Βιοκαταλυτικές αναγωγές β,δ-δικέτο εστέρων

Άννα Β. Μπαριωτάκη

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ιουλία Σμόνου

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

Ηράκλειο 2011

Biocatalytic reductions of β,δ-diketo esters

Anna V. Bariotaki

Supervisor Professor: Ioulia Smonou

Department of Chemistry, University of Crete

Master of Science

Heraklion 2011

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

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

2. Μανώλης Στρατάκης, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας

3. Γεώργιος Βασιλικογιαννάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας

Βιογραφικό

Ονοματεπώνυμο: Μπαριωτάκη Άννα
Ημ. Γέννησης: 24 Οκτωβρίου 1986
Τόπος Γέννησης: Χανιά, Κρήτη
Email: met623@chemistry.uoc.gr, anna-993@hotmail.com

Εκπαίδευση

2011-σήμερα: Υποψήφια Διδάκτωρ, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Οργανική Χημεία, Επιβλέπουσα Καθηγήτρια Ι. Σμόνου

2009-2011: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
Οργανική Χημεία, Επιβλέπουσα Καθηγήτρια Ι. Σμόνου
«Βιοκαταλυτικές αναγωγές β,δ-δικετοεστέρων»
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

2004-2009: Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Εμπειρία

2010-2011: Βοηθός στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας Ι και ΙΙ, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Υπεύθυνος: Αγαθόπους Καταχανάκης

2007-2009: Διπλωματική εργασία «Χημειοενζυμική Σύνθεση του φυσικού προϊόντος (S)-(+)-5,6-δίυδρο-6-μέθυλο-2Η-πυραν-2-όνη (Παρασορβικό οξύ)».
Εργαστήριο Οργανικής Χημείας-Βιοκατάλυσης
Επιβλ. καθηγήτρια: Ιουλία Σμόνου, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

1/7/2006-31/10/2006: «Κυλινδρόμυλοι Κρήτης Α.Ε.» (Μύλοι Κρήτης)

Συνέδρια

27/4–1/5/ 2011: COST Action CM0701 "Cascade Chemoenzymatic Processes – New Synergies between Chemistry and Biochemistry", Certosa di Pontignano, University of Siena, Italy

23-27/6/2010: 3° Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας Κύπρου-Ελλάδας, Πρωταράς, Παραλίμνι, Κύπρος

3-9/5/2010: 1st Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientist's School – BIONANOTOX 2010, Ηράκλειο, Ελλάδα

10-11/10/2008: 1° Πανελλήνιο Συμπόσιο Ερευνητικής Δερματολογίας, Ηράκλειο, Ελλάδα

14-15/3/2008: 13° Πανελλήνιο Συμπόσιο Φαρμακευτικής Χημείας, Αθήνα, Ελλάδα

2-3/2/2008: 4th International Conference of Biotechnology, Athens, Greece

Ανακοινώσεις σε Συνέδρια

1. **Bariotaki A**, Kalaitzakis D, Smonou I. "Biocatalytic reduction of tert-butyl 3,5-dioxo-hexanoate". 17th European Symposium on Organic Chemistry, 10th-15th July 2011, Crete, Greece.
2. **Bariotaki A**, Kalaitzakis D, Smonou I. "Biocatalytic reduction of tert-butyl 3,5-dioxo-hexanoate". COST Action CM0701 "Cascade Chemoenzymatic Processes – New Synergies between Chemistry and Biochemistry", Certosa di Pontignano, University of Siena, 27 April-1 May 2011, Italy
3. Σμόνου Ι, Καλαϊτζάκης Δ, **Μπαριωτάκη Α**. "Βιοκαταλυτική αναγωγή 3,5-δικετοεστέρων με απομονωμένες κετορεδουκτάσες." 3ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας Κύπρου-Ελλάδας, 23-27 Ιουνίου 2010, Κύπρος
4. Smonou I, Smaragdakis M, **Bariotaki A.** "Biochemical synthesis of physical products Xestodecalactones A, B, C". 4th International Conference of Biotechnology, 2-3 February 2008, Athens

Μέλος Επιστημονικών Ενώσεων

Μέλος της «Ένωσης Ελλήνων Χημικών», από το 2010

CURRICULUM VITAE

Full name: Bariotaki Anna
Date of Birth: 24 October 1986
Place of birth: Chania, Crete
Email: met623@chemistry.uoc.gr, anna-993@hotmail.com

Education

2011-present : PhD student in Organic Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete, Supervisor Prof. I. Smonou.

2009-2011: M.Sc thesis, Department of Chemistry, University of Crete, Supervisor Prof. I. Smonou. Title: "Biocatalytic reductions of β,δ-diketo esters"

2004-2009 : BS in Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete.

Experience

2010-2011: Teaching assistant in the undergraduate Organic Chemistry I and II laboratory, Supervisor Prof. A. Katachanakis

2007-2009: Undergraduate diploma thesis "Chemoenzymatic synthesis of the natural product (S)-(+)-5,6-dihydro-6-methyl-2H-pyran-2-one (Parasorbic acid)" elaborated under the supervision of Prof. I. Smonou, Department of Chemistry, University of Crete

1/7/2006-31/10/2006: Industrial Training Placement at the Company "Mill of Crete"

Conferences

27/4– 1/5/2011: COST Action CM0701 "Cascade Chemoenzymatic Processes – New Synergies between Chemistry and Biochemistry", Certosa di Pontignano, University of Siena, Italy

23-27/6/2010: 3rd Conference of Chemistry Graduates Students from Cyprus and Greece, Protaras, Paralimni, Cyprus

3-9/5/2010: 1st Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientist's School – BIONANOTOX 2010, Heraklion, Greece

10-11/10/2008: 1st Greek Symposium of Dermatology, Heraklion, Greece

14-15/3/2008: 13th Greek Symposium of Pharmaceutical Chemistry, Athens, Greece

2-3/2/2008: 4th International Conference of Biotechnology, Athens, Greece

Statements at Conferences

1. **Bariotaki A**, Kalaitzakis D, Smonou I. "Biocatalytic reduction of tert-butyl 3,5-dioxo-hexanoate". 17th European Symposium on Organic Chemistry, 10th-15th July 2011, Crete, Greece. *Poster presentation.*
2. **Bariotaki A**, Kalaitzakis D, Smonou I. "Biocatalytic reduction of tert-butyl 3,5-dioxo-hexanoate". COST Action CM0701 "Cascade Chemoenzymatic Processes – New Synergies between Chemistry and Biochemistry", Certosa di Pontignano, University of Siena, 27 April-1 May 2011, Italy. *Poster presentation.*
3. Smonou I, Kalaitzakis D, **Bariotaki A.** "Biocatalytic reduction of 3,5-diketo esters utilizing isolated Ketoreductases". 3rd Conference of Chemistry Graduates Students from Cyprus and Greece, Protaras, Paralimni, Cyprus. *Oral Presentation*
4. Smonou I, Smaragdakis M, **Bariotaki A.** "Biochemical synthesis of physical products Xestodecalactones A, B, C". 4th International Conference of Biotechnology, 2-3 February 2008, Athens. *Poster presentation.*

Member in Professional Associations

Greek Chemical Society since 2010

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν στερεοεκλεκτικές ενζυμικές αναγωγές με NADPH εξαρτώμενες κετοredουκτάσες για την σύνθεση σημαντικών χειρόμορφων ενδιαμέσων και πιο συγκεκριμένα για την σύνθεση οπτικά καθαρών υδρόξυ-κετο εστέρων και 1,3-διολών. Επίσης πραγματοποιήθηκε η χημειοενζυμική σύνθεση του φυσικού προϊόντος «Παρασορβικό οξύ». Σε όλα τα προϊόντα των ενζυμικών αναγωγικών αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής τους με φασματοσκοπία NMR.

Αρχικά μελετήθηκε για πρώτη φορά η ενζυμικά καταλυόμενη αναγωγή του υποστρώματος 3,5-διόξο-εξανικού *τριτ*-βουτυλεστέρα προς τον σχηματισμό 5-υδρόξυ-3-κετο εστέρων και 3-υδρόξυ-5-κετο εστέρων. Οι υδρόξυ-κετο εστέρες σχηματίστηκαν με εξαιρετικά μεγάλη οπτική και χημική καθαρότητα. Οι βιοκαταλύτες-κετοredουκτάσες επέδειξαν σε κάθε περίπτωση υψηλή στερεοεκλεκτικότητα και τοποεκλεκτικότητα.

Ακολούθησε η διαδοχική, ενζυμικά καταλυόμενη αναγωγή του υποστρώματος 3,5-διόξο-εξανικού *τριτ*-βουτυλεστέρα προς τον σχηματισμό 3,5-διύδροξυ-κετο εστέρων. Και εδώ τα προϊόντα σε κάθε περίπτωση σχηματίστηκαν με μεγάλη οπτική και χημική καθαρότητα και υψηλά ποσοστά εναντιομερικής και διαστερομερικής περίσσειας.

Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων στη συνέχεια επιχειρήθηκε η ενζυμικά καταλυόμενη αναγωγή του ίδιου δικετοεστέρα (3,5-διόξο-εξανικού *τριτ*-βουτυλεστέρα) προς τον σχηματισμό οπτικά καθαρών διαφορετικών στερεοϊσομερών διυδρόξυ-κετο εστέρων σε ένα μόνο στάδιο, στο ίδιο σκεύος, χωρίς την απομόνωση του ενδιαμέσου. Στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται φαίνεται η εξαιρετική τοποεκλεκτικότητα και διαστερεοεκλεκτικότητα των κετοredουκτασών.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η χημειοενζυμική σύνθεση του φυσικού προϊόντος «Παρασορβικό Οξύ» με μεγάλη οπτική και χημική καθαρότητα.

Summary

In the present thesis the stereoselective enzymatic reductions with NADPH-dependent ketoreductases for the synthesis of important chiral intermediates were studied and more specifically for the synthesis of optically pure hydroxy-keto esters and 1,3-diols. Also, the chemoenzymatic synthesis of the natural product “Parasorbic acid” has been accomplished. All products derived from enzymatic reductions were analyzed and characterized. Their absolute configuration was determined by NMR spectroscopy.

The first study included the one step enzymatic reduction for the first time in the literature of *tert*-butyl 3,5-dioxo-hexanoate for the synthesis of 5-hydroxy-3-keto esters and 3-hydroxy-5-keto esters. These products were synthesized with excellent optical and chemical purity. Ketoreductases proved to be excellent catalysts with high stereoselectivity and chemoselectivity.

The next study included the two step enzymatic reduction of *tert*-butyl 3,5-dioxo-hexanoate for the synthesis of 3,5-dihydroxy-keto esters. The results here showed excellent optical and chemical purity of the products as well as high enantiomeric and diastereomeric excess.

Based on the above results, the two step, one-pot enzymatic reduction of *tert*-butyl 3,5-dioxo-hexanoate for the direct synthesis of optically pure 3,5-dihydroxy-keto esters was accomplished successfully. In this process the two reductive steps were performed in the same reaction vessel without the isolation of the intermediate hydroxy-keto ester. Ketoreductases showed excellent stereoselectivity and chemoselectivity in the one-pot, two step enzymatic process.

In the last part of this thesis, the chemoenzymatic synthesis of the natural product “Parasorbic acid” in high optical and chemical purity, is presented.

Ευχαριστίες

Η διατριβή αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας-Βιοκατάλυσης του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ιουλίας Σμόνου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης που με δέχτηκε στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών του καθώς και για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε.

Ευχαριστώ την επιβλέπουσα Καθηγήτρια Ιουλία Σμόνου, για την ανάθεση του θέματος της διατριβής αυτής και την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε. Επίσης την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την συνεχή ενθάρρυνση της κατά την διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης τους Καθηγήτές κ. Μανώλη Στρατάκη και κ. Γιώργο Βασιλικογιαννάκη για τις πολύτιμες συμβουλές και για το ότι δέχτηκαν να είναι μέλη της συμβουλευτικής μου επιτροπής.

Ευχαριστώ τον Δρ. Α. Σπύρο για την διάθεση του να βοηθήσει στην επίλυση οποιουδήποτε τεχνικού προβλήματος του φασματομέτρου NMR.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Δρ. Δημήτρη Καλαϊτζάκη για την πολύτιμη βοήθεια του και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Για την υπομονή και την υποστήριξη του στις δυσκολίες που υπήρξαν κατά την εκπόνηση της εργασίας αυτής, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω για τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου πρόσφεραν τους Μ. Σμαραγδάκη, Δρ. Μ. Τζιράκη, Δρ. Μ. Αλμπέρτη, Δρ. Μ. Τοφή και Δρ. Γ. Λυκάκη. Ακόμα να ευχαριστήσω τους φίλους και συνεργάτες από τον τομέα της Οργανικής για την άψογη συνεργασία τους, καθώς και τις συνεργάτιδες από το εργαστήριο Χ. Μάρκου και Μ. Καλλέργη.

Τέλος, ευχαριστώ βαθύτατα την οικογένεια μου για την υπομονή και την αμέριστη υποστήριξη τους και όσους με στήριξαν και με στηρίζουν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ 4

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 8

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ 10

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗΝ ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ 13

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ 15

ΚΕΤΟΡΕΔΟΥΚΤΑΣΕΣ 17

ΝΙΚΟΤΙΝΑΜΙΔΙΚΟΙ ΣΥΜΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ 19

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ ΤΩΝ ΝΙΚΟΤΙΝΑΜΙΔΙΚΩΝ ΣΥΝΕΝΖΥΜΩΝ 21

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΛΥΤΗΣ ΣΤΕΡΕΟΔΟΜΗΣ 23

PARASORBIC ACID 24

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ 33

ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΑΓΩΓΗ ΠΡΟΣ ΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΟΠΤΙΚΑ ΚΑΘΑΡΩΝ ΥΔΡΟΞΥ-ΚΕΤΟ ΕΣΤΕΡΩΝ 35

ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΑΓΩΓΗ ΠΡΟΣ ΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΟΠΤΙΚΑ ΚΑΘΑΡΩΝ 1,3-ΔΙΟΛΩΝ 38

ΣΥΝΘΕΣΗ ΟΠΤΙΚΑ ΚΑΘΑΡΩΝ 1,3-ΔΙΟΛΩΝ ΣΕ ΕΝΑ ΣΤΑΔΙΟ (CASCADE) 39

ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΦΥΣΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ «ΠΑΡΑΣΟΡΒΙΚΟ ΟΞΥ» 41

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ 44

ΟΡΓΑΝΑ 44

ΓΕΝΙΚΕΣ ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ 44

ΣΥΝΘΕΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ 47

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 54

ΦΑΣΜΑΤΑ ^{1}H NMR 56

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

‘Ενζυμα στην οργανική σύνθεση

Η οργανική σύνθεση αποτελεί έναν από τους πιο ανεπτυγμένους κλάδους της χημείας επιδεικνύοντας συνεχώς και ιδιαίτερα τις τελευταίες δεκαετίες όλο και περισσότερο την χρησιμότητά της. Διαρκής είναι η προσπάθεια για τη διαλεύκανση μηχανισμών οργανικών αντιδράσεων, για την ανακάλυψη πιο αποδοτικών αντιδραστηρίων και καταλυτών, με μοναδικό σκοπό τη σύνθεση πολύπλοκων μορίων κατά κύριο λόγο με βιολογική αξία. Σήμερα ένας από τους σημαντικότερους στόχους των συνθετικών οργανικών χημικών είναι η ανακάλυψη μεθόδων για την στερεοελεγχόμενη παρασκευή οπτικώς ενεργών ενώσεων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η βιολογική δραστικότητα οπτικώς ενεργών μορίων, όπως αγροχημικά, φάρμακα και αρωματικές ουσίες, συνήθως εξαρτάται από τη διαμόρφωση των χειρόμορφων κέντρων τους. Βασική βέβαια προϋπόθεση είναι οι μέθοδοι σύνθεσης οπτικώς ενεργών μορίων να είναι, εκτός από αποδοτικές, περιβαλλοντικά και οικονομικά αποδεκτές.

Τα τελευταία χρόνια γίνονται αρκετές προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων καταλυτών, οι οποίοι αποτελούν τον σημαντικότερο παράγοντα σύγχρονης - παράλληλης ανάπτυξης της οργανικής σύνθεσης. Καταλύτες, όπως οξέα κατά Lewis, πολυλειτουργικοί καταλύτες και μέταλλα αποτελούν στόχο αρκετών συνθετικών χημικών, καθώς συντελούν σημαντικά στη σύνθεση βιοενεργών μορίων. Μια κατηγορία βιοκαταλυτών η οποία έχει αναπτυχθεί σημαντικά και εφαρμόζεται εκτενώς στην οργανική σύνθεση είναι τα ένζυμα.

Τα ένζυμα είναι μακρομόρια, πρωτεϊνικής φύσεως, τα οποία καταλύουν τις περισσότερες βιολογικές αντιδράσεις in vivo. Επίσης χρησιμοποιούνται αρκετά στις αντιδράσεις είτε με φυσικά είτε και με μη φυσικά υποστρώματα in vitro. Η ικανότητά τους να εκτελούν συνθετικές μετατροπές, οι οποίες υπό άλλες συνθήκες θα ήταν αδύνατες, είναι καθαρά μια από τις σπουδαιότερες ευκαιρίες που έχουν τώρα στη διάθεσή τους οι οργανικοί χημικοί. Τα κύρια χαρακτηριστικά των βιοκαταλυτών αυτών και τα οποία τους διαφοροποιούν από τους υπόλοιπους χημικούς καταλύτες είναι τα εξής[1]:

- Είναι πολύ αποτελεσματικοί καταλύτες. Γενικά οι ταχύτητες των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων είναι μεγαλύτερες κατά ένα παράγοντα της τάξης του $10^{8}-10^{10}$. Σε κάποιες περιπτώσεις η αύξηση της ταχύτητας μπορεί να υπερβεί τον παράγοντα 10^{12}, τιμή την οποία οι χημικοί καταλύτες δεν είναι εύκολο να την

επιτύχουν.[2] Γενικά οι χημικοί καταλύτες χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις του 0,1% - 1% σε σχέση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, ενώ οι περισσότερες ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται για αντίστοιχες ταχύτητες, σε συγκεντρώσεις της τάξης του 10^{-3}% - 10^{-4}%, γεγονός που καθιστά τα ένζυμα ιδιαίτερα αποτελεσματικούς καταλύτες.

- Τα ένζυμα είναι περιβαλλοντικά αποδεκτοί καταλύτες σε σχέση με τους χημικούς καταλύτες βαρέων μεταβατικών μετάλλων καθώς είναι αποικοδομήσιμα στο περιβάλλον και λειτουργικά σε υδατικά διαλύματα.
- Είναι ενεργά κάτω από ήπιες συνθήκες όπως σε θερμοκρασία 20–40 ^{o}C καθώς και σε pH 5–8. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση των παράπλευρων μη επιθυμητών αντιδράσεων όπως οι αποικοδομήσεις, ισομεριώσεις, αντικαταστάσεις και ρακεμοποιήσεις.
- Το γεγονός ότι τα περισσότερα ένζυμα δρουν κάτω από παρόμοιες συνθήκες, αυτό δίνει τη δυνατότητα της χρήσης ενός αριθμού ενζύμων ταυτόχρονα πραγματοποιώντας πολλά στάδια αντίδρασης σε ένα μόνο εργαστηριακό σκεύος. Αυτό είναι αρκετά πρακτικό στην περίπτωση όπου ένα ενδιάμεσο προϊόν είναι αρκετά ασταθές και είναι αδύνατη η απομόνωσή του ή στην περίπτωση όπου μια ανεπιθύμητη ισορροπία μπορεί να οδηγηθεί προς το επιθυμητό προϊόν συνδυάζοντας δυο συνεχόμενα ενζυμικά στάδια μεταξύ τους.
- Έχουν αρκετά μεγάλη ποικιλία ως προς τα υποστρώματα που μπορούν να δεχτούν, καθώς καταλύουν αντιδράσεις είτε φυσικών είτε τεχνητών μη φυσικών υποστρωμάτων συμβάλλοντας δυναμικά στην οργανική σύνθεση. Μόλις τη δεκαετία του 1980 άρχισε η δυναμική εφαρμογή των φυσικών καταλυτών για τη μετατροπή μη φυσικών οργανικών ενώσεων και από τότε συνεχίζεται με επιτυχία, με αποτέλεσμα την ραγδαία εξέλιξη του πεδίου της βιοκατάλυσης.
- Με την ύπαρξη αρκετών διαφορετικών ενζύμων, οι βιοκαταλύτες αυτοί μπορούν να καταλύσουν μια μεγάλη ποικιλία οργανικών αντιδράσεων. Έτσι, τα ένζυμα έχουν ταξινομηθεί από τη διεθνή ένωση βιοχημείας (International Union of Biochemistry) σε έξη κύριες ομάδες:
  1. Τις **οξειδορεδουκτάσες**, που καταλύουν τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και τις αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου.

