ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Α) Εφαρμογές ενζυμικών αναγωγών στην σύνθεση γ-βουτυρολακτονών και του φυσικού προϊόντος Stereocalpin A
Β) Απομόνωση συνθετικών Κετορεδουκτασών

Τζανακάκη Αγγελική

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΙΟΥΛΙΑ ΣΜΟΝΟΥ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2016

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

ISOLATION AND SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

MASTER THESIS

A) Application of enzymatic reductions in the synthesis of *γ*-butyrolactones and the natural product Stereocalpin A
B) Isolation of synthetic ketoreductases

Tzanakaki Angeliki

MASTER THESIS SUPERVISOR: IOULIA SMONOU

HERAKLION 2016

Τριμελής επιτροπή

Σμόνου Ιουλία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα), Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Βασιλικογιαννάκης Γεώργιος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Στρατάκης Εμμανουήλ, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για όλη την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας, όπως επίσης και το πρόγραμμα του ΕΛΚΕ για την οικονομική βοήθεια με ΚΑ: 4065.

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Ιουλία Σμόνου για όλη την υποστήριξη που μου έδειξε κατά την διάρκεια της διατριβής αυτής. Η βοήθεια της στις διάφορες δυσκολίες της εργασίας μου ήταν ιδιαίτερα σημαντική.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Μανώλη Στρατάκη και κ. Γεώργιο Βασιλικογιαννάκη που δέχτηκαν να είναι μέλη της Συμβουλευτικής επιτροπής μου καθώς και για τις χρήσιμες συμβουλές τους.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τον Dr. Δημήτρη Καλαϊτζάκη που υπήρξε πρόθυμος να δώσει τις πολύτιμες συμβουλές του όποτε τις χρειαζόμουν, τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο.

Σημαντική ήταν επίσης η συμβολή του Καθηγητή κ. Μιχάλη Οφανόπουλο που με την καθοδήγηση του βοήθησε στην πραγματοποίηση της διατριβής αυτής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες και φίλους Άννα Μπαριωτάκη, Θοδωρή Τυρίκο-Εργά, Μαργαρίτα Ζωίδη, Βασίλη Γιαννόπουλο, για τις ενδιαφέρουσες εποικοδομητικές συζητήσεις και την καλή συνεργασία. Ευχαριστώ τα υπόλοιπα παιδιά του τομέα για την καλή συνεργασία και τις ωραίες στιγμές που περάσαμε μαζί και τον Δημήτρη Νούτσια για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη του καθώς και την ευχάριστη παρέα του. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Martin Rebros, και όλη την ερευνητική του ομάδα για την καθοδήγηση και την βοήθεια τους, κατά την διάρκεια της δίμηνης παραμονής μου στο Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Σλοβακίας, η οποία πραγματοποιήθηκε με την υποστήριξη του προγράμματος Erasmus. Τέλος το πρόγραμμα Cost Action CM1303 Systems Biocatalysis μέσω του οποίου κατέστη δυνατή μια πολύ επιτυχής συνεργασία μεταξύ του εργαστηρίου μας και του εργαστήριου βιοτεχνολογίας του Καθηγητή M. Rebros. Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την στήριξη τους και την υπομονή τους όλα αυτά τα χρόνια.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Ονοματεπώνυμο : Τζανακάκη Αγγελική
Ημερομηνία Γέννησης : 19/07/1991
Τόπος Γέννησης : Ηράκλειο, Κρήτη
Email : angelatzan@hotmail.com

Σπουδές

2014-σήμερα: Υποψήφια μεταπτυχιακός στην Οργανική Χημεία, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης υπό την επίβλεψη της αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ιουλίας Σμόνου

2009-2014: Πτυχίο Χημείας στο Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιου Κρήτης

2013: Πτυχιακή εργασία στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης με θέμα "α-Υδροξυλίωση 1,3-Δικετονών με το σύστημα Oxone/$AlCl_3$" στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας-Βιοκατάλυσης υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ιουλίας Σμόνου

Εμπειρία

2/10-15/12/2015: Πρακτική Άσκηση Erasmus στο Τμήμα Βιοτεχνολογίας, του Ινστιτούτου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Σλοβακίας, Μπρατισλάβα.

2014-2015: Βοηθός Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ι και ΙΙ, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

1/7/-31/09/2012: Πρακτική Άσκηση στο Γενικό Χημείο του Κράτους Ηρακλείου Κρήτης

Συμμετοχή σε Συνέδρια

1. Smonou, I.; **Tzanakaki, A.;** Tyrikos-Ergas, T.; Giannopoulos, V. *The 5th international conference on Novel Enzymes 2016*, Groningen, The

Netherlands, Οκτώβριος 11-14, **2016**. “Bioreductions as the key step for the synthesis of biologically active natural products”.

2. *18° Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας*, Ηράκλειο Κρήτης, 26-28 Μαρτίου 2016.
3. Smonou, I.; Stergiou, A.; Bariotaki, A.; **Tzanakaki, A.;** Kalaitzakis, D. 4° *Πανελλήνιο Συνέδριο Πράσινης Χημείας και Βιώσιμης Ανάπτυξης, Ιωάννινα*, Ελλάδα, 30 Οκτωβρίου- 1 Νοεμβρίου **2014**. “Synthesis of α- hydroxylated 1,3-diketones through the environmentally friendly oxidation system of Oxone/$AlCl_3$”.

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά σε επίπεδο Lower (Εξετάσεις του Michigan)

Άλλες δραστηριότητες

Συμμετοχή ως επικεφαλής ομάδας προπτυχιακών σε εκπαιδευτική επίδειξη πειραμάτων Χημείας, Άγιος Νικόλαος, Κρήτη 11-12 Ιουνίου **2016**. Συνδιοργάνωση από το Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ένωση Χημικών Π.Τ. Κρήτης.

CURICULUM VITAE

Full name	: Tzanakaki Angeliki
Date of Birth	: 19/07/1991
Place of Birth	: Heraklion, Crete
Email	: angelatzan@hotmail.com

Education

2014-today:	MSc Candidate in Organic Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete under the supervision of Associate Professor Ioulia Smonou.
2009-2014:	BSc in Chemistry at the Department of Chemistry, University of Crete.
2013:	Undergraduate research thesis at the Department of Chemistry, University of Crete titled: "α-Hydroxylation of 1,3-Diketones with the system Oxone/$AlCl_3$" in Organic Chemistry-Biocatalysis laboratory under the supervision of Associate Professor Ioulia Smonou.

Experience

2/10-15/12/2015:	Erasmus Placement at the Department of Biotechnology, Institute of Chemistry and Food Technology, Technological University in Slovakia, Bratislava.
2014-2015:	Laboratory Assistant in Organic Chemistry I and II, Department of Chemistry, University of Crete.
1/7/-31/09/2012:	Traineeship at the State Chemical Laboratory of Greece, Heraklion, Crete.

Participation in Conferences

1. Smonou, I.; **Tzanakaki, A.;** Tyrikos-Ergas, T.; Giannopoulos, V. *The 5th international conference on Novel Enzymes 2016*, Groningen, The Netherlands, October 11-14, **2016**. "Bioreductions as the key step for the synthesis of biologically active natural products".
2. *18th Chemistry Postgraduates Conference*, Heraklion of Crete, Greece, 26-28 of March 2016.
3. Smonou, I.; Stergiou, A.; Bariotaki, A.; **Tzanakaki, A.;** Kalaitzakis, D. *4th Panhellenic Conference on Green Chemistry and Sustainable Development*, Ioannina, Greece, 30 October- 1 November **2014**. "Synthesis of α-hydroxylated 1,3-diketones through the environmentally friendly oxidation system of Oxone/$AlCl_3$".

Foreign Language

English to the level of Lower (Michigan Examination).

Other Activities

Participation in educational demonstration of Chemistry experiments, Agios Nikolaos, Crete, June 11-12 **2016**. Co-organised by the Department of Chemistry–University of Crete, Hellenic Chemical Society, Crete devision.

Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη στερεοεκλεκτικών ενζυμικών αναγωγών με κετοredουκτάσες για την σύνθεση οπτικά ενεργών ενδιαμέσων φυσικών προϊόντων, καθώς και η ανάπτυξη νέων συνθετικών κετοredουκτασών.

Στο πρώτο μέρος παρουσιάζεται η χημειοενζυμική προσέγγιση για την σύνθεση της αλδολικής υπομονάδας 5-υδροξυ-2,4-διμέθυλο-3-οξο-οκτανοϊκό οξύ (HDMOO) της Stereocalpin A, με σκοπό την διερεύνηση της σωστής στερεοχημείας του φυσικού προϊόντος. Έγινε προσπάθεια σύνθεσης της υπομονάδας αυτής με την ενζυμική αναγωγή σαν στάδιο «κλειδί». Προσδιορίστηκαν συγκεκριμένες κετοredουκτάσες οι οποίες οδήγησαν στον σχηματισμό του 5-υδροξυ-4-μεθυλο-3-οξοοκτανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα με καλή διαστερεομερική αναλογία και μέτρια εναντιομερική περίσσεια ως προς το Β στερεοϊσομερές.

Στο δεύτερο μέρος περιγράφεται η στερεοεκλεκτική σύνθεση διυποκατεστημένων γ-βουτυρολακτονών από τρεις διαφορετικούς κέτο διεστέρες με την χρήση κετοredουκτασών σαν αναγωγικά μέσα. Η ενζυμική αναγωγή απέδωσε αποκλειστικά τις γ-βουτυρολακτόνες, χωρίς καθόλου απομόνωση του ενδιάμεσου υδρόξυ διεστέρα που παράγεται. Δοκιμάστηκαν διάφορες κετοredουκτάσες σε κάθε περίπτωση, οι οποίες παρουσίασαν εξαιρετικά ποσοστά μετατροπής στις περισσότερες περιπτώσεις, υψηλή διαστερεοεκλεκτικότητα και αρκετά καλή εναντιοεκλεκτικότητα σε μερικές από αυτές.

Στο τελευταίο κεφάλαιο περιγράφεται η παραγωγή νέων κετοredουκτασών καθώς και μελέτη της δραστικότητας τους, χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα τον 2-μεθυλο οξικό αιθυλεστέρα. Η παραγωγή τους έγινε μέσω της κλωνοποίησης των αλληλουχιών που εκφράζουν την επιθυμητή πρωτεΐνη-κετοredουκτάση σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* και δοκιμάστηκαν διάφορες μορφές του ενζύμου για μελέτη της δραστικότητας του.

Λέξεις κλειδιά: Βιοκατάλυση, Ενζυμική αναγωγή, Κετοredουκτάσες, NADPH, Stereocalpin A, *γ*-Βουτυρολακτόνες, Βιοτεχνολογία, 2-Μέθυλο οξικός αιθυλεστέρας, Μικροβιακά ένζυμα.

Abstract

The subject of the present thesis is the study of stereoselective enzymatic reductions with ketoreductases for the synthesis of optically active intermediates of natural products and the development of new synthetic ketoreductases.

In the first part, the chemoenzymatic approach for the synthesis of aldol subunit 5-hydroxy-2,4-dimethyl-3-oxo-octanoic acid (HDMOO) of Stereocalpin A is presented, in order to investigate the right structure assignment of this natural product. The attempted synthesis of the referred subunit, with the key step to be an enzymatic reduction, gave the resulted 5-hydroxy-4-methyl-3-oxooctanoic *tert*-butylester after screening of a series of ketoreductases with adequate stereoselectivity and good enantiomeric excess in favor of B stereoisomer.

In the second part, the stereoselective synthesis of disubstituted *γ*-butyrolactones, starting from three different ketodiesters via enzymatic reduction with ketoreductases is described. The enzymatic reduction resulted exclusively to the *γ*-butyrolactones synthesis under the reaction conditions, without any isolation of the hydroxy diester intermediate. Different KREDs were utilized in each case, which led to excellent reactions rates in most of the cases, high diastereoselectivity and very good enantioselectivity at specific examples.

The last chapter includes the production of new ketoreductases and the determination of enzymatic activity, having as substrate ethyl 2-methyl acetoacetate. Enzyme production proceeds with cloning of appropriate strains which express the desired protein-ketoreductase in bacterial host *E.coli* cells, and different modes of the produced enzymes were used for the study of enzymatic activity.

Key words: Biocatalysis, Enzymatic Reduction, Ketoreductases, NADPH, Stereocalpin A, *γ*-Butyrolactones, Biotechnology, Ethyl 2-methyl acetoacetate, Microbial enzymes.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Ευχαριστίες	iv
Βιογραφικό σημείωμα	v
Curriculum Vitae	vii
Περίληψη	ix
Abstract	x
Περιεχόμενα	xi

Κεφάλαιο 1

1.1 Τα ένζυμα ως καταλύτες στην οργανική σύνθεση	2
1.2 Κετορεδουκτάσες	6
1.3 Νικοτιναμιδικοί Συμπαράγοντες	7
1.4 Ένζυμα στην σύνθεση φυσικών προϊόντων	10

Κεφάλαιο 2

2.1 Χημειοενζυμική προσέγγιση για την σύνθεση του φυσικού προϊόντος Stereocalpin A	16
2.2 Ανάλυση-Συζήτηση αποτελεσμάτων	18
2.3 Πειραματικό μέρος	25

Κεφάλαιο 3

3.1 3,4 Διυποκατεστημένες γ-βουτυρολακτόνες	34
3.2 Ανάλυση-Συζήτηση Αποτελεσμάτων	35
3.3 Πειραματικό μέρος	42

Κεφάλαιο 4

4.1 Σύνθεση νέων Βιοκαταλυτών 50
4.2 Εφαρμογές της Βιοτεχνολογίας στην παραγωγή νέων Κετορεδουκτασών 54
4.3 Ανάλυση-Συζήτηση Αποτελεσμάτων 55
4.4 Πειραματικό μέρος 63

Παράρτημα

Φάσματα Χρωματογραφίας GC 69
Φάσματα ^{1}H και ^{13}C NMR 76

Βιβλιογραφία 94

Κεφάλαιο 1

Τα ένζυμα ως καταλύτες στην οργανική σύνθεση

Στην οργανική σύνθεση κάποιες αντιδράσεις γίνονται αυθόρμητα ενώ άλλες συνθετικές μέθοδοι απαιτούν την χρήση καταλυτών με στόχο την σύνθεση πολύπλοκων μορίων που έχουν βιολογική δράση.[1] Οι καταλύτες γενικότερα είναι ενώσεις που λαμβάνουν μέρος στην αντίδραση με στόχο να την επιταχύνουν μειώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης της, ενώ η συνολική ελεύθερη ενέργεια Gibbs δεν αλλάζει.[2] Η κατάλυση στην οργανική σύνθεση επιτρέπει την πραγματοποίηση καθαρών και οικονομικά αποδοτικών διαδικασιών με αποτέλεσμα να είναι ένας ισχυρός οικονομικός παράγοντας στην βιομηχανία. Ένα σημαντικό μέρος των καταλυτών που χρησιμοποιούνται στην οργανική σύνθεση αποτελούν οι βιοκαταλύτες, που είναι βιοχημικοί καταλύτες, στις περισσότερες περιπτώσεις ένζυμα, και καταλύουν *in vitro* χημικές μετατροπές. Η βιοκατάλυση αποτελεί πλέον μια καθιερωμένη εναλλακτική τεχνολογία που προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα ως προς την εκλεκτικότητα, τις μετατροπές αυξημένης κλίμακας και την βιωσιμότητα. Τα μειονεκτήματα των ενζύμων για χρήση σε βιομηχανική κλίμακα, όπως η περιορισμένη πρόσβαση σε ένζυμα, η έλλειψη σταθερότητας και η δύσκολη εύρεση των κατάλληλων ενζύμων, έχουν πλέον βελτιωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια με την ανάπτυξη της πρωτεϊνικής μηχανικής και της βιοτεχνολογίας.[3] Τα ένζυμα εμφανίζουν ορισμένα πολύ αξιοσημείωτα πλεονεκτήματα που τα κάνουν απαραίτητα και πολύ ανταγωνιστικά ως καταλύτες και η έρευνα πάνω στην ανάπτυξη νέων ενζύμων και τις εφαρμογές τους, είναι ιδιαίτερα αναπτυσσόμενη και δυναμική.[1]

- Πρώτα από όλα τα ένζυμα είναι πολύ αποτελεσματικοί καταλύτες με ταχύτητες μετατροπής (turnover frequencies) των καταλυόμενων αντιδράσεων μεγαλύτερες από 10^7 s^{-1}, ταχύτητες που ξεπερνούν ακόμη και τις χημικά καταλυόμενες αντιδράσεις. Συνέπεια αυτού είναι ότι οι χημικοί καταλύτες χρησιμοποιούνται σε ποσοστό 0,1-1% ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος, σε αντίθεση με τις ενζυμικές αντιδράσεις που απαιτούν καταλύτη σε ποσοστό 10^{-3}-10^{-4}% με αυξημένη αποτελεσματικότητα.
- Εμφανίζουν την δραστικότητα τους κάτω από ήπιες συνθήκες αντίδρασης σε τιμές pH 5-8 και θερμοκρασίες 20-40 ^oC, οπότε μειώνεται η πιθανότητα των ανεπιθύμητων, παράπλευρων αντιδράσεων.

- Είναι καταλύτες φιλικοί προς το περιβάλλον και σε αντίθεση με την χρήση μεθόδων που απαιτούν βαρέα μέταλλα είναι βιοαποικοδομήσιμες ενώσεις.
- Είναι συμβατά μεταξύ τους αφού τα περισσότερα είναι δραστικά κάτω από τις ίδιες ήπιες συνθήκες αντίδρασης, γεγονός που δίνει την δυνατότητα συνεχόμενων αντιδράσεων στο ίδιο δοχείο χωρίς ενδιάμεση απομόνωση προϊόντων. Αυτό είναι σημαντικό στην περίπτωση αντιδράσεων με ασταθή ενδιάμεσα προϊόντα καθώς επίσης και σε περιπτώσεις που η ισορροπία χρειάζεται να μετατοπιστεί προς το επιθυμητό προϊόν.
- Μπορούν να δεχτούν πληθώρα διαφορετικών φυσικών και μη φυσικών υποστρωμάτων χωρίς να περιορίζονται στον φυσικό τους ρόλο. Ακόμη είναι δυνατή η αντικατάσταση του νερού από οργανικούς διαλύτες ή ιοντικά υγρά σαν μέσο αντίδρασης, κάτι που είναι ωφέλιμο πολλές φορές για την πορεία της αντίδρασης.[4]
- Έχουν την ικανότητα να καταλύουν πληθώρα διαφορετικών αντιδράσεων και υπάρχουν ενζυμικά-καταλυόμενες αντιδράσεις σχεδόν για κάθε τύπο οργανικών αντιδράσεων.

Ενώ στην φύση χρησιμοποιούνται πολλά διαφορετικά είδη ένζυμων για την κατάλυση διαφόρων μετατροπών, στην βιοκατάλυση έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς μόνο συγκεκριμένοι τύποι αντιδράσεων.Οι κατηγορίες των ενζύμων ανάλογα με το είδος της αντίδρασης που καταλύουν, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

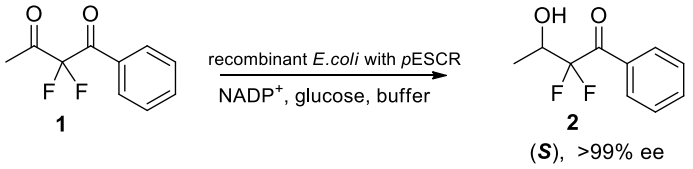
Πίνακας 1: Κατηγορίες ενζύμων

Τύπος ενζύμου	**Τύπος αντίδρασης**
Οξειδορεδουκτάσες	Οξείδωση/Αναγωγή
Τρανσφεράσες	Μεταφορά λειτουργικής ομάδας
Λιγάσες	Σχηματισμός ομοιοπολικού δεσμού μορίων
Ισομεράσες	Αναδιάταξη ατόμων-Ισομερισμός
Υδρολάσες	Υδρόλυση/ Εστεροποίηση
Λυάσες	Απόσπαση/Προσθήκη σε διπλό δεσμό

Τα δεδομένα και οι πληροφορίες από την βιοκατάλυση είναι πλέον αυξανόμενα τόσο για την φαρμακοβιομηχανία, την βιομηχανική βιοτεχνολογία όσο και στα πεδία

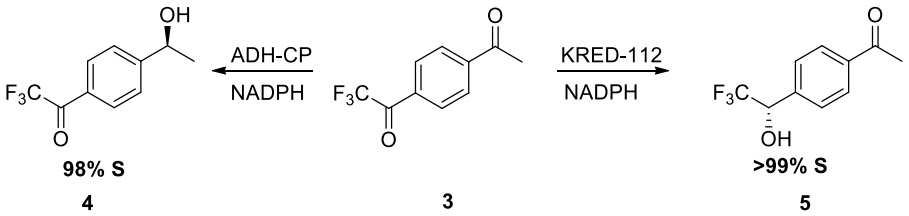
της συνθετικής βιολογίας. Πολλές φαρμακευτικές ενώσεις έχουν τουλάχιστον ένα χειρόμορφο κέντρο, ενώ άλλες έχουν πολλαπλά χειρόμορφα κέντρα. Επομένως η σύνθεση τέτοιων ενώσεων απαιτεί την αποτελεσματική χρήση εναντιο- και τοποεκλεκτικών καταλυτών, όπως είναι τα ένζυμα.[5] Η εκλεκτικότητα είναι η πιο ελκυστική ιδιότητα που εμφανίζουν τα ένζυμα και παίζει σημαντικό ρόλο στην ασύμμετρη σύνθεση οργανικών ενώσεων, φαρμακευτικών και αγροχημικών. Διακρίνεται τέσσερα είδη εκλεκτικότητας:

— *Χημειοεκλεκτικότητα,* που είναι η ιδιότητα του ενζύμου να αναγνωρίζει μια λειτουργική ομάδα μέσα στο μόριο και να αφήνει άλλες ευαίσθητες λειτουργικές ομάδες ανέπαφες. Έτσι παράγονται τα επιθυμητά προϊόντα, μειώνοντας τις διεργασίες καθαρισμού των προϊόντων. Αυτό παρατηρήθηκε για παράδειγμα στην βιοκαταλυτική αναγωγή μιας α,α-διφθοριωμένης κετόνης (Σχήμα 1), που πραγματοποιήθηκε με την χρήση κυττάρων ανασυνδυασμένου *Escherichia coli,* και απέδωσε αποκλειστικά το (*S*)-προϊόν.[6]



Σχήμα 1: Στερεοεκλεκτική αναγωγή της διφθοριωμένης κετόνης **1** με μικροβιακό ένζυμο.

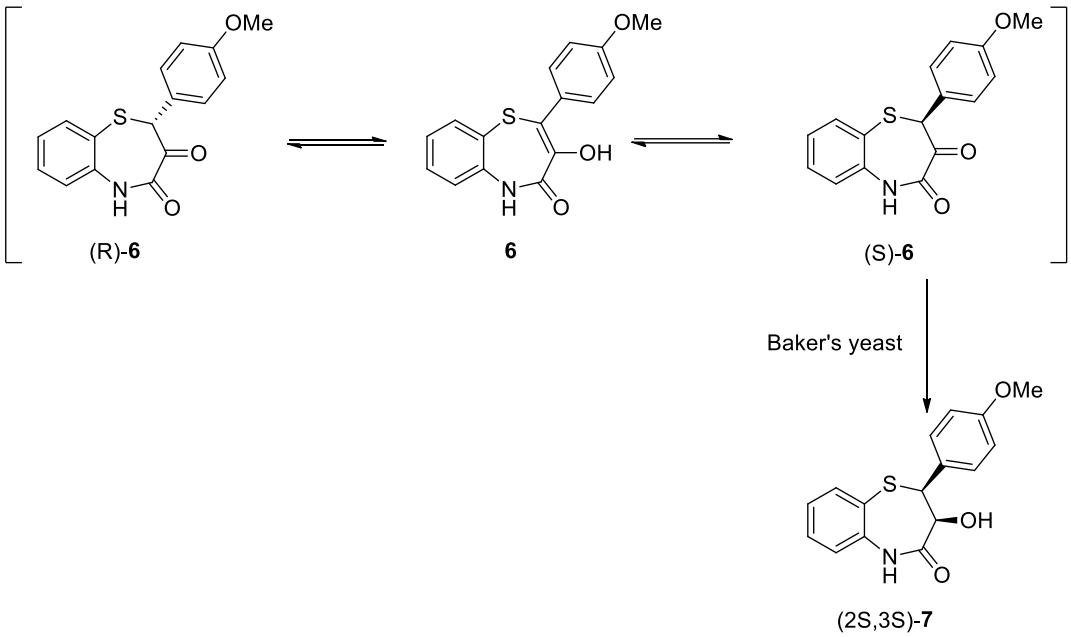
— *Τοποεκλεκτικότητα* είναι η ιδιότητα των ενζύμων, που μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στην σύνθεση φαρμακευτικών και άλλων βιολογικά ενεργών ενώσεων. Χάρη στην τρισδιάστατη πολύπλοκη δομή τους τα ένζυμα μπορούν να ξεχωρίσουν παρόμοιες λειτουργικές ομάδες, όταν βρίσκονται σε διαφορετική θέση μέσα στο μόριο. Παράδειγμα αποτελεί η σύνθεση και των δυο πιθανών τοποισομερών της φθοριωμένης υδροξυκετόνης **3** χρησιμοποιώντας διαφορετικά ένζυμα (Σχήμα 2).[7]



Σχήμα 2: Τοποεκλεκτική αναγωγή της κετόνης **3**με διαφορετικά ένζυμα για την σύνθεση των προϊόντων **4** και **5**.

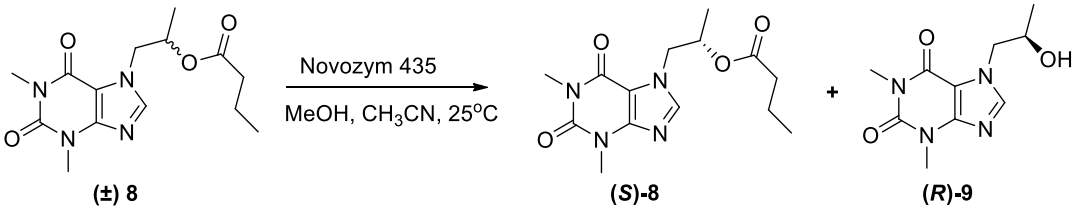
— *Διαστερεοεκλεκτικότητα,* που είναι η ικανότητα του ενζύμου λόγω της ασύμμετρης φύσης του να διακρίνει μόνο το ένα στερεοϊσομερές από ένα μίγμα στερεοισομερών μιας ένωσης.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η σύνθεση του ενδιαμέσου **7** (Σχήμα 3) που αποτελεί οπτικά ενεργό ενδιάμεσο "κλειδί" για την σύνθεση του φαρμάκου Diltiazem hydrochloride.[8]



Σχήμα 3: Ενζυμική αναγωγή του υποστρώματος **6** για την σύνθεση του ενδιαμέσου **7** του φαρμάκου Diltiazem hydrochloride.

— *Εναντιοεκλεκτικότητα,* είναι η εκλεκτικότητα που εμφανίζουν τα ένζυμα ως προς το ένα από τα δύο εναντιομερή ενός ρακεμικού μίγματος, μετατρέποντας σε προϊόν το ένα γρηγορότερα σε σχέση με το άλλο. Η εκλεκτικότητα είναι αποτέλεσμα του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος που σχηματίζεται και κάνει δυνατή την αναγνώριση οποιασδήποτε χειρομορφίας στο μόριο. Παράδειγμα αποτελεί η σύνθεση των εναντιομερών της proxyphylline καταλυόμενη από μια λιπάση (Σχήμα 4).[9]

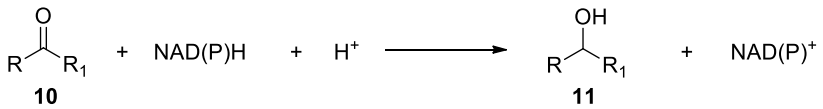


Σχήμα 4: Ενζυμικός κινητικός διαχωρισμός με την ακινητοποιημένη λιπάση Novozym 435 για την σύνθεση του (*R*) εναντιομερούς της proxyphylline.

Κετοredουκτάσες

Οι κετοredουκτάσες είναι ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των οξειδορεδουκτασών και πιο συγκεκριμένα είναι μέρος της ομάδας των αφυδρογονασών/ρεδουκτασών. Είναι ευρέως διαδεδομένα στην φύση και συνήθως απομονώνονται από φυτά, βακτήρια, μαγιά, ψάρια καθώς και από θηλαστικά όπως ανθρώπους, κουνέλια, μύκητες.[10] Συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διεργασίες σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Οι βιοκαταλύτες αυτοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε στο φυσικό τους περιβάλλον, όπως είναι οι μικροοργανισμοί και τα κύτταρα (whole cell), είτε μετά από απομόνωση τους. Απαιτούν την χρήση συνενζύμου για να είναι δραστικά, το οποίο στην περίπτωση των ολόκληρων κυττάρων υπάρχει στο εσωτερικό τους και το προμηθεύονται συνεχώς από εκεί, ενώ στα απομονωμένα ενζυμα είναι απαραίτητη η προσθήκη συνενζύμου. Οι προσπάθειες ανακάλυψης νέων βιοκαταλυτών είναι συνεχείς, με αποτέλεσμα να έχει αυξηθεί εντυπωσιακά ο αριθμός των νέων κετοredουκτασών που είναι διαθέσιμες για χρήση.

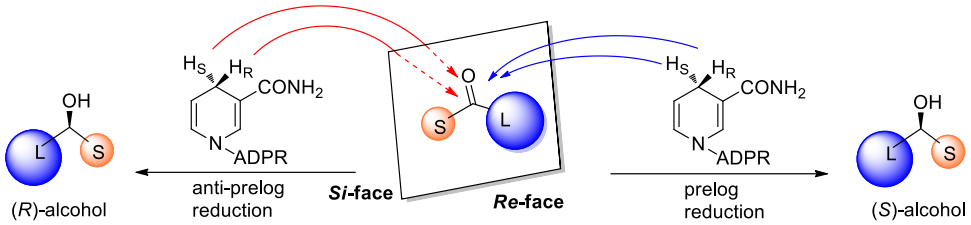
Ο ρόλος των βιοκαταλυτών αυτών είναι η κατάλυση αναγωγής καρβονυλικών ενώσεων προς τον σχηματισμό χειρόμορφων αλκοολών. Έχουν την ιδιότητα να δέχονται στο ενεργό τους κέντρο και μη φυσικά υποστρώματα εκτός από τα φυσικά τους υποστρώματα, πράγμα πολύ σημαντικό για την σύνθεση νέων ενώσεων με υψηλή συνθετική αξία. Ο μηχανισμός της αναγωγής μιας κετόνης καταλυόμενης από κετοredουκτάση, περιλαμβάνει την μεταφορά υδριδίου μέσω ενός νικοτιναμιδικού συμπαράγοντα NAD(P)H, όπως φαίνεται και στο παρακάτω Σχήμα 5.



Σχήμα 5: Αντίδραση αναγωγής με μεταφορά υδριδίου.

Το υδρίδιο μεταφέρεται από τον συμπαράγοντα NAD(P)H στο καρβονύλιο της προς αναγωγή ένωσης-υπόστρωμα, που είναι συναρμοσμένη στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, και η αντίδραση αυτή είναι κατά κανόνα στερεοεκλεκτική. Το NAD(P)H μεταφέρει το υδρίδιο εκλεκτικά από την re ή την si επιφάνεια του

καρβονυλίου μιας προχειρόμορφης κετόνης, οδηγώντας σε (*S*) και (*R*) αλκοόλες αντίστοιχα. Η στερεο-ειδικότητα της ενζυμικής αντίδρασης, μπορεί να προβλεφτεί από τον κανόνα του Prelog[11] και εξαρτάται από την στερεοχημική υποκατάσταση του υποστρώματος (Σχήμα 6).[12]



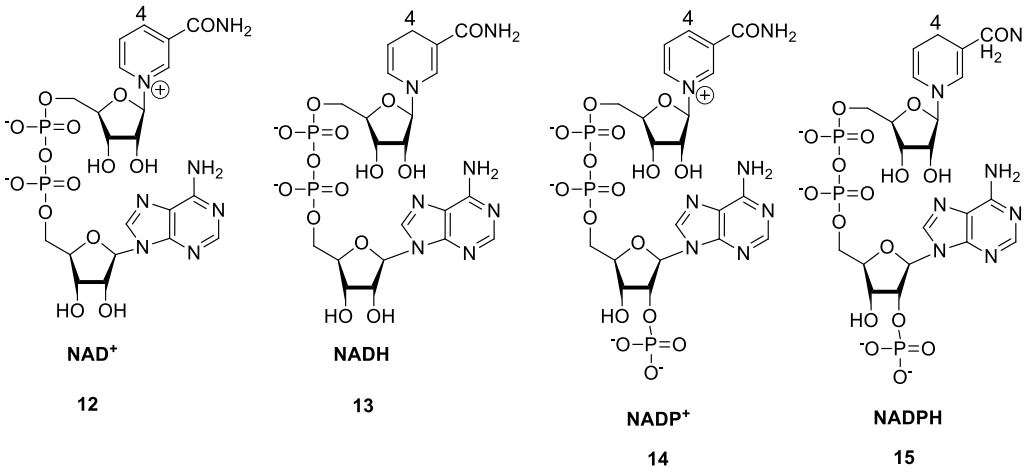
Σχήμα 6: Πρόβλεψη στερεοεκλεκτικότητας της αναγωγής καρβονυλίου από το NADPH.

Η πλειοψηφία των εμπορικά διαθέσιμων αφυδρογονασών που χρησιμοποιούνται για την στερεοεκλεκτική αναγωγή κετονών, όπως η Yeast Alcohol Dehydrogenase (YADH), Horse Liver Alcohol Dehydrogenase (HLADH) και των διάφορων μικροοργανισμών, όπως είναι η Baker's yeast, ακολουθούν τον κανόνα του Prelog. Οι κετοredουκτάσες με anti-Prelog στερεο-ειδικότητα είναι περιορισμένες.

Νικοτιναμιδικοί συμπαράγοντες

Οι αναγωγές κετονών καταλυόμενες από ένζυμα απαιτούν την χρήση συνενζύμου για την μεταφορά του υδριδίου. Τα νικοτιναμίδια είναι οι πιο συνηθισμένες πηγές υδριδίου στις ενζυμικές αντιδράσεις και εμφανίζονται σε δύο μορφές, στο νικοτινάμιδο αδένινο δινουκλεοτίδιο (NADH) και το φωσφορυλιωμένο ανάλογο του (NADPH). Μερικά ένζυμα εμφανίζουν εκλεκτικότητα ως προς ένα τύπο συμπαράγοντα, ενώ άλλα μπορούν να δεχτούν και τις δύο μορφές του συμπαράγοντα NADH και NADPH. Κατά την αντίδραση αναγωγής το νικοτιναμίδιο που χρησιμοποιείται μετατρέπεται στην οξειδωμένη του μορφή, οπότε πρέπει να αναχθεί στην αρχική του μορφή για να μπορεί να συμμετέχει πάλι στον καταλυτικό κύκλο. Πραγματοποιείται επίσης και η αντίστροφη μεταφορά υδριδίου από ένα αναγωγικό υπόστρωμα στο $NAD(P)^+$, η οποία είναι και αυτή στερεοεκλεκτική και χαρακτηριστική για κάθε ένζυμο. Κάθε ένζυμο μεταφέρει στερεοεκλεκτικά ένα από

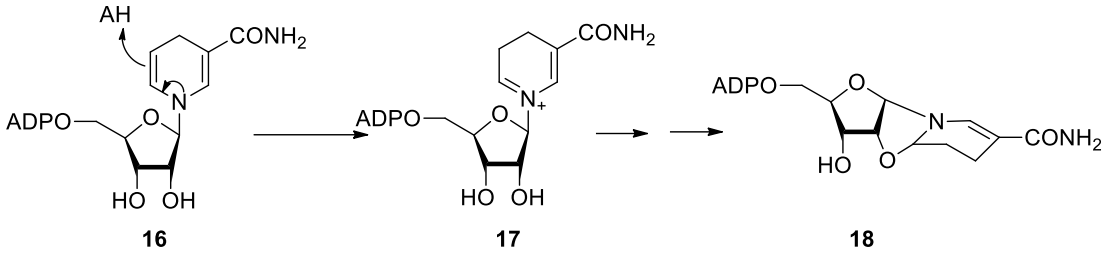
τα διαστερεοτοπικά υδρογόνα του νικοτιναμιδικού δακτυλίου του NAD(P)H σε μια καρβονυλομάδα του υποστρώματος.



Σχήμα 7: Τα νικοτιναμίδια NAD(P)H και οι οξειδωμένες τους μορφές.

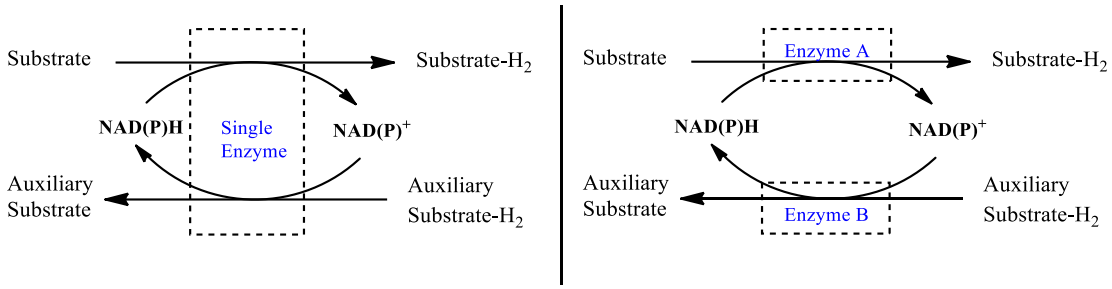
Γενικά οι ανηγμένες μορφές των συνενζύμων είναι σταθερές σε βασικά διαλύματα, αλλά ασταθείς σε όξινα, για αυτό και οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται συνήθως σε pH περίπου 7.[13] Σε pH=5-9 η αποικοδόμηση του NAD(P)H που γίνεται οφείλεται σε όξινη κατάλυση. Σε ανόργανα ρυθμιστικά διαλύματα οι χρόνοι ζωής των συνενζύμων είναι περιορισμένοι και έτσι στην περίπτωση του NADH και NADPH οι χρόνοι ημιζωής σε διάλυμα 0.1 M φωσφορικού νατρίου, σε pH=7.0 στους 25 ^{o}C είναι 27 και 13 ώρες, αντίστοιχα. Σε οργανικά ρυθμιστικά διαλύματα οι χρόνοι ζωής αυξάνονται αρκετά.

Η αποικοδόμηση του συμπαράγοντα πραγματοποιείται ξεκινώντας με πρωτονίωση του νικοτιναμιδικού δακτυλίου στον άνθρακα-5 και με επακόλουθη πυρηνόφιλη προσβολή του δακτυλίου από μια υδροξυλομάδα της ριβόζης σχηματίζεται ένας κυκλικός αιθέρας (Σχήμα 8).[14] Στην περίπτωση του NADPH γίνεται μια επιπλέον ενδομοριακή κυκλοποίηση στην θέση της 2-φωσφορικής ομάδας.[10]



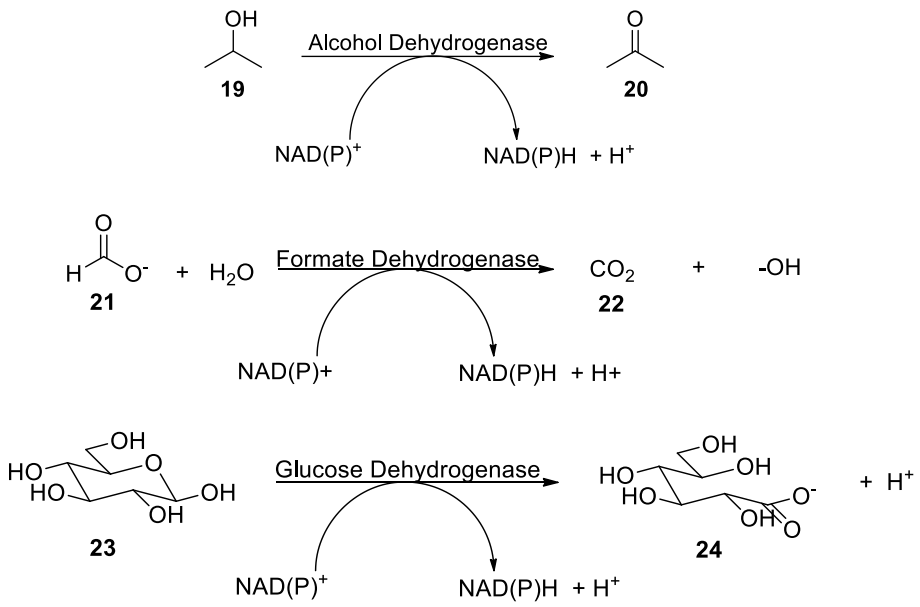
Σχήμα 8: Αποικοδόμηση του συμπαράγοντα προς σχηματισμό του κυκλικού αιθέρα **18**.

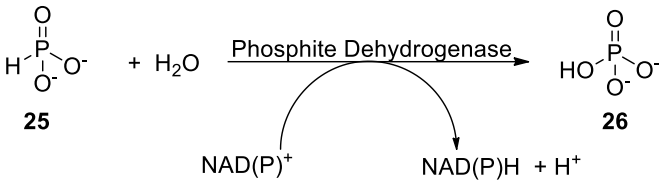
Ο συμπαράγοντας NAD(P)H εξαιτίας του υψηλού του κόστους του, είναι απαραίτητο να αναγεννηθεί και αυτό γίνεται με δύο τρόπους.



Σχήμα 9: Συστήματα ανακύκλωσης του συμπαράγοντα NAD(P)H.

