

**KETONIEN STEREOSELEKTIIVINEN  
PELKISTYS ENTSYIMEILLÄ**

Pro gradu -tutkielma  
Jyväskylän yliopisto  
Kemian laitos  
Orgaanisen kemian osasto  
10.5.2016  
Katja Kärki

## Tiivistelmä

Työn kirjallisessa osassa käsitellään ketonien enantioselektiivistä pelkistystä entsyymeillä. Entsymaattiset reaktiot ovat kiinnostavia hyvän selektiivisyytensä ja ympäristöystävällisyytensä takia. Kaikki ketoneja pelkistävät entsyymit tarvitsevat toimintaansa nikotiiniamidikofaktoria NADH tai NADPH ja voivat yleensä katalysoida reaktioita sekä hapetus- että pelkistysuuntaan. Kofaktoreita kierrätetään reaktioissa yleensä joko isopropanolia hapettamalla tai erillisellä entsyymillä, kuten glukosidehydrogenaasilla. Substraatin liukoisuuden parantamiseksi ja konsentraation kasvattamiseksi reaktioissa kannattaa käyttää veden lisäksi jotain orgaanista liuotinta.

Kokeellisessa osassa tutkittiin ketoreduktaasien käyttöä valterioni C -nimisen luonnonaiheen enantioselektiivisessä synteesissä. Aineen absoluuttinen konfiguraatio ei ole tiedossa, joten kumpaakin enantiomeeria pitäisi pystyä valmistamaan. Tavoitteena oli selvittää, missä vaiheessa bentsosuberona lähtevää synteesireittiä entsyymattinen pelkistys kannattaa tehdä. Parhaiten pelkistys onnistuu 8-nitrobentsosuberonilla, koska siitä voidaan valmistaa selektiivisesti molempia enantiomeereja ja reaktiot ovat myös skaalattavissa. Kumpaakin enantiomeeria valmistettiin noin 15 mg erinomaisella enantioselektiivisyydellä ( $ee >99\%$  ja  $97\%$ ). Synteesireitin kannalta olisi kuitenkin hyvä tehdä pelkistys vasta myöhemmin, vaikka silloin voidaankin valmistaa vain toista enantiomeeria.

## Esipuhe

Työn kirjallinen osa kirjoitettiin syksyllä 2015 ja kokeellinen osa suoritettiin Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen orgaanisen kemian osastolla prof. Petri Pihkon tutkimusryhmässä keväällä 2016. Kokeellisen osan ohjaajana toimi prof. Pihkon lisäksi FM Juha Siitonen. Tutkielman tarkastivat FT Juhani Huuskonen ja prof. Janne Ihalainen. Yhdisteiden **47**, **48** ja **52** synteesejä suorittivat Petrin ja Juhan lisäksi myös LuK Mari Ella Mäkinen, joka tekee omaa tutkielmaansa valterioni C:n raseemisesta synteesisistä, ja Dr. Rosy Malik. Haluan kiittää heitä kaikkia tämän tutkielman valmistumisesta. Lisäksi kiitän koko ryhmää viihtyisästä työympäristöstä.

## Käytetyt lyhenteet

3 $\alpha$ -HSD	3 $\alpha$ -hydroksisteroididehydrogenase
7 $\alpha$ -HSD	7 $\alpha$ -hydroksisteroididehydrogenase
ADH	alkoholidehydrogenaasi
AKR	aldo-ketoreduktaasi
Ala	alaniini
APG4	asetonikuivattuja <i>Geotrichum candidum</i> - soluja
Asn	asparagiini
BAL	bentsaldehydilyaase
BF4	tetrafluoroboraatti
bmim	1-butyylil-3-metyyli-imidatsolium
CBFDH	<i>Candida boidinii</i> FDH
CHBE	etyyli-4-kloori-3-hydroksibutanoaatti
CMCR	<i>Candida magnoliae</i> CR
COBE	etyyli-4-kloori-3-oxobutanoaatti
CR	karbonyylireduktaasi
Cys	kysteiini
DCM	dikloorimetaani
<i>de</i>	diastereomeerinen ylimäärä
DMSO	dimetyylisulfoksidi
<i>dr</i>	diastereomeerien suhde
<i>ee</i>	enantioylimäärä
emim	1-etyyli-3-metyyli-imidatsolium
Et	etyyli
FAD	flaviiniadeniinidinukleotidi
FAP	tris(pentafluoroetyyli)-trifluorofosfaatti
FDH	formiaattidehydrogenaasi
G	glysiini
G6PDH	glukoosi-6-fosfaatti-dehydrogenaasi
GDH	glukoosidehydrogenaasi
Gox0644	<i>Gluconobacter oxydans</i> -CR
His	histidiini

HLADH	hevosen maksan ADH
<i>i-</i>	<i>iso-</i>
Ile	isoleusiini
IPA	isopropanoli
KRED	ketoreduktaasi
KtCR	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> CR
LBADH	<i>Lactobacillus brevis</i> ADH
Leu	leusiini
LKADH	<i>Lactobacillus kefir</i> ADH
LVR	levodionireductase
Lys	lysiini
MDR	keskipitkäketjuinen dehydrogenaasi/reduktaasi
Me	metyyli
MTBE	metyyli- <i>tert</i> -butyylieetteri
NAD <sup>+</sup>	nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi, hapettunut muoto
NADH	nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi, pelkistynyt muoto
NADP <sup>+</sup>	nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi-fosfaatti, hapettunut muoto
NADPH	nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi-fosfaatti, pelkistynyt muoto
NcCR	<i>Neurospora crassa</i> CR
NTF	bis(trifluorometyylisulfonyyli)-imidi
<i>o-</i>	<i>ortho-</i>
OYE	old yellow enzyme
<i>p-</i>	<i>para-</i>
PAR	fenyyliaasetaldehydireduktaasi
PDB	protein data bank
PDH	fosfiittidehydrogenaasi
Pen	pentyyli
PF6	hexafluorofosfaatti

PFADH	<i>Pyrococcus furiosus</i> ADH
PFB	2,3,4,5,6-pentafluorobentsyylialkoholi
Phe	fenyylialaniini
Pr	propyyli
Pro	proliini
RADH	<i>Ralstonia</i> sp. DSM6428 ADH
READH	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ADH
S	seriini
SADH	sekundäärinen ADH
sc	ylikriittinen
SDR	lyhyketjuinen dehydrogenaasi/reduktaasi
Ser	seriini
SMO	styreenimono-oksygenaasi
SSCR	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> -CR
TAGDH	<i>Thermoplasma acidophilum</i> -GDH
TBADH	<i>Thermoanaerobacter brockii</i> -ADH
Thr	treoniini
TIM	trioosifosfaatti-isomeraasi
TPPTS	3,3',3''-fosfaanitriyllitris- (bentseenisulfonihappo), trinatrium-suola
Trp	tryptofaani
TTN	total turnover number
Tyr	tyrosiini
Val	valiini

## Sisällysluettelo

Tiivistelmä.....	i
Esipuhe.....	ii
Käytetyt lyhenteet.....	iii
Sisällysluettelo.....	vi

### KIRJALLINEN OSA

1 Johdanto.....	1
2 Ketoreduktaasien rakenne ja toiminta.....	2
2.1 Keskipitkäketjuiset dehydrogenaasit/reduktaasit (MDR).....	3
2.1.1 MDR-mekanismi.....	4
2.2 Lyhytketjuiset dehydrogenaasit/reduktaasit (SDR).....	6
2.2.1 SDR-mekanismi.....	7
2.2.2 Kofaktorin sitominen.....	8
2.3 Aldo-ketoreduktaasit (AKR).....	9
2.3.1 AKR-mekanismi.....	10
3 Ketonien stereoselektiivine pelkistys entsyymeillä.....	12
3.1 Kofaktorin kierrätys.....	12
3.1.1 Toisen substraatin käyttö kofaktorin kierrätyksessä.....	13
3.1.2 Toisen entsyymin käyttö kofaktorin kierrätyksessä.....	15
3.1.3 Valokemialliset menetelmät.....	16
3.2 Liuottimen vaikutukset.....	17
3.2.1 Entsymaattiset reaktiot orgaanisissa liuottimissa.....	17
3.2.2 Miksi entsyymit ovat vähemmän aktiivisia orgaanisissa liuottimissa kuin vedessä?.....	18
3.2.3 Orgaanisten liuottimien log <i>P</i> :n vaikutus entsyymireaktioihin.....	18
3.2.4 Entsymaattiset reaktiot ioninesteissä.....	19

3.2.5 Entsymaattiset reaktiot ylikriittisessä hiilidioksidissa.....	22
3.3 Lämpötilan ja pH:n vaikutukset enantioselektiivisyyteen entsyymireaktioissa.....	24
3.3.1 Lämpötilan vaikutukset.....	24
3.3.2 pH:n vaikutukset.....	25
3.4 Esimerkkejä entsyymeillä pelkistetyistä ketoneista.....	25
3.4.1 Yksinkertaiset alifaattiset ketonit.....	25
3.4.2 $\alpha$ - ja $\beta$ -Ketoesterit.....	28
3.4.3 $\alpha$ -Ketohapot.....	30
3.4.4 Asetofenonijohdannaiset.....	31
3.4.5 $\alpha,\beta$ -tyydyttymättömät ketonit.....	35
3.4.6 $\alpha$ - ja $\beta$ -Hydroksiketonit.....	38
3.4.7 $\alpha$ -Haloketonit.....	40
3.4.8 Muut substraatit.....	40
4 Yhteenvedo.....	43

## KOKEELLINEN OSA

### Ketoreduktaasien käyttö valterioni C:n synteesissä

5 Johdanto.....	46
6 Tulokset.....	48
7 Kokeelliset menetelmät.....	53
7.1 Yleistä.....	53
7.2 Substraattien synteesi.....	53
7.3 Rasemaattien synteesi.....	54
7.4 Entsymaattisen pelkistykset.....	56
Kirjallisuusviitteet.....	58



## 1 Johdanto

Enantioselektiivisten synteesimenetelmien kehittäminen on tärkeää, koska teollisuudessa tarvitaan yhä enemmän enantiopuhtaita aineita.<sup>1</sup> Esimerkiksi farmaseuttiset tuotteet ovat entistä monimutkaisempia ja useimmat niistä sisältävät enemmän kuin yhden kiraalisen keskuksen.<sup>2,3</sup> Entsyymit kiinnostavat korkeiden kemo-, regio- ja stereoselektiivisyyksiensä takia, mutta myös jatkuva tarve kehittää prosesseista ympäristöystävällisempiä ja turvallisempia tekee biokatalyyttisistä menetelmistä houkuttelevia. Biokatalyytit ovat täysin biohajoavia ja reaktiot voidaan suorittaa miedoissa oloissa (huoneenlämpötila, neutraali pH, vesiliuokset) ilman vaarallisia reagensseja. Tällöin myös haitalliset sivureaktiot, kuten isomeroituminen ja epimeroituminen ovat vältettävissä.<sup>4</sup> Korkea selektiivisyys vähentää suojaryhmien käyttöä, mikä tekee prosesseista lyhyempiä ja näin vähentää syntyneen jätteen määrää. Parhaimmillaan biokatalyyttiset prosessit ovat siis sekä taloudellisia että ympäristöystävällisiä.

Entsyymien käyttö orgaanisessa synteesissä ei silti ole kovin tavallista.<sup>5</sup> Kemistit eivät ole tottuneet työskentelemään biologisten systeemien kanssa, ja pienessä mittakaavassa entsyymien käyttö voi myös tulla kalliiksi, vaikka se isossa mittakaavassa yleensä vähentääkin kustannuksia.<sup>6</sup> Suurin ongelma lienee kuitenkin se, etteivät entsyymit välttämättä kestä reaktioon vaadittavia olosuhteita, kuten suuria konsentraatioita substraattia ja tuotetta tai orgaanisia liuottimia. Entsyymeistä kuitenkin voidaan tehdä stabiilimpia immobilisoimalla niitä tai kehittämällä luonnon entsyymeistä mutanteja, jotka ovat kestävämpiä. Muita ongelmia biokatalyyttien käytössä voivat aiheuttaa toisinaan hankala work-up, soluviljelyyn vaadittava tila sekä reaktioon käytettyyn tilavuuteen nähden huono saanto, jos joudutaan pitämään substraatin konsentraatio matalana.<sup>7</sup>

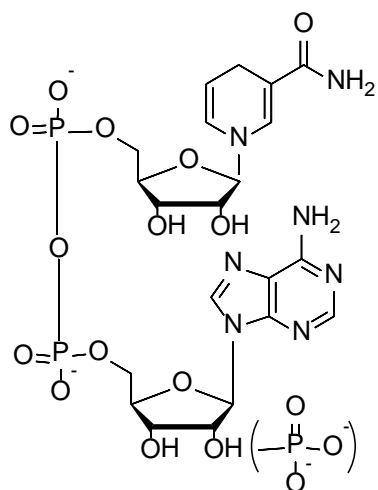
Tässä tutkielmassa keskitytään ketonien enantioselektiiviseen pelkistykseen entsyymeillä. Monia muitakin pelkistysmenetelmiä on,<sup>8-12</sup> mutta entsyymeillä voidaan saavuttaa hyvä selektiivisyys sellaisissakin tapauksissa, joissa se ei välttämättä muuten olisi mahdollista. Esimerkiksi etyylipropyyliketoni voidaan pelkistää selektiivisesti (*ee* 98%) vastaavaksi (*S*)-alkoholiksi biokatalyyttisellä menetelmällä,<sup>13</sup> vaikka useimmat katalyytit eivät pysty pelkistämään selektiivisesti ketonia, jossa on kaksi näin samanlaista ryhmää. Entsyymien

käytössä on myös se hyöty, että vetykaasun sijaan pelkistimenä voidaan käyttää suhteellisen vaarattomia yhdisteitä, kuten glukoosia tai isopropanolia.

Kirjallisessa osassa käsitellään ketoreduktaasien rakennetta ja toimintaa sekä olosuhteiden (liuotin, lämpötila, pH) vaikutusta reaktioihin. Lisäksi esitetään lukuisia esimerkkejä entsyymeillä tehdyistä pelkistyksistä. Entsyymien immobilisointi ja muokkaus geneettisin menetelmin (proteini engineering) taas eivät kuulu tutkielman aihepiireihin. Kokeellisessa osassa tutkitaan, voisiko ketoreduktaaseja käyttää valterioni C:n totaalisynteesissä.

## 2 Ketoreduktaasien rakenne ja toiminta

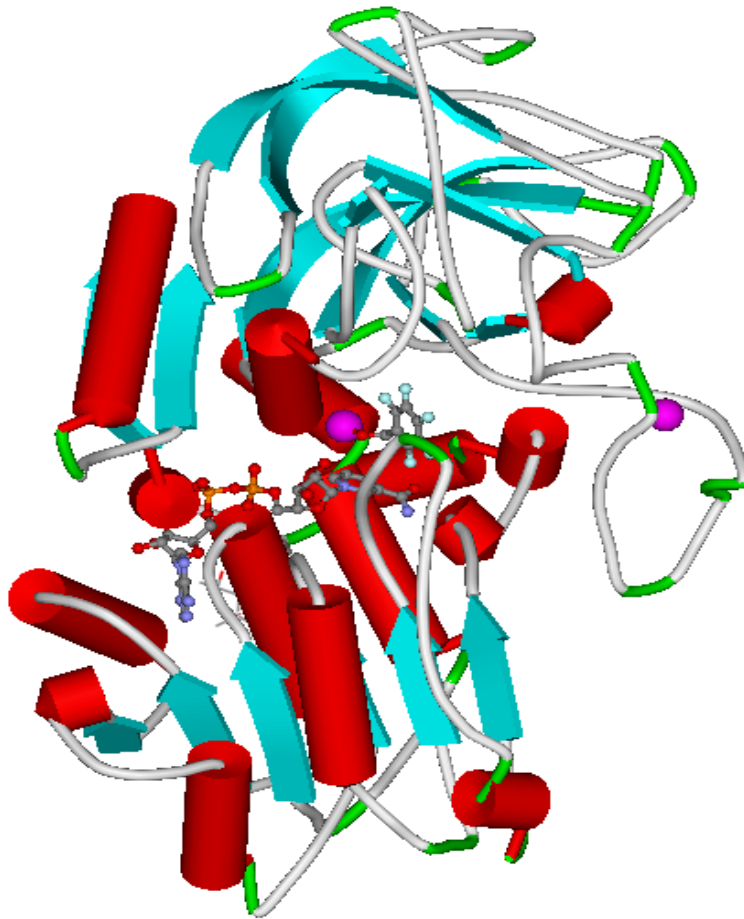
Alkoholidehydrogenaasit (ADH) ja ketoreduktaasit ovat oksidoreduktaaseja, jotka muuttavat ketoneja ja aldehydeja vastaaviksi alkoholeiksi ja toisinpäin.<sup>14</sup> Ne kaikki tarvitsevat toimiakseen nikotiiniamidikofaktoria NADH or NADPH (kaavio 1). Ketoreduktaasit luokitellaan kolmeen luokkaan riippuen mekanismista ja kofaktorin sitomisesta.



**Kaavio 1.** NAD(P)H:n rakenne.

## 2.1 Keskipitkätjuiset dehydrogenaasit/reduktaasit (MDR)

Keskipitkätjuiset dehydrogenaasit/reduktaasit ovat Zn-riippuvaisia oksidoreduktaaseja.<sup>14</sup> Tutkituin tähän ryhmään kuuluva entsyymi on hevosen maksan ADH (HLADH). Se on dimeerinen entsyymi, jonka alayksiköt koostuvat kahdesta domeenista (kofaktorin sitova ja katalyyttinen domeeni, kuva 1). Kofaktorin sitova domeeni sisältää Rossmann-foldiksi kutsutun motiivin, johon kuuluu kuudesta samansuuntaisesta  $\beta$ -laskoksesta koostuva  $\beta$ -levy, joka on molemmilta puolilta ympäröity  $\alpha$ -helikseillä. Substraatti sitoutuu domeenien välissä olevaan taskuun. Molemmat alayksiköt sisältävät kaksi Zn-iona, joista toista tarvitaan katalyysissa.

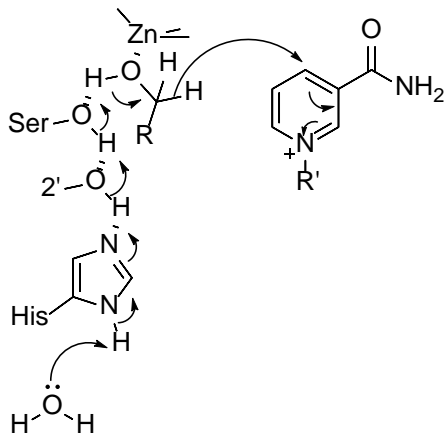
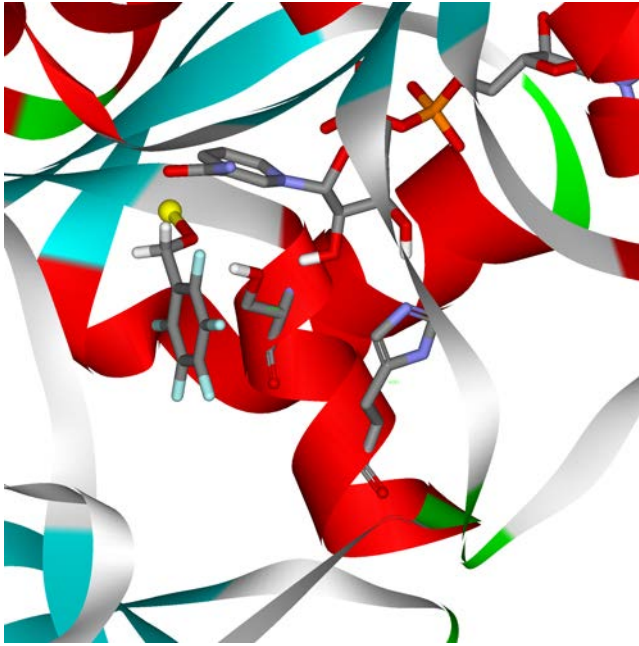


**Kuva 1.** HLADH:n alayksikön rakenne. Kuvassa ylempänä on katalyyttinen domeeni ja alempana Rossmann-foldin sisältävä kofaktorin sitova motiivi. Kofaktori ja PFB-substraatti näkyvät pallotikkumallilla domeenin rajapinnalla. Rakenteellinen ja katalyyttinen Zn (keskellä) on esitetty magendanvärisillä palloilla. (PDB: 4DWV)

### 2.1.1 MDR-mekanismi

Reaktio alkaa kofaktorin sitoutumisella ja päättyy sen vapauttamiseen.<sup>14</sup> Näistä jälkimmäinen on nopeuden määräävä vaihe. Apo-muodossa entsyymi on avoimessa konformaatiossa, jossa liuotin ja muut molekyylit pääsevät vapaasti aktiiviseen keskukseen. Kofaktorin sitoutuessa se kuitenkin ottaa suljetun konformaation, jossa rakenne on järjestyneempi.<sup>15-17</sup> HLADH:ssa aminohapot 293-298 sisältävä joustava silmukka on tärkeä konformaation muutoksessa. Se järjestyy uudelleen tehden tilaa katalyyttisen domeenin aminohapoille.<sup>18</sup> Mutanteilla tehdyt kokeet osoittavat, että substraatti sitoutuu mieluiten suljettuun konformaatioon, mutta reaktio voi tapahtua myös avoimessa konformaatiossa.