2. Τις **τρανσφεράσες** που καταλύουν τη μεταφορά λειτουργικών ομάδων, όπως άκυλο και φωσφορικών ομάδων ή σακχάρων, από ένα μόριο σε άλλο
3. Τις **υδρολάσες** που καταλύουν την υδρόλυση αμιδίων, εστέρων και πεπτιδίων.
4. Τις **λυάσες** που καταλύουν τις αντιδράσεις προσθήκης σε διπλούς δεσμούς καθώς και τις αντίστροφες αντιδράσεις απόσπασης.
5. Τις **ισομεράσες** που καταλύουν αντιδράσεις ισομερισμού όπως τη μετακίνηση διπλών δεσμών, Z/E ισομερισμούς και αντιδράσεις ρακεμοποίησης.
6. Τις **λιγκάσες** που καταλύουν το σχηματισμό δεσμών C-O, C-S, C-N, C-C και δεσμούς φωσφορικών εστέρων.

Χαρακτηριστικά γνωρίσματα των ενζύμων

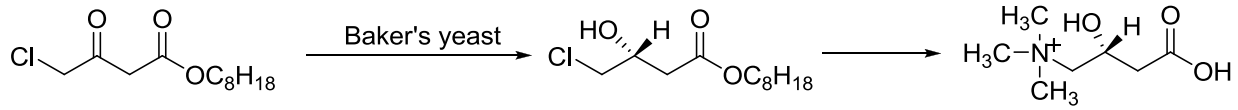
Τα ένζυμα είναι δραστικά σε υδατικά διαλύματα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι στην εξωτερική επιφάνειά τους εντοπίζονται υδρόφιλες πολικές ομάδες, όπως –COOH, -OH, $-NH_2$, -SH, $-CONH_2$, ενώ στην εσωτερική υδρόφοβες, όπως αρυλο και αλκυλο ομάδες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η επιφάνεια του ενζύμου να είναι καλυμμένη από ένα υδατικό στρώμα ποσότητας που φτάνει έως και το 10% της ποσότητας του ενζύμου σε ξηρή κατάσταση. Το νερό αυτό είναι απαραίτητο για να αποκτήσει το ένζυμο την κατάλληλη τρισδιάστατη δομή και έτσι την δραστικότητά του. Ολόκληρη η δομή που αποκτά το ένζυμο σταθεροποιείται από αλληλεπιδράσεις Van–Der–Waals των αλειφατικών αλυσίδων, π-π αλληλεπιδράσεις αρωματικών δακτυλίων ή γέφυρες αλάτων μεταξύ φορτισμένων ομάδων του μορίου. Εκτός από τους πολυπεπτιδικούς δεσμούς που αποτελούν τον σκελετό του ενζύμου (πρωτεΐνη), ισχυροί τέτοιοι δεσμοί εντοπίζονται μεταξύ ατόμων S (S – S) και ονομάζονται δισουλφιδικοί δεσμοί. Τέτοιοι δεσμοί είναι αρκετά σημαντικοί, καθώς ανάλογα με τον αριθμό δισουλφιδικών δεσμών στο ένζυμο επηρεάζεται η σταθερότητά του στη θερμοκρασία. Μεγάλη επιρροή στη θερμοσταθερότητα του ενζύμου έχουν επίσης και οι δεσμοί αλάτων καθώς και τα κατάλοιπα ασπαραγινικού οξέος.

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

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

α) Χημειοεκλεκτικότητα

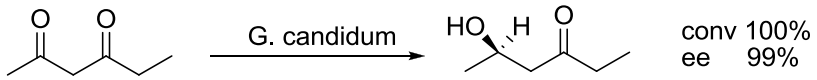
Τα ένζυμα έχουν την ικανότητα να δρουν εκλεκτικά σε μια δραστική ομάδα του υποστρώματος χωρίς την μετατροπή άλλων εξίσου δραστικών ομάδων του ίδιου μορίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή καθαρών ενώσεων χωρίς την παρουσία παραπροϊόντων. Παράδειγμα αποτελεί η χημειοενζυμική σύνθεση της L-Καρνιτίνης (Σχήμα 1).[3]



Σχήμα 1

β) Τοποεκλεκτικότητα

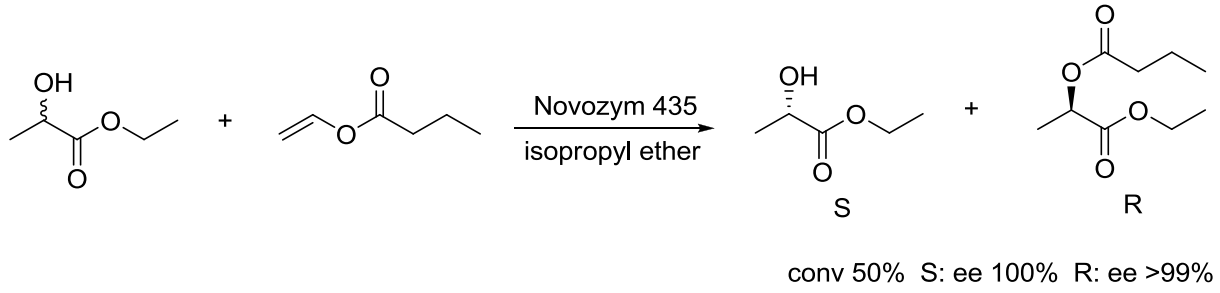
Εξαιτίας της πολύπλοκης τρισδιάστατης δομής τους έχουν την ικανότητα να διακρίνουν όμοιες λειτουργικές ομάδες οι οποίες βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις του ίδιου υποστρώματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αναγωγή της 2,4-εξανοδιόνης με τον μικροοργανισμό Geotrichum candidum (Σχήμα 2).[4]



Σχήμα 2

γ) Εναντιοεκλεκτικότητα

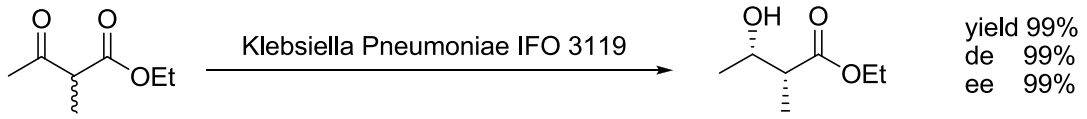
Έχουν την ικανότητα να διακρίνουν ένα από τα δύο εναντιομερή ενός ρακεμικού μίγματος ή μια από τις εναντιοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου, όπως φαίνεται στην αντίδραση εστεροποίησης του 2-υδροξυ προπανοϊκού αιθυλεστέρα με το ένζυμο Novozym 435 (Σχήμα 3).[5]



Σχήμα 3

δ) Διαστερεοεκλεκτικότητα

Έχουν την ικανότητα να διακρίνουν ένα από τα διαστερεομερή ενός μίγματος ή μία από τις διαστερεοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου. Αυτό έχει παρατηρηθεί στην αντίδραση αναγωγής του 2-μεθυλο-ακετοξικου αιθυλεστέρα με τον μικροοργανισμό Klebsiella Pneumoniae IFO 3119 (Σχήμα 4).[6]

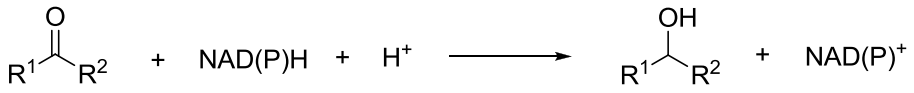


Σχήμα 4

Κετοredουκτάσες

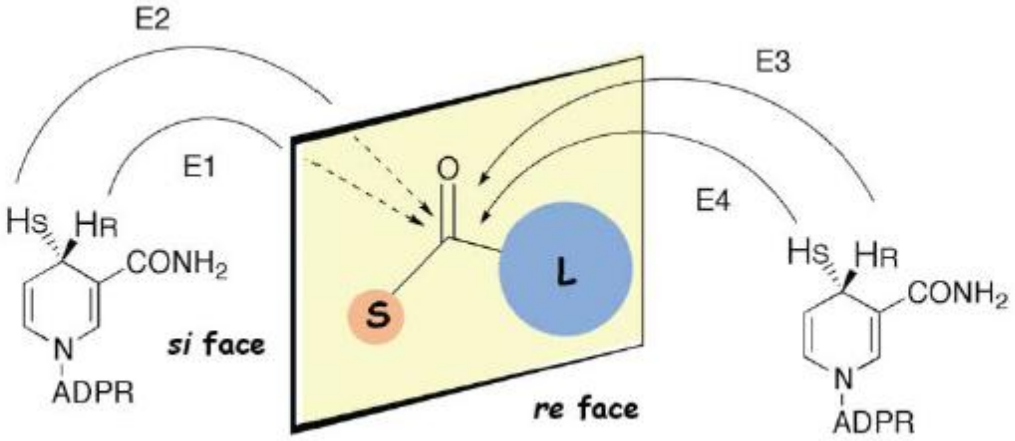
Οι κετοredουκτάσες είναι ένζυμα που ανήκουν στη κατηγορία των οξειδορεδουκτασών και αποτελούν μέρος της οικογένειας των αφυδρογονασών/ρεδουκτασών. Είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και απομονώνονται από φυτά, βακτήρια, μαγιά, ψάρια αλλά κι από θηλαστικά όπως από ανθρώπους, κουνέλια, ποντίκια. Γενικά οι κετοredουκτάσες είναι χαμηλού μοριακού βάρους, μονομερή ένζυμα, όμως σε μικρό ποσοστό έχουν απομονωθεί και τετραμερείς κετοredουκτάσες, κυρίως από θηλαστικά.[7] Ορισμένοι από αυτούς τους βιοκαταλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε μέσα στο φυσικό τους περιβάλλον, όπως είναι οι μικροοργανισμοί και τα κύτταρα (whole cell), οπότε σε αυτή την περίπτωση το απαραίτητο συνένζυμο προμηθεύεται συνεχώς από τα κύτταρα, είτε μετά από την απομόνωσή τους, όπου και απαιτείται η προσθήκη συνενζύμου. Εμπορικά διαθέσιμοι βιοκαταλύτες περιλαμβάνουν μαγιά της ζύμης (baker's yeast), και αλκοολικές αφυδρογονάσες από την μαγιά της ζύμης, *Thermoanaerobium brockii* (TBADH), horse liver και hydroxysteroid dehydrogenase από *Pseudomonas testosterone* και *Bacillus spherisus*. Πάντως, για την παραγωγή και άλλων βιοκαταλυτών είναι απαραίτητο να καλλιεργηθούν κύτταρα από καλλιέργειες σπόρων (seed cultures), οι οποίοι μπορεί να είναι εμπορικά διαθέσιμοι.[8]

Η φυσική αποστολή αυτών των βιοκαταλυτών είναι η κατάλυση της αναγωγής καρβονυλικών ενώσεων. Τα φυσικά τους υποστρώματα είναι αλκοόλες όπως αιθανόλη, λακτικό, γλυκερόλη κ.τ.λ. καθώς και οι αντίστοιχες καρβονυλικές ενώσεις. Παρόλα αυτά έχουν τη ικανότητα να ανάγουν εναντιοεκλεκτικά και μη φυσικά υποστρώματα. Για την πραγματοποίηση μιας αναγωγής, τα ένζυμα αυτά απαιτούν τη χρήση συνενζύμων όπως NADH ή NADPH. Η αναγωγή πραγματοποιείται με μεταφορά ενός υδριδίου στο καρβονυλικό υπόστρωμα, σύμφωνα με τη γενική αντίδραση του Σχήματος 5:



Σχήμα 5. Αντίδραση αναγωγής με μεταφορά υδριδίου

Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες ενζύμων που ενεργοποιούν την προσβολή του υδριδίου από το συνένζυμο NAD(P)H στο υπόστρωμα (Σχήμα 6).[9] Υπάρχουν τα ένζυμα τύπου E1 και E2, με τα οποία η προσβολή του υδριδίου γίνεται από την si-επιφάνεια της καρβονυλομάδας και τα τύπου E3 και E4, με τα οποία η προσβολή γίνεται από την re-επιφάνεια, προκύπτοντας αντίστοιχα οι *R* και *S* αλκοόλες. Μηχανιστικά τα ένζυμα τύπου E1 και E3 μεταφέρουν το pro-(*R*)-υδρίδιο του συνενζύμου, ενώ τα τύπου E2 και E4 χρησιμοποιούν το pro-(*S*)-υδρίδιο.



Σχήμα 6. Αναγωγή καρβονυλίου από NADH

Παραδείγματα ενζύμων τύπου Ε1 – Ε3 είναι:

Ε1: *Pseudomonas* sp. alcohol Dehydrogenase,[9] *Lactobacillus kefir* alcohol Dehydrogenase.[10]

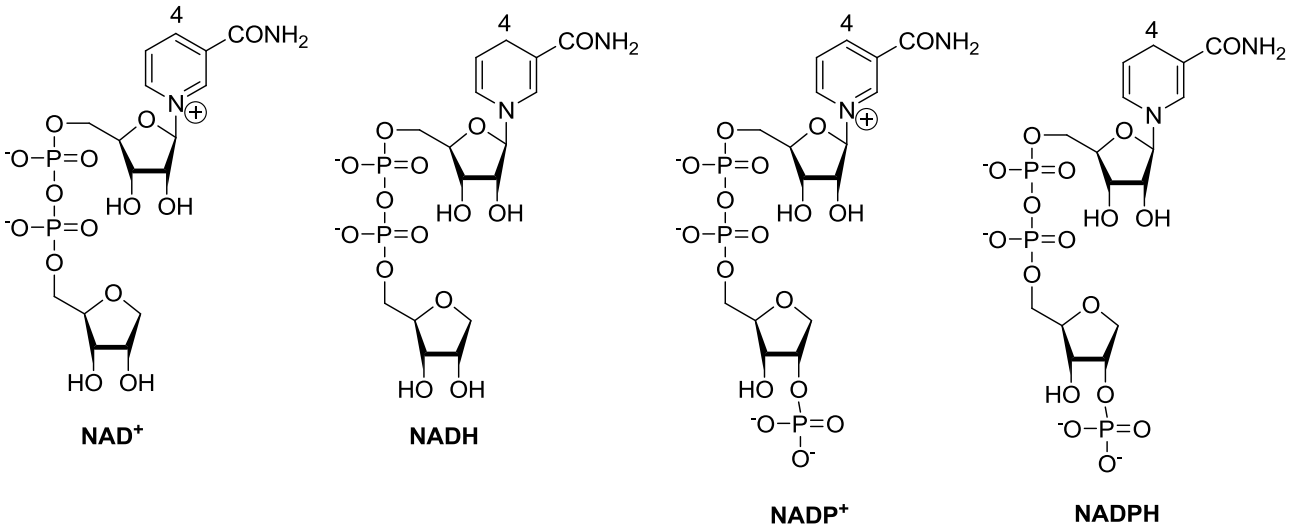
Ε2: *Geotrihum candidum* glycerol Dehydrogenase,[11] *Mucor javanicus* dihydroxyacetone reductase.

Ε3: Yeast alcohol dehydrogenase, Horse liver alcohol Dehydrogenase,[12] *Moraxella* sp. alcohol dehydrogenase.[13]

Ε4: Άγνωστη.

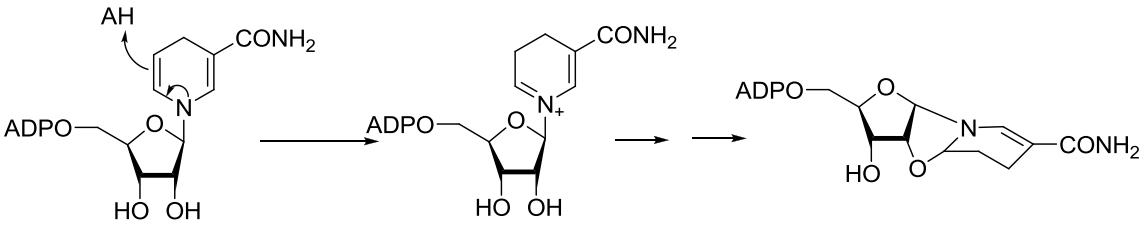
Νικοτιναμιδικοί συμπαράγοντες

Το νικοτιναμιδο αδενινο δινουκλεοτίδιο (NAD) και το 2'-φωσφορυλιωμένο άλας (NADP) (Σχήμα 7) συμμετέχουν σε πολλές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις καταλυόμενες από αφυδρογονάσες. Ο νικοτιναμιδικός δακτύλιος των ενώσεων αυτών είναι οξειδοαναγωγικά ενεργός, μπορώντας να δεχτεί ένα υδρίδιο (ή δυο ηλεκτρόνια και ένα πρωτόνιο) για το σχηματισμό των υδρογονωμένων παραγώγων NADH και NADPH. Η αντίστροφη μεταφορά υδριδίου από ένα αναγωγικό υπόστρωμα στο $NAD(P)^+$, και αυτή από το NAD(P)H σε ένα οξειδωτικό, είναι στερεοεκλεκτική και χαρακτηριστική για κάθε ένζυμο ξεχωριστά. Κάθε ένζυμο είναι ικανό να μεταφέρει στερεοεκλεκτικά ένα από τα διαστερεοτοπικά υδρογόνα που βρίσκονται στη θέση C-4 του NAD(P)H σε μια καρβονυλομάδα ενός υποστρώματος.[14]



Σχήμα 7. Νικοτιναμιδο αδενινο δινουκλεοτίδιο και 2'-φωσφορυλιωμάνο άλας

Η ανηγμένη και η οξειδωμένη μορφή των νικοτιναμιδιακών συμπαραγόντων είναι και οι δυο αποικοδομίσιμες σε υδατικά διαλύματα. Γενικά οι ανηγμένες μορφές είναι σταθερές σε βασικά διαλύματα, αλλά ασταθείς σε όξινα, σε αντίθεση με τις οξειδωμένες μορφές που είναι σταθερές σε όξινα διαλύματα και ασταθείς σε βασικά.[15] Γι' αυτό οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται συνήθως σε pH περίπου 7, σε μια ενδιάμεση δηλαδή τιμή σταθερότητας. Η αποικοδόμηση του NAD(P)H σε pH 5-9 κυρίως οφείλεται σε όξινη κατάλυση (Σχήμα 8).[15,16]



Σχήμα 8

Έτσι, πραγματοποιείται πρωτονίωση του νικοτιναμιδιακού δακτυλίου στον άνθρακα-5, ακολουθούμενη από γρήγορη μετάθεση σχηματίζοντας κυκλικό αιθέρα.[16] Στην περίπτωση του NADPH πραγματοποιείται μια επιπλέον ενδομοριακή κυκλοποίηση στη θέση της 2-φωσφορικής ομάδας.[15] Έτσι σε ανόργανα ρυθμιστικά διαλύματα οι χρόνοι ζωής των συνενζύμων είναι περιορισμένοι. Οι χρόνοι ημιζωής για το NADH και το

NADPH σε 0,1M φωσφορικό νάτριο, σε pH 7.0, 25 ^{o}C είναι 27 και 13 ώρες αντίστοιχα. Σε οργανικά όμως ρυθμιστικά διαλύματα οι χρόνοι ζωής αυξάνονται αρκετά. Τέτοια διαλύματα είναι imidazole, triettanolamine, Hepes και Tris. Έτσι οι χρόνοι ημιζωής για το NADH και το NADPH σε 0,1M Tris σε pH 7.0 και 25 ^{o}C είναι 330 και 31 ώρες αντίστοιχα.