Ο πρώτος τρόπος αναγέννησης είναι με την χρήση ενός ενζύμου, όπως είναι η ίδια η κετουρεδουκτάση που χρησιμοποιείται στην αντίδραση και ο δεύτερος τρόπος είναι με την χρήση δεύτερου ενζύμου όπως είναι η αφυδρογονάση της γλυκόζης (glucose dehydrogenase, GDH).[15] Τα πιο χρήσιμα συστήματα ανακύκλωσης του συνενζύμου παρατίθενται στο παρακάτω Σχήμα 10:





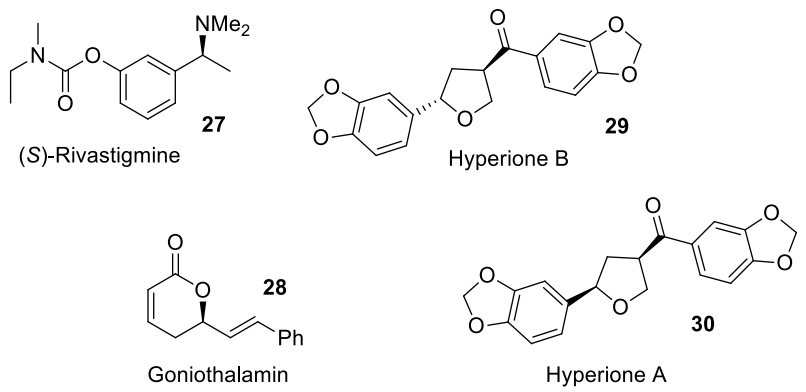
Σχήμα 10: Συστήματα αναγέννησης συνενζύμου NAD(P)H.

Με τα συστήματα ανακύκλωσης είναι δυνατή και οικονομικά συμφέρουσα η χρήση ενζυμικών αντιδράσεων με μειωμένο κόστος, παράγοντας εξαιρετικά σημαντικός για την εφαρμογή τους στην βιομηχανία με στόχο την σύνθεση ασύμμετρων ενδιαμέσων και βιολογικά ενεργών ενώσεων.

Ένζυμα στην σύνθεση φυσικών προϊόντων

Τα ένζυμα εξαιτίας της εκλεκτικότητας που παρουσιάζουν χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο στην σύνθεση βιολογικά ενεργών ενώσεων. Πολλά καθοριστικά στάδια στην σύνθεση πολύπλοκων φυσικών προϊόντων πραγματοποιούνται ενζυμικά και τα επιθυμητά προϊόντα σχηματίζονται με υψηλή στερεοεκλεκτικότητα κάτω από ήπιες και φιλικές προς το περιβάλλον συνθήκες αντίδρασης.[16]

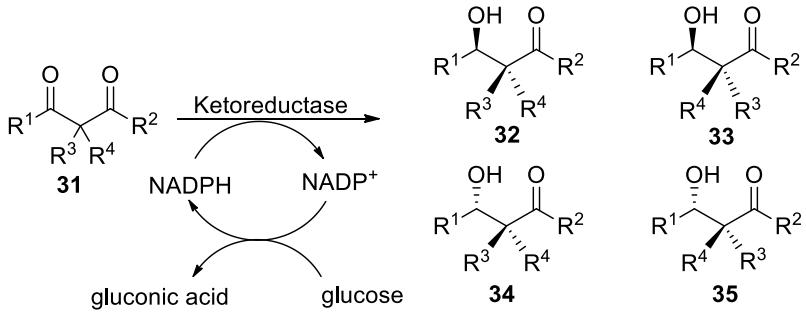
Διάφορες κατηγορίες ενζύμων έχουν χρησιμοποιηθεί για να αντικαταστήσουν συνθετικά στάδια που απαιτούν χρήση τοξικών μετάλλων, υψηλού κόστους χειρόμορφων υποκαταστατών και πολλών προστατευτικών ομάδων. Μερικά παραδείγματα είναι η χημειοενζυμική ολική σύνθεση των φυσικών προϊόντων hyperione A και B, όπου το στάδιο κλειδί είναι μια αντίδραση μετεστεροποίησης καταλυόμενη από την λιπάση από πάγκρεας χοίρου (Porcine Pancreatic Lipase, PPL)[17], η χημειοενζυμική σύνθεση του προϊόντος goniothalamin[18] και η ασύμμετρη ολική σύνθεση του προϊόντος (*S*)-rivastigmine με την χρήση μιας ω-τρανσαμινάσης.[19]



Σχήμα 11: Χαρακτηριστικά φυσικά προϊόντα που έχουν συντεθεί χημειοενζυμικά .

Κετορεδουκτάσες στην σύνθεση φυσικών προϊόντων

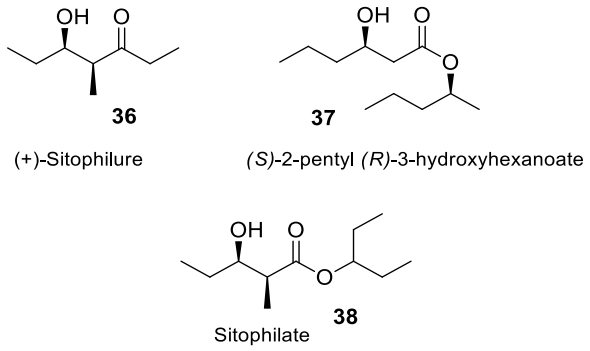
Στην ερευνητική μας ομάδα τα ένζυμα που έχουν χρησιμοποιηθεί και μελετηθεί περισσότερο τα τελευταία χρόνια είναι οι κετορεδουκτάσες (KRED), οι οποίες εμφανίζουν πολλές εφαρμογές στην σύνθεση σημαντικών πρόδρομων ενώσεων φυσικών προϊόντων. Οι ενζυμικά καταλυόμενες στερεοεκλεκτικές αναγωγές κετονών με την χρήση κετορεδουκτασών αποτελεί εξαιρετική μέθοδο σύνθεσης χειρόμορφων αλκοολών με υψηλή οπτική καθαρότητα, ξεπερνώντας πολλές φορές την ικανότητα των χημικών καταλυτών σε αντίστοιχες αντιδράσεις.



Σχήμα 12: Στερεοεκλεκτική αναγωγή α-αλκυλο-1,3-δικετονών και α-αλκυλο-1,3-κετοεστέρων με KRED .

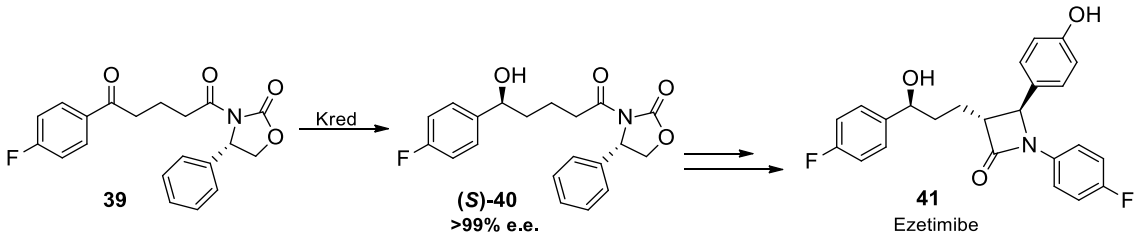
Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν στο εργαστήριο μας, έχει εφαρμοστεί η ενζυμικά καταλυόμενη αναγωγή με διαφορετικές κετορεδουκτάσες για την σύνθεση διαφόρων φυσικών προϊόντων (Σχήμα 13), όπως η φερομόνη (+)-sitophilure[20], όπως επίσης και η πτητική ένωση (*S*)-2-pentyl (*R*)-3-hydroxyhexanoate, που προέρχεται από τον φλοιό της μπανάνας. Η σύνθεση της έγινε πραγματοποιήθηκε

χημειοενζυμικά.[21] Μια ακόμη επιτυχημένη εφαρμογή της μεθοδολογίας αυτής με συνδυασμό κετοredουκτάσης και υδρολυτικού ένζυμου είναι στη σύνθεση της φερομόνης Sitophilate, σε λίγα συνθετικά βήματα και με εξαιρετική στερεοεκλεκτικότητα.[22]



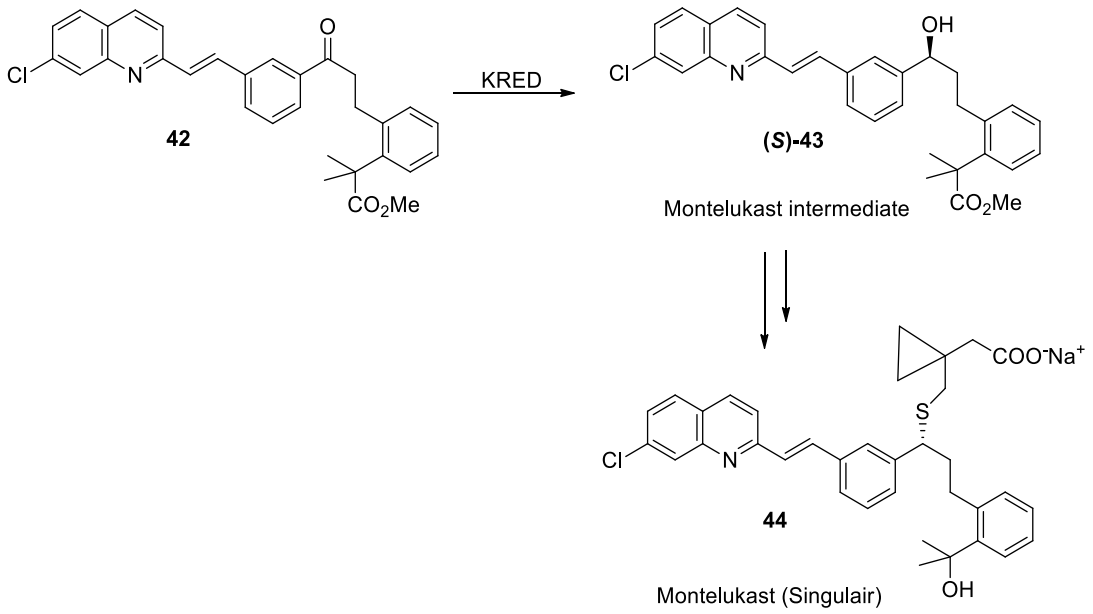
Σχήμα 13: Παραδείγματα φυσικών προϊόντων που έχουν συντεθεί χημειοενζυμικά .

Ένα άλλο παράδειγμα χρήσης απομονωμένης κετοredουκτάσης στην σύνθεση βιολογικά δραστικών ενώσεων αποτελεί η χρήση KRED για την εναντιοεκλεκτική σύνθεση του χειρόμορφου ενδιάμεσου (*S*)-40 (Σχήμα 14) στην πορεία σύνθεσης του ezetimibe, [23] φαρμάκου για την μείωση της χοληστερόλης στο αίμα.



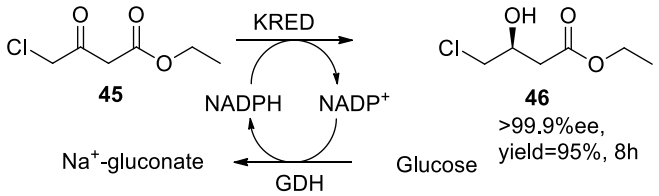
Σχήμα 14: Ενζυμική σύνθεση του ενδιαμέσου του φαρμάκου ezetimibe.

Το 1998 αναπτύχθηκε μια ακόμη εντυπωσιακή εφαρμογή απομονωμένης κετοredουκτάσης πολύ σημαντική στη φαρμακοβιομηχανία. Η σύνθεση του φαρμάκου εναντίον του άσθματος, Montelukast (Singulair®), με τεράστια κέρδη ετησίως σε παγκόσμια κλίμακα, περιλαμβάνει ένα καθοριστικό στάδιο στερεοειδικής αναγωγής του ενδιάμεσου κετο εστέρα **42** προς την ένωση **43** (Σχήμα 15), σημαντικό χειρόμορφο ενδιάμεσο στην πορεία σύνθεσης του φαρμάκου.[24] Παρόλο που στην φαρμακευτική εταιρεία Merck είχε αναπτυχθεί μέθοδος χημικά καταλυόμενης αναγωγής, η ανάγκη για μια οικονομικότερη και περιβαλλοντικά αποδεκτή διαδικασία οδήγησε στην εναλλακτική ενζυμική μέθοδο με χρήση του κατάλληλου ενζύμου για την στερεοεκλεκτική αναγωγή στο στάδιο κλειδί.



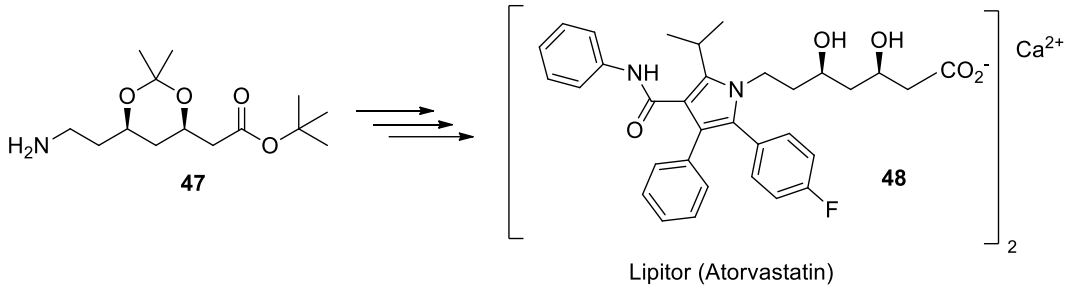
Σχήμα 15: Ενζυμικά καταλυόμενη σύνθεση του ενδιαμέσου (*S*)-**43** στην πορεία σύνθεσης του Montelukast.

Το αντιχοληστερινικό φάρμακο Lipitor (Atorvastatin), με τις μεγαλύτερες πωλήσεις στον κόσμο, αποτελεί επίσης χαρακτηριστικό παράδειγμα χρήσης κετορεδουκτάσης στην πραγματοποίηση μιας στερεοεκλεκτικής αναγωγής (Σχήμα 16).[25] Περιέχει δυο χειρόμορφα κέντρα και διατίθεται ως το οπτικά καθαρό (*R*,*R*)-διαστερεομερές. Έχουν δημοσιευτεί αρκετές βιοκαταλυτικές μέθοδοι με σκοπό την σύνθεση του απαραίτητου ενδιαμέσου για την παρασκευή αυτού του φαρμάκου. Η μέθοδος που εφαρμόζεται από την εταιρεία Codexis, Inc.[26] περιλαμβάνει την ενζυμική αναγωγή ενός πρόδρομου χλωροκέτο εστέρα με κετορεδουκτάση, όπως φαίνεται στο Σχήμα 16.



Σχήμα 16: Παρασκευή του χλώρο υδρόξυ εστέρα **46** με χρήση κετορεδουκτάσης.

Χρησιμοποιώντας το σημαντικό αυτό ενδιάμεσο και σε μερικά ακόμη βήματα πραγματοποιείται η τελική σύνθεση του φαρμάκου αυτού (Σχήμα 17).

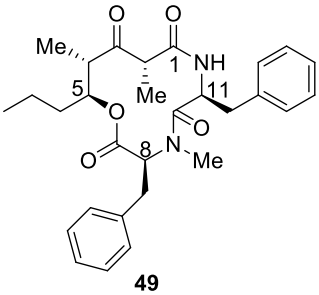


Σχήμα 17: Σύνθεση του φαρμάκου Lipitor από το ενδιάμεσο 47.

Κεφάλαιο 2

Χημειοενζυμική προσέγγιση για την σύνθεση του φυσικού προϊόντος stereocalpin A

Η stereocalpin A είναι ένα κυκλικό depsipeptide που απομονώθηκε το 2008 από την ερευνητική ομάδα του Oh[27] από την λειχήνα *Ramalina Terebrata* που ενδημεί στην Ανταρκτική. [28] Οι λειχήνες θεωρούνται οργανισμοί που σχηματίζονται από την σταθερή ένωση δύο οργανισμών που συμβιώνουν, ενός μύκητα με άλγη ή κυανοβακτήρια. Η συνένωση αυτή μοναδικών δευτερογενών μεταβολιτών όπως είναι οι depsides, depsidones και τα κυκλικά depsipeptides. Τα τελευταία είναι ενώσεις που αποτελούνται από κατάλοιπα άμινο και υδρόξυ καρβοξυλικών οξέων ενωμένων μεταξύ τους σε σειρά ή και εναλλασσόμενα μέσα σε ένα δακτύλιο.[2]



49

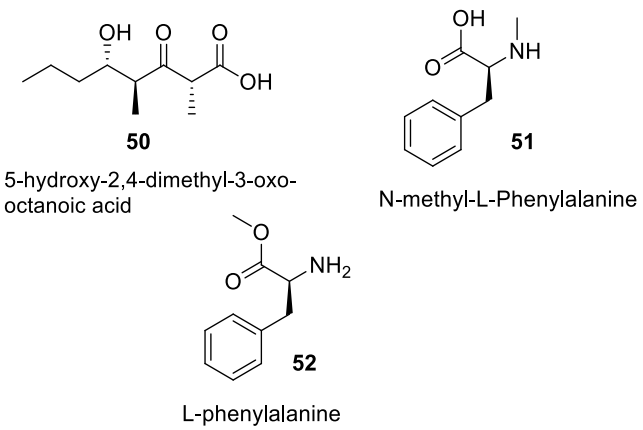
Stereocalpin A

(προτεινόμενη δομή)

Σχήμα 18: Η Προταθείσα δομή του φυσικού προϊόντος stereocalpin A.

Η stereocalpin A μελετήθηκε για κυτταροτοξική δράση εναντίον διάφορων τύπων ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων και βρέθηκε ότι εμφανίζει δραστικότητα εναντίον των κυττάρων του παχέος εντέρου (HT-29, IC_{50} = 6.5 μM), του δέρματος (B16/F10, IC_{50} = 11.9 μM) και του ήπατος (HepG2, IC_{50} =13.4 μM). Ακόμη παρουσιάζει σε μικρό ποσοστό αναστολή της πρωτεΐνης Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B, IC_{50}= 40.0 μM), καθώς επίσης φαίνεται να δρα και σαν αντιφλεγμονώδες φάρμακο που αποτρέπει την επιτάχυνση των αρτηριοσκληρωτικών βλαβών.[29]

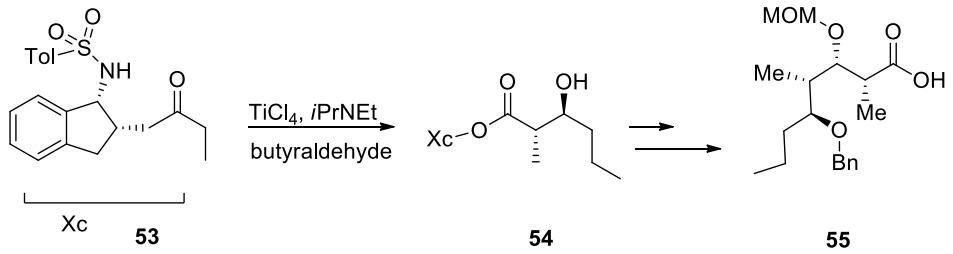
Με βάση την προτεινόμενη δομή του προϊόντος, το μόριο αυτό ρετροσυνθετικά φαίνεται να αποτελείται από δυο τμήματα, το 5-υδροξυ-2,4-διμεθυλο-3-οξο-οκτανοϊκό οξύ (HDMOO) και το πεπτιδικό τμήμα, που είναι ένα μόριο L-φαινυλαλανίνης και ένα N-μεθυλο-L-φαινυλαλανίνης ενωμένα μεταξύ τους (Σχήμα 19).



Σχήμα 19: Τα δομικά τμήματα του φυσικού προϊόντος stereocalpin A.

Έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες προσπάθειες σύνθεσης του φυσικού αυτού προϊόντος. Η πρώτη εργασία δημοσιεύτηκε από την ομάδα του Ghosh,[30] και περιλαμβάνει την σύνθεση της προταθείσας δομής της stereocalpin A, καθώς και ενός επιμερούς της ένωσης αυτής (Σχήμα 18). Συγκρίνοντας τα φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης που συντέθηκε με αυτή που απομονώθηκε, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η στερεοχημεία που προτάθηκε στο απομονωμένο προϊόν από την ομάδα του Oh[27] δεν είναι σωστή.

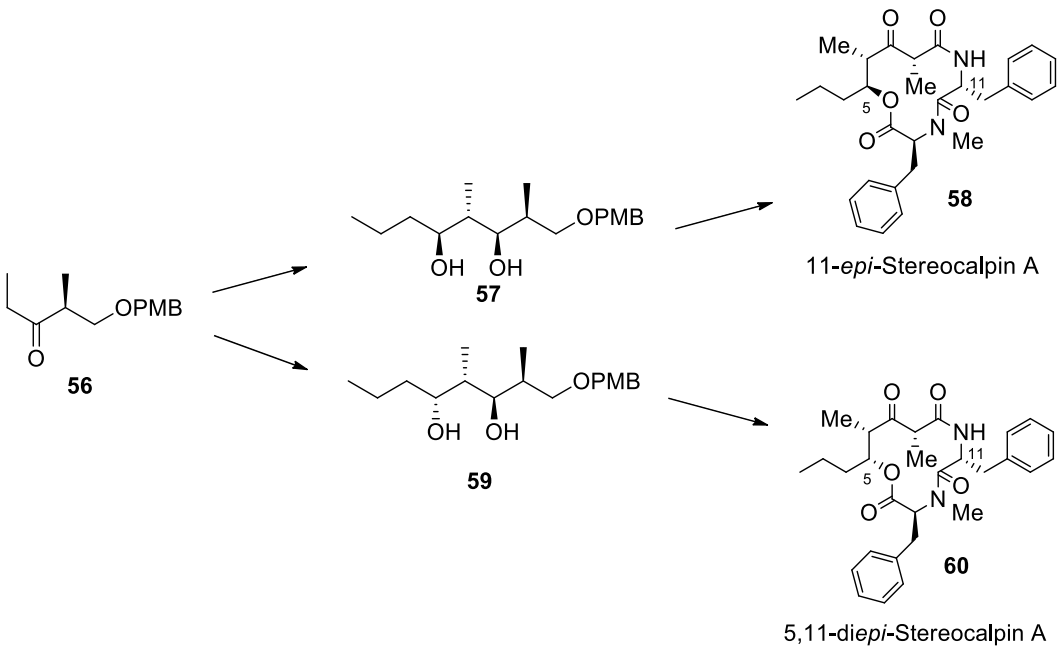
Για την σύνθεση της υπομονάδας 5-υδροξυ-2,4-διμεθυλο-3-οξο-οκτανοϊκού οξέος έγινε χρήση δυο στερεοεκλεκτικών μεθόδων σαν στάδια κλειδιά, μία Ghosh' *anti* αλδολική αντίδραση καταλυόμενη από $TiCl_4$ και μια Evans' *syn* αλδολική (Σχήμα 20).



Σχήμα 20: Σύνθεση της υπομονάδας 5-υδροξυ-2,4-διμεθυλο-3-οξο-οκτανοϊκού οξέος από την ομάδα του Ghosh.

Το 2011 πραγματοποιήθηκε δεύτερη μελέτη για την εύρεση της σωστής δομής του φυσικού προϊόντος μέσω της σύνθεσης δυο τμημάτων της ένωσης (Σχήμα 21).[31] Στόχος ήταν η σύνθεση του 5-επιμερούς, όμως τελικά κατάφεραν να συνθέσουν το 11-επιμερές και 5,11-διεπιμερές, μέσω μιας εφαρμογής της Paterson's *anti*-αλδολικής

αντίδρασης. Έτσι ακόμη και σε αυτή την συνθετική προσέγγιση, δεν βρέθηκε η σωστή στερεοχημεία του προϊόντος.



Σχήμα 21: Δεύτερη συνθετική προσέγγιση της stereocalpin A.

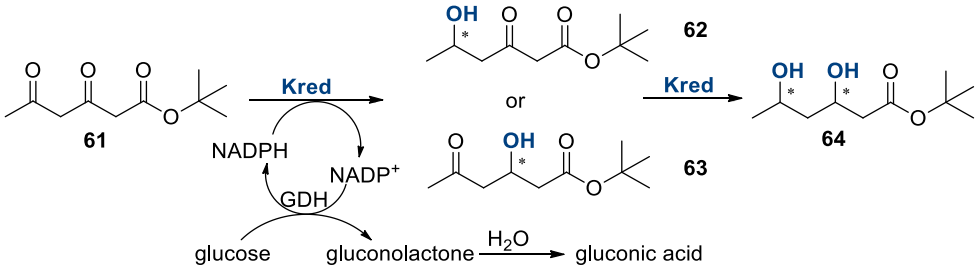
Τέλος σε μια ακόμη δημοσιευμένη εργασία παρατίθενται οι συνθετικές προσπάθειες για την προτεινόμενη δομή της stereocalpin A, όπου η αλδολική υπομονάδα συντέθηκε με την μέθοδο Evans.[32] Η προσπάθεια για την ολική σύνθεση της προτεινόμενης δομής δεν συνεχίστηκε αφού ήδη είχε αποδειχθεί, από την ομάδα του Ghosh, ότι δεν αντιστοιχεί στο φυσικό προϊόν.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η προσπάθεια στερεοεκλεκτικής χημειοενζυμικής σύνθεσης της αλδολικής υπομονάδας της stereocalpin A, και ο προσδιορισμός της σωστής στερεοδομής του φυσικού προϊόντος το οποίο παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Ανάλυση-συζήτηση αποτελεσμάτων

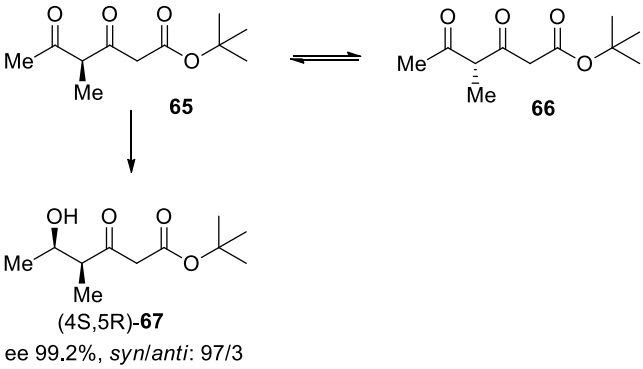
Παρατηρώντας το φυσικό αυτό προϊόν, διαπιστώθηκε ότι η αλδολική υπομονάδα (HDMOO) που περιέχει, παρουσιάζει ομοιότητες με τα υποστρώματα που μελετώνται τα τελευταία χρόνια στο εργαστήριο μας, και θα μπορούσε να συντεθεί χημειοενζυμικά. Όπως παρουσιάστηκε σε πρόσφατη ερευνητική μας εργασία, οι ενζυμικές αναγωγές με την χρήση εμπορικά διαθέσιμων κετορεδουκτασών οδήγησαν

στην εκλεκτική σύνθεση υδρόξυ κετοεστέρων καθώς και διυδρόξυ εστέρων σε υψηλή απόδοση και εξαιρετική εναντιομερική περίσσεια (Σχήμα 22).[33]



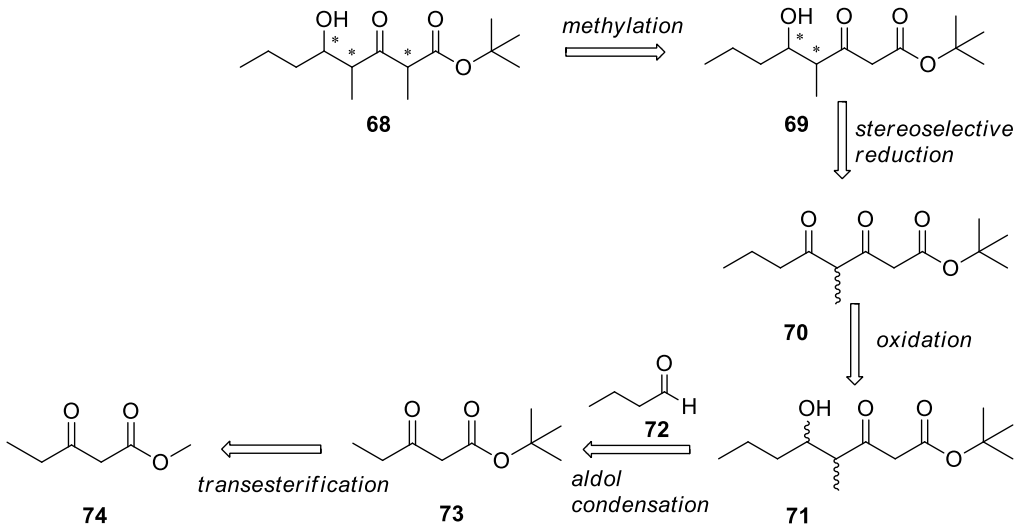
Σχήμα 22: Μέθοδος ενζυμικής σύνθεσης υδρόξυ κετοεστέρων και διυδρόξυ εστέρων.

Σε μια εργασία της ερευνητικής ομάδας του Müller, παρουσιάστηκε ο δυναμικός κινητικός διαχωρισμός του ρακεμικού μίγματος του 4-μεθυλο-3,5-διοξο-εξανικού *tert*-βουτυλεστέρα (Σχήμα 23) με την χρήση μιας ανασυνδυασμένης αλκοολικής αφυδρογονάσης από τον μικροοργανισμό Lactobacillus brevis (recLBADH).[34]



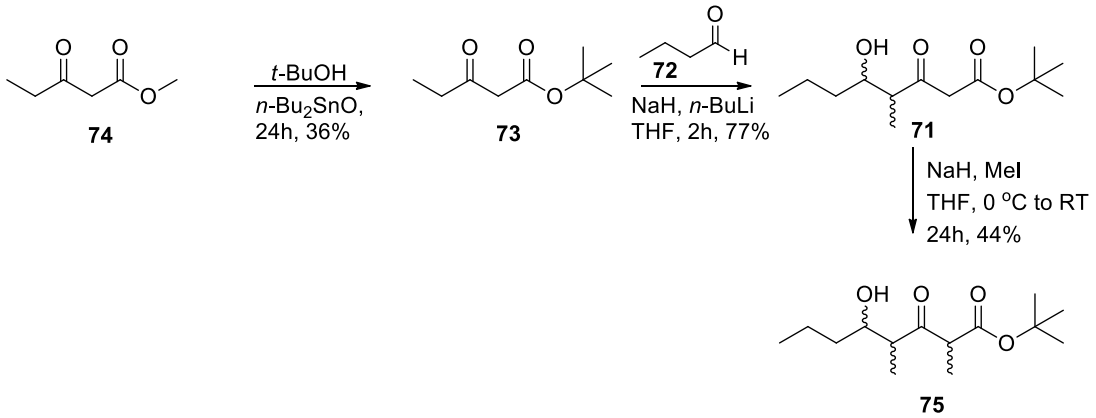
Σχήμα 23: Δυναμικός κινητικός διαχωρισμός του ρακεμικού μίγματος 4-μεθυλο-3,5-διοξο-εξανικού *tert*-βουτυλεστέρα.

Έτσι οι κετορεδουκτάσες, εξαιτίας των πλεονεκτημάτων τους που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή, θεωρήθηκαν κατάλληλοι βιοκαταλύτες για την στερεοεκλεκτική σύνθεση της συγκεκριμένης αλδολικής υπομονάδας. Η υπομονάδα αυτή αποτελείται από τρία στερεογονικά κέντρα και στο Σχήμα 24 παρουσιάζεται η ρετροσυνθετική μας προσέγγιση. Η εισαγωγή της απαιτούμενης ασυμμετρίας θα μπορούσε να προέλθει από ενζυμική αναγωγή της ένωσης **70** παρουσία του κατάλληλου αναγωγικού ενζύμου.



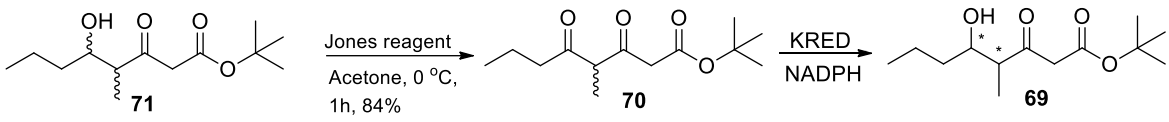
Σχήμα 24: Ρετροσυνθετική προσέγγιση της σύνθεσης της αλδολικής υπομονάδας

Πραγματοποιήθηκαν 3 στάδια για την σύνθεση του ρακεμικού μίγματος της ένωσης **75** (Σχήμα 25). Ξεκινώντας από τον εμπορικά διαθέσιμο κέτο εστέρα **74**, σε μια αντίδραση μετεστεροποίησης με *tert*-βουτανόλη, σχηματίστηκε ο αντίστοιχος *tert*-βουτυλεστέρας **73**. Έπειτα ο κέτο εστέρας **73**, μέσω μιας αντίδρασης αλδολικής συμπύκνωσης με την βουτυραλδεΰδη, απέδωσε τον υδροξυ κετοεστέρα **71** σε 77% απόδοση. Ακολούθησε μια τελική αντίδραση αλκυλίωσης με MeI παρουσία βάσης, για 24 ώρες, η οποία έδωσε το ρακεμικό μίγμα της επιθυμητής ένωσης **75** (44%).



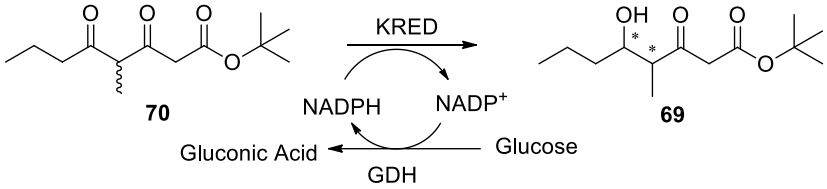
Σχήμα 25: Σύνθεση του ρακεμικού μίγματος της αλδολικής υπομονάδας **75**.

Στην συνέχεια διερευνήθηκε η ενζυμική αναγωγή του δικέτο εστέρα **70**, ώστε να προσδιοριστεί το κατάλληλο αναγωγικό ένζυμο για τον σχηματισμό όλων των πιθανών στερεοϊσομερών του υδρόξυ κετοεστέρα **69**. Έτσι συντέθηκε πρώτα ο δικέτο εστέρας **70** από την ρακεμική ένωση **71** μετά από οξείδωση.



Σχήμα 26: Σύνθεση της πρόδρομης ένωσης **70** για την διερεύνηση της ενζυμικής στερεοεκλεκτικής αναγωγής.

Η ενζυμικά καταλυόμενη αναγωγή του δικέτο εστέρα **70** έγινε με την καλά μελετημένη μέθοδο που φαίνεται στο Σχήμα 27. Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκε σύστημα αναγέννησης του συνενζύμου NADPH με χρήση αφυδρογονάσης της γλυκόζης GDH και βοηθητικού υποστρώματος γλυκόζης.



Σχήμα 27: Μέθοδος ενζυμικής αναγωγής του δικετο εστέρα **70**.

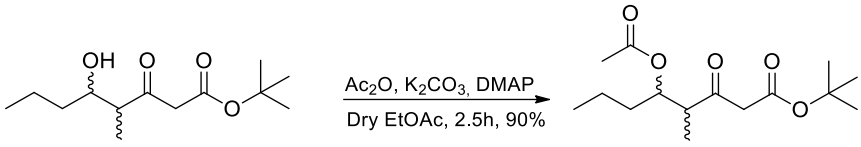
Μελετήθηκε η δραστικότητα που εμφανίζουν 23 διαφορετικές κετοεδουκτάσες, σε χρόνο αντίδρασης 24 ωρών, θερμοκρασία 37 ^{o}C, υπό ανακίνηση στους 200 rpm. Τα καλύτερα αποτελέσματα τους συνοψίζονται στον Πίνακα 2:

Πίνακας 2: Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών

	KRED	Ποσοστό Μετατροπής %	Αναλογία στερεοισομερών %			
			A	**B**	**C**	**D**
1	101	85.5	0	79.3	9.1	11.6
2	114	92.2	1.5	8.6	52.2	37.7
3	115	73.4	3.5	59.4	21.8	15.3
4	119	89.4	0	77.0	9.2	13.8
5	121	92.7	0	39.6	39.6	20.8
6	123	79.6	12.4	54.7	20.1	12.8

Σε όλες τις περιπτώσεις η διαστερεοεκλεκτικότητα και η εναντιοεκλεκτικότητα προσδιορίστηκε με την χρήση αέριας χρωματογραφίας με χειρόμορφη στήλη. Για την διάκριση με GC των τεσσάρων πιθανών στερεοϊσομερών του παραγόμενου υδρόξυ κετοεστέρα απαιτήθηκε η παραγοντοποίηση τους με εστεροποίηση με οξικό ανυδρίτη (Σχήμα 28), αφού η χρωματογραφική ανάλυση του καθαρού ρακεμικού μίγματος **71** δεν κατέστη δυνατή με τις χειρόμορφες στήλες που

χρησιμοποιήσαμε πριν την εστεροποίηση. Ο προσδιορισμός της εκλεκτικότητας των ενζυμικών αναγωγών γίνεται με σύγκριση των κορυφών των στερεοϊσομερών στο ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα. Αντιστοίχως μετρήθηκε και το ποσοστό μετατροπής των αντιδράσεων με αυτό τον τρόπο.



71 **76**

Σχήμα 28: Αντίδραση εστεροποίησης του ρακεμικού υδρόξυ εστέρα **71**.

Όπως προέκυψε από την αεριοχρωματογραφική ανάλυση, οι κορυφές των A και B, καθώς και οι C και D, αντιστοιχούν σε ζεύγη δυο διαστερεομερών. Επίσης οι A και B καθώς και οι C και D, είναι μεταξύ τους εναντιομερή. Οι A και B φαίνεται να είναι τα *anti* εναντιομερή ενώ οι C και D τα *syn*, συγκρίνοντας την χημική μετατόπιση του καρβινολικού πρωτονίου του φάσματος ^{1}H NMR του υδροξυ κετοεστέρα **69** που συντέθηκε ενζυμικά με το μίγμα στερεοϊσομερών *syn-anti* **71** που συντέθηκε χημικά . Το καρβινολικό πρωτόνιο στα χαμηλά πεδία αντιστοιχεί στο *syn* ενώ στα υψηλά πεδία στο *anti* στερεοϊσομερές[35]. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 2, φαίνεται ότι με τα ένζυμα Kred-101 και Kred-119 σχηματίζεται σαν κύριο προϊόν το B. Η διαστερεοεκλεκτικότητα των παραπάνω ενζυμικών αντιδράσεων (dr περιπου 79:9:12 και 77:9:14 αντίστοιχα για τις δυο κετορεδουκτάσες), καθώς και το ποσοστό μετατροπής τους (85.5% και 89.4% αντίστοιχα), είναι αρκετά ικανοποιητικά. Η εναντιοεκλεκτικότητα στις αντιδράσεις των Kred-101 και Kred-119, >99% ee και στα δυο είναι πολύ υψηλή για το προϊόν B, το οποίο είναι και το κύριο προϊόν των δύο αντιδράσεων.

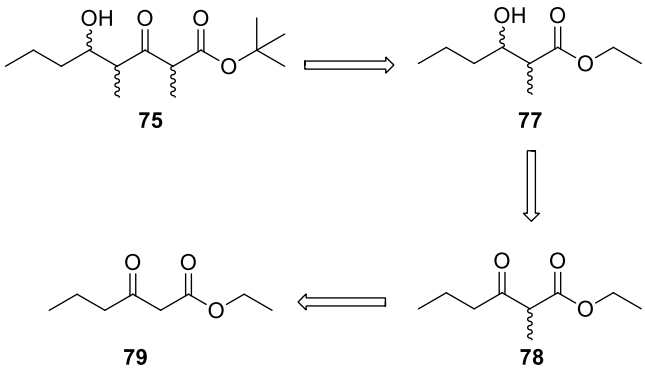
Ακόμη στην ενζυμική αναγωγή με την Kred-114 σχηματίζονται κυρίως τα προϊόντα C και D, ενώ με τα ένζυμα Kred-115 και Kred-121 τα B και C.

Η διαστερεοεκλεκτικότητα της ενζυμικής αναγωγής με την Kred-114 είναι αρκετά υψηλή 89.9% *de*, όπως επίσης και το ποσοστό μετατροπής (92.2%). Το κύριο προϊόν είναι το C, όμως η εναντιοεκλεκτικότητα για αυτό το στερεοϊσομερές είναι χαμηλή (16,2% *ee*).

Στις περιπτώσεις 3 και 5 του πίνακα, παρόλο που τα ποσοστά μετατροπής είναι πολύ ικανοποιητικά, (73.4% και 92.7% αντίστοιχα), η διαστερεοεκλεκτικότητα είναι αρκετά μικρή και στις 2 περιπτώσεις. Λαμβάνεται μίγμα προϊόντων, με κύρια να είναι τα B και C.

Η βελτίωση της εναντιοεκλεκτικότητας των αντιδράσεων σε αυτό το στάδιο είναι ιδιαίτερα σημαντική και βρίσκεται υπό εξέλιξη.

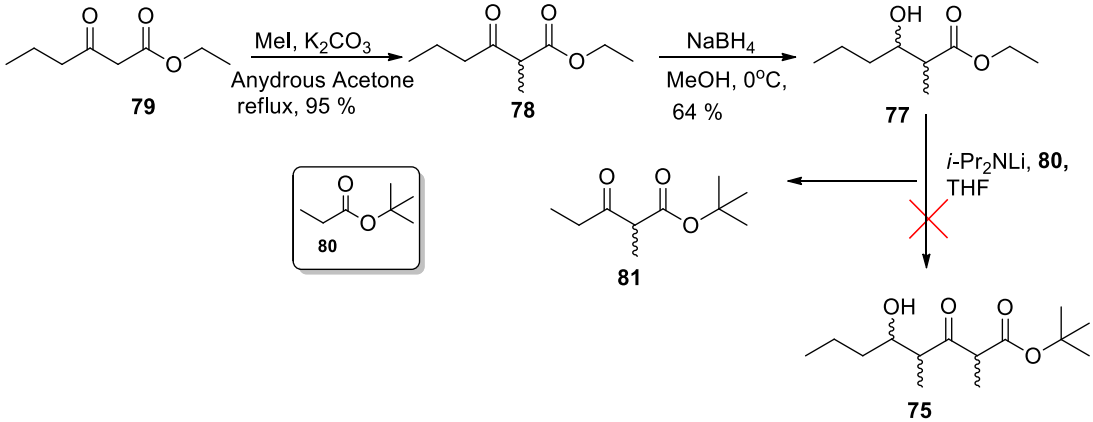
Η προσπάθεια βελτίωσης της εναντιοεκλεκτικότητας οδήγησε στην ανάπτυξη μιας εναλλακτικής πορείας σύνθεσης του προϊόντος **68**, ώστε να διερευνηθεί εάν μπορεί να γίνει σχηματισμός των διαφορετικών στερεοϊσομερών με μεγαλύτερη οπτική καθαρότητα. Η νέα ρετροσυνθετική προσέγγιση φαίνεται στο Σχήμα 29.



