30%
	121	93%	74%	87%	13%
	123	75%	60%	80%	20%
	127	60%	>99%	100%	-
	128	99%	52%	76%	24%
	A1B	90%	20%	60%	40%
	A1C	82%	26%	63%	37%
A1F	75%	>99%	100%	-	

[α] Η διαστερομερική περίσσεια και τα ποσοστά μετατροπής προέκυψαν από αέρια χρωματογραφία με χειρόμορφη κολώνα.

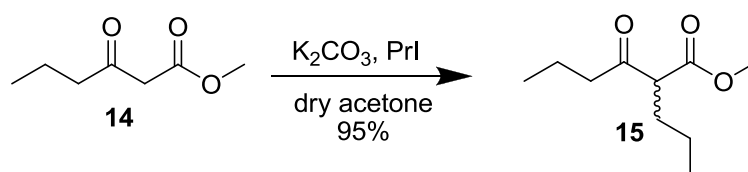
Όπως φαίνεται στον Πίνακα 7 αλλάζοντας το υπόστρωμα η διαστεροεκλεκτικότητα των προϊόντων δεν έχει μεταβληθεί ουσιαστικά. Έτσι σε όλες τις περιπτώσεις και πάλι κύριο προϊόν είναι το *anti* διαστερομερες.

Οπότε για την επίτευξη της ασύμμετρης σύνθεσης της Cruentol (**7**), μελετήθηκε μια διαφορετική προσέγγιση. Η νέα ρετροσυνθετική ανάλυση παρουσιάζεται παρακάτω (Σχήμα 29), και αξίζει να σημειωθεί ότι η ένωση κλειδί για τη σύνθεση του φυσικού προϊόντος είναι ο υδρόξυ εστέρας **16** με *anti* στερεοδομή.



**Σχήμα 29:** Ρετροσύνθεση της (*S*)-4-μέθυλο-(*S*)-5-οκτανόλη (**7**).

Η σύνθεση μπορεί να ξεκινήσει από τον εμπορικά διαθέσιμο κετοεστέρα **14**. Ο κετοεστέρας **15** μπορεί πολύ εύκολα να συντεθεί από τον εμπορικά διαθέσιμο 3-οξοεξανοϊκό μεθυλεστέρα **14** με αντίδραση προπυλίου (Σχήμα 30).

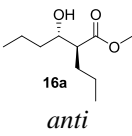
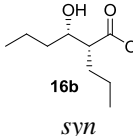
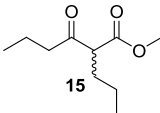


**Σχήμα 30:** Παρασκευή της ένωσης (**15**) με αντίδραση αλκυλίωσης

Στη συνέχεια με τον παραγόμενο κετοεστέρα (**15**) πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές ενζυμικές αντιδράσεις χρησιμοποιώντας απομονωμένες και NADPH-εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες, παρουσία του ανακυκλωτικού συστήματος γλυκόζη/αφυδρογονάση της γλυκόζης, για την ανακύκλωση του συνενζύμου, με

σκοπό τη σύνθεση του *anti* διαστερομερούς. Τα καλύτερα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 8.

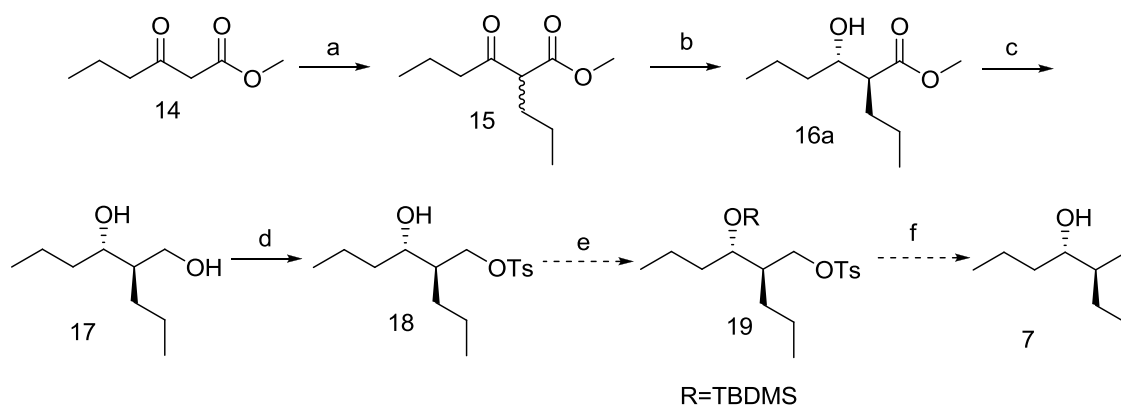
**Πίνακας 8.** Ενζυμική αναγωγή του κετο εστέρα **15**.

Υπόστρωμα	KRED	Ποσοστό μετατροπής (24h) <sup>[α]</sup>	Διαστερομερική περίσσεια de% <sup>[α]</sup>	 <b>16a</b> <i>anti</i>	 <b>16b</b> <i>syn</i>
 <b>15</b>	101	99%	50%	75%	25%
	108	74%	99%	>99%	-
	116	80%	99%	>99%	-
	117	86%	98%	99%	1%
	118	99%	98%	99%	1%
	<b>119</b>	>99%	99%	>99%	-
	128	90%	98%	99%	1%

[α] Η διαστερομερική περίσσεια και τα ποσοστά μετατροπής προέκυψαν από αέρια χρωματογραφία με χειρόμορφη κολώνα.

Από τα αποτελέσματα του πίνακα φαίνεται ότι τα ενζυμα αντέδρασαν πολύ εκλεκτικά και με υψηλά ποσοστά μετατροπής. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, οι KRED-108, 116 και 119 που ολοκλήρωσαν την αντίδραση σε 24 ώρες σχηματίζοντας μόνο ένα από τα δυο διαστερομερή, το *anti*, σε οπτικά καθαρή μορφή (**16a**, Πίνακας 8). Το σημαντικότερο στην περίπτωση αυτή είναι ότι με την KRED 119 σχηματίστηκε μόνο το επιθυμητό προϊόν (>99%) σε 24 ώρες με ποσοστό μετατροπής >99%.

Στη συνέχεια, έχοντας συνθέσει ενζυμικά την ενδιάμεση ένωση **16a** σε μεγάλη απόδοση και οπτική καθαρότητα, ακολουθήσαμε την συνολική συνθετική πορεία, όπως παρουσιάζεται παρακάτω στο Σχήμα 31. Η αρχική ουσία ήταν ο εμπορικά διαθέσιμος 3-οξοεξανοϊκός μεθυλεστέρας (**14**), ο οποίος εύκολα και ποσοτικά μετατράπηκε στον κετοεστέρα **15**. Ο υδροξυ εστέρας **16a** προέκυψε με την ενζυμική αναγωγή, χρησιμοποιώντας την KRED-119, με υψηλή απόδοση και οπτική καθαρότητα. Η διόλη **17** προέκυψε με την αναγωγή της ένωσης **16a** χρησιμοποιώντας  $\text{LiAlH}_4$ . Στη συνέχεια με εκλεκτική αντίδραση τοξυλίωσης σχηματίστηκε η ένωση **18** και είναι χαρακτηριστικό ότι αντέδρασε με το  $\text{TsCl}$  μόνο η πρωτοταγής υδροξυλομάδα. Τα τελευταία βήματα, προστασία του ελεύθερου υδροξυλίου της **18**, η απομάκρυνση της τοξυλομάδας από την ένωση **19** και η αποπροστασία για το σχηματισμό της φερομόνης Cruentol (**7**), βρίσκονται υπό μελέτη.

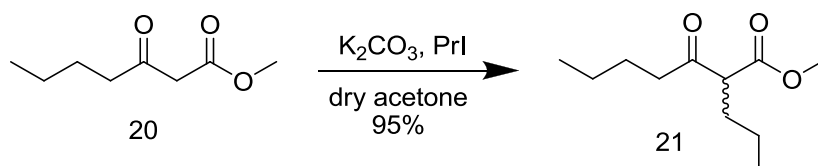


**Σχήμα 31.** Χημιοενζυμική σύνθεση της φερομόνης cruentol (7)

a) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Prop-I, ξηρή ακετόνη, reflux, 95% απόδοση. b) KRED-119, NADPH, r.t., 95% απόδοση, >99% de. c) LiAlH<sub>4</sub>, ξηρός Et<sub>2</sub>O, 0°C-r.t., 83% απόδοση, d) TsCl/Et<sub>3</sub>N, DMAP, ξηρό CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 14 h 85% απόδοση. e) TBDMSCl, imidazole, DMF, rt. f) i. LiAlH<sub>4</sub>, ξηρό THF, 0 °C-r.t., ii. TBAF, THF, 0°C – r.t., 2 h.

Για τη σύνθεση των φερομονών Ferrugineol (6), και phoenicol (8) χρησιμοποιήθηκε η ίδια προσεγγιστική μεθοδολογία με την φερομόνη cruentol (7), που αναφέρθηκε προηγουμένως.