Στην περίπτωση των $NAD(P)^{+}$ το κυριότερο στάδιο για την αποικοδόμησή τους είναι η πυρηνόφιλη προσθήκη στον άνθρακα-4 για το σχηματισμό 1,4-διυδροξυπυριδινικής δομής, πορεία η οποία μπορεί να καταλύεται από ένζυμο. Τα πυρηνόφιλα μπορεί να είναι υποστρώματα ή κάποιες άλλες ενώσεις του διαλύματος. Για παράδειγμα, παρουσία 0,1M πυρουβικού σε pH 7.0 το NAD έχει χρόνο ημιζωής 6,9 ώρες.[14]

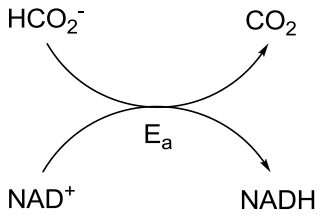
Τα συνένζυμα είναι ενώσεις εμπορικά διαθέσιμες εδώ και πολλά χρόνια. Παρόλα αυτά το κόστος τους είναι αρκετά υψηλό και για αυτό το λόγο απαιτούνται τρόποι αντιμετώπισης του προβλήματος αυτού. Ένας τέτοιος τρόπος είναι τα συστήματα αναγέννησης των συνενζύμων.

Συστήματα αναγέννησης των νικοτιναμιδικών συνενζύμων

Οι εξαρτώμενες από το NAD(P)H ενζυμικές αντιδράσεις είναι ιδιαίτερα σημαντικές στην οργανική σύνθεση. Παρόλα αυτά όμως οι απαραίτητοι συμπαράγοντες είναι ακριβοί και αρκετά ασταθείς στο διάλυμα και για οικονομικούς λόγους μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε στοιχειομετρικές αντιδράσεις μόνο σε μικρή κλίμακα. Για να είναι μια μέθοδος αναγέννησης συνενζύμων αποτελεσματική θα πρέπει να είναι αρκετά εκλεκτική ως προς το υπόστρωμα, σε σχέση με την επιθυμητή ενζυμική αντίδραση, και να έχει την ικανότητα να ανακυκλώνει τον συμπαράγοντα 10^{2}–10^{5} φορές. Προς το παρόν, μόνο η ενζυμική κατάλυση παρέχει τέτοια μεγάλη εκλεκτικότητα για την αναγωγή του $NAD(P)^{+}$ σε NAD(P)H. Το μόνο μειονέκτημα των ενζυμικών ανακυκλώσεων είναι η δαπάνη και η περιορισμένη σταθερότητα των ενζύμων.

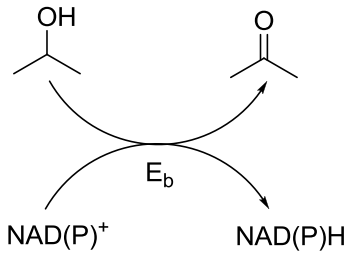
Υπάρχουν αρκετά ενζυμικά συστήματα για την ανακύκλωση του NADH και NADPH. Τα πιο χρήσιμα συστήματα αναγέννησης είναι:

1. Άλας του μυρμηκικού οξέος/αφυδρογονάση του μυρμηκικού (E_1) από Candida boidinii (Σχήμα 9),[17]



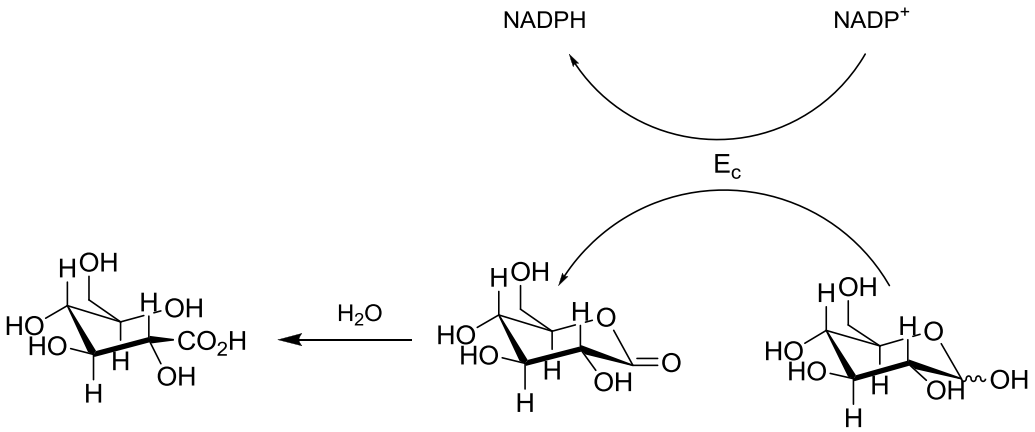
Σχήμα 9

2. Ισοπροπανόλη/αλκοολική αφυδρογονάση (E_2) από Theromoanaerobium brocki (για NADP),[18] ή Pseudomonas sp (για NAD)[9] (Σχήμα 10)



Σχήμα 10

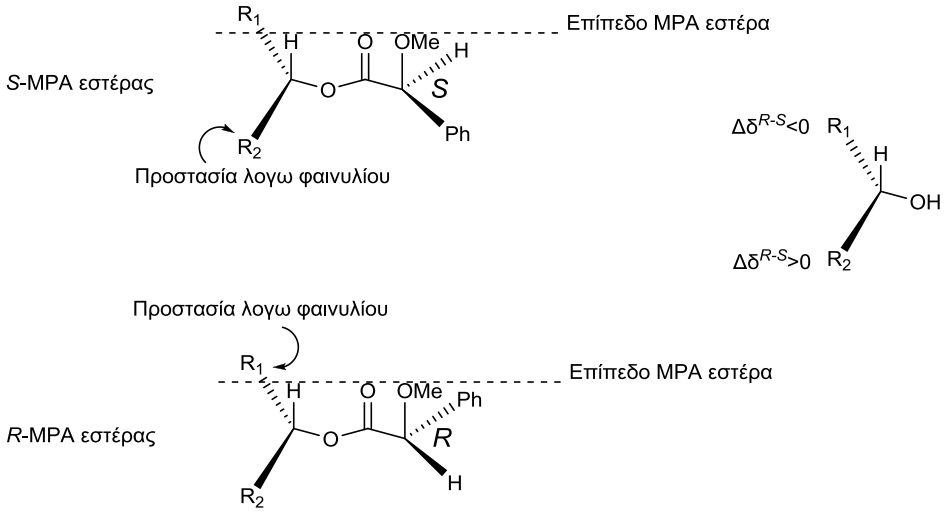
3. Γλυκόζη/αφυδρογονάση της γλυκόζης (E_3) από Bacillus[19] (για NAD(P)H) (Σχήμα 11).



Σχήμα 11

Προσδιορισμός απόλυτης στερεοδομής

Ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής των οργανικών ενώσεων βασίζεται ολοένα και περισσότερο σε απλές και αξιόπιστες μεθόδους. Η κλασσική μέθοδος ανισοτροπίας, την οποία εισήγαγαν και αξιοποίησαν οι Dale και Mosher,[20] ο Trost και οι συνεργάτες του[21] και άλλοι,[22] συνεχίζει να αποτελεί την απλούστερη και πιο αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής δευτεροταγών αλκοολών. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων (στο φάσμα ^{1}H NMR) των δυο διαστερεομερών εστέρων οι οποίοι προκύπτουν με παραγοντοποίηση της αλκοόλης με τα δυο εναντιομερή ενός χειρόμορφου αντιδραστηρίου ανισοτροπίας, όπως το MTPA ή MPA.[20,22]



Σχήμα 12. Μοντέλο διαμόρφωσης για τους (R)-MPA και (S)-MPA εστέρες των δευτεροταγών αλκοολών.

Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα διαμόρφωσης για διάφορα χειρόμορφα αντιδραστήρια ανισοτροπίας που να εξηγούν τα φάσματα ^{1}H NMR και να προβλέπουν την απόλυτη στερεοχημεία των ενώσεων. Το χειρόμορφο αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το α-μεθοξυ φαινυλοξικό οξύ (MPA). Το μοντέλο διαμόρφωσης που προτείνεται για το αντιδραστήριο αυτό φαίνεται στο Σχήμα 12.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 12, μετά την εστεροποίηση της δευτεροταγούς αλκοόλης και με τα δυο εναντιομερή του MPA, η διαμόρφωση των MPA-εστέρων βρίσκει

το υδρογόνο της αλκοόλη, το καρβονύλιο και την μεθόξυ ομάδα στο ίδιο επίπεδο. Αυτό σημαίνει ότι κάθε ομάδα της αλκοόλης (R_1, R_2) έχει απέναντί της ένα συγκεκριμένο υποκαταστάτη, είτε υδρογόνο, είτε φαινύλιο. Για παράδειγμα η ομάδα R_1 του (*R*)-MPA εστέρα έχει απέναντι ένα φαινύλιο, ενώ η R_2 ένα υδρογόνο. Αντιθέτως η ομάδα R_1 του (*S*)-MPA εστέρα έχει απέναντι ένα υδρογόνο, ενώ η R_2 ένα φαινύλιο.

Γενικά οι ομάδες οι οποίες είναι εκλειπτικές ως προς το φαινύλιο εμφανίζονται σε υψηλότερα πεδία στο φάσμα ^{1}H NMR, λόγω προστασίας. Έτσι στη συγκεκριμένη περίπτωση, η ομάδα R_1 του (*R*)-MPA εστέρα, λόγω του φαινυλίου, εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία (χαμηλότερα ppm) σε σχέση με την αντίστοιχη του (*S*)-MPA εστέρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η διαφορά στις μετατοπίσεις στο φάσμα ^{1}H NMR για την ομάδα R_1 μεταξύ του (*R*)-MPA και του (*S*)-MPA εστέρα να είναι αρνητική ($\Delta\delta^{R-S}<0$).

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

Η μέθοδος αποδείχτηκε ικανοποιητική για τις ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, καθώς όλες οι κορυφές και οι διαφορές στις μετατοπίσεις ήταν ευδιάκριτες. Επίσης οι διαφορές στις μετατοπίσεις των κορυφών ανάμεσα στα δυο φάσματα δεν παρουσίασαν οποιαδήποτε απόκλιση από το μοντέλο. Εκτός της αξιοπιστίας και της αποτελεσματκότητας της μεθόδου αυτής, σημαντικά πλεονεκτήματα της είναι και η ευκολία και η ταχύτητα της. Όλα αυτά την καθιστούν ένα εξαιρετικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοχημείας χειρόμορφων δευτεροταγών αλκοολών.

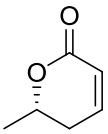
Parasorbic acid

Το παρασορβικό οξύ, αποτελεί ουσία που απομόνωσε το 1859 ο Hofmann απο το φυτό Sorbus aucuparia, με πιο γνωστή την ονομασία “Mountain ash”.[23] Το φυτό το συναντάμε σε μεγάλα υψόμετρα των βουνών της Ευρώπης. Οι Άγγλοι το είχαν χαρακτηρίσει και ως “anti-witching device”, γιατί το χρησιμοποιούσαν για την αντιμετώπιση μυκήτων, θεωρώντας ότι οι μύκητες είναι αποτέλεσμα μαγείας. Ωστόσο μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί άλλη φυσική πηγή. Έχει σημειωθεί όμως, ότι αποτελεί

δομικό συστατικό της ουσίας chamaedrine, που απομονώθηκε απο το φυτό Melochia.[24] Το φυτό αυτό το χρησιμοποιούσαν οι ντόπιοι της Νότιας Αφρικής ως φάρμακο για ασθένειες, όπως ο καρκίνος και η υπέρταση.

Αποτελεί ισομερές του σορβικού οξέος, το οποίο χρησιμοποιείται σαν συντηρητικό στα τρόφιμα. Σε αναλύσεις τροφίμων που έχουν γίνει, έχουν βρεθεί ίχνη του παρασορβικού οξέος στο σορβικό. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για την συμπεριφορά των α,β-ακόρεστων καρβονυλικών ενωσεων και ανάμεσα σε αυτές είναι και το παρασορβικό οξύ. Παλαιότερα, είχε χαρακτηριστεί "πιθανώς καρκινογόνος ουσία" αλλά σε μελέτες που έγιναν από αρκετούς ερευνητές αργότερα αποδείχθηκε η μη τοξική δράση του.[25,26] Η ακόρεστη αυτή λακτόνη έχει δείξει σημαντική παρεμπόδιση στην μυκητιακή βλάστηση και στην ανάπτυξη των σπορίων.[27] Το παρασορβικό οξύ χρησιμοποιείται σε πολλά αντιβιοτικά, αλλά έχει βρεθεί και στην φερομόνη των αρσενικών μελισσών.

Ιδιαίτερο δομικό χαρακτηριστικό της ένωσης ειναι ο εξαμελής ετεροκυκλικός δακτύλιος, ο οποίος έχει στερεογονικό κέντρο στον C_5. Ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής (5*S*) δόθηκε αρκετά χρόνια μετά την απομόνωση της ουσίας (Σχήμα 13).[28,29]



Σχήμα 13. Χημική δομή του φυσικού προϊόντος (2*S*)-2-μέθυλο-2,3-διυδροξυ πυραν-6-όνη (Παρασορβικό Οξύ)

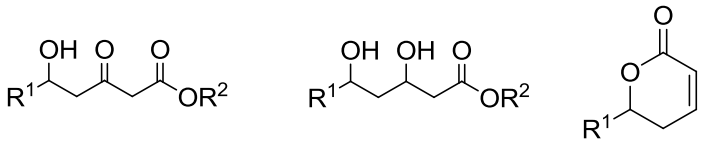
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο βασικός στόχος του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης είναι η σύνθεση χρήσιμων, οπτικώς ενεργών ενδιαμέσων και πρόδρομων ενώσεων με βιοκαταλυτικές μεθόδους.

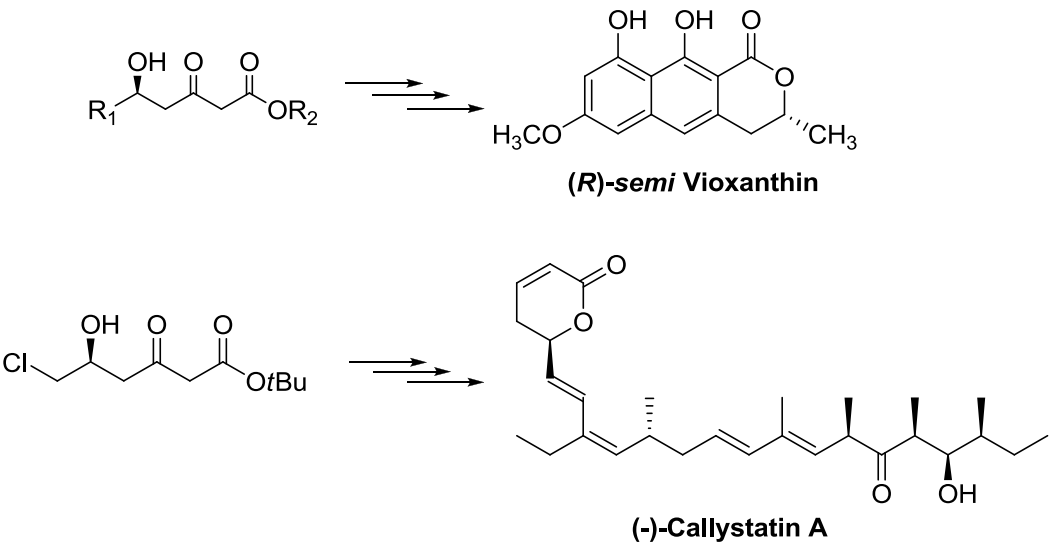
Στα πλάισια της παρούσας εργασίας μελετήθηκαν οι ενζυμικές αναγωγές β,δ-δικετοεστέρων με πιθανά προϊόντα αναγωγής δ-υδρόξυ-β-κετο εστέρες, β,δ-διυδρόξυ εστέρες και δ-λακτόνες (Σχήμα 14). Τέτοιες ενώσεις αποτελούν σημαντικά πρόδρομα μόρια στην οργανική σύνθεση καθώς έχουν χρησιμοποιηθεί για την σύνθεση διαφόρων φυσικών προϊόντων και φαρμάκων.

Οι βιοκαταλύτες που επιλέχθηκαν για το σκοπό αυτό, είναι τα αναγωγικά ένζυμα, NAD(P)H εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες (KRED), η οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμες. Η επιλογή τους στηρίχθηκε στην πληθώρα πλεονεκτημάτων που συγκεντρώνουν, όπως υψηλή καταλυτική ικανότητα, στερεοεκλεκτικότητα, τοποεκλεκτικότητα, χημειοεκλεκτικότητα, καθώς και στην ικανότητά τους να δέχονται ως υποστρώματα μεγάλο αριθμό μορίων με διαφορετικά στερεοχημικά χαρακτηριστικά, όπως δικετόνες, υδροξυ κετόνες και β-κετοεστέρες.



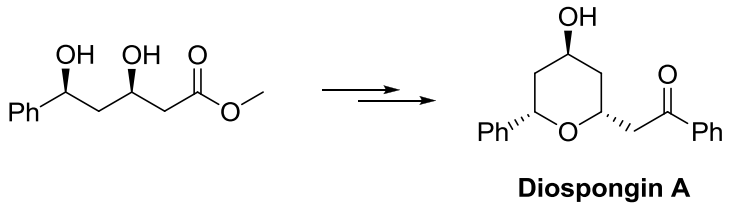
Σχήμα 14. Γενική δομή των δ-υδρόξυ-β-κετο εστέρων, β,δ-διυδροξυ εστέρων και δ-λακτονών.