Σχήμα 29: Δεύτερη ρετροσυνθετική προσέγγιση.

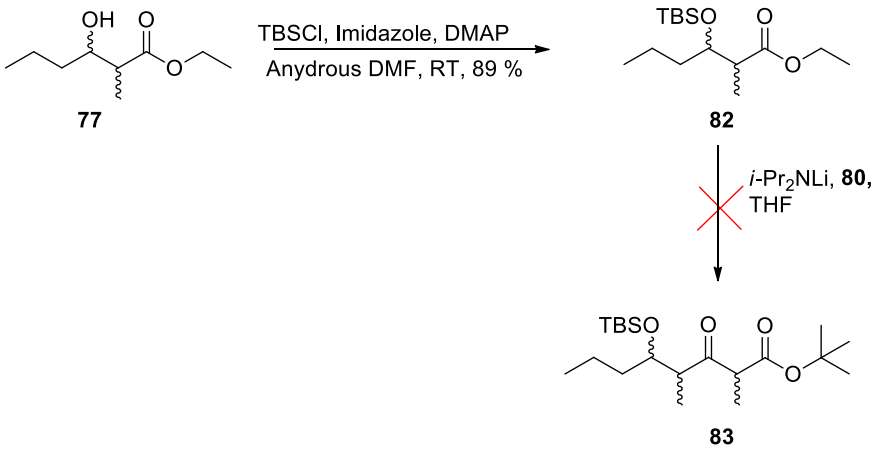
Αυτή την φορά θεωρήσαμε ότι η σύνθεση θα μπορούσε να ξεκινήσει από τον εμπορικά διαθέσιμο κετο εστέρα **79** και μέσω μιας αντίδρασης μεθυλίωσης να προκύψει ο 2-μεθυλο-3-οξο εξανοϊκός αιθυλεστέρας **78**. Στην συνέχεια με μία αντίδραση αναγωγής θα γινόταν η σύνθεση του υποστρώματος **77**, το οποίο θα αντιδράσει σε μια αντίδραση συμπύκνωσης με τον προπιονικό *tert*-βουτυλεστέρα για να δώσει το προϊόν **75.**

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η συνθετική αυτή προσέγγιση του Σχήματος 29 για την σύνθεση του ρακεμικού προϊόντος **75** για να γίνει μετά η εφαρμογή των ίδιων αντιδράσεων στην εκλεκτική σύνθεση του ίδιου προϊόντος. Έτσι έγινε σύνθεση του υποστρώματος **77** όπως φαίνεται στο Σχήμα 30:



Σχήμα 30: Προσπάθεια εναλλακτικής σύνθεσης της αλδολικής υπομονάδας του φυσικού προϊόντος.

Έχοντας διαθέσιμη την ένωση **77**, πραγματοποιήθηκαν αρκετές προσπάθειες συμπύκνωσης Claisen με τον προπιονικό *tert*-βουτυλεστέρα **80** προς σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος. Δοκιμάστηκαν πολλές διαφορετικές συνθήκες, όμως καμία δεν οδήγησε στο επιθυμητό προϊόν **75**. Αντίθετα όλες οδήγησαν στον σχηματισμό του παραπροϊόντος αυτοσυμπύκνωσης **81**. Έτσι εναλλακτικά, έγινε προστασία του υδρόξυ κετοεστέρα **77** με TBDMSCl και στην συνέχεια αντίδραση του προστατευμένου κετο εστέρα σε παρόμοιες συνθήκες (Σχήμα 31).



Σχήμα 31: Προστασία του υδροξυ κετοεστέρα **77** και προσπάθεια συμπύκνωσης Claisen του προστατευμένου προϊόντος.

Και στην δεύτερη περίπτωση η αντίδραση απέδωσε κυρίως το παραπροϊόν από την αυτοσυμπύκνωση του προπιονικού *tert*-βουτυλεστέρα. Παρακάτω παρατίθεται ο Πίνακας 3 με τις αναλογίες των αντιδραστηρίων για όλες τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν.

Πίνακας 3: Αναλογίες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση συμπύκνωσης Claisen.

Αντιδρών	LDA (equiv)	**80** (equiv)
77	2	2.1
77	7	7.1
77	10	10.1
82	7	7.1
82	6	6.1

Ακόμα και όταν τα ισοδύναμα του εστέρα **80** ήταν σε μεγάλη περίσσεια (7, 10 equiv), έναντι του υποστρώματος, δεν ταυτοποιήθηκε σε καμία περίπτωση να σχηματίστηκε το προϊόν που αναμενόταν. Για αυτό τον λόγο δεν έγινε περαιτέρω μελέτη της στερεοεκλεκτικότητας των ενζυμικών αναγωγών που θα γίνονταν στο υπόστρωμα **78**.

Συμπερασματικά, πραγματοποιήθηκε ολοκληρωμένη σύνθεση της αλδολικής υπομονάδας στην ρακεμική μορφή **75**, καθώς και στερεοεκλεκτική σύνθεση της πρόδρομης ένωσης **69**, που περιλαμβάνει ένα σημαντικό στάδιο ενζυμικής αναγωγής για την δημιουργία της χειρομορφίας στο μόριο. Μελετήθηκαν πολλά ένζυμα για αυτή την αναγωγή και βρέθηκαν κάποια από αυτά να δίνουν εξαιρετικό ποσοστό μετατροπής, διαστερεοεκλεκτικά προϊόντα και σε πολύ λίγες περιπτώσεις εναντιοεκλεκτικά προϊόντα. Παρόλα αυτά δεν ήταν τόσο ικανοποιητικά τα αποτελέσματα και έτσι η πορεία τερματίστηκε σε αυτό το σημείο. Στην συνέχεια θεωρείται απαραίτητο να δοκιμαστούν και άλλες κετοredουκτάσες, πιθανόν συνθετικές, με σκοπό την βελτίωση των αποτελεσμάτων και αν είναι δυνατό, τον σχηματισμό όλων των στερεοϊσομερών της ένωσης **69**. Στην δεύτερη πορεία, δυστυχώς δεν έγινε δυνατός ο σχηματισμός της αλδολικής υπομονάδας σε ρακεμική μορφή, και αυτή η εργασία θα συνεχιστεί μελλοντικά με εναλλακτικό τρόπο για να ολοκληρωθεί η σύνθεση της. Ο τελικός στόχος και στις δύο πορείες που αναφέρθηκαν, είναι η δοκιμή όλων των στερεοϊσομερών στην σύνθεση του φυσικού προϊόντος για την εύρεση της σωστής στερεοδομής του φυσικού προϊόντος.

Πειραματικό Μέρος

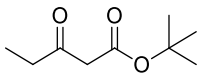
Γενικές μέθοδοι

Η απόσταξη του διαλύτη THF, πραγματοποιήθηκε παρουσία Na/βενζοφαινόνης. Τα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επαξεργασία. Τα ένζυμα ήταν εμπορικά διαθέσιμες απομονωμένες κετοredουκτάσες της εταιρείας Codexis (Inc., Pasadena CA, USA). Η παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων έγινε σύμφωνα με την βιβλιογραφική μέθοδο.[36] Η παρακολούθηση των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε πλακίδια silica gel (60F-254) και με χρήση UV ακτινοβολίας για την παρατήρηση τους. Η χρωματογραφία στήλης

πραγματοποιήθηκε με υλικό πλήρωσης SiO_2 (silica gel 60, με μέγεθος σωματιδίων 0,040–0,063 mm).

Για την λήψη των φασμάτων ^1H και ^{13}C NMR χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο Bruker AMX-500 και MSL-300 σε διαλύτη $CDCl_3$. Οι εκλεκτικότητες των ενζυμικών αντιδράσεων προσδιορίστηκαν με αέριο χρωματογράφο της εταιρίας Shimadzu GC 2014 με ανιχνευτή FID στην χειρόμορφη κολώνα (20% permethylated cyclodextrine) 30m x 0.25mm x 0.25 μm.

3-Οξοπεντανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας (73)

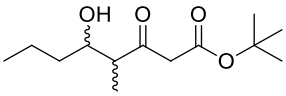


Σε σφαιρική φιάλη με μοριακά κόσκινα 4Å διαλύθηκε ο *n*-Bu_2SnO 10% (0.768 mmol, 191 mg) σε *tert*-βουτανόλη (20 mL). Στην συνέχεια προστέθηκε ο 3-οξοπεντανοϊκός μεθυλεστέρας **74** (7.68 mmol, 1 gr) και το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού και παρέμεινε υπό ανάδευση για 24 ώρες. Ακολούθησε έλεγχος της αντίδρασης με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης έγινε προσθήκη κορεσμένου υδατικού διαλύματος Na_2CO_3 (20 mL). Η υδατική φάση εκχυλίστηκε με EtOAc (3 x30 mL) και η οργανική φάση διηθήθηκε με Celite, ξηράνθηκε με $MgSO_4$ και συμπυκνώθηκε στον ρότορα. Ο καθαρισμός του προϊόντος γίνεται με flash χρωματογραφία στήλης (Petr. Ether/EtOAc=10/1 v/v). Απόδοση 36%.

^1H NMR ($CDCl_3$ 300 MHz, δ ppm): 3.35 (s, 2H), 2.55 (q, J =7.5 Hz, 2H), 1.48 (s, 9H) 1.08 (t, J =7.5 Hz, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz, δ ppm): 203.9, 166.6, 81.9, 50.4, 36.2, 27.9, 7.6.

5-Υδροξυ-4-μεθυλο-3-οξοοκτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας (71)



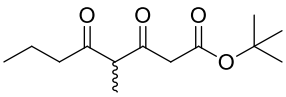
Υπό ατμόσφαιρα αζώτου σε άνυδρο THF (3 mL) στους 0 ^oC διαλύθηκε NaH (2.3 mmol, 56 mg) και προστέθηκε ο 3-οξοπεντανοϊκός-*tert*-βουτυλεστέρας **73** (1.07 mmol, 184 mg) σε διαλύτη THF (2 mL). Το μίγμα έμεινε υπό ανάδευση για 10 λεπτά και έπειτα ψύχθηκε στους -50 ^oC με την χρήση ξηρού πάγου. Προστέθηκε στάγδην *n*-BuLi (1.6 M σε εξάνιο, 1.39 mmol, 869 μL), η θερμοκρασία ανέβηκε στους -45 ^oC

και το μίγμα αναδεύτηκε για ακόμη 20 λεπτά. Στην συνέχεια προστέθηκε αποσταγμένη βουτυραλδεΰδη (1.07 mmol, 96 μL) στους -25 ^{o}C, παρέμεινε για 5 λεπτά στην θερμοκρασία αυτή και μετά αυξήθηκε σταδιακά για να φτάσει θερμοκρασία δωματίου μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης που διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Για την απομόνωση του προϊόντος προστέθηκε μίγμα EtOAc (6 mL) και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH_4Cl (6 mL) και έγινε διήθηση του μίγματος της αντίδρασης. Η υδατική φάση εκπλύθηκε με EtOAc (2 x20ml) και η οργανική φάση εκπλύθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaCl (2 x 20 mL). Το σύνολο των οργανικών φάσεων που προέκυψαν ξηράνθηκε με $MgSO_4$ και απομακρύνθηκε ο οργανικός διαλύτης στον ρότορα. Το προϊόν που προκύπτει καθαρίστηκε περαιτέρω με flash χρωματογραφία στήλης (Petr. Ether/EtOAc=10/1 v/v). Απόδοση 77.2 %.

^{1}H NMR ($CDCl_3$ 300 MHz, δ ppm): (μίγμα *syn* και *anti* διαστερεομερών, *syn/anti*=43/57) 3.98-4.00 (m, 1H) (*syn*), 3.69-3.74 (m, 1H) (*anti*), 3.46 (s, 2H), 3.45 (s, 2H) (*syn+anti*), 2.69-2.78 (m, 1H) (*syn+anti*), 1,46 (s, 9H) (*syn+anti*), 1.15 (d, *J* =7.2Hz, 3H), 1.14 (d, *J* =7.1Hz, 3H) (*syn+anti*), 0.93 (t, *J* =6.9Hz, 3H) (*syn+anti*).

^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz, δ ppm): (μίγμα *syn* και *anti* διαστερεομερών) 208.2 (*anti*), 208.0 (*syn*), 166.5 (*syn*), 166.4 (*anti*), 82.2 (*anti*), 82.1(*syn*), 73.4 (*anti*), 70.6 (*syn*), 51.8 (*anti*), 50.7 (*syn*), 50.6 (*anti*), 49.6 (*syn*), 36.7 (*anti*), 36.0 (*syn*), 28.3 (*syn*), 27.9 (*anti*), 19.2 (*syn*), 18.6 (*anti*), 13.9 (*anti*), 13.6 (*syn*), 9.4 (*syn* και *anti*).

4-Μεθυλο-3,5-διοξοοκτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας (70)

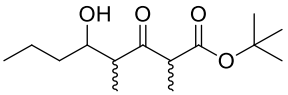


Σε σφαιρική φιάλη με μαγνητικό αναδευτήρα διαλύθηκε ο ρακεμικός υδρόξυ εστέρας **19** (0.4 mmol, 100 mg) σε 2.5 mL ακετόνης και το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 ^{o}C. Έπειτα προστέθηκε στάγδην διάλυμα αντιδραστηρίου Jones (147 μL) σε 1 mL ακετόνης, και αναδεύτηκε μέχρι το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος με TLC). Αραίωση του μίγματος της αντίδρασης με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=8 στο διπλάσιο, εκχύλιση με EtOAc (2x15 mL) ξήρανση με $MgSO_4$ και συμπύκνωση απέδωσε το επιθυμητό προϊόν. Απόδοση 84 %.

^{1}H NMR ($CDCl_3$ 300 MHz, δ ppm): 3.85 (q, J = 6.9 Hz, 1H), 3.37 (s, 2H), 2.40 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.57-1.67 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.33 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.97 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz, δ ppm): 207.0, 194.5, 166.1, 81.8, 60.2, 49.0, 43.3, 27.9, 16.8, 13.5, 12.5.

5-Υδροξυ-2,4-διμεθυλο-3-οξοοκτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας (75)

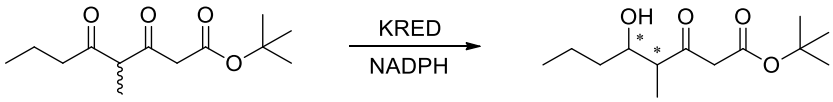


Σε ατμόσφαιρα αζώτου και διαλύτη ξηρό THF (3 mL) στους 0 ^{o}C, προστέθηκε NaH (0.6 mmol, 14 mg) και ακολούθησε ανάδευση για 15 λεπτά. Στην συνέχεια προστέθηκε ο υδροξυ κετοεστέρας **71** (0,3 mmol, 70 mg) σε THF (2 mL) και ανάμειξη στους 0 ^{o}C. Τέλος προστέθηκε MeI (0,3 mmol, 18 μl) αφέθηκε για ανάδευση στην θερμοκρασία αυτή για μισή ώρα και μετά σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι το τέλος της αντίδρασης που διαπιστώθηκε με TLC. Ακολούθησε προσθήκη νερού στο διπλάσιο και εκχύλιση με EtOAc (3 x 10 mL). Έγινε ξήρανση με $MgSO_4$, συμπύκνωση του διαλύτη στον ρότορα και καθαρισμός του προϊόντος με flash χρωματογραφία κολώνας (Petr. Ether/EtOAc=15/1 v/v). Απόδοση 44%.

^{1}H NMR ($CDCl_3$ 500 MHz, δ ppm): (μίγμα τεσσάρων διαστερεομερών) 3.94-3.97 (m, 1H), 3.85-3.88 (m, 1H), 3.57-3.65 (m, 1H), 2.81-2.88 (m, 1H), 2.75-2.80 (m, 1H), 1.45-1.54 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.32-1.38 (m, 2H), 1.27 (d, J = 7.1Hz, 3H), 1.25 (d, J =7.1Hz, 3H), 1.12 (t, J =7Hz, 3H), 0.91 (t, J =7.1Hz, 3H).

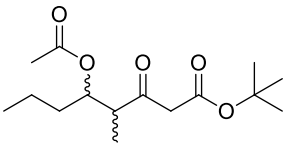
^{13}C NMR ($CDCl_3$ 125 MHz, δ ppm): (μίγμα τεσσάρων διαστερεομερών) 211.71, 211.43, 211.31, 210.92, 169.53, 169.44, 169.35, 169.17, 82.07, 82.02, 81.87, 81.74, 73.95, 73.18, 71.14, 70.54, 54.52, 53.20, 53.03, 52.33, 51.19, 50.88, 49.84, 49.66, 36.88, 36.70, 36.17, 36.00, 27.86, 19.22, 19.18, 18.69, 18.54, 14.27, 13.97, 13.94, 13.91, 12.80, 12.68, 12.62, 12.49, 10.03, 9.72.

Ενζυμική αναγωγή του υποστρώματος 70



Σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (1 mL, 200 mM, pH =6,9) προστέθηκε ο δικετο εστέρας **19** (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 ανακινήθηκε στους 37 ^{o}C για 24 ώρες. Στην συνέχεια η αντίδραση εκχυλίστηκε με EtOAc, συμπυκνώθηκε και το προϊόν ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR.

5-Ακετοξυ-4-μεθυλο-3οξοοκτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας (76)



Σε σφαιρική φιάλη με μαγνητικό αναδευτήρα, υπό ατμόσφαιρα αργού, διαλύθηκε ο υδροξυ κετοεστέρας **71** (0.246 mmol, 60 mg), σε ξηρό EtOAc (1.5 mL) στους 0 ^{o}C και κατόπιν προστέθηκε προξηραμένο K_2CO_3 (0.984 mmol, 136 mg) και καταλυτική ποσότητα DMAP. Τέλος έγινε προσθήκη οξικού ανυδρίτη (0.492 mmol, 46 mg) και το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση στους 0 ^{o}C μέχρι το πέρας της αντίδρασης. Μετά από εκχύλιση με κορεσμένο υδατικό διάλυμα $NaHCO_3$ (2 mL) μετά με κορεσμένο διάλυμα NaCl (2 mL) και συμπύκνωση, απομονώθηκε το επιθυμητό προϊόν. Η επιβεβαίωση της δομής έγινε με φασματοσκοπία ^{1}H και ^{13}C NMR. Απόδοση 90%.

^{1}H NMR ($CDCl_3$ 300 MHz, δ ppm): (μίγμα *syn* και *anti* διαστερεομερών, *syn/anti*=43/57) 5.17-5.21 (m, 1H) (*syn*), 5.07-5.13 (m, 1H) (*anti*), 3.49 (s, 2H), 3.43 (s, 2H) (*syn*+*anti*), 2.91-2.99 (m, 1H) (*syn*+*anti*), 2.04 (s, 3H), 2.05 (s, 3H) (*syn*+*anti*), 1.49-1.52 (m, 2H) (*syn*+*anti*), 1.46 (s, 9H) (*syn*+*anti*), 1.29-1.38 (m, 2H) (*syn*+*anti*), 1.11 (d, *J* =7.1Hz, 3H) (*syn*+*anti*), 0.91 (t, *J* =7.1Hz, 3H) (*syn*), 0.90 (t, *J* =7.2Hz, 3H) (*anti*).

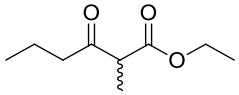
^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz, δ ppm): 204.3 (*anti*), 204.1 (*syn*), 170.5 (*syn*), 170.3 (*anti*), 166.4 (*syn*), 166.2 (*anti*), 81.9 (*syn*), 81.8 (*anti*), 74.1 (*anti*), 73.3 (*syn*), 49.9 (*syn*), 49.8 (*anti*), 49.7 (*anti*), 49.5 (*syn*), 33.8 (*syn*), 32.9 (*anti*), 28.3 (*syn*), 27.9 (*anti*), 21.0 (*anti*), 20.9 (*syn*), 18.9 (*syn*), 18.2 (*anti*), 13.9 (*anti*), 13.7 (*syn*), 11.8 (*anti*), 10.9 (*syn*).

Εστεροποίηση των υδροξυ εστέρων από ενζυμική αντίδραση

Στο απομονωμένο προϊόν της ενζυμικής αναγωγής του υδροξυ εστέρα (25 mM) διαλυμένο σε ξηρό EtOAc (2 mL) στους 0 ^{o}C, προστίθεται προξηραμένο K_2CO_3 (80 μmol, 11 mg), καταλυτική ποσότητα DMAP και οξικός ανυδρίτης (40 μmol, 4 μL). Μετά από έλεγχο με TLC που δείχνει την ολοκλήρωση της αντίδρασης και το μίγμα εκχυλίζεται μία φορά με κορεσμένο υδατικό διάλυμα $NaHCO_3$ (2 mL) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (2 mL). Η οργανική φάση λαμβάνεται με EtOAc. Με αεριοχρωματογραφική ανάλυση και μελετάται η στερεοεκλεκτικότητα του προϊόντος.

2^{η} Συνθετική πορεία

2-Μεθυλο-3-οξοεξανοϊκός αιθυλεστέρας (78)

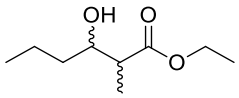


Υπό ατμόσφαιρα αζώτου ο 3-οξοεξανοϊκός αιθυλεστέρας (15.8 mmol, 2.5 g) διαλύθηκε σε άνυδρη ακετόνη (20 mL) και στο διάλυμα προστέθηκε K_2CO_3 (14.74 mmol, 2,04 g). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και στη συνεχεία προστέθηκε, σε διάρκεια 2 λεπτών το MeI (19.39 mmol, 1.20 mL) και το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού για 20 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης προστέθηκε διαίθυλο αιθέρας (40 mL), ακολούθησε διήθηση υπό κενό και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε. Απομονώθηκε ο 2-μεθυλο-3-οξοεξανοϊκός αιθυλεστέρας **78** και χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 95%.

^{1}H NMR ($CDCl_3$ 300 MHz, δ ppm): 4.18 (q, J =7.2 Hz, 2H), 3.50 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 2.41-2.61 (m, 2H), 1.56-1.68 (m, 2H),

^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz, δ ppm): 205.9,170.6, 61.3, 52.9, 43.2, 17.0, 14.1, 13.6, 12.7.

3-Υδροξυ-2-μεθυλοεξανοϊκός αιθυλεστέρας (77)

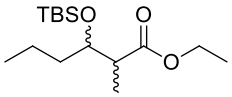


Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει μεθανόλη (15 mL) προστέθηκε $NaBH_4$ (11.61 mmol, 2.0 g) και το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 ^{o}C. Στην θερμοκρασία αυτή και σε διάρκεια 5 λεπτών προστέθηκε στάγδην ο 2-μεθυλο-3-οξοεξανοϊκός αιθυλεστέρας **78** (2.1 mmol, 303 mg) διαλυμένος σε μεθανόλη (5 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 0,5 ώρα στους 0

^{o}C. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκε, στην ίδια θερμοκρασία, κορεσμένο διάλυμα NH_4Cl (1 mL) και το διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό. Κατόπιν προστέθηκαν 20 mL νερό και το μίγμα εκχυλίστηκε με EtOAc (2x20 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με $MgSO_4$ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με flash χρωματογραφία στήλης (Petr.Ether/EtOAc=15/1 v/v). Απόδοση 64%.

^{1}H NMR ($CDCl_3$ 300MHz, δ ppm): (μίγμα *syn* και *anti* διαστερεομερών, *syn/anti*=37/63) 4.09 (q, *J* =7.2 Hz, 2H) (*syn*+*anti*), 3.81-3.82(m, 1H) (*syn*), 3.60 (m, 1H) (*anti*), 2.79-2.84 (m, 1-OH) (*syn*+*anti*), 2.39-2.48 (m, 1H) (*syn*+*anti*), 1.27-1.48 (m, 4H) (*syn*+*anti*), 1.20 (t, *J* =7.1 Hz, 3H) (*syn*+*anti*), 1.13 (d, *J* =5.5 Hz,3H) (*anti*), 1.10 (d, *J* =5.5 Hz, 3H) (*syn*), 0.86 (t, *J* =6.8 Hz, 3H) (*syn*+*anti*).
^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75MHz, δ ppm): (μίγμα *syn* και *anti* διαστερεομερών) 176.2 (*syn*), 176.1 (*anti*), 73.0 (*anti*), 71.4 (*syn*), 60.5 (*syn*), 60.5 (*anti*), 45.2 (*anti*), 44.2 (*syn*), 36.8 (*anti*), 35.9 (*syn*), 19.1 (*syn*), 18.7 (*anti*), 14.2 (*syn*), 14.1 (*anti*), 13.9 (*syn* και *anti*), 10.6 (*syn* και *anti*).

3-((*tert*-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο)οξυ)-2-μεθυλοεξανοϊκός αιθυλεστέρας (82)



Σε διάλυμα της ένωσης **27** (2.87 mmol, 500mg) σε ξηρό DMF (5 mL) προστέθηκαν ιμιδαζόλιο (817 mg, 12 mmol) και TBSCl (904 mg, 6 mmol). Το διάλυμα αναδεύτηκε επί 15 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκε παγωμένο νερό και εκχυλίστηκε με Et_2O (4x 20 mL). Η οργανική φάση ξεπλύθηκε με νερό και κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηράνθηκε σε $MgSO_4$ και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Hexane/EtOAc=20/1 v/v). Απόδοση 85%.

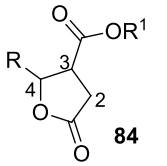
^{1}H NMR ($CDCl_3$ 300MHz, δ ppm): (μίγμα *syn* και *anti* διαστερεομερών, *syn/anti*=35/65) 4.11 (q, *J*=7.1Hz, 3H) (*syn*+*anti*), 3.95-4.02 (m, 1H) (*syn*+*anti*), 2.56-2.66 (m,1H), 2.47-253 (m,1H) (*syn*+*anti*), 1.40-1.48 (m, 2H) (*syn*+*anti*), 1.33-1.38 (m, 2H) (*syn*+*anti*), 1.25 (t, *J*=7.1Hz, 3H) (*syn*+*anti*), 1.11 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 1.07 (d, *J*=7.0Hz, 3H) (*syn*+*anti*), 0.90 (t, *J*=7.2Hz, 3H) (*syn*+*anti*), 0.86 (s, 9H) (*syn*+*anti*), 0.05 (s), 0.04 (s), 0.03 (s), 0.01 (s).

^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75MHz, δ ppm): (μίγμα *syn* και *anti* διαστερεομερών) 175.2 (*syn*), 175.0 (*anti*), 73.1 (*anti*), 73.1 (*syn*), 60.2 (*syn*), 60.1 (*anti*), 45.4 (*anti*), 44.5 (*syn*), 37.4 (*syn*), 35.3 (*anti*), 25.8 (*syn*), 25.8 (*anti*), 18.3 (*anti*), 18.0 (*syn*), 18.0 (*syn*), 17.6 (*anti*), 14.3 (*syn*), 14.2 (*anti*), 11.7 (*anti*), 11.2 (*syn*), -4.3 (*syn*), -4.5 (*anti*), -4.8 (*syn*), -4.9 (*anti*).

Κεφάλαιο 3

3,4-Διυποκατεστημένες γ-βουτυρολακτόνες

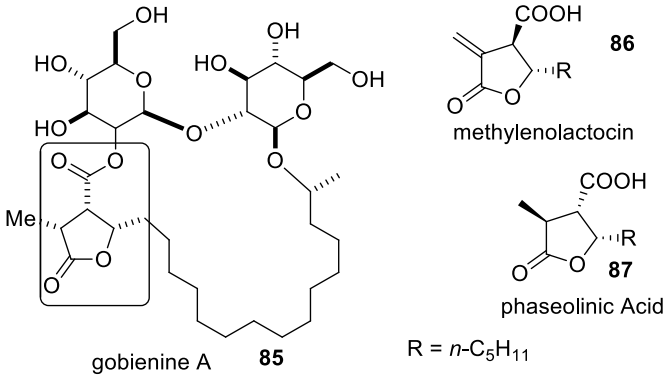
Οι 3,4-διυποκατεστημένες γ-βουτυρολακτόνες, γνωστές και ως παράγωγα του παρακονικού οξέος, είναι ενώσεις που αποτελούνται από ένα λακτονικό δακτύλιο με χαρακτηριστική την παρουσία μιας καρβοξυλικής ομάδας στην 3-θέση. Υποκατεστημένες γ-βουτυρολακτονες είναι μια ομάδα μεταβολιτών που παράγονται από μύκητες, λειχήνες και βρύα.[37]



R : alkyl group
R^1 : H, alkyl group

Σχήμα 32: Υποκατεστημένες γ-βουτυρολακτόνες.

Στην φύση, τα παράγωγα παρακονικού οξέος, απαντούν υποκατεστημένα και στην 2-θέση με μέθυλο ή μεθυλένο ομάδα. Τέτοιες ενώσεις είναι κοινές δομικές μονάδες πολλών βιολογικά ενεργών ενώσεων φυσικής ή μη φυσικής προέλευσης (Σχήμα 33). Ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα είναι το φυσικό προϊόν gobienine A, ένα γλυκολιπίδιο που απομονώθηκε από την λειχήνα *Acarospora gobiensis*[38], καθώς και τα παράγωγα παρακονικών οξέων, methylenolactocin και phaseolinic acid, που παρουσιάζουν αντικαρκινική, αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δραστικότητα.[39]



Σχήμα 33: Φυσικά προϊόντα που περιέχουν διυποκατεστημένες γ-βουτυρολακτόνες.

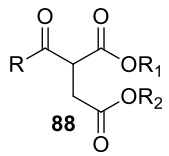
Η σύνθεση οπτικά ενεργών υποκατεστημένων γ-βουτυρολακτονών όπως αυτές που προαναφέρθηκαν, έχει πραγματοποιηθεί με πολλές διαφορετικές μεθόδους. Σε αυτές περιλαμβάνονται: ασύμμετρη υδρογόνωση ακυλοσουκινικών εστέρων με καταλύτες Ru[40], προσθήκη ριζών καρβινολικού άνθρακα, που προκύπτουν παρουσία

δι-*tert*-βούτυλο-υπεροξειδίου και ακτινοβολίας σε ολεφίνες,[41] και προσθήκη οξικού οξέος σε 1,2-διυποκατεστημένα αλκένια, χρησιμοποιώντας καταλύτες Mn(III).[42] Εναλλακτικές χημειοενζυμικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση τέτοιων ενώσεων είναι οι εξής: ενζυμική υδρόλυση των *γ*-βενζυλο παρακονικών αιθυλεστέρων με λιπάσες[43], σύνθεση των *γ*-φαινυλο παρακονικών αιθυλεστέρων και *γ*-(n-πυριδιλο) παρακονικών αιθυλεστέρων με υδρόλυση καταλυόμενη από λιπάση καθώς και πραγματοποιώντας αναγωγή του αντίστοιχου κετο διεστέρα με την χρήση αρκετών διαφορετικών yeasts σαν ολόκληρα κύτταρα.[44] Η εφαρμογή απομονωμένων κετοredουκτασών στην σύνθεση υποκατεστημένων *γ*-βουτυρολακτονών δεν έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία μέχρι στιγμής, παρόλο που εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι των ολόκληρων κυττάρων. Τα ολόκληρα κύτταρα λόγω της παρουσίας επιπλέον ενζύμων με διαφορετική εκλεκτικότητα, έχουν σαν αποτέλεσμα να μειώνουν την εναντιοεκλεκτικότητα των παραγόμενων προϊόντων.

Ανάλυση-συζήτηση αποτελεσμάτων

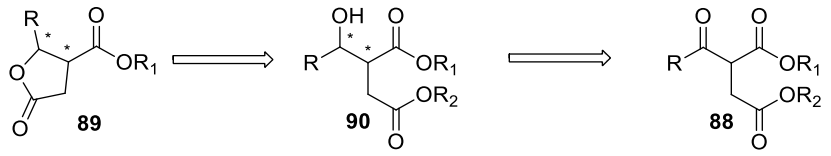
Οι 3,4-διυποκατεστημένες *γ*-βουτυρολακτόνες, αποτελούν εξαιρετικά σημαντικές ενώσεις, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, καθώς είναι πρόδρομες ενώσεις φυσικών προϊόντων με βιολογική δραστικότητα. Έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες σύνθεσης οπτικά καθαρών υποκατεστημένων *γ*-βουτυρολακτονών, ανάμεσα στις οποίες και χημειοενζυμικές, κυρίως με την χρήση κάποιας λιπάσης καθώς και διαφορετικών yeasts.

Αντικείμενο της συγκεκριμένης εργασίας είναι η μελέτη της στερεοεκλεκτικής αναγωγής κετο διεστέρων ***(88)*** *με την χρήση διαφορετικών απομονωμένων κετοredουκτασών για την σύνθεση οπτικά καθαρών εστέρων του παρακονικού οξέος*. Τα υποστρώματα που μελετήθηκαν σε αυτού του τύπου την αντίδραση, φαίνονται στο Σχήμα 34.



Σχήμα 34: Υπόστρωμα για την στερεοεκλεκτική σύνθεση λακτονών.

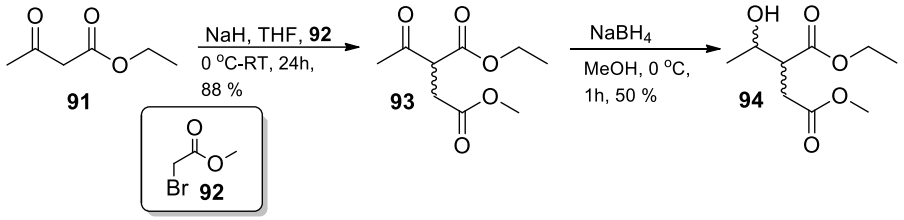
Με την ενζυμική αναγωγή τέτοιων υποστρωμάτων μπορούν να προκύψουν οι αντίστοιχοι υδρόξυ διεστέρες, οι οποίοι με μια αντίδραση λακτονοποίησης θα μετατραπούν στο προβλεπόμενο επιθυμητό προϊόν **89**.



Σχήμα 35: Συνθετική πορεία στερεοεκλεκτικής σύνθεσης υποκατεστημένων γ-βουτυρολακτονών **89**.

Συνεπώς, με την κατάλληλη ενζυμική αναγωγή και την επακόλουθη λακτονοποίηση του υδρόξυ διεστέρα που σχηματίζεται, θα μπορούσαν να συντεθούν διυποκατεστημένες *γ*-βουτυρολακτόνες, οι οποίες θα είναι οπτικά ενεργές. *Στόχος λοιπόν* ήταν η μελέτη της εναντιο και διαστερεοεκλεκτικότητας της ενζυμικά καταλυόμενης αναγωγής του υποστρώματος **88**, που αποτελεί ενδιάμεσο για την σύνθεση των διυποκατεστημένων *γ*-βουτυρολακτονών.

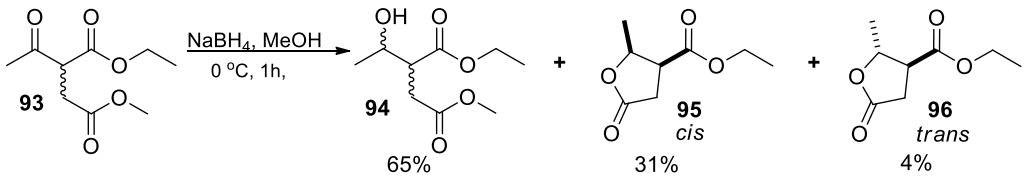
Αρχικά πραγματοποιήθηκε σύνθεση του ρακεμικού μίγματος του υδρόξυ διεστέρα, σαν μίγμα των τεσσάρων πιθανών στερεοϊσομερών, ώστε να χρησιμοποιηθούν σαν πρότυπο για σύγκριση με τα προϊόντα της ενζυμικής αναγωγής. Έτσι, ο πρώτος κέτο διεστέρας που συντέθηκε, ο **93**, για να γίνει η αναγωγή του προς τον σχηματισμό ρακεμικού μίγματος υδρόξυ διεστέρα, προέκυψε από τον 3-οξοβουτανοϊκό αιθυλεστέρα **91**.



Σχήμα 36: Σύνθεση ρακεμικού μίγματος του υδρόξυ διεστέρα **94**.

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 36, πρώτο βήμα ήταν η αλκυλίωση σε α-θέση του κετο εστέρα **91** με τον βρωμοοξικό μεθυλεστέρα **92** και στην συνέχεια έγινε αναγωγή του καρβονυλίου με $NaBH_4$, αποδίδοντας την ένωση **94** σε 50% απόδοση. Κατά την απομόνωση του υδρόξυ διεστέρα **94**, παρατηρήθηκε ότι σχηματίστηκαν και δύο επιπλέον προϊόντα. Έπειτα από διαχωρισμό με flash χρωματογραφία στήλης διαπιστώθηκε ότι πραγματοποιήθηκε αυθόρμητος σχηματισμός των επιθυμητών

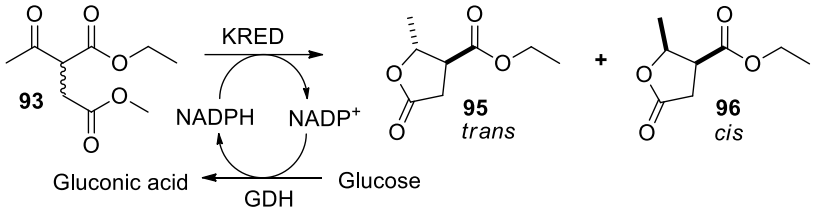
βουτυρολακτονών στις συνθήκες της αντίδρασης. Τα προϊόντα που προέκυψαν φαίνονται στο παρακάτω Σχήμα 37.



Σχήμα 37: Αντίδραση αναγωγής κετοδιεστέρα **93** με $NaBH_4$ οδηγεί στην αυθόρμητη κυκλοποίηση του προϊόντος **94**.

Η αναλογία των ισομερών *γ*-λακτόνης που σχηματίστηκαν, ως προς τον αρχικά αναμενόμενο υδρόξυ διεστέρα **94** ήταν 35:65% με βάση το αρχικό φάσμα ^{1}H NMR. Οι δύο ισομερείς *γ*-βουτυρολακτόνες, *cis* και *trans* ταυτοποιήθηκαν έπειτα από τον διαχωρισμό τους με flash χρωματογραφία στήλης, με σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα.[36] Η αναλογία τους έδειξε ότι, ευνοείται περισσότερο ο σχηματισμός των *cis* στερεοϊσομερών της βουτυρολακτόνης **95**. Το ρακεμικό μίγμα του υδροξυ διεστέρα **94** που προέκυψε, κατεργάστηκε με προσθήκη καταλυτικής ποσότητας *p*-τολουολοσουλφονικού οξέος (*p*-TsOH) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο, και έτσι ολοκληρώθηκε ο σχηματισμός των λακτονών σε διάστημα 24 ωρών με αναλογία *cis*:*trans*= 75:25.

Όταν πραγματοποιήθηκε η ενζυμική αναγωγή του ίδιου υποστρώματος (Σχήμα 38), σύμφωνα με την μεθοδολογία που αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, παρατηρήθηκε ο αποκλειστικός σχηματισμός των επιθυμητών *γ*-βουτυρολακτονών **95** και **96** σε χρονικό διάστημα 24 ωρών.



Σχήμα 38: Ενζυμική αναγωγή του κετο διεστέρα **93**.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH=6.9, 0.2 M) το οποίο φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην ολοκλήρωση της αντίδρασης κυκλοποίησης του ενδιάμεσου υδρόξυ διεστέρα, αφού στην αντίδραση αναγωγής με $NaBH_4$ του ίδιου υποστρώματος, δεν γίνεται αποκλειστικός σχηματισμός των λακτονών, αλλά παράγεται κυρίως ο υδρόξυ διεστέρας **94**. Η επιλογή των αναγωγικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε

υπόστρωμα βασίστηκε στην μελέτη αναγωγής ανάλογων υποστρωμάτων που έχει πραγματοποιηθεί από την ερευνητική μας ομάδα.[45] Στον Πίνακα 4 παρατίθενται τα αποτελέσματα όλων των ενζυμικών αναγωγών με το συγκεκριμένο υπόστρωμα.

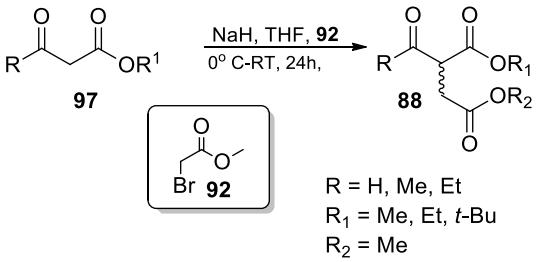
Πίνακας 4: Αποτελέσματα ενζυμικής αναγωγής του κετοδιεστέρα **93** με κετοredουκτάσες.