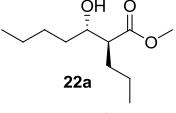
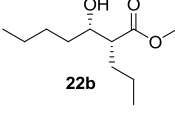
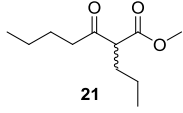
Η σύνθεση της ferrugineol (6), ξεκίνησε από τον εμπορικά διαθέσιμο κετοεστέρα 20. Ο κετοεστέρας 21 μπορεί εύκολα να συντεθεί από τον εμπορικά διαθέσιμο 3-οξοεπτανοϊκό μεθυλεστέρα (20) με αντίδραση προπυλίσωσης (Σχήμα 32).



**Σχήμα 32:** Παρασκευή της ένωσης 21 με αντίδραση αλκυλίωσης

Με τον κετοεστέρα 21 πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές ενζυμικές αντιδράσεις χρησιμοποιώντας απομονωμένες και NADPH-εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες, παρουσία του ανακυκλωτικού συστήματος γλυκόζη/αφυδρογονάση της γλυκόζης, για την ανακύκλωση του συνενζύμου, με σκοπό τη σύνθεση του *anti* διαστερομερούς. Τα καλύτερα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 9 που ακολουθεί.

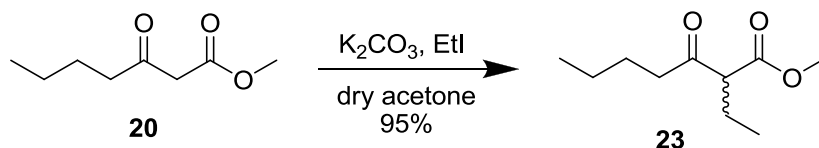
**Πίνακας 9.** Ενζυμική αναγωγή του κετο εστέρα 21.

Υπόστρωμα	KRED	Ποσοστό μετατροπής (24h) <sup>[α]</sup>	Διαστερομερική περίσσεια de% <sup>[α]</sup>	 22a <i>anti</i>	 22b <i>syn</i>
 21	101	97%	84%	92%	8%
	108	80%	96%	98%	2%
	111	97%	70%	85%	15%
	112	95%	40%	70%	30%
	113	87%	70%	85%	15%
	114	90%	60%	80%	20%
	115	97%	70%	85%	15%
	116	90%	98%	99%	1%
	<b>118</b>	98%	>99%	>99%	-
	128	88%	98%	99%	1%

[α] Η διαστερομερική περίσσεια και τα ποσοστά μετατροπής προέκυψαν από αέρια χρωματογραφία με χειρόμορφη κολώνα.

Από τον Πίνακα 9 φαίνεται ότι τα ενζυμα αντέδρασαν πολύ εκλεκτικά και με υψηλά ποσοστά μετατροπής. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, η KRED-118 που ολοκλήρωσε την αντίδραση σε 24 ώρες σχηματίζοντας μόνο ένα από τα δύο διαστερομερή, το *anti*, σε οπτικά καθαρή μορφή. Συγκεκριμένα με την KRED 118 σχηματίστηκε μόνο το επιθυμητό προϊόν (>99%) με ποσοστό μετατροπής 98%.

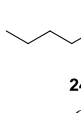
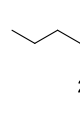
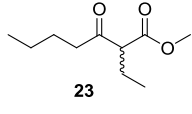
Η σύνθεση της rhoenicol (**8**) μπορεί να ξεκινήσει ομοίως με την σύνθεση της ferrugineol (**6**), από τον εμπορικά διαθέσιμο κετοεστέρα **20**. Ο κετοεστέρας **23** μπορεί εύκολα να συντεθεί από τον εμπορικά διαθέσιμο 3-οξοεπτανοϊκό μεθυλεστέρα (**20**) με αντίδραση αιθυλίωσης (Σχήμα 33).



**Σχήμα 33:** Παρασκευή της ένωσης **23** με αντίδραση αλκυλίωσης.

Στη συνέχεια έχοντας παράγει τον κετοεστέρα **23** πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές ενζυμικές αντιδράσεις χρησιμοποιώντας τις ίδιες απομονωμένες και NADPH-εξαρτώμενες κετορεδοκτάσες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν με τα προηγούμενα υποστρώματα. Τα αποτελέσματα αναφέρονται στον πίνακα 10 που ακολουθεί.

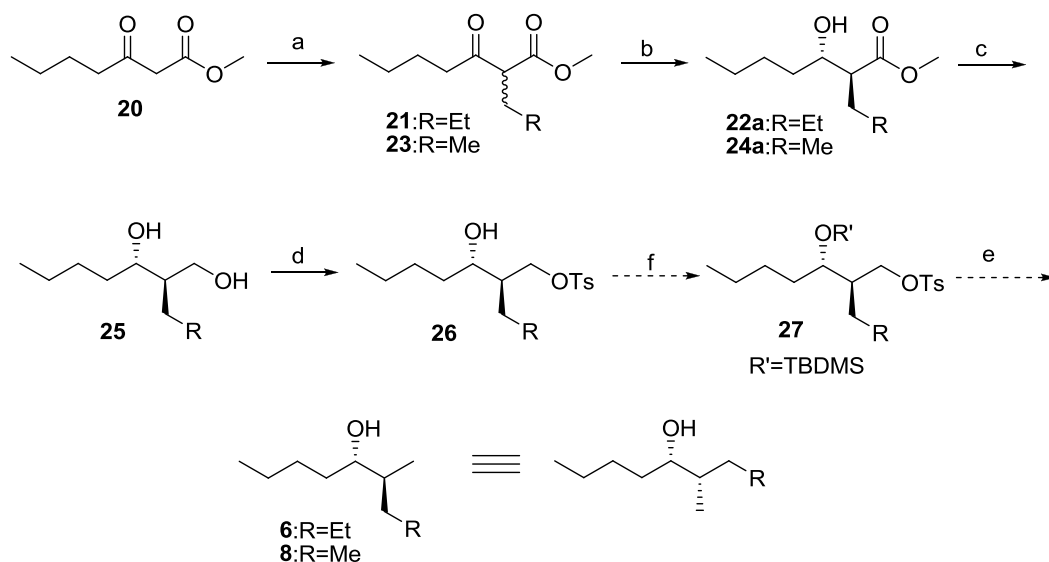
**Πίνακας 10.** Ενζυμική αναγωγή του κετο εστέρα **23**.

Υπόστρωμα	KRED	Ποσοστό μετατροπής (24h) <sup>[a]</sup>	Διαστερομερική περίσσεια de% <sup>[a]</sup>	 <b>24a</b> <i>anti</i>	 <b>24b</b> <i>syn</i>
 <b>23</b>	101	99%	70%	85%	15%
	<b>108</b>	>99%	98%	99%	1%
	111	>99%	80%	90%	10%
	112	83%	74%	87%	13%
	114	>99%	70%	85%	15%
	115	>99%	76%	88%	12%
	116	>99%	96%	98%	2%
	118	>99%	96%	98%	2%
	128	>99%	80%	90%	10%

[a] Η διαστερομερική περίσσεια και τα ποσοστά μετατροπής προέκυψαν από αέρια χρωματογραφία με χειρόμορφη κολώνα.

Από τον πίνακα φαίνεται ότι όλα τα ένζυμα αντέδρασαν πολύ εκλεκτικά και με υψηλά ποσοστά μετατροπής. Από όλα τα ένζυμα, τρία κατάφεραν να σχηματίσουν το ένα ισομερές με μεγάλη οπτική καθαρότητα. Το καλύτερο αποτέλεσμα προέκυψε από την αναγωγή με το ένζυμο KRED-108, το οποίο με >99% ποσοστό μετατροπής οδήγησε στο σχηματισμό του ενός διαστερομερούς με διαστερομερική περίσσεια (99%).

Στη συνέχεια, έχοντας συνθέσει χημειοενζυμικά και τις δυο ενδιάμεσες ενώσεις **22a** και **24a** με μεγάλη απόδοση και οπτική καθαρότητα, ακολουθήθηκε η συνθετική πορεία, όπως παρουσιάζεται παρακάτω στο Σχήμα 34.



**Σχήμα 34.** Χημειοενζυμική σύνθεση των φερομόνων ferrugineol (**6**) και phenicol (**8**)

a) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Prop-I, ξηρή ακετόνη, reflux, 95% απόδοση. b) KRED-118/108, NADPH, r.t., 95% απόδοση, >99% de. c) LiAlH<sub>4</sub>, ξηρός Et<sub>2</sub>O, 0°C-r.t., 83% απόδοση. d) TsCl/Et<sub>3</sub>N, DMAP, ξηρό CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 14 h 85% απόδοση. e) TBDMSCl, imidazole, DMF, r.t. f) i. LiAlH<sub>4</sub>, ξηρό THF, 0 °C-r.t., ii. TBAF, THF, 0°C – r.t., 2 h.