Οι δ-υδρόξυ-β-κετο εστέρες αποτελούν πρόδρομες ενώσεις σημαντικών ουσιών όπως είναι η ημι-Vioxanthin, πρόδρομη ένωση της Vioxanthin, η οποία έχει παρουσιάσει αντικαρκινική δράση[30] ή η Callystatin A, ουσία με βιολογική δραστικότητα και αντικαρκινική δράση (Σχήμα 15).[31]



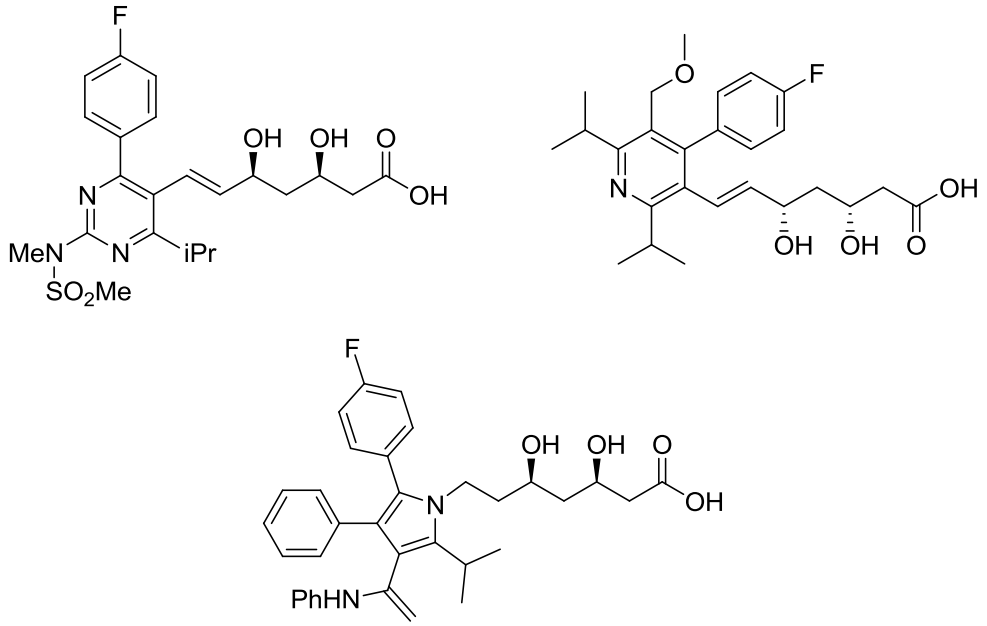
Σχήμα 15

Οι β,δ-διυδροξυ εστέρες αποτελούν πρόδρομες χειρόμορφες ενώσεις φυσικών προϊόντων, όπως η Diospongin A (Σχήμα 16).[32]



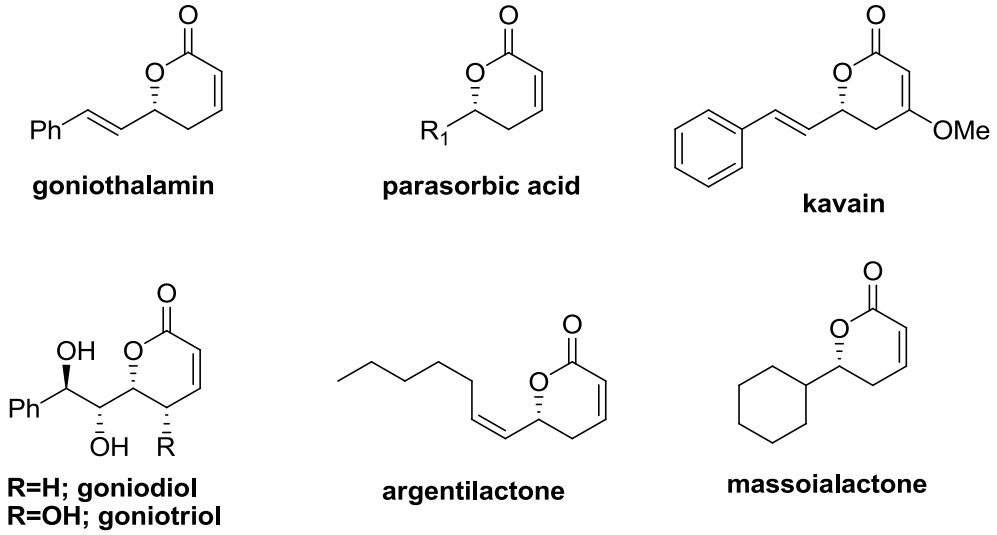
Σχήμα 16

Επίσης αποτελούν δομικές μονάδες μιας πολύ σημαντικής κατηγορίας ενώσεων, τις στατίνες.[33] Οι στατίνες δρούν παρεμποδιστικά στον μεταβολίτη (HMG-CoA reductase) που παράγει χοληστερόλη, με αποτέλεσμα να μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα (Σχήμα 17).



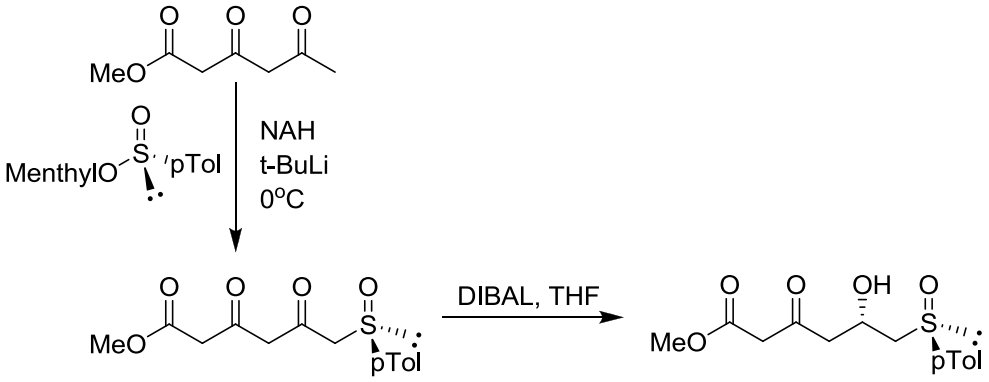
Σχήμα 17

Οι δ-λακτόνες αποτελούν δομικές μονάδες μιας μεγάλης κατηγορίας φυσικών προϊόντων (Σχήμα 18).[34]



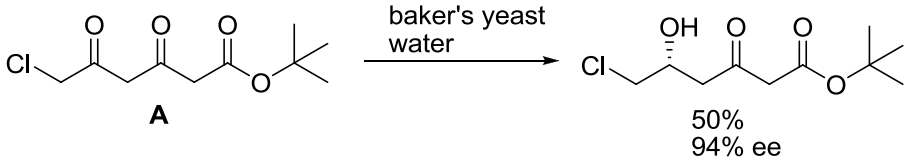
Σχήμα 18

Αρκετές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση οπτικώς ενεργών δ-υδρόξυ-β-κέτο εστέρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί κατ'αρχήν η συμπύκνωση Claisen ενός δικετοεστέρα με χειρόμορφο αντιδραστήριο και η αναγωγή στη συνέχεια με diisobutylaluminum hydride (DIBAL) (Σχήμα 19).[35]



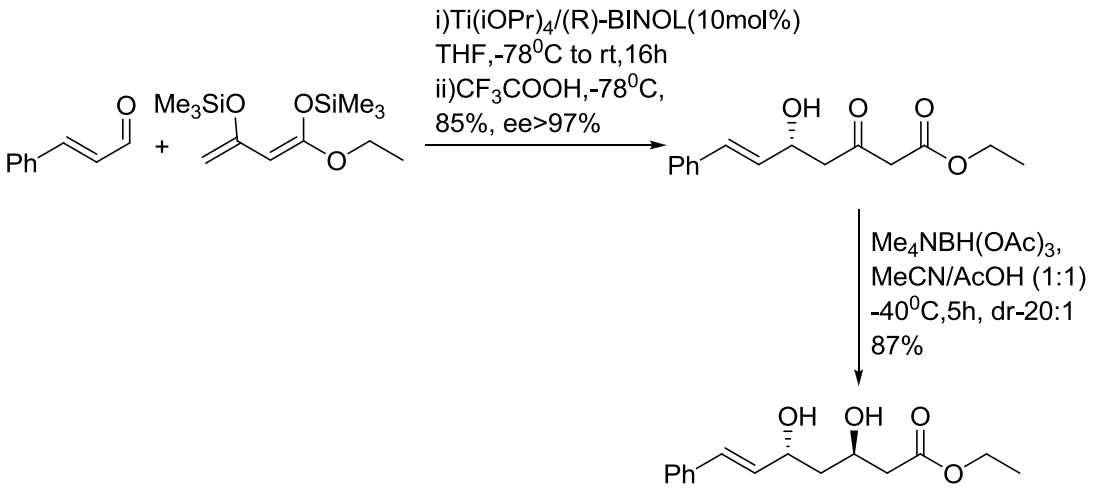
Σχήμα 19

Εναλλακτικά, βιοκαταλυτικές μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί τα τελευταία χρόνια για την σύνθεση δ-υδρόξυ-β-κέτο εστέρων, συμβάλλοντας σημαντικά στην μείωση των χημικών ρύπων στην οργανική σύνθεση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αναγωγή του χλώρο-δικετοεστέρα (**A**) με χρήση ολόκληρου κυττάρου μικροοργανισμού σαν βιοκαταλύτης (Σχήμα 20).[36]



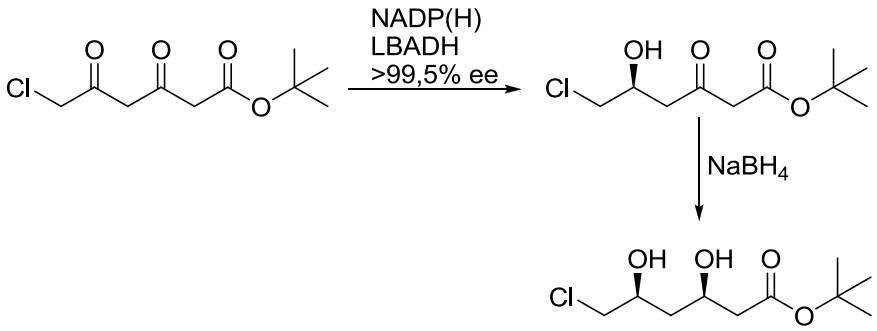
Σχήμα 20

Αρκετές μέθοδοι έχουν επινοηθεί για τη σύνθεση οπτικώς ενεργών β,δ-διυδρόξυ εστέρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πυρηνόφιλη προσθήκη με χρήση χειρόμορφου καταλύτη για τον σχηματισμό δ-υδρόξυ-β-κέτο εστέρα ακολουθούμενη από εκλεκτική χημική αναγωγή προς το β,δ-διυδρόξυ εστέρα (Σχήμα 21).[37]



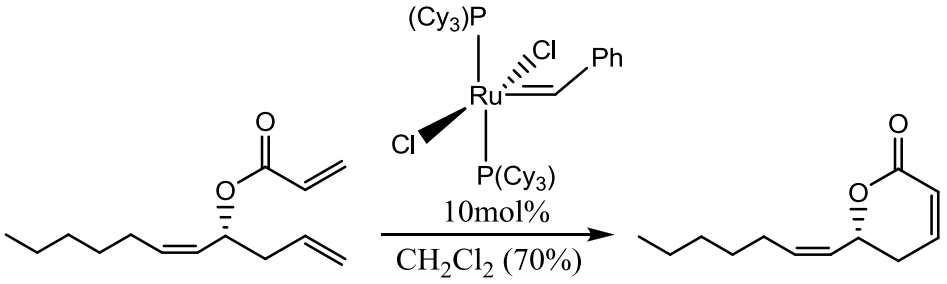
Σχήμα 21

Ορισμένοι β,δ-διυδρόξυ εστέρες έχουν συντεθεί τα τελευταία χρόνια βιοκαταλυτικά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αναγωγή με *Lactobacillus brevis* (LBADH) ακολουθούμενη από χημική αναγωγή (Σχήμα 22).[38]



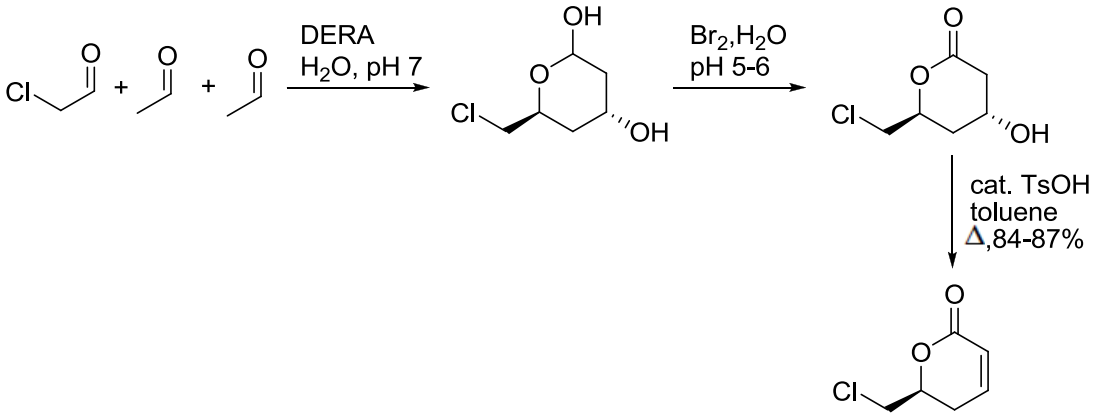
Σχήμα 22

Τέλος, δ-λακτόνες έχουν συντεθεί χημικά με [2+2] κυκλοπροσθήκη με καταλύτη Grubbs πρώτης γενιάς (Σχήμα 23).[39]



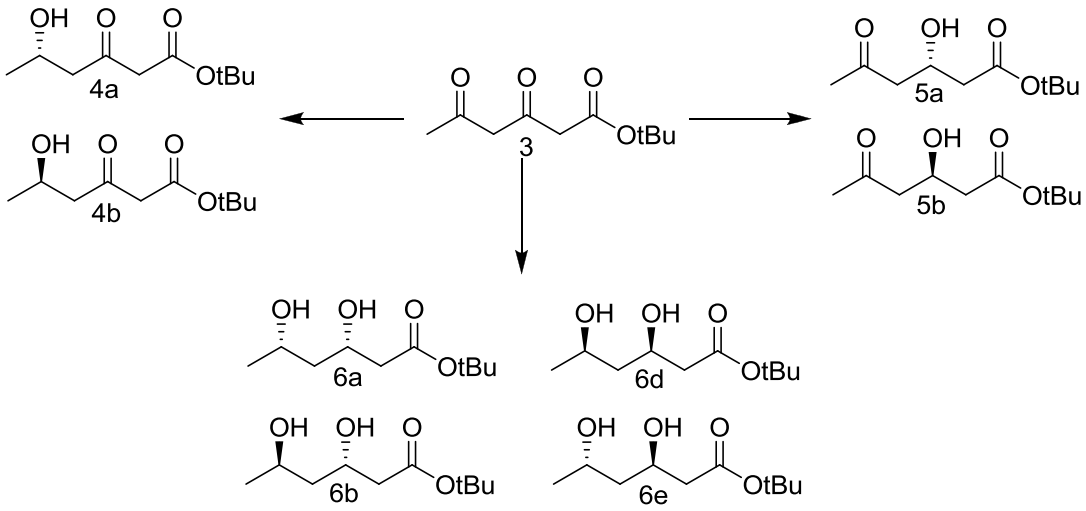
Σχήμα 23

Αντίστοιχα έχουν συντεθεί ενζυμικά με χρήση αλδολάσης σε μία αντίδραση αλδολικής προσθήκης δύο μορίων ακεταλδεϋδης σε αλδεϋδη, σε ένα βήμα, αντίδραση που πρώτος πραγματοποίησε ο Wong και οι συνεργάτες του το 1994.[40] Στη συνέχεια ακολουθεί οξείδωση και αφυδάτωση (Σχήμα 24).[41]



Σχήμα 24

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε εκτενώς ο 3,5-διοξοεξανοϊκός τριτ-βουτυλεστέρας. Με αναγωγή αυτού μπορούν να προκύψουν δ-υδρόξυ-β-κετο εστέρες, δ-κέτο-β-υδρόξυ εστέρες και β,δ-διυδρόξυ εστέρες (Σχήμα 25).



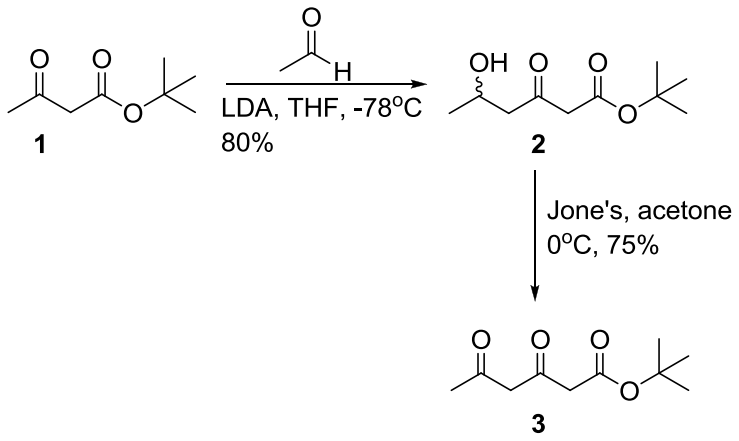
Σχήμα 25

Άρα για το σχηματισμό ενός μόνο υδροξυ κετο εστέρα απαιτείται τοποεκλεκτική αναγωγή ενός εκ των δυο καρβονυλίων, ενώ για το σχηματισμό ενός μόνο

στερεοϊσομερούς απαιτείται διαστερεοεκλεκτική και εναντιοεκλεκτική αναγωγή της δικετόνης.

Η σύνθεση ενός ή περισσοτέρων διαφορετικών διαστερεομερών από τον 3,5-διοξοεξανοϊκό τριτ-βουτυλεστέρα, με μεγάλη απόδοση και οπτική καθαρότητα, πραγματοποιήθηκε βιοκαταλυτικά με χρήση NADPH-εξαρτώμενων κετοredουκτασών.

Η σύνθεση του 3,5-διοξοεξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα **3** πραγματοποιήθηκε με πολύ απλές αντιδράσεις. Αρχικά παρασκευάστηκε ο ρακεμικός δ-υδρόξυ-β-κέτο εστέρας **2** με αλδολική συμπύκνωση του δικετοεστέρα **1** με ακεταλδεύδη ακολουθούμενη από αντίδραση οξείδωσης προς το σχηματισμό του υποστρώματος **3** (Σχήμα 26).



Σχήμα 26

Μεθοδολογία ενζυμικών αντιδράσεων

Οι βιοκαταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν απομονωμένες κετοredουκτάσες, οι οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμες από την εταιρία Codexis (Inc.,Pasadena CA, USA). Τα ένζυμα αυτά απομονώθηκαν από διάφορους μικροοργανισμούς, οι οποίοι επέδειξαν αναγωγική δραστικότητα σε αντιδράσεις σε ολόκληρο κύτταρο. Μετά την απομόνωση τους, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση και υπερέκφραση σε ξενιστή *E. coli*, όπου μετά από καθαρισμό προέκυψαν τα ένζυμα σε στερεή μορφή και με καθαρότητες που αγγίζουν το 70%. Όλες οι κετοredουκτάσες αποδείχτηκαν εξαιρετικά σταθερές για πολλούς μήνες μετά από την αποθήκευσή τους στους -20°C.

Οι κετορεδουκτάσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν NADPH-εξαρτώμενες. Και το συνένζυμο είναι επίσης εμπορικά διαθέσιμο. Για την αναγέννηση του συνενζύμου χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανακύκλωσης γλυκόζη/αφυδρογονάση της γλυκόζης από *Bacillus cereus*.[19] Στο σύστημα αυτό έλαβαν μέρος η D-γλυκόζη και η αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH), ένζυμο το οποίο και αυτό είναι εμπορικά διαθέσιμο. Σύμφωνα με το συγκεκριμένο σύστημα, η αφυδρογονάση της γλυκόζης οξειδώνει τη D-γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ ανάγοντας ταυτόχρονα το $NADP^+$ σε NADPH (Σχήμα 11). Η GDH είναι καθαρά εξειδικευμένο ένζυμο στην D-γλυκόζη, οπότε δεν οξειδώνει το προϊόν της αντίδρασης (αλκοόλη). Έτσι με τη χρήση του συγκεκριμένου συστήματος ανακύκλωσης απαιτείται καταλυτική ποσότητα του συνενζύμου βοηθώντας στην ελάττωση του κόστους των ενζυμικών αντιδράσεων.

Εξαιτίας της παραγωγής γλυκονικού οξέος κατά την αντίδραση, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών για τη διατήρηση του pH σε σταθερά επίπεδα. Το pH των αντιδράσεων ήταν 6.9, τιμή στην οποία τα ένζυμα εμφανίζουν αρκετά καλή δραστικότητα και σταθερότητα. Επίσης σε αυτή την τιμή το συνένζυμο ήταν σταθερό για περίπου 18 – 24 ώρες. Άρα όλες οι αντιδράσεις διάρκεσαν το πολύ 24 ώρες. Η θερμοκρασία των αντιδράσεων διατηρήθηκε στους 37^oC, τιμή αρκετά ικανοποιητική για τη διατήρηση της σταθερότητας των ενζύμων και συνενζύμων, αλλά και για την αποφυγή παράπλευρων χημικών αντιδράσεων, που πιθανώς να οδηγούσαν σε παραπροϊόντα.

Πριν από τις ενζυμικές αντιδράσεις, για λόγους ταυτοποίησης, παρασκευάστηκε όλη η σειρά των πιθανών προϊόντων σε ρακεμική μορφή, με χημική μέθοδο.

Για την εύρεση των πιο δραστικών και εκλεκτικών ενζύμων, το υπόστρωμα εξετάστηκε με σειρά κετορεδουκτασών.

Ο έλεγχος της πορείας των ενζυμικών αντιδράσεων, της εναντιοεκλεκτικότητας και της διαστερεοεκλεκτικότητας πραγματοποιήθηκε με αέρια χρωματογραφία με χειρόμορφη τριχοειδή κολώνα. Τα προϊόντα ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία (NMR) πρωτονίου και άνθρακα.