	KRED	Ποσοστό μετατροπής %	Αναλογία διαστερεομερών %			
			A	B	C	D
1	102	>99	21	61	18	-
2	104	<10	-	-	-	-
3	107	37	16	40	15	29
4	108	>99	2	3	18	**77**
5	116	>99	3	10	26	61
6	119	>99	1	4	43	52
7	127	41	4	18	18	60
8	A1C	>99	2	8	30	60
9	A1D	>98	4	6	40	50
10	B1F	11	-	-	>99	-

Οι ενώσεις A και B είναι διαστερεομερείς των ενώσεων C και D. Οι A και B, αποτελούν εναντιομερείς *trans* *γ*-βουτυρολακτόνες, ενώ οι C και D είναι εναντιομερείς *cis*-γ-βουτυρολακτόνες, όπως συμπεραίνεται συγκρίνοντας τα φάσματα ^{1}H και ^{13}C NMR των ενώσεων που έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία.[36] Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι το ένζυμο που εμφανίζει εξαιρετική δραστικότητα, αλλά και την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα από αυτά που δοκιμάστηκαν, είναι η KRED-108, καθώς ευνοείται σημαντικά ο σχηματισμός του στερεοϊσομερούς D με ικανοποιητική εναντιοεκλεκτικότητα 67% *ee*. Τα ένζυμα KRED-116 και KRED-A1C εμφανίζουν πολύ υψηλή δραστικότητα (ποσοστό μετατροπής >99%) και σχηματίζονται κυρίως τα προϊόντα C και D με αναλογία C/D περίπου 30/60 και στις δυο περιπτώσεις. Το ένζυμο KRED-102 (περίπτωση 1) είναι το μοναδικό που οδηγεί στον εκλεκτικό σχηματισμό των *trans* ισομερών της *γ*-βουτυρολακτόνης. Στην περίπτωση των KRED-119 και KRED-A1D παρατηρείται πλήρης μετατροπή του

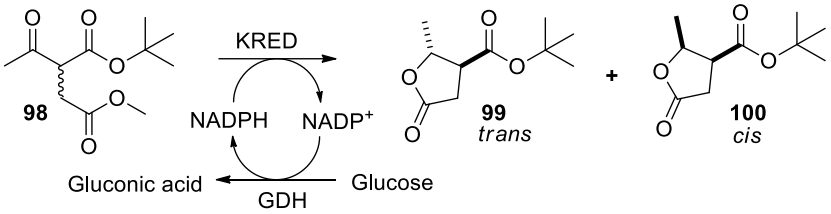
υποστρώματος, με εκλεκτικό σχηματισμό των *cis* προϊόντων, αλλά η εναντιοεκλεκτικότητα δεν ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητική. Τέλος οι KRED-104 και B1F (περιπτώσεις 2, 10) έχουν μικρή δραστικότητα ως προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα, ενώ οι KRED-107 και 127 εμφανίζουν μικρό ποσοστό μετατροπής και μειωμένη εναντιοεκλεκτικότητα. Σε κάθε περίπτωση είναι δυνατός ο διαχωρισμός των διαστερεομερών με flash χρωματογραφία στήλης.

Με βάση την μέθοδο αυτή, ακολούθησε σύνθεση δομικά τροποποιημένων *γ*-βουτυρολακτονών (Σχήμα 39) με αλλαγή των ομάδων του εστέρα R_1 και της αλκυλομάδας της κετόνης R, για να μελετηθεί αν βελτιώνεται η δραστικότητα και εκλεκτικότητα του ενζύμου με μικρές τροποποιήσεις των υποστρωμάτων.



Σχήμα 39: Σύνθεση των κετοδιεστέρων **88**.

Έτσι, ο 1-*tert*-βουτυλο 4-μέθυλο 2-ακετυλοσουκκινικός εστέρας **98** ήταν το δεύτερο υπόστρωμα που συντέθηκε για αυτό τον λόγο, ακολουθώντας την μέθοδο του Σχήματος 39, και τα αποτελέσματα των ενζυμικών αναγωγών του υποστρώματος φαίνονται στον Πίνακα 5.



Σχήμα 40: Ενζυμική αναγωγή του κέτο διεστέρα **98**.

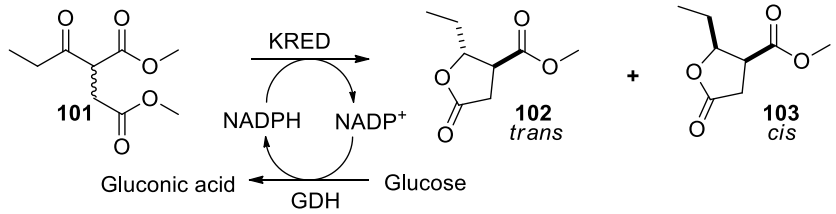
Πίνακας 5: Αποτελέσματα ενζυμικής αναγωγής με κετοredουκτάσες του κέτο διεστέρα **98**.

	KRED	Ποσοστό μετατροπής %	Αναλογία διαστερομερών %			
			A	B	C	D
1	101	>99	-	23	**77**	-
2	102	>99	14	24	23	39
3	104	<10	-	-	-	-

4	107	<10	-	-	-	-
5	108	>99	-	4	13	**83**
6	112	>99	6	31	6	57
7	118	>99	-	2	24	**74**
8	119	>99	-	4	35	61
9	A1C	74	2	6	20	**72**
10	A1D	92	2	8	21	69

Παρατηρώντας τον παραπάνω πίνακα, συμπεραίνεται ότι οι KRED-108, 118, 119 και A1C παρουσιάζουν εξαιρετική δραστικότητα, (ποσοστό μετατροπής >99%) και διαστερεοεκλεκτικότητα (98% *ee*), δηλαδή δίνουν κατά κύριο λόγο τα προϊόντα C και D τα οποία είναι τα *cis* στερεοϊσομερή και σε αυτή την περίπτωση όπως διαπιστώθηκε ξανά από βιβλιογραφικά δεδομένα.[36] Η υψηλότερη στερεοεκλεκτικότητα λαμβάνεται με την KRED-108, διαστερεοεκλεκτικότητα *cis*/*anti*, 96/4 και σχετικά καλή εναντιοεκλεκτικότητα (74% *ee*) ως προς το D στερεοϊσομερές. Το ένζυμο KRED-101 μετέτρεψε πλήρως το υπόστρωμα, σε προϊόν με διαστερεοεκλεκτική αναλογία των C/D 77/23, δηλαδή σχηματίστηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό η *cis* *γ*-βουτυρολακτόνη. Σε αντίθεση με την KRED-108, αυτή την φορά σχηματίστηκε το C στερεοϊσομερές σε μεγαλύτερο ποσοστό (77%), και η αναλογία B/C, 23/77 που δείχνει την μεγάλη εκλεκτικότητα του ενζύμου. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι δυνατός ο διαχωρισμός των δύο παραγόμενων προϊόντων *cis* και *trans* λακτονών. Ακόμη, με την KRED-A1D, διαπιστώνεται πολύ ικανοποιητικό ποσοστό μετατροπής (92%), καλή διαστερεοεκλεκτικότητα και μέτρια εναντιοεκλεκτικότητα. Στις περιπτώσεις 6 και 2, η δραστικότητα είναι πολύ καλή, όμως η διαστερεοεκλεκτικότητα και η εναντιοεκλεκτικότητα δεν είναι πολύ ικανοποιητικές οπότε λαμβάνεται μίγμα και των τεσσάρων στερεοϊσομερών προϊόντων. Τέλος, οι KRED-104 και 107 δεν εμφάνισαν δραστικότητα με το συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Στην συνέχεια μελετήθηκε η ενζυμική αναγωγή με κετορεδουκτάσες του τροποποιημένου κέτο διεστέρα **101**, (Σχήμα 41). Η σύνθεση του υποστρώματος **101** έγινε σύμφωνα με την πορεία του Σχήματος 39. Τα αποτελέσματα της ενζυμικής αναγωγής παρατίθενται στον παρακάτω Πίνακα 6.



Σχήμα 41: Ενζυμική αναγωγή του κέτο διεστέρα **101**.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα της ενζυμικής αναγωγής με κετοredουκτάσες του κέτο διεστέρα **101**.

	KRED	Ποσοστό μετατροπής %	Αναλογία διαστερεομερών %			
			A	B	C	D
1	101	>99	30	66	-	4
2	107	<10	-	-	-	-
3	111	>99	14	23	24	39
4	112	>99	28	68	-	4
5	114	76	15	45	7	33
6	118	>99	-	-	16	**84**
7	119	>99	-	-	24	**76**
8	128	86	-	-	25	75
9	A1C	26	-	-	17	83
10	A1D	<10	-	-	-	-

Από τα αποτελέσματα στον Πίνακα 6, φαίνεται ότι οι KRED-118, 119, 128 εμφανίζουν πολύ υψηλή δραστικότητα και με αυτό το υπόστρωμα και αποδίδουν διαστερεοεκλεκτικά τις *cis* βουτυρολακτόνες C και D. Η εναντιοεκλεκτικότητα είναι σχετικά καλή και στις τρεις περιπτώσεις με την μεγαλύτερη να παρουσιάζεται στην περίπτωση 6, με την KRED-118, (B στερεοϊσομερές 68% *ee*). Αντίθετα οι KRED-101, 112 (περιπτώσεις 1 και 4) απέδωσαν κυρίως τα *trans* διαστερεομερή, με υψηλό ποσοστό μετατροπής (>99%) και μέτρια εναντιομερική περίσσεια. Τα ένζυμα KRED-111, 114 αντιδρούν σε μεγάλο ποσοστό, αλλά οδηγούν σε μίγμα τεσσάρων προϊόντων, ενώ η KRED-A1C (περίπτωση 9) έχει χαμηλή δραστικότητα αλλά καλή διαστερεοεκλεκτικότητα. Τέλος οι KRED-A1D και 107 (περιπτώσεις 2, 10) δεν εμφάνισαν ικανοποιητική δραστικότητα με το συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Συμπερασματικά η ενζυμική αναγωγή κέτο διεστέρων του τύπου **88**, αποτελεί εξαιρετική μέθοδο για την σύνθεση υποκατεστημένων *γ*-βουτυρολακτονών. Σε δύο μόνο συνθετικά στάδια, μια αντίδραση αλκυλίωσης κέτο εστέρα σε α-θέση ακολουθούμενη από ενζυμική αναγωγή του κέτο διεστέρα που προκύπτει, πραγματοποιείται στερεοεκλεκτικός σχηματισμός *γ*-βουτυρολακτονών. Αξιοσημείωτο είναι ότι κατά την διάρκεια της ενζυμικής αναγωγής δεν απομονώνεται ο υδροξυ διεστέρας, αλλά υφίσταται μέσα στις συνθήκες της αντίδρασης αυθόρμητη κυκλοποίηση, αποδίδοντας το επιθυμητό προϊόν.

Η μελέτη των ενζυμικών αναγωγών που πραγματοποιήθηκε με τα τρία διαφορετικά υποστρώματα κέτο διεστέρων, δείχνει ότι οι κετοredουκτάσες ανάγουν διαστερεοεκλεκτικά αυτά τα υποστρώματα σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, και εναντιοεκλεκτικά σε μερικές από αυτές. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα ένζυμα αυτά είναι κατάλληλα και ιδανικά για την παρασκευή τέτοιων λακτονών. Ωστόσο χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για την εύρεση νέων ή τροποποιημένων κετοredουκτασών που θα οδηγήσουν σε προϊόντα με μεγαλύτερη οπτική καθαρότητα. Επίσης απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών της ενζυμικής αντίδρασης καθώς και περαιτέρω τροποποίηση των υποστρωμάτων με μεγαλύτερες πλευρικές αλκυλομάδες για την σύνθεση πολύπλοκων ενώσεων.

Πειραματικό μέρος

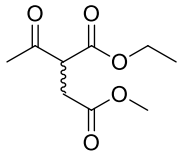
Γενικές μέθοδοι

Όλα τα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Οι κέτο εστέρες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των κέτο διεστέρων είναι εμπορικά διαθέσιμοι. Η ξήρανση των διαλυτών καθώς και η παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων έγινε όπως έχει αναφερθεί ήδη στο Κεφάλαιο 2. Για τα φάσματα ^{1}H και ^{13}C NMR χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο Bruker MSL-300 σε διαλύτη $CDCl_3$. Οι εκλεκτικότητες των ενζυμικών αντιδράσεων προσδιορίστηκαν με αέριο χρωματογράφο της εταιρίας Shimadzu GC 2014 με ανιχνευτή FID και χειρόμορφη κολώνα (20% permethylated β-cyclodextrine) 30m x 0.25mm x 0.25 μm.

Σύνθεση των κέτο διεστέρων 93, 98, 101

Υπό ατμόσφαιρα αργού διαλύθηκε NaH (60% w/w dispersion in mineral oil, 2.42 mmol) σε άνυδρο THF (3 mL) και το μίγμα ψύχθηκε στους 0 ^{o}C. Το διάλυμα του β-κέτο εστέρα (2.30 mmol) σε THF (1 mL) προστέθηκε στάγδην μέσα σε διάστημα 20 λεπτών και έμεινε υπό ανάδευση για 15 επιπλέον λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια ο 2-βρωμοοξικός μεθυλεστέρας **92** (1.15 mmol) διαλυμένος σε THF (1 mL) προστέθηκε στάγδην για 15 λεπτά και έμεινε υπό ανάδευση για 24 ώρες. Ακολούθησε ψύξη του μίγματος της αντίδρασης, προσθήκη νερού και εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα. Έγινε ξήρανση της οργανικής φάσης με $MgSO_4$ και συμπύκνωση στον ρότορα. Το καθαρό προϊόν απομονώθηκε με flash χρωματογραφία (Petr.ether/EtOAc=7/1 v/v). Απόδοση 85-95 %.

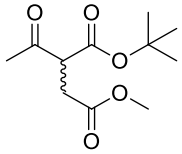
1-Αιθυλο-4-μεθυλο 2-ακετυλοσουκκινικός εστέρας (93)



^{1}H NMR ($CDCl_3$ 300 MHz, δ ppm): 4.21 (q, J =7.2 Hz, 2H), 3.98 (dd, J_1 = 6.36 Hz, J_2 = 8.13 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.98 (J_1 = 8.2 Hz, J_2 = 17.6 Hz, 1H), 2.83 (J_1 = 6.4 Hz, J_2 = 17.6 Hz, 1H), 2.36 (s, 3H), 1.28 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz, δ ppm): 201.7, 171.8, 168.3, 61.8, 54.6, 52.0, 32.0, 30.0, 14.0.

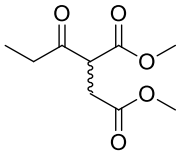
1-*tert*-Βουτυλο-4-μέθυλο 2-ακετυλοσουκκινικός εστέρας (98)



^{1}H NMR ($CDCl_3$ 300 MHz, δ ppm): 3.89 (dd, J_1 = 6.5 Hz, J_2 = 8.0 Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 2.91 (dd, J_1 = 8.0 Hz, J_2 = 17.5 Hz, 1H), 2.77 (J_1 = 6.5 Hz, J_2 = 17.5 Hz, 1H), 2.34 (s, 3H), 1.45 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz, δ ppm): 202.1, 172.0, 167.3, 82.6, 55.7, 51.9, 32.1, 29.9, 27.8.

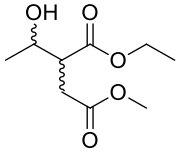
2-Προπιονυλοσουκινικός διμεθυλεστέρας (101)



^{1}H NMR ($CDCl_3$ 300 MHz, δ ppm): 4.00 (dd, J_1 = 6.3 Hz, J_2 = 8.2 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.00 (dd, J_1 = 8.2 Hz, J_2 = 17.6 Hz, 1H), 2.84 (dd, J_1 = 6.2 Hz, J_2 = 17.6 Hz, 1H), 2.79-2.63 (m, 2H), 1.08 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75MHz, δ ppm): 204.5, 171.9, 169.0, 53.4, 52.7, 52.0, 36.2, 32.2, 7.5.

1-Αιθυλο-4-μεθυλο 2-(1-υδροξυαιθυλο)σουκκινικός εστέρας (94)

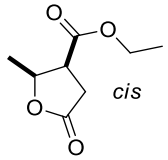


Σε 1 mL μεθανόλης, προστέθηκε $NaBH_4$ (0.132 mmol, 5 mg) και ακολούθησε προσθήκη του 1-αιθυλο-4-μεθυλο 2-ακετυλοσουκκινικού εστέρα **93** (0.396 mmol, 80 mg) διαλυμένου σε 1 mL μεθανόλης στους 0 ^{o}C. Το μίγμα αναδεύτηκε για 1 ώρα και στην ίδια θερμοκρασία προστέθηκε αργά μικρή ποσότητα κορεσμένου υδατικού διαλύματος NH_4Cl. Το διάλυμα συμπυκνώθηκε στον ρότορα, προστέθηκαν 4 mL νερό και το μίγμα εκχυλίστηκε με EtOAc, 2x4 mL. Η οργανική φάση που προέκυψε ξηράνθηκε και απομακρύνθηκε ο διαλύτης στον ρότορα. Το προϊόν καθαρίστηκε με flash χρωματογραφία στήλης (Hexane/EtOAc=6/1 v/v). Απόδοση 50%.

^{1}H NMR ($CDCl_3$ 300 MHz, δ ppm): 4.20 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 4.07-3.99 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.94-2.88 (m, 1H), 2.77 (dd, J_1 = 8.1 Hz, J_2 = 16.6 Hz, 1H), 2.66 (dd, J_1 = 5.7 Hz, J_2 = 16.6 Hz, 1H), 1.28 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.23 (d, J = 6.4 Hz, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz, δ ppm): 173.4, 172.5, 67.7, 61.0, 51.9, 47.9, 32.6, 20.7, 14.1.

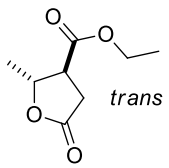
***cis*-2-Μεθυλο-5-οξοτετραυδροφουρανο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (96)**



Η σύνθεση του *cis*-2-μεθυλο-5-οξοτετραυδροφουρανο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **96** πραγματοποιήθηκε αυθόρμητα στις συνθήκες αντίδρασης της αναγωγής με $NaBH_4$ και απομονώθηκε με flash χρωματογραφία στήλης (Petr. ether/EtOAc=8/1 v/v).

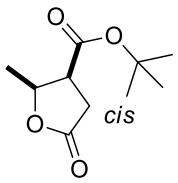
^{1}H NMR ($CDCl_3$ 300 MHz, δ ppm): 4.89-4.80 (m, 1H), 4.21 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.47-3.40 (m, 1H), 2.94 (dd, J_1 = 6.5 Hz, J_2 = 17.7 Hz, 1H), 2.65 (dd, J_1 = 8.8 Hz, J_2 = 17.7 Hz, 1H), 1.33 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 1.28 (t, J = 7.1 Hz, 3H).
^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz, δ ppm): 174.9, 170.1, 76.3, 61.5, 44.5, 31.1, 16.8, 14.1.

trans-2-μεθυλο-5-οξοτετραυδροφουρανο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (95)



Η σύνθεση του *trans*-2-μεθυλο-5-οξοτετραυδροφουρανιο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **95** πραγματοποιήθηκε αυθόρμητα στις συνθήκες αντίδρασης της αναγωγής με $NaBH_4$ και απομονώθηκε με flash χρωματογραφία στήλης (Petr. ether/EtOAc=10/1 v/v).
^{1}H NMR ($CDCl_3$ 300 MHz, δ ppm): 4.71-4.64 (m, 1H), 4.21 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.03-2.89 (m, 2H), 2.85-2.74 (m, 1H), 1.51 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 3H).
^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz, δ ppm): 174.4, 170.7, 78.2, 61.8, 47.6, 32.3, 20.8, 14.1.

cis-2-μεθυλο-5-οξοτετραυδροφουρανο-3-καρβοξυλικός _tert_-βουτυλεστέρας (100)

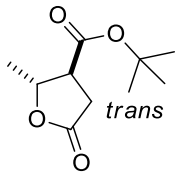


Η σύνθεση του 2-μεθυλο-5-οξοτετραυδροφουρανιο-3-καρβοξυλικού *tert*-βουτυλεστέρα **100** πραγματοποιήθηκε αυθόρμητα στις συνθήκες αντίδρασης της αναγωγής με $NaBH_4$ και απομονώθηκε με flash χρωματογραφία στήλης (Petr. ether/EtOAc=8/1 v/v).

^{1}H NMR ($CDCl_3$ 300 MHz, δ ppm): 4.86-4.77 (m, 1H), 3.37-3.29 (m, 1H), 2.89 (dd, J_1 = 6.6 Hz, J_2 = 17.6 Hz, 1H), 2.60 (dd, J_1 = 8.7 Hz, J_2 = 17.6 Hz, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.37 (d, J = 6.5 Hz, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz, δ ppm): 175.2, 169.2, 82.5, 76.5, 45.4, 31.3, 28.0, 16.7.

trans-2-μεθυλο-5-οξοτετραυδροφουρανο-3-καρβοξυλικός _tert_-βουτυλεστέρας (99)

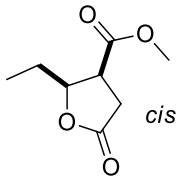


Η σύνθεση του 2-μεθυλο-5-οξοτετραυδροφουρανιο-3-καρβοξυλικού *tert*-βουτυλεστέρα **99** πραγματοποιήθηκε αυθόρμητα στις συνθήκες αντίδρασης της αναγωγής με $NaBH_4$ και απομονώθηκε με flash χρωματογραφία στήλης (Petr. ether/EtOAc=12/1 v/v).

^{1}H NMR ($CDCl_3$ 300MHz, δ ppm): 4.65-4.57 (m, 1H), 2.95-2.85 (m, 2H), 2.78-2.68 (m, 1H), 1.50 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.47 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75MHz, δ ppm): 174.6, 169.8, 82.4, 78.4, 48.6, 32.2, 8.0, 20.8.

cis-2-αιθυλο-5-οξοτετραυδροφουρανο-3-καρβοξυλικός μεθυλεστέρας (103)

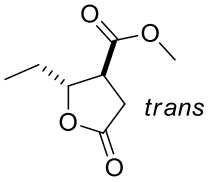


Η σύνθεση του 2-αιθυλο-5-οξοτετραυδροφουρανιο-3-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα **103** πραγματοποιήθηκε αυθόρμητα στις συνθήκες αντίδρασης της αναγωγής με $NaBH_4$ και διαχωρίστηκε από την *trans* λακτόνη με flash χρωματογραφία στήλης (Petr. ether/EtOAc=6/1 v/v).

^{1}H NMR ($CDCl_3$ 300 MHz, δ ppm): 4.53-4.60 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.49-3.42 (m, 1H), 2.90 (dd, J_1 = 5.7 Hz, J_2 = 17.6 Hz, 1H), 2.67 (dd, J_1 = 8.7 Hz, J_2 = 17.6 Hz, 1H), 1.56-1.63 (m, 2H), 1.05 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz, δ ppm): 174.8, 170.7, 81.7, 52.3, 44.1, 31.8, 24.7, 10.3.

***trans*-2-αιθυλο-5-οξοτετραυδροφουρανο-3-καρβοξυλικός μεθυλεστέρας (102)**



Η σύνθεση του 2-αιθυλο-5-οξοτετραυδροφουρανιο-3-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα **102** πραγματοποιήθηκε αυθόρμητα στις συνθήκες αντίδρασης της αναγωγής με $NaBH_4$ και απομονώθηκε με flash χρωματογραφία στήλης (Petr. ether/EtOAc=6/1 v/v).

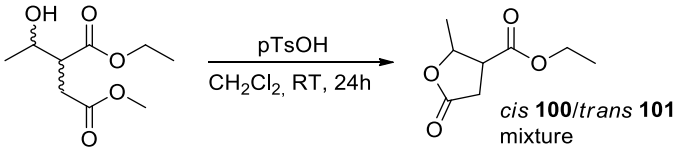
^{1}H NMR ($CDCl_3$ 300MHz, δ ppm): 4.56-4.50 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.10-3.01 (m, 1H) 2.93 (dd, J_1 = 8.7 Hz, J_2 = 17.6 Hz, 1H), 2.77 (dd, J_1 = 9.5 Hz, J_2 = 17.6 Hz, 1H), 1.88-1.67 (m, 2H), 1.04 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$ 75 MHz, δ ppm): 174.4, 171.6, 83.0, 52.7, 45.1, 32.2, 28.2, 9.4.

Ενζυμική αναγωγή κέτο διεστέρων

Σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (1 mL, 200 mM, pH =6,9) προστίθενται ο κέτο διεστέρας (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 ανακινείται στους 37 ^oC για 24 ώρες. Στην συνέχεια η αντίδραση εκχυλίζεται με EtOAc, συμπυκνώνεται η οργανική φάση και ταυτοποιείται το προϊόν με φασματοσκοπία NMR.

Αντίδραση λακτονοποίησης



Σε διάλυμα του υδρόξυ διεστέρα **95** (0.196 mmol, 40 mg) σε 3 mL CH_2Cl_2, υπό ατμόσφαιρα αργού, προστέθηκε καταλυτική ποσότητα *p*TsOH και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Ακολούθησε συμπύκνωση του μίγματος, όπου απομακρύνθηκε ο οργανικός διαλύτης, και προστέθηκαν 3 mL EtOAc και 3 mL H_2O. Έγινε εκχύλιση της οργανικής φάσης, έκπλυση με κορεσμένο υδατικό

διάλυμα NaCl και ξήρανση της τελικής οργανικής φάσης με $MgSO_4$. Το δείγμα συμπυκνώθηκε και διαχωρίστηκαν οι δυο ισομερείς *cis/trans* λακτόνες με flash χρωματογραφία στήλης.

Κεφάλαιο 4

Σύνθεση νέων βιοκαταλυτών

Από τις αρχές του 1960 μέχρι και σήμερα, η χρήση μικροβιακών ενζύμων έχει αυξηθεί σταδιακά και έχει σχεδόν αντικαταστήσει τα ένζυμα από άλλες πηγές.[46] Η συνεχής τεχνολογική πρόοδος στην μοριακή γενετική και στην γενετική μηχανική έχει δημιουργήσει την δυνατότητα κλωνοποίησης και έκφρασης οποιουδήποτε γονιδίου μέσα στον κατάλληλο μικροοργανισμό ξενιστή, όπως είναι τα βακτήρια, οι μύκητες και οι ζυμομύκητες. Η ανάγκη παραγωγής ειδικών ενζύμων σε πολύ μεγάλες ποσότητες, για εφαρμογές στην φαρμακοβιομηχανία, στην βιομηχανία τροφίμων, χημικών υψηλής ποιότητας και σε άλλες εφαρμογές, οδήγησε στην ανάπτυξη μικροοργανισμών τροποποιημένων με γενετική μηχανική σαν το κύριο μέσο παραγωγής των ενζύμων αυτών.

Οι μικροοργανισμοί είναι πολύ κατάλληλα κυτταρικά συστήματα για να "φιλοξενήσουν" και να παράγουν ένζυμα, καθώς βρίσκουν πολλαπλές εφαρμογές, είναι εύκολος και γρήγορος ο πολλαπλασιασμός τους και οι συνθήκες ανάπτυξης τους είναι απλές, άρα και εύκολα επαναλαμβανόμενες. Όλα τα παραπάνω αποτελούν σημαντικά πλεονεκτήματα των μικροβιακών κυττάρων, καθώς κάνουν την παραγωγή νέων ενζύμων πιο εύκολη, οικονομική, αξιόπιστη χωρίς παραπροϊόντα και επικίνδυνα πρόσθετα συστατικά.[4]

Τα ένζυμα, ανάλογα με την εφαρμογή που θα έχουν, παράγονται με διαφορετική διαδικασία. Τα πιο εξειδικευμένα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στα προϊόντα φροντίδας της υγείας και σε ποικιλία φαρμακευτικών προϊόντων, παράγονται σε υψηλά επίπεδα καθαρότητας σε σχετικά πιο μικρές ποσότητες, ενώ ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην μαζική παραγωγή τροφίμων, καυσίμων, υφασμάτων, παράγονται σε τεράστιες ποσότητες τόνων σε μορφή ακατέργαστου εκχυλίσματος.[47]

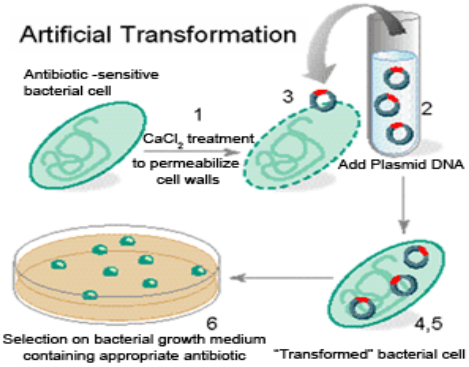
Έχοντας την τεχνολογία ανασυνδυασμού του DNA διαθέσιμη, αναπτύχθηκε η ταυτοποίηση και σύνθεση νέων ενζύμων, συμβάλλοντας σημαντικά στον τομέα της βιοκατάλυσης. Με αυτό τον τρόπο, εντοπίζονται πολλές φορές χρήσιμοι βιοκαταλύτες για κρίσιμα συνθετικά βήματα και ακόμη και αν δεν είναι αρκετά αποτελεσματικοί, μπορούν να βελτιωθούν χαρακτηριστικά τους όπως η δραστικότητα, η σταθερότητα και η εκλεκτικότητα τους, μπορούν να βελτιωθούν.[48] Η βελτίωση της δραστικότητας σε αυτές τις περιπτώσεις, επιτυγχάνεται με τις τεχνικές κατευθυνόμενη μεταλλαξιογένεση (site-directed mutagenesis), γενετικής μηχανικής

(genetic engineering) και κατευθυνόμενης εξέλιξης (directed evolution). Έτσι πολλές εταιρίες χρησιμοποιούν συνθετικά ένζυμα για πολύπλοκα βήματα σύνθεσης, αφού με αυτό τον τρόπο έχουν μια πιο οικονομική, περιβαλλοντικά αποδεκτή και αποδοτικότερη προσέγγιση, πλεονεκτήματα σημαντικά στον τομέα της βιομηχανίας.
Η διαδικασία παραγωγής νέων ενζύμων σε μικρή κλίμακα, διακρίνεται σε 3 στάδια:

- Παραγωγή ενζύμου
- Ανάκτηση ενζύμου
- Καθαρισμός ενζύμου

Παραγωγή ενζύμου

Η παραγωγή ενός νέου ενζύμου που χρησιμοποιείται για ερευνητικούς σκοπούς, πραγματοποιείται με τις τεχνικές της γενετικής μηχανικής. Αρχικά γίνεται εισαγωγή του επιθυμητού DNA σε ένα φορέα κλωνοποίησης, συνήθως πλασμιδιακό φορέα, και έπειτα γίνεται εισαγωγή των πλασμιδίων αυτών σε βακτηριακά κύτταρα που είναι στις κατάλληλες συνθήκες για να δεχθούν το πλασμίδιο (chemically competent cells). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται «μεταμόρφωση» (transformation) και στην συγκεκριμένη εργασία τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν βακτηριακά κύτταρα *E.coli*. Τα πλασμίδια, στα οποία έγινε η εισαγωγή του DNA, περιέχουν ένα γονίδιο αντίστασης στο αντιβιοτικό αμπικιλλίνη.



Εικόνα 1: Διαδικασία τεχνητής "μεταμόρφωσης" βακτηριακών κυττάρων.

Έτσι όταν γίνεται ανάπτυξη των κυττάρων, μετά την μεταμόρφωση, στο μέσο ανάπτυξης που περιέχει το αντίστοιχο αντιβιοτικό, μόνο τα κύτταρα που περιέχουν το συγκεκριμένο πλασμίδιο μπορούν να επιβιώσουν. Μόλις τα κύτταρα φτάσουν σε ένα κατάλληλο σημείο ανάπτυξης, γίνεται προσθήκη διαλύματος isopropyl b-D

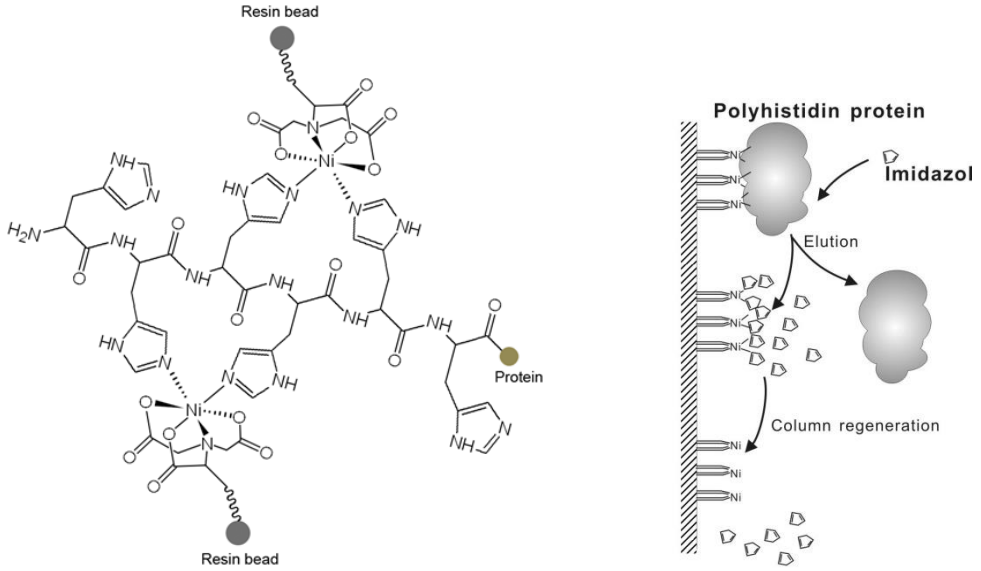
thiogalactoside (IPTG), και αρχίζει να εκφράζεται σε μεγάλη ποσότητα η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο που φέρει το πλασμίδιο.

Ανάκτηση ενζύμου

Αφού έγινε παραγωγή του ενζύμου μέσω ανάπτυξης στον κατάλληλο μικροοργανισμό, επόμενο στάδιο είναι ο διαχωρισμός του από το κυτταρικό σύστημα. Για τον σκοπό αυτό ακολουθεί φυγοκέντριση του δείγματος για να γίνει συλλογή των κυττάρων, και θραύση της κυτταρικής μεμβράνης μέσω της εφαρμογής αυξημένης πίεσης στο κυτταρικό διάλυμα. Αυτό που λαμβάνεται από την παραπάνω διαδικάσία είναι ένα ακατέργαστο εκχύλισμα ενζύμου που χρειάζεται περαιτέρω επεξεργασία για να απομονωθεί πλήρως καθαρό το ένζυμο.

Καθαρισμός ενζύμου

Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης γίνεται με την μέθοδο της χρωματογραφίας Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) και με μια τεχνική χρωματογραφίας συγγένειας γνωστή ως Immobilised Metal-ion Affinity Chromatography (IMAC).Η κωδική αλληλουχία DNA που έχει κλωνοποιηθεί, έχει στο άκρο της συναρμοσμένα 6 κατάλοιπα ιστιδίνης στην σειρά, και αποτελεί ένα μοτίβο γνωστό ως His-tag. Οι His-tagged πρωτεΐνες έχουν υψηλό επίπεδο συγγένειας για ιόντα Ni^{+2}, τα οποία είναι ακινητοποιημένα σε ένα μέσο χρωματογραφίας, μέσω ύπαρξης χειλικών υποκαταστατών. Έτσι οι His-tagged πρωτεΐνες συνδέονται εκλεκτικά στο υλικό που είναι φορτισμένο με τα ιόντα Ni^{+2} ενώ οι άλλες συνδέονται ασθενώς ή και καθόλου. Τα ιόντα αυτά συναρμόζονται με το άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2: Συναρμογή μορίων ιστιδίνης με ιόντα Ni^{+2} και ανταγωνιστική έκλουση τους με ιμιδαζόλιο.

Στην συνέχεια τα μη προσδεδεμένα μόρια ξεπλένονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, ενώ η επιθυμητή πρωτεΐνη λαμβάνεται με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος, που περιέχει ποσότητα ιμιδαζολίου. Το ιμιδαζόλιο εκλούει ανταγωνιστικά την προσδεδεμένη πρωτεΐνη, καθώς και το ίδιο προσδένεται στα ιόντα του νικελίου. Πολλές φορές απαιτείται μεγάλη συγκέντρωση του για να εκλουστεί όλη η πρωτεΐνη.[49]

Ο προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης γίνεται με την μέθοδο Bradford η οποία είναι μια φασματοφωτομετρική αναλυτική διαδικασία. Η μέθοδος στηρίζεται στην μετατόπιση της απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Η χρωστική κάτω από όξινες συνθήκες έχει κόκκινο χρώμα, ενώ παρουσία της πρωτεΐνης σχηματίζει ένα σύμπλοκο με αυτήν, και το χρώμα της μετατρέπεται σε μπλε. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης εμφανίζει απορρόφηση στα 595nm, όπου γίνεται και η μέτρηση του κάθε δείγματος. Η πειραματική τιμή της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης προκύπτει με την κατασκευή καμπύλης αναφοράς, έχοντας ως πρότυπο την μέτρηση της πρωτεΐνης Serum albumin, με την εξίσωση :

$$C\ (\mu g.cm^{-3})=34.765A-1.095$$

Όπου C είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης

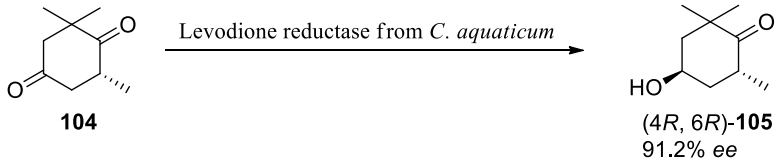
A είναι η απορρόφηση στα 595nm.

Εφαρμογές της βιοτεχνολογίας στην παραγωγή νέων κετοredουκτασών

Οι βιοκαταλυτικές αναγωγές αποτελούν σημαντικό εργαλείο στην σύνθεση φαρμακευτικών και φυσικών προϊόντων. Οι πρώτες βιοκαταλυτικές αναγωγές έγιναν με την χρήση baker's yeast για μια μεγάλη ποικιλία αναγωγικών αντιδράσεων. Το 1996 πρώτη φορά βρέθηκε το γονιδίωμα της baker's yeast και ήταν διαθέσιμο για διερεύνηση. Στα επόμενα χρόνια απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν αρκετές κετοredουκτάσες, και μελετήθηκε σε μερικές από αυτές το εύρος των υποστρωμάτων που δέχονται. Το συμπέρασμα ήταν ότι η δραστικότητα και εκλεκτικότητα της yeast ήταν συνολικό αποτέλεσμα της δράσης όλων των διαφορετικών ενζύμων, γεγονός που συνέβαλλε και στον σχηματισμό παραπροϊόντων. Έχοντας ως στόχο την μείωση των παράπλευρων αντιδράσεων και την βελτίωση της εκλεκτικότητας, αναπτύχθηκαν τεχνικές απομόνωσης και παραγωγής νέων ενζύμων. Έτσι πραγματοποιήθηκε απομόνωση των κετοredουκτασών που εμφανίζουν μια σημαντική δραστικότητα, και έπειτα κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο αυτό, σε ένα άλλο κύτταρο ξενιστή που δεν εμφανίζει δράση ως προς το επιθυμητό υπόστρωμα.

Με τις σύγχρονες βιοτεχνολογικές τεχνικές, άρχισαν να παράγονται τα ένζυμα σε μεγάλες ποσότητες με εύκολες και γνωστές τεχνικές επαγωγής έκφρασης της πρωτεΐνης, παρέχοντας σχεδόν οποιοδήποτε ένζυμο απαιτείται για κάθε συγκεκριμένο μετασχηματισμό. Έτσι οι βιομηχανίες εισάγουν όλο και περισσότερο στην σύνθεση των προϊόντων τους, στάδια που περιλαμβάνουν ασύμμετρες αναγωγές με την χρήση τέτοιων ενζύμων.[50]

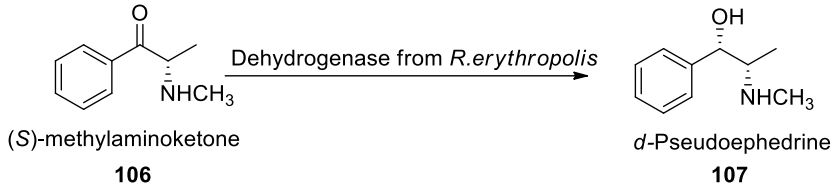
Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η κλωνοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί την ρεδουκτάση της (6*R*)-2,2,6-τριμεθυλο-1-4-κυκλοεξανοδιόνης (levodione), που προήλθε από το βακτήριο *Corynebacterium aquaticum* M-13. Το ένζυμο που παράχθηκε επιτυχώς στα κύτταρα *E.coli,* απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την στέρεο-και τοποεκλεκτική αναγωγή του levodione με εξαιρετική απόδοση και σε υψηλή οπτική καθαρότητα.[51]



104 (4*R*, 6*R*)-**105** 91.2% *ee*

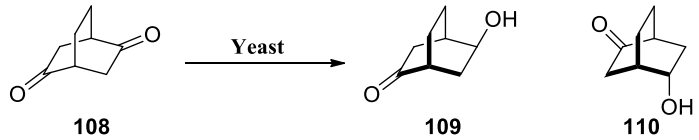
Σχήμα 42: Ενζυμική στερεοεκλεκτική αναγωγή του levodione.

Ακόμη η σύνθεση της χειρόμορφης αμινοαλκοόλης *d*-ψευδοεφεδρίνης, που είναι το ενεργό συστατικό ψευδοεφεδρίνη του φαρμάκου SUDAFED®, πραγματοποιήθηκε με την ασύμμετρη αναγωγή της αντίστοιχης προχειρόμορφης αμινο κετόνης καταλυόμενη από την αφυδρογονάση που απομονώθηκε από τον μικροοργανισμό *Rhodococcus erythropolysis* MAK154.[52]



Σχήμα 43: Ενζυμική αναγωγή της προχειρόμορφης αμινοκετόνης **106**.

Η ασύμμετρη αναγωγή της δικετόνης **108** από την *baker's yeast* οδήγησε στην σύνθεση των υδρόξυ κετονών **109** και **110** σε >98% *ee*. Όμως με τις τεχνικές της βιοτεχνολογίας, η γενετικά τροποποιημένη αλληλουχία της *baker's yeast* (TMB4100), που υπερεκφράζει μια συγκεκριμένη κετοredουκτάση, οδήγησε σε μεγάλη αύξηση της ταχύτητας αντίδρασης (>40 φορές ταχύτερη), και σε μια μικρή βελτίωση της εναντιομερικής περίσσειας από >98% σε >99% *ee*.[53]



Σχήμα 44: ενζυμική αναγωγή της δικετόνης **108** από την *baker's yeast*.

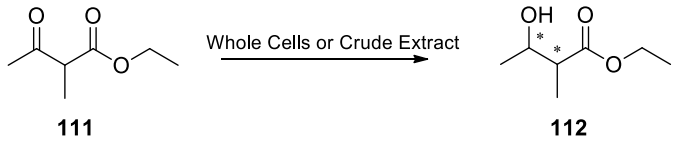
Ανάλυση-συζήτηση αποτελεσμάτων

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ανάγκη για την εύρεση νέων κετοredουκτασών, με δραστικότητα κατάλληλη ώστε να καταλύουν την αναγωγή διάφορων επιθυμητών υποστρωμάτων, σε μεγαλύτερη ποσότητα και με αυξημένη σταθερότητα και δραστικότητα, οδήγησε στην ανάπτυξη τους, εφαρμόζοντας βιοτεχνολογικές τεχνικές.