Συνοψίζοντας στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάστηκε η σύνθεση των φυσικών προϊόντων (*S*)-4-μεθυλο-(*S*)-5-ενεανόλη (**6**), (*S*)-4-μεθυλο-(*S*)-5-οκτανόλη (**7**) και (*S*)-3-μεθυλο-(*S*)-4-οκτανόλη (**8**), οι οποίες είναι φερομόνες συνάθροισης, εκλυόμενες από τα αρσενικά άτομα των εντόμων *Rhynchophorus spp.* Για τη σύνθεση τους χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένες κετορεδουκτάσες, οι οποίες συνέβαλαν στη δημιουργία όλων των στερεογονικών κέντρων των ενώσεων αυτών με πολύ υψηλή στερεοεκλεκτικότητα, το οποίο συνέβαλε στη σύνθεση των φυσικών προϊόντων με υψηλή οπτική καθαρότητα. Κάθε στάδιο ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα με ποσότητες σε μεγαλύτερη κλίμακα. Αναπτύχθηκε μία συνθετική μέθοδος, η οποία αρχίζει από τις εμπορικά διαθέσιμες αρχικές ενώσεις όπως ο 3-οξοεξανοϊκός μεθυλεστέρας (**14**) για τη σύνθεση της *cruentol* (**7**), και ο 3-οξοεπτανοϊκός μεθυλεστέρας (**20**) για τη σύνθεση των φερομονών *ferrugineol* (**6**), και *phoenicol* (**8**).



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### A. Υλικά και Μέθοδοι

Οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich, Merck, Fluka και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Πριν από τις ενζυμικές αντιδράσεις, για λόγους ταυτοποίησης, παρασκευάστηκαν τα υποστρώματα και όλη η συνθετική πορεία σε ρακεμική μορφή, με χημικές μεθόδους. Για την εύρεση των πιο δραστικών και εκλεκτικών ενζύμων, όλα τα υποστρώματα εξετάστηκαν με όλη τη σειρά των κετορεδουκτασών. Η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων καθώς και οι εκλεκτικότητες μελετήθηκαν με αέριο χρωματογράφο (Hewlett Packard 5890 Series II με ανιχνευτή FID. Κολώνα: 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm χειρόμορφη κολώνα, 20% permethylated Cyclodextrin-B Part No 112-2532). Τα προϊόντα ταυτοποιήθηκαν με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR) πρωτονίου και άνθρακα, η λήψη των φασμάτων  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR έγινε με φασματοόμετρο 300 MHz και 500 MHz της Bruker, σε διάλυμα  $\text{CDCl}_3$  και σαν σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το τετραμεθυλο σιλάνιο (TMS). Η λήψη των φασμάτων μάζας έγινε σε GC-MS (Simatzu GCMS-QP5050 με κολώνα SPB-5 και ανιχνευτή μάζας CI). Οι χημικές αποδόσεις αναφέρονται σε απομονωμένες και φασματοσκοπικά καθαρές ενώσεις.

Οι κετορεδουκτάσες, η γλυκόζη, το ανακυκλωτικό ένζυμο αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH), το συνένζυμο NADPH και η ακινητοποιημένη λιπάση CAL-B (Novozym 435) που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη αυτή, είναι εμπορικά διαθέσιμα από την εταιρία Codexis. Τα ένζυμα αυτά απομονώθηκαν από διάφορους μικροοργανισμούς, οι οποίοι επέδειξαν αναγωγική δραστικότητα σε αντιδράσεις σε ολόκληρο κύτταρο. Μετά την απομόνωση τους, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση και υπερέκφραση σε ξενιστή *E. coli*, όπου μετά από καθαρισμό προέκυψαν τα ένζυμα σε στερεή μορφή και με καθαρότητες που αγγίζουν το 70%. Όλες οι κετορεδουκτάσες αποδείχτηκαν εξαιρετικά σταθερές για πολλούς μήνες μετά από την αποθήκευσή τους στους  $-20^\circ\text{C}$ . Οι κετορεδουκτάσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν NADPH-εξαρτώμενες. Για την αναγέννηση και των δυο μορφών συνενζύμου χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανακύκλωσης γλυκόζη/αφυδρογονάση της γλυκόζης. Στο σύστημα αυτό έλαβαν μέρος η D-γλυκόζη και η αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH). Σύμφωνα με το συγκεκριμένο σύστημα, η αφυδρογονάση της γλυκόζης οξειδώνει τη D-γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ ανάγοντας ταυτόχρονα το  $\text{NAD(P)}^+$  σε

NAD(P)H. Η GDH είναι καθαρά εξειδικευμένο ένζυμο στην D-γλυκόζη, οπότε δεν οξειδώνει το προϊόν της αντίδρασης (αλκοόλη). Έτσι με τη χρήση του συγκεκριμένου συστήματος ανακύκλωσης απαιτείται καταλυτική ποσότητα του συνενζύμου βοηθώντας στην ελάττωση του κόστους των ενζυμικών αντιδράσεων. Εξαιτίας της παραγωγής γλυκονικού οξέος κατά την αντίδραση, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών για τη διατήρηση του pH σε σταθερά επίπεδα. Το pH των αντιδράσεων ήταν 6.9 και η θερμοκρασία των διατηρήθηκε από τους 25°C έως 37°C, τιμές στις οποίες τα ένζυμα εμφάνισαν αρκετά καλή δραστηριότητα και σταθερότητα. Οι αντιδράσεις διάρκεσαν το πολύ 24 ώρες. Ακολουθώντας την παραπάνω μεθοδολογία οι ενζυμικές αναγωγές πραγματοποιήθηκαν με μεγάλη ευκολία συνθέτοντας πολύτιμες χειρόμορφες ενώσεις, αλλά και φυσικά προϊόντα αποδεικνύοντας την μεγάλη σημασία των κετορεδουκτασών στην ασύμμετρη οργανική σύνθεση.

## **B. Γενικές Συνθετικές Μέθοδοι**

### **Ενζυμικές αντιδράσεις σε μικρή κλίμακα.**

Σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (1 mL, 200 mM, pH=6,9) προστίθενται το υπόστρωμα (25 mM), η κετορεδουκτάση (2 mg/mL), NADPH (2,5 mM, 2 mg), γλυκόζη (100 mM, 18 mg) και αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH, 2 mg/mL). Το διάλυμα αναδεύεται στους 37 °C και ο έλεγχος της αντίδρασης πραγματοποιείται κάθε 1 ώρα με λήψη δείγματος από την αντίδραση, το οποίο αναλύεται σε αέριο χρωματογράφο μετά από εκχύλιση με EtOAc. Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις έγιναν ακολουθώντας αυτό το πρωτόκολλο.

### **Ενζυμικές αντιδράσεις σε μεγάλη κλίμακα.**

Σε 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (200 mM, pH 6.9 ή σε pH 6.5) προστίθενται 50 mM υποστρώματος, γλυκόζη (120 mM, 2.16 g), NADPH (0.5 mM, 42 mg), αφυδρογονάση της γλυκόζης (50 mg) και η κατάλληλη κετορεδουκτάση (50-150 mg). Το μίγμα αναδεύεται στους 37 °C μέχρι το πέρας της αντίδρασης, όπως φαίνεται από τον αέριο χρωματογράφο. Σποραδικά (κάθε 1 ώρα) κατά τη διάρκεια της αντίδρασης το pH επαναρυθμίζεται σε τιμή 6,9 ή 6,5 με προσθήκη σταγόνων NaOH (2 M). Το προϊόν απομονώνεται έπειτα από εκχύλιση του μίγματος με EtOAc (2x100 mL). Μερικές φορές απαιτείται φυγοκέντριση (6000 rpm, 10 λεπτά) για τον

καλό διαχωρισμό υδατικής οργανικής φάσης, εξαιτίας δημιουργίας γαλακτώματος. Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηραίνεται με  $\text{MgSO}_4$  και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό παράγοντας καθαρή και οπτικώς ενεργή την αλκοόλη.

#### **Χημική αναγωγή με $\text{NaBH}_4$ .**

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου  $\text{NaBH}_4$  (0.098 mmol) προστέθηκε σε άνυδρη αιθανόλη (10 mL) και το διάλυμα ψύχθηκε στους  $0^\circ\text{C}$ . Στην θερμοκρασία αυτή και σε διάρκεια 5 λεπτών προστέθηκε στάγδην ο κετο-εστερας ή η κετονη (0.3 mmol) διαλυμένη σε άνυδρη αιθανόλη (5 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 2-4 ώρες στους  $0^\circ\text{C}$  και η αντίδραση ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκε αργά στους  $0^\circ\text{C}$  κορεσμένο διάλυμα  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 mL) και το διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό. Κατόπιν προστέθηκαν 15 mL νερό και το μίγμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα (2x20 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με  $\text{MgSO}_4$  και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό.