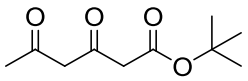
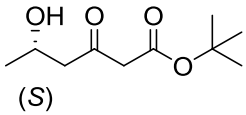
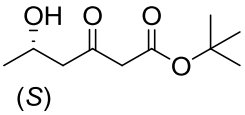
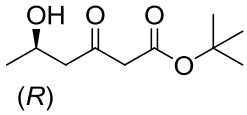
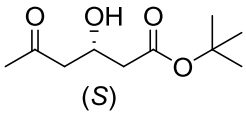
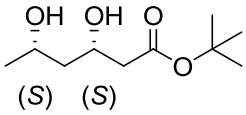
Τέλος, μετά από την δοκιμή του υποστρώματος με τις κετορεδουκτάσες, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός σχετικής και απόλυτης στερεοδομής όλων των οπτικά ενεργών προϊόντων.

Ενζυμική αναγωγή προς το σχηματισμό οπτικά καθαρών υδρόξυ-κετο εστέρων

Ακολουθώντας την παραπάνω μεθοδολογία οι ενζυμικές αναγωγές πραγματοποιήθηκαν με μεγάλη ευκολία συνθέτοντας πολύτιμες χειρόμορφες ενώσεις, αποδεικνύοντας έτσι την μεγάλη σημασία των κετοredουκτασών στην ασύμμετρη οργανική σύνθεση.

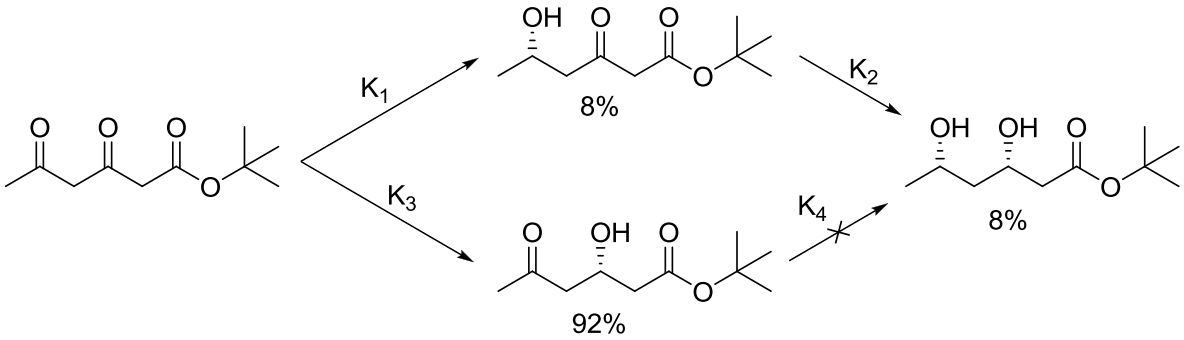
Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα καλύτερα αποτελέσματα (όσον αφορά στην στερεοεκλεκτικότητα και στο ποσοστό μετατροπής) της ενζυμικής αναγωγής του 3,5-διοξοεξανοϊκού τριτ-βουτυλεστέρα.

Πίνακας 1

Υπόστρωμα	KRED	Συνθήκες αντίδρασης	Μετατροπή (χρόνος)	Προϊόν
	104, B1E	pH 6,9 37^0C	>99% (4h)	 99% ee
	105		70% (24h)	 99% ee
	107		>99% (3h)	 99% ee
	118, 119, 131		>99% (2,5h)	92%  95% ee 8%  99% ee, de

Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι τα ένζυμα 104/B1E και 107 οδηγούν στα δύο εναντιομερή, τον (*S*)-5-υδρόξυ-3-κέτο εστέρα **4a** και τον (*R*)-5-υδρόξυ-3-κέτο εστέρα **4b** αντίστοιχα, με μεγάλη οπτική καθαρότητα. Σημαντικό όμως αποτέλεσμα αποτελεί η βιοκαταλυτική αναγωγή με τα ένζυμα 118, 119 και 131, κατά την οποία ανάγεται η 3 κετοομάδα του δικετοεστέρα σε πολύ υψηλό ποσοστό, 92% δίνοντας όμως ένα μικρό ποσοστό 8% *syn*-διόλης. Η συγκεκριμένη ενζυμική αναγωγή μελετήθηκε περαιτέρω ούτως

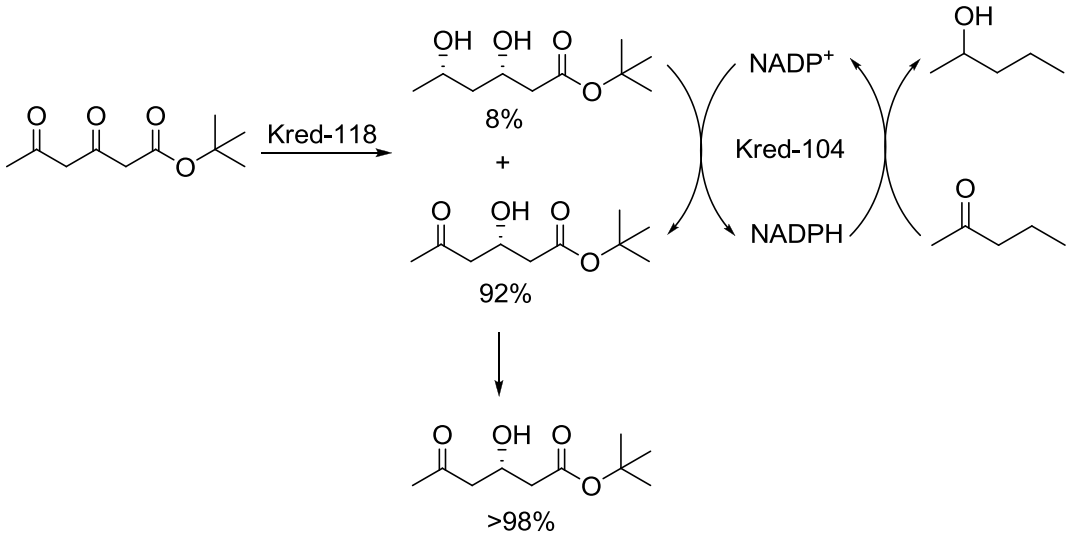
ώστε να διαπιστωθεί η πιθανή πορεία που οδηγεί στο παραπροϊόν της διόλης. Οι πιθανές πορείες είναι: α) πρώτη αναγωγή στην 5 θέση και δεύτερη αναγωγή στην 3 θέση, β) το αντίστροφο, δηλαδή πρώτα η αναγωγή στην 3 θέση και μετά στην 5 θέση. Οπότε σε καθαρό δείγμα του (*S*)-3-υδρόξυ-5-κέτο εστέρα **5a** που προέκυψε από τον χρωματογραφικό διαχωρισμό του μίγματος από την ενζυμική αναγωγή με το ένζυμο KRED-118, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω αναγωγή πάλι με την KRED-118, όπου διαπιστώθηκε ότι δεν σχηματίζεται η διόλη. Έτσι στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ενζυμική αναγωγή του (*S*)-5-υδρόξυ-3-κέτο εστέρα **4a** με το ίδιο ένζυμο (KRED-118), όπου το προϊόν της αναγωγής είναι η *syn*-διόλη. Τα παραπάνω μας επιβεβαίωσαν ότι με την KRED-118 η αναγωγή πραγματοποιείται πιο γρήγορα στην 3 θέση και με μικρότερη ταχύτητα στην 5 θέση, η οποία συνεχίζει προς τον σχηματισμό της δίολης (Σχήμα 27).



Σχήμα 27. Μηχανισμός σχηματισμού παραπροϊόντος *syn*-διόλης. Με K_3>>K_1 και K_2>>K_4

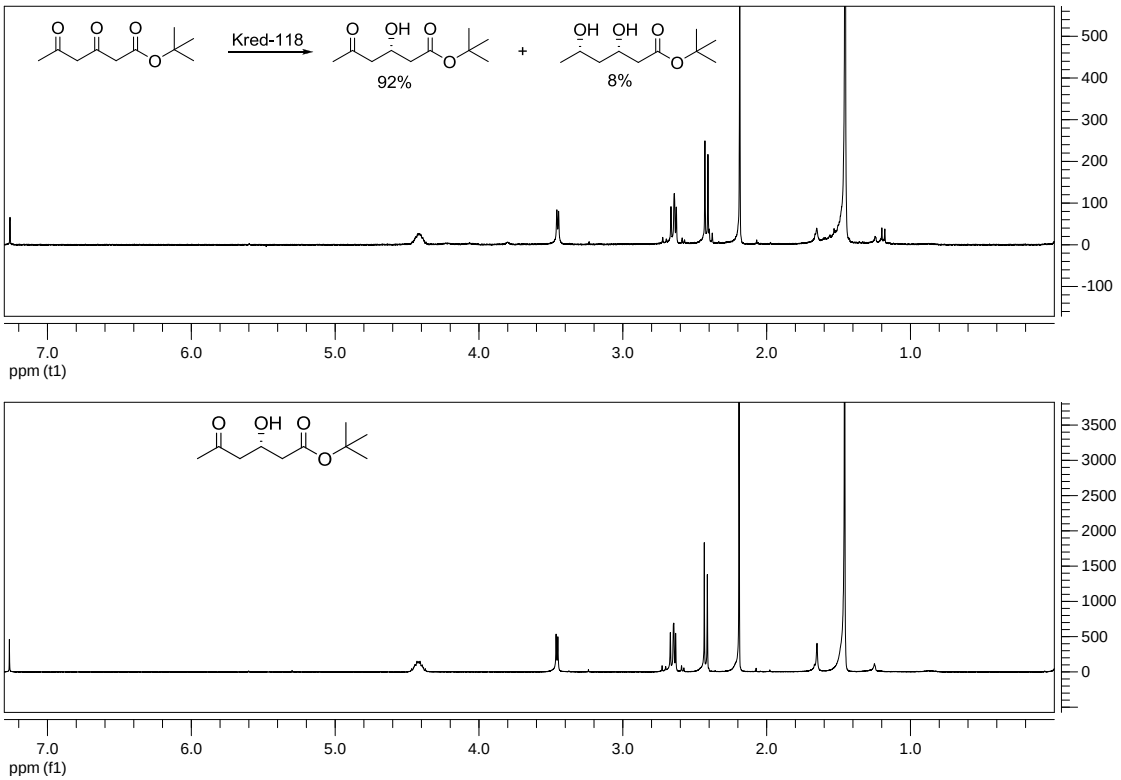
Η μη αναμενόμενη συμπεριφορά του ενζύμου KRED-118 και η εντυπωσιακή τοποεκλεκτικότητα του οδήγησε σε μια σειρά πειραμάτων για την μείωση του ποσοστού του παραπροϊόντος της διόλης. Σύμφωνα με τα δεδομένα που είχαμε μέχρι στιγμής, δηλαδή ότι η κετοredουκτάση 104 καταλύει την αναγωγή στην 5 θέση του δικετοεστέρα, καθώς και ότι η περαιτέρω αναγωγή με την κετοredουκτάση 118 οδηγεί στο σχηματισμό της *syn*-διόλης και γνωρίζοντας ότι οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις είναι αμφίδρομες, πραγματοποιήσαμε την οξείδωση στο μίγμα προϊόντων, που προκύπτουν από την αναγωγή με το ένζυμο KRED-118, με την κετοredουκτάση 104. Συγκεκριμένα πραγματοποιήσαμε την αναγωγή στον δικετοεστέρα με το ένζυμο KRED-118 και μετά απο 24 ώρες που το ένζυμο και το συνένζυμο έχασαν τη δραστικότητα τους, προσθέσαμε στην ίδια φιάλη το ένζυμο KRED-104 και την οξειδωμένη μορφή του συνενζύμου $NADP^+$. Έτσι η κετοredουκτάση 104 καταλύει την οξείδωση στην 5 θέση της διόλης μέσω του $NADP^+$.

Για την ανακύκλωση του συνενζύμου $NADP^+$, προσθέσαμε περίσσεια 2-πεντανόνης, η οποία ανάγεται με το συγκεκριμένο ένζυμο, δίνοντας 2-πεντανόλη, που απομακρύνεται εύκολα υπό ελαττωμένη πίεση. Με τον τρόπο αυτό πραγματοποιήθηκε η οξείδωση της διόλης και η σύνθεση του 3-υδρόξυ-5-κέτο εστέρα **5a** σε μεγάλη οπτική καθαρότητα (Σχήμα 28).



Σχήμα 28. Ενζυμική αναγωγή με το ένζυμο KRED-118 και ενζυμική οξείδωση με το ένζυμο KRED-104 προς το σχηματισμό οπτικά καθαρού 3-υδρόξυ-5-κετο εστέρα, ως μοναδικό προϊόν

Το παραπάνω αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται και από το φάσμα ^{1}H NMR, όπου η διπλή κορυφή των πρωτονίων του μεθυλίου της διόλης στα ~1,2 ppm, έχει εξαφανιστεί (Σχήμα 29).

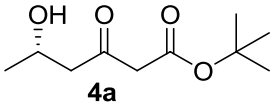
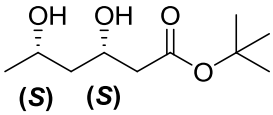
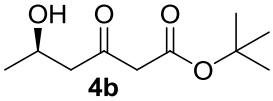
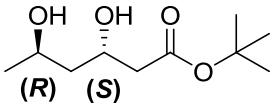
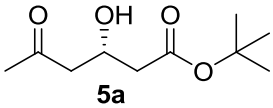
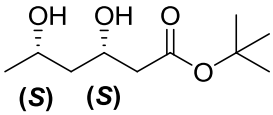


Σχήμα 29. Στα παραπάνω φάσματα ^{1}H NMR φαίνεται ότι έχει εξαφανιστεί η διπλή κορυφή του παραπροϊόντος της διόλης στα ~1,2 ppm.

Διαδοχική ενζυμική αναγωγή προς το σχηματισμό οπτικά καθαρών 1,3-διολών

Στη συνέχεια μελετήθηκε η περαιτέρω ενζυμική αναγωγή των οπτικά καθαρών και ενζυμικά παραγόμενων υδρόξυ-κέτο-εστέρων προς τον σχηματισμό β,δ-διυδρόξυ εστέρων. Στον Πίνακα 2 φαίνονται τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά στην στερεοεκλεκτικότητα και στο ποσοστό μετατροπής.

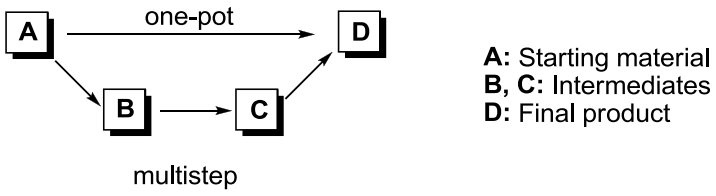
Πίνακας 2

Υπόστρωμα	KRED	Συνθήκες αντίδρασης	ee, de %	Μετατροπή (χρόνος)	Προϊόν
 **4a**	118	pH 6,9 37^0C	>99, 99%	>99% (6h)	 (*S*) (*S*)
 **4b**	118		>99, 90%	>99% (6h)	 (*R*) (*S*)
 **5a**	104		>99, 95%	>95% (24h)	 (*S*) (*S*)

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 2 φαίνεται ότι είναι δυνατή η σύνθεση των δύο απο τα τέσσερα διαστερεομερή σε μεγάλη οπτική και χημική καθαρότητα (>99% ee, >90% de). Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε ενζυμική αναγωγή του (S)-5-υδρόξυ-3-κετο εστέρα **4a** με το ένζυμο KRED-118 προς τον σχηματισμό της *syn*-διόλης (*S*,*S*), διαδικασία που πραγματοποιήθηκε και αντίστροφα, δηλαδή στον (S)-3-υδρόξυ-5-κέτο εστέρα **5a** πραγματοποιήθηκε η ενζυμική αναγωγή με την κετορεδουκτάση 104, που οδήγησε στο ίδιο προϊόν.

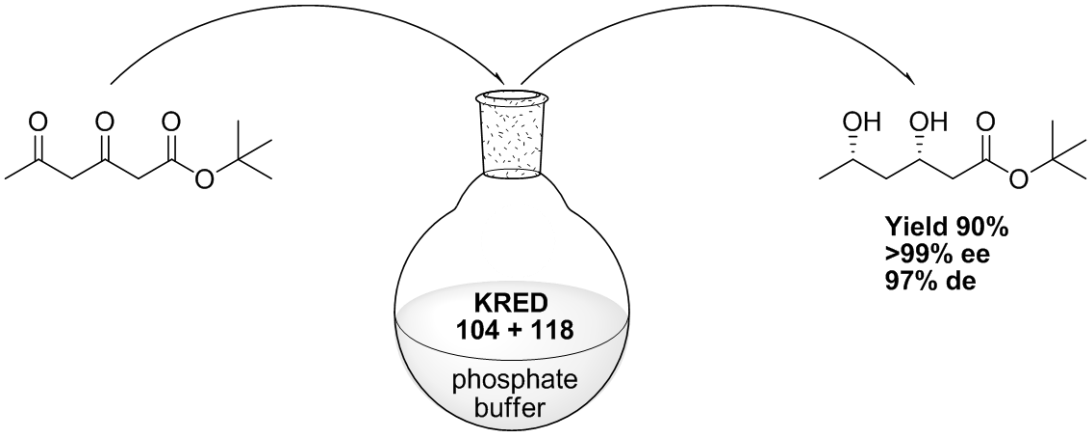
Σύνθεση οπτικά καθαρών 1,3-διολών σε ένα στάδιο (cascade)

Τα τελευταία χρόνια οι ερευνητικές προσπάθειες τόσο στον ακαδημαϊκό χώρο όσο και στην χημική βιομηχανία επικεντρώνονται στα πλαίσια περιβαλλοντικώς αποδεκτών συνθηκών και γενικότερα στα πλαίσια της πράσινης χημείας. Η πρόκληση, λοιπόν, σε συνθέσεις με πολλά στάδια είναι να συνδυαστούν αρκετές καταλυτικές αντιδράσεις σε ένα βήμα, στην ίδια συσκευή, διαδικασία γνωστή ως «καταλυτική διαδικασία πολλαπλών βημάτων» (cascade). Σε αυτό το είδος αντιδράσεων συμβαίνουν πολλες διαδοχικές αντιδράσεις στην ίδια φιάλη, χωρίς την απομόνωση του ενδιαμέσου (Σχήμα 30), με αποτέλεσμα να αποφεύγεται επιπλέον προσπάθεια, χρόνος και κατανάλωση διαλυτών. Κατά συνέπεια, οι διαδοχικές αντιδράσεις με πολλά ένζυμα διευκολύνουν και απλοποιούν την συνθετική πορεία προς το επιθυμητό προϊόν.[42]



Σχήμα 30. Διαδοχικές αντιδράσεις στην ίδια φιάλη οδηγούν στο τελικό προϊόν, χωρίς την απομόνωση των διαφόρων ενδιαμέσων

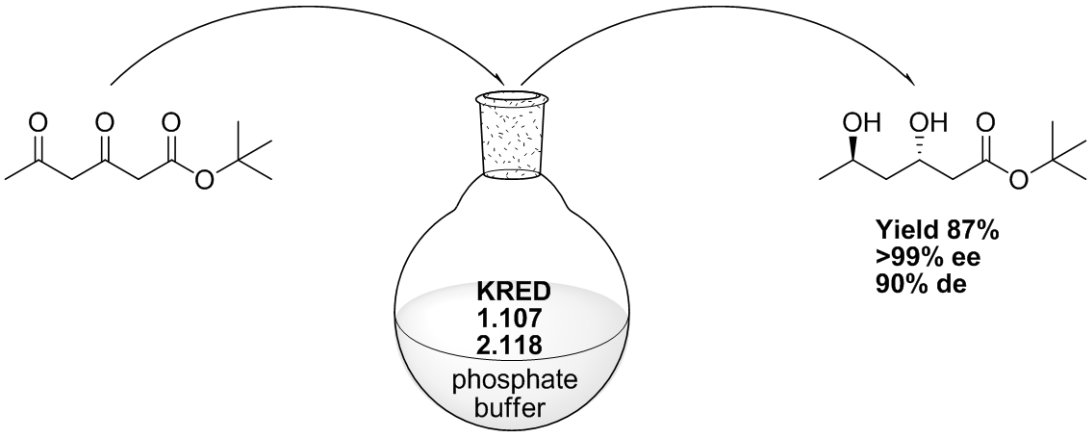
Έχοντας λοιπόν μελετήσει την ενζυμική αναγωγή του β,δ-δικετοεστέρα **3** και έχοντας προσδιορίσει τους κατάλληλους βιοκαταλύτες για τον σχηματισμό των *syn*- και *anti*- διυδρόξυ εστέρων, προχωρήσαμε στην διερεύνηση της δυνατότητας να πραγματοποιηθεί αυτό το σχήμα σε μία φιάλη, χωρίς απομόνωση του ενδιαμέσου. Πραγματοποιήσαμε την δύο σταδίων αναγωγή στην ίδια φιάλη (cascade), χωρίς να απομονωθεί το ενδιάμεσο προϊόν, ξεκινώντας από τον δικετοστέρα. Με τον τρόπο αυτό συντέθηκε απευθείας η *syn*-διόλη. Η προσθήκη και των δύο ενζύμων (KRED-118 και KRED-104) καθώς και των απαραίτητων συνενζύμων και ανακυκλωτικών, έγινε ταυτόχρονα στην φιάλη της αντίδρασης, οδηγώντας σε ένα βήμα στο μοναδικό προϊόν, την (*S*,*S*)-διόλη (Σχήμα 31).