Στόχος της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας ήταν η παραγωγή νέων κετοredουκτασών με δραστικότητα κατάλληλη για την αναγωγή ποικιλίας δικαρβόνυλο υποστρωμάτων, τα οποία αποτελούν πεδίο έρευνας της ερευνητικής μας

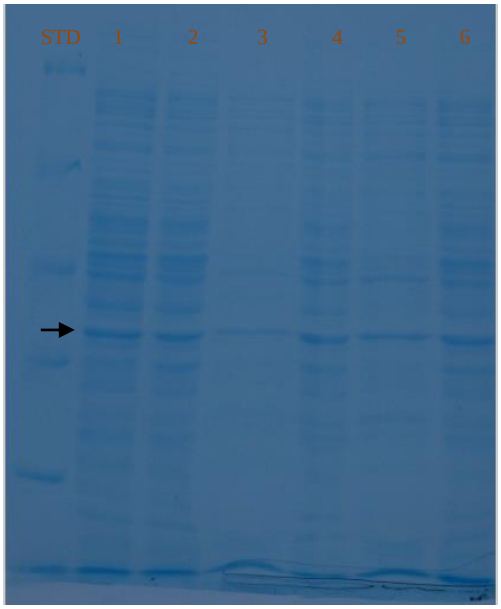
ομάδας. Η συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Βιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Σλοβακίας στα πλαίσια του προγράμματος Erasmus placement, υπό την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή Martin Rebros.

Η παραγωγή κετοredουκτασών μελετήθηκε, με την κλωνοποίηση 4 διαφορετικών αλληλουχιών DNA, που κωδικοποιούν το επιθυμητό ένζυμο, σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli*. Αρχικά έγινε καλλιέργεια όλων των διαφορετικών αλληλουχιών σε 24 ώρες και ύστερα από τις διαδικασίες απομόνωσης των ενζύμων, είτε σαν ολόκληρα κύτταρα, είτε σε μορφή ακατέργαστου εκχυλίσματος (crude extract), μελετήθηκε η δραστικότητα κάθε μίας από αυτές. Ο προσδιορισμός της δραστικότητας του ενζύμου πραγματοποιήθηκε μέσω του βιομετασχηματισμού του υποστρώματος 2-μέθυλοακετοξικός αιθυλεστέρας **111**, ενώ έγινε και μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραγόντων στην μετατροπή του υποστρώματος (Σχήμα 45).



Σχήμα 45: Μετατροπή του υποστρώματος **111** με ολόκληρα κύτταρα ή ακατέργαστο εκχύλισμα πρωτεΐνης.

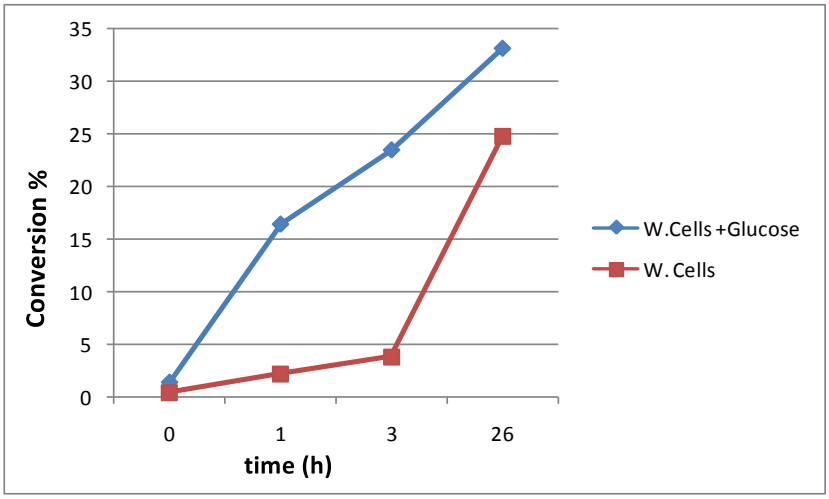
Πρώτα μελετήθηκε ο χρόνος επαγωγής της έκφρασης του κάθε ενζύμου που απαιτείται, με λήψη δειγμάτων σε 2, 4, 5.5 και 24 ώρες, και προετοιμασία των δειγμάτων αυτών για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακριλαμιδίου. Διαπιστώθηκε ότι, σε κάθε περίπτωση, χρειάζονται 24 ώρες για να γίνει έκφραση της πρωτεΐνης σε μεγαλύτερο βαθμό , και στην Εικόνα 3 φαίνεται η πρωτεΐνη που έχει παραχθεί από τις αλληλουχίες A1, A5 και A4.



1. A1 Αλληλουχία-5.5h επαγωγή
2. A1 Αλληλουχία-24h επαγωγή
3. A4 Αλληλουχία-5.5h επαγωγή
4. A4 Αλληλουχία-24h επαγωγή
5. A5 Αλληλουχία-5.5h επαγωγή
6. A5 Αλληλουχία-24h επαγωγή

Εικόνα 3: Ηλεκτροφόρηση πηκτής των αλληλουχιών A1, A4, A5 σε 5.5 και 24 ώρες.

Έπειτα πραγματοποιήθηκαν δοκιμές, για να προσδιοριστεί ο ρόλος της γλυκόζης στην καταλυτική δράση του ενζύμου που παράγεται, οι οποίες έδειξαν αύξηση του ποσοστού μετατροπής στον ίδιο χρόνο, όταν προστέθηκε γλυκόζη στην αντίδραση. Αυτό είναι φανερό στο παρακάτω πείραμα, στην περίπτωση των ολόκληρων κυττάρων με την αλληλουχία A1, όπου η προσθήκη γλυκόζης βελτιώνει τα ποσοστά μετατροπής (Διάγραμμα 1).

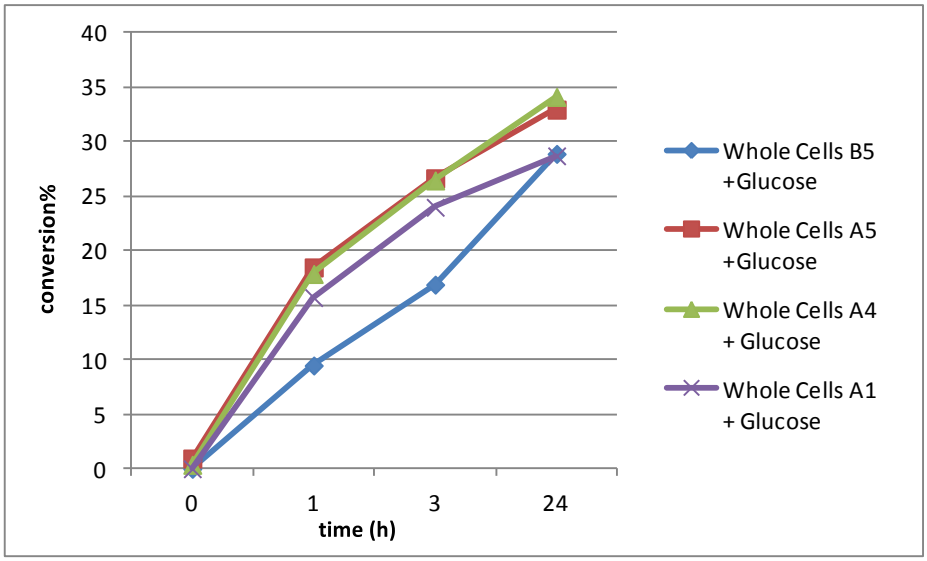


Διάγραμμα 1: Σύγκριση της αντίδρασης ολόκληρων κυττάρων της αλληλουχίας A1, με ή χωρίς την παρουσία γλυκόζης.

Στην περίπτωση των ολόκληρων κυττάρων δεν είναι απαραίτητη η προσθήκη συμπαράγοντα στην αντίδραση, αφού το κύτταρο διαθέτει στο εσωτερικό του, όλα τα

απαραίτητα συστατικά, καθώς και γλυκόζη για να γίνεται η ανακύκλωση του συνενζύμου και να μην χρειάζεται επιπλέον προσθήκη.

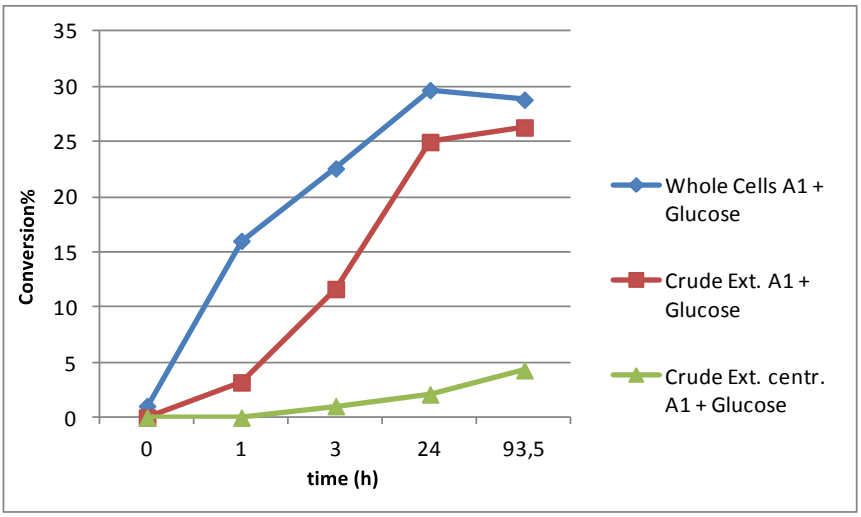
Ακόμη διερευνήθηκε η επίδραση της αυξανόμενης συγκέντρωσης της γλυκόζης, στο ποσοστό μετασχηματισμού του υποστρώματος **111**, και καμία σημαντική αλλαγή δεν εντοπίστηκε στο ποσοστό μετατροπής. Τα ένζυμα που παράγουν οι αλληλουχίες ύστερα από 24ώρες επαγωγής της έκφρασης της πρωτεΐνης, δοκιμάστηκαν ως ολόκληρα κύτταρα με την προσθήκη γλυκόζης, για την μετατροπή του παραπάνω υποστρώματος, και στο Διάγραμμα 2 φαίνονται τα ποσοστά μετατροπής ως προς τον χρόνο, των ενζύμων που προέκυψαν από την κλωνοποίηση των αλληλουχιών A1, A4, A5, B5.



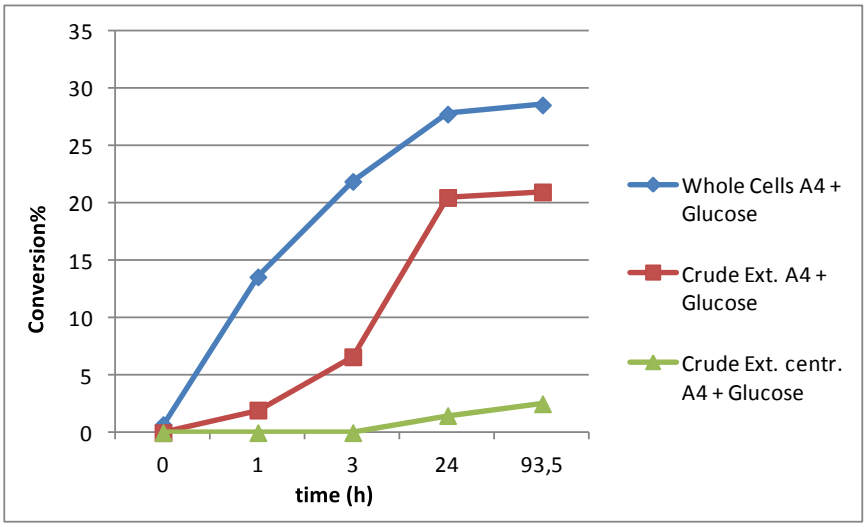
Διάγραμμα 2: Σύγκριση των ποσοστών μετατροπής των ολόκληρων κυττάρων του υποστρώματος **111** παρουσία γλυκόζης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνονται ενθαρρυντικά, αφού παρατηρείται μετατροπή του υποστρώματος **111**. Το ποσοστό μετατροπής όμως, δεν κατάφερε να ξεπεράσει το 30-35%, που επιτεύχθηκε στις περιπτώσεις των αλληλουχιών A4 και A5, σε διάστημα 24 ωρών.

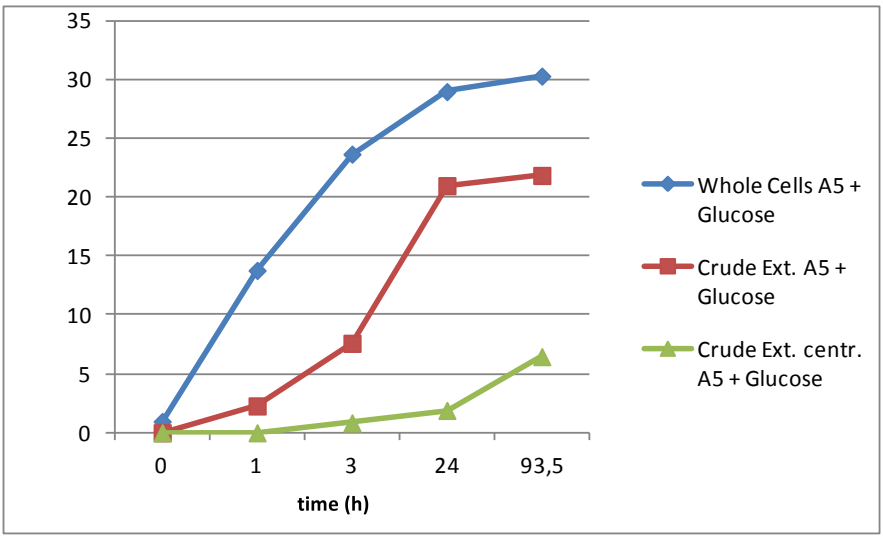
Πραγματοποιήθηκε πιο εκτενής μελέτη για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών αντίδρασης, για τα ένζυμα που κωδικοποιούν οι αλληλουχίες A1, A4, A5, όπως επίσης και η απομόνωση των επιθυμητών πρωτεϊνών. Ακολούθησαν αντιδράσεις ελέγχου, που περιλαμβάνουν αντίδραση του ενζύμου που παράγεται σε τρεις διαφορετικές μορφές, σαν ολόκληρα κύτταρα, ακατέργαστο εκχύλισμα, και μετά από φυγοκέντριση του ακατέργαστου εκχυλίσματος και φιλτράρισμα του. Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα και για τις τρεις αλληλουχίες A1, A4, A5 στο Διάγραμμα 3 του ποσοστού μετατροπής % ως προς τον χρόνο αντίδρασης.



Διάγραμμα 3: Σύγκριση των ποσοστών μετατροπής του υποστρώματος **111** με την χρήση τριών διαφορετικών μορφών του ενζύμου της αλληλουχίας A1.



Διάγραμμα 4: Σύγκριση των ποσοστών μετατροπής του υποστρώματος **111** με την χρήση τριών διαφορετικών μορφών του ενζύμου της αλληλουχίας A4.

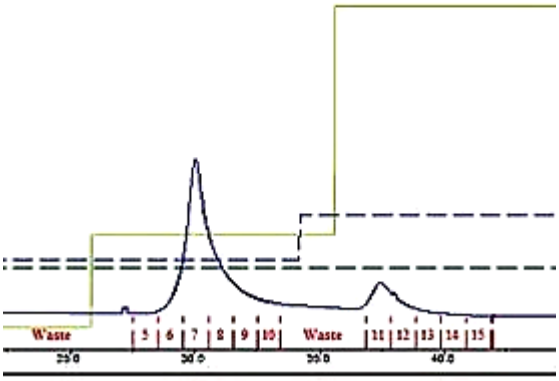


Διάγραμμα 5: Σύγκριση των ποσοστών μετατροπής του υποστρώματος **111**με την χρήση τριών διαφορετικών μορφών του ενζύμου της αλληλουχίας Α5.

Όπως φαίνεται και στα τρία παραπάνω Διαγράμματα 3, 4, και 5, η γενική εικόνα και των τριών ενζύμων από τις αλληλουχίες Α1, Α4, Α5, είναι ότι όταν γίνεται θραύση του κυττάρου για να απομονωθεί το ένζυμο, η μετατροπή του υποστρώματος είναι μικρότερη, και αυτό πιθανόν να οφείλεται σε άλλα ένζυμα που υπάρχουν μέσα στο κύτταρο και έχουν συνεργατικό ρόλο με το επιθυμητό ένζυμο. Επίσης τα κύτταρα είναι μεταβολικά ενεργά, δηλαδή περιέχουν τον απαραίτητο συμπαράγοντα και αφυδρογονάση της γλυκόζης για την αναγέννηση του συνενζύμου. Έτσι, όταν διασπάται η κυτταρική μεμβράνη δεν υπάρχουν αυτές οι πρωτεΐνες, και έπειτα από φυγοκέντριση του εκχυλίσματος και φιλτράρισμα του, πολλά ακόμη συστατικά απομακρύνονται με αποτέλεσμα μειωμένη δράση του επιθυμητού ενζύμου.

Τα ποσοστά μετατροπής σε όλες τις περιπτώσεις που παρατίθενται, δεν ξεπερνούν το 30%, γεγονός που δείχνει ότι χρειάζεται περαιτέρω προσπάθεια για την αύξηση της ποσότητας της πρωτεΐνης που παράγεται, με βελτίωση των συνθηκών επαγωγής της έκφρασης της πρωτεΐνης ή ακόμη και αλλαγή των αλληλουχιών που κλωνοποιούνται.

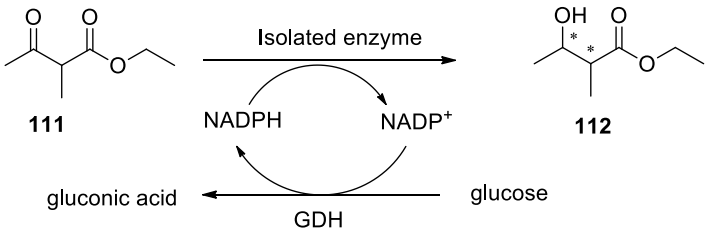
Στην συνέχεια θεωρήθηκε σημαντικό να γίνει απομόνωση και καθαρισμός της πρωτεΐνης, για να εξακριβωθεί η δραστικότητα του κάθε ενζύμου, και η ικανότητα των αλληλουχιών αυτών να εκφράζουν ικανοποιητικά το κάθε ένζυμο. Με την χρήση χρωματογραφίας συγγένειας, έγινε δυνατή η απομόνωση και των τριών διαφορετικών ένζυμων που παράγονται από τις Α1, Α4, Α5. Στην εικόνα που παρατίθεται, φαίνεται η απομόνωση του ενζύμου που παράγεται από την αλληλουχία Α5, στην οποία παρατηρείται ότι εκλούονται πρώτα διάφορες ακαθαρσίες στα κλάσματα 5-10, ενώ στα επόμενα κλάσματα 11-14 γίνεται συλλογή της επιθυμητής πρωτεΐνης.



Εικόνα 4: Χρωματογράφημα FPLC της απομόνωσης της επιθυμητής πρωτεΐνης που παράγεται από την αλληλουχία A5, με χρωματογραφία συγγένειας.

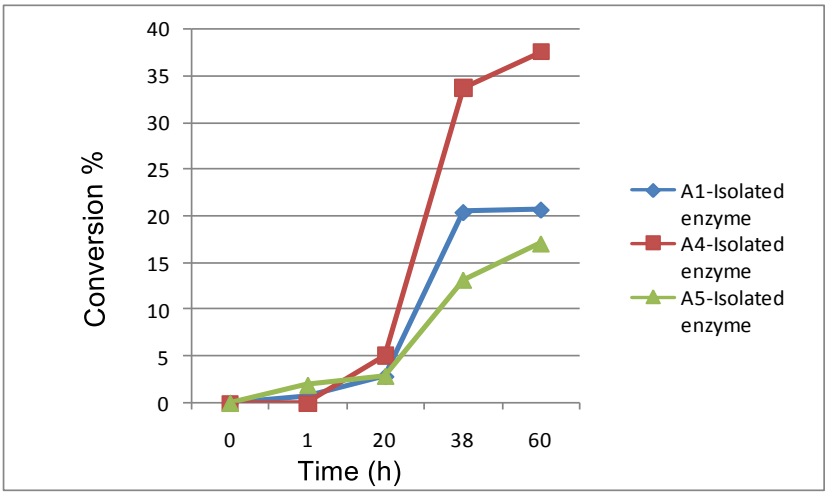
Παρόλο που πραγματοποιήθηκε η απομόνωση της πρωτεΐνης χωρίς τις επιπλέον ακαθαρσίες, η ποσότητα του ενζύμου που απομονώθηκε δεν ήταν απόλυτα ικανοποιητική και απαιτείται βελτίωση της έκφρασης της. Στο χρωματογράφημα που παρατίθεται, η επιθυμητή πρωτεΐνη που εκλούεται στα κλάσματα 11-15, αντιστοιχεί στην δεύτερη κορυφή και είναι αρκετά μικρής έντασης. Το συμπέρασμα αυτό, σε συνδυασμό με την μέτρηση συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford, που βρέθηκε ότι είναι περίπου 42 μg/ml, αποδεικνύει την μη ικανοποιητική έκφραση της πρωτεΐνης.

Τέλος πραγματοποιήθηκαν οι ενζυμικές αναγωγές του υποστρώματος **111** με τις 3 νέες απομονωμένες πρωτεΐνες όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα 46. Εφαρμόστηκαν οι συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης που έχουν αναπτυχθεί σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, χρησιμοποιώντας συνένζυμο NADPH και σύστημα ανακύκλωσης του αποτελούμενο από γλυκόζη και αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH).



Σχήμα 46: Αντίδραση των 3 απομονωμένων ενζύμων με το υπόστρωμα **111** με χρήση ανακυκλωτικού συστήματος συνενζύμου.

Τα ποσοστά μετατροπής των αντιδράσεων μετρήθηκαν με την χρήση αέριας χρωματογραφίας και παρακάτω φαίνεται το συγκριτικό Διάγραμμα 6 και των τριών ενζύμων, που δείχνει την % μετατροπή σε σχέση με τον χρόνο αντίδρασης. Ανάμεσα στα τρία ένζυμα, το ένζυμο που προήλθε από την αλληλουχία A4, οδηγεί στο μεγαλύτερο ποσοστό του προϊόντος (38%), δηλαδή εμφάνισε την υψηλότερη δραστικότητα για το συγκεκριμένο υπόστρωμα.



Διάγραμμα 6: Σύγκριση των ποσοστών μετατροπής του υποστρώματος **111** των απομονωμένων ενζύμων.

Συμπερασματικά η παραγωγή νέων ενζύμων είναι πολύ πλεονεκτική, καθώς μπορεί να αποδώσει ένζυμα σε μεγαλύτερη ποσότητα, με μεγαλύτερη σταθερότητα και δραστικότητα ως προς τα επιθυμητά υποστρώματα. Επιπλέον, με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η παραγωγή συγκεκριμένων επιθυμητών ενζύμων με γνωστά χαρακτηριστικά, χωρίς να υπάρχει εξάρτηση από εμπορικά αντίστοιχα, των οποίων η προέλευση και δραστικότητα δεν είναι πολλές φορές σταθερή και επομένως επαναλήψιμη. Ωστόσο η συγκεκριμένη μέθοδος χρειάζεται βελτίωση, ώστε να παράγεται σε μεγαλύτερη ποσότητα το ένζυμο μέσα στα βακτηριακά κύτταρα. Η ανάπτυξη καλύτερης μεθόδου βρίσκεται ήδη υπό διερεύνηση στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου στην Σλοβακία, για να γίνει έκφραση των ενζύμων σε ικανοποιητικό βαθμό και στην συνέχεια μελέτη της σχέσης δομής υποστρωμάτων με δραστικότητα ενζύμου.

Πειραματικό μέρος

Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών Sigma-Aldrich. Το πρότυπο πρωτεϊνών Unstained Protein MW Marker για την ηλεκτροφόρηση ήταν από την εταιρεία Thermo Scientific. Τα κύτταρα *E.coli* καλλιεργήθηκαν στο μέσο ανάπτυξης Luria-Bertani (LB) : NaCl 10 $g \cdot dm^{-3}$, yeast extract 5 $g \cdot dm^{-3}$, tryptone 10 $g \cdot dm^{-3}$, LB-agar : NaCl 10$g \cdot dm^{-3}$, yeast extract 5$g \cdot dm^{-3}$, tryptone 10$g \cdot dm^{-3}$, agar 20$g \cdot dm^{-3}$, Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,1M: $KH_2PO_4$13,609 $g \cdot dm^{-3}$, K_2HPO_4 17,418$g \cdot dm^{-3}$, pH=6.9. Ο αναστολέας πρωτεασών που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρίας Roche Diagnostics (Complete EDTA-free Protein Inhibitor cocktail). Τα ρυθμιστικά διαλύματα για την απομόνωση της πρωτεΐνης είχαν την σύσταση (A): ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M KH_2PO_4 pH 6.9, + 300 mM NaCl με τελικό όγκο 700ml, pH 6.651 (B): ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M KH_2PO_4 pH 6.9 + NaCl 0,5M ιμιδαζόλιο τελικού όγκου 200mL. Για την ηλεκτροφόρηση τα διαλύματα είναι Tank Buffer: Tris 15.1g, γλυκίνη 94 g, SDS 10% 50 mL, απιονισμένο νερό ως το 1 L, Ρυθμιστικό διάλυμα χρωματισμού: Coomassie Blue 0.25 g, Μεθανόλη 45 ml, Οξικό Οξύ 9 mL, Απιονισμένο νερό 46 mL, Ρυθμιστικό διάλυμα αποχρωματισμού: Μεθανόλη 10 mL, Οξικό οξύ 9 mL, Απιονισμένο νερό 81 mL, Sample buffer: SDS 10% 2.5 mL, γλυκερόλη 2.5 mL, bromophenol blue 0.2% 125 μL, Tris 0.5 M pH 6.8 2 mL, β μερκαπτοαιθανόλη 1.25 mL.

Όργανα

Η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων ελέγχθηκε με την βοήθεια αέριου χρωματογράφου GC-FID (Agilent 6890N), κολώνα DB-23 (J&W Scientific, μήκος: 60 m, I.D. 0.25 mm, film: 0.25 μm), με ανιχνευτή FID και κινητή φάση αέριο H_2. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε μέσα σε αναδευτήρα Incubator Shaker New Brunswick Scientific της εταιρείας Eppendorf. Η ανάπτυξη της καλλιέργειας των κυττάρων μετρήθηκε σε μήκος κύματος 600 nm με φασματοφωτόμετρο (BioSpectrophotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany). Η μέτρηση της

συγκέντρωσης της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε επίσης με την βαφή Bromophenol blue και με την μέθοδο Bradford[54] με φασματοφωτόμετρο ίδιας εταιρίας. Η ρήξη των κυττάρων έγινε με την χρήση συνεχούς disrupter (Constant System LTD), 20 kPSI. Το φιλτράρισμα του εκχυλίσματος έγινε με αποστειρωμένο φίλτρο (Filtopur S 0.2 μm, Sarstedt). Η απομόνωση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με την χρήση χρωματογράφου FPLC της εταιρίας GE Healthcare Life Sciences με κολώνα HisTrap™ FF GE Healthcare από την εταιρεία Merck. Για την συγκέντρωση της απομονωμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε φίλτρο (Amicon Ultra-15 Centrifugal filter units) της εταιρίας Merck, ενώ για την αφαλάτωση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ειδική κολώνα (disposable PD-10 Desalting Column, Sephadex G-25 resin).

Παραγωγή Βιομάζας

Αρχικά τα κύτταρα *E.coli* ήταν αποθηκευμένα σε LB agar medium με αμπικιλλίνη τελικής συγκέντρωσης 50 μg ·cm-3 (50 mg/mL) στους 4 ^{o}C μέσα σε τρυβλία.

Η παραγωγή κυττάρων *E.coli* που εκφράζουν την KRED, η οποία έχει κλωνοποιηθεί σε ένα πλασμίδιο, έγινε με την καλλιέργεια των κυττάρων αυτών για 24 ώρες σε LB medium στους 37 ^{o}C. Για να αρχίσει η παραγωγή της βιομάζας, έγινε προκαλλιέργεια (pre-inoculation) σε δοκιμαστικό σωλήνα με την προσθήκη μιας μόνο αποικίας σε LB medium (3 mL) με αντιβιοτικό αμπικιλλίνη (1/1000v/v, 3 μL), στους 37 ^{o}C με συνεχή ανάμειξη (200 rpm) και αφέθηκε μέχρι την επόμενη μέρα. Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε μεγαλύτερη ποσότητα (inoculum) πραγματοποιήθηκε με την εισαγωγή 1% της καλλιέργειας που προηγήθηκε, σε σφαιρική φιάλη των 500 mL που περιέχει LB medium (100 mL) και επιπλέον ποσότητας αμπικιλλίνης (1/1000v/v, 100 μL). Ακολούθησε επώαση στις ίδιες συνθήκες ανάδευσης και θερμοκρασίας και έλεγχος της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 600 nm (OD_{600}) φασματοσκοπικά ανά μία ώρα (1000 μL δείγμα) μέχρι η οπτική πυκνότητα να έχει την επιθυμητή τιμή (0.5-0.6). Για την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας, 100 μL του κάθε δείγματος αραιώθηκαν με 900 μL απιονισμένο νερό και η πραγματική τιμή της ήταν 10x πειραματικής τιμής. Η διαδικασία μέτρησης της οπτικής πυκνότητας γίνεται δυο φορές και το αποτέλεσμα είναι ο μέσος όρος αυτών. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν, εκτός από την μέτρηση της OD_{600} (200 μL), και στην ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών (800 μL).

Επαγωγή της έκφρασης της KRED

Η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης στα κύτταρα αυτά επιτεύχθηκε με την προσθήκη υδατικού διαλύματος IPTG (100 mM, 1 mL), όταν η OD_{600} φτάσει την επιθυμητή τιμή, και η διαδικασία διήρκησε 24 ώρες.

Παρασκευή του εκχυλίσματος του ενζύμου

Η κατεργασία της βιομάζας ξεκίνησε με την φυγοκέντριση του δείγματος που προέκυψε από την καλλιέργεια σε δύο σωλήνες φυγοκέντρισης των 50ml στους 4 ^{o}C, 7197 g για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό οδηγήθηκε στα απόβλητα, ενώ το ίζημα διαλυτοποιήθηκε ξανά σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1 M (pH 6.9). Τα διαλυμένα κύτταρα υπέστησαν ρήξη από συνεχές disrupter (20 kPSI, 1 κύκλος) και αμέσως μετά την επεξεργασία του δείγματος, προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα υδατικού διαλύματος ταμπλέτας αναστολέα Πρωτεασών (EDTA-free protein inhibitor cocktail tablets, 1mL). Ακολούθησε φυγοκέντριση στις ίδιες συνθήκες για 10 λεπτά και φιλτράρισμα σε σύριγγα μέσω ενός αποστειρωμένου φίλτρου 0.2 μm και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη.

Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

Σε ποτήρι ζέσεως με 3,35 mL απεσταγμένου νερού διαλύθηκαν με την εξής σειρά διάλυμα Tris 1.5 M pH=8.8 (2.5 mL), διάλυμα 10% (w/v) SDS (100 μL), Protogel (30% w/v acrylamide, 0.8% Bis-acrylamide) (4 ml), TEMED (5 μL) και στο τέλος προστίθεται διάλυμα APS 10% w/v (50 μL) που έχει παρασκευαστεί την ίδια μέρα. Το μίγμα αναδεύεται και τοποθετείται στον χώρο που σχηματίζεται μεταξύ δυο γυάλινων τμημάτων μετά από την συναρμολόγηση τους στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (Running gel), μέχρι το 60% του όγκου. Άμεσα προστίθεται σε αυτό κορεσμένο διάλυμα βουτανόλης σε νερό και αφήνεται να πήξει. Μόλις πήξει το

μίγμα, απομακρύνεται η βουτανόλη, ξεπλένεται και στεγνώνεται η επιφάνεια του πηκτώματος.

Στην συνέχεια παρασκευάζεται ένα πήκτωμα πακεταρίσματος (Stacking gel). Σε ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκαν διάλυμα Tris 0.5 M pH=6.8 (2.5 mL), διάλυμα 10% SDS(100 μl), Protogel (30% w/v acrylamide, 0.8% Bis-acrylamide) (1.7 mL), απεσταγμένο νερό (5.7 mL), APS 10% w/v (50 μL) και TEMED (10 μL). Το μίγμα αναδεύεται, προστίθεται πάνω στο πήκτωμα διαχωρισμού και στην άκρη του τοποθετείται η υποδοχή για τον σχηματισμό των πηγαδιών φόρτωσης δείγματος. Μόλις πολυμεριστεί και το δεύτερο πήκτωμα, αφαιρείται η υποδοχή για τον σχηματισμό των πηγαδιών και το πήκτωμα είναι έτοιμο για ηλεκτροφόρηση.

Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Για την προετοιμασία των δειγμάτων, η κατάλληλη ποσότητα δείγματος αναμειγνύεται με το Sample buffer και μένει για 3 λεπτά στους 100 ^{o}C. Τα δείγματα (αραιωμένα ή όχι) φορτώθηκαν στο πήκτωμα (10μL) μαζί με ένα πρότυπο πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (7 μL). Η συσκευή ηλεκτροφόρησης πληρώθηκε με 1x αραιωμένο διάλυμα Tank buffer και συνδέθηκε στους 200 V, 35 mA, 50 W μέχρι τα πρωτεϊνικά δείγματα να φτάσουν στο τέλος του πηκτώματος. Στην συνέχεια αποσυνδέεται η συσκευή, το stacking gel απομακρύνεται, ενώ το πήκτωμα με τις πρωτεΐνες μένει για 20 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης που καλύπτει όλη την επιφάνεια του πηκτώματος. Ακολουθεί ο αποχρωματισμός του πηκτώματος, ο οποίος γίνεται πρώτα με έκπλυση με νερό για την απομάκρυνση όλης της χρωστικής και στην συνέχεια τοποθετείται σε μεγάλο πιάτο καλλιέργειας, όπου μένει για συνεχόμενες εκπλύσεις με κατάλληλο διάλυμα αποχρωματισμού για 2 ώρες. Στο τέλος αυτής της διαδικασίας το πήκτωμα είναι έτοιμο για μελέτη.

Απομόνωση πρωτεΐνης

Η απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης από το εκχύλισμα του ενζύμου πραγματοποιήθηκε με την χρήση υγρής χρωματογραφίας Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC). Ο διαχωρισμός του ενζύμου έγινε με την χρήση κολώνας (1

mL, HisTrap FF) φορτισμένη με ιόντα Ni^{+2}, η οποία έχει συγγένεια ως προς τα κατάλοιπα ιστιδίνης. Έγινε εισαγωγή του φιλτραρισμένου δείγματος, έπειτα από φυγοκέντριση του (3 mL), και πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση της στήλης με το ειδικό διάλυμα πρόσδεσης (A). Έπειτα με την σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση του διαλύματος έκλουσης (B), εκλούστηκε η πρωτεΐνη, καθώς αυξήθηκε η ποσότητα του ιμιδαζολίου που απελευθερώνει την προσδεδεμένη πρωτεΐνη. Τα κλάσματα (1mL) συλλέγονται με βάση την απορρόφηση στην περιοχή του ορατού και γίνεται έλεγχος τους με σε πηκτή πολυακριλαμιδίου 12%, προσθέτοντας 50 μL του sample buffer σε 50 μL δείγματος. Τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη συλλέγονται όλα μαζί και υφίστανται περαιτέρω συγκέντρωση για να γίνει ο όγκος τους μικρότερος από 2.5 mL. Η φυγοκέντριση του δείγματος (5.000 g, 4 ^{o}C, 1 min), παρουσία ειδικού φίλτρου με πόρους συγκεκριμένου μεγέθους, προκάλεσε τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με διαφορετικό μέγεθος, αφού οι πρωτεΐνες με μέγεθος < 30 kDa φιλτράρονται και πάνε στο κάτω μέρος του σωλήνα φυγοκέντρισης. Το πάνω μέρος που περιέχει την επιθυμητή πρωτεΐνη, κατεργάζεται περαιτέρω για να αντικατασταθεί το ρυθμιστικό διάλυμα της απομόνωσης, που περιέχει υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου, με το βέλτιστο ρυθμιστικό διάλυμα για το ένζυμο. Η κατεργασία αυτή πραγματοποιείται με την προσθήκη του δείγματος σε ειδικές κολώνες (desalting columns), στις οποίες το ρυθμιστικό διάλυμα απομόνωσης αντικαταστάθηκε από το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH=6.9 (0.1 M, 3.5 mL).

Μέτρηση συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford

Σε φιαλίδιο (eppendorf) παρασκευάστηκε το κάθε δείγμα πρωτεΐνης, προσθέτοντας σε 600 μl του διαλύματος της πρωτεΐνης, 600 μL απιονισμένο νερό. Στην συνέχεια μεταφέρθηκαν 150 μl του κάθε δείγματος, που έχει αραιωθεί με τον παραπάνω τρόπο, σε κυψελίδα φωτομέτρησης, η οποία συμπληρώθηκε με 150 μL αντιδραστηρίου Bradford. Ίδιες ποσότητες χρησιμοποιήθηκαν και για την παρασκευή του τυφλού διαλύματος, όπου αντί για διάλυμα πρωτεΐνης, προστέθηκε απιονισμένο νερό. Μετά το πέρας 3 λεπτών μελετήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm, σε σύγκριση με το τυφλό διάλυμα που ρυθμίζεται να έχει απορρόφηση μηδέν. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για το κάθε διαφορετικό δείγμα και η πραγματική τιμή της συγκέντρωσης είναι η διπλάσια της πειραματικής. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που

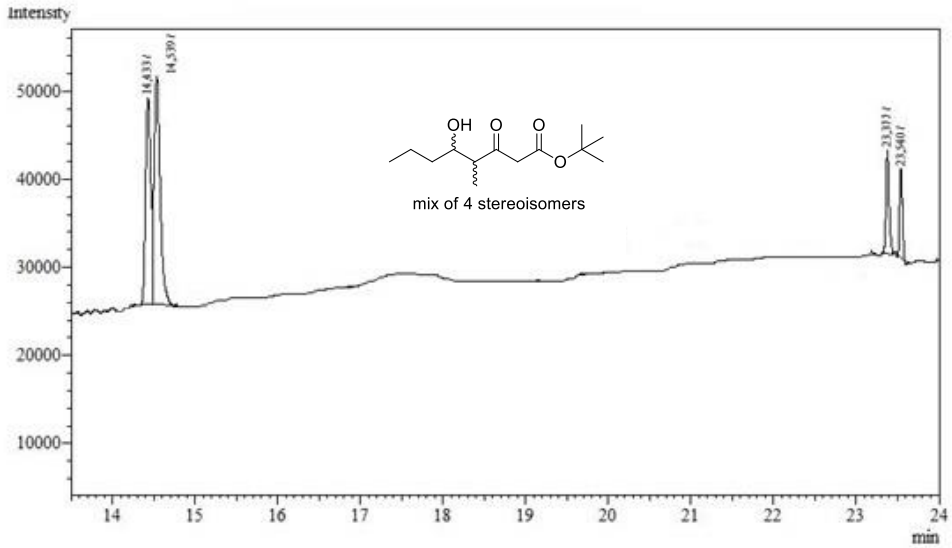
παράχθηκε από την κλωνοποίηση των 3 αλληλουχιών είναι 41.95 μg/mL η **A5**, η **A4** 33.78 μg/mL και η **A1** 33.13 μg/mL.