#### **Σύνθεση των MPA εστέρων των δευτεροταγών αλκοολών**

Σε διάλυμα του αντίστοιχου υδρόξυ εστέρα (0.1 mmol), σε άνυδρο  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , προστίθενται 1.1 ισοδύναμα DCC (0.11 mmol), 1.1 ισοδύναμα του αντίστοιχου (*R*) ή (*S*) MPA (0.11 mmol) και καταλυτική ποσότητα DMAP και το διάλυμα αναδεύεται στους  $0^\circ\text{C}$  για 4-6 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μίγμα διηθείται, το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό και το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/ $\text{EtOAc}$ , v/v, 5/1). Ο παραγόμενος MPA-εστέρας απομονώνεται με απόδοση 90%.

#### **Υδρόλυση β-κετοεστέρων**

Σε διάλυμα  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  (1/1 v/v, 10 mL) προστίθενται ο εστέρας (1.2 mmol, 176 mg), 0,7 ισοδύναμα  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0.84 mmol) και το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα συγκεντρώθηκε, αραιώθηκε με  $\text{H}_2\text{O}$  (8 mL) και εκχυλίζεται με  $\text{Et}_2\text{O}$  (8 mL). Η υδατική φάση οξινίζεται σε pH 3 και εκχυλίζεται με  $\text{EtOAc}$  (3x10 mL). Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηραίνεται με  $\text{MgSO}_4$  και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό παράγοντας καθαρό το αντίστοιχο οξύ.

### **Αλκυλίωση β-κετοεστέρων**

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου ο εστέρας (50 mmol) διαλύθηκε σε άνυδρη ακετόνη (40 mL) και προξηραμένο ανθρακικό κάλιο (50 mmol) προστέθηκε στο διάλυμα. Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και εν συνεχεία προστέθηκαν, σε διάρκεια 2 λεπτών, το κατάλληλο αλκυλοϊωδίδιο (61.5 mmol). Το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού για 20 ώρες μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οποία παρατηρήθηκε είτε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ή με αέρια χρωματογραφία. Μετά από συμπύκνωση του μίγματος, προστέθηκε αιθέρας (50 mL), ακολούθησε διήθηση υπό κενό, για την απομάκρυνση των αλάτων και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Τα προϊόντα απομονώθηκαν μετά από χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 15/1). Και στη συνέχεια τα καθαρά προϊόντα που προέκυψαν ανάχθηκαν ενζυμικά. Απόδοση 70 – 95%.

### **Αναγωγή β-κετοεστέρων με LiAlH<sub>4</sub>**

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου σε διάλυμα LiAlH<sub>4</sub> (5 mmol) σε άνυδρο αιθέρα (15 ml), στους 0 °C, προστίθεται στάγδην ο εστέρας (15 mmol) διαλυμένος σε αιθέρα. Το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου και η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ή αέρια χρωματογραφία. Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 15% NaOH (5 ml) (χαρακτηριστικό λευκό ίζημα) και εκχυλίζεται με EtOAc (4x5 mL). Ακολουθεί ξήρανση με MgSO<sub>4</sub> και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό. Απόδοση 75 – 85%.

### **Αντίδραση διολών με χλωρίδιο του τοζυλίου**

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου σε διάλυμα διόλης (2mmol) σε άνυδρο CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15ml), στους 0 °C, προστέθηκε Et<sub>3</sub> N (2.2 mmol), χλωρίδιο του τοζυλίου (2.3 mmol) και τέλος DMAP καταλυτικά. Το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 14 ώρες και η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολουθεί προσθήκη νερού (15ml) και αιθέρα (15ml). Η υδατική φάση εκχυλίζεται με αιθέρα (3x15ml) και στη συνέχεια η οργανική εκχυλίζεται με HCl 2N (5x10ml) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (brine) (5ml). Ακολουθεί ξήρανση με MgSO<sub>4</sub> και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό. Το προϊόν απομονώνεται μετά από χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 8/1). Απόδοση 85%.

### **Προστασία αλκοολών με TBDMSiCl**

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου, σε διάλυμα αλκοόλης (4.24 mmol) σε ξηρό διγλωρομεθάνιο (15ml), στους προστίθενται τερτ βουτυλο διμεθυλο σιλυλο χλωριδιο (6.35 mmol), ημιδαζόλη (8.48 mmol) και DMAP καταλυτικά στους 0 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 ώρες και η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ή αέρια χρωματογραφία. Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολουθεί προσθήκη NaHCO<sub>3</sub> και διάλυμα HCl 5%. Ακολουθεί ξήρανση της οργανικής φάσης με MgSO<sub>4</sub> και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό. Το προϊόν απομονώνεται μετά από χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 92/8). Απόδοση 95%.

### **Αντίδραση αναγωγής τοξυλεστέρων με LiAlH<sub>4</sub>**

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου, σε διάλυμα LiAlH<sub>4</sub> (2.52 mmol) σε ξηρό THF (10ml), προστίθεται στάγδην διάλυμα τοξυλ-εστέρα (1.68mmol) σε ξηρό THF. Το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα και η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ή αέρια χρωματογραφία. Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολουθεί προσθήκη μεθανόλης (5ml) αργά στους 0 °C. Στη συνέχεια ακολουθεί φιλτράρισμα του διαλύματος με celite και εκχύλιση με EtOAc (3 x 20 mL). Ακολουθεί ξήρανση με MgSO<sub>4</sub> και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό. Το προϊόν απομονώνεται μετά από χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 97/3). Απόδοση 85%.

### **Αντίδραση αποπροστασίας αλκοολών**

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου, σε διάλυμα προστατευμένης αλκοόλης (4.24 mmol) σε ξηρό THF στους 0 °C, προστίθεται τετρα βουτυλο αμμώνιο φθορίδιο (TBAF) (1.66 mmol, 1M σε THF). Το διάλυμα αναδεύεται στους 0 °C για μία ώρα και η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ή αέρια χρωματογραφία. Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολουθεί προσθήκη NH<sub>4</sub>Cl (10 mL) και εκχύλιση με EtOAc (3 x 20 mL). Ακολουθεί ξήρανση με MgSO<sub>4</sub> και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό. Το προϊόν απομονώνεται μετά από χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 90/10). Απόδοση 90%.

### C. Σύνθεση υποστρωμάτων

#### **Ενζυμική αναγωγή του κετοεστέρα (2) για τη σύνθεση του (R)-3-υδροξυεξανοϊκού μεθυλεστέρα (2a)**

Σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (13 mL, 200 mM, pH 6.9) προστίθενται ο 3-οξοεξανοϊκός μεθυλεστέρας (2) (150 mM, 2 mmol, 288 mg), η κετορεδουκτάση A1C (18 mg), γλυκόζη (250 mM, 585 mg), NADPH (5 mg), αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH, 10 mg) και το διάλυμα αναδεύεται στους 37 °C Σε τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης το pH επαναρυθμίζεται σε τιμή 6,9 με προσθήκη σταγόνων NaOH (2 M). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το προϊόν απομονώνεται έπειτα από εκχύλιση του μίγματος με EtOAc (3x15 mL). Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO<sub>4</sub> και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό παράγοντας καθαρό και οπτικώς ενεργό τον υδροξυ εστέρα (2a). Απόδοση 90%, 263 mg.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, ppm): δ = 3.94-4.07 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 2.91 (bs, 1H), 2.49 (dd, J = 3.6 Hz, 1H), 2.39 (dd, J = 9 Hz, 1H), 1.31-1.54 (m, 4H), 0.92 (t, J = 6.9 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz, ppm): δ = 173.5, 67.7, 51.7, 41.1, 38.6, 18.7, 13.9.

GC: δεδομένα αέριου χρωματογράφου (πρόγραμμα: 90°C ισόθερμα, φέρων αέριο: N<sub>2</sub>, πίεση 12 psi) t<sub>R</sub> = 27.3 min.

#### **Ενζυμική αναγωγή της κετόνης (3) για τη σύνθεση (S)-2-πεντανόλη (3a)**

Σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (20 mL, 200 mM, pH 6.9) προστίθενται η 2-πεντανόνη (3) (175 mM, 3.5 mmol, 300 mg), η κετορεδουκτάση 108 (40 mg), γλυκόζη (278 mM, 1 g), NADPH (10 mg), αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH, 10 mg) και το διάλυμα αναδεύεται στους 37 °C Σε τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης το pH επαναρυθμίζεται σε τιμή 6,9 με προσθήκη σταγόνων NaOH (2 M). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το προϊόν απομονώνεται έπειτα από εκχύλιση του μίγματος με Et<sub>2</sub>O (3x25 mL). Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO<sub>4</sub> και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό παράγοντας καθαρή και οπτικώς ενεργή την αλκοόλη (3a). Απόδοση 92%, 284 mg.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, ppm):  $\delta = 3.76\text{-}3.87$  (m, 1H), 1.36-1.51 (m, 4H), 1.18 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H), 0.93 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz, ppm):  $\delta = 67.9, 41.5, 23.5, 18.9, 14.1$ .