Σχήμα 31

Για την σύνθεση της *anti*-διόλης από τον (R)-5-υδρόξυ-3-κέτο εστέρα **4b** χρησιμοποιήθηκε η κετορεδουκτάση 118 (βλέπε Πίνακα 2). Δεδομένης της επιτυχημένης σύνθεσης της *syn*-διόλης σε ένα βήμα, πραγματοποιήσαμε και εδώ την δύο σταδίων αναγωγή στην ίδια φιάλη, ξεκινώντας από τον δικετοεστέρα. Η διαδικασία ήταν λίγο

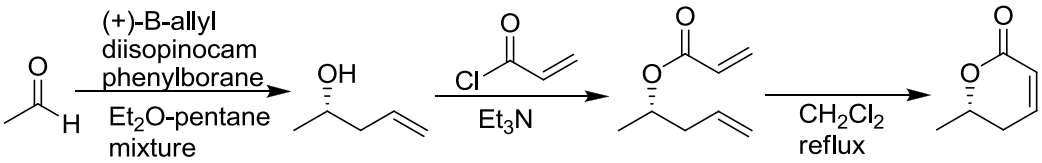
διαφορετική. Σε αυτή την περίπτωση πρώτα προσθέσαμε το ένζυμο KRED-107 για την αναγωγή στην 5 θέση και μετά το πέρας της αντίδρασης (3 ώρες) προσθέσαμε το ένζυμο KRED-118, χωρίς να απομονώσουμε το ενδιάμεσο προϊόν, για την σύνθεση της *anti*-διόλης σε μεγάλη οπτική καθαρότητα (Σχήμα 32). Πρέπει να σημειωθεί ότι η προσθήκη των δύο ενζύμων δεν πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα σε αυτήν την περίπτωση γιατί η αναγωγή με το ένζυμο KRED-118 δίνει ένα μικρό ποσοστο *syn*-διόλης, γεγονός που θα μείωνε την διαστερεομερική περίσσεια της τελικής διόλης.



Σχήμα 32

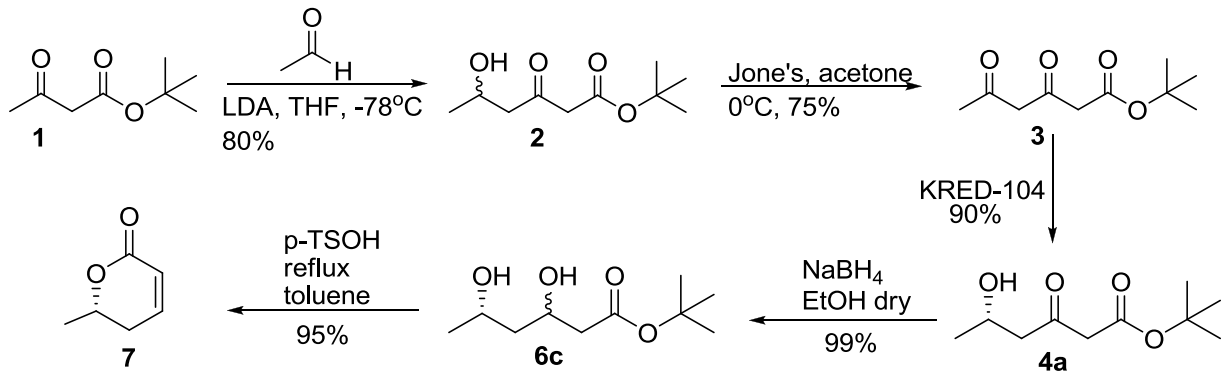
Σύνθεση του φυσικού προϊόντος «Παρασορβικό οξύ»

Βασισμένοι στα παραπάνω πολύ θετικά αποτελέσματα, επιχειρήσαμε να τα αξιοποιήσουμε εφαρμόζοντας την μέθοδο μας για την ασύμμετρη σύνθεση του φυσικού προϊόντος Parasorbic acid. Στην βιβλιογραφία έχει δημοσιευτεί μία εντυπωσιακή και γρήγορη σύνθεση του φυσικού προϊόντος με χρήση χειρόμορφου αντίδραστηρίου για την δημιουργία του στερεογονικού κέντρου και καταλύτη πρώτης γενιάς Grubbs (Σχήμα 33).[43]



Σχήμα 33

Στην παρούσα εργασία για την σύνθεση του φυσικού προϊόντος Parasorbic acid ξεκινήσαμε με αλδοδική συμπύκνωση του κετο-εστέρα **1** με ακεταλδεϋδη προς τον σχηματισμό του 5-υδρόξυ-3-κέτο εστέρα **2**. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η οξείδωση για τον σχηματισμό του δικετοεστέρα **3**. Ακολούθησε το στάδιο κλειδί για την δημιουργία του στερεογονικού κέντρου, η ενζυμική αναγωγή, από την οπόια προέκυψε ο (S)-5-υδρόξυ-3-κέτο εστέρας **4a**. Έπειτα πραγματοποιήθηκε η χημική αναγωγή για την σύνθεση του διυδρόξυ-εστέρα **6a**. Τέλος, μέσω αντίδρασης κυκλοποίησης και αφυδάτωσης συνθέσαμε το φυσικό προϊόν **7** με συνολική απόδοση 47% και σε μεγάλη εναντιοεκλεκτική περίσσεια >99% (Σχήμα 34).



Σχήμα 34

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών Sigma-Aldrich, Merck, Riedel και Fluka. Τα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Στις αντιδράσεις όπου χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης ξηρό τετραϋδροφουρανιο (THF), η ξήρανση έγινε με απόσταξη τετραϋδροφουρανίου παρουσία μεταλλικού Na ως ξηραντικού και βενζοφαινόνης ως δείκτη, σε συσκευή Soxhlet. Η παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων έγινε σύμφωνα με την γνωστή βιβλιογραφική μέθοδο.[44]

Οι κετοredουκτάσες, το συνένζυμο NADPH και η αφυδρογονάση της γλυκόζης ήταν της εταιρίας Biocatalytics και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Όργανα

Τα φάσματα ^{1}H και ^{13}C NMR ελληφθησαν με το φασματόμετρο 300MHz της Bruker και σαν σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε τετραμέθυλοσιλανιο (TMS) σε διαλύτη $CDCl_3$. Η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων καθώς και οι εκλεκτικότητες μελετήθηκαν με αέριο χρωματογράφο της Hewlett Packard 5890 Series II με ανιχνευτή FID και χειρόμορφη κολώνα (20% permethylated κυκλοδεξτρίνη) 30m x 0.25mm x 0.25μm.

Γενικές συνθετικές μεθόδοι

Αλδολική συμπύκνωση

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρό THF (5 ml) διαλύεται ξηρή διισοπροπυλαμίνη (4.4 mmoles, 621 μL) και αφού ψύχετε στους 0^0C σε παγόλουτρο, προστίθεται στάγδην το BuLi 1,6M σε εξάνιο (4.4 mmoles, 2.75 mL). Το μίγμα αναδεύεται για 20 λεπτά στους 0^0C και στη συνέχεια ψύχεται στους -20^0C. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος δικετοεστέρα(1.6 mmoles) σε ξηρό THF και ανάδευση για 60 λεπτά. Ακολούθως το διάλυμα ψύχεται περαιτέρω στους -78^0C και προστίθεται διάλυμα ξηρού THF που περιέχει αλδεϋδη (3 mmoles) και το μίγμα αναδεύεται εως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το οποίο ανιχνεύεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), ενώ η θερμοκρασία παραμένει στους -78^0C.

Το προϊόν απομονώνεται έπειτα από προσθήκη κορεσμένου διαλύματος NH_4Cl και 2 εκχυλίσεις του μίγματος με EtOAc. Ακολουθεί ξήρανση της οργανικής φάσης με $MgSO_4$ και απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος γίνεται με χρωματογραφία στήλης (Hex/EtOAc, v/v, 5/1).

Αντίδραση οξείδωσης αλκοολών με Jone's

Σε σφαιρική φιάλη με μαγνητικό αναδευτήρα διαλύεται η αλκοόλη (0.5 mmoles) σε 2.5 ml ακετόνης και το διάλυμα ψύχεται στους 0^0C με παγόλουτρο και τήθεται υπό ανάδευση. Κατόπιν γίνεται προσθήκη σταγόνων του αντιδραστηριού Jone's (180 μL), το οποίο είχε πρώτα διαλυθεί σε 0.5 mL ακετόνης, οπότε το διάλυμα θα χρωματιστεί αρχικά καστανοκόκκινο. Το αντιδραστήριο Jone's προστίθεται στάγδην στους 0^0C στο διάλυμα της αλκοόλης έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC).

Η απομόνωση του προϊόντος γίνεται ως εξής: Το διάλυμα αραιώνεται στο διπλάσιο με ρυθμιστικό διάλυμα (pH 8). Στη συνέχεια εκχυλίζεται 2 φορές με Et_2O. Η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$. Ακολουθεί διήθηση και απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση.

Αντίδραση αναγωγής κετόνης με $NaBH_4$

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε 10 mL άνυδρης αιθανόλης προστίθενται 0.098 mmoles $NaBH_4$. Στους 0^0C και σε διάρκεια 5 λεπτών προστίθενται στάγδην 0.3 mmoles δικετοεστέρα ή υδροξυ-κετο εστέρα διαλυμένα σε 5 mL άνυδρης αιθανόλης. Το μίγμα αναδεύεται για 2-4 ώρες στους 0^0C, ελέγχοντας την πρόοδο της αντίδρασης με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται αργά στους 0^0C περίπου 1 mL κορεσμένου διαλύματος NH_4Cl και το διάλυμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Κατόπιν προστίθενται 20 mL νερό και το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (2x20 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 6/1). Απόδοση 70 – 80%.

Ενζυμική αναγωγή δικετοεστέρα ή υδρόξυ-κετο εστέρα

Σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (200 mM, pH=6.9) προστίθενται υπόστρωμα δικετοεστέρα ή υδροξυ-κετο εστέρα (25 mM), κετοredουκτάση (2 mg/mL),

NADPH (2.5 mM, 2 mg), γλυκόζη (100 mM, 18 mg) και αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH, 2 mg/mL). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση στους 37 ^{o}C και ο έλεγχος αυτής γίνεται, ανάλογα με την κετοredουκτάση, κάθε 1 ώρα ή μετά από 24 ώρες, με αέριο χρωματογράφο μετά από εκχύλιση του μίγματος με EtOAc.

Εστεροποίηση υδρόξυ-κετο εστέρων (ρακεμικών και οπτικά καθαρών) με οξικό ανυδρίτη

Σε υπόστρωμα υδρόξυ-κετο εστέρα (25mM) διαλυμένο σε 1 mL ξηρό CH_2Cl_2 στους 0^0C, προστίθεται οξικός ανυδρίτης (30μL) και καταλυτική ποσότητα tert-butyldimethylsilyltrifluormethansulfonat (TBDMSOTF) (1μL). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι το πέρας της, το οποίο διαπιστώνεται με αέριο χρωματογράφο μετά από αραίωση του μίγματος με EtOAc και 2 εκχυλίσεις του μίγματος με διάλυμα υδροχλωρίου.

Εστεροποίηση διυδρόξυ εστέρων (ρακεμικών και οπτικά καθαρών) με οξικό ανυδρίτη και K_2CO_3

Σε υπόστρωμα διυδρόξυ εστέρα (25mM) διαλυμένο σε 2 mL ξηρό CH_2Cl_2 στους 0^0C, προστίθεται οξικός ανυδρίτης (50μL) και καταλυτική ποσότητα ανθρακικού καλίου και DMAP. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι το πέρας της, το οποίο διαπιστώνεται με αέριο χρωματογράφο μετά από 2 εκχυλίσεις του μίγματος με $NaHCO_3$.

Σύνθεση των MPA εστέρων

Σε διάλυμα της δευτεροταγούς αλκόλης (0.1mmole), σε άνυδρο CH_2Cl_2, προστίθενται 1.1 ισοδύναμα DCC (0.11 mmole, 23 mg), 1.1 ισοδύναμα του αντίστοιχου (*R*) ή (*S*) MPA (0.11 mmole, 18 mg) και καταλυτική ποσότητα DMAP. Μετά από ανάδευση στους 0 °C για 6 ώρες, το μίγμα διηθείται και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 5/1). Απόδοση 90%.

Σύνθεση Υποστρωμάτων

Σύνθεση του ρακεμικού 5-υδρόξυ-3-οξο-εξανικού *τριτ*-βουτυλεστέρα με αλδολική συμπύκνωση (2)

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρό THF (5 ml) διαλύθηκε ξηρή διισοπροπυλαμίνη (4,4 mmoles, 621 μL) και αφού ψύχθηκε στους 0^0C σε παγόλουτρο, προστέθηκε στάγδην το BuLi 1,6M σε εξάνιο (4,4 mmoles, 2,75 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 20 λεπτά στους 0^0C και στη συνέχεια ψύχθηκε στους -20^0C. Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος ακετο οξικού τριτ-βουτυλεστέρα **1** (1,6 mmoles, 260 mg) σε ξηρό THF και ανάδευση για 60 λεπτά. Ακολούθως το διάλυμα ψύχθηκε περαιτέρω στους -78^0C και προστέθηκε διάλυμα ξηρού THF που περιείχε ξηρή ακεταλδεϋδη (3 mmoles, 180 μL) και το μίγμα αναδεύτηκε εως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, που ανιχνεύτηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), ενώ η θερμοκρασία παρέμεινε στους -78^0C.

Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από προσθήκη κορεσμένο NH_4Cl και 2 εκχυλίσεις του διαλύματος με EtOAc. Ακολούθησε ξήρανση με $MgSO_4$ και απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη υπό ελαττωμενη πίεση. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφία στήλης (Hex:EtOAc, v/v, 5/1). Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 80%.
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300MHz, δ ppm): 1.210 (d, J=6.3 Hz, 2H), 1.471 (s, 9H), 2.775 (m, 2H), 3.372 (s, 2H), 4.253 (m, 1H).

Σύνθεση του 3,5-διοξο-εξανικού τριτ-βουτυλεστέρα (3)

Σε σφαιρική φιάλη με μαγνητικό αναδευτήρα διαλύθηκε ο ρακεμικός 3-υδρόξυ-5-οξο-εξανικός τριτ –βουτυλεστέρας **2** (0,5 mmoles, 100 mg) σε 2,5 ml ακετόνης και το διάλυμα ψύχθηκε στους 0^0C με παγόλουτρο και τέθηκε υπό ανάδευση. Κατόπιν έγινε η προσθήκη σταγόνων του αντιδραστηριού Jone's (180 μL), το οποίο είχε πρώτα διαλυθεί σε ο,5 mL ακετόνης, οπότε το διάλυμα χρωματίστηκε αρχικά καστανοκόκκινο. Το αντιδραστήιο Jone's προστίθεται στάγδην στους 0^0C μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος με TLC).

Η απομόνωση του προϊόντος έγινε ως εξής: Το διάλυμα αραιώθηκε στο διπλάσιο με phosphate buffer (pH 8). Στη συνέχεια εκχυλίστηκε 2 φορές EtOAc. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με $MgSO_4$. Ακολούθησε διήθηση και απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 75%.

Στη συνέχεια ελήφθησαν τα φάσματα NMR της κετόνης, όπου στο φάσμα ^{1}H NMR παρατηρήθηκαν και τα πρωτόνια των δύο ενολικών μορφών της κετόνης.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300MHz, δ ppm): 1.468 (s, 9H), 2.253 (s, 3H), 3.459 (s, 2H), 3.727 (s, 2H).

Ενζυμική αναγωγή του 3,5-διοξο-εξανικού *τριτ*-βουτυλεστέρα

Σύνθεση οπτικώς καθαρού (*S*)-5-υδρόξυ-3-κέτο εστέρα (4a)

Η σύνθεση του οπτικά ενεργού 5-υδρόξυ-3-κετο εστέρα έγινε με ενζυμική αναγωγή του 3,5-διοξο-εξανικού τριτ-βουτυλεστέρα **3** με την κετορεδουκτάση 104/B1E σε pH 6,9 σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής. Συγκεκριμένα διαλύθηκαν 5mgr υποστρώματος σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και προστέθηκαν 18mg γλυκόζης, 2mgr ενζύμου KRED-104/B1E, 2mgr αφυδρογονάση της γλυκόζης και 2mgr αναγωγικού NADPH. Το σύστημα αναδεύτηκε στους 37^{0}C για 4 ώρες μέχρι το πέρας της αντίδρασης. Απόδοση >99%

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300MHz, δ ppm): 1.210 (d, J=6.3 Hz, 2H), 1.471 (s, 9H), 2.755 (m, 2H), 3.372 (s, 2H), 4.253 (m, 1H).

Σύνθεση οπτικώς καθαρού (*R*)-5-υδρόξυ-3-κέτο εστέρα (4b)

Η σύνθεση του οπτικά ενεργού 5-υδρόξυ-3-κετο εστέρα έγινε με ενζυμική αναγωγή του 3,5-διοξο-εξανικού τριτ-βουτυλεστέρα **3** με την κετορεδουκτάση 107 σε pH 6,9 σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής. Συγκεκριμένα διαλύθηκαν 5mgr υποστρώματος σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και προστέθηκαν 18mg γλυκόζης, 2mgr ενζύμου KRED-107, 2mgr αφυδρογονάση της γλυκόζης και 2mgr αναγωγικού NADPH. Το σύστημα αναδεύτηκε στους 37^{0}C για 3 ώρες μέχρι το πέρας της αντίδρασης. Απόδοση >99%

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300MHz, δ ppm): 1.210 (d, J=6.3 Hz, 2H), 1.471 (s, 9H), 2.755 (m, 2H), 3.372 (s, 2H), 4.253 (m, 1H).

Σύνθεση οπτικώς καθαρού (*S*)-3-υδρόξυ-5-κέτο εστέρα (5a)

Η σύνθεση του οπτικά ενεργού 3-υδρόξυ-5-κετο εστέρα έγινε με ενζυμική αναγωγή του 3,5-διοξο-εξανικού τριτ-βουτυλεστέρα **3** με την κετορεδουκτάση 118/119/131 σε pH 6,9 σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής. Συγκεκριμένα διαλύθηκαν 5mgr υποστρώματος σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και προστέθηκαν 18mg

γλυκόζης, 2mgr ενζύμου KRED-118/119/131, 2mgr αφυδρογονάση της γλυκόζης και 2mgr αναγωγικού NADPH. Το σύστημα αναδεύτηκε στους 37^0C για 2,5 ώρες μέχρι το πέρας της αντίδρασης. Απόδοση >99%

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300MHz, δ ppm): 1.195 (d, J=6.6 Hz, 3H) του παραπροϊόντος της διόλης, 1.459 (s, 9H), 2.191 (s, 3H), 2.423 (m, 2H), 2.646 (m, 2H), 3.446 (br s, 1H), 4.418 (m, 1H).