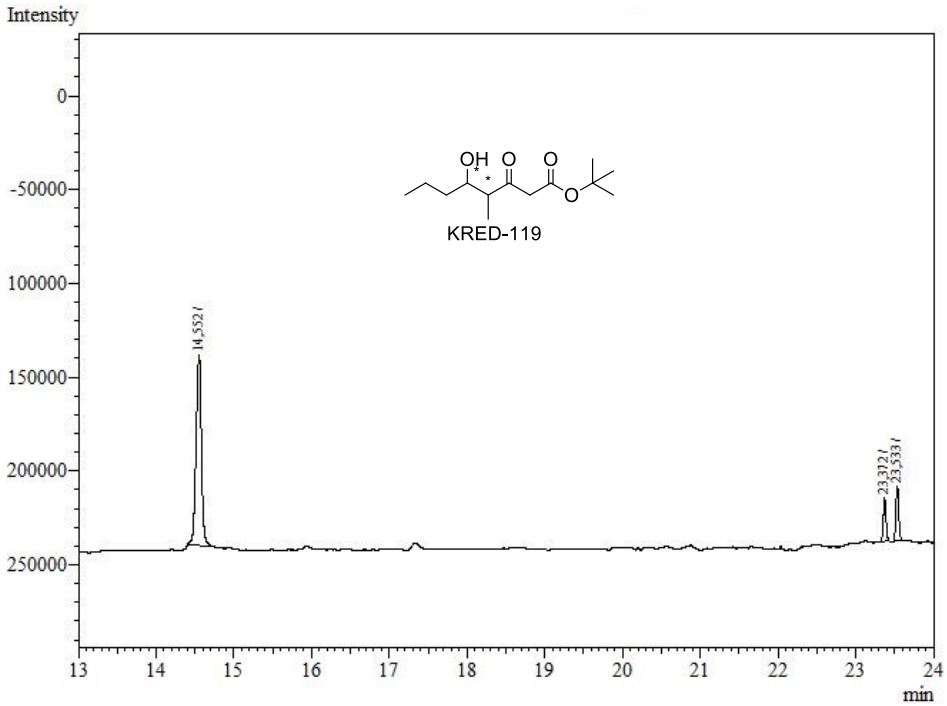
Βιομετατροπή του υποστρώματος 2-μέθυλο-οξικού αιθυλεστέρα

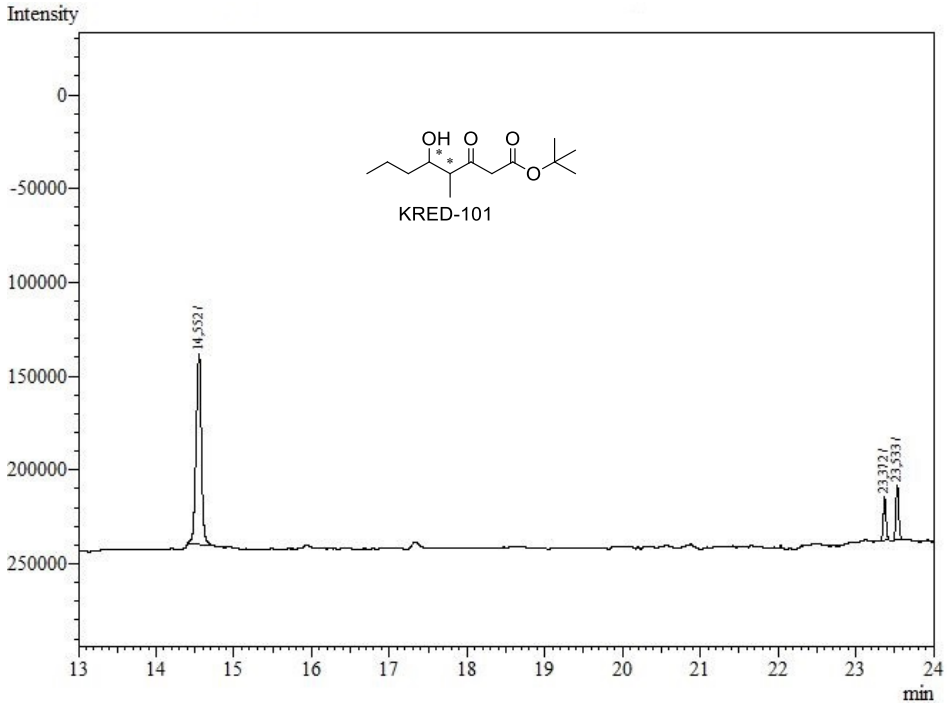
Σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0.1 M, pH=6.9) που περιέχει απομονωμένη πρωτεΐνη (ή περιέχει την πρωτεΐνη είτε σαν ολόκληρα κύτταρα είτε σαν ακατέργαστο εκχύλισμα πρωτεΐνης), προστέθηκαν το υπόστρωμα (25 mM, 5 mg), NADPH (2.5 mM, 2 mg), γλυκόζη (100 mM, 18 mg) και αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH, 1 mg/mL). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε υπό ανακίνηση 500 rpm στους 37 ^{o}C και έγινε λήψη δειγμάτων στις 0, 1, 3, 24 ώρες (10 μL), εκχύλιση τους με EtOAc και μελέτη της δραστικότητας του ενζύμου σε σχέση με τον χρόνο με την βοήθεια αέριου χρωματογράφου.

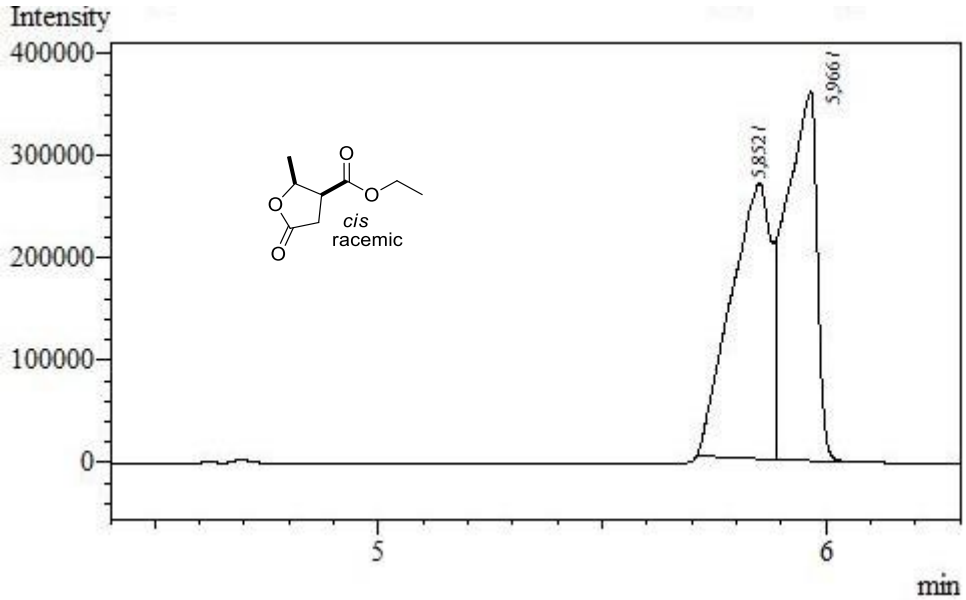
Παράρτημα

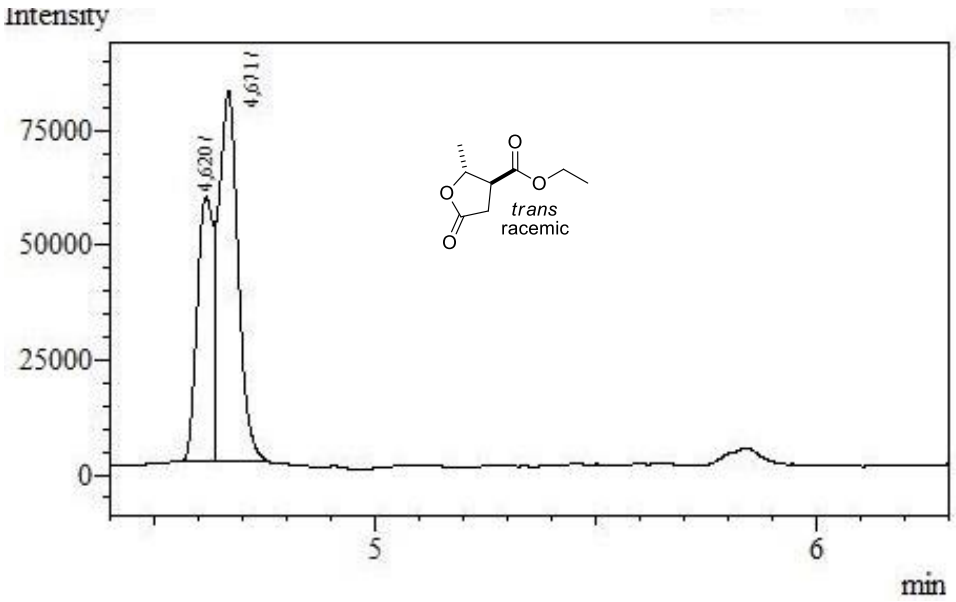
Φάσματα Χρωματογραφίας GC

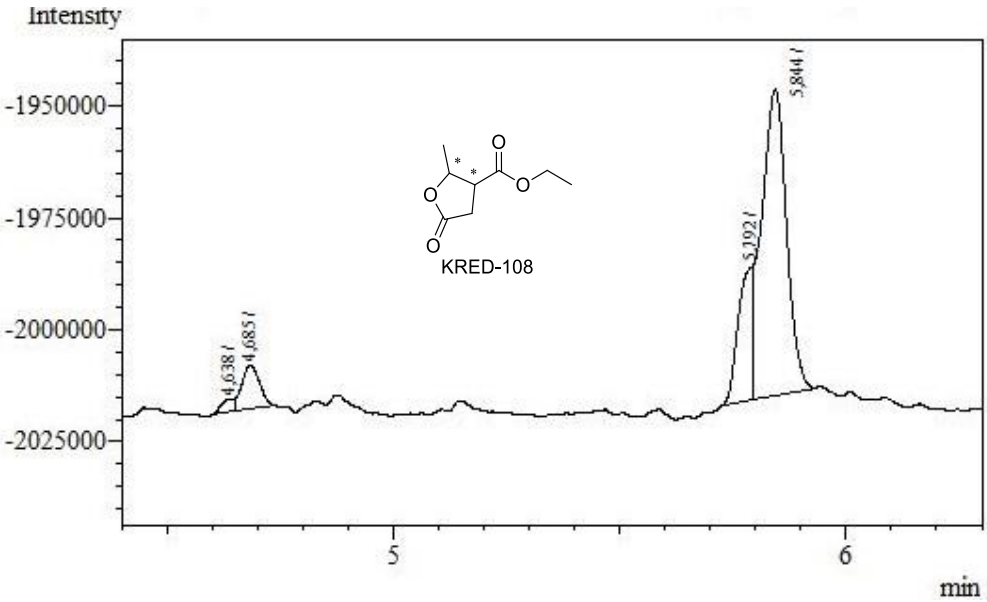


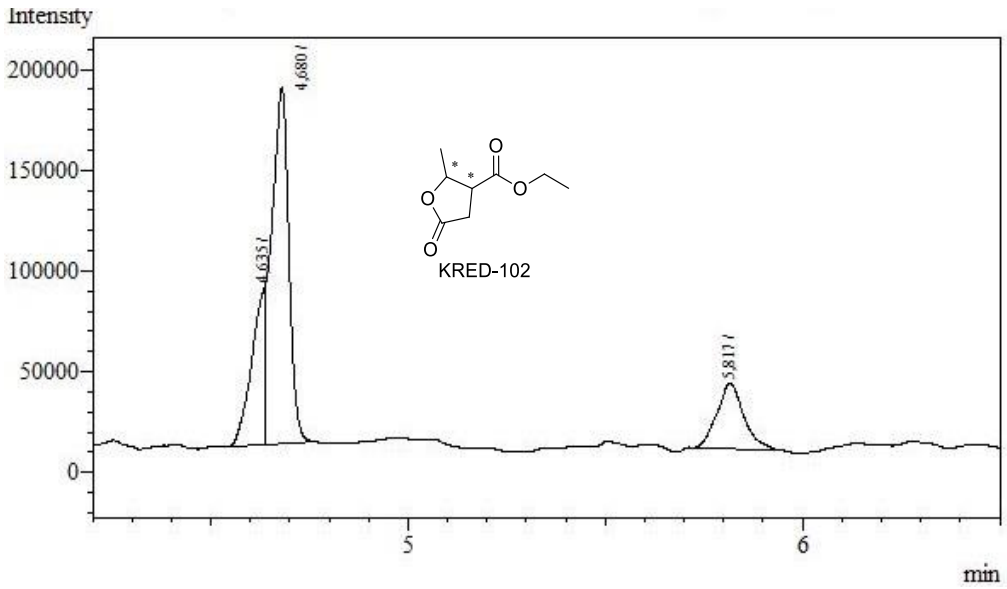


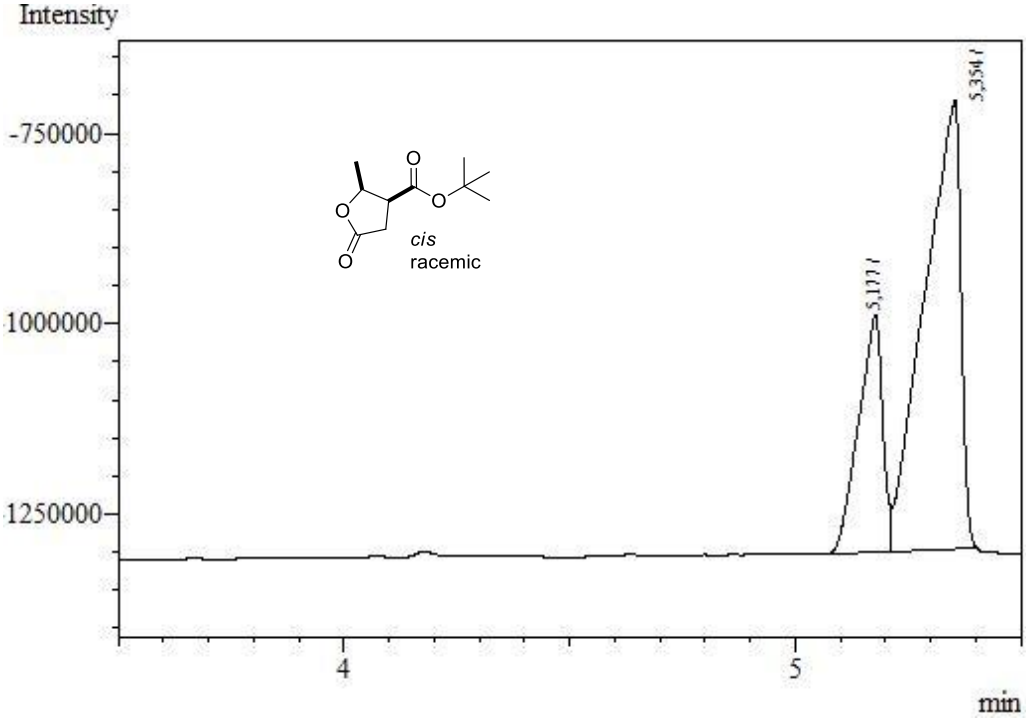

Intensity
0
-50000
100000
150000
200000
250000
OH
O
O
O
KRED-101
14,552 t
23,312 t
23,533 t
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
min

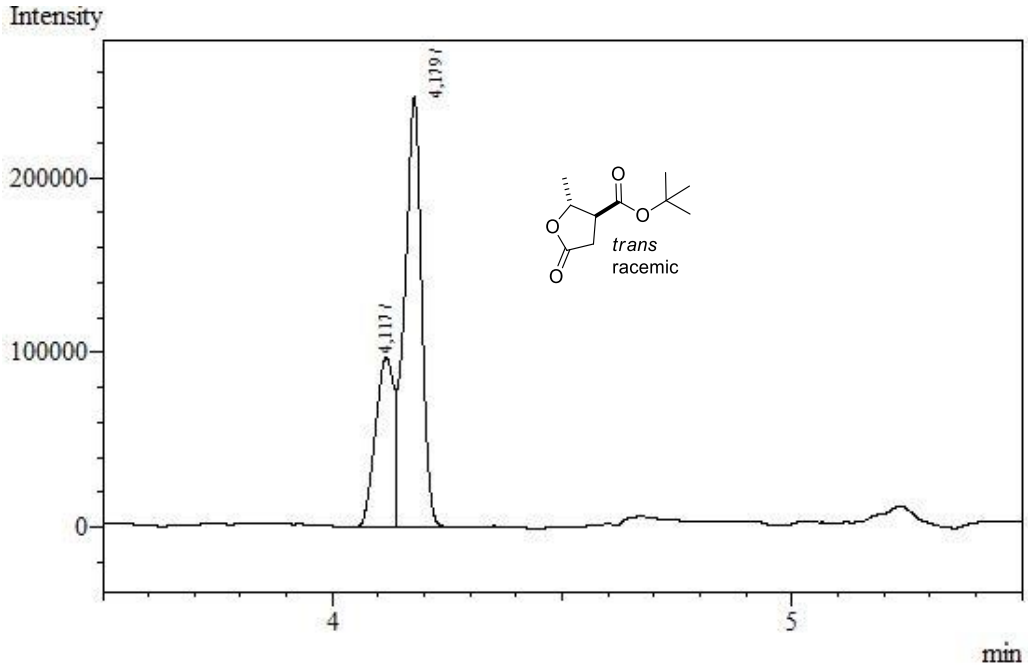

Intensity
400000
300000
200000
100000
0
O
O
O
O
O
cis
racemic
5,852 t
5,966 t
5
6
min

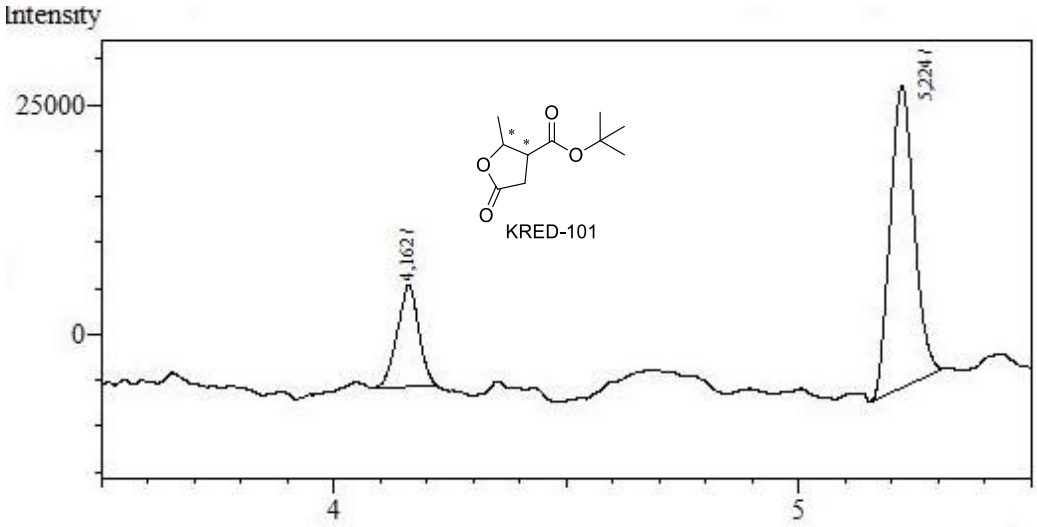

Intensity
75000
50000
25000
0
4,620
4,671
trans
racemic
5
6
min

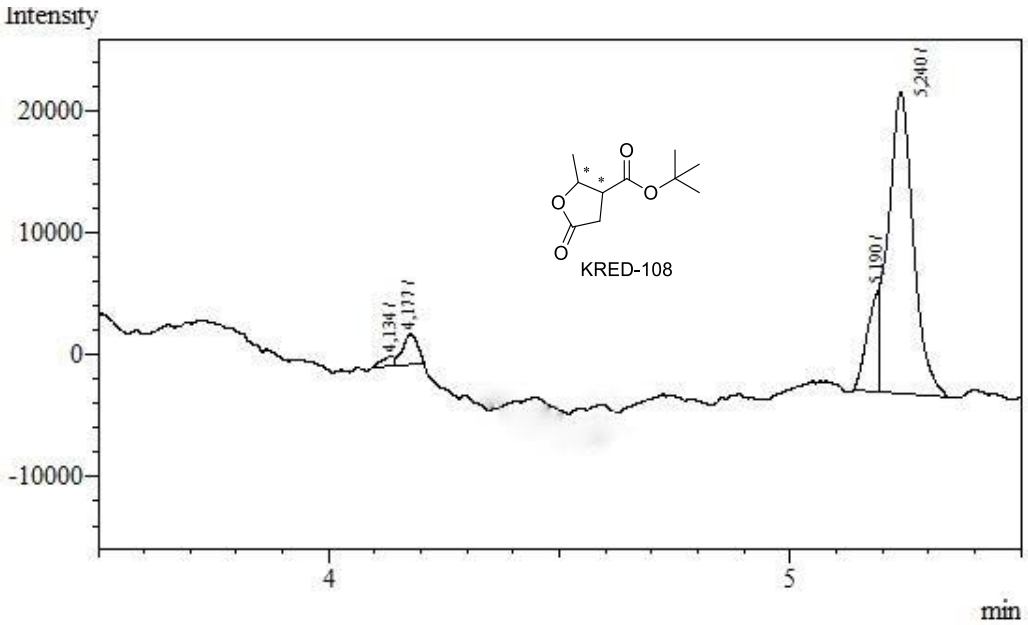

Intensity
-1950000
-1975000
-2000000
-2025000
4,638
4,685
5,192
5,844
KRED-108
5
6
min

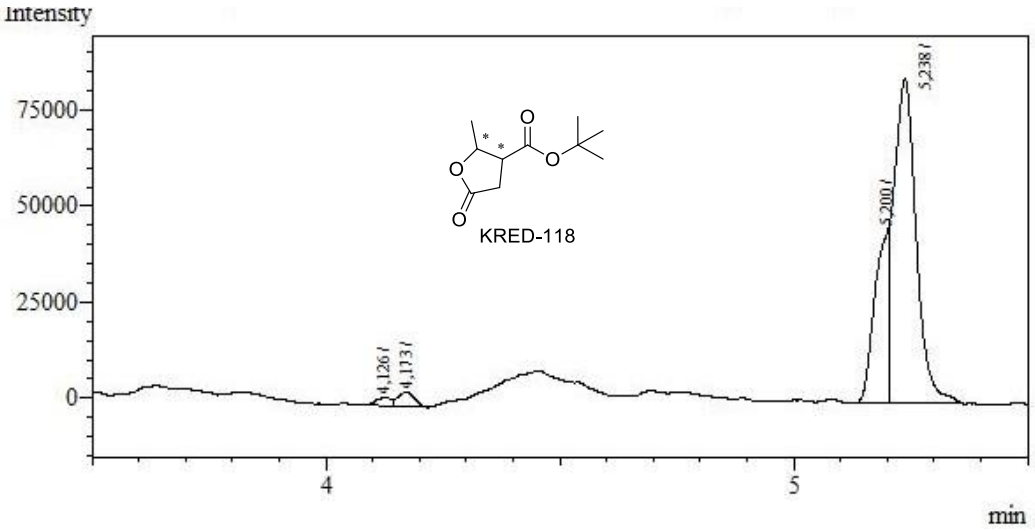

Intensity
200000
150000
100000
50000
0
4,680
4,635
5,817
KRED-102
5
6
min

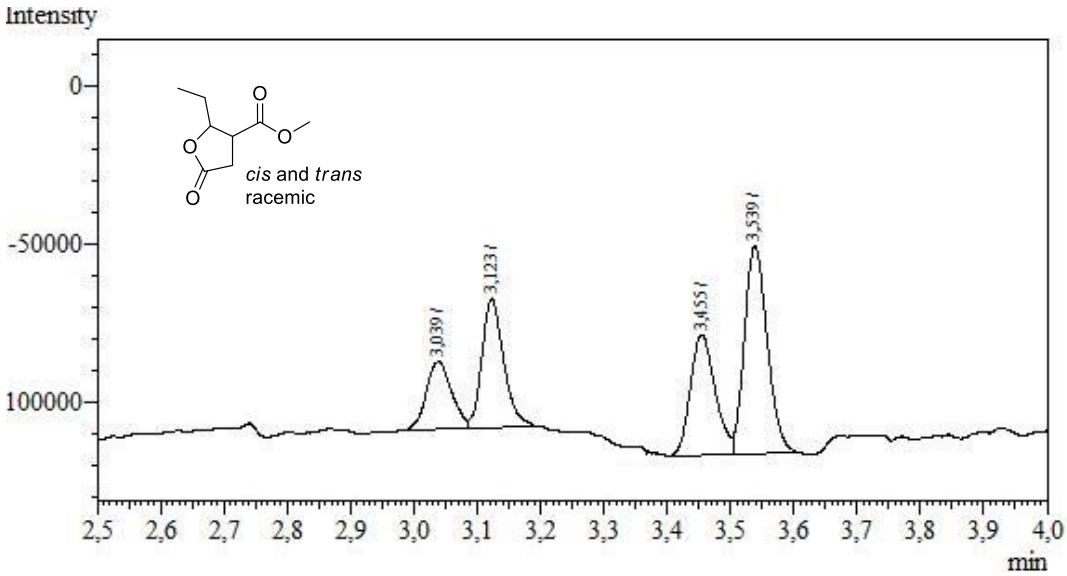

Intensity
-750000
1000000
1250000
5,354
5,177
cis
racemic
4
5
min

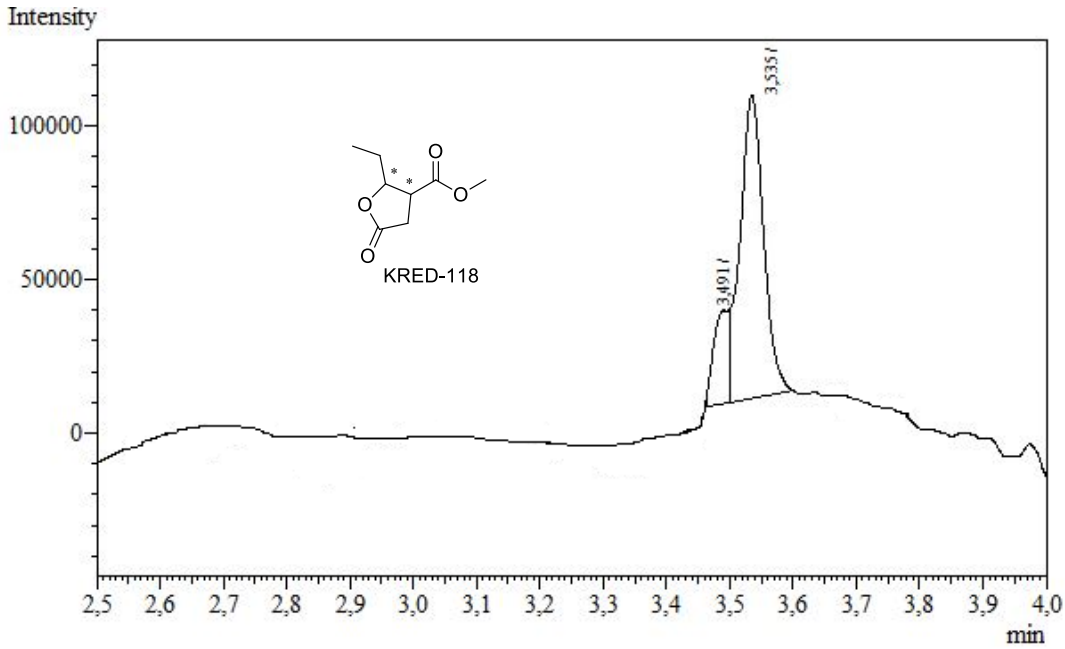

Intensity
200000
100000
0
4,117
4,179
trans
racemic
4
5
min


Intensity
25000
0
4,162
5,224
KRED-101
4
5

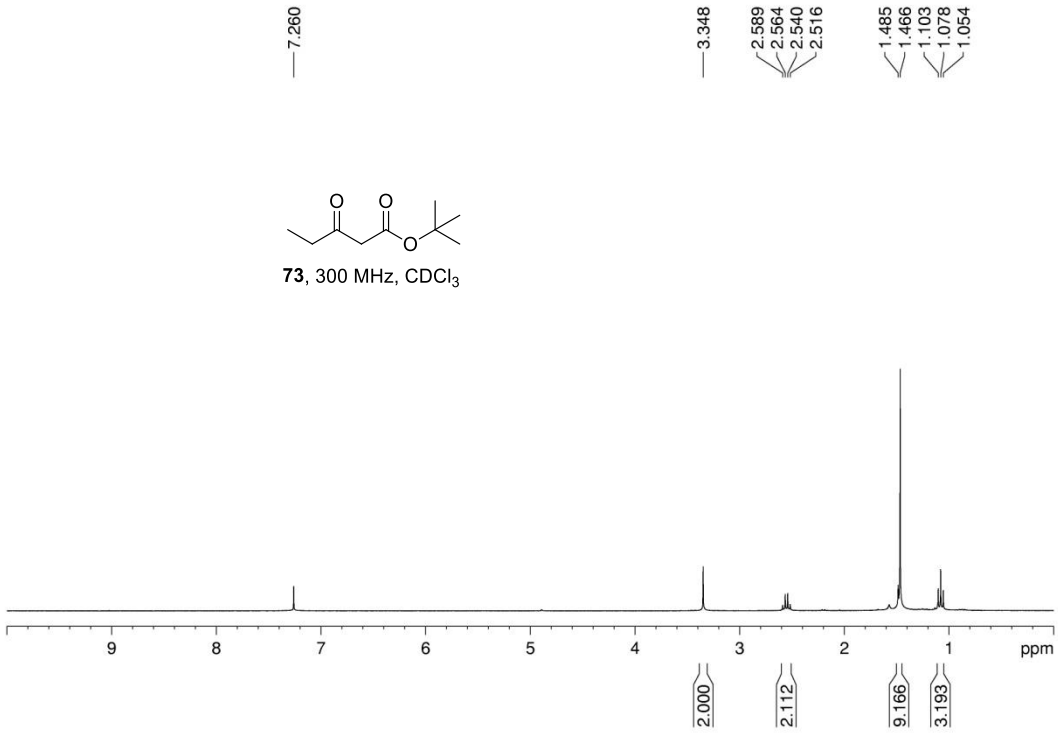

Intensity
20000
10000
0
-10000
4
5
min
4,134
4,177
5,190
5,240
KRED-108


Intensity
75000
50000
25000
0
4
5
min
4,126
4,173
5,200
5,238
KRED-118

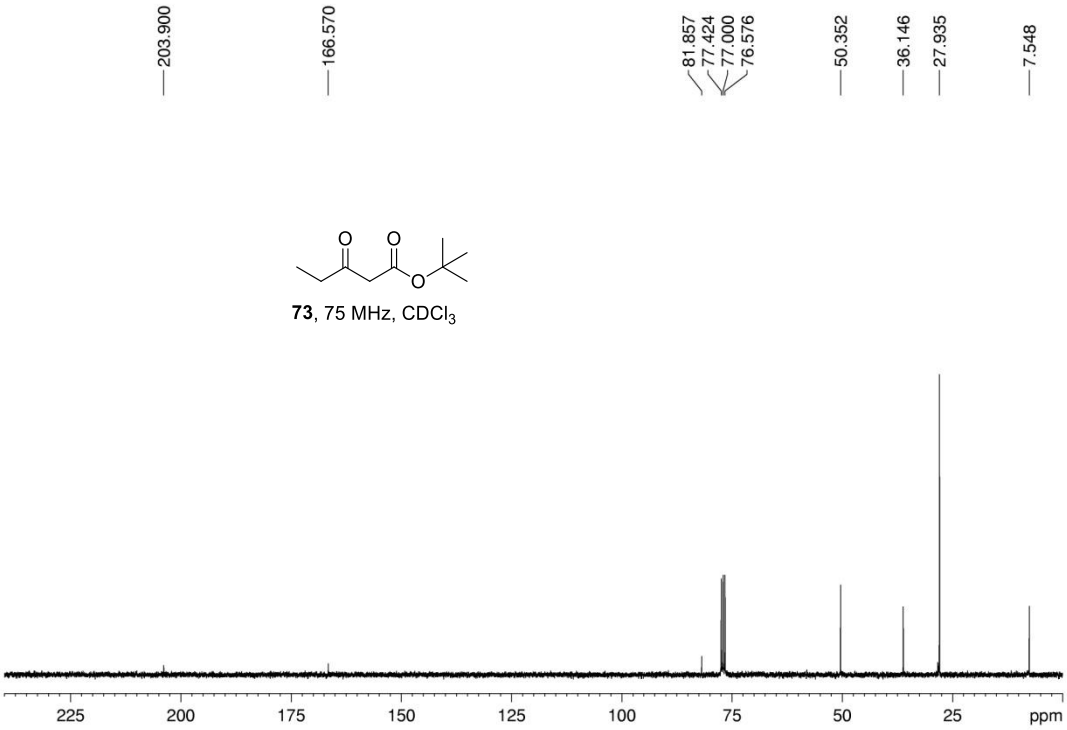

Intensity
0
-50000
100000
cis and trans
racemic
3,039 t
3,123 t
3,455 t
3,539 t
2,5 2,6 2,7 2,8 2,9 3,0 3,1 3,2 3,3 3,4 3,5 3,6 3,7 3,8 3,9 4,0
min


Intensity
100000
50000
0
KRED-118
3,491 t
3,535 t
2,5 2,6 2,7 2,8 2,9 3,0 3,1 3,2 3,3 3,4 3,5 3,6 3,7 3,8 3,9 4,0
min

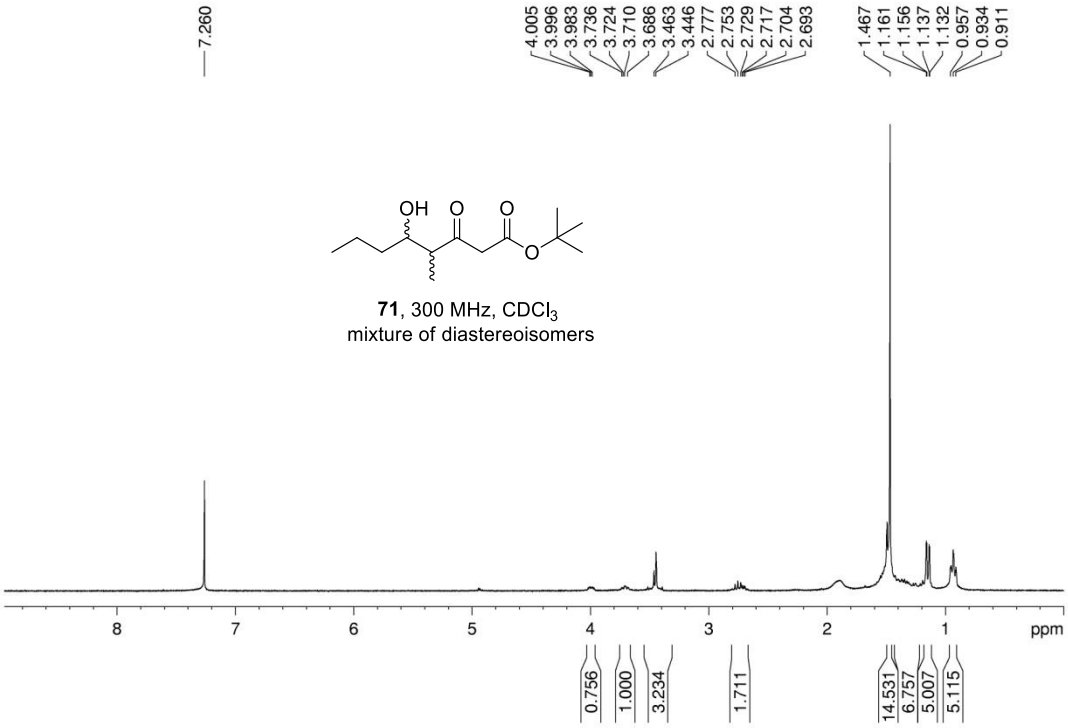
Φάσματα ^{1}H και ^{13}C NMR



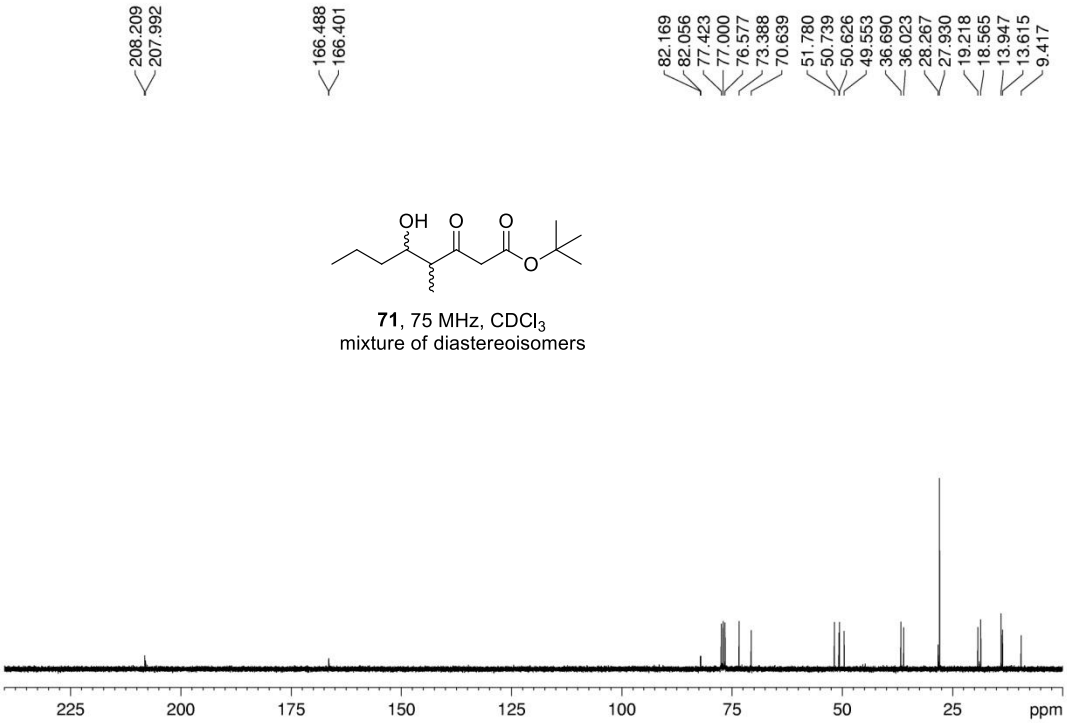
73, 300 MHz, $CDCl_3$



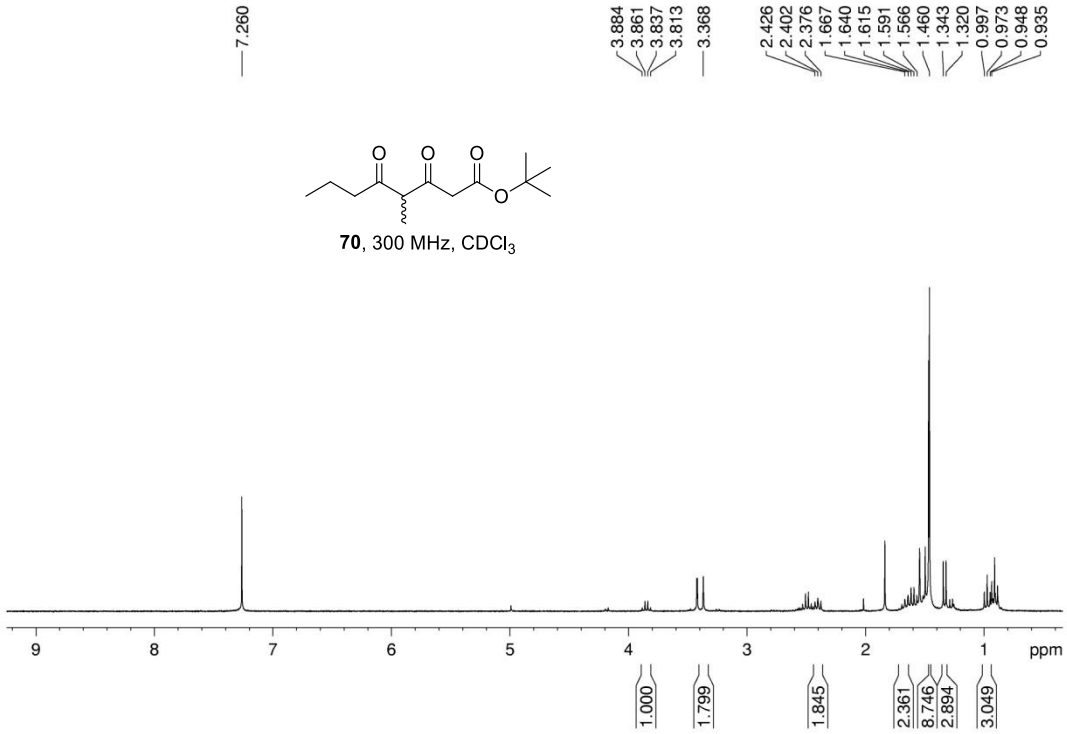
73, 75 MHz, $CDCl_3$



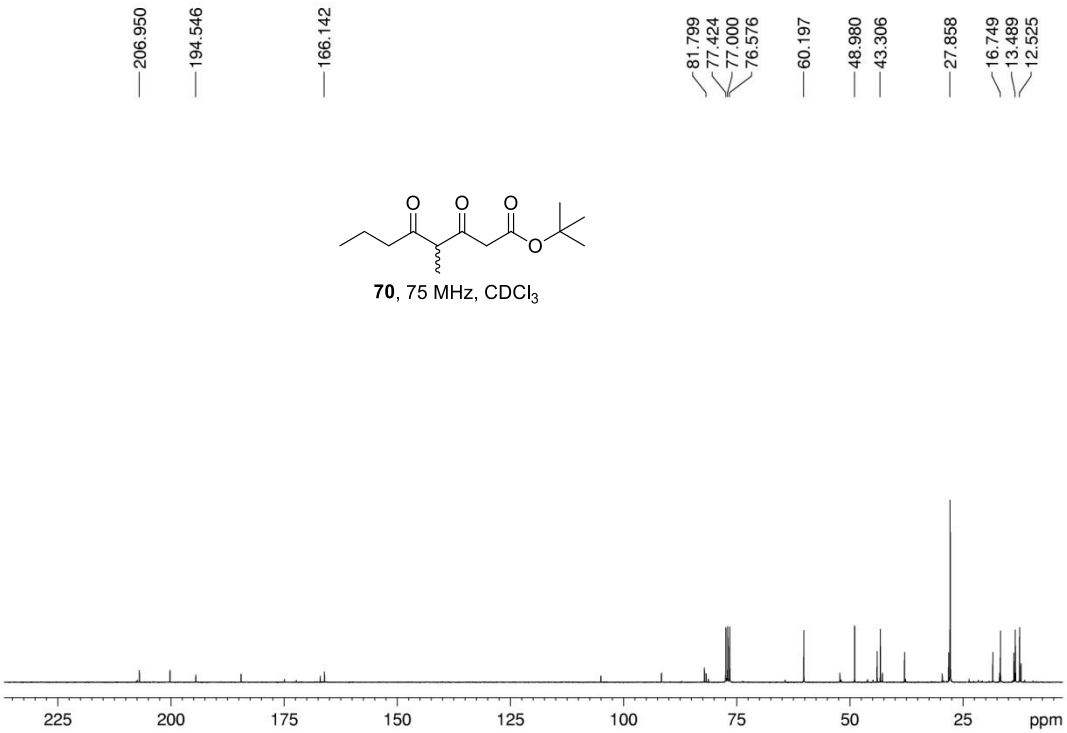
71, 300 MHz, $CDCl_3$
mixture of diastereoisomers