Konformaation muutoksen aikana Ser48 ja His51 muodostavat vetysidokset nikotiiniamidiriboosin 2'- ja 3'-hydroksyylien kanssa, jolloin muodostuu protoninsiirtoketju, jota pitkin protoni voi siirtyä substraatilta vedelle tai toisinpäin (kuva2). Substraatti sitoutuu katalyyttiseen sinkkiin, jonka muita ligandeja ovat Cys46, Cys174 ja His67. Vapaassa entsyymissä neljäntenä ligandina on vesimolekyylä. Reaktiossa katkeaa kaksi sidosta, alkoholin O-H- ja C-H-sidokset. Jälkimmäinen tapahtuu hybridin siirrolla kofaktorille ja ensimmäinen protoninsiirtoketjun avulla. Nämä tapahtuvat yhtä aikaa.<sup>18</sup> Kofaktorin ja sinkin muodostama positiivinen kenttä alentaa alkoholin  $pK_a$ -arvoa, mikä helpottaa protonin siirtymistä Ser48:lle. Itse asiassa alkoholit sitoutuvat alkoksideina, mikä nähdään sidospituuksista (1.96 Å alkoholin ja sinkin ja 2.48 Å alkoholin ja Ser48:n välillä).<sup>19</sup>

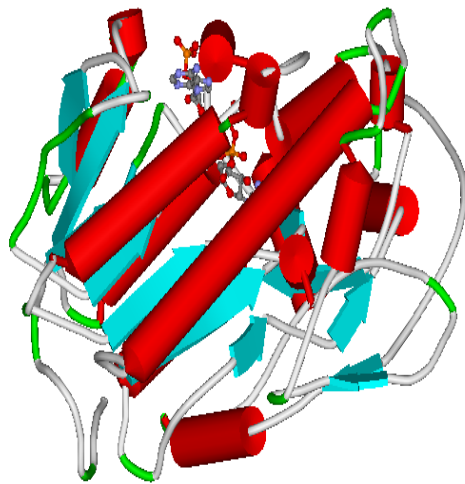


**Kuva 2.** MDR-mekanismi. Ylhäällä HLADH:n aktiivinen keskus, jossa PFB-substraatti on sitoutuneena sinkkiin (keltainen pallo). Ser48 ja His51 muodostavat kofaktorin kanssa protoninsiirtoketjun, joka kuvassa alhaalla olevan mekanismin mukaisesti siirtää alkoholin protonin vedelle. Pelkistysuuntaan mekanismi on päinvastainen. (PDB: 4DWV)

Substraatin metyleenin ja nikotiiniamidin C4:n välinen etäisyys on noin 3.4 Å. Etäisyyden lyhentäminen tekee hydridin siirtymisestä helpompaa. Nikotiiniamidirengas voi ottaa venemäisen konformaation lyhentääkseen etäisyyttä. Tässä sitä auttavat siihen kontaktissa olevat aminohapot Thr178, Val203 ja Val229.

## 2.2 Lyhytketjuiset dehydrogenaasit/reduktaasit (SDR)

Lyhytketjuiset dehydrogenaasit/reduktaasit ovat Zn-riippumattomia, 250-350 aminohappoa sisältäviä oksidoreduktaaseja.<sup>20</sup> Kuten MDR:t, myös SDR:t sitovat kofaktorin Rossmann-foldina tunnetun rakenteen avulla. Hyvä esimerkki SDR:sta on *Sporobolomyces salmonicolor*:n karbonyylireduktaasi (SSCR).<sup>21</sup> Se on NADPH-riippuvainen entsyymi, joka koostuu 12  $\alpha$ -heliksistä ja 12  $\beta$ -laskoksesta, jotka muodostavat kolme  $\beta$ -levyä (kuva 3). Alayksikkö koostuu kahdesta domeenista, pienestä katalyyttisestä domeenista ja suuremmasta kofaktorin sitovasta domeenista. Jälkimmäinen sisältää Rossmann-foldin, jossa seitsemän yhdensuuntaista  $\beta$ -laskosta muodostaa ison  $\beta$ -levyn, jota ympäröi molemmilta puolilta  $\alpha$ -heliksit.

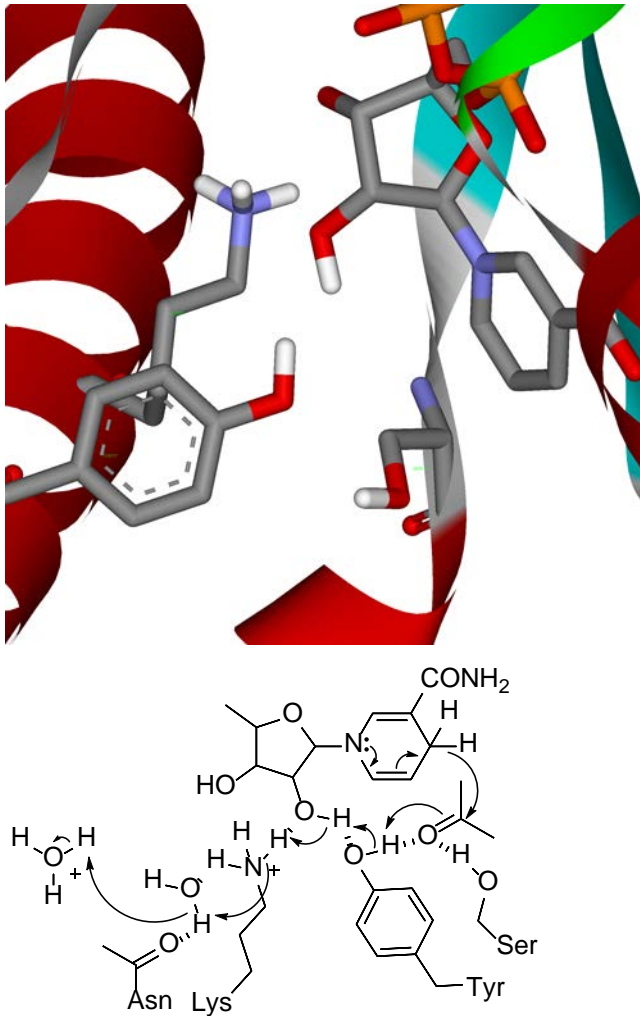


**Kuva 3.** SSCR:n alayksikön rakenne, jossa sitoutuneena NADPH (pallotikkumallilla). Vasemmalla kofaktorin sitova domeeni ja oikealla katalyyttinen domeeni. (PDB: 1Y1P)

### 2.2.1 SDR-mekanismi

Myös SDR-mekanismi alkaa kofaktorin sitomisella ja päättyy sen vapauttamiseen.<sup>22</sup> SSCR:ssa silmukat Ile91-Tyr101 ja Pro216-Ser220 ovat joustavia apo-rakenteessa.<sup>21</sup> Kun NADPH sitoutuu, tapahtuu konformaation muutos ja nämä joustavat osat ottavat järjestäytyneen rakenteen. Silmukan Ile91-Tyr101 konformaation muutos aiheuttaa hydrofobisen vuorovaikutuksen aminohappojen Phe97 ja Trp226 välille, jolloin ne muodostavat aminohappojen Ala238, Leu241, Pro170 ja Leu174 kanssa hydrofobisen kanavan, joka osallistuu substraatin tunnistukseen. Kuvassa 4 on esitetty SSCR:n aktiivisen keskuksen rakenne.

SDR:t sisältävät katalyyttisen triadin Ser-Tyr-Lys tai tetradin Ser-Tyr-Lys-Asn.<sup>20</sup> Tyrosiini toimii katalyyttisena emäksenä ja seriini stabiloi substraattia, transitiotilaa ja tuotetta vetysidoksilla ja voi myös vetysitoutua tyrosiinin kanssa.<sup>22</sup> Seriinin vaihtaminen treoniiniin tuottaa entsyymin, jolla on samanlaiset katalyyttiset ominaisuudet. Lysiini vuorovaikuttaa nikotiiniamidiriboosin kanssa muodostaen positiivisen kentän, joka alentaa tyrosiinin  $pK_a$ -arvoa.<sup>14</sup> Mahdollinen asparagiini vuorovaikuttaa lysiinin kanssa vesimolekyylin välityksellä ja on myös muiden aminohappojen kanssa vuorovaikutuksessa siten, että pakottaa pääketjun sitomaan tämän vesimolekyylin. Joillakin SDR:illa on tämän asparagiinin tilalla seriini, joka toimii samalla tavalla. Lysiinin tai tyrosiinin mutaatiot sen sijaan johtavat lähes aina inaktiiviseen entsyymiin.<sup>23</sup> SDR-mekanismi on esitetty kuvassa 4.



**Kuva 4.** SDR-mekanismi. Ylhäällä SSCR:n aktiivinen keskus, jossa näkyy katalyyttinen triadi Ser133-Tyr177-Lys181. Rakenteessa ei ole substraattia, mutta se sitoutuisi vetysidoksilla seriiniin ja tyrosiiniin ja saisi protonin tyrosiinilta alhaalla esitetyn mekanismin mukaisesti. Mekanismissa on esitetty myös mahdollisen asparagiinin vaikutus, jota SSCR:lla ei ole. (PDB: 1Y1P)

### 2.2.2 Kofaktorin sitominen

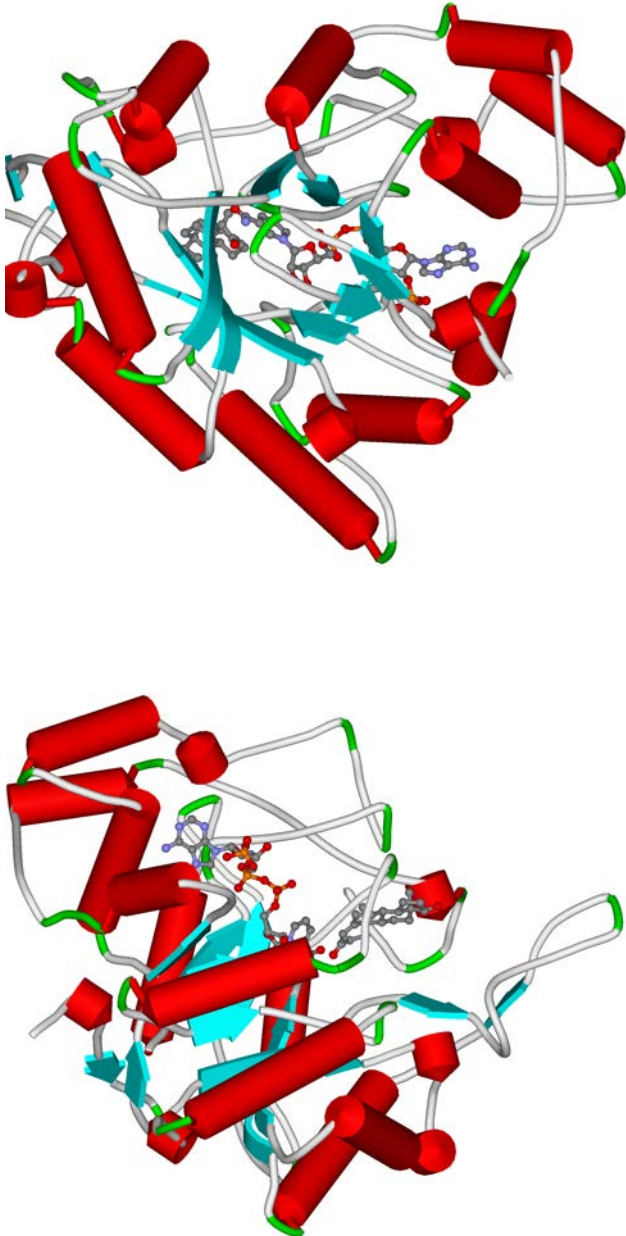
SDR:lla on glysiiniä sisältävä kofaktorin sitomiseen tarvittava motiivi GXXXGXXG, jota ilman entsyymi on inaktiivinen.<sup>20,23</sup> Joillakin entsyymeillä tämä motiivi on epätäydellisenä, ja mutaation täydelliseksi on havaittu parantavan entsyymin aktiivisuutta ja lämmönkestävyyttä.<sup>24</sup> Adenosiiniriboosin 2'- ja 3'-hydroksyyleihin sitoutuva aspartaatti saa entsyymin suosimaan NADH:ia NADPH:n sijaan, koska negatiivisten varausten välinen hylkimisvoima estää NADPH:ia sitoutumasta. NADPH-riippuvainen entsyymi, jolla on jokin muu aminohappo tällä paikalla, voidaan muuttaa NADH-riippuvaiseksi vaihtamalla tämä



aminohappo aspartaattiin.<sup>25</sup> Usein NADPH-riippuvaisissa entsyymeissä on arginiini, joka sitoutuu NADPH:n 2'-fosfaattiin.<sup>26</sup> Se kuitenkin osallistuu myös muihin kofaktorin sitomisessa tarvittaviin vuorovaikutuksiin, joten sen korvaaminen muilla aminohapoilla heikentää myös NADH:n sitoutumista. Jos kofaktoririippuvuuteen halutaan vaikuttaa mutaatiolla, on edellä mainittu aspartaatti siis tärkein aminohappo.

### 2.3 Aldo-ketoreduktaasit (AKR)

Aldo-ketoreduktaasit (AKR) ovat monomeerisia, Zn-riippumattomia oksidoreduktaaseja, joilla Rossmann-foldin sijaan on trioosifosfaatti-isomeraasin (TIM) rakenne (kuva 5).<sup>27</sup> Siinä kahdeksan  $\alpha$ -heliksiä ja kahdeksan  $\beta$ -laskosta muodostavat tynnyrimäisen rakenteen. Sen takana on kolme suurta silmukkaa, jotka määräävät substraattispesifisyyden. *In vitro* AKR:t katalysoivat reaktioita molempiin suuntiin, mutta *in vivo* ne toimivat pelkästään pelkistysuuntaan.

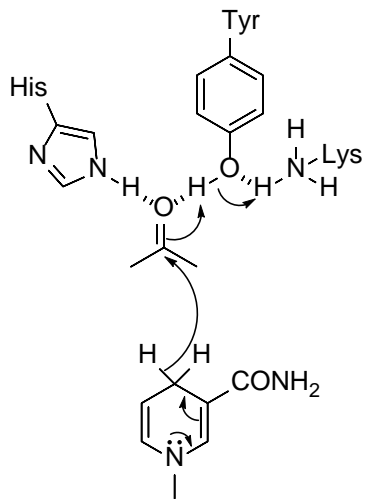
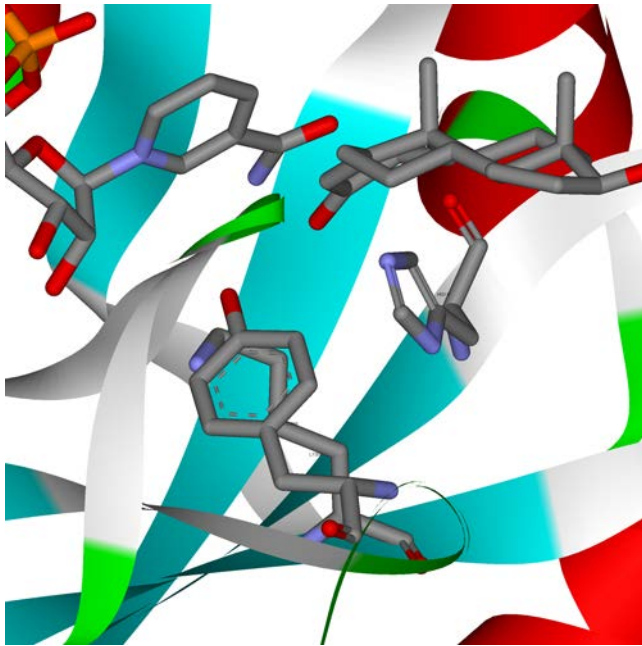


**Kuva 5.** AKR:n rakenne. Ylemmässä kuvassa näkyy hyvin tynnyrimäinen (TIM)-rakenne ja alemmassa kolme substraatin tunnistukseen vaikuttavaa silmukkaa. Kofaktori ja testosteronisubstraatti on esitetty pallotikkumallilla. (PDB: 1AFS)

### 2.3.1 AKR-mekanismi

Kuten muillakin ketoreduktaaseilla, AKR-mekanismi alkaa kofaktorin sitomisella ja päättyy sen vapauttamiseen.<sup>27</sup> Kofaktorin vapauttaminen on nopeuden määräävä hapetussuuntaan,

mutta pelkistysuuntaan myös itse reaktio on nopeuden määräävä. AKR:lla on katalyyttinen tetrad Tyr-Lys-His-Asp ja mekanismi on melko samanlainen kuin SDR-meknismi (kuva 6).



**Kuva 6.** AKR-mekanismi. Ylhäällä rotan  $3\alpha$ -HSD:n rakenne, jossa näkyvät testosteronisubstraatti, kofaktori ja katalyysiin osallistuvat aminohapot Tyr55, Lys84 ja His117. Mekanismi on melko samanlainen kuin SDR-mekanismi eli ketonisubstraatti saa protonin tyrosiinilta. (PDB: 1AFS)

### 3 Ketonien stereoselektiivinen pelkistys entsyymeillä

Entsyaattinen pelkistys voidaan tehdä joko eristetyillä entsyymeillä tai kokonaisia soluja käyttäen. Molemmista tavoista on omat hyvät ja huonot puolensa. Kokosolukatalyytteja voidaan helposti tuottaa suuria määriä soluja viljelemällä, eikä proteiinien puhdistusprosesseja tarvita.<sup>1</sup> Entsyymit voivat myös olla stabiilimpia solun sisällä kuin eristettyinä. Myöskään erillistä kofaktorin kierrätysjärjestelmää ei välttämättä tarvita.

Elävien solujen käytössä katalyytteina on kuitenkin omat ongelmansa. Soluviljely vaatii tilaa ja solujen aineenvaihdunta on pystyttävä optimoimaan reaktiolle mahdollisimman hyödylliseksi.<sup>6,7</sup> Usein substraattit ja tuotteet ovat myös myrkyllisiä soluille, mikä rajoittaa substraattikonsentraatiota (yleensä  $< 2 \text{ g l}^{-1}$ ).<sup>28</sup> Tuotteet voivat myös hajota solun aineenvaihduntareaktioissa.<sup>1</sup> Kokosolukatalyytit myös sisältävät monia erilaisia ketoreduktaaseja, joilla voi olla vastakkaiset enantioselektiivisyydet, mikä johtaa mataliin *ee*-arvoihin. Nämä ongelmat voidaan välttää käyttämällä eristettyjä entsyymejä. Tällöin substraattikonsentraatio voi olla huomattavasti suurempi ( $50\text{-}100 \text{ g l}^{-1}$ ) ja pelkistykset yleensä tapahtuvat hyvällä selektiivisyydellä. Eristetyillä entsyymeillä on myös se etu, että niitä voi käyttää kuten mitä tahansa muutakin reagenssia, eikä elävien solujen käsittelyyn tarvittavaa biologian tuntemusta tarvita.