GC: δεδομένα αέριου χρωματογράφου (πρόγραμμα: 50°C ισόθερμα, φέρων αέριο:  $\text{N}_2$ , πίεση 12 psi)  $t_{\text{R}} = 12.4$  min.

### **Ενζυμική μετεστεροποίηση του (*R*)-3-υδροξυ εξανοικού μεθυλεστέρα (**2a**) με την (*S*)-2-πεντανόλη (**3a**) για τη σύνθεση του (*R*)-3-υδροξυεξανοικού (*S*)-2-πεντυλεστέρα (**1**)**

Σε ξηρό εξάνιο (10 mL) προστίθενται (*R*)-3-υδροξυ εξανοικός μεθυλεστέρας (**2a**) (40 mM, 0.4 mmol, 58 mg), (*S*)-2-πεντανόλη (**3a**) (80 mM, 0.8 mmol, 70 mg), η CAL-B (50 mg) και το διάλυμα αναδεύεται στους 45 °C. Μετά από 7 ημέρες το ένζυμο απομακρύνεται με διήθηση και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, εξάνιο/EtOAc, v/v, 5/1), και απομονώθηκαν 40 mg, 50%. Αναλυτικές πληροφορίες για το φυσικό προϊόν παρουσιάζονται στα ακόλουθα πειραματικά.

### **Χημική υδρόλυση του εστέρα (**2a**) για τη σύνθεση του (*R*)-3-υδροξυ εξανικού οξέος (**4**)**

Σε διάλυμα MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (1/1 v/v, 10 mL) προστίθενται (*R*)-3-υδροξυ εξανοικός μεθυλεστέρας (**2a**) (1.2 mmol, 176 mg),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0.84 mmol, 116 mg) και το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα συγκεντρώθηκε, αραιώθηκε με  $\text{H}_2\text{O}$  (8 mL) και εκχυλίζεται με  $\text{Et}_2\text{O}$  (8 mL). Η υδατική φάση οξινίζεται σε pH 3 και εκχυλίζεται με EtOAc (3x10 mL). Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηραίνεται με  $\text{MgSO}_4$  και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό παράγοντας 146 mg (92%) (*R*)-3-υδροξυ εξανικό οξύ (**4**)

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, ppm):  $\delta = 4.01\text{-}4.11$  (m, 1H), 2.57 (dd,  $J = 3$  Hz, 1H), 2.47 (dd,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 1.34-1.61 (m, 4H), 0.94 (t,  $J = 6.3$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz, ppm):  $\delta = 177.5, 67.7, 41.0, 38.6, 18.6, 13.9$ .

### **Ενζυμική εστεροποίηση του (R)-3-υδροξυ εξανικό οξύ (4) με την (S)-2-πεντανόλη (3a)**

Σε ξηρό εξάνιο (10 mL) προστίθενται το (R)-3-υδροξυ εξανικό οξύ (4) (88 mM, 0.88 mmol, 116 mg), η (S)-2-πεντανόλη (3a) (80 mM, 0.8 mmol, 70 mg), η CALB (70 mg), molecular sieves (4Å, 500 mg) και το διάλυμα αναδεύεται στους 45 °C. Μετά από 5 ημέρες το ένζυμο απομακρύνεται με διήθηση και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Απομονώθηκαν 137 mg φυσικού προϊόντος (85%). Αναλυτικές πληροφορίες για το φυσικό προϊόν παρουσιάζονται στα ακόλουθα πειραματικά.

### **Ενζυμική μετεστεροποίηση του 3-οξοεξανικού μεθυλεστέρα (2) με την (S)-2-πεντανόλη (3a) για τη σύνθεση του 3-οξοεξανικού (S)-2-πεντυλεστέρα (5)**

Σε ξηρό εξάνιο (10 mL) προστίθενται ο 3-οξοεξανικός μεθυλεστέρας (2) (88 mM, 0.88 mmol, 127 mg), η (S)-2-πεντανόλη (3a) (40 mM, 0.4 mmol, 35 mg), η CAL-B (70 mg) και το διάλυμα αναδεύεται στους 45 °C. Μετά από 24 ώρες το ένζυμο απομακρύνεται με διήθηση και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 20/1) και απομονώθηκαν 72 mg του κετοεστέρα (5) με απόδοση 90%. 66 mg του 3-οξοεξανικού μεθυλεστέρα (2) ανακτήθηκαν.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, ppm):  $\delta$  = 4.91-5.05 (m, 1H), 3.40 (s, 2H), 2.51 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H), 1.52-1.69 (m, 4H), 1.28-1.52 (m, 4H), 1.23 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H), 0.92 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3H), 0.91 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz, ppm):  $\delta$  = 202.9, 166.6, 72.1, 49.7, 44.9, 37.9, 19.9, 18.6, 16.9, 13.8, 13.5.

### **Ενζυμική αναγωγή του 3-οξοεξανικού (S)-2-πεντυλεστέρα (5) για τη σύνθεση του (R)-3-υδροξυεξανικού (S)-2-πεντυλεστέρα (1)**

Σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (5 mL, 200 mM, pH 6.9) προστίθενται ο 3-οξοεξανικός (S)-2-πεντυλεστέρας (5) (100 mM, 0.5 mmol, 100 mg), η κετορεδοκτάση A1C (35 mg) γλυκόζη (200 mM, 180 mg), NADPH (5 mg), αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH, 10 mg) και το διάλυμα αναδεύεται στους 37 °C



Σε τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης το pH επαναρυθμίζεται σε τιμή 6,9 με προσθήκη σταγόνων NaOH (2 M). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (24 ώρες) το προϊόν απομονώνεται έπειτα από εκχύλιση του μίγματος με EtOAc (3x8 mL). Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO<sub>4</sub> και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό παράγοντας το φυσικό προϊόν (*R*)-3-υδροξυεξανικός (*S*)-2-πεντυλεστέρας (**1**) Απόδοση 95%, 96 mg.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, ppm): δ = 4.94-5.01 (m, 1H), 3.97-4.03 (m, 1H), 2.84 (d, *J* = 4 Hz, 1H), 2.48 (dd, *J* = 3 Hz, 1H), 2.37 (dd, *J* = 9 Hz, 1H), 1.28-1.64 (m, 8H), 1.22 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.93 (t, *J* = 7 Hz, 3H), 0.92 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz, ppm): δ = 172.8, 71.3, 67.8, 41.5, 38.6, 38.0, 20.0, 18.7, 18.6, 14.0, 13.9.

GC: δεδομένα αέριου χρωματογράφου (πρόγραμμα: 100°C για 3 min, αύξηση θερμοκρασίας: 10°C/min, τελική θερμοκρασία: 180°C, φέρων αέριο: N<sub>2</sub>, πίεση: 12 psi) t<sub>R</sub> = 13.2 min. (M + H); found 203.2.

### Σύνθεση των MPA εστέρων των οπτικά καθαρών β-ταγών αλκοολών

Σε διάλυμα της β-ταγής αλκοόλης (0.1 mmol), σε άνυδρο CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, προστίθενται 1.1 ισοδύναμα DCC (0.11 mmol, 13 mg), 1.1 ισοδύναμα του αντίστοιχου (*R*) ή (*S*) MPA (0.11 mmol) και καταλυτική ποσότητα DMAP και το διάλυμα αναδεύεται στους 0 °C για 4-6 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μίγμα διηθείται, το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό και το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 5/1). Ο παραγόμενος MPA-εστέρας απομονώνεται με απόδοση 90%.

(*R*)-MPA εστέρας της (*S*)-2-πεντανόλης (**3a**) <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, ppm): δ = 7.31-7.46 (m, 5H), 4.92-5.03 (m, 1H), 4.73 (s, 1H), 3.41 (s, 3H), 1.53-1.65 (m, 1H), 1.39-1.50 (m, 1H), 1.21-1.36 (m, 2H) 1.08 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

(*S*)-MPA εστέρας της (*S*)-2-πεντανόλης (**3a**): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, ppm): δ = 7.31-7.46 (m, 5H), 4.89-4.99 (m, 1H), 4.72 (s, 1H), 3.41 (s, 3H), 1.29-1.51 (m, 2H), 1.21 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.98-1.10 (m, 2H), 0.73 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

**(R)-MPA εστέρας του (R)-3-υδροξυ εξανοικού μεθυλεστέρα (2a):**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, ppm):  $\delta = 7.31-7.45$  (m, 5H), 5.24-5.33 (m, 1H), 4.72 (s, 1H), 3.40 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 2.47 (dd,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 2.45 (dd,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 1.44-1.70 (m, 2H), 1.19-1.36 (m, 2H), 0.89 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H).

**(S)-MPA εστέρας του (R)-3-υδροξυ εξανοικού μεθυλεστέρα (2a):**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, ppm):  $\delta = 7.31-7.45$  (m, 5H), 5.22-5.31 (m, 1H), 4.73 (s, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.42 (s, 3H), 2.58 (dd,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 2.55 (dd,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 1.42-1.52 (m, 2H), 0.98-1.10 (m, 2H), 0.74 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H).