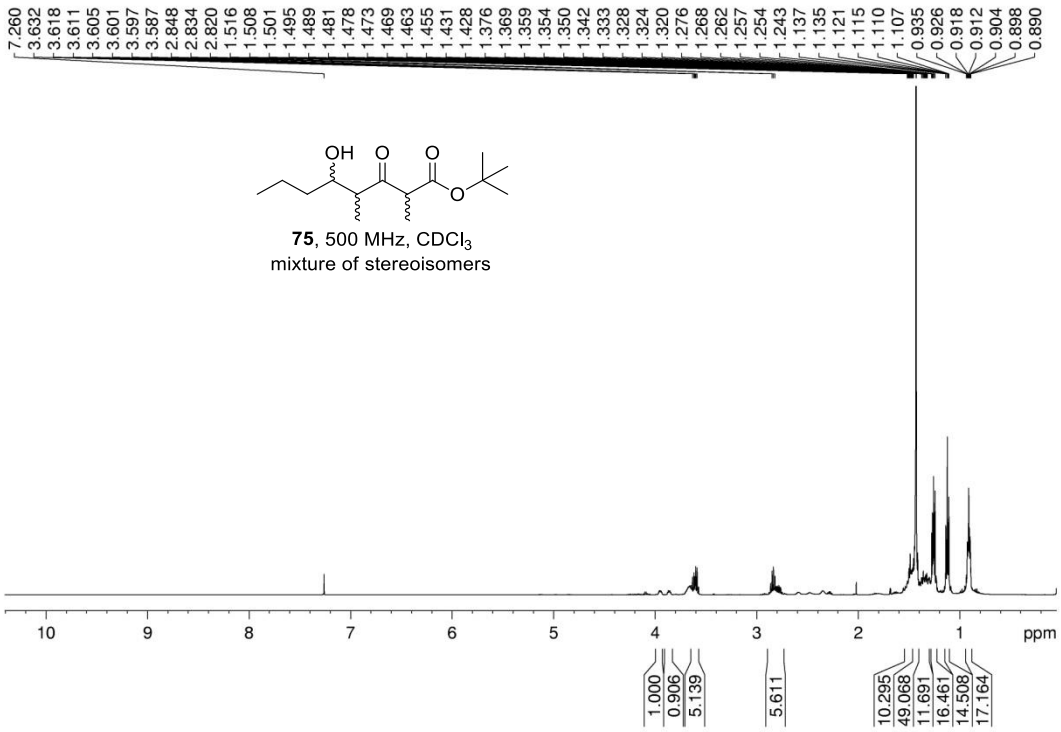
71, 75 MHz, $CDCl_3$
mixture of diastereoisomers



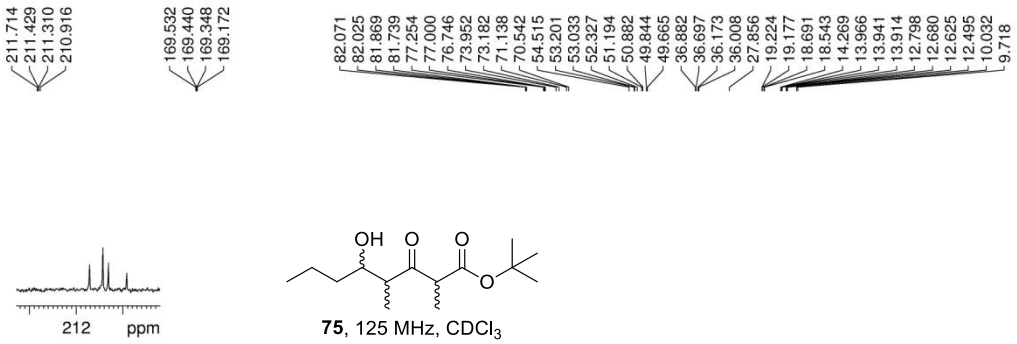
70, 300 MHz, $CDCl_3$



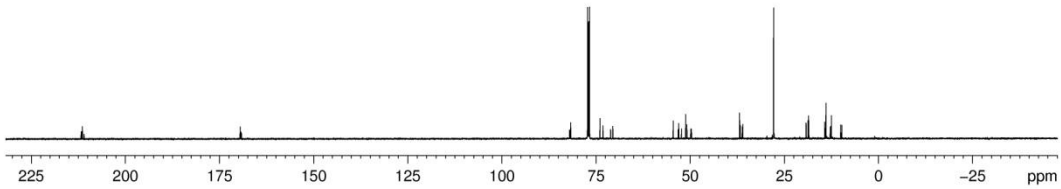
70, 75 MHz, $CDCl_3$

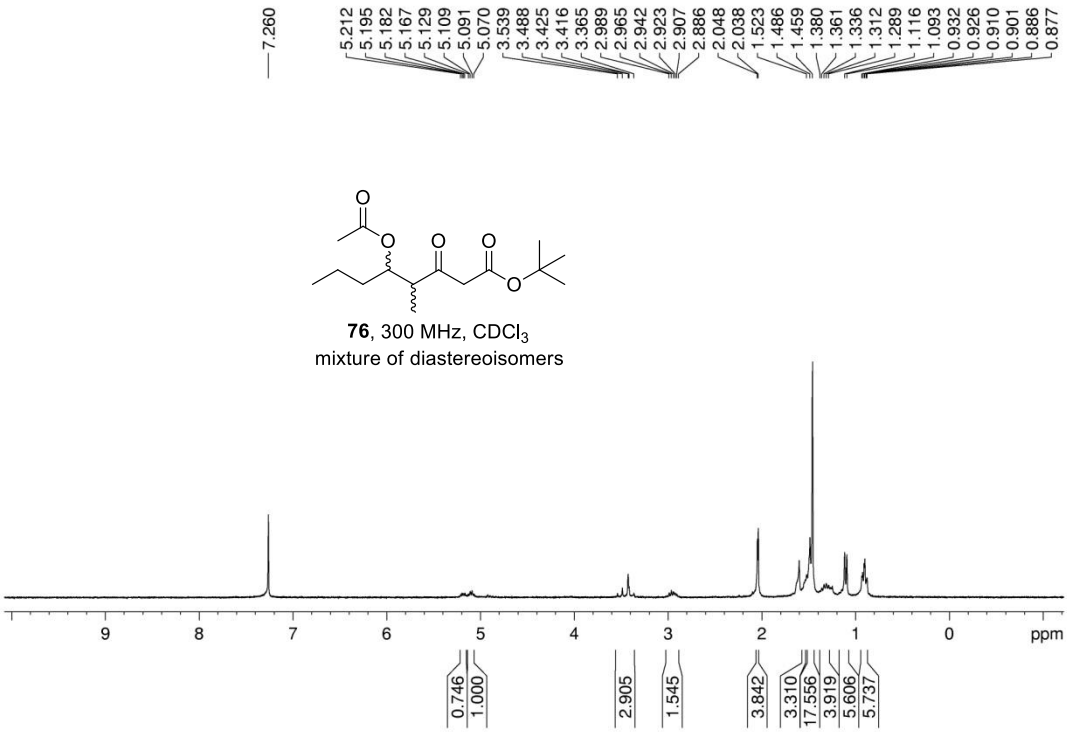


75, 500 MHz, $CDCl_3$
mixture of stereoisomers

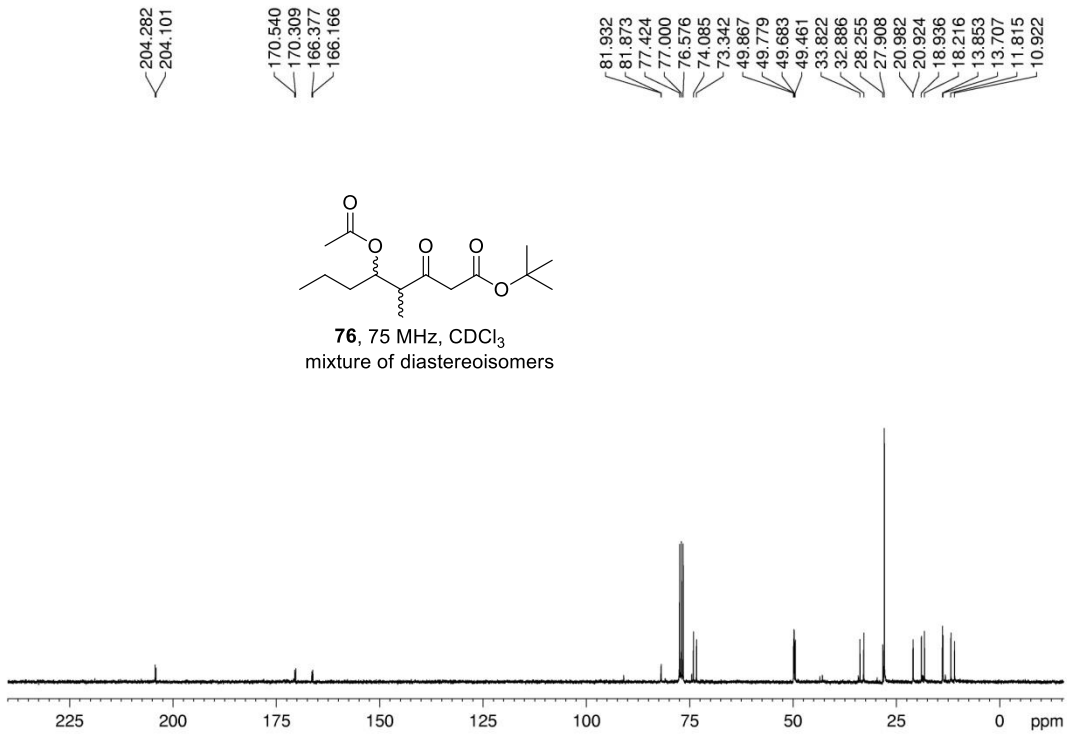


75, 125 MHz, $CDCl_3$
mixture of stereoisomers

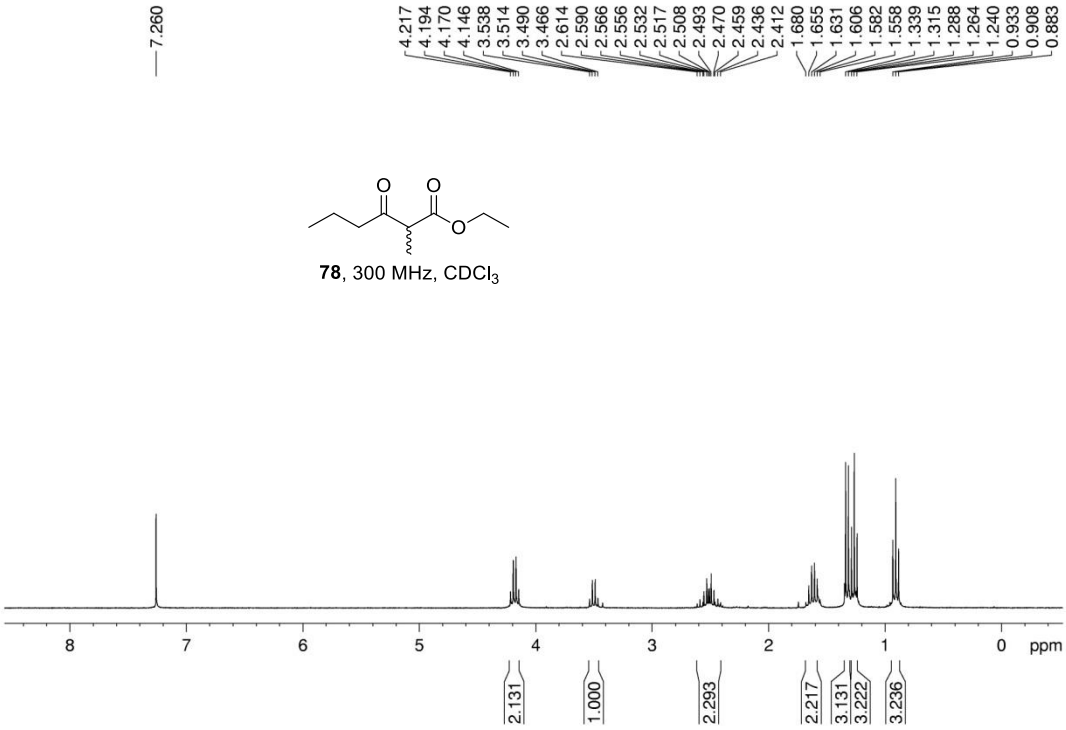




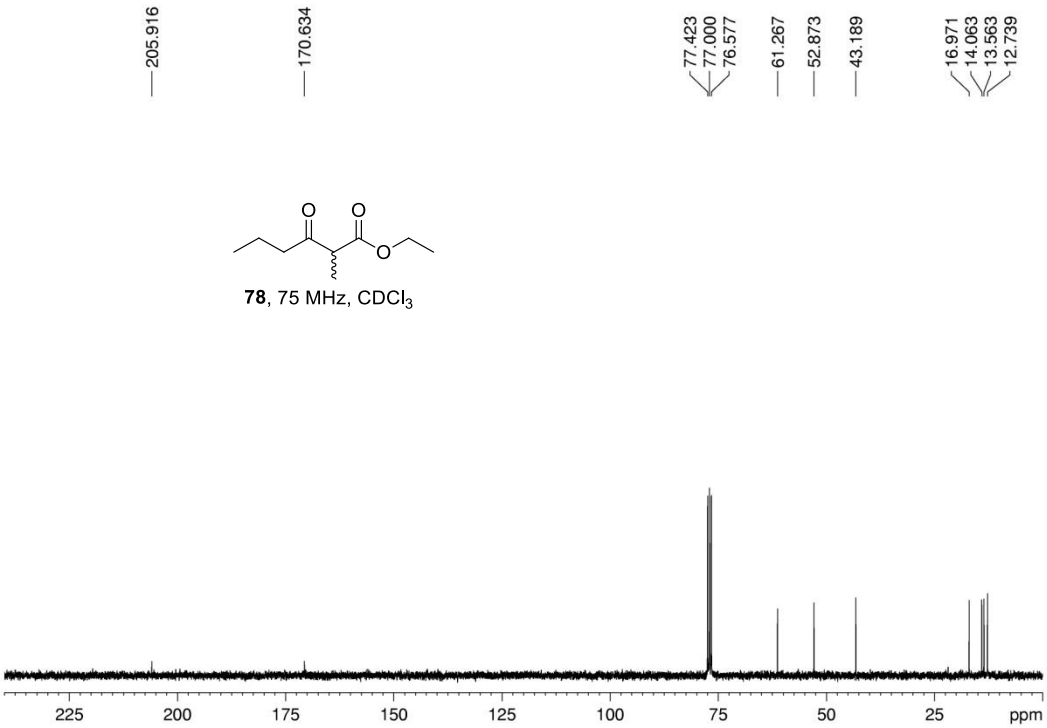
76, 300 MHz, $CDCl_3$
mixture of diastereoisomers



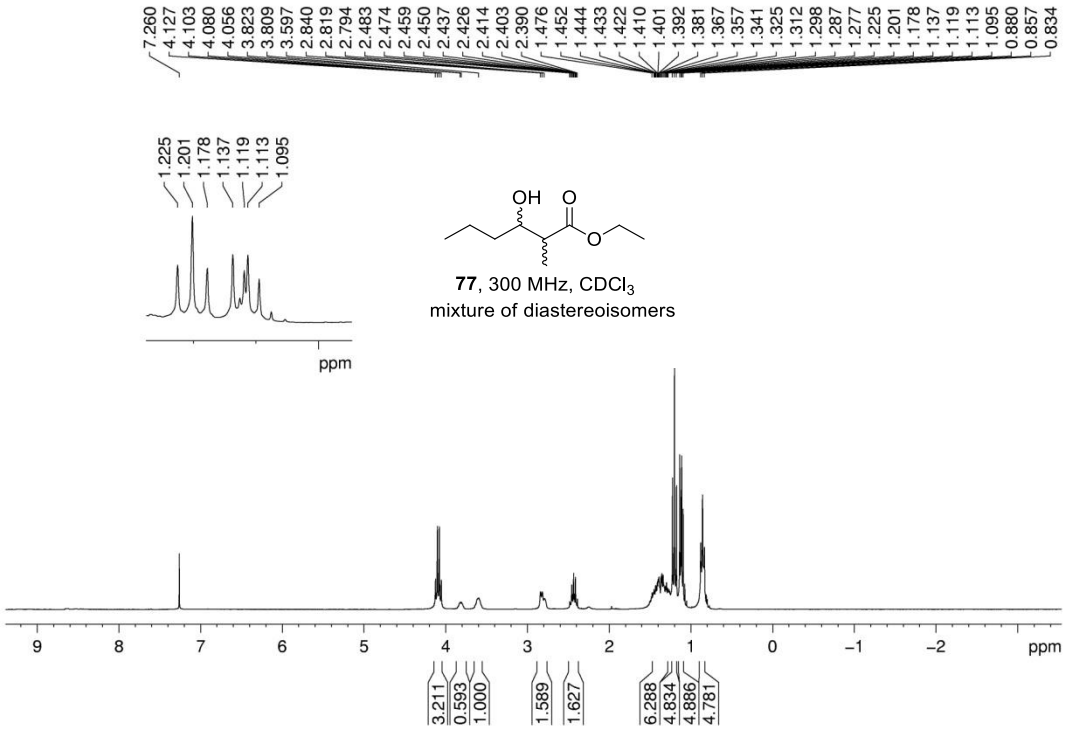
76, 75 MHz, $CDCl_3$
mixture of diastereoisomers



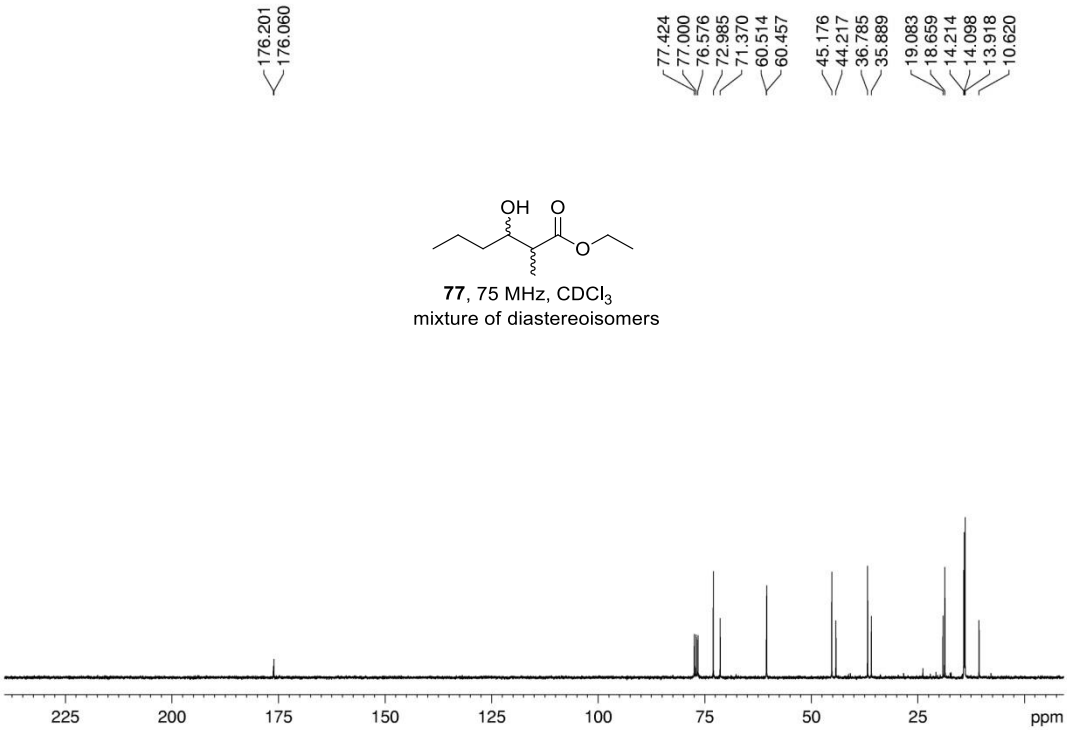
78, 300 MHz, $CDCl_3$



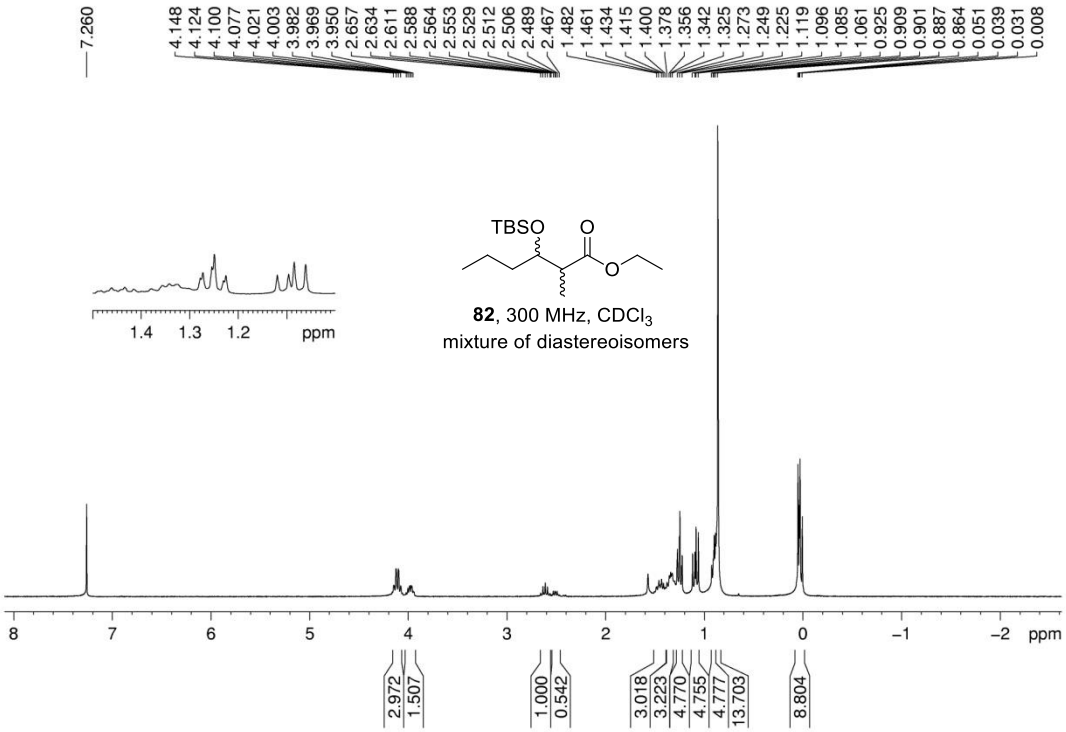
78, 75 MHz, $CDCl_3$

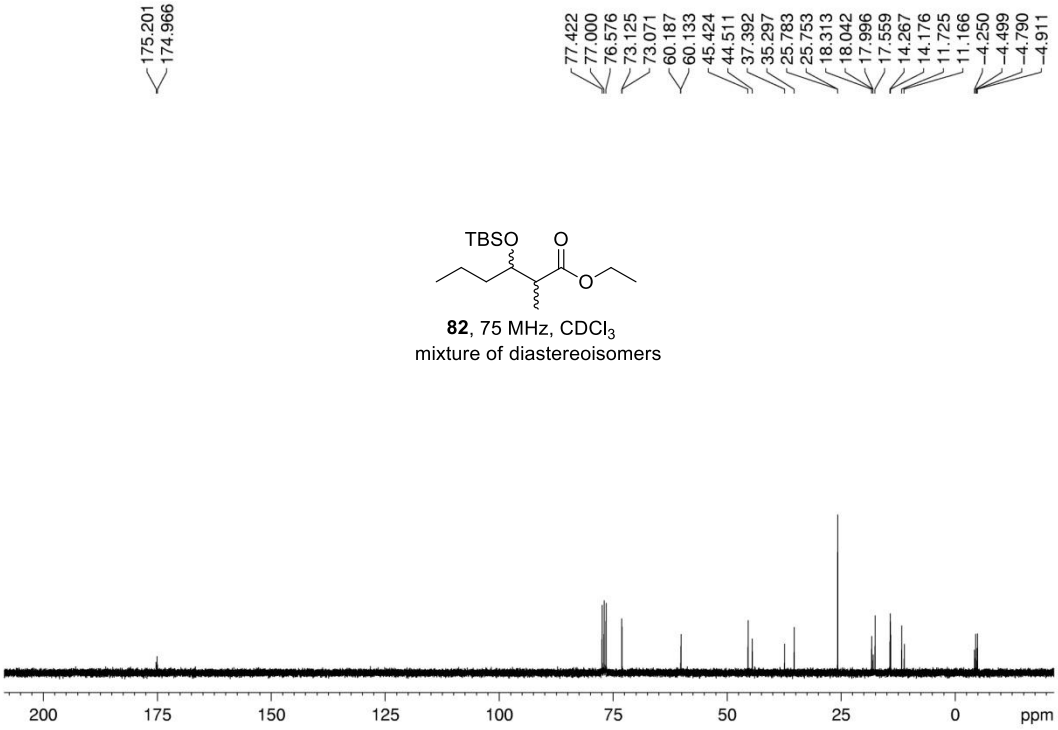


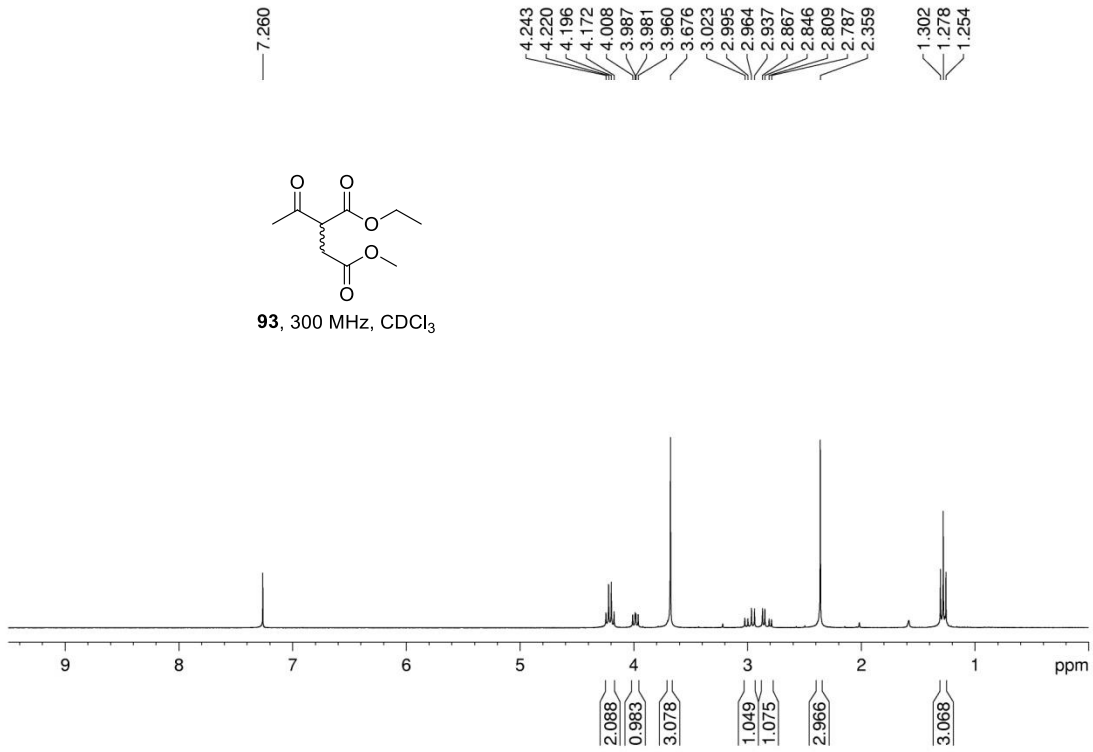
77, 300 MHz, $CDCl_3$
mixture of diastereoisomers



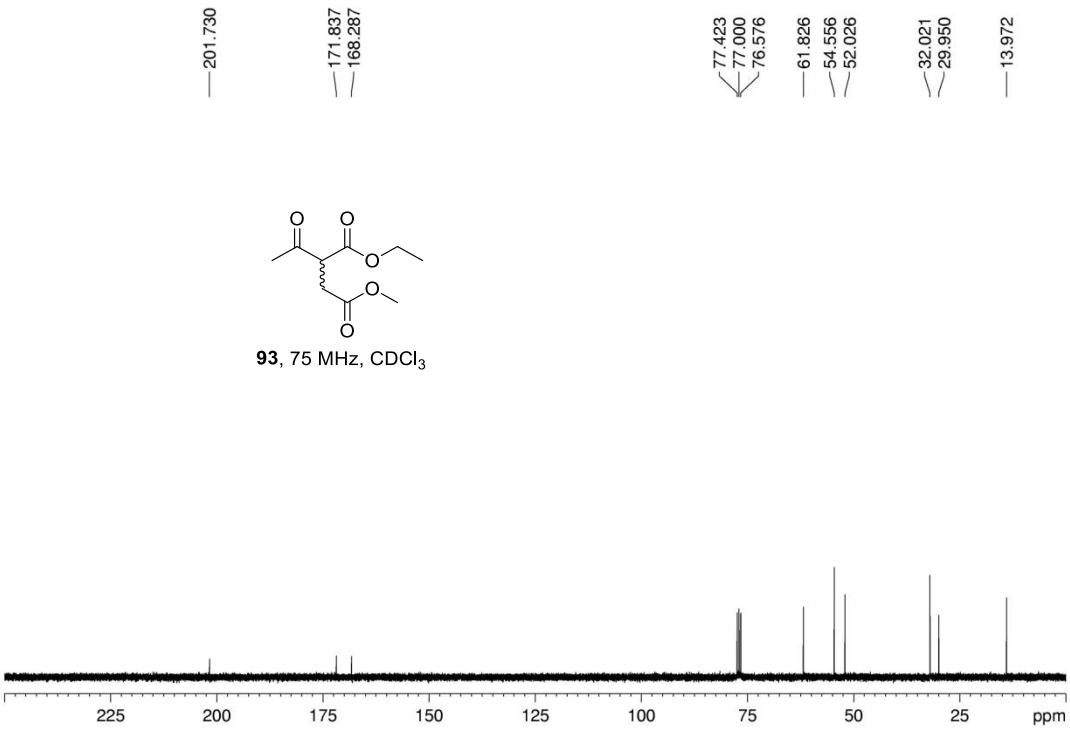
77, 75 MHz, $CDCl_3$
mixture of diastereoisomers


7.260
4.148
4.124
4.100
4.077
4.021
4.003
3.982
3.969
3.950
2.657
2.634
2.611
2.588
2.564
2.553
2.529
2.512
2.506
2.489
2.467
1.482
1.461
1.434
1.415
1.400
1.378
1.356
1.342
1.325
1.273
1.249
1.225
1.119
1.096
1.085
1.061
0.925
0.909
0.901
0.887
0.864
0.051
0.039
0.031
0.008
TBSO
O
O
82, 300 MHz, CDCl3
mixture of diastereoisomers
1.4
1.3
1.2
ppm
8
7
6
5
4
3
2
1
0
−1
−2
ppm
2.972
1.507
1.000
0.542
3.018
3.223
4.770
4.755
4.777
13.703
8.804

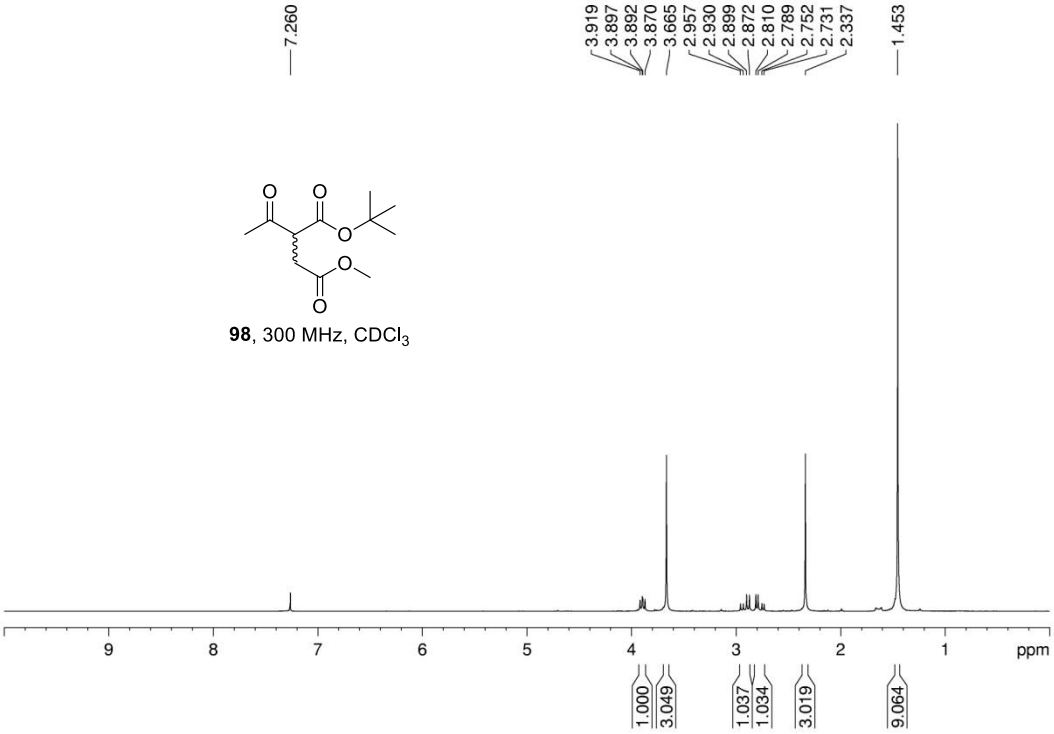

175.201
174.966
77.422
77.000
76.576
73.125
73.071
60.187
60.133
45.424
44.511
37.392
35.297
25.783
25.753
18.313
18.042
17.996
17.559
14.267
14.176
11.725
11.166
−4.250
−4.499
−4.790
−4.911
TBSO
O
O
82, 75 MHz, CDCl3
mixture of diastereoisomers
200
175
150
125
100
75
50
25
0
ppm