Ενζυμική οξείδωση του μίγματος (*S*)-3-υδρόξυ-5-κέτο εστέρα (5a) και (*S*,*S*)-διυδρόξυ εστέρα (6a) προς το σχηματισμό οπτικά καθαρού (*S*)-3-υδρόξυ-5-κέτο εστέρα ως μοναδικό προϊόν

Η οξείδωση του μίγματος που προέκυψε από την ενζυμική αναγωγή με το ένζυμο KRED-118 πραγματοποιήθηκε για την μείωση το ποσοστού της διόλης **6a**. Συγκεκριμένα μετά από 24 ώρες που το ένζυμο KRED-118 έχασε την δραστικότητα του, προστέθηκαν στην ίδια φιάλη 8μL 2-πεντανόνης, 2mgr ενζύμου KRED-104, και 2mgr οξειδωτικού $NADP^+$. Το σύστημα αναδεύτηκε στους 37^0C για 24 ώρες μέχρι το πέρας της αντίδρασης.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300MHz, δ ppm): 1.459 (s, 9H), 2.192 (s, 3H), 2.423 (m, 2H), 2.651 (m, 2H), 4.445 (d, J=3.9 Hz, 1H), 4.419 (m, 1H).

Ενζυμική αναγωγή των οπτικά καθαρών 5-υδρόξυ-3-κετο εστέρων προς το σχηματισμό οπτικά καθαρών διολών

Σύνθεση οπτικώς καθαρού (*S*,*S*)-3,5-διυδρόξυ εστέρα (6a)

Η σύνθεση του οπτικά ενεργού 3,5-διυδρόξυ εστέρα έγινε με ενζυμική αναγωγή του (*S*)-5-υδρόξυ-3-κέτο εστέρα **4a** με την κετοredουκτάση 118 σε pH 6,9 σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής. Συγκεκριμένα διαλύθηκαν 5mgr υποστρώματος σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και προστέθηκαν 18mg γλυκόζης, 2mgr ενζύμου KRED-118, 2mgr αφυδρογονάση της γλυκόζης και 2mgr αναγωγικού NADPH. Το σύστημα αναδεύτηκε στους 37^0C για 6 ώρες μέχρι το πέρας της αντίδρασης. Απόδοση >99%

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300MHz, δ ppm): 1.195 (d, J=6.3 Hz, 3H), 1.464 (s, 9H), 1.537 (m, 2H), 2.394 (m, 2H), 3.415 (br s, 1H), 3.786 (br s, 1H), 4.069 (m, 1H), 4.224 (m, 1H).

Σύνθεση οπτικώς καθαρού (*S*,*S*)-3,5-διυδρόξυ εστέρα (6a)

Η σύνθεση του οπτικά ενεργού 3,5-διυδρόξυ εστέρα έγινε με ενζυμική αναγωγή του (*S*)-3-υδρόξυ-5-κέτο εστέρα **5a** με την κετοredουκτάση 104 σε pH 6,9 σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής. Συγκεκριμένα διαλύθηκαν 5mgr υποστρώματος σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και προστέθηκαν 18mg γλυκόζης, 2mgr ενζύμου KRED-104, 2mgr αφυδρογονάση της γλυκόζης και 2mgr αναγωγικού NADPH. Το σύστημα αναδεύτηκε στους 37^0C για 24 ώρες μέχρι το πέρας της αντίδρασης. Απόδοση 95%

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300MHz, δ ppm): 1.195 (d, J=6.3 Hz, 3H), 1.464 (s, 9H), 1.537 (m, 2H), 2.394 (m, 2H), 3.415 (br s, 1H), 3.786 (br s, 1H), 4.069 (m, 1H), 4.224 (m, 1H).

Σύνθεση οπτικώς καθαρού (*R*,*S*)- 3,5-διυδρόξυ εστέρα (6b)

Η σύνθεση του οπτικά ενεργού 3,5-διυδρόξυ εστέρα έγινε με ενζυμική αναγωγή του (*R*)-5-υδρόξυ-3-κετο εστέρα **4b** με την κετοredουκτάση 118 σε pH 6,9 σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής. Συγκεκριμένα διαλύθηκαν 5mgr υποστρώματος σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και προστέθηκαν 18mg γλυκόζης, 2mgr ενζύμου KRED-118, 2mgr αφυδρογονάση της γλυκόζης και 2mgr αναγωγικού NADPH. Το σύστημα αναδεύτηκε στους 37^0C για 6 ώρες μέχρι το πέρας της αντίδρασης. Απόδοση >99%

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300MHz, δ ppm): 1.233 (d, J=6.3 Hz, 3H), 1.463 (s, 9H), 1.603 (m, 2H), 2.451 (m, 2H), 3.560 (br s, 1H), 4.128 (m, 1H), 4.308 (m, 1H).

Διαδοχική ενζυμική αναγωγή του 3,5-διοξο-εξανικού *τριτ*-βουτυλεστέρα προς το σχηματισμό οπτικά καθαρών διολών

Σύνθεση οπτικώς καθαρού (*S*,*S*)-3,5-διυδρόξυ εστέρα (6a)

Η σύνθεση του οπτικά ενεργού 3,5-διυδρόξυ εστέρα έγινε με ενζυμική αναγωγή του 3,5-διοξο-εξανικού τριτ-βουτυλεστέρα **3** με τις κετοredουκτάσες 104 και 118 σε pH 6,9 σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής. Η προσθήκη των ενζύμων πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα. Συγκεκριμένα διαλύθηκαν 5mgr υποστρώματος σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και προστέθηκαν 18mg γλυκόζης, 2mgr ενζύμου KRED-104 και 2mgr ενζύμου KRED-118, 2mgr αφυδρογονάση της γλυκόζης και 2mgr αναγωγικού NADPH. Το σύστημα αναδεύτηκε στους 37^0C για 24 ώρες μέχρι το πέρας της αντίδρασης. Απόδοση 90%

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300MHz, δ ppm): 1.195 (d, J=6.3 Hz, 3H), 1.464 (s, 9H), 1.537 (m, 2H), 2.394 (m, 2H), 3.415 (br s, 1H), 3.786 (br s, 1H), 4.069 (m, 1H), 4.224 (m, 1H).

Σύνθεση οπτικώς καθαρού (*R*,*S*)- 3,5-διυδρόξυ εστέρα (6b)

Η σύνθεση του οπτικά ενεργού 3,5-διυδρόξυ εστέρα έγινε με ενζυμική αναγωγή του 3,5-διοξο-εξανικού τριτ-βουτυλεστέρα **3** με τις κετορεδουκτάσες 107 και 118 σε pH 6,9 σύμφωνα με την γενική μέθοδο ενζυμικής αναγωγής. Η προσθήκη του ενζύμου 118 πραγματοποιήθηκε μετά από 3 ώρες που τελείωσε η αντίδραση αναγωγής στην 5 θέση. Συγκεκριμένα διαλύθηκαν 5mgr υποστρώματος σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και προστέθηκαν 18mg γλυκόζης, 2mgr ενζύμου KRED-107, 2mgr αφυδρογονάση της γλυκόζης και 2mgr αναγωγικού NADPH. Μετά το πέρας των τριών ωρών προστέθηκαν και 2mgr KRED-118. Το σύστημα αναδεύτηκε στους 37^{0}C για τέσσερις ώρες μέχρι το πέρας της αντίδρασης. Απόδοση 87%

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300MHz, δ ppm): 1.233 (d, J=6.3 Hz, 3H), 1.463 (s, 9H), 1.603 (m, 2H), 2.451 (m, 2H), 3.560 (br s, 1H), 4.128 (m, 1H), 4.308 (m, 1H).

Σύνθεση των MPA εστέρων

Σύνθεση του MPA εστέρα του (*S*)-5-υδρόξυ-3-κετο εστέρα 4a

Σε διάλυμα της δευτεροταγούς αλκόλης (0.1mmole), σε άνυδρο CH_2Cl_2, προστίθενται 1.1 ισοδύναμα DCC (0.11 mmole, 23 mg), 1.1 ισοδύναμα του αντίστοιχου (*R*) ή (*S*) MPA (0.11 mmole, 18 mg) και καταλυτική ποσότητα DMAP. Μετά από ανάδευση στους 0 °C για 6 ώρες, το μίγμα διηθείται και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 5/1). Απόδοση 90%.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300MHz, δ ppm): 1.431 (s, 9H), 1.465 (m, 3H), 2.687 (m, 2H), 3.101 (s, 3H), 3.392 (s, 2H), 4.708 (s, 1H), 5.327 (m, 1H), 7.348 (m, 3H), 7.4002 (m, 2H).

Σύνθεση του MPA εστέρα του (*S*)-3-υδρόξυ-5-κετο εστέρα 5a

Σε διάλυμα της δευτεροταγούς αλκόλης (0.1mmole), σε άνυδρο CH_2Cl_2, προστίθενται 1.1 ισοδύναμα DCC (0.11 mmole, 23 mg), 1.1 ισοδύναμα του αντίστοιχου (*R*) ή (*S*) MPA (0.11 mmole, 18 mg) και καταλυτική ποσότητα DMAP. Μετά από ανάδευση στους 0 °C για 6 ώρες, το μίγμα διηθείται και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό. Το προϊόν της

αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 5/1). Απόδοση 90%.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300MHz, δ ppm): 1.328 (s, 9H), 2.121 (s, 3H), 2.501 (d, J=6.3 Hz, 2H), 2.810 (d, J=6.3 Hz, 2H), 3.405 (s, 3H), 4.708 (s, 1H), 5.543 (m, 1H), 7.343 (m, 2H), 7.407 (m, 3H).

Σύνθεση του φυσικού προϊόντος «Παρασορβικό οξύ»

Αναγωγή του οπτικώς καθαρού (S)-5-υδρόξυ-3-οξο-εξανικού τριτ-βουτυλεστέρα με $NaBH_4$ (6c)

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη και κάτω από αδρανείς συνθήκες προστίθεται ποσότητα $NaBH_4$ (0,75 mmoles, 29 mgr) και 5 ml EtOH dry, και αφήνονται λίγη ώρα για ανάδευση. Στη συνέχεια προστίθεται και η οπτικώς ενεργή αλκοόλη **4a** (1,24 mmoles, 251 mg), διαλύμένη σε 3 ml ξηρή EtOH, στάγδην. Το σύστημα αφήνεται για ανάδευση στους 0^0C , μέχρι το πέρας της αντίδρασης που διαπιστώνεται με TLC.

Για την απομόνωση της διόλης προστέθηκαν μερικές σταγόνες κορεσμένου NH_4Cl, όπου παρατηρήθηκε και η έκλυση αερίου και στη συνέχεια προστέθηκε νερό. Το διάλυμα εκχυλίστηκε 3 φορές με EtOAc. Η συγκεντρωμένη οργανική φάση ξηράνθηκε με $MgSO_4$,και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση 97% αλλά δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω καθαρισμός της.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz, δ ppm): 1.244 (d, J=14.1 Hz, 3H), 1.445 (s, 9H), 1.788 (t, 2H), 2.328-2.568 (m, 3H), 4.347 (m, 2H).

Σύνθεση του τελικού φυσικού προϊόντος μέσω κυκλοποίησης και αφυδάτωσης (7)

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετείται ποσότητα διόλης **6c** (0,49 mmoles, 100 mg) διαλυμένη σε 8 ml τολουόλιο και προστίθεται καταλυτική ποσότητα para-toluenesulfonic acid (TSOH) (30mg). Το σύστημα αναδεύεται και θερμαίνεται μέχρι βρασμού για περίπου 3h , μέχρι το πέρας της αντίδρασης, όπου διαπιστώνεται με TLC.

Για την απομόνωση της ουσίας αραιώνεται το διάλυμα με EtOAc και εκχυλίζεται με διάλυμα 10% $NaHCO_3$ και με κορεσμένο διάλυμα NaCl. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με $MgSO_4$ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Η ουσία απομονώθηκε με απόδοση >99 %.

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz, δ ppm): 1.447 (d, J=6.3 Hz, 3H), 2.336 (m, 2H), 4.580 (m, 1H), 6.030 (m, 1H), 6.871 (m, 1H)

ПАРАРТНМА

Βιβλιογραφία

[1] Faber, K. *Biotransformation in organic Chemistry*, 3rd Edition, Springer, **1997**

[2] Menger, F. M. *Acc. Chem. Res.* **1977**, 44

[3] Zhou, B., Copalan, S. A., Vanmiddlesworth, F., Shieh, W., Sih, J. C., *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5925

[4] Fauve, A., Veschambre, H. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5215

[5] Lee, S. Y., Hong, H. J., Jeon, Y. N., Won, K., Kim, T. B. O*rg. Process Res. & Dev.* **2004**, *8*, 948

[6] Miya, H., Kawada, M., Sugiyama, Y. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1996**, *60*, 95

[7] Forrest, G. L., Gonzales, B. *Chem-Biol. Interact.* **2000**, *129*, 21

[8] Nakamura, K., Yamanaka, R., Matsuda, T., Harads, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2659

[9] Bradshaw, C. W., Fu, H., Shen, G. J., Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1526

[10] Bradshaw, C. W., Hummel, W., Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1532

[11] Nakamura, K., Yoneda, T., Miyai, T., Ushio, K., Oka, S., Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2453

[12] Jones, J. B. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3351

[13] Velonia, K., Tsigon, I., Bouriotis, V., Smonou, I *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 65

[14] Wong, C. H., Whitesides, G. M. "*Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*", Tetrahedron Organic Chemistry Series, London, **1993**

[15] Wong, C. H., Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4890

[16] Oppenheimer, N. J., Kaplan, N. O. *Biochemistry* **1974**, *13*, 4675

[17] Shaked, Z., Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7104

[18] Lamed, R., Keinan, E., Zeikus, J. E. *Enzyme Microb. Technol.* **1981**, *3*, 144

[19] Wong, C. H., Drueckhammer, D. G., Sweers, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4028

[20] Dale, J.A., Mosher, H.S., *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512

[21]Trost, B.M., Belletire, J.L., Godleski, S., Mcdougal, P.G., Balkovec, J.M., *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2370

[22] Seco, J.M., Quinoa, E., Riguera, R., *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 17

[23] Stevenson, R., WEBER, J., *J. of* Nat. *Prod.* **1988**, *51*, 1215-1219

[24] Dias G.C.D., Gressler V., Hoenzel S.C.S.M., Silva U.F., Dalcol I.I., Morel A.F., *Phytochemistry* **2007**, 68, 668-672

[25]Mason P. L., Gaunt I. F., Hardy J., Kiss I. S., Butterworth K. R., Gangolli S. D., *Cosmet. Toxicol.* **1976**, *14*, 387-394

[26]Larsen J., Olson L. W., *J. Phytopathology* **1992**, *135*, 1-5

[27] Larsen J., Olson L. W., Lange L., *J. Phytopathology* **1992**, *134*, 336-342

[28] Kuhn, R., Kum, K., *Chem. Ber.*,**1962,** *95*, 2009-2011

[29] Lukd, R., Jarg, J., Nzmec, J., *Collecr. Czech. Chem. Commun.*,**1962**, *27*,735-741

[30] Drochner, D., Müller, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 211 – 215

[31] Enders, D., Vicario, J, L., Job, A., Wolberg, M., Müller, M. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4272

[32] Kumar, R. N., Meshram H. M. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 1003 – 1007

[33] Quirk, J., Thornton, M., Kirkpatrick, P. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 769

[34] Boucard, V., Broustal, G., Campagne, J. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 225 – 236

[35] Guy Solladie, Claude Bauder, and Leucio Rossi, J. Org. Chem. **1995**,60, 7774

[36] Job, A., Wolberg, M., Muller, M., Enders, D. *Synlett* **2001**,*11*,1796

[37] Kumar, R. N., Meshram, H. M. *Tetrahedron Letters* **2011**,*52*,1003

[38] Wolberg, M., Filho, M.V., Bode, S., Geilenkirchen, P., Feldmann, R., Liese, A., Hummel, W., Müller, M. *Bioprocess Biosyst. Eng*. **2008**, *31*,183–191

[39] Fatima, A., Kohn, L., Aparecida, M., Carvalhob, J., Pillia, R. *Bioorg. Med. Chem*. **200**4, 12, 5437–5442

[40] H. J. M. Gijsen, C.-H. Wong, J. Am. Chem. Soc. **1994**, 116, 8422 – 8423

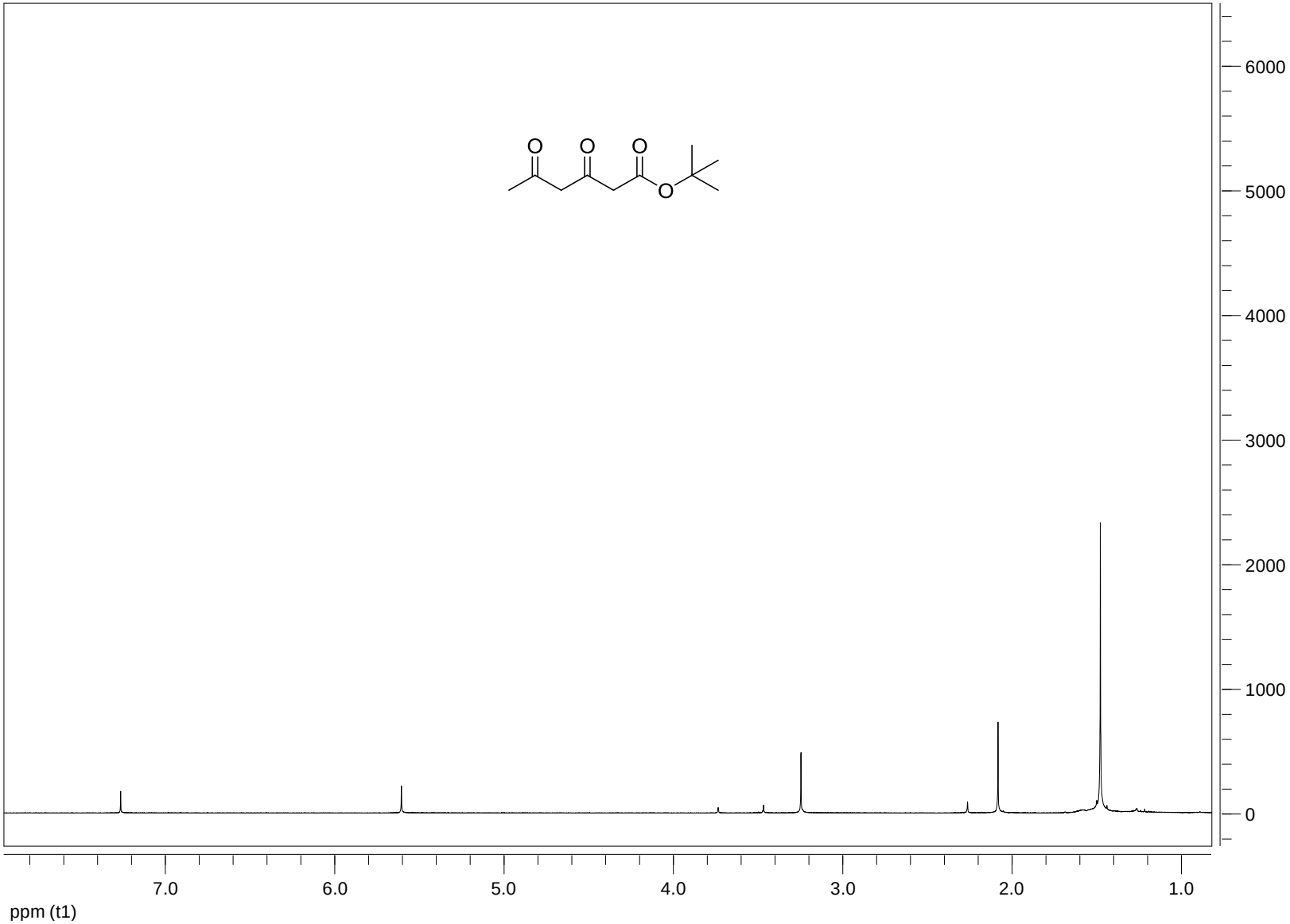
[41] Wolberg, M., Dassen, B. N., Schrmann, M., Jennewein, S., Wubbolts, M. G., Schoemaker, H. E., Minkb, D. *Adv. Synth. Catal*. **2008**, *350*, 1751 – 1759