**(R)-MPA εστέρας του (R)-3-υδροξυεξανοικού (S)-2- πεντυλεστέρα (1):**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, ppm):  $\delta = 7.31-7.46$  (m, 5H), 5.25-5.34 (m, 1H), 4.71-4.77 (m, 1H), 4.73 (s, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.49 (dd,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 2.39 (dd,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 1.16-1.66 (m, 8H), 1.09 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H), 0.88 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 0.86 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H).

**(S)-MPA εστέρας του (R)-3-υδροξυεξανοικού (S)-2- πεντυλεστέρα (1):**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, ppm):  $\delta = 7.31-7.45$  (m, 5H), 5.23-5.31 (m, 1H), 4.86-4.94 (m, 1H), 4.72 (s, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.58 (dd,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 2.49 (dd,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 0.98-1.49 (m, 8H), 1.18 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H), 0.90 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 0.72 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H).

### **Σύνθεση των α-υποκατεστημένων-β-κετοεστέρων 10, 13, 15, 21 και 23**

**2-μεθυλο-3-οξοεξανοϊκός αιθυλεστέρας (10).** Υπό ατμόσφαιρα αζώτου ο 3-οξοεξανοϊκός αιθυλεστέρας (**9**) (935mg, 6.4 mmol) διαλύθηκε σε άνυδρη ακετόνη (10 mL) και προξηραμένο ανθρακικό κάλιο (883mg, 6.4 mmol) προστέθηκε στο διάλυμα. Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και εν συνεχεία προστέθηκαν, σε διάρκεια 2 λεπτών, το μεθυλοϊωδίδιο (499μl, 8 mmol). Το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού για 20 ώρες μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οποία παρατηρήθηκε είτε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ή με αέρια χρωματογραφία. Μετά από συμπύκνωση του μίγματος, προστέθηκε αιθέρας (10 mL), ακολούθησε διήθηση υπό κενό, για την απομάκρυνση των αλάτων και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Τα προϊόντα απομονώθηκαν μετά από

χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 15/1). Και στη συνέχεια τα καθαρά προϊόντα που προέκυψαν ανάχθηκαν ενζυμικά. Απόδοση 95%, 973mg.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, ppm): 0.886-0.936 (t, 6H), 1.242-1.290 (t, 3H), 1.585-1.658 (m, 2H), 2.494-2.533 (t, 2H), 3.467-3.538 (q, 1H), 4.149-4.219 (t, 2H)

GC: δεδομένα αέριου χρωματογράφου (πρόγραμμα: 120°C για 3 min, αύξηση θερμοκρασίας: 10°C/min, τελική θερμοκρασία.: 210°C, φέρων αέριο:  $\text{N}_2$ , πίεση: 10 psi)  $t_R = 7.7$  min.

**2-μεθυλο-3-οξοεξανοϊκός βουτυλεστέρας (13).**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, ppm): 0.887-0.953 (m, 9H), 1.331-1.405 (m, 2H), 1.569-1.656 (m, 4H), 2.470-2.539 (t, 2H), 3.473-3.545 (q, 1H), 4.101-4.151 (t, 2H)

GC: δεδομένα αέριου χρωματογράφου (πρόγραμμα: 140°C για 3 min, αύξηση θερμοκρασίας: 10°C/min, τελική θερμοκρασία.: 210°C, φέρων αέριο:  $\text{N}_2$ , πίεση: 10 psi)  $t_R = 9.1$  min.

**2-προπυλο-3-οξοεξανοϊκός μεθυλεστέρας (15).**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, ppm): 0.875-0.940 (m, 6H), 1.234-1.335 (m, 5H), 1.566-1.639 (m, 2H), 1.768-1.862 (m, 2H), 2.443-2.524 (t, 2H), 3.422-3.471 (t, 1H), 3.713 (s, 3H)

GC: δεδομένα αέριου χρωματογράφου (πρόγραμμα: 120°C για 3 min, αύξηση θερμοκρασίας: 10°C/min, τελική θερμοκρασία.: 210°C, φέρων αέριο:  $\text{N}_2$ , πίεση: 10 psi)  $t_R = 9.7$  min.

**2-προπυλο-3-οξοεπτανοϊκός μεθυλεστέρας (21).**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, ppm): 0.873-0.944 (m, 6H), 1.239-1.363 (m, 4H), 1.508-1.607 (m, 2H), 1.771-1.866 (m, 2H), 2.463-2.511 (t, 2H), 3.429-3.478 (t, 1H), 3.716 (s, 3H)

GC: δεδομένα αέριου χρωματογράφου (πρόγραμμα: 120°C για 3 min, αύξηση θερμοκρασίας: 10°C/min, τελική θερμοκρασία.: 210°C, φέρων αέριο:  $\text{N}_2$ , πίεση: 10 psi)  $t_R = 11$  min.

**2-αιθυλο-3-οξοεπτανοϊκός μεθυλεστέρας (23).**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, ppm): 0.872-0.942 (m, 6H), 1.255-1.361 (m, 2H), 1.510-1.609 (m, 2H), 1.826-1.923 (m, 2H), 2.462-2.510 (t, 2H), 3.345-3.394 (t, 1H), 3.720 (s, 3H)

GC: δεδομένα αέριου χρωματογράφου (πρόγραμμα: 120°C για 3 min, αύξηση θερμοκρασίας: 10°C/min, τελική θερμοκρασία.: 210°C, φέρων αέριο:  $\text{N}_2$ , πίεση: 10 psi)  $t_R = 9.9$  min.

### Αντίδραση μετεστεροποίησης του εστέρα (9) με $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$

Σε διάλυμα 3-οξοεξανοϊκού αιθυλεστέρα (9) (640mg, 4 mmol) σε βουτανόλη (20ml) προστέθηκε  $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$  (521μl, 1.75mmol). Το διάλυμα αναδεύεται μέχρι βρασμού για 24 ώρες και η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με αέρια χρωματογραφία. Μετά από συμπύκνωση του μίγματος, προστέθηκε HCl 1N (10ml) και το διάλυμα εκχυλίζεται με  $\text{Et}_2\text{O}$  αιθέρα (2x10ml). Έπειτα από το διαχωρισμό των δύο φάσεων η οργανική φάση εκχυλίστηκε με  $\text{NaHCO}_3$  κορεσμένο. Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηραίνεται με  $\text{MgSO}_4$  και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Απόδοση 95%, 715mg.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, ppm): 0.904-0.953 (t, 6H), 1.341-1.414 (m, 2H), 1.581-1.651 (m, 4H), 2.494-2.542 (t, 2H), 3.427 (s, 2H), 4.116-4.160 (t, 2H)

GC: δεδομένα αέριου χρωματογράφου (πρόγραμμα: 120°C για 3 min, αύξηση θερμοκρασίας: 10°C/min, τελική θερμοκρασία.: 210°C, φέρων αέριο:  $\text{N}_2$ , πίεση: 10 psi)  $t_R = 7.4$  min.

### Χημική αναγωγή των κετοεστέρων 15, 21 και 23 για τη σύνθεση των αντίστοιχων ρακεμικών ακλοολών 16, 22 και 24

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου  $\text{NaBH}_4$  (4mg, 0.09 mmol) προστέθηκε σε άνυδρη αιθανόλη (6 mL) και το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 °C. Στην θερμοκρασία αυτή και σε διάρκεια 5 λεπτών προστέθηκε στάγδην ο αντίστοιχος κετο-εστέρας (50mg, 0.27 mmol) διαλυμένη σε άνυδρη αιθανόλη (5 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 2-4 ώρες στους 0 °C και η αντίδραση ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκε αργά στους 0 °C κορεσμένο διάλυμα  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1 mL) και το διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό. Κατόπιν προστέθηκαν 15 mL νερό και το μίγμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα (2x20 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με  $\text{MgSO}_4$  και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Απόδοση 90%, 45mg.

**ρακεμική αλκοόλη 16:**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, ppm): 0.892-0.940 (t, 6H), 1.257-1.458 (m, 6H), 1.530-1.593 (q, 2H), 2.391-2.486 (m, 1H), 3.662 (s, 1H), 3.710 (s, 3H), 3.772-3.815 (q, 1H)

GC: δεδομένα αέριου χρωματογράφου (πρόγραμμα: 120°C για 3 min, αύξηση θερμοκρασίας: 10°C/min, τελική θερμοκρασία.: 210°C, φέρων αέριο:  $\text{N}_2$ , πίεση: 10 psi)  $t_R = 9.88$  και 10.24 min.