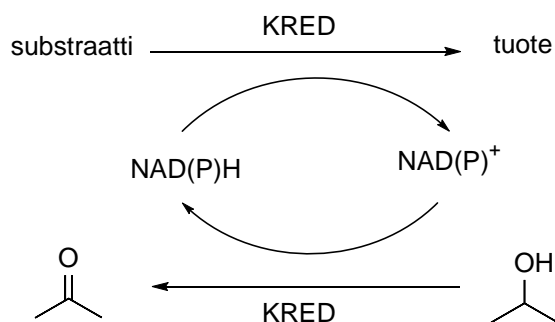
#### 3.1 Kofaktorin kierrätys

Koska nikotiiniamidikofaktorit ovat liian kalliita käyttää stoikiometrisina reagensseina, täytyy niiden kierrättämiseksi olla tehokkaita menetelmiä, jos halutaan tehdä reaktioita preparatiivisessa mittakaavassa.<sup>29</sup> Yleensä reaktioseokseen lisätään jotain toista substraattia, esimerkiksi isopropanolia, jota hapettamalla entsyymi voi itse kierrättää kofaktorin. Toinen vaihtoehto on lisätä reaktioseokseen toista entsyymiä, joka hoitaa kofaktorin kierrätyksen. Menetelmän valinnassa on tärkeää: 1) ettei lisätty substraatti tai siitä tuleva tuote haittaa entsyymin toimintaa, 2) että tuote on helposti puhdistettavissa reaktioseoksesta, 3) että

reaktion tasapaino saadaan halutun tuotteen puolelle, 4) että prosessi on käytännöllinen ja edullinen ja 5) että tarvittavat reagenssit ovat kaupallisesti saatavilla tai helposti valmistettavissa. Kofaktorin kierrätyksen tehokkuutta kuvataan TTN-luvulla (total turnover number), joka kertoo kuinka paljon tuotetta (mooleissa) syntyy yhtä kofaktorimoolia kohti.<sup>30</sup> Jotta prosessi olisi kaupallisesti kannattava, täytyy TTN:n olla vähintään  $10^2$ - $10^4$ .<sup>31</sup>

### 3.1.1 Toisen substraatin käyttö kofaktorin kierrätyksessä

Yksinkertaisia alkoholeja, yleensä isopropanolia, voidaan käyttää hydridin lähteinä kofaktorin kierrätyksessä (kaavio 2).<sup>29</sup> Tällöin tarvitaan vain yksi entsyymi, koska sama entsyymi voi suorittaa sekä varsinaisen substraatin pelkistymisen että kofaktorin kierrätyksen isopropanolia hapettamalla. Tällöin kofaktorin ei myöskään tarvitse siirtyä eri entsyymien välillä, vaan se voi olla jatkuvasti sitoutuneena aktiiviseen keskukseseen ja toimia vuorotellen hapettimena ja pelkistimenä.



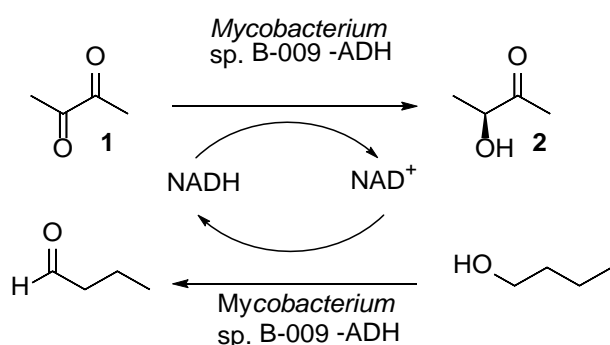
**Kaavio 2.** Kofaktorin kierrätys isopropanolia käyttäen.

Isopropanoli on edullista ja monet entsyymit sietävät sitä hyvin. Se myös helpottaa huonosti veteen liukenevien substraattien liukenemistä. Reaktioseoksen pH:ta ei myöskään tarvitse säätää reaktion aikana, kuten toista entsyymiä hyödyntävissä menetelmissä, joissa pH usein muuttuu reaktion aikana.

Isopropanolin käytössä on kuitenkin se ongelma, että kaksi reversiibeliä prosessia on yhtä aikaa käynnissä. Tuotteen lopullinen konsentraatio riippuu siis termodynaamisesta tasapainosta. Yleensä tasapaino saadaan tuotteen puolelle käyttämällä suurta ylimäärää isopropanolia. Joskus tarvitaan myös asetonin poistamista reaktioseoksesta. Vain entsyymejä,

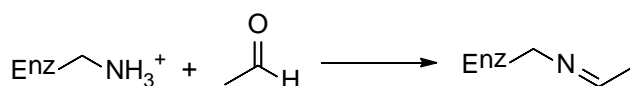
jotka sietävät suuria määriä isopropanolia ja asetonia, voidaan siis käyttää. Optimaaliset pH:t ovat myös erilaiset hapetus- ja pelkistysuuntaan, joten reaktioseoksen pH täytyy säätää sellaiseksi, että entsyymi on tarpeeksi aktiivinen katalysoimaan substraatin pelkistystä, mutta myös isopropanolin hapetus tapahtuu.

Jos entsyymi ei siedä isopropanolia, pitkäketjuisemmat alkoholit voivat toimia paremmin.<sup>32</sup> Myös primäärisiä alkoholeja voidaan käyttää. Esimerkiksi diasetyyli **1** on pelkistetty (*S*)-asetoiiniksi **2** käyttämällä 1-butanolia kofaktorin kierrätykseen (kaavio 3).<sup>33</sup> Tässä käytetty ADH sietää suuriakin määriä 1-butanolia, mutta vain 1,5-kertainen määrä substraattiin verrattuna tarvitaan tehokkaaseen ja enantioselektiiviseen reaktioon.



**Kaavio 3.** Diasetyylin **1** pelkistys *Mycobacterium* sp. B-009 -ADH:lla.<sup>33</sup>

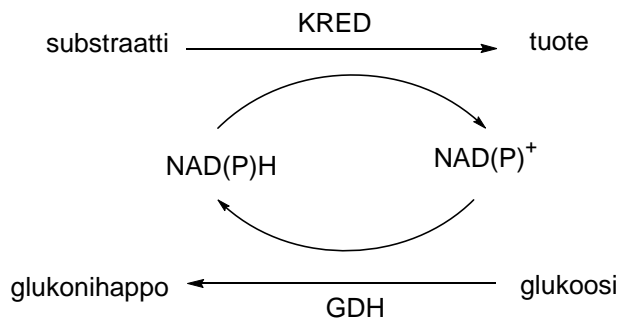
Primääristen alkoholien käyttö voi kuitenkin aiheuttaa myös ongelmia, koska aldehydit reagoivat aminoryhmien kanssa imiinejä muodostaen (kaavio 4) helpommin kuin ketonit.<sup>32</sup> Tämä voi muuttaa entsyymin konformaatiota, ja monilla ketoreduktaaseilla katalyysiin tarvitaan lysiiniä, joka voi myös osallistua näihin reaktioihin.



**Kaavio 4.** Aldehydin ja lysiinin välinen imiinin muodostus.

### 3.1.2 Toisen entsyymien käyttö kofaktorin kierrätyksessä

Kofaktorin kierrätys voidaan tehdä myös niin, että reaktioseokseen lisätään tätä tarkoitusta varten toista entsyymiä, esimerkiksi glukosidehydrogenaasia (kaavio 5).<sup>32</sup> Vaikka tämä tekee prosessista monimutkaisemman, on tällä menetelmällä joitakin etuja isopropanolin ja muiden alkoholien käyttöön verrattuna. Kofaktorin kierrätykseen käytettävä reaktio on nyt irreversiibeli, joten suurta ylimäärää toista substraattia ei tarvita. Esimerkiksi 2-oktanonin asymmetrinen pelkistys *Lactobacillus brevis* ADH:lla vaatisi substraattiin verrattuna 50-kertaisen ylimäärän isopropanolia, mutta glukosidehydrogenaasi/glukoosi-systeemiä käyttämällä vain kolminkertainen ylimäärä glukosia tarvitaan.<sup>34</sup>



**Kaavio 5.** Kofaktorin kierrätys GDH/glukoosi-systeemillä.

Glukosidehydrogenaasit (GDH), jotka muuttavat glukosin glukonihapoksi, ovat yleisimmin käytettyjä johtuen niiden stabiiliudesta ja aktiivisuudesta. Ne voivat kierrättää sekä NADH:ia että NADPH:ia. Tuotteena syntyvä glukonihappo alentaa reaktioseoksen pH:ta, joten reaktioon täytyy lisätä emästä pH:n pitämiseksi vakiona. Esimerkiksi 1M NaOH:ia voidaan käyttää.<sup>24</sup> Joskus glukonaatti voi myös vaikeuttaa tuotteen puhdistusta.<sup>29</sup>

Formiaattidehydrogenaaseja (FDH), jotka hapettavat muurahaishapon hiilidioksidiksi, on perinteisesti käytetty NADH:n kierrätykseen.<sup>35</sup> Tämä on ensimmäinen isossa mittakaavassa käytetty kofaktorin kierrätysmenetelmä.<sup>29</sup> Reaktio on irreversiibeli, ja tuotteen puhdistus on helppoa, koska sivutuotteena syntyy vain hiilidioksidia.<sup>32</sup> FDH:t ovat kuitenkin vähemmän käytettyjä kuin GDH:t, koska niillä voidaan kierrättää vain NADH:ia. Pääasiassa niitä käytetään silloin kun substraatti on herkkä emäksille. Reaktioseoksen pH nousee, kun muurahaishappoa kuluu reaktiossa, joten happoa täytyy lisätä reaktion aikana.

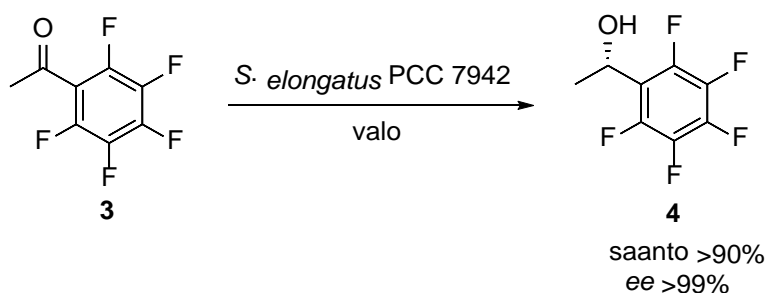
Uusi menetelmä kofaktorin kierrätykseen on fosfiittidehydrogenaasien (PDH) käyttö.<sup>6</sup> Ne muuttavat puskurin fosfiittia fosfaatiksi vaikuttamatta merkittävästi pH-arvoon. Ne ovat yhtä aktiivisia kuin FDH:t, mutta stabiilimpia ja voivat kierrättää myös NADPH:ia. Kuitenkin vain muutama esimerkki niiden käytöstä on julkaistu.<sup>36,37</sup>

Muita kofaktorin kierrätykseen käytettyjä entsyymejä ovat glukoosi-6-fosfaattidehydrogenaasit (G6PDH), glutamaattidehydrogenaasit ja dehydrogenaasit.<sup>3</sup>

### 3.1.3 Valokemialliset menetelmät

Kasvit ja levät pystyvät pelkistämään  $\text{NADP}^+$ :n fotosynteesin avulla.<sup>38</sup> Luonnossa tätä reaktiota käytetään sokerien valmistamiseen hiilidioksidista, mutta sitä voidaan käyttää myös ketonien pelkistykseen alkoholeiksi. Syanobakteerit ovat tähän kasveja parempi vaihtoehto, koska yleensä kasvisolut kasvavat viljeltyinä todella hitaasti.

Pentafluoroasetofenoni **3** voidaan pelkistää enantioselektiivisesti *Synechococcus elongatus* PCC 7942 -syanobakteerin avulla (kaavio 6). Reaktio on huomattavasti hitaampi pimeässä kuin valossa.



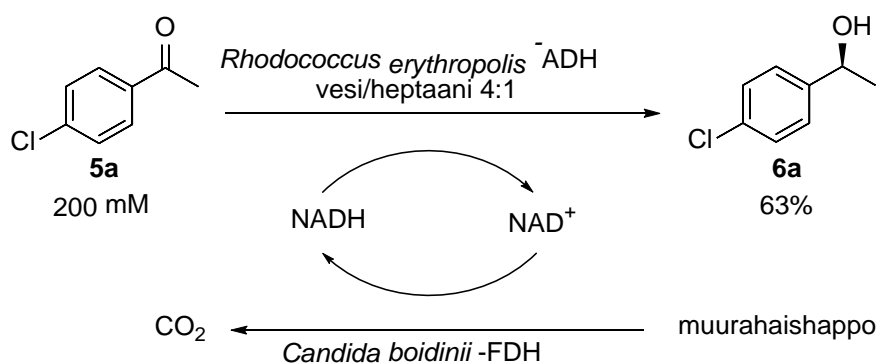
**Kaavio 6.** Pentafluoroasetofenonin **3** pelkistys *Synechococcus elongatus* PCC 7942 -syanobakteerilla.<sup>38</sup>



## 3.2 Liuottimen vaikutukset

### 3.2.1 Entsymaattiset reaktiot orgaanisissa liuottimissa

Vesi on entsyymien luonnollinen ympäristö, mutta on monia syitä tehdä entsyymaattisia reaktioita orgaanisissa liuottimissa.<sup>39</sup> Monet substraatit liukenevat veteen huonosti ja voivat olla myös myrkyllisiä katalyytille.<sup>40</sup> Siksi kaksifaasireaktiot, joissa substraatti pääosin orgaanisessa faasissa, ovat suosittuja. Kaavion 7 esimerkissä substraatin konsentraatiota on kasvatettu 10 mM:sta 200 mM:ksi käyttämällä vesi/heptaani-kaksifaasisysteemiä.<sup>41</sup>



**Kaavio 7.** 4'-Klooriasetofenonin **5a** stereoselektiivinen pelkistys *Rhodococcus erythropolis* -ADH:lla vesi/heptaani-kaksifaasisysteemissä.<sup>41</sup>

Kokosolureaktioissa kaksifaasisysteemin käyttö tarjoaa myös mahdollisuuden kontrolloida stereokemiaa.<sup>42</sup> Kun substraatin konsentraatio vesiliuoksessa on matala, nopeiten toimii entsyymi, jolla on pienin  $K_M$ -arvo. Näin saadaan vähennettyä monien entsyymien vaikutusta stereokemiaan. Orgaanisten liuottimien sijaan voidaan käyttää myös hydrofobista polymeeria, kuten Amberlite™ XAD:ia. XAD-7:n käyttö parantaa saantoa ja enantioselektiivisyyttä *Geotrichum candidum*:lla tehdyissä pelkistyksissä.

Entsyymien ominaisuudet ovat erilaiset orgaanisissa liuottimissa kuin vedessä ja niitä voidaan muuttaa vaihtamalla liuotinta.<sup>39</sup> Enantioselektiivisyys voi jopa muuttua vastakkaiseksi liuotinta vaihtamalla. Yksi hyvä syy käyttää orgaanisia liuottimia on myös se, että vesi voi saada aikaan monia sivureaktioita ja lähtöaineet tai tuotteet voivat olla epästabiileja vedessä. Esimerkiksi 4-substituoituidut 3-oksobutanoaatit ovat melko epästabiileja vedessä, joten niiden biokatalyyttinen pelkistys suoritetaan kaksifaasisysteemissä.<sup>43</sup>

### 3.2.2 Miksi entsyymit ovat vähemmän aktiivisia orgaanisissa liuottimissa kuin vedessä?

Suurin ongelma entsyymattisten reaktioiden suorittamisessa pelkästään orgaanisissa liuottimissa on niiden aktiivisuuden pieneneminen.<sup>44</sup> Toimiakseen kunnolla ne tarvitsevat ympärilleen vesikerroksen. Suurin syy aktiivisuuden pienenemiseen orgaanisissa liuottimissa on vesikerroksen häviäminen, joka tekee entsyymistä jäykemmän ja voi aiheuttaa konformaation muutoksia. Rakenteessa pitää olla joustavia osia, jotta entsyymi pystyy kaikkiin reaktiossa tarvittaviin konformaatiomuutoksiin, joten jäykkä entsyymi ei toimi yhtä hyvin.

Orgaanisissa liuottimissa reaktiot saattavat myös olla energieettisesti epäsuotuisia. Kun substraatti sitoutuu entsyymiin aktiiviseen keskukseen, sen vuorovaikutukset liuottimen kanssa purkautuvat. Tämä prosessi on suotuisa, jos syntyvät vuorovaikutukset entsyymiin kanssa ovat voimakkaampia kuin vuorovaikutukset liuottimen kanssa. Näin on, jos hydrofobinen substraatti siirtyy vedestä hydrofobiseen aktiiviseen keskukseen. Kun vesi vaihdetaan orgaaniseen liuottimeen, tämä etu voidaan menettää, jolloin aktivoitumisenergia kasvaa ja reaktio hidastuu. Reaktioita voi hidastaa myös entsyymien huono liukoisuus orgaanisiin liuottimiin, mutta tämän ei pitäisi olla ongelma, jos reaktiossa on kunnollinen sekoitus.

### 3.2.3 Orgaanisten liuottimien log $P$ :n vaikutus entsyymireaktioihin

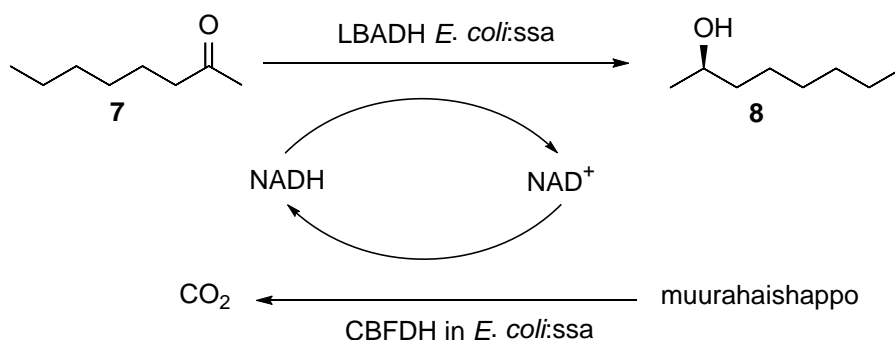
Hydrofobiset liuottimet ovat usein hydrofiilisiä parempi vaihtoehto, jos orgaanisia liuottimia käytetään entsyymireaktioissa.<sup>39</sup> Hydrofobisuutta voidaan vertailla esimerkiksi oktanoli/vesi-jakautumiskertoimen logaritmillä log  $P$ . Kirjallisuuden perusteella on kuitenkin epäselvää, voidaanko log  $P$ -arvoja oikeasti käyttää oikean liuottimen valintaan.<sup>45-50</sup> Laane *et al.*<sup>45</sup> suosittelivat niiden käyttöä tärkeimpänä kriteerinä, kun valitaan orgaanista liuotinta kaksifaasireaktioon. Li *et al.*<sup>46</sup> ovat havainneet, että 2-oktanonin pelkistyksessä hiivalla solujen elinkelpoisuus ja sitä kautta saanto paranevat log  $P$ :n kasvaessa. Myöskin Gonzalo *et al.*<sup>47</sup> ovat havainneet entsyymien aktiivisuuden paranevan log  $P$ :n kasvaessa.

On kuitenkin myös esimerkkejä, joissa tällaista korrelaatiota ei ole havaittu.<sup>48</sup> Mozhaev *et al.*<sup>49</sup> ovat sitä mieltä, ettei log  $P$ -arvojen perusteella voi vertailla liuottimia, joilla on erilaiset funktionaalisuudet. Villela Filho *et al.*<sup>50</sup> ovat myöhemmin osoittaneet, ettei näin voi vertailla

edes liuottimia, joilla on sama funktionaalisuus. On kuitenkin näyttöä siitä, että hypertermofiilisen ADH:n aktiivisuus vesiliukoisissa orgaanisissa liuottimissa on riippuvainen liuottimen log *P*-arvosta, eikä koostumuksesta.<sup>51</sup>

### 3.2.4 Entsymaattiset reaktiot ioninesteissä

Ioninesteet ovat yhdisteitä, jotka koostuvat ioneista, mutta ovat nesteitä huoneenlämpötilassa ta lähellä sitä.<sup>28</sup> Ne ovat kierrätettävyytensä ja haihtumattomuutensa ansiosta ympäristöystävällisiä, minkä takia niiden käyttöä orgaanisessa synteesissä on tutkittu.<sup>52</sup> Myös esimerkkejä entsyymaattisista pelkistyksistä löytyy kirjallisuudesta monia. Varsinkin kokosolureaktioissa bioyhteesopivat ioniset nesteet voivat olla hyvä vaihtoehto perinteisille orgaanisille liuottimille, jotka usein vahingoittavat solukalvoa.<sup>53</sup> Bräutigam *et al.*<sup>40</sup> ovat kokeilleet 21 ionisen nesteen sopivuutta 2-oktanonin **7** ja 4'-klooriasetofenonin **5a** kokosolupelkistykseen (kaavio 8).