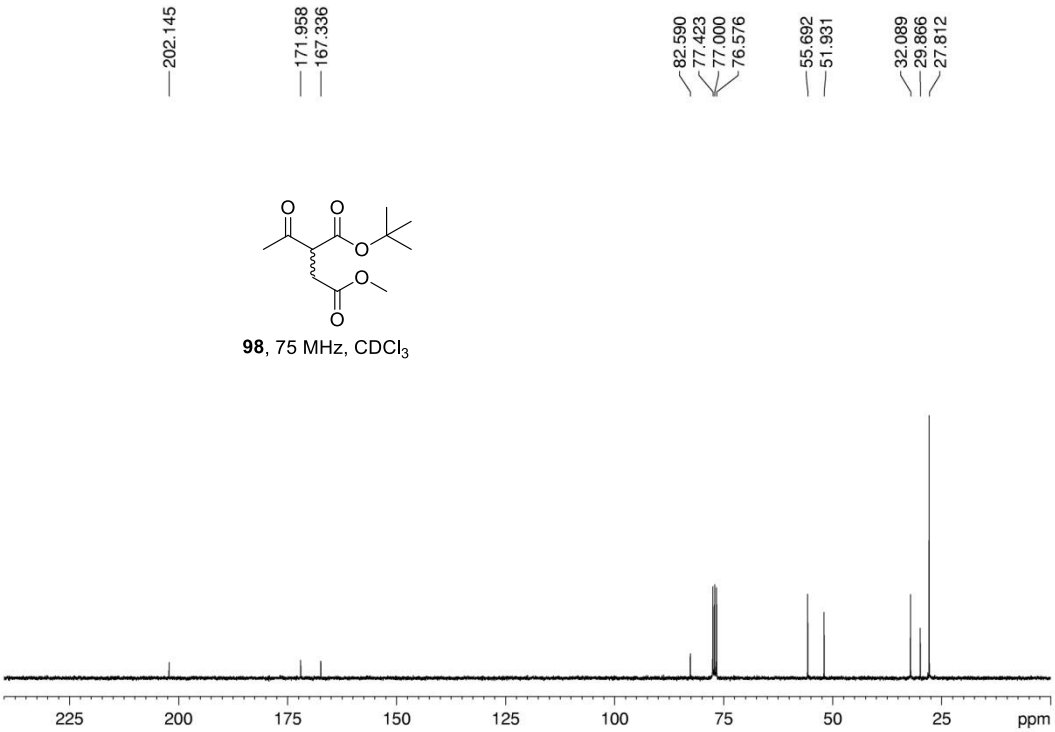
93, 300 MHz, $CDCl_3$



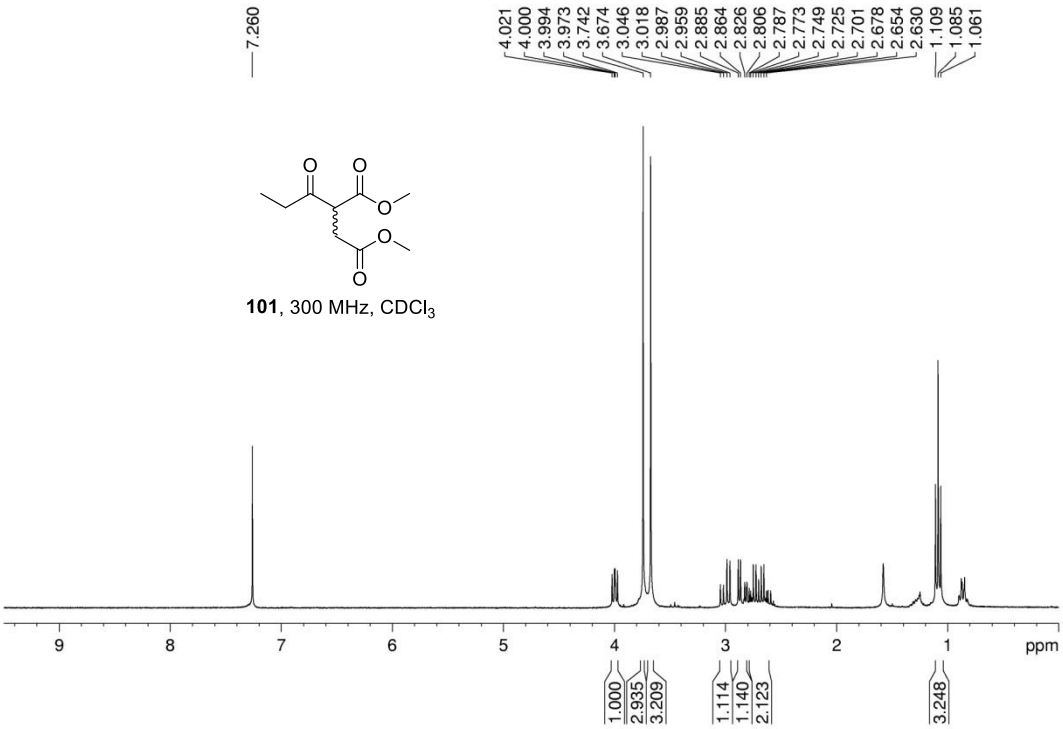
93, 75 MHz, $CDCl_3$



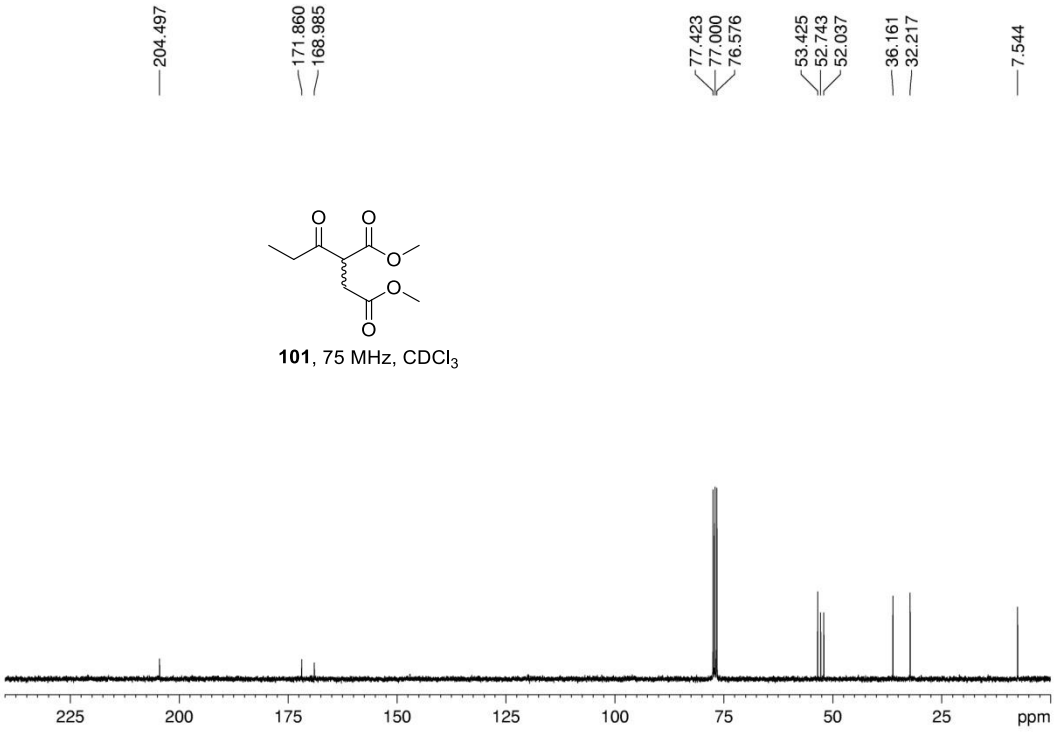
98, 300 MHz, $CDCl_3$



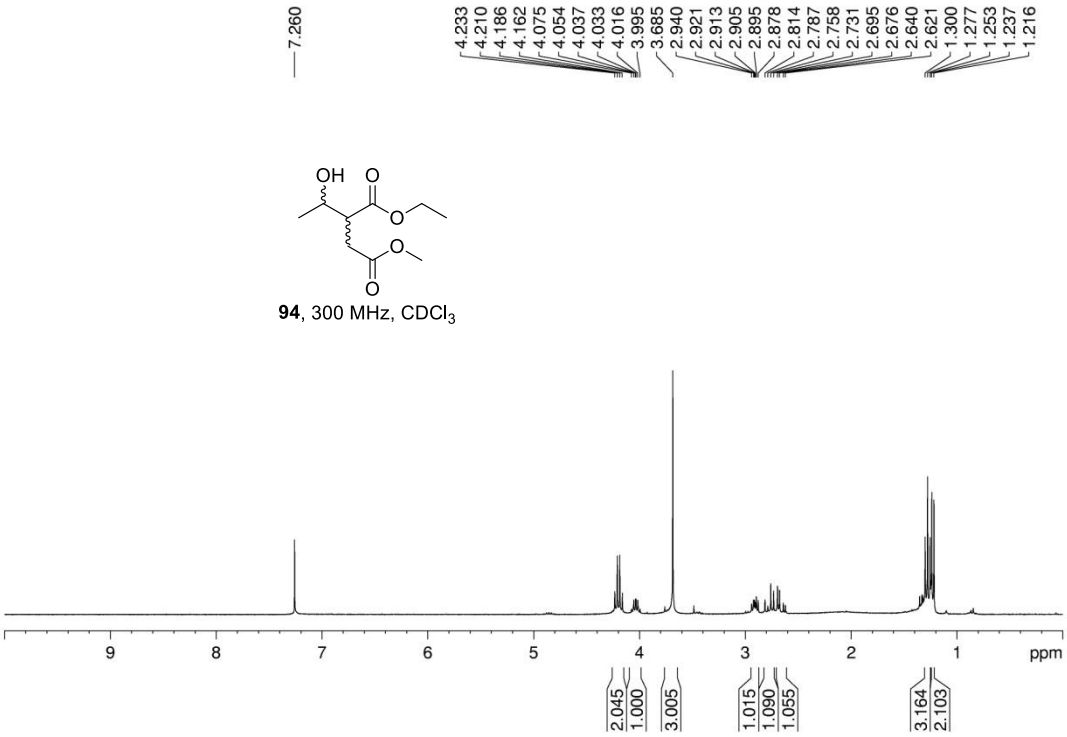
98, 75 MHz, $CDCl_3$



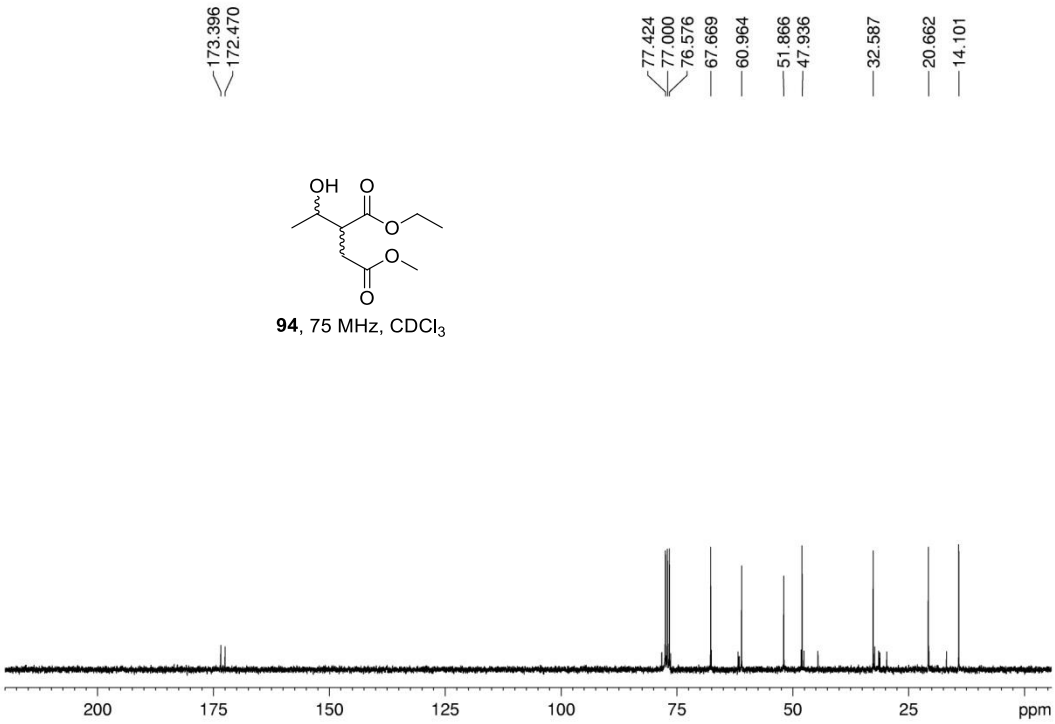
101, 300 MHz, $CDCl_3$



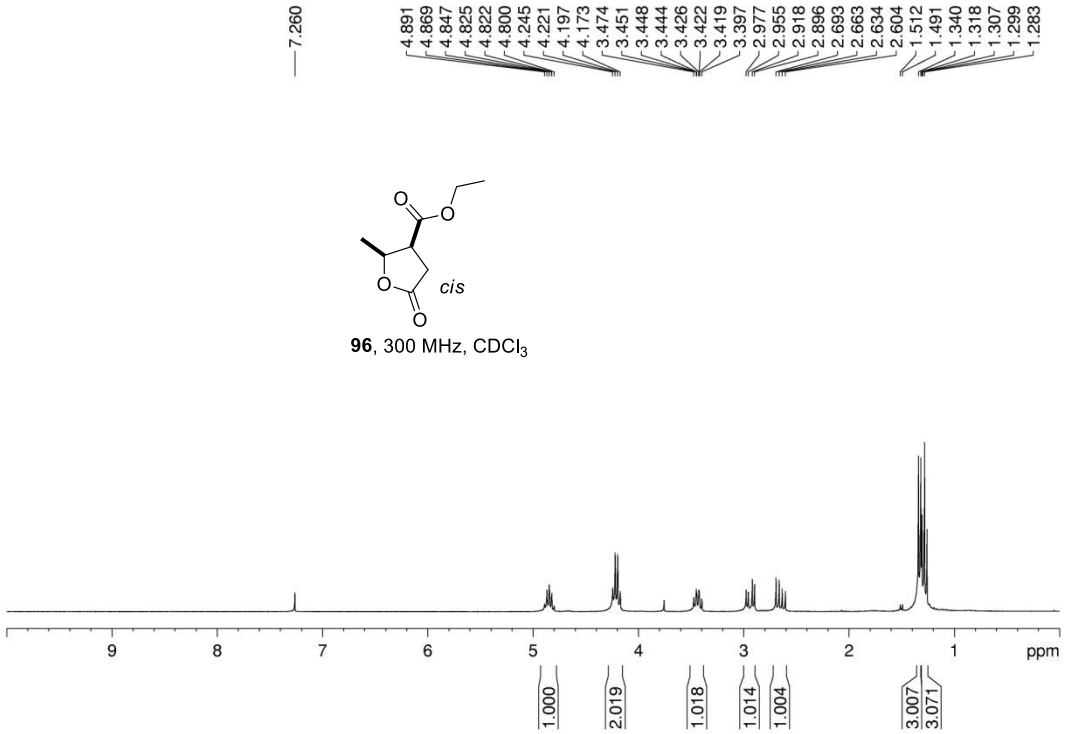
101, 75 MHz, $CDCl_3$



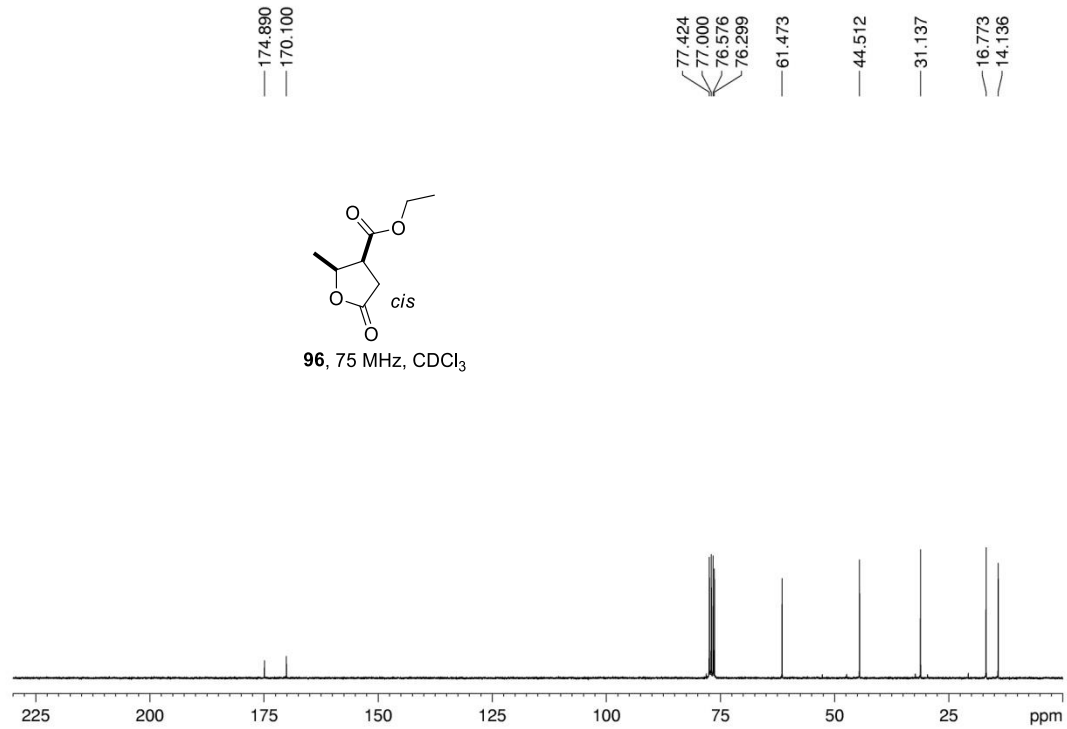
94, 300 MHz, $CDCl_3$



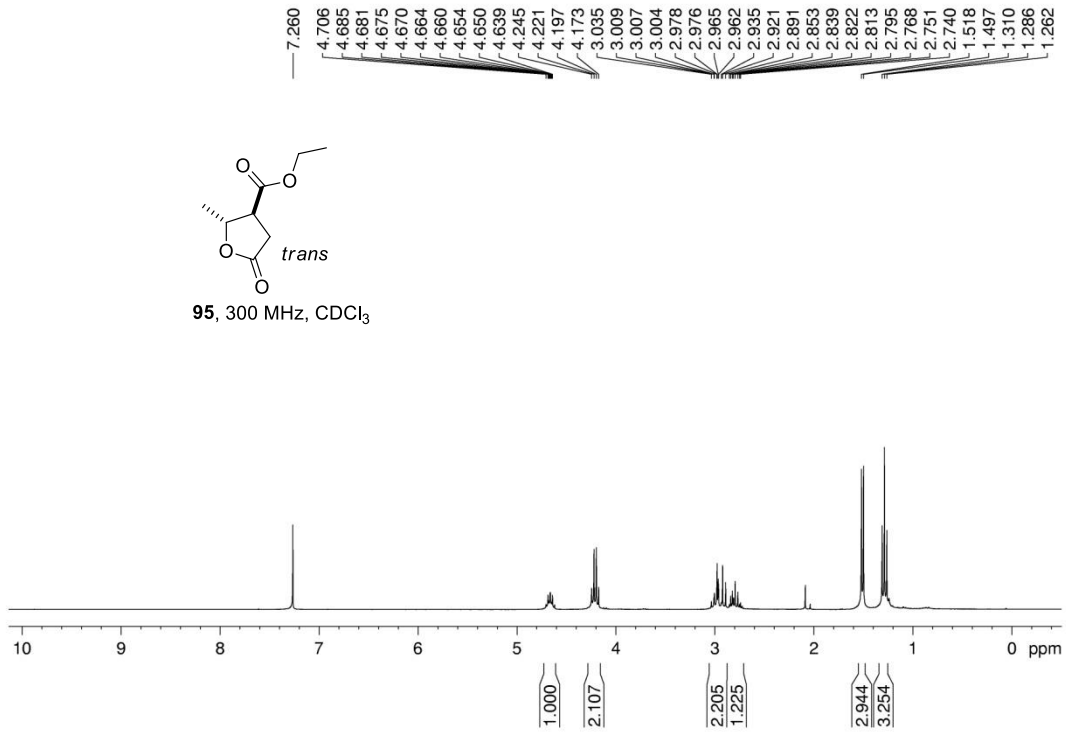
94, 75 MHz, $CDCl_3$



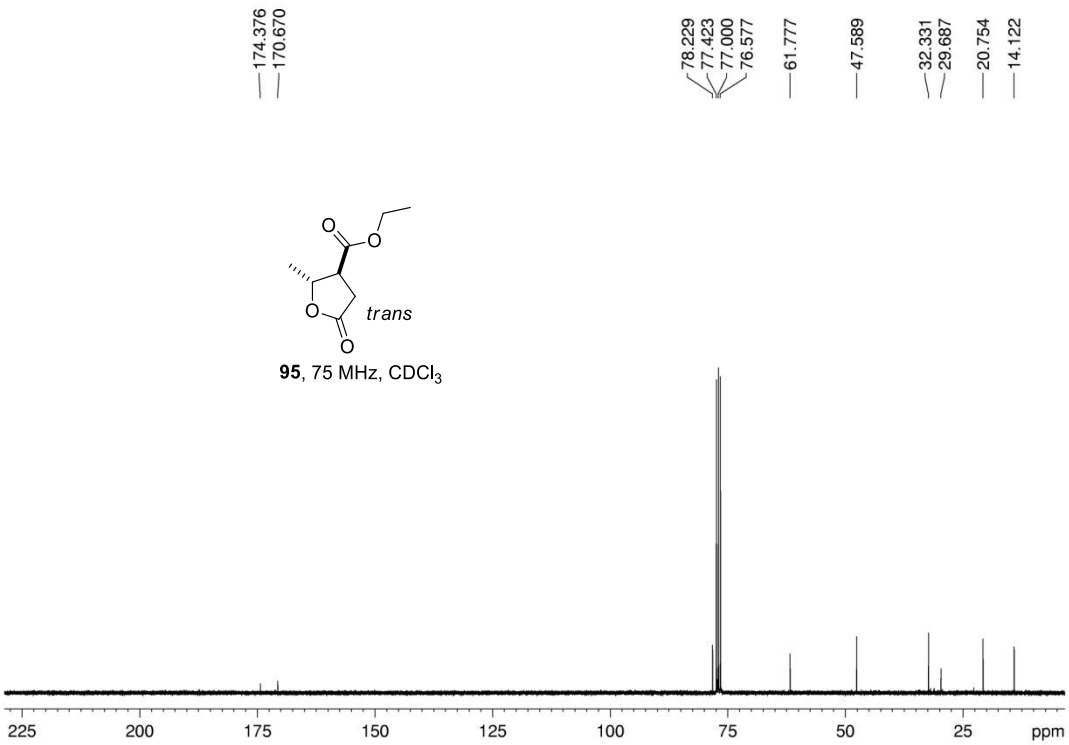
96, 300 MHz, $CDCl_3$



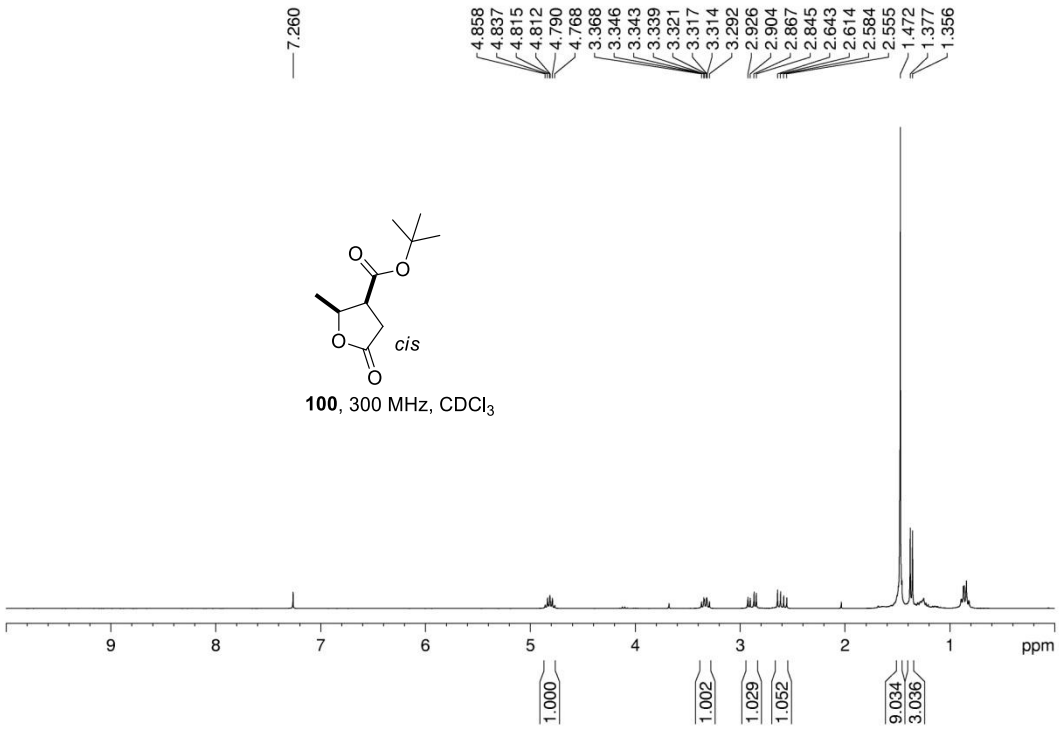
96, 75 MHz, $CDCl_3$



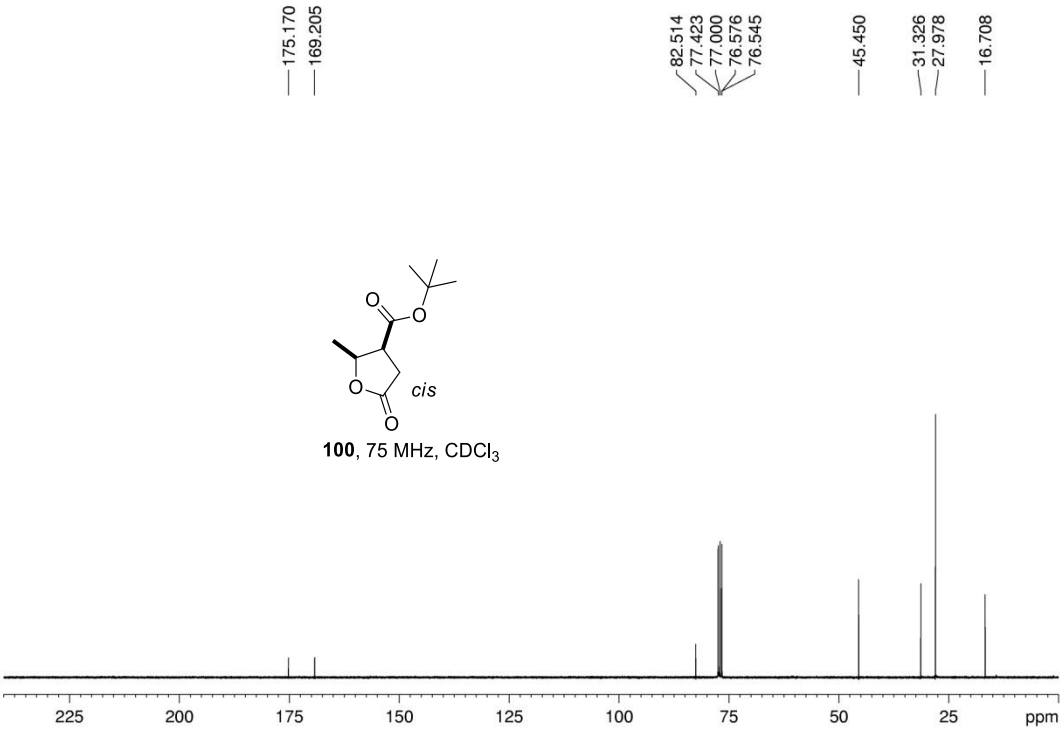
95, 300 MHz, $CDCl_3$



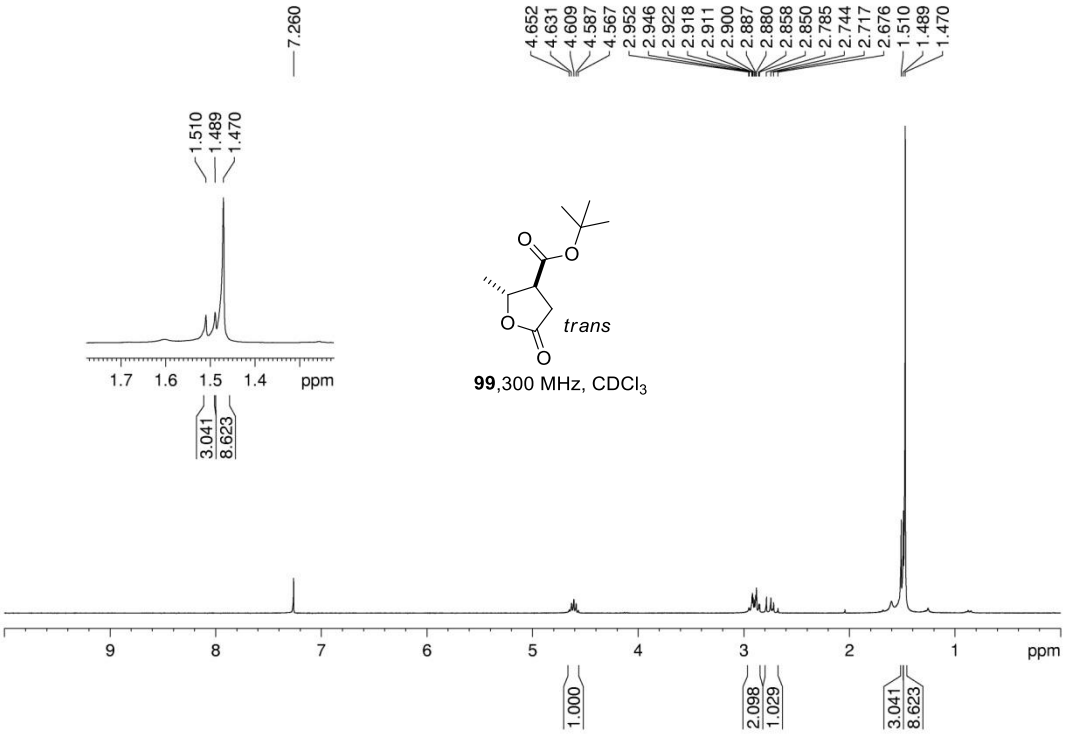
95, 75 MHz, $CDCl_3$

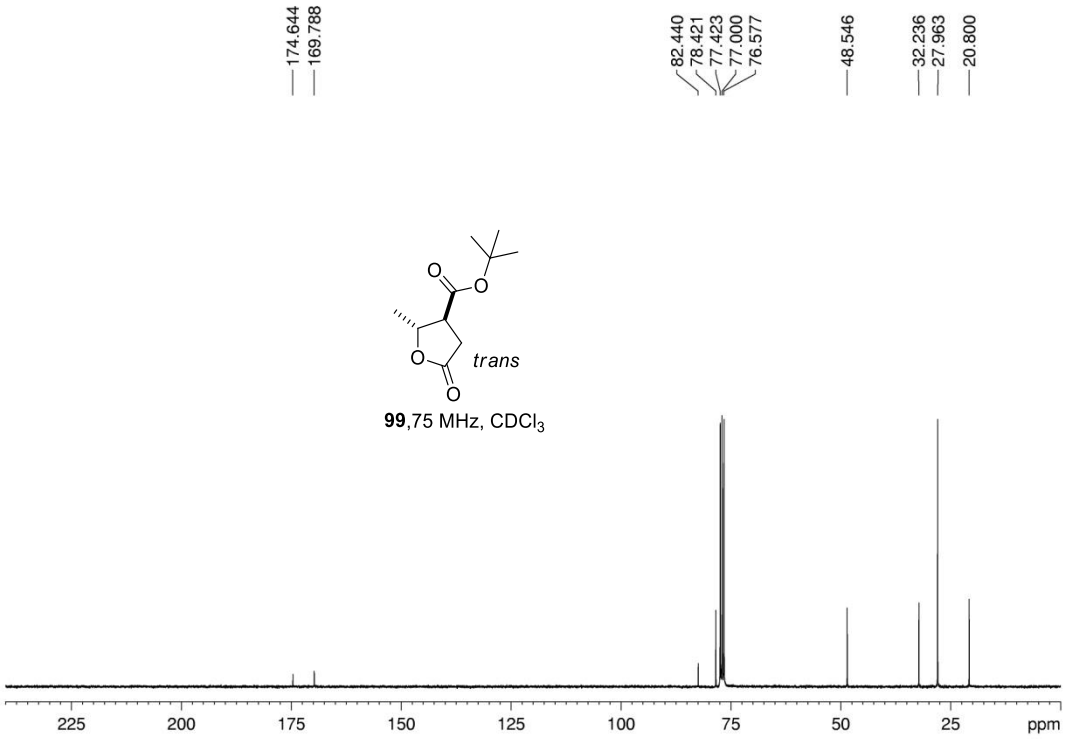


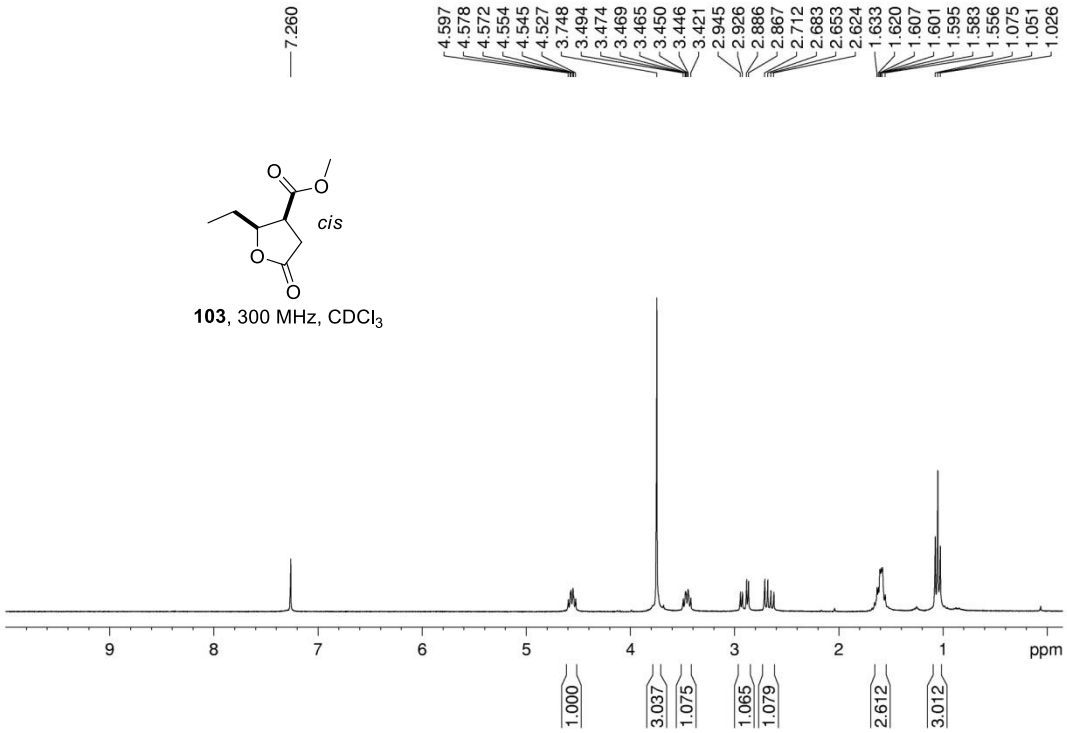
100, 300 MHz, $CDCl_3$



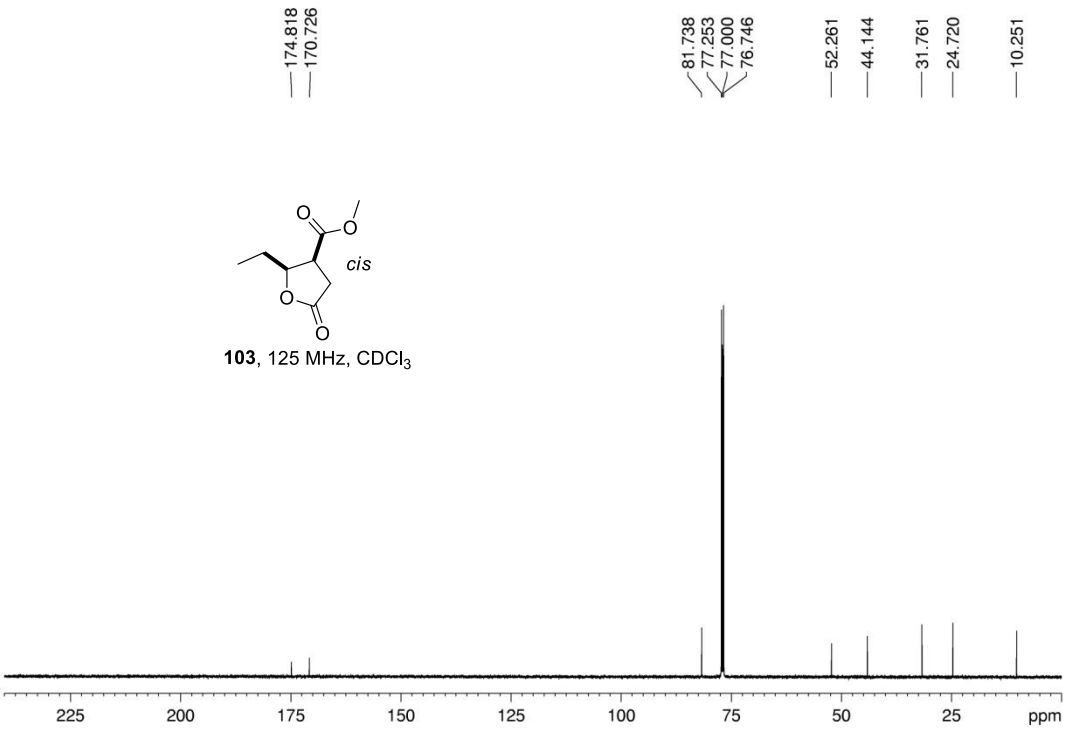
100, 75 MHz, $CDCl_3$


7.260
4.652
4.631
4.609
4.587
4.567
2.952
2.946
2.922
2.918
2.911
2.900
2.887
2.880
2.858
2.850
2.785
2.744
2.717
2.676
1.510
1.489
1.470
1.510
1.489
1.470
1.7 1.6 1.5 1.4 ppm
3.041
8.623
trans
99,300 MHz, CDCl3
9 8 7 6 5 4 3 2 1 ppm
1.000
2.098
1.029
3.041
8.623

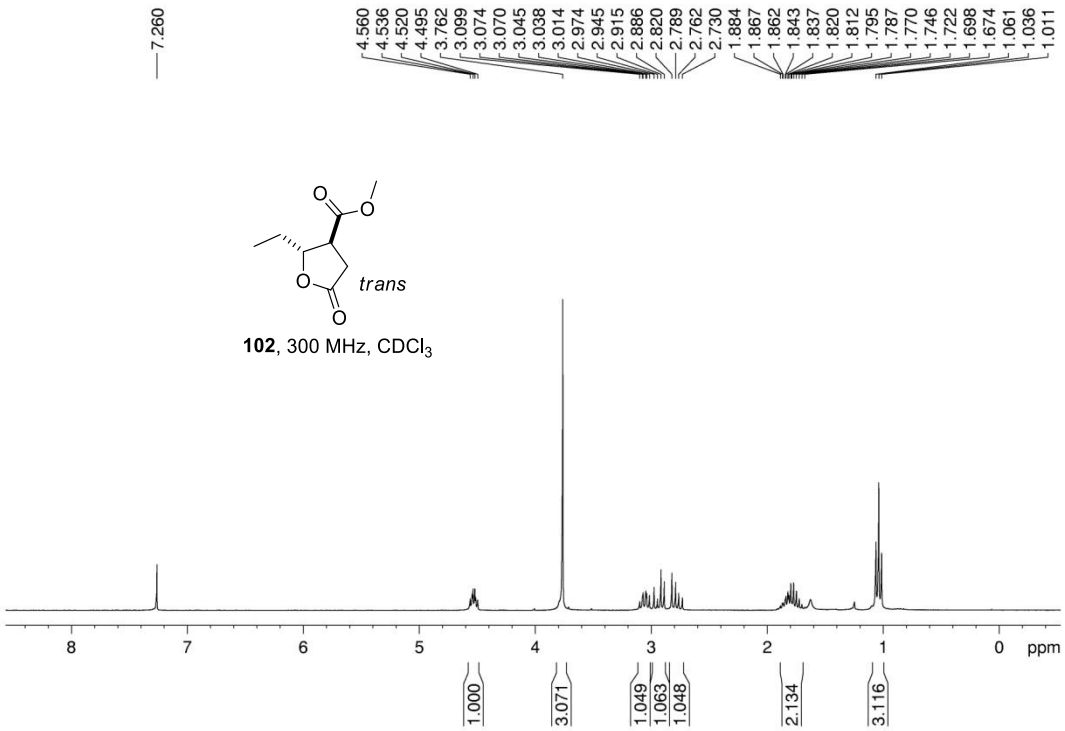

174.644
169.788
82.440
78.421
77.423
77.000
76.577
48.546
32.236
27.963
20.800
trans
99,75 MHz, CDCl3
225 200 175 150 125 100 75 50 25 ppm



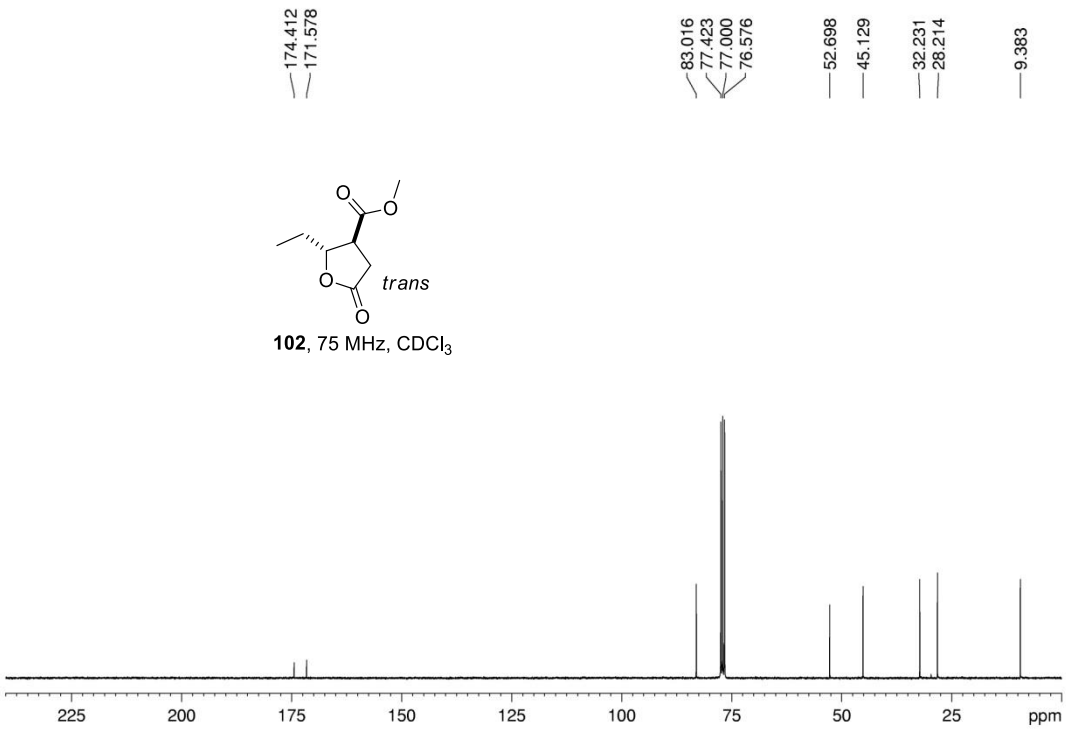
103, 300 MHz, $CDCl_3$



103, 125 MHz, $CDCl_3$



102, 300 MHz, $CDCl_3$



102, 75 MHz, $CDCl_3$

Βιβλιογραφία

[1]Faber, K. *Biotransformation in organic chemistry*, 6th Edition, Springer, **2011**.
[2] McNaught, A. D.; Wilkinson. A. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd Edition, Blackwell Scientific Publications, **1997**.
[3]Milner, S. E.; Maguire, A. R. *ARKIVOC* **2012,** 321-382.
[4]Illanes, A. *Enzyme Biocatalysis- Principles and Applications*, Springer, **2008**.
[5]Moore, J. C.; Pollard, D. J.; Kosjek, B.; Devine, P. N. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1412–1419.
[6] Ema, T.; Kadoya, T.; Akihara, K.; Sakai, T. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2010**, *66*, 198–202.
[7] Grau, B. T.; Devine, P. N.; DiMichele, L. N.; Kosjek, B. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4951-4954.
[8] Flickinger, M. C. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, John Wiley & Sons, Inc., **2010**.
[9]Borowiecki, P.; Paprocki, D.; Dudzik, A.; Plenkiewicz, J. *J. Org. Chem* **2016**, *81*, 380-395.
[10]Kruas, K.; Waldmann, H. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons: Weinheim, **1995**.
[11] Prelog. V. *Pure Appl.Chem.* **1964**, *9*, 119-130.
[12]Liang, P.; Qin, B.; Mu, M.; Zhang, X.; Jia, X.; You, S. *Biotechnol Lett* **2013**, *35*, 1469–1473.
[13]Wong, C.H.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4890-4899.
[14]Oppenheimer, N.J.; Kaplan, N.O. *Biochemistry* **1974**, *13*, 4675-4685.
[15]Goswami, A.; Stewart, J. D. *Organic Synthesis Using Biocatalysis*, Elsevier, **2016**.
[16]Fessner, W.-D. *Biocatalysis From Discovery to Application*, Springer, **1999**.
[17]Sapu, C. M.; Deska, J. *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 1376-1382.
[18]Michelangelo Gruttadauria, M.; Meo, P. L.; Noto, R. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 83–85.
[19]Fuchs, M.; Koszelewski, D.; Tauber, K.; Kroutil, W.; Faber, K. *Chem. Commun*, **2010**, *46*, 5500–5502.
[20]Kalaitzakis, D.; Rozzell, J. D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2309–2313.
[21]Kallergi, M.; Kalaitzakis, D.; Smonou, I. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3946–3950.
[22] Kalaitzakis, D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. *Tetrahedron:* Asymmetry **2007**, *18*, 2418-2426.
[23] Huisman, G. W.; Liang, J.; Krebber, A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 122-129.
[24]Shafiee, A.; Motamedi, A.; King, A. *Appl Microbiol Biotechnol* **1998**, *49*, 709-717.
[25]U.T. Bornsheuer, U. T.; Huisman, G. W.; R.J. Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robbins, K. *Nature* **2012**, *485*, 185–194.
[26] Steven K. Ma, S. K.; Gruber, J.; Davis, C.; Newman, L.; Gray, D.; Wang, A.; John Grate, J.; Huisman, G. W.; Sheldon, R. A. *Green Chem.*, **2010**, *12*, 81–86.
[27]Seo, C.; Yim, J. H.; Lee, H. K.;Seong Min Park, S. M.; Sohn, J.-H.; Oh, H. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 29-31.
[28]Seo, C.; Yim, J. H.; Lee, H. K.;Seong Min Park, S. M.; Sohn, J.-H.; Oh, H. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 4804.
[29]Byeon, H.-E.; Park, B.-K.; Yim, J. H.; Hong Kum Lee, H. K.; Moon, E. Y.; Rhee, D.-K.; Pyo, S. *International Immunopharmacology* **2012**, *12*, 315-325.
[30]Ghosh, A. K.; Xu, C.-X. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1963-1966.
[31]Reddy, K. M.; Shashidhar, J.; Pottireddygari, G. R.; Ghosh, S. *Tetrahedron letters* **2011**, *52*, 5987-5991.
[32]Yixian, H.; Yikang, W. *Chin. J. Chem.* **2011**, *29*, 1185-1191.
[33]Bariotaki, A.; Kalaitzakis, D.; Smonou I. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1792–1795.
[34]Ji, A.; Wolberg, M.; Hummel, W.; Wandrey, C.; Müller, M. *Chem. Commun.* **2001**, 57–58.
[35] Kalaitzakis, D.; Smonou, I. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3919-3921.
[36]Blanchard, J. S. *Methods in Enzymol*. **1984**, *104*, 404.

[37]Comini, A.; Forzato, C.; Nitti, P.; Pitacco, G.; Valentin, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 617–625.
[38]Kondoh, A.; Arlt, A.; Gabor, B.; Fürstner, A. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 7731–7738.
[39]Hajra, S.; Karmakar, A.; Giri, A. K.; Hazra, S. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 3625–3627.
[40]Turova, O. V.; Starodubtseva, E. V.; Vinogradov, M. G.; Ferapontov, V. A.; Struchkova, M. I. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 2121–2124.
[41]Ouchi, A.; Liu, C.; Kaneda, M.; Hyugano, T. *Eur. J. Org. Chem*. **2013**, 3807–3816.
[42]Méou, A.; Lamarque, L.; Brun, P.; *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 5301–5304.
[43] Berti, F.; Felluga, F.; Forzato, C.; Furlan, G.; Nitti, P.; Pitacco, G.; Valentin, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2344–2353.
[44]Forzato, C.; Furlan, G.; Nitti, P.; Pitacco, G.; Ennio Valentin, E.; Zangrando, E.; Buzzini, P.; Goretti, M.; Turchetti, B. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2026–2036.
[45]Kalaitzakis, D.; Rozzell, J. D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4799–4801.
[46]Strohmeier, G. A.; Pichler, H.; May, O.; Mandana Gruber-Khadjawi, M. G. Lambert, P. W.; Meers, J. L. (1983). *Phil Trans R Soc Lond B* **1983**, *300*, 263–282.
[47] Headon, D. R.; Walsh, G. *Biotechnol Adv* , **1994**, *12*, 635– 646.
[48]Strohmeier, G. A.; Pichler, H.; May, O.; Gruber-Khadjawi, M. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4141–4164.
[49] Bornhorst, J. A.; Falke, J. J. *Methods Enzymol*. **2000**, *326*, 245–254.
[50]Moore, J. C.; Savile, C. K.; Pannuri, S.; Kosjek, S.; Janey, J. M. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* **2012**, *9*, 318-341.
[51] Yoshizumi, A.; Wada, M.; Takagi, H.;Shimizu, S.; Nakamori, S. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2001**, *65*, 830–836.
[52]Kataoka, M.; Nakamura, Y.; Urano, N.; Ishige, T.; Shi, G.; Kita, S.; Sakamoto, K.; Shimizu, S. *Letters in Applied Microbiology* **2006**, *43*, 430–435.
[53]Friberg, A.; Johanson, T.; Franzén, J.; Gorwa-Grauslund, M. F.; Frejd, T. *Org. Biomol. Chem* **2006**, ***4***, 2304–2312.
[54] Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.