**ρακεμική αλκοόλη 22:**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, ppm): 0.893-0.941 (t, 6H), 1.229-1.472 (m, 8H), 1.597-1.762 (m, 1H), 2.394-2.495 (m, 1H), 1.700 (s, 3H), 3.759-3.799 (q, 1H),

GC: δεδομένα αέριου χρωματογράφου (πρόγραμμα: 120°C για 3 min, αύξηση θερμοκρασίας: 10°C/min, τελική θερμοκρασία.: 210°C, φέρων αέριο:  $\text{N}_2$ , πίεση: 10 psi)  $t_R = 11.4$  και 11.7 min.

**ρακεμική αλκοόλη 24:**  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, ppm): 0.904-0.954 (t, 6H), 1.255-1.467 (m, 6H), 1.638-1.777 (m, 2H), 2.365-2.425 (q, 1H), 3.718 (s, 3H), 3.752-3.824 (q, 1H)

GC: δεδομένα αέριου χρωματογράφου (πρόγραμμα: 120°C για 3 min, αύξηση θερμοκρασίας: 10°C/min, τελική θερμοκρασία.: 210°C, φέρων αέριο:  $\text{N}_2$ , πίεση: 10 psi)  $t_R = 10.2$  και 10.57 min.

#### **Αναγωγή ρακεμικού β-υδροξυεστέρα 22 με $\text{LiAlH}_4$ για τη σύνθεση της ρακεμικής διόλης 25.**

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου σε διάλυμα  $\text{LiAlH}_4$  (61mg, 1.6mmol) σε άνυδρο αιθέρα (10 ml), στους 0 °C, προστίθεται στάγδην η ένωση **22** (427mg, 2.12 mmol) διαλυμένη σε αιθέρα. Το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου και η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ή αέρια χρωματογραφία. Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 15%  $\text{NaOH}$  (5 ml) (χαρακτηριστικό λευκό ίζημα) και εκχυλίζεται με  $\text{EtOAc}$  (4x5 mL). Ακολουθεί ξήρανση με  $\text{MgSO}_4$  και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό. Απόδοση 85%, 301mg

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, ppm): 0.998-0.942 (t, 6H), 1.217-1.610 (m, 10H), 1.652-1.730 (m, 1H), 3.636-3.689 (q, 1H), 3.708-3.943 (m, 2H)

#### **Αντίδραση ρακεμικής διόλης 25 με χλωρίδιο του τοζυλίου για τη σύνθεση της ένωσης 26.**

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου σε διάλυμα διόλης (300mg, 1.8mmol) σε άνυδρο  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10ml), στους 0 °C, προστέθηκε  $\text{Et}_3\text{N}$  (276μl, 1.91 mmol), χλωρίδιο του τοζυλίου (366mg, 2 mmol) και τέλος  $\text{DMAP}$  καταλυτικά. Το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 14 ώρες και η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολουθεί

προσθήκη νερού (15ml) και αιθέρα (15ml). Η υδατική φάση εκχυλίζεται με αιθέρα (3x15ml) και στη συνέχεια η οργανική εκχυλίζεται με HCl 2N (5x10ml) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (brine) (5ml). Ακολουθεί ξήρανση με MgSO<sub>4</sub> και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό. Το προϊόν απομονώνεται μετά από χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 8/1). Απόδοση 85%, 503mg.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, ppm): 0.859-0.905 (t, 6H), 1.190-1.425 (m, 10H), 1.589-1.669 (m, 1H), 2.444 (s, 3H), 3.980-4.048 (m, 1H), 4.064-4.201 (m, 2H), 7.344 (d J=8.4Hz, 2H), 7.787 (d J=8.4Hz, 2H)

### **Ενζυμική αναγωγή των κετοεστέρων 15, 21 και 23 σε μικρή κλίμακα.**

Σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (1 mL, 200 mM, pH=6,9) προστίθενται ο αντίστοιχος κετοεστέρας (5mg, 25 mM), η κετορεδουκτάση (2 mg/mL), NADPH (2,5 mM, 2 mg), γλυκόζη (100 mM, 18 mg) και αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH, 2 mg/mL). Το διάλυμα αναδεύεται στους 37 °C και ο έλεγχος της αντίδρασης πραγματοποιείται κάθε 1 ώρα με λήψη δείγματος από την αντίδραση, το οποίο αναλύεται σε αέριο χρωματογράφο μετά από εκχύλιση με EtOAc. Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις έγιναν ακολουθώντας αυτό το πρωτόκολλο.

**(2S,3S)-2-προπυλο-3-υδροξυ εξανοϊκός μεθυλεστέρας 16a.** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, ppm): 0.890-0.939 (t, 6H), 1.245-1.346 (m, 6H), 1.661-1.730 (m, 2H), 2.415-2.492 (m, 1H), 3.670 (br s, 1H), 3.720 (s, 3H), 3.090-4.161 (q, 1H)

GC: δεδομένα αέριου χρωματογράφου (πρόγραμμα: 120°C για 3 min, αύξηση θερμοκρασίας: 10°C/min, τελική θερμοκρασία.: 210°C, φέρων αέριο: N<sub>2</sub>, πίεση: 10 psi) t<sub>R</sub> = 9.98 min.

**(2S,3S)-2-προπυλο-3-υδροξυ επτανοϊκός μεθυλεστέρας 22a.** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, ppm): 0.894-0.942 (t, 6H), 1.259-1.359 (m, 8H), 1.675-1.746 (m, 2H), 2.419-2.496 (m, 1H), 3.662 (br s, 1H), 3.711 (s, 3H), 4.086-4.157 (q, 1H)

GC: δεδομένα αέριου χρωματογράφου (πρόγραμμα: 120°C για 3 min, αύξηση θερμοκρασίας: 10°C/min, τελική θερμοκρασία.: 210°C, φέρων αέριο: N<sub>2</sub>, πίεση: 10 psi) t<sub>R</sub> = 11.4 min.

**(2*S*,3*S*)-2-αιθυλο-3-υδροξύ επτανοϊκός μεθυλεστέρας 24a.** <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, ppm): 0.900-0.950 (t, 6H), 1.289-1.416 (m, 6H), 1.635-1.775 (m, 2H), 2.345-2.411 (m, 1H), 3.682 (br s, 1H), 3.717 (s, 3H), 4.083-4.154 (q, 1H)

GC: δεδομένα αέριου χρωματογράφου (πρόγραμμα: 120°C για 3 min, αύξηση θερμοκρασίας: 10°C/min, τελική θερμοκρασία.: 210°C, φέρων αέριο: N<sub>2</sub>, πίεση: 10 psi) t<sub>R</sub> = 10.2 min.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Crossley, R. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 8155.
2. Tatsuta, K.; Hosokawa, S. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4707.
3. a) Faber, K. *Biotransformation in organic Chemistry*, 3<sup>rd</sup> Edition, Springer, **1997**.: b) Wong and Whitesides *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Tetrahedron Organic Chemistry Series, volume 12
4. S. G. Neidleman. In *Biocatalysis*. (D. Abramowicz, ed.), pp. 1-24, Van Nostrand Reinhold, New York (1990).
5. Faber, K., *Pure, Appl., Chem.*, **1997**, *69*, 1613.
6. Menger, F. M. *Acc. Chem. Res.* **1977**, *44*.
7. Forrest, G. L.; Gonzales, B. *Chem-Biol. Interact.* 2000, *129*, 21.
8. Bradshaw, C. W.; Fu, H.; Shen, G. J.; Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1526.
9. Prelog, V., *Pure Appl. Chem.*, **1964**, *9*, 119.
10. Wong, C. H.; Whitesides, G. M. “*Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*”, Tetrahedron Organic Chemistry Series, London, **1993**.
11. Wong, C. H.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4890.
12. Zhao, H.; Donk, W. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 583.
13. Shaked, Z.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7104.
14. Lamed, R.; Keinan, E.; Zeikus, J. E. *Enzyme Microb. Technol.* **1981**, *3*, 144.
15. Wong, C. H.; Drueckhammer, D. G.; Sweers, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4028.
16. Seco, J. M.; Quinoa, E.; Riguera, R. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 17.
17. Bornsheyer, U. T., Kazlauskas, R. J., “*Hydrolases in Organic Chemistry*”.
18. Woley, P., Petersen, S.B., “Lipases, their structure, biochemistry and applications” Cambridge University press.
19. Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer Heidelberg, **1995**.
20. Rasor, J.P., Voss, E., *App. Catal. A.*, **2001**, *221*, 145.
21. Lambusta, D, Nikolosi G., Patti A., Sanfilipo C., *J. Mol. Catal. B. Enzym*, **2003**, *21*, 271.
22. Schmid, R.D., Verger, R., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1998**, *37*, 160
23. Gross, R.A., Kumar, A., Kalra, B., *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 2097.
24. Cheetham, P. S. J., *Trends Biotechnol.* **1993**, *11*, 478