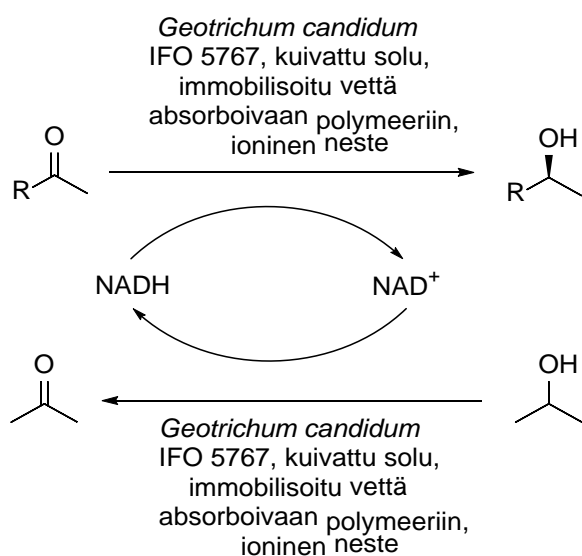


**Kaavio 8.** 2-Oktanonin **7** asymmetrinen pelkistys *Lactobacillus brevis* -ADH:ta tuottavissa *E. coli* -soluissa veden ja ioninesteen muodostamassa kaksifaasisysteemissä.<sup>40</sup>

Ioninesteitä käyttämällä saatiin yli 10-kertaisia saantoja pelkässä vesiliuoksessa tapahtuviin reaktioihin verrattuna. Ioninesteet, jotka sisältävät [PF<sub>6</sub>]- tai [NTF]-anionin tuottivat paremman saannon kuin vastaavat [FAP]-anionin sisältävät liuottimet. Suurin syy saantojen parantumiseen on katalyytille myrkyllisten substratin ja tuotteen konsentraation pienentyminen vesifaasissa. Tämä ei kuitenkaan ole ainoa selitys, koska korkea jakautumiskerroin ei automaattisesti tarkoittanut hyvää saantoa.

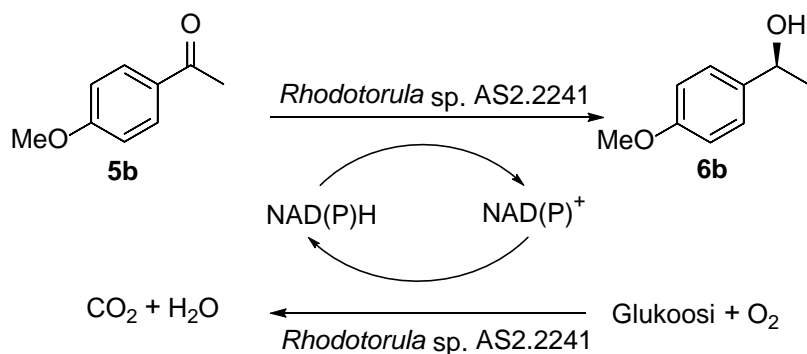
Matsuda *et al.*<sup>52</sup> ovat tutkineet erilaisten ketonien stereoselektiivistä pelkistystä *Geotrichum candidum*:lla ionisissa nesteissä (kaavio 9). Reaktio ei tapahtunut ollenkaan, jos

reaktioseokseen ei lisätty vettä. Vesiliukoisen ioninesteen [emim][BF<sub>4</sub>] tapauksessa edes veden lisääminen ei auttanut, mikä osoittaa, että vesikerros solun ympärillä on välttämätön. Vesikerroksen luomiseksi solujen ympärille ne immobilisoitiin vettä absorboivaan polymeeriin. Tällöin reaktio tapahtui laajalla substraattiskaalalla ja hyvällä selektiivisyydellä (*ee* >99%). Muilla ioninesteillä havaittiin, että saanto riippuu anionista. [PF<sub>6</sub>] ja [BF<sub>4</sub>] tuottivat parhaat saannot, kun taas rikkiä sisältävillä anioneilla reaktio oli todella hidas. Kationeilla ei havaittu olevan vaikutusta saantoon, ja selektiivisyys oli hyvä kaikissa toimivissa reaktioissa.



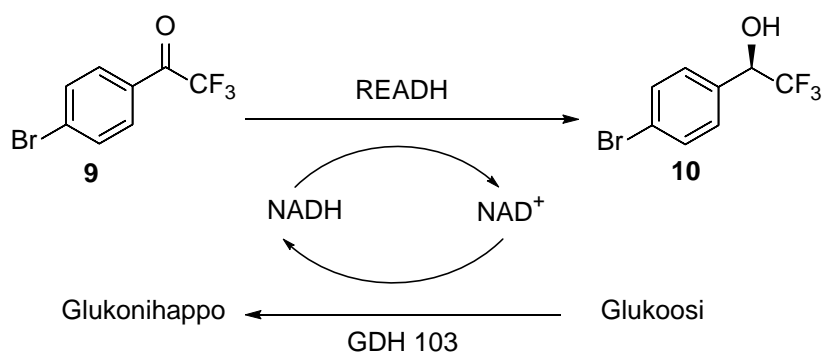
**Kaavio 9.** Ketonien asymmetrinen pelkistys *Geotrichum candidum*:lla ioninesteissä.<sup>52</sup>

Substraatti- ja tuoteinhibitiosta johtuen ioninesteitä on käytetty myös 4'-metoksiasetofenonin **5b** biokatalyyttisessä pelkistyksessä (kaavio 10).<sup>54</sup>



**Kaavio 10.** 4'-Metoksiasetofenin **5b** asymmetrinen pelkistys (S)-1-(4-metoksifenyyli)etanoliksi **6b** *Rhodotorula* sp. AS2.2241:lla.<sup>54</sup>

Kokosolureaktioiden lisäksi ioninesteitä on käytetty myös eristettyjen entsyymien kanssa. Esimerkiksi Hussain *et al.*<sup>28</sup> ovat pelkistäneet 4'-bromi-2,2,2-trifluoroasetofenonia **9** vastaavaksi alkoholiksi **10** *Rhodococcus erythropolis* -ADH:lla ioninesteitä sisältävässä liuoksessa (kaavio 11). Yhdiste **9** on tarpeeksi vesiliukoinen tehokasta reaktiota varten, mutta suurissa konsentraatioissa katalyytille haitallinen. Reaktio pelkässä puskurissa tai 10% vesiliukoista orgaanista liuotinta sisältävässä liuoksessa tuotti vain 10% konversion katalyytin nopean deaktivoitumisen takia. Kaksifaasisysteemi, joka sisälsi 10 % tolueenia, tuotti sekin vain 20% konversion. Ioninesteet kuitenkin suojasivat katalyyttia deaktivoitumiselta, ja reaktio eteni loppuun alle kymmenessä tunnissa.



**Kaavio 11.** 4'-Bromi-2,2,2-trifluoroasetofenin **9** asymmetrinen pelkistys READH:lla.<sup>28</sup>

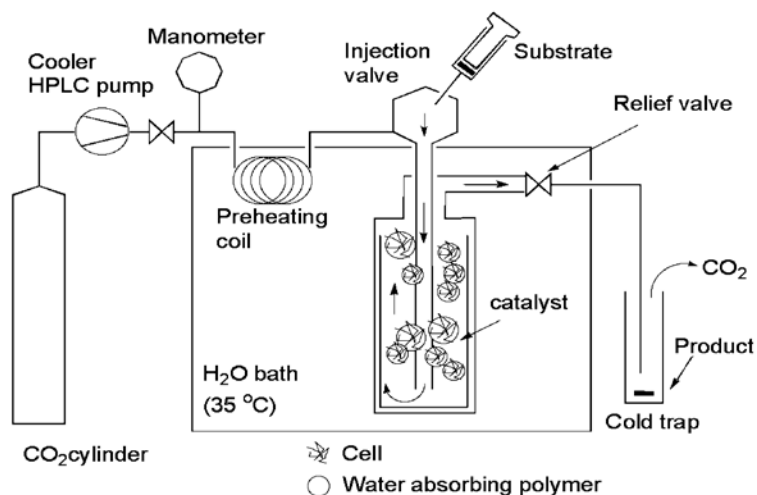
Ioninesteitä voidaan käyttää myös yksifaasireaktioissa, mutta tähän liittyy joitakin ongelmia.<sup>55</sup> Hydrofobisissa ioninesteissä entsyymit ovat stabiileja ja aktiivisia, mutta huonon liukoisuuden takia muodostuu suspension, ja vain pieni osa entsyymimolekyyleista on käytettävissä reaktioon. Hydrofiilisissa ioninesteissä taas liukoisuus on hyvä, mutta vuorovaikutukset anionien kanssa denaturoivat entsyymien.

### 3.2.5 Entsymaattiset reaktiot ylikriittisessä hiilidioksidissa

Myös ylikriittistä hiilidioksidia ( $\text{scCO}_2$ ) käytetään toisena liuottimena kaksifaasisysteemeissä.<sup>56</sup> Sen etuja ovat myrkyttömyys, hyvä saatavuus, syttymättömyys ja alhainen kriittinen lämpötila. Ylikriittisillä nesteillä on sekä kaasujen (alhainen viskositeetti, hyvä diffuusiokyky) että nesteiden (hyvä liuotuskyky) ominaisuuksia, mikä tekee niistä erilaisia kuin perinteiset liuottimet.<sup>57</sup> Ominaisuuksia voidaan myös säätää muuttamalla lämpötilaa ja painetta, joten itse liuotinta ei tarvitse vaihtaa, jos halutaan erilaisia ominaisuuksia.

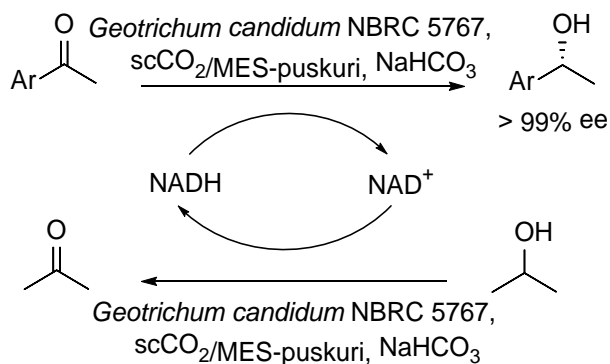
Monia ketoneja voidaan pelkistää  $\text{scCO}_2$ :ssa *Geotrichum candidum* -soluilla, jotka on immobilisoitu vettä absorboivaan polymeeriin.<sup>57</sup> Reaktio toimii asetofenonilla ja sen johdannaisilla, bentsyyliasetonilla ja sykloheksanonilla tuottaen 11-96%:n saannon ja useimmissa tapauksissa erinomaisen selektiivisyyden ( $ee >99\%$ ). Substituoiduilla asetofenoneilla substituentit *ortho*-asemassa parantavat saantoa ja *para*-asemassa heikentävät sitä.

Immobilisoituja *Geotrichum candidum* -soluja on käytetty ketonien pelkistykseen myös kaaviossa 12 esitettyssä virtausreaktorissa.<sup>58</sup> Sen etu perinteiseen reaktoriin verrattuna on, ettei tuotetta tarvitse uutaa reaktioseoksesta.



**Kaavio 12.** Ketonien pelkistykseen *Geotrichum candidum*:lla scCO<sub>2</sub>:ssa käytetty virtausreaktori.<sup>58</sup>

Mahdollinen ongelma scCO<sub>2</sub>:n käytössä on, että se voi alentaa reaktioseoksen pH:ta, mikä taas voi johtaa katalyytin deaktivoitumiseen.<sup>56</sup> Esimerkiksi kaaviossa 13 esitetyssä reaktiossa saatiin vain 4%:n saanto pH:n alenemisesta johtuen. Kun reaktioseokseen lisättiin NaHCO<sub>3</sub>:a, saanto parani 25%:iin. Substituoiduilla asetofenoneilla saatiin onneksi sitäkin korkeampia saantoja.



**Kaavio 13.** Asetofenonien asymmetrinen pelkistys *Geotrichum candidum* NBRC 5767:lla.<sup>56</sup>

### 3.3 Lämpötilan ja pH:n vaikutukset enantioselektiivisyyteen entsyymireaktioissa

#### 3.3.1 Lämpötilan vaikutukset

Entsyymireaktioiden enantioselektiivisyyttä tai enantiospesifisyyttä voidaan kuvata enantiomeerisella suhteella  $E$  (yhtälö 1).<sup>59</sup> Kun reaktio on kineettisessä kontrollissa,  $E$  on suhteessa aktivoitumisenergian muutokseen yhtälön 2 mukaisesti. Jos reaktio tuottaa raseemista tuotetta,  $E = 1$  ja  $\Delta\Delta G^\ddagger = 0$ , jolloin  $\Delta\Delta H^\ddagger = T\Delta\Delta S^\ddagger$ . Niinpä lämpötila, jossa reaktio tuottaa raseemista tuotetta, raseeminen lämpötila  $T_r = \Delta\Delta H^\ddagger/\Delta\Delta S^\ddagger$ . Raseemisen lämpötilan alapuolella  $E$  pienenee lämpötilan kasvaessa, kunnes saavuttaa arvon 1. Raseemisen lämpötilan yläpuolella se taas kasvaa lämpötilan noustessa.

$$E = \frac{(k_{cat}/K_M)_R}{(k_{cat}/K_M)_S} \quad (1)$$

$$\Delta\Delta G^\ddagger = -RT\ln E = \Delta\Delta H^\ddagger - T\Delta\Delta S^\ddagger \quad (2)$$

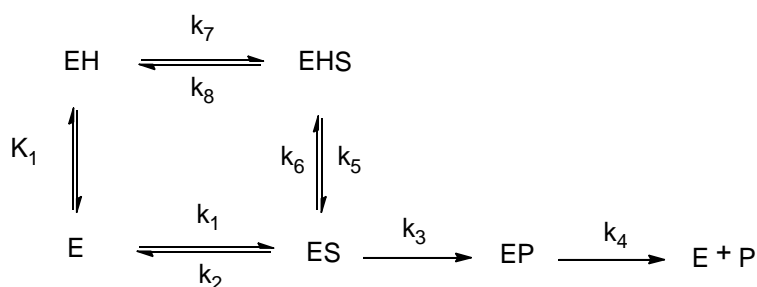
Tämän perusteella enantioselektiivisyyttä voidaan siis parantaa joko laskemalla tai nostamalla lämpötilaa, mutta kirjallisuudesta löytyvissä esimerkeissä lämpötilaa on laskettu.<sup>60-62</sup>  $\alpha$ -Klooriasetofenonin pelkistyksessä hypertermofiilisen arkin *P. furiosus* ADH:lla enantioselektiivisyys hieman laskee korkeissa lämpötiloissa (*ee*:t 99, 99, 98 ja 96 lämpötiloissa 25, 37, 50 and 70 °C).<sup>60</sup> Siksi reaktio kannattaa suorittaa 37 °C:ssa, vaikka entsyymi on aktiivisempi korkeammissa lämpötiloissa. Samanlaisia tuloksia saatiin myös 1,1,1-trifluoriasetonin pelkistyksessä LBADH:lla.<sup>61</sup> Enantioylimäärä kasvoi 94%:sta 97%:iin, kun lämpötila laskettiin 30 °C:sta 15 °C:een. Kolmas esimerkki on etyyli-4-kloori-3-oksobutanoaatin (COBE) pelkistys *Neurospora crassa*:n karbonyylireduktaasilla (NcCR).<sup>62</sup> Lämpötilassa 40 °C entsyymin aktiivisuus oli paras, mutta *ee* vain 78.8%. NcCR oli COBE:lla kuitenkin tarpeeksi aktiivinen toimiakseen -3 °C:ssa, jolloin *ee* oli 98%.



### 3.3.2 pH:n vaikutukset

Secundo ja Phillips<sup>63</sup> ovat tutkineet pH:n vaikutusta enantiospesifisyyteen alkoholien hapetuksessa kahdella ADH:lla. Mitään vaikutusta ei havaittu HLADH:lla, ja *Thermoanaerobacter ethanolicus* -SADH:n tapauksessa havaittu vaikutus on esitetty yhtälössä 3, jossa  $E$  on enantiomeerinen suhde,  $K_I$  on entsyymin katalyyttisen emäksen happovakio ja  $C = k_3/k_2$  (kaavio 14,  $C_R$  ja  $C_S$  ovat  $C$ :n arvot ( $R$ )- ja ( $S$ )-isomeerien muodostumisessa). Tämä pH-riippuvuus tarkoittaa, että myös vastaavan pelkistysreaktion enantioselektiivisyys on samalla tavalla pH-riippuvainen.

$$E = \frac{(k_{cat}/K_M)_R \frac{K_1(1+C_R)}{[H^+] + K_1(1+C_R)}}{(k_{cat}/K_M)_S \frac{K_1(1+C_S)}{[H^+] + K_1(1+C_S)}} \quad (3)$$



**Kaavio 14.** pH-riippuvaisen entsyymireaktion kineettinen mekanismi.<sup>63</sup>

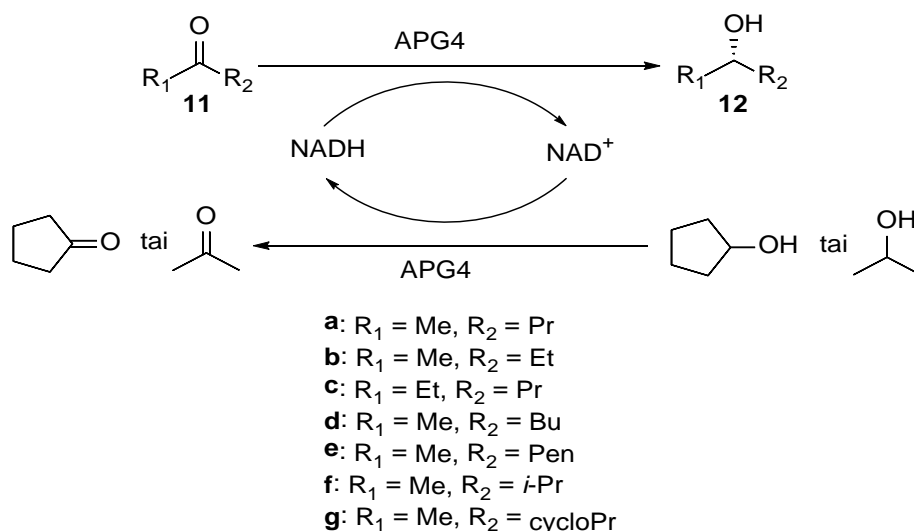
Paras aktiivisuus voidaan saavuttaa eri pH-arvossa kuin paras selektiivisyys.<sup>46</sup> 2-Oktanonin **7** pelkistyksessä hiivalla paras saanto saadaan, kun pH on 7.0-8.0. Enantioselektiivisyys taas on paras, kun pH on 4.0-5.0 ja huonoin pH:ssa 7.0. Kun pH:ta vielä nostetaan, selektiivisyys kasvaa taas, joten optimaalinen pH tälle reaktiolle on 8.0.

## 3.4 Esimerkkejä entsyymeillä pelkistetyistä ketoneista

### 3.4.1 Yksinkertaiset alifaattiset ketonit

Matsuda *et al.*<sup>13</sup> ovat tutkineet yksinkertaisten alifaattisten ketonien pelkistystä asetonikuivatuilla *Geotrichum candidum* IFO 4597 -soluilla (kaavio 15). Substraateilla **11a**,

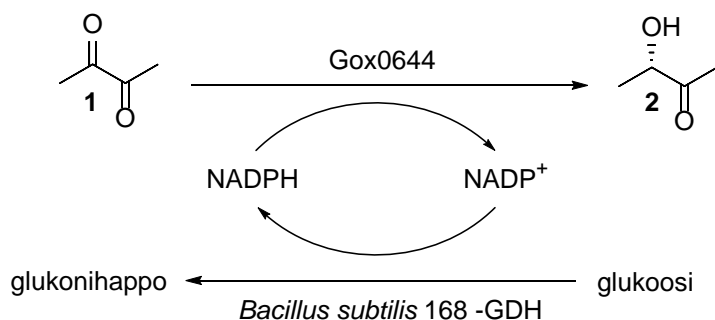
**11d**, **11e** and **11g** saavutettiin erinomainen enantioselektiivisyys ( $ee > 99\%$ ). Melkein yhtä hyvä tulos saatiin myös **11c**:llä ja **11f**:llä ( $ee$  98%). Ainut huonompi arvo ( $ee$  77%) saatiin **11b**:llä, mutta sekin parani 94%:iin, kun käytettiin suurempaa määrää alkoholia. Tämä todennäköisesti johtui siitä, että alkoholi inhiboi voimakkaammin (*R*)- kuin (*S*)-entsyymejä.



**Kaavio 15.** Yksinkertaisten alifaattisten ketonien pelkistys *Geotrichum candidum* IFO 4597:lla (APG4).<sup>13</sup>

Keinan *et al.*<sup>64</sup> ovat pelkistäneet yksinkertaisia alifaattisia ketoneja *Thermoanaerobacter brockii* -ADH:lla (TBADH). Pienet substraatit suosivat (*R*)- ja suuremmat (*S*)-konfiguraatiota. Hyvän selektiivisyyden saavuttamiseksi reaktiot suoritettiin 37 °C:ssa, vaikka entsyymi on aktiivisempi korkeammissa lämpötiloissa.

Gao *et al.*<sup>65</sup> ovat pelkistäneet diasetyyliä **1** (*3S*)-asetoiiniksi **2** *Gluconobacter oxydans* -CR:lla (kaavio 16). Entsyymi on sopiva tähän tarkoitukseen, koska sillä ei ole ollenkaan asetoiinireduktaasiaktiivisuutta. Optimaalisissa olosuhteissa saavutettiin  $ee$  96.9%.

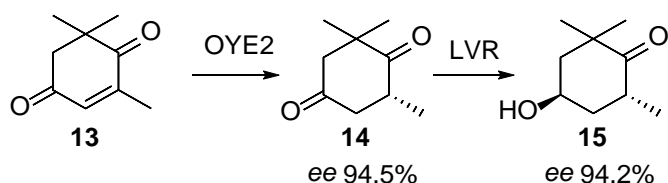


**Kaavio 16.** Diasetyylin **1** asymmetrinen pelkistys *Gluconobacter oxydans* -CR:lla (Gox0644).<sup>65</sup>

(*R*)-1,3-butaanidiolia on valmistettu enantioselektiivisesti (*ee* >99%) 4-hydroksi-2-butanonista *E. coli* -soluilla, jotka tuottavat *Leifsonia* sp. S749 -ADH:ta.<sup>66</sup> Reaktio suoritettiin reaktorissa, jossa katalyytti on pakattu pieneen kolonniin, ja substraattia sisältävän liuoksen annetaan valua sen läpi. Vastaava reaktio voidaan katalysoida myös *Pichia jadinii* HBY61:lla.<sup>67</sup> Substraattikonsentraatiolla 45 g/L saavutettiin 100%:n *ee* ja 85.1%:n saanto.

Myös diketoneja on pelkistetty entsyymeillä onnistuneesti. (2*S*,5*S*)-heksaanidiolia on tuotettu vastaavasta diketonista Gre2p-nimisellä hiivan (*Saccharomyces cerevisiae*) dehydrogenaasilla.<sup>68</sup> Erittäin hyvä selektiivisyys saavutettiin (*ee* ja *de* >99%). Diketoneja on pelkistetty myös *Rhodococcus ruber* DSM 44541:lla.<sup>69</sup> Pienillä substraateilla, kuten 2,3-pentaanidionilla, selektiivisyys oli huono (*ee* 60%), mutta parani hiiliketjun kasvaessa. 2,4-Oktaanidioni ei pelkistynyt dioliksi saakka, mutta vastaavaa (*S*)-2-hydroksiketonia saatiin hyvällä selektiivisyydellä (*ee* >99%).

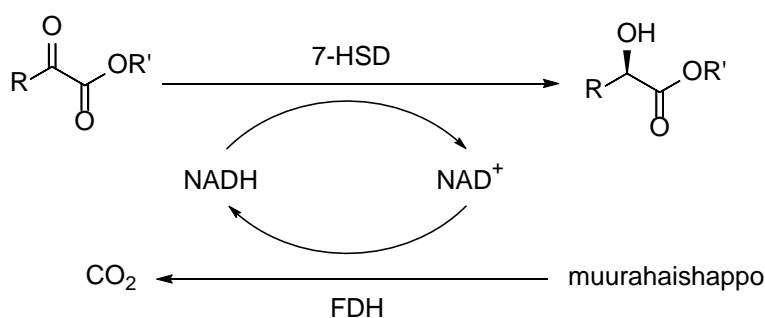
Myös sykliisiä ketoneja on käytetty substraatteina entsyymaattisissa pelkistyksissä. Wada *et al.*<sup>70</sup> ovat julkaisseet ketoisoforonin **13** pelkistyksen aktinoliksi **15** kaksivaiheisessa entsyymireaktiossa (kaavio 17). Ensimmäisessä vaiheessa OYE pelkistää kaksoisidoksen ja toisessa levodionireduktaasi (LVR) toisen ketoryhmistä.



**Kaavio 17.** Kaksivaiheinen entsyymaattinen reaktio, joka muuttaa ketoisoforonin **13** aktinoliksi **15**.<sup>70</sup>

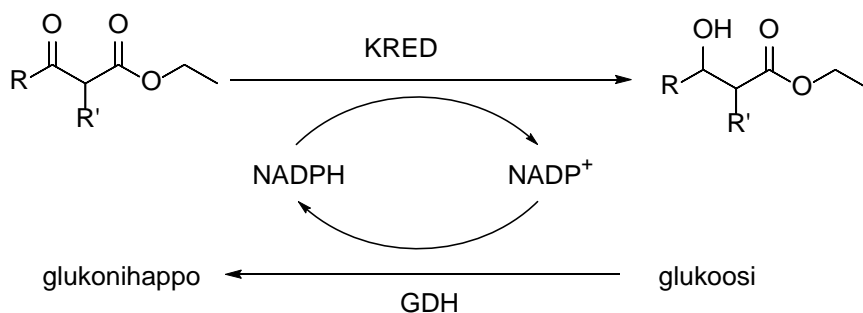
### 3.4.2 $\alpha$ - ja $\beta$ -Ketoesterit

*Bacteroidis fragilis*:n  $7\alpha$ -hydroksisteroididehydrogenaasia ( $7\alpha$ -HSD) on käytetty  $\alpha$ -ketoestereiden pelkistykseen (kaavio 18).<sup>71</sup> Entsyymi ei ole aktiivinen asetofenonijohdannaisilla tai  $\beta$ -ketoestereillä, mutta pelkistää tehokkaasti sekä aromaattisia että alifaattisia  $\alpha$ -ketoestereitä. Substituentit vaikuttavat entsyymin aktiivisuuteen, mutta eivät reaktion enantioselektiivisyyteen. Useimmissa tapauksissa saavutetaan erinomainen selektiivisyys ( $ee >99\%$ ).



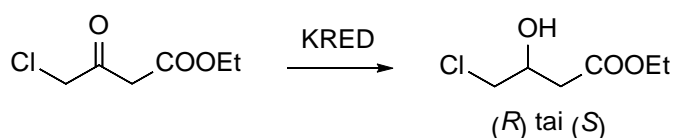
**Kaavio 18.**  $\alpha$ -Ketoestereidän asymmetrinen pelkistys *Bacteroidis fragilis* - $7\alpha$ -HSD:lla.<sup>71</sup>

Zhu *et al.*<sup>72</sup> ovat tutkineet  $\beta$ -ketoesterien pelkistystä 20 ketoreduktaasilla (kaavio 19). Useimmissa tapauksissa entsyymin aktiivisuus pieni, kun  $R'$ -ryhmän koko kasvoi. Tapauksissa, joissa diastereomeerien muodostuminen oli mahdollista, reaktio tapahtui diastereoselektiivisesti johtuen  $\alpha$ -protonin happamuudesta, joka sallii  $\alpha$ -hiilen epimeroitumisen lähtöaineessa, mutta ei tuotteessa.



**Kaavio 19.**  $\beta$ -ketoesterien entsymaattinen pelkistys.

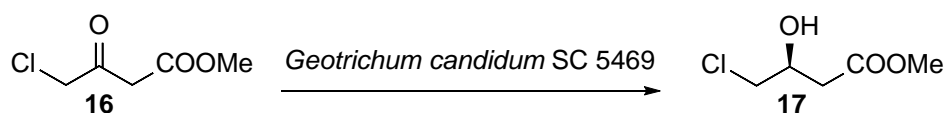
Etyyli-(*R*)- ja (*S*)-4-kloori-3-hydroksibutanoaatit (CHBE) ovat tärkeitä kiraalisia rakennuspalikoita synteesissä, joten monia entsyymejä on kokeiltu niiden tuottamiseen COBE:sta (kaavio 20).<sup>73,74</sup> (*S*)-CHBE on kolesterolilääkkeenä käytetyn atorvastatiinin esiaste. Shimizu *et al.*<sup>73</sup> ovat tuottaneet CHBE:n molempia enatiomeereja >92%:n *ee*:llä käyttämällä *Sporobolomyces salmonicolor*:n (*R*)-AKR:a ja *Candida magnolia*:n (*S*)-KRED:a.



**Kaavio 20.** CHBE:n enantioselektiivinen synteesi COBE:sta.

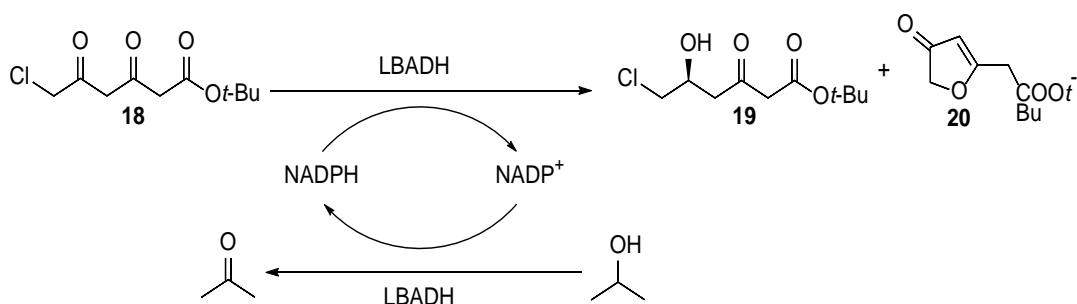
(*S*)-CHBE:ta on syntetisoitu myös pelkistämällä COBE:a *Streptomyces coelicolor* -ADH:lla.<sup>75</sup> Reaktio onnistui suurella substraattikonsentraatiolla (600 g/L) puolet puskuria ja puolet toluenia sisältävässä liuoksessa erittäin hyvällä selektiivisyydellä (*ee* >99%). Myös Liu *et al.*<sup>76</sup> ovat julkaisseet (*S*)-CHBE:n biokatalyyttisen synteesin isossa mittakaavassa. (*R*)-CHBE:ta on tuotettu myös pelkistämällä COBE:a *Bacillus* sp. ECU0013:lla.<sup>77</sup>

Myös vastaavaa metyyliesteriä **17** on valmistettu enantioselektiivisesti (*ee* 98%) entsyymaattisella pelkistyksellä (kaavio 21).<sup>78</sup> Substraattikonsentraatiolla 10 g/L saatiin 95%:saanto.



**Kaavio 21.** Metyyli-4-kloori-3-oxobutanoaatin **16** asymmetrinen pelkistys *Geotrichum candidum* SC 5469:lla.<sup>78</sup>

Wolberg *et al.*<sup>79</sup> ovat tutkineet  $\beta,\delta$ -diketoesterin **18** enantioselektiivistä pelkistystä LBADH:lla (kaavio 22). Vain toinen ketoryhmistä pelkistyi ja tuotteena saatiin  $\delta$ -hydroksi- $\beta$ -ketoesteriä **19** >99%:n *ee*:llä. Reaktiossa ongelmana oli ei-entsyymaattisena sivutuotteena syntyvä furanoni **20**, jonka muodostumista ehkäistiin pitämällä substraattikonsentraatio matalana. Yhdiste **19** voidaan pelkistää *syn*- tai *anti*-selektiivisellä boorihydridipelkistyksellä vastaavaksi  $\beta,\delta$ -dihydroksiesteriksi (*ee* >99%, *dr* >205:1).<sup>80</sup>

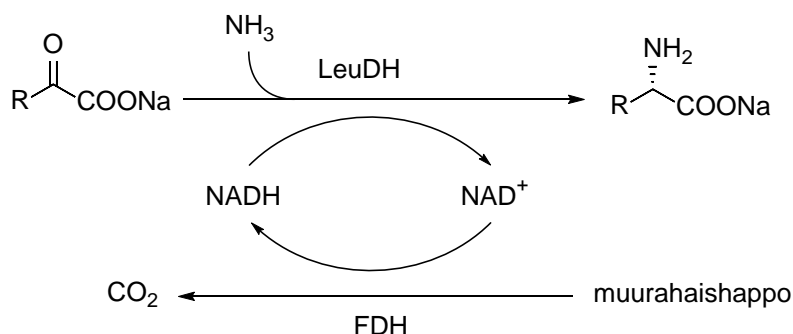


**Kaavio 22.**  $\beta,\delta$ -Diketoesterin **18** asymmetrinen pelkistys LBADH:lla.<sup>79</sup>

Zhu *et al.*<sup>81,82</sup> ovat pelkistäneet  $\alpha$ - ja  $\beta$ -ketoestereitä *Pyrococcus furiosus* -ADH:lla (PFADH) ja *Candida magnolia* -CR:lla (CMCR). Sekä aromaattiset että alifaattiset substraatit kelpasivat PFADH:lle, mutta selektiivisyys oli parempi aromaattisilla (*ee* >99%) kuin alifaattisilla yhdisteillä (*ee* 4-95%). CMCR taas pelkisti alifaattiset substraatit >99%:n *ee*:llä useimmissa tapauksissa.

### 3.4.3 $\alpha$ -Ketohapot

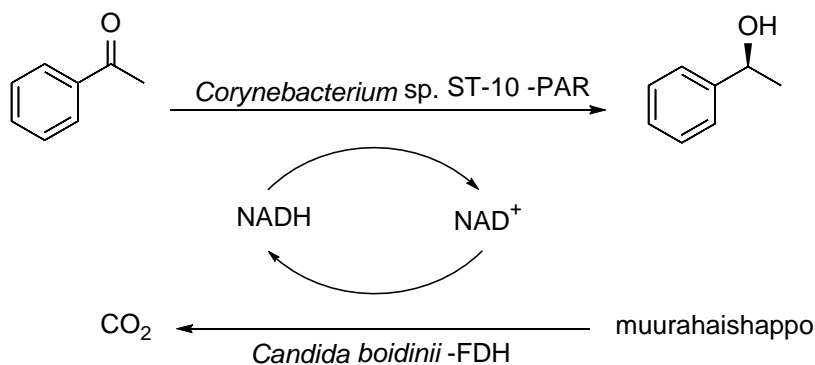
Aminohappoja on valmistettu  $\alpha$ -ketohappojen pelkistävällä aminaatiolla leusiini- tai fenyylialaniinidehydrogenaasilla (kaavio 23).<sup>83</sup> LeuDh pystyi käyttämään haarautuneita ja harautumattomia alifaattisia ja joitakin alisyklisiä substraatteja. Adamantyyli-ryhmä oli kuitenkin liian iso tälle entsyymille. Aminohappoja saatiin enantiopuhtaina (*ee* >99%) 60-90%:n saannolla. *L*-neopentyyliglysiiniä pystyttiin valmistamaan jopa 30 kg. Alifaattisten substraattien lisäksi PheDH hyväksyi myös aromaattiset yhdisteet. Se suosi erityisesti isoja sivuketjuja, myös adamantyyli-ryhmän sisältävä substraatti reagoi onnistuneesti.



**Kaavio 23.**  $\alpha$ -ketohappojen pelkistävä aminointi leusiinidehydrogenaasilla.<sup>83</sup>

### 3.4.4 Asetofenonijohdannaiset

Itoh *et al.*<sup>84</sup> ovat pelkistäneet asetofenonijohdannaisia *Corynebacterium* sp ST-10:n fenyyliaasetaldehydireduktaasilla (kaavio 24). Entsyymi toimi parhaiten yhdisteillä, joissa on halogeenisubstituentti *meta*- tai *para*-asemassa. Substituentit *ortho*-asemassa ja pidemmät sivuketjut  $\alpha$ -asemassa pienensivät entsyymin aktiivisuutta. Useimmissa tapauksissa reaktiot olivat erittäin selektiivisiä (*ee* >99%).

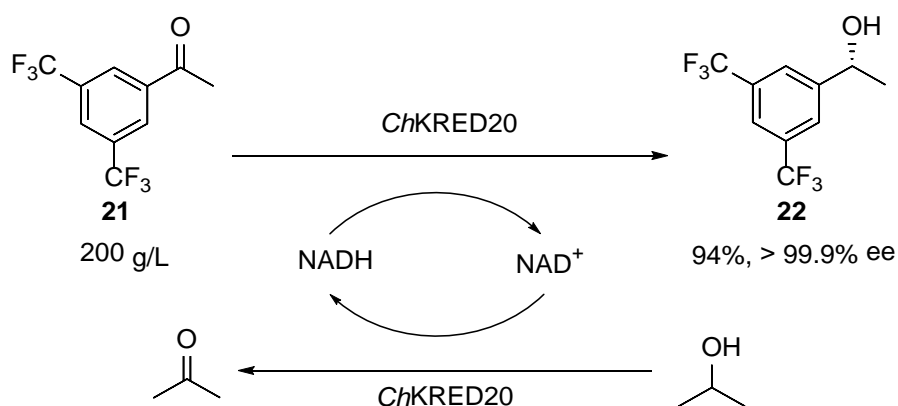


**Kaavio 24.** Asetofenonijohdannaisten asymmetrinen pelkistys fenyyliaasetaldehydireduktaasilla (PAR).<sup>84</sup>

Erlaisia *p*-substituoituja asetofenoneja on pelkistetty myös *Rhodotorula* sp. AS2.2241:lla.<sup>85</sup> Yli 99%:n enantioylimäärä saavutettiin muilla substraateilla paitsi *p*-nitro- $\alpha$ -bromiasetofenonilla, joka tuotti vastaavaa alkoholia (*R*)-nifenalolia vain 97%:n *ee*:llä. Elektroneja puoleensa vetävät ryhmät kasvattivat reaktionopeutta ja elektroneja luovuttavat ryhmät vastaavasti hidastivat reaktiota huomattavasti. Kun substraattina oli *p*-aminoasetofenoni, saanto oli vain 6% 24 tunnissa, kun se *p*-nitroasetofenonilla oli 84%

kolmessa tunnissa. Samanlaisia tuloksia saatiin, substituoituja asetofenoneja pelkistettiin *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556:lla.<sup>86</sup>

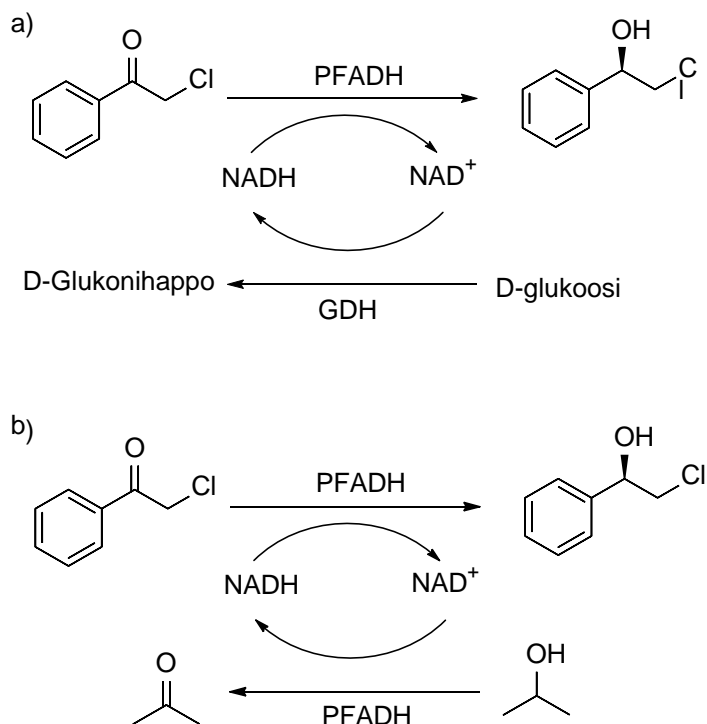
(*R*)-3,5-bis(trifluorometyyli)-1-fenyylietanolia **22** on valmistettu pelkistämällä vastaavaa ketonia **21** *Chryseobacterium* sp. CA49:n ketoreduktaasilla, *ChKRED20*:lla (kaavio 25).<sup>87</sup> substraatin liukoisuutta saatiin kasvatettua isopropanolia käyttämällä 200 g/L:aan. Enantiopuhdasta (*ee* >99%) tuotetta saatiin hyvällä konversiolla (94%). Muidenkin asetofenonien, paitsi *ortho*-substituoitujen yhdisteiden, pelkistys onnistuu tällä entsyymillä hyvin.<sup>88</sup> Myös pitkät sivuketjut  $\alpha$ -asemassa kuitenkin hidastavat reaktiota.



**Kaavio 25.** Yhdisteen **21** asymmetrinen pelkistys *ChKRED20*:lla.<sup>87</sup>

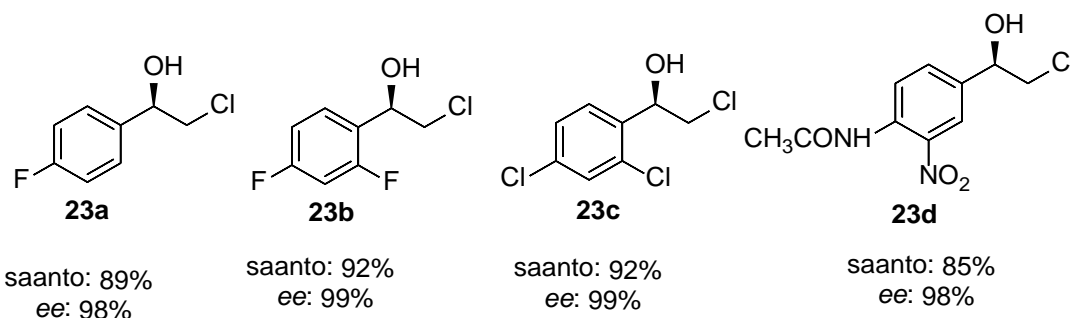
$\alpha$ -Klooriasetofenoneja on pelkistetty PFADH:lla (kaavio 26).<sup>60</sup> Kuten muutkin termofiiliset entsyymit, se sietää hyvin orgaanisia liuottimia, kuten isopropanolia, heksaania, DMSO:a ja MTBE:ä.





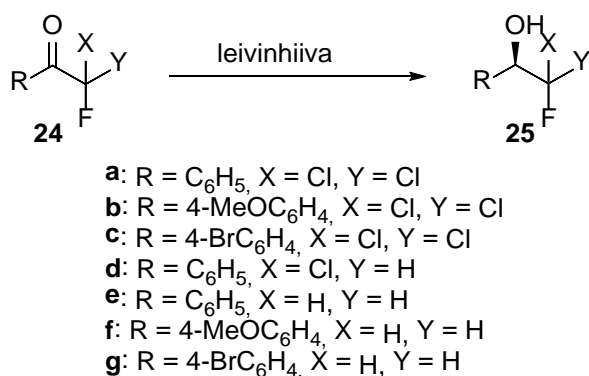
**Kaavio 26.**  $\alpha$ -Klooriasetofenonien asymmetrinen pelkistys PFADH:lla a) vesiliuoksessa, kofaktorin kierrätys hoidettu GDH:lla b) 15% isopropanolia sisältävässä liuoksessa.<sup>60</sup>

Substituentit eivät vaikuttaneet selektiivisyyteen, >96%:n *ee* saatiin kaikilla yhdisteillä. Saantoon substitueinteilla kuitenkin oli vaikutusta. Esimerkiksi 4'-klooriyhdisteellä saanto oli vain 17%, mutta 4'-fluoriyhdisteellä jopa 95%. Sekä elektroniset että steriset syyt voivat vaikuttaa asiaan. Liukoisuusongelmista ei ollut kyse, sillä saannot eivät olleet parempia muita orgaanisia liuottimia kuin isopropanolia sisältävässä liuoksessa tehdyissä reaktioissa. Isopropanoli paransi saantoja, koska entsyymi pystyy käyttämään sitä kofaktorin kierrätykseen. Yhdisteitä **23a-d** (kaavio 27) valmistettiin myös preparatiivisessa mittakaavassa, jolloin saavutettiin erinomaiset saannot ja selektiivisyydet.  $\alpha$ -Klooriasetofenoneja on pelkistetty myös muilla ketoreduktaaseilla.<sup>89</sup>



**Kaavio 27.** Preparatiivisessa mittakaavassa valmistetut tuotteet.<sup>60</sup>

Barkakaty *et al.*<sup>90</sup> ovat tutkineet  $\alpha$ -fluoroasetofenonien **24a-g** enantioselektiivistä pelkistystä hiivalla (kaavio 28). Selektiivisyydet vaihtelivat kekskinkertaisesta hyvään (*ee* 47-94%) ja olisivat ehkä parannettavissa eristettyjä entsyymejä käyttämällä. Yhdisteellä **24f** reaktio ei tapahtunut ollenkaan, koska elektroneja luovuttava ryhmä deaktivoi karbonyyliä.



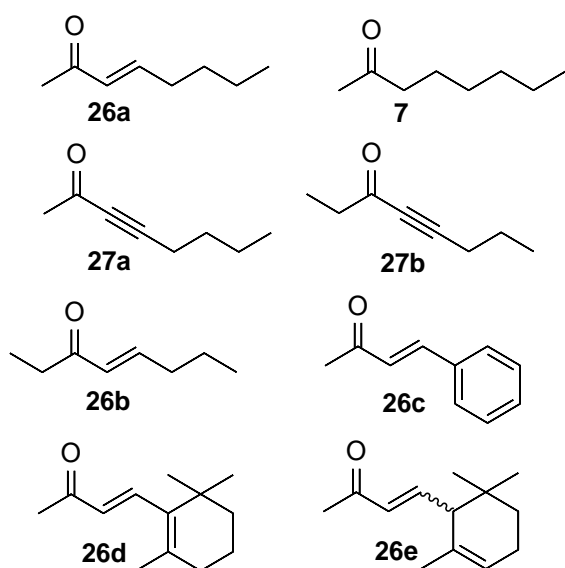
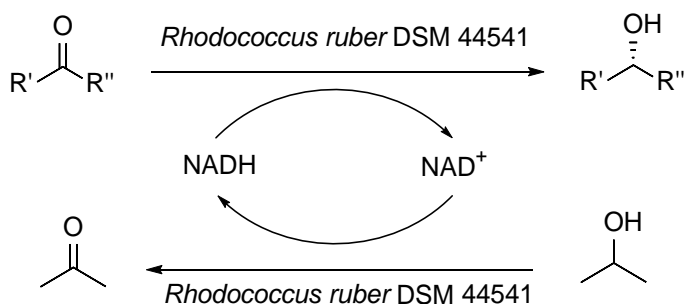
**Kaavio 28.**  $\alpha$ -Fluoroasetofenonien **24a-g** asymmetrinen pelkistys hiivalla.<sup>90</sup>

$\alpha$ -Halogenoituja asetofenoneja on pelkistetty myös *Kluyveromyces thermotolerans* -CR:lla (KtCR).<sup>91</sup>  $\alpha$ -Klooriasetofenonin pelkistys onnistuu isossa mittakaavassa (substraattikonsentraatio 154 g/L) sitä tuottavilla *E. coli* -soluilla. Reaktiossa saatiin hyvä saanto ja selektiivisyys (saanto 92% ja *ee* >99%). Kuten muillakin entsyymeillä on havittu, *o*-substituoidut yhdisteet ovat huonoja substraatteja myös tälle entsyymille ja elektroneja puoleensa vetävät ryhmät *p*-asemassa parantavat aktiivisuutta.

Myös kasveja voidaan käyttää biokatalyytteina.<sup>92</sup> Esimerkiksi  $\alpha$ -trifluorometyyliasetofenonia ja *o*-klooriasetofenonia on pelkistetty retiisillä. Molemmassa tapauksissa saatiin hyvä selektiivisyys (*ee* >99%).

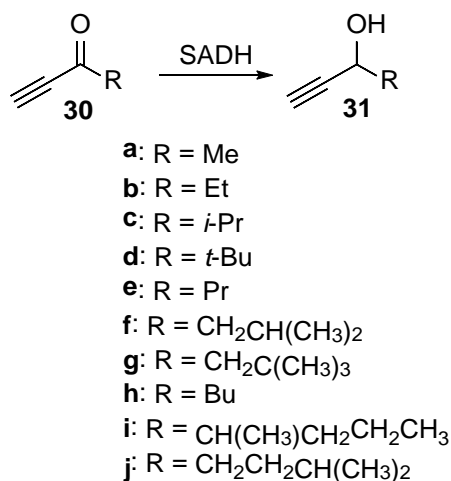
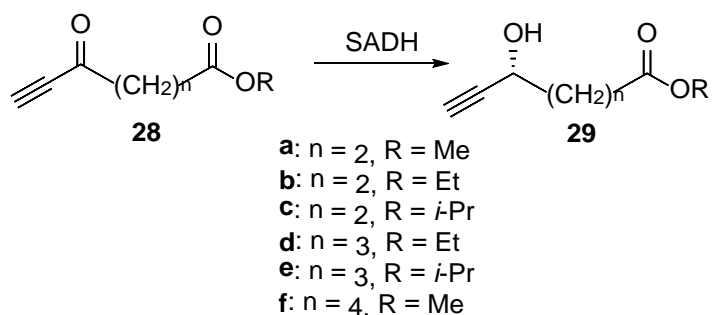
### 3.4.5 $\alpha,\beta$ -Tyydyttymättömät ketonit

$\alpha,\beta$ -Tyydyttymättömien ketonien pelkistyksessä kokosolumentelmillä on kemoselektiivisyysongelma, koska solut sisältävät myös enoaattireduktaaseja, jotka pelkistävät C=C-kaksoissidoksen karbonyyliin sijaan.<sup>93-95</sup> Esimerkiksi hiiva pelkistää kaksoissidoksen ensin useimmissa tapauksissa. Myös muita sivureaktioita, kuten veden addition kaksoissidokseen saattaa tapahtua metabolian seurauksena.<sup>93</sup> Kaaviossa 29 esitetyt ketonit on kuitenkin onnistuttu pelkistämään *Rhodococcus ruber* DSM 44541:lla.<sup>94</sup> Selektiivisyydet olivat erinomaisia ( $ee >99\%$ ) paitsi yhdisteellä **27a**, jolla saatiin vain 75%:n  $ee$ . Raseeminen **26e** ei pelkistynyt diastereoselektiivisesti. Stereokeskus  $\gamma$ -asemassa on liian kaukana vaikuttaakseen reaktion lopputulokseen.



**Kaavio 29.**  $\alpha,\beta$ -Tyydyttymättömien ketonien pelkistys *Rhodococcus ruber* DSM 44541:lla.<sup>94</sup>

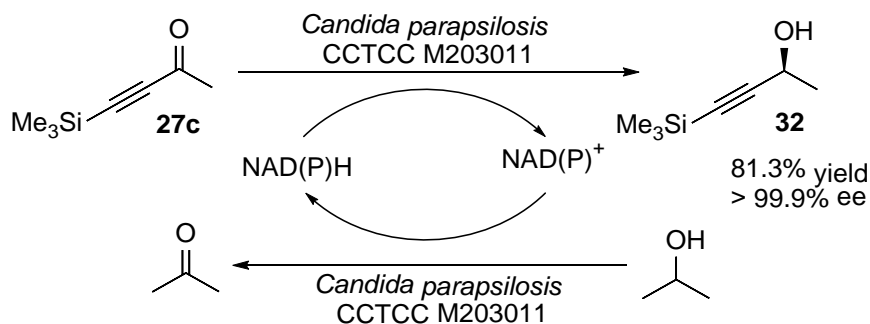
Heiss ja Phillips<sup>96</sup> ovat tutkineet erilaisten kolmoissidoksen sisältävien ketonien pelkistystä *Thermoanaerobacter ethanolicus* -SADH:lla (kaavio 30). Reaktioon tarvittiin suurempi entsyymikonsentraatio kuin konjugoitumattomien ketonien pelkistykseen, mikä johtune nukeofiilisten aminohappojen konjugaattiadditiosta kolmoissidokseen. Yhdisteillä **30d**, **30g** ja **30i** tuotetta ei saatu juuri ollenkaan, koska ne ovat liian ahtaita. Myös muut ketonit **30** pelkistyivät melko huonosti (saanto 28-55%). Ketoestereillä **28** saanto oli hieman parempi (35-88%). Selektiivisyydet vaihtelivat keskinkertaisesta huonoon yhdisteillä **30** (ee 42-98%), mutta yhdisteillä **28** saatiin kaikilla suhteellisen hyvä selektiivisyys (ee 82-98%).



**Kaavio 30.** Kolmoissidoksen sisältävien  $\alpha,\beta$ -tydyttymättömien ketonien pelkistys *Thermoanaerobacter ethanolicus* -SADH:lla.<sup>96</sup>

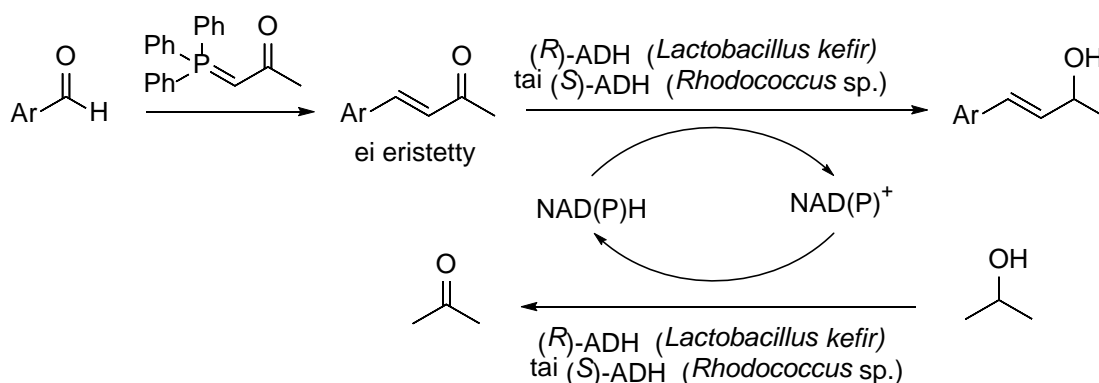
4-(Trimetyylisilyyli)-3-butyyn-2-oni **27c** on pelkistetty vastaavaksi (*S*)-alkoholiksi **32** *Candida parapsilosis* CCTCC M203011:lla (kaavio 31).<sup>97</sup> Reaktiossa oli tärkeää pitää pH alle kuudessa, koska neutraaleissa ja emäksisissä olosuhteissa substraatin silyyliryhmä hajoaa

nukleofiilisen hyökkäyksen seurauksena. Toinen ongelma tässä reaktiossa oli substraatti-inhibitio, joka rajoitti substraattikonsentraation 3,0 mM:een.



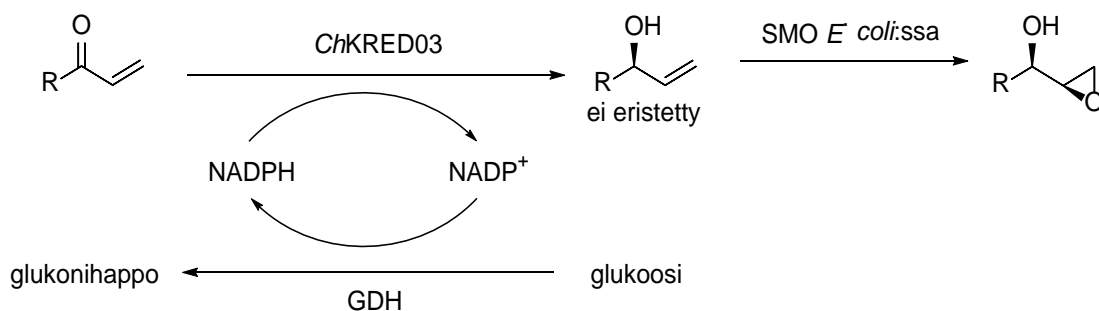
**Kaavio 31.** 4-(Trimetyylisilyyli)-3-butyn-2-onin **27c** asymmetrinen pelkistys *Candida parapsilosis* CCTCC M203011:lla.<sup>97</sup>

Kraußer *et al.*<sup>98</sup> yhdistivät Wittig-reaktion entsymaattiseen pelkistykseen (kaavio 32). Kaikilla testatuilla substraateilla allyylialkoholituotetta saatiin 48-90%:n konversiolla ja >99%:n ee:llä.



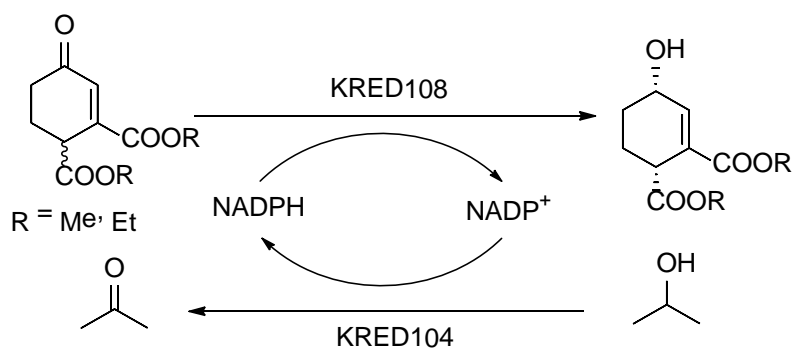
**Kaavio 32.** Allyylialkoholien stereoselektiivinen synteesi kaksivaiheisella kemoentsymaattisella menetelmällä.<sup>98</sup>

Liu *et al.*<sup>95</sup> yhdistivät  $\alpha,\beta$ -tyydyttymättömien ketonien entsymaattisen pelkistykseen styreenimono-oksigenaasin (SMO) katalysoimaan epoksidaatioon (kaavio 33). Kaksoissidoksen pelkistymisen välttämiseksi eristettyä *ChKRED03*-entsyymiä käytettiin ensimmäisessä vaiheessa ja sen jälkeen SMO:a tuottava *E. coli* lisättiin reaktioseokseen. Konversiot olivat 37-99%, ee > 99% ja de 86-99%.



**Kaavio 33.** Glysidolijohdannaisia tuottava kaksivaiheinen entsymaattinen reaktio.<sup>95</sup>

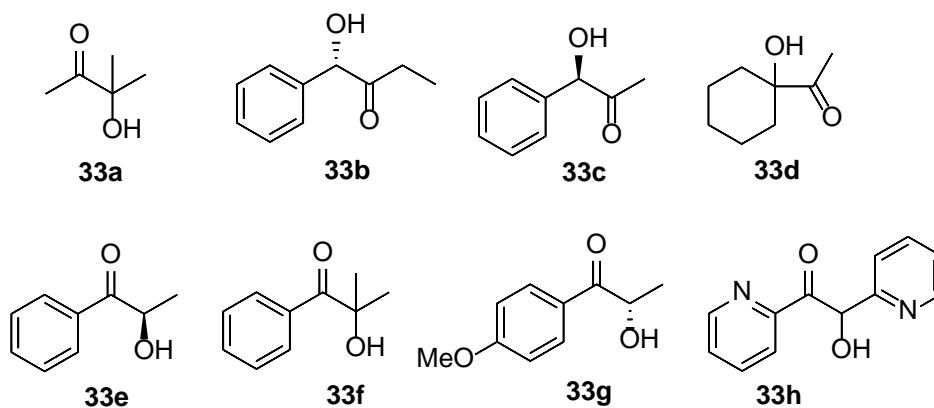
Kosjek *et al.*<sup>99</sup> ovat pelkistäneet syklisiä  $\alpha,\beta$ -tyydyttymättömiä ketoneja ketoreduktaaseilla (kaavio 34). Reaktiossa saatiin 94%:n saanto, *de* 99% ja *ee* 95%.



**Kaavio 34.** Syklisten  $\alpha,\beta$ -tyydyttymättömien ketonien pelkistys ketoreduktaaseilla.<sup>99</sup>

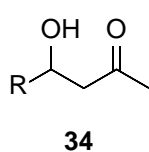
### 3.4.6 $\alpha$ - ja $\beta$ -Hydroksiketoneit

Ahtaita  $\alpha$ -hydroksiketoneja voidaan pelkistää vastaaviksi dioleiksi *Ralstonia* sp. DSM6428 -ADH:lla (RADH).<sup>100</sup> Esimerkkejä sopivista substraateista on esitetty kaaviossa 35. Parhaiten toimivat aryylialkyyliketonit. Kiraaliset (*R*)- ja (*S*)- $\alpha$ -hydroksiketoneit pelkistyvät hyvällä diastereoselektiivisyydellä (*de* >99%). Ahtaat aryylialkyyliketonit ilman  $\alpha$ -hydroksyyliiryhmää ovat myös hyviä substraatteja RADH:lle.<sup>101</sup>

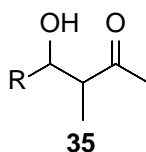


**Kaavio 35.** Esimerkkejä RADH:lla pelkistetyistä  $\alpha$ -hydroksiketoneista.<sup>100</sup>

Acetti *et al.*<sup>102</sup> ovat tutkineet  $\beta$ -hydroksiketoniin **34a-e** ja **35a-b** enantioselektiivistä pelkistystä hiivalla (kaavio 36). Tuotteet olivat enantiopuhaita (*ee* 95-99%) ja uusi stereokeskus oli aina (*S*)-konfiguraatiossa. Useimmissa tapauksissa päätuotteena syntyi *anti*-diolia. Yhdisteen **34b** tapauksessa se oli ainoa tuote. Vain yhdisteen **34e** tapauksessa *syn*-dioliolia muodostui hieman enemmän kuin *anti*-diolia.



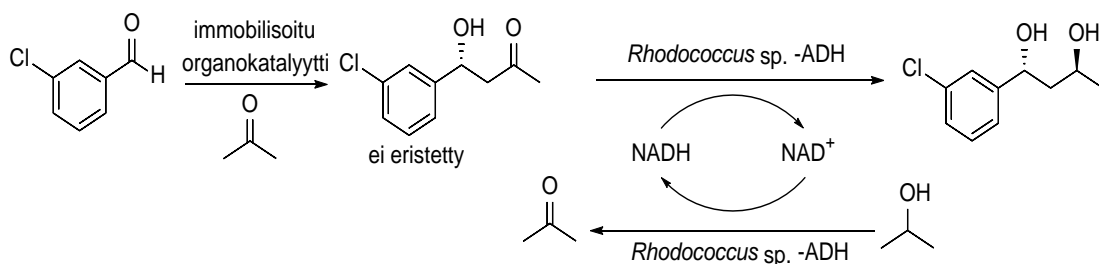
- a:** R = Ph  
**b:** R = PhCH=CH  
**c:** R = 4-MeOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>  
**d:** R = 2-furyyli  
**e:** R = CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>



- a:** R = Ph  
**b:** R = PhCH=CH

**Kaavio 36.** Hiivalla pelkistettyjä  $\beta$ -hydroksiketoneja.<sup>102</sup>

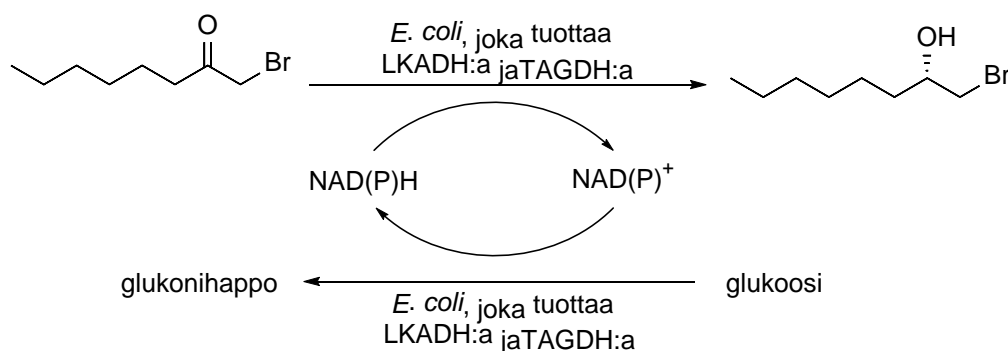
Heidlindemann *et al.*<sup>103</sup> ovat valmistaneet kiraalisia 1,3-dioleja kaaviossa 37 esitetyllä kemoentsyymaattisella prosessilla. Ensimmäinen vaihe on proliinipohjaisella organokatalyytillä katalysoitu aldolireaktio. Siinä muodostunut  $\beta$ -hydroksiketoni pelkistetään *Rhodococcus sp.* -ADH:lla vastaavaksi (1*R*, 3*S*)-dioliksi (*ee* >99%, *dr* >35:1).



**Kaavio 37.** 1,3-Diolien kemoentsymaattinen asymmetrinen synteesi.<sup>103</sup>

### 3.4.7 $\alpha$ -Haloketonit

$\alpha$ -Haloketoneita on pelkistetty vastaaviksi (*S*)-alkoholeiksi *E. coli* -soluilla, jotka tuottavat LKADH:a ja TAGDH:a (kaavio 38).<sup>104</sup> Reaktio toimi suuressa mittakaavassa (substraattia 208 g/l) tuottaen hyvän konversion ja selektiivisyyden (*ee* >99%). Syntyneet alkoholit muutettiin epoksideiksi NaOH-käsittelyllä, jolloin enantiopuhtaus säilyi. Kun nämä kaksi vaihetta yhdistettiin, tuotteen puhdistaminen oli vaikeaa ja saanto jäi 37%:iin.

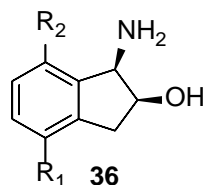


**Kaavio 38.**  $\alpha$ -Haloketonien asymmetrinen pelkistys *L. kefir* -ADH:lla ja *T. acidophilum* -GDH:lla.<sup>104</sup>

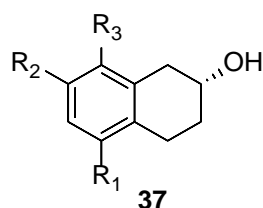
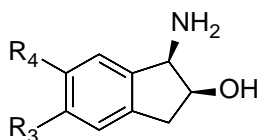
### 3.4.8 Muut substraatit

Yadav *et al.*<sup>105</sup> ovat valmistaneet indanoleja **36a-f**, tetraloleja **37a-c** ja monoterpenoleja **38a-b** biokatalyytisella pelkistyksellä vastaavista ketoneista (kaavio 39). Pelkistykseen käytettiin kahta erilaista katalyyttia, porkkanaa ja hiivaa. Porkkanalla saatiin paremmat enantioselektiivisyydet paitsi yhdisteen **37b** tapauksessa, jossa saavutettiin vain 70%:n *ee* molemmilla katalyyteilla. Useimmissa tapauksissa porkkanalla saatiin myös paremmat konversiot.

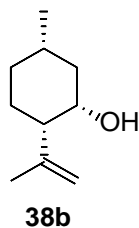
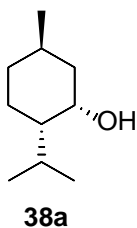




- a:**  $R_1 = H, R_2 = H$   
**b:**  $R_1 = H, R_2 = Me$   
**c:**  $R_1 = Me, R_2 = H$   
**d:**  $R_1 = H, R_2 = (CH_3)_2CH$

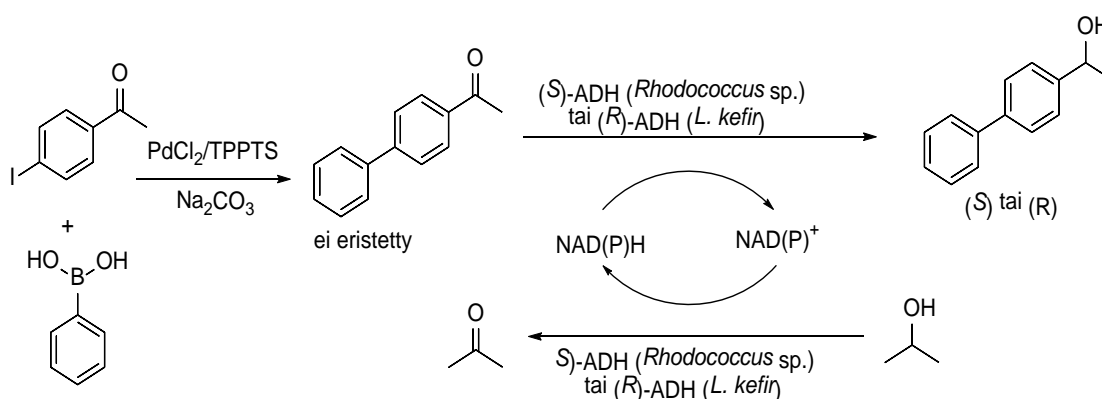


- a:**  $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H$   
**b:**  $R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = H$   
**c:**  $R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = OMe$

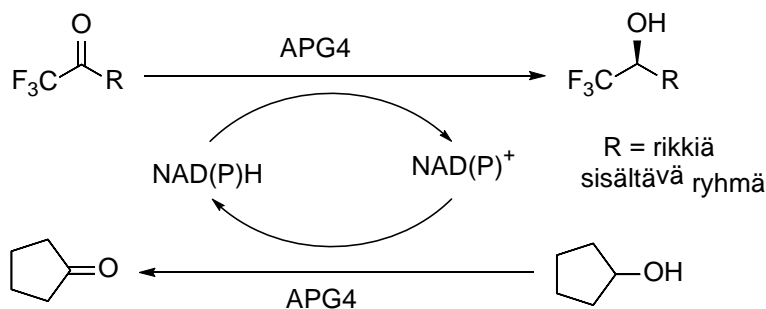


**Kaavio 39.** Erilaisten indanonien, tetralonien ja monoterpenonien pelkistyksessä saadut tuotteet.<sup>105</sup>

Borchert *et al.*<sup>106</sup> yhdistivät Suzuki-kytkennän ja entsymaattisen pelkistyksen biaryylialkoholien valmistamiseksi (kaavio 40). Kytkennässä käytettiin palladiumkloridista ja TPPTS:sta valmistettua katalyyttia. Muodostunut biaryyliketoni pelkistettiin ADH:lla. Molempia enantiomeereja pystyttiin valmistamaan hyvällä selektiivisyydellä (*ee* >99%). Samanlaisella kaksifaasireaktiolla voidaan valmistaa myös biaryylidioleja.<sup>107</sup>

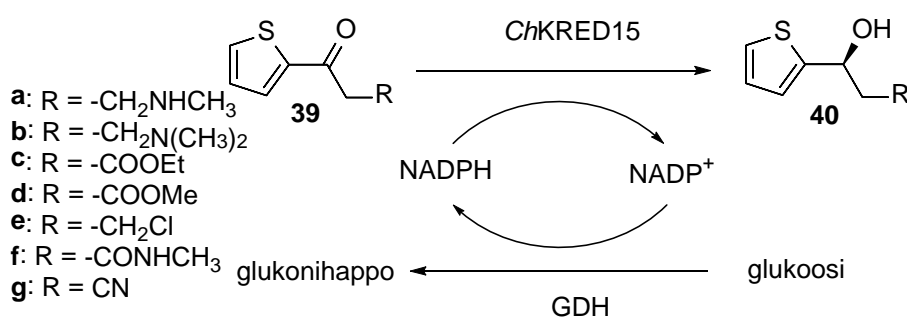


Nakamura *et al.*<sup>108</sup> ovat pelkistäneet rikkiä sisältäviä trifluorometyyliketoneja APG4:llä (kaavio 41). Fenyylitio-, oktyylitio- ja tienyyliiryhmiä sisältävien ketonien pelkistys onnistui hyvällä saannolla ja enantioselektiivisyydellä. Isopropanolin sijaan käytettiin syklopentanolia, koska se inhiboi joitakin ketoreduktaaseja ja siten parantaa selektiivisyyttä.



**Kaavio 41.** Rikkiä sisältävien trifluorometyyliketonien asymmetrinen pelkistys APG4:llä.<sup>108</sup>

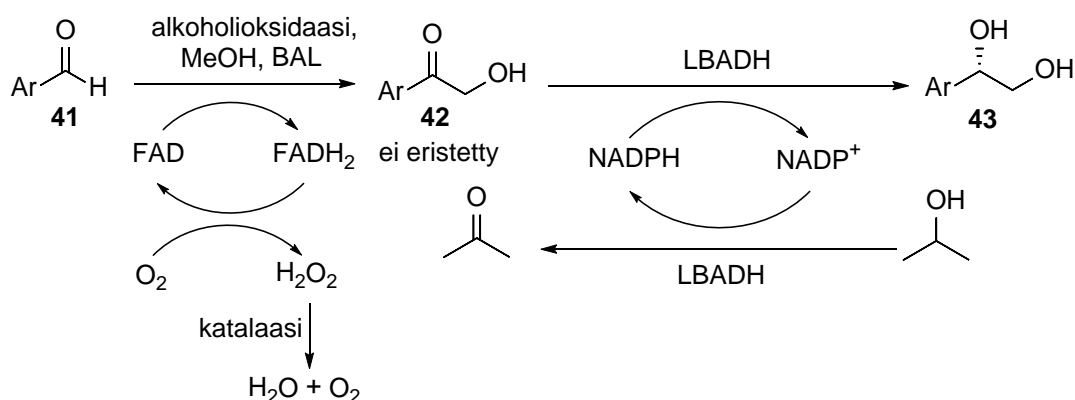
*ChKRED15*:n S12G-mutanttia on käytetty kiraalisen lääkeaineen (*S*)-duloksetiinin esiasteiden **40a-g** synteesiin (kaavio 42).<sup>24</sup> Tuoteinhibitio rajoitti substraatin konsentraation 5 mM:een yhdisteillä **39e** ja **39g** ja 50 mM:een yhdisteillä **39c** ja **39d**. Paras substraatti isossa mittakaavassa tapahtuvaan reaktioon oli **39f**, jolla reaktio onnistui ilman inhibitiota konsentraatioilla 100-250 mM. Kaikissa tapauksissa saavutettiin erinomainen selektiivisyys (*ee* >99%).



**Kaavio 42.** Yhdisteiden **39a-g** asymmetrinen pelkistys *ChKRED15*:n S12G-mutantilla.<sup>24</sup>

$\alpha$ -Aryylidioleja **43** voidaan valmistaa stereoselektiivisesti kaaviossa 43 esitetyllä multientsyymaattisella reaktiolla.<sup>78</sup> Välituote **42** valmistetaan lähtöaineena olevasta aldehydista **41** ja formaldehydista bentsaldehydilyaasilla (BAL). Myrkyllisen formaldehydin

käsittelyn välttämiseksi se valmistetaan *in situ* FAD-riippuvaisella alkoholioksidaasilla. Välituote **42** pelkistetään halutuksi dioliksi **50** LBADH:lla (saanto ja *ee* >99%).



**Kaavio 43.**  $\alpha$ -Aryyliketonien asymmetrinen multientsyymaattinen synteesi.<sup>78</sup>

## 4 Yhteenveto

Entsyymien käyttö kiraalisten alkoholien valmistuksessa kiinnostaa, koska ne yleensä pelkistävät ketoneja erittäin enantioselektiivisesti.<sup>1</sup> Entsyymien käyttö on myös ympäristöystävällistä, koska ne ovat täysin biohajoavia ja reaktiot voidaan suorittaa miedoissa oloissa ilman haitallisia kemikaaleja. Ketoneja pelkistävät entsyymit voidaan jakaa kolmeen luokkaan, jotka ovat keskipitkäketjuiset ja lyhytketjuiset dehydrogenaasit/reduktaasit (MDR ja SDR) ja aldo-ketoreduktaasit (AKR).<sup>14,27</sup> Ne kaikki tarvitsevat NADH- tai NADPH-kofaktoria ja voivat yleensä toimia sekä hapetus- että pelkistysuuntaan. Hapetusreaktiossa katkeavat alkoholin O-H- ja C-H-sidokset, joista jälkimmäinen tapahtuu kaikilla entsyymeillä hydridin siirtymisellä kofaktorille. Sen sijaan O-H-sidoksen katkaisussa on eroja erityyppisten entsyymien välillä. MDR:t sisältävät Zn-ionin, jonka positiivinen varaus edistää protonin siirtymistä seriinille. SDR:t ja AKR:t sen sijaan eivät sisällä mitään metallia, vaan positiivinen varaus muodostetaan lysiinin ja kofaktorin avulla, ja katalyyttisenä emäksenä toimii tyrosiini.

Kofaktorit ovat liian kalliita stoikiometrisiksi reagensseiksi, joten niiden kierrättäminen reaktiossa on tärkeää.<sup>29</sup> Yleinen tapa on lisätä reaktioseokseen isopropanolia, jota hapettamalla entsyymi voi kierrättää kofaktorin takaisin pelkistyneeseen muotoon. Isopropanolin lisääminen myös parantaa substraattien liukoisuutta. Haittapuolena on kuitenkin se, että reaktio on reversiibeli. Tasapainon saamiseksi haluttuun suuntaan täytyy

isopropanolia käyttää suuri ylimäärä substraattiin nähden. Tämä rajoittaa mentelmän käytön vain niihin entsyymeihin, jotka sietävät sitä suuria määriä. Toinen yleinen tapa on lisätä reaktioseokseen glukoosia ja glukosidehydrogenaasia (GDH), joka kierrättää kofaktoria.<sup>32</sup> Tämä reaktio on irreversiibeli, joten glukoosia tarvitsee käyttää vain pieni ylimäärä. Menetelmän huono puoli kuitenkin on, että olosuhteet täytyy optimoida kahdelle entsyymille sopiviksi ja sivutuotteena syntyvä glukonihappo voi alentaa seoksen pH:ta.

Vaikka vesi on entsyymien luonnollinen ympäristö, kannattaa reaktioissa yleensä käyttää myös orgaanisia liuottimia.<sup>39,40</sup> Tämä parantaa substraatin liukoisuutta ja mahdollistaa substraattikonsentraation kasvattamisen ilman että se tai tuote inhiboisivat entsyymien toimintaa. Yleensä poolittomat liuottimet, kuten heksaani, toimivat näissä kaksifaasireaktioissa poolisia paremmin. Pelkästään orgaanisessa liuotimessa reaktioita ei kannata suorittaa, koska entsyymit tarvitsevat ympärilleen vesikerroksen toimiakseen kunnolla.<sup>44</sup>

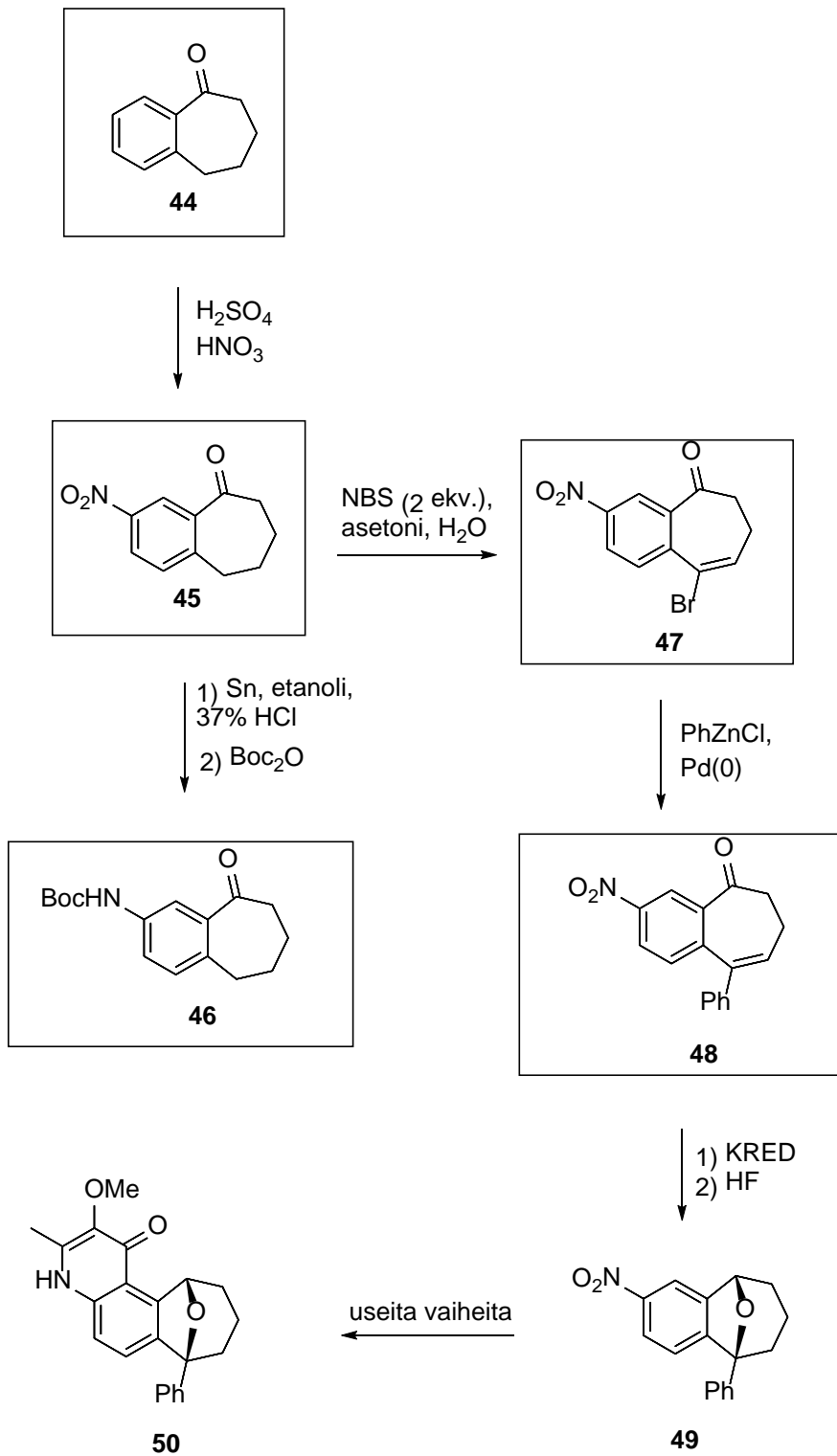
Vaikka entsyymien käyttö synteesissä on vielä melko harvinaista,<sup>5</sup> on monenlaisten ketonien pelkistystä kuitenkin tutkittu. Eniten esimerkkejä on aromaattisista ketoneista, jotka ainakin näyttäisivät pelkistyvän hyvin.<sup>84-92</sup> Muita yleisiä substraatteja ovat  $\beta$ -ketoesterit,<sup>72-78</sup> ja myös yksinkertaisten alifaattisten ketonien, kuten etyylipropyyliketonin, pelkistys onnistuu enantioselektiivisesti.<sup>13</sup>  $\alpha,\beta$ -Tyydyttymättömien ketonien pelkistyksessä ongelmana ovat kaksoissidoksen pelkistyminen ja muut mahdolliset sivureaktiot.<sup>93-95</sup> Siitä huolimatta niitäkin on pelkistetty entsyymeillä onnistuneesti.

**KOKEELLINEN OSA**

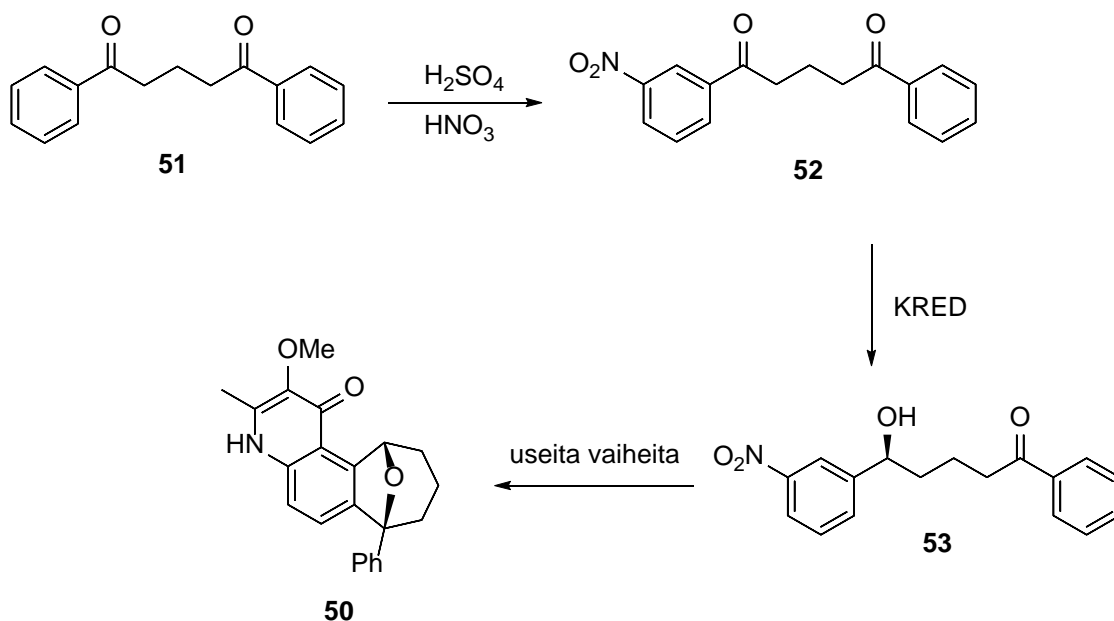
**KETOREDUKTAASIEN KÄYTTÖ  
VALTERIONI C:N SYNTEESISSÄ**

## 5 Johdanto

Työn tarkoituksena oli selvittää, voisiko ketoreduktaaseja hyödyntää valterioni C:n **50** enantioselektiivisessä synteesissä. Luonnonaineen absoluuttista konfiguraatiota ei ole määritetty, joten molemmat enantiomeerit pitäisi pystyä valmistamaan.<sup>109</sup> Mahdolliset synteesireitit on esitetty kaavioissa 44 ja 45. Bentsosuberonireitillä paras vaihe entsyymaattiseen pelkistykseen olisi yhdiste **48**, mutta pelkistys on mahdollista tehdä myös sitä ennen. Yhdistettä **46** ei suoraan voisi käyttää synteesissä, koska sen bromaus ei luultavasti onnistuisi halutulla tavalla. Sitä kuitenkin kokeiltiin, koska haluttiin tietää toimivatko entsyymit yleensäkin BocNH-ryhmän sisältävillä yhdisteillä, koska jossain vaiheessa synteesireittiä nitroryhmä kuitenkin pitää pelkistää. Reiteistä epävarmempi on diketonireitti, joka toimisi vain jos yhdiste **52** onnistuttaisiin pelkistämään selektiivisesti yhdisteeksi **53**.



**Kaavio 44.** Bentsosuberone. Ympyröity vaiheet, joissa entsyymaattinen pelkistys on mahdollinen.

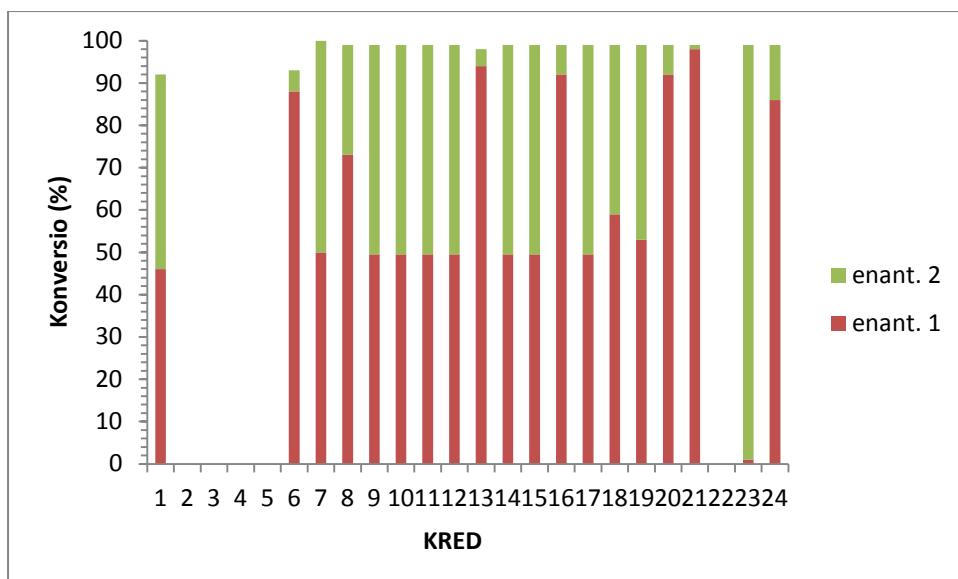


Kaavio 45. Diketonireitti.

## 6 Tulokset

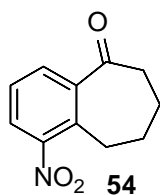
Pelkistystä kokeiltiin 24 kaupallisesti saatavalla entsyymillä, joista viisi (KRED 1-5) tarvitsevat kofaktorin kierrätykseen glukoosi/GDH-systeemin ja loput 19 (KRED 6-24) pystyvät käyttämään isopropanolia. Bentsosuberonilla **44** kokeiltiin, pystyvätkö entsyymit käyttämään tällaista 7-renkaan sisältävää substraattia. Tulokset on esitetty kuvassa 7. Suurin osa entsyymeistä toimi, vain entsyymeillä 2-5 ja 22 ei tapahtunut reaktiota ollenkaan. Suurin osa entsyymeistä tuotti raseemista tuotetta, mutta molempia enantiomeereja kuitenkin pystytään valmistamaan hyvällä selektiivisyydellä (KRED 21 ja 23, *ee* 97%).





**Kuva 7.** Yhdisteen **44** entsyymaattinen pelkistys. Enantiomeeri 1 tarkoittaa ensimmäisenä HPLC-kolonnista ulos tulevaa enantiomeeria. Olosuhteet: KRED 1-5: substraatti 4 g/l, entsyymi 10 g/l, puskuri 250 mM,  $\text{MgSO}_4$  2.0 mM,  $\text{NADP}^+$  0.82 g/l,  $\text{NAD}^+$  0.73 g/l, glukoosi 80 mM, GDH 10 U/ml, pH 7.0, lämpötila 30 °C, aika 24 h, KRED 6-24: substraatti 4 g/l, IPA 10% (v/v), entsyymi 10 g/l, puskuri 110 mM,  $\text{MgSO}_4$  1.1 mM,  $\text{NADP}^+$  0.67 g/l, pH 7.0, lämpötila 30 °C, aika 24 h.

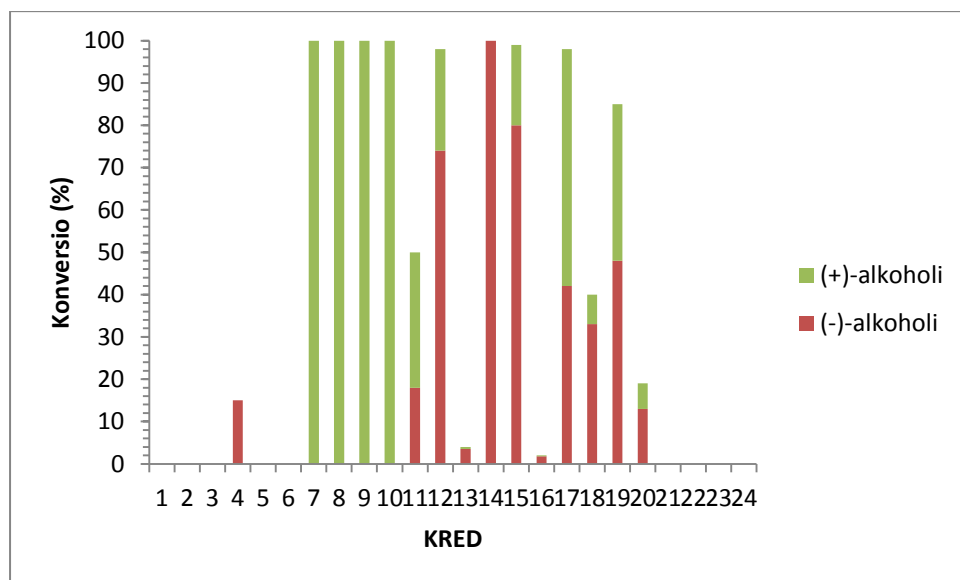
Bentsosuberoni nitrattiin rikkihapon ja typpihapon seoksella.<sup>110</sup> Kaliumnitraatilla ja rikkihapolla tapahtuva pelkistys<sup>111</sup> ei toiminut, koska ohjeessa ilmeisesti oli virhe; kaliumnitraattia pitäisi käyttää vain 1,2 ekvivalenttia, ei 12 niin kuin artikkelissa lukee. Jos reaktion tekee 12 ekvivalentilla, se ei sekoitu kunnolla, jolloin lämpötila nousee ja lähtöaine hajoo. Sivutuotteena nitrauksessa syntyi vastaavaa 6-nitroyhdistettä **54** (kaavio 46).



**Kaavio 46.** Bentsosuberonin nitrauksessa syntynyt sivutuote.

Kuvasta 8 nähdään, että entsyymit toimivat huomattavasti selektiivisemmin nitratulla yhdisteellä **45** kuin bentsosuberonilla **44**. Molempia enantiomeereja voidaan tuottaa >99%:n *ee*:llä. Parhaiten toimineilla entsyymeillä kokeiltiin entsyymien määrän ja ajan puolittamista (taulukko 1). Jostain syystä KRED 8 ei enää toiminutkaan yhtä selektiivisesti kuin muut entsyymit. Paras konversio saatiin KRED 7:llä, joten se valittiin KRED 14:n lisäksi toiseksi

entsyymiksi, kun molempia enantiomeereja tuotettiin vähän isommassa mittakaavassa. Reaktioiden skaalaaminen onnistui helposti ja molempia enantiomeereja valmistettiin 15 mg:n (substraattikonsentraatio 32 g/l) mittakaavassa (*ee* 97% (-)- ja *ee* >99% (+)-alkoholi, saannot vastaavasti 84 ja 93%).



**Kuva 8.** Yhdisteen **45** entsyymaattinen pelkistys. Olosuhteet: KRED 1-5: substraatti 5 g/l, DMSO 5% (v/v), entsyymi 10 g/l, puskuri 240 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.9 mM, NADP<sup>+</sup> 0.78 g/l, NAD<sup>+</sup> 0.69 g/l, glukoosi 76 mM, GDH 9.5 U/ml, pH 7.0, lämpötila 30 °C, aika 24 h, KRED 6-24: substraatti 5 g/l, DMSO 5% (v/v), IPA 5% (v/v), entsyymi 10 g/l, puskuri 110 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.1 mM, NADP<sup>+</sup> 0.67 g/l, pH 7.0, lämpötila 30 °C, aika 24 h

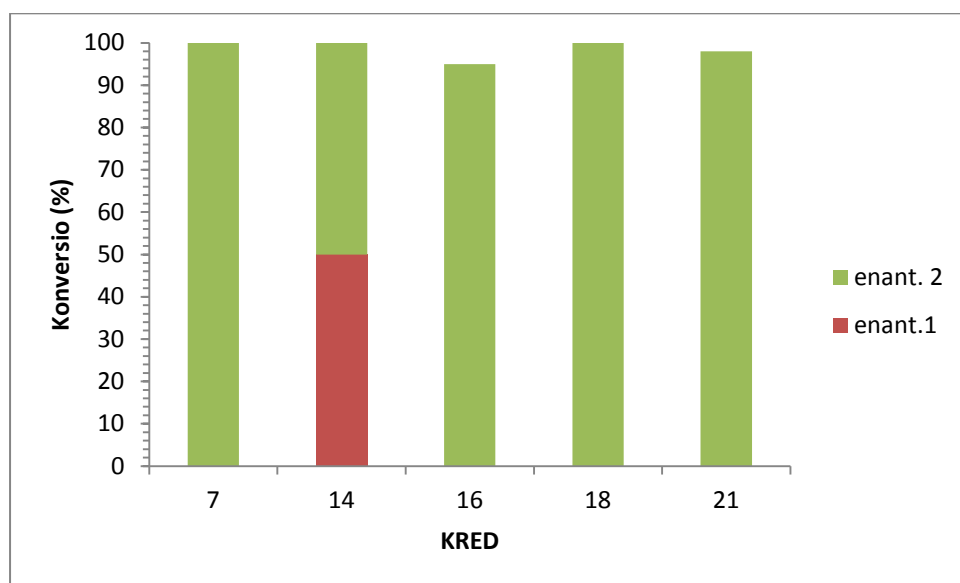
**Taulukko 1.** Entsyymireaktioiden optimointi yhdisteellä **45**.

ENTSYYMI	<i>ee</i> (%)	konversio (%)
KRED 7	99	98
KRED 8	84	89
KRED 9	99	88
KRED 10	99	85
KRED 14	99	93

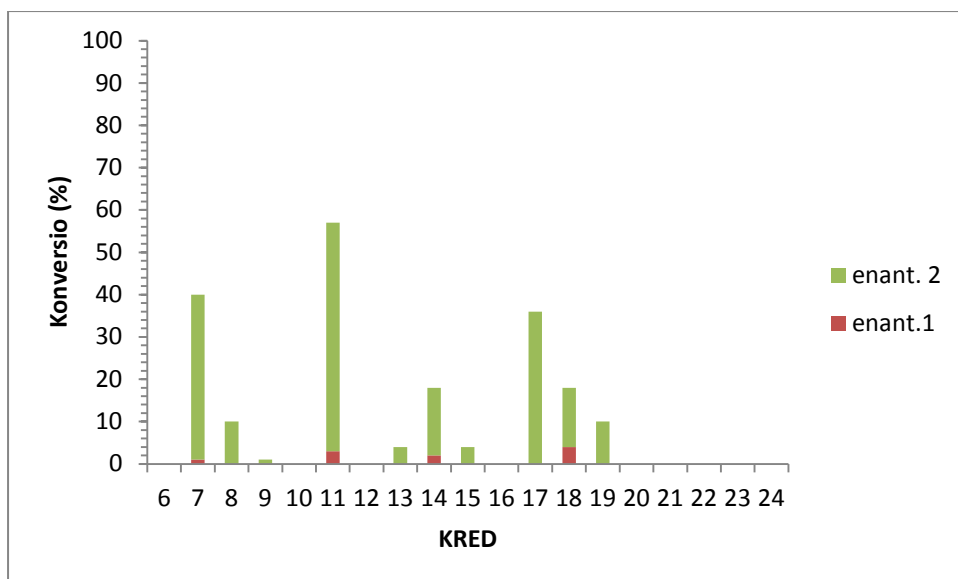
Olosuhteet: substraatti 4 g/l, 2% DMSO, 10% IPA, entsyymi 5 g/l, puskuri 110 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.1 mM, NADP<sup>+</sup> 0.66 g/l, pH 7.0, lämpötila 30 °C, aika 13h

Yhdistettä **46** yritettiin valmistaa Pd/C-vedytyksellä Boc<sub>2</sub>O:n läsnäollessa, mutta tällöin myös ketoni pelkistyi alkoholiksi. Tinapelkistyksellä (kaavio 44) vastaavaa ongelmaa ei ollut, vaan haluttua tuotetta **46** saatiin 63%:n saannolla. Pelkistystä kokeiltiin vain viidellä entsyymillä (KRED 8, 13, 14, 18 ja 21), koska ainetta oli niin vähän. Vain KRED 8 toimi, mutta sillä saatiin hyvä selektiivisyys (*ee* 98%). Tarkkaa konversiota ei määritetty, mutta HPLC:n perusteella se oli kuitenkin surkea. Yhdiste **46** ei siis ole hyvä substraatti.

Yhdisteiden **47** ja **48** tulokset on esitetty kuvissa 9 ja 10. Yhdiste **47** pelkistyi erittäin selektiivisesti (*ee* >99%) täydellä konversiolla, mutta vain toista enantiomeeria pystytään valmistamaan. Yhdiste **48** taas näyttäisi olevan liian iso substraatti, koska reaktiot eivät sillä etene kovinkaan pitkälle 20 tunnissa. Paras konversio (57%) saadaan KRED 11:lla, mutta sillä selektiivisyys ei ole niin hyvä (*ee* 90%). KRED 7 ja 17:lla (konversiot 40 ja 36%, *ee*:t 96 ja >99%) reaktiota voisi optimoida nostamalla lämpötilaa ja pidentämällä aikaa. Tässäkin kuitenkin vain toista enantiomeeria voidaan tuottaa.



**Kuva 9.** Yhdisteen **47** entsyymaattinen pelkistys. Enantiomeeri 1 tarkoittaa ensimmäisenä HPLC-kolonnista ulos tulevaa enantiomeeria. Olosuhteet: substraatti 7.4 g/l, DMSO 12% (v/v), IPA 10% (v/v), entsyymi 5 g/l, puskuri 98 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.98 mM, NADP<sup>+</sup> 0.58 g/l, pH 7.0, lämpötila 30 °C, aika 20h. KRED 16 ja 21:n konversioita ei tiedetä tarkasti. Kuvassa näkyvät konversiot on laskettu olettaen, että lähtöaineen ja tuotteen vasteet HPLC:lla ovat samat. Muissa tapauksissa lähtöaineen vaste on ollut suurempi, joten voisi sanoa, että konversiot ovat vähintään kuvassa näkyvät.



**Kuva 10.** Yhdisteen **48** entsyymaattinen pelkistys. Enantiomeeri 1 tarkoittaa ensimmäisenä HPLC-kolonnista ulos tulevaa enantiomeeria. Olosuhteet: substraatti 7.2 g/l, DMSO 12% (v/v), IPA 10% (v/v), entsyymi 5 g/l, puskuri 98 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.98 mM, NADP<sup>+</sup> 0.58 g/l, pH 7.0, lämpötila 30 °C, aika 20h. HPLC: Chiralpak IC, 85:15 Hex/IPA, 1 ml/min, 254 nm, t<sub>r</sub>(1) = 8.8 min, t<sub>r</sub>(2) = 9.5 min.

Diketonireitti ei toiminut, vaan yhdisteen **52** pelkistyksessä jo lyhyen reaktioajan jälkeen oli muodostunut vastaavaa diolia. Lämpötilan laskeminen 10 °C:een ei auttanut, vaan tulos oli sama.

Johtopäätöksenä voidaan todeta, että ketoreduktaaseja pystyy käyttämään valterioni C:n **50** enantioselektiivisessä synteesissä. Synteesin kannalta paras olisi tehdä pelkistys yhdisteelle **47** tai **48**. Näistä helpommin skaalattavissa näyttäisi olevan **47**. Sillä myös pitäisi kokeilla useampia entsyymejä, jotta selviäisi voidaanko toistakin enantiomeeria valmistaa. Yhdisteestä **45** voidaan selektiivisesti tuottaa molempia enantiomeereja ja reaktio on myös helposti skaalattavissa.

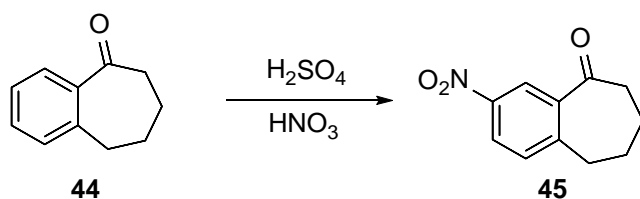
## 7 Kokeelliset menetelmät

### 7.1 Yleistä

Entsyymikokeissa tehtiin 24 ketoreduktaasia sisältävällä Codex<sup>®</sup> KRED Screening Kit:lla. Substraatit **47**, **48** ja **52** saatiin muilta ryhmän jäseniltä. HPLC-analyyseissa käytettiin Waters 501-pumppu, Waters 486 -detektoria ja Chiralpak AY-H ja IC -kolonneja. Sulamispisteet määritettiin Stuart SMP3 -sulamispistelaiteella. <sup>1</sup>H NMR ja <sup>13</sup>C NMR-spektrit mitattiin CDCl<sub>3</sub>:ssa Bruker Avance 300-spektrometrilla. Kiertokulmat mitattiin