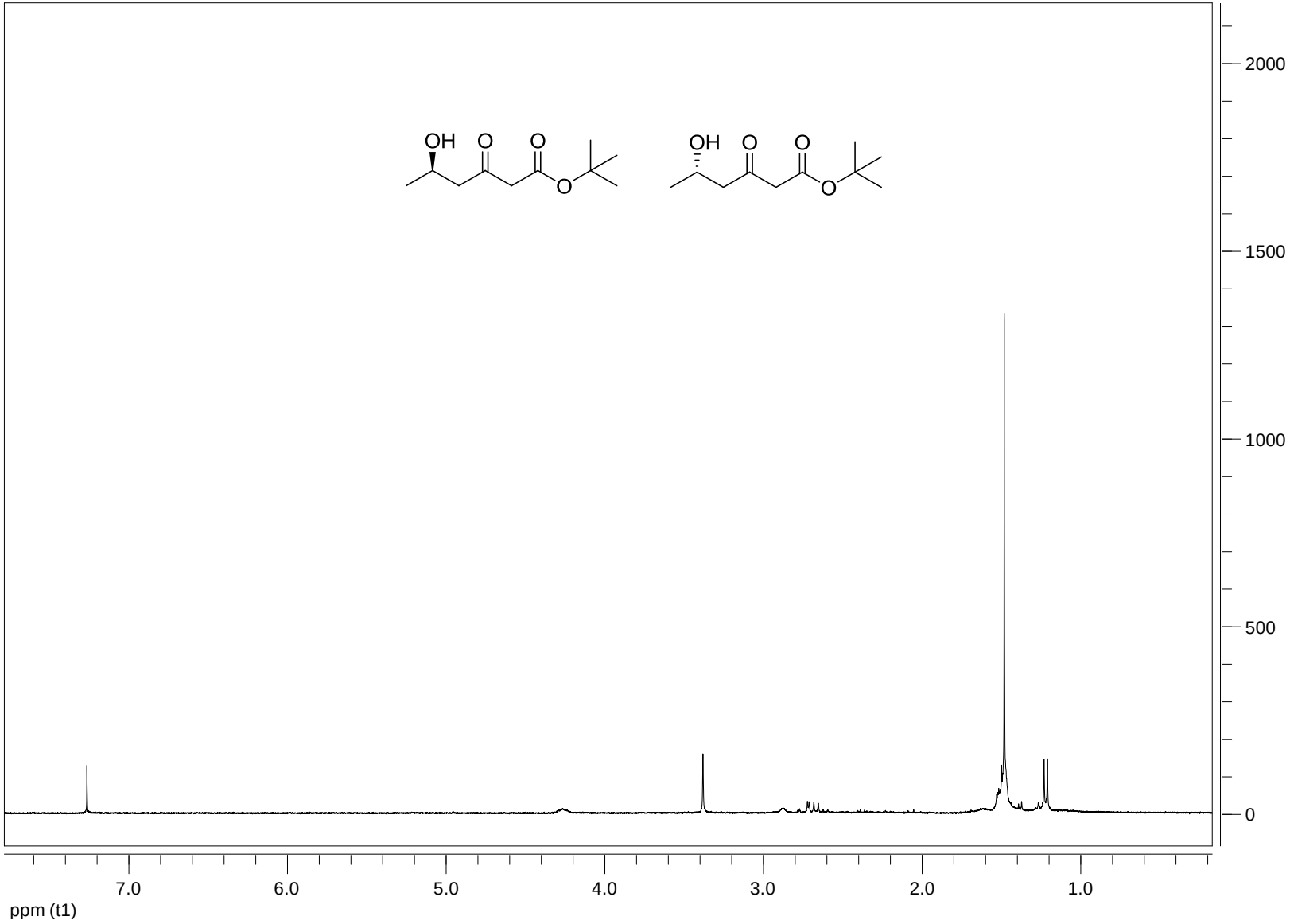
[42] Kalaitzakis and Smonou, J. Org. Chem. **2010**, 75, 8658–8661

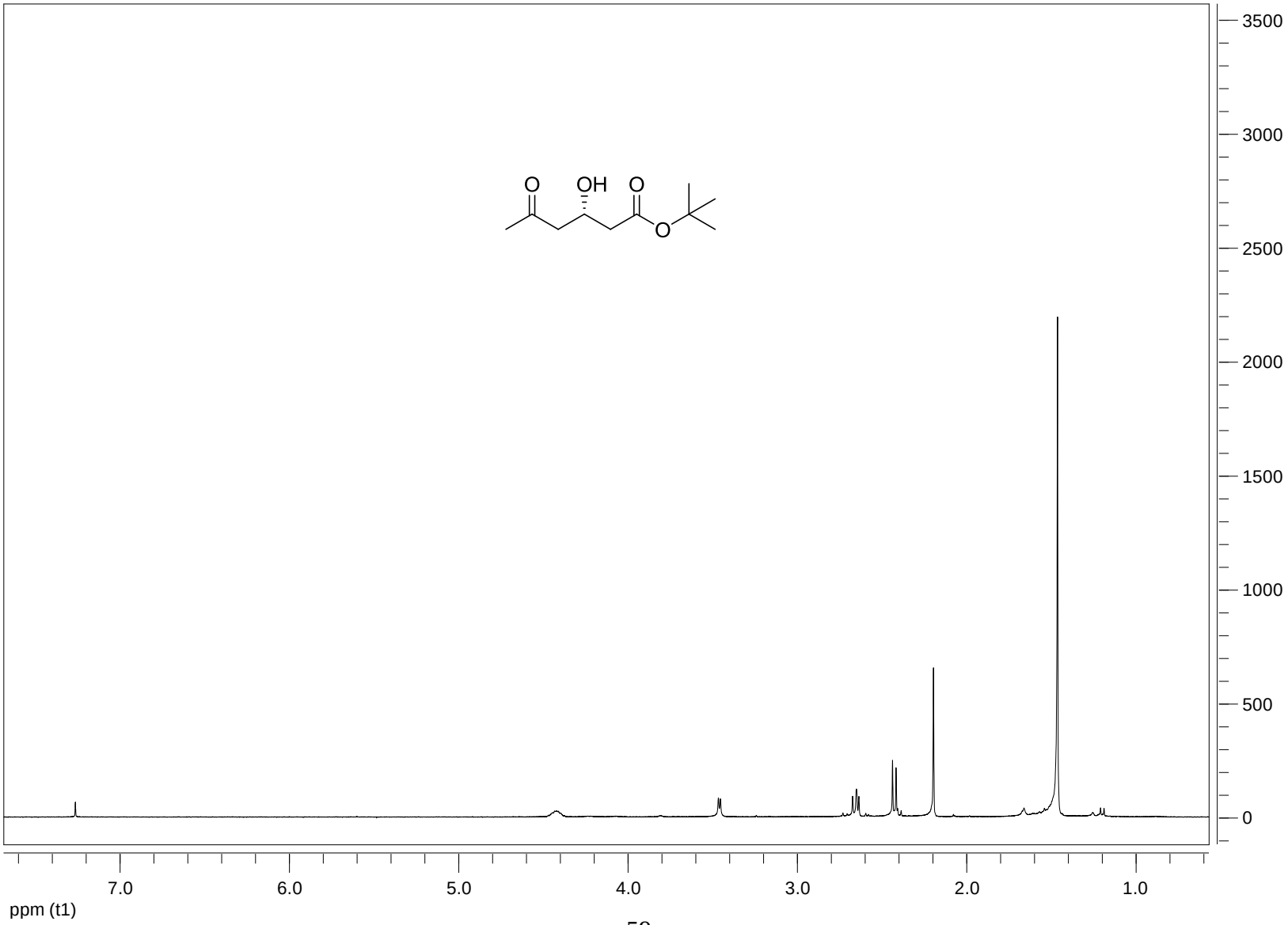
[43] Ramachandran, P., Venkat Ram Reddy, M., Herbert Brown, C., *Tetrahedron Letters*, **2000**, *41*, 583-586

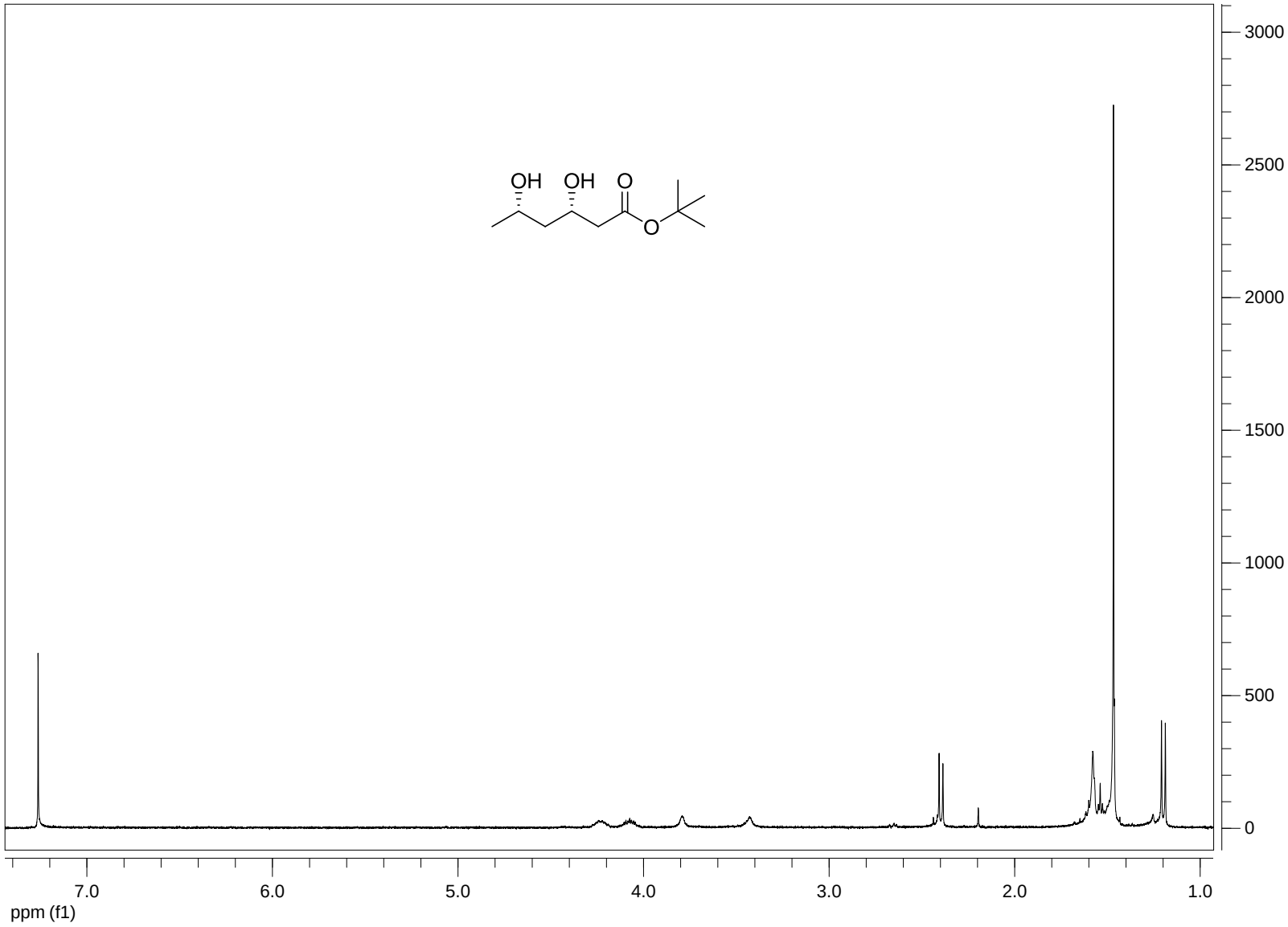
[44] Blanchard, J.S., *Methods in Enzymol.*, **1984**, *104*, 404

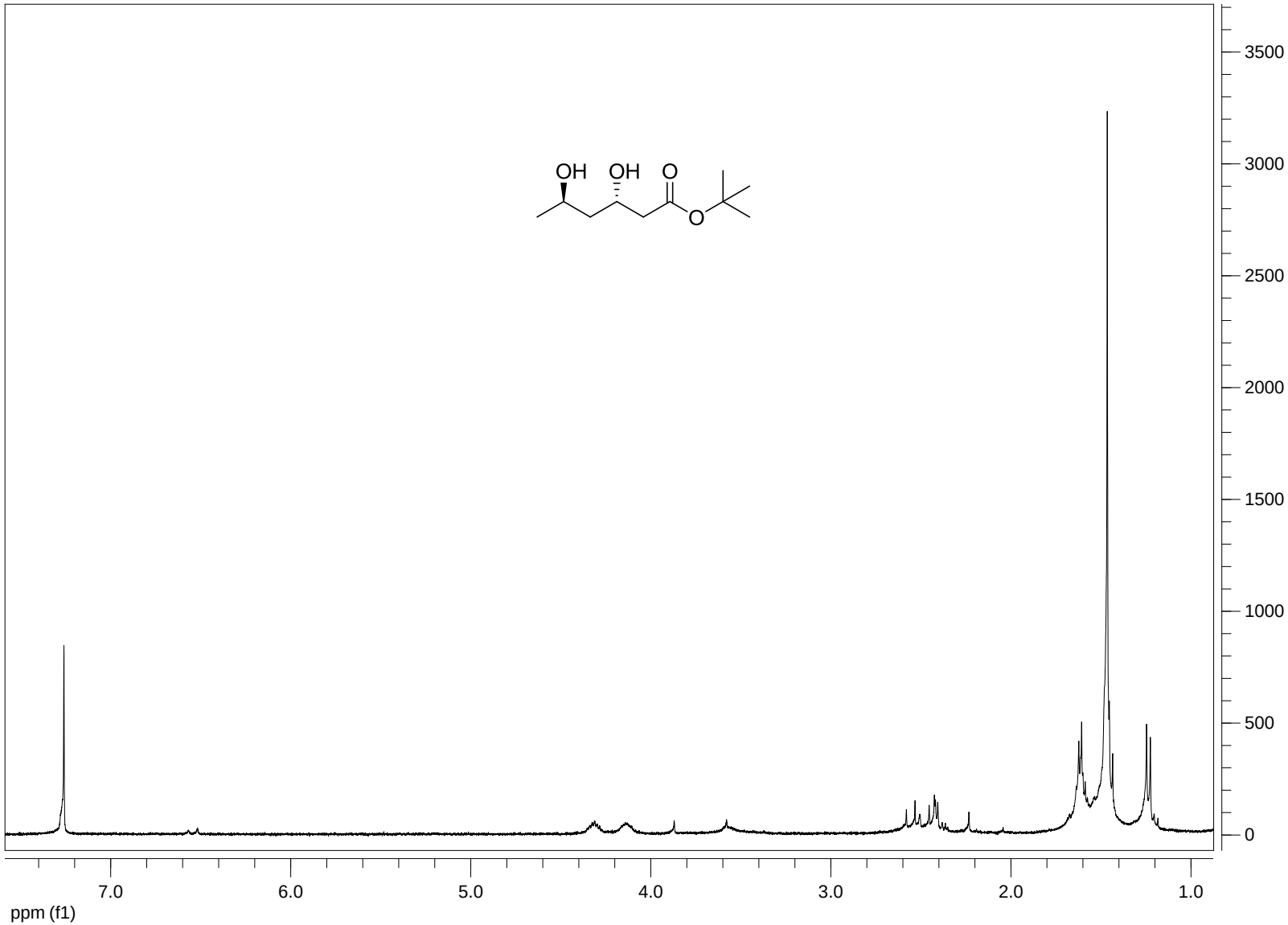
ΦΑΣΜΑΤΑ ^{1}H NMR

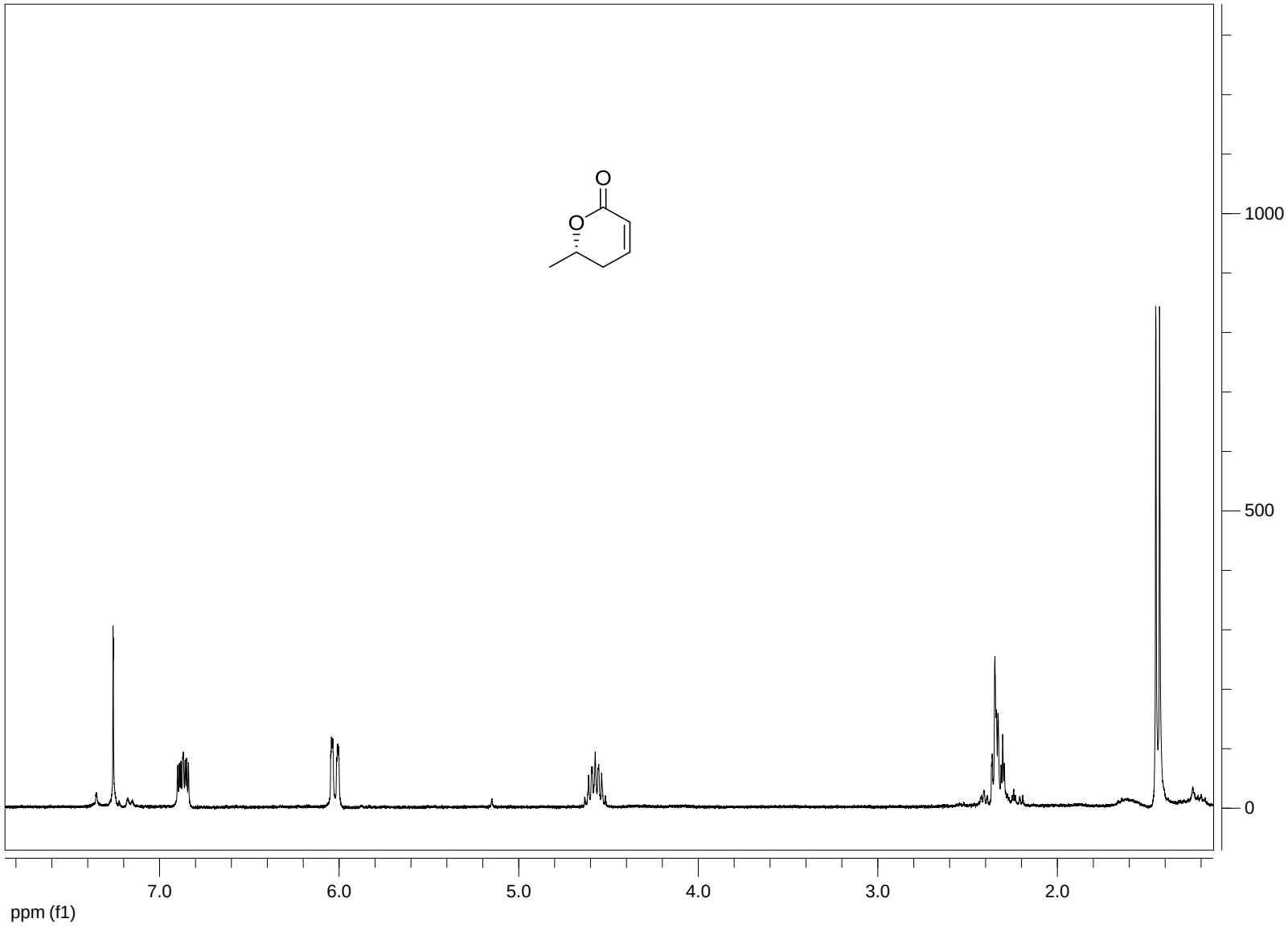

6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
ppm (t1)


OH
O
O
O
OH
O
O
O
2000
1500
1000
500
0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
ppm (t1)


O
OH
O
O
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
ppm (t1)


OH
OH
O
O
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
ppm (f1)


OH
OH
O
O
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
ppm (f1)


O
O
1000
500
0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
ppm (f1)