25. Fujita, Y., Awaji, M., Matsukura, M., Hata, K., Shimoto, H., Sharyo, H., Skaguchi, H., Gibson, K., *Tappi. J.*, **1992**, *65*, 117.
26. Boel, E., Christenesen, T., Woldike, H., (Novo Nordisk AS), USA, 5 536 661, **1996** (*Chem. Abstr.*, **1996**, *125*, 160364).
27. a) Brandy, L., *Science*, **1990**, *343*, 767. b) Winkler, F. K., D'Arcy, A., Humziker, W., *Nature*, **1990**, *343*, 771.
28. Carriere, J., *Bioch. Bioph. Acta*, **1998**, *1376*, 417.
29. Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remigton, S.J., Silman, I., Schrag, G., Sussman, J.L., Verschueren, K.H.G., Goldman, A., *Prot Engineer*, **1992**, *5*, 1997.
30. Heikinheimo, P., Goldman, A, Jeffries, C, Ollis, D.L. *Strusture*, **1999**, *7*, 141.
31. Brzozowski, A.M., Derewenda, U., Derewenda, Z.S., Dodson, D.D., Lawson, D.M., Turkenburg, J.P., Bjorkling, B., Huges-Jensen, B., Parkar, S.A., Thim, L., *Nature*, **1991**, *351*, 491.
32. Blow, D., *Nature*, **1991**, *351*, 444.
33. Cygler, M., Schag, J.D., *Bioch. Bioph. Acta*, **1999**, *1441*, 205.
34. Verger, R., *TIBTECH*, **1997**, *15*, 32.
35. Klibanov, A.M., *Nature*, **2001**, *409*, 241.
36. Carrea, G., Rina, S., *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, **2000**, *39*, 2227.
37. Kazlauskas, R.J., Weissfloch, A.N.E, Rappaport, A.T., Cuccia, L.A., *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 2656.
38. a) Tuomi, W., Kazlauskas, R.J., *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 2638. b) Hultin, P. G., Jones, J. B., *Tetrahedron lett.* **1992**, *33*, 1399.
39. Ahmed, S.N., Kazlauskas, R.J., Morinville, A.H., Grochulski, P., Schrag, J.D., Cygler, M., *Biocatalysis*, **1994**, *9*, 209.
40. M. E. Τζανακάκης, Εντομολογία, Θεσσαλονίκη, **1995**.
41. C. R. Eric, Reeve, *Encyclopedia of genetics*. USA: Fitzroy Dearborn Publishers, **2001** I. pp. 157.
42. A. Mallis *Handbook of Pest Control*, 5<sup>th</sup> ed.; MacNair-Dorland Co. New York, (1969) p.158
43. a) W. M. Barrows, *J. Exp. Zool.* **1907**, *4*, 515; b) S. H. Hunter, H. M. Kaplan, E. V. Enzmann, *Am. Nat* **1937**, *71*, 575; c) A. S. West, *J. Econ. Entomol.* **1961**, *54*, 677.

44. a) T. M. Howlett, *J. Econ Biol.* **1914**, *9*, 21-23; b) A. C. Morgan, S. E. Crumb, *J. Econ Entomol.* **1928**, *21*, 913-920
45. W. G. Gaum, J. H. Giliomee, K. L. Pringle, *J. Bulletin of Entomological Research* **1994**, *84*, 487-492.
46. Μ. Δ. Βασιλακάκης, Στοιχεία Γενικής και Ειδικής Δεντροκομίας, Θεσσαλονίκη, **1993**
47. J. T. Knudsen, I. Tollsten, L. C. Bergstrom, *Phytochemistry*, **1993** *32*, 253-280.
48. I. Zabetakis, M. A. Holden, *J. Sci. Food Agric.* **1997**, *74*, 421.
49. L. Mattiacci, B. A. Rocca, N. Scascighini, M. D'Alessandro, A. Hern, S. Dorn, *J. Chem. Ecol.* **2001**, *27*, 2233.
50. a) S. Serra, C. Fuganti, E. Brenna, *Trends in Biotechnology* **2005**, *23*, 193; b) A. Abate, E. Brenna, C. Fuganti, F. G. Gatti, S. Serra, *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* **2004**, *32*, 33; c) J. Aleu, A. J. Bustillo, R. Hernandez-Galan, I. G. Collado, *Curr. Org. Chem.* **2007**, *11*, 693; d) E. Fukusaki, S. Satoda, , *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* **1997**, *2*, 257.
51. a) M. R. Reed, *Physiol. Zool.* **1938**, *11*, 317; b) W. P. Spencer, *Am. Midland Nat.* **1950**, *43*, 79; c) H. J. Phaff, M. W. Miller, J. A. Recca, M. Shifrine, E. M. Mrak, *Ecology* **1956**, *37*, 533.
52. J. Mowat, R. Gries, G. Khaskin, G. Gries, R. Britton, *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 772.
53. a) D. Kalaitzakis, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, I. Smonou, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4799. b) D. Kalaitzakis, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, I. Smonou, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1958. c) D. Kalaitzakis, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, I. Smonou, *Eur. J. Org. Chem* **2006**, 2309. d) D. Kalaitzakis, D. J. Rozzell, S. Kambourakis, I. Smonou, *Tetrahedron Asymmetry*, **2007**, *18*, 2418-2426.
54. a) I. Shiina, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 239; b) E. J. Kang, E. Lee, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4348; c) K. -S. Yeung, I. Paterson, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4237; d) K. Mori, T. Tashiro, *Curr. Org. Synth.* **2004**, *1*, 11; e) P. T. Baraldi, P. H. G. Zarbin, P. C. Vieira, A. G. Corrêa, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 621.
55. a) E. Burda, W. Bauer, W. Hummel, H. Gröger, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 67; b) H. Asako, M. Shimizu, Y. Makino, N. Itoh, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2664; c) K. Goldberg, K. Schroer, S. Lutz, A. Liese, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 237; d) K. Goldberg, K. Schroer, S. Lutz, A. Liese, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 249; e) T. Matsuda, R. Yamanaka, K. Nakamura,

- Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 513; f) K. Nakamura, R. Yamanaka, T. Matsuda, T. Harada, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2659.
56. Kallergi, M.; Kalaitzakis, D.; Smonou, I. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3946-3950.
57. Kontodimas D., Milonas P., Vassiliou V., Thymakis N., Oikonomou D., *Entomologia Hellenica*, **2005-2006**, *16*, 11-15.
58. Kaakeh, W., *Crop Protection*, **2006**. *25*:432-439.
59. Kontodimas D., Oikonomou D., Thymakis N., Menti Ch., Anagnou M., *Agriculture – crop & animal husbandry*, **2006**, 54-57 [in Greek]
60. a) Ghazavi, & Faghieh, *Applied Entomology and Phytopathology*; **2002** *69*(2): 44-45. b) Κοντοδήμας και συν., *Γεωργία – Κτηνοτροφία*, Ιανουάριος **2006**: 54-57. c) Rahalkar, G.W., Tamharkar, A.J. Shantaram, K.. *Plant. Crops*.**1978** *6*: 61-64
61. Κοντοδήμας Δ., Οικονόμου Δ., Θυμάκης Ν., Αποστολοπούλου Α., Πρακτικά Ημερίδας: “Μέτρα προστασίας για το Φοινικόδασος Βάϊ, Αντιμετώπιση εντόμου *R. ferrugineus*.”, **2006**, 6-10
62. Rochat, D.; Malosse, C.; Lettere, M.; Ramirez-Lucas, P.; Einhorn, J.; Zagatti, P. *C. R. Acad. Sci. Ser. 2*, **1993**, 1737–1742.
63. Mori, K.; Kiyota, H.; Malosse, C.; Rochat, D. *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 1201–1204.
64. a) Perez, A. L.; Hallett, R. H.; Gries, R.; Gries, G.; Oehlschlager, A. C.; Borden, J. H. *J. Chem. Ecol.* **1996**, 357–368. b) Odriozola, J. M.; García, J. M.; González, A.; Gil, P. *Tetrahedron: Asymmetry* *10*, **1999**, 4627–4632
65. Giblin-Davis, R. M.; Howard, F. W. **1989**.
66. Weissling, T. J; Giblim-Davis, R. M.; Gries, G.; Perez, A. L.; Pierce, H. D.; Oehlschlager, A. C. *J. Chem. Ecol.* **1994**, *20*, 505-515
67. Perez, A. L.; Hallett, R. H.; Gries, R.; Gries, G.; Oehlschlager, A. C.; Borden, J. H; Pierce, H. D; Gonzalez, L. M; Giblim R. M. **1993**, July 31 - August 4, Florida, USA., *Abstracts of Papers* p. 54.
68. Mori, K.; Murata, N. *Liebigs Ann.* **1995**, 697–698.
69. Gries, G.; Gries, R.; Perez, A. L.; Oehlschlager, A. C.; Gonzalez, L. M.; Pierce Jr., H. D.; Kouda-Bonafos, M.; Zebeyou, M.; Nanou N. *Naturwissenschaften* **1993**, 90–91.
70. Mori, K.; Kiyota, H.; Rochat, D. *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 865–870.
71. Kalaitzakis, D.; Smonou, I. *J. Org. Chem* **2008**, *73*, 3919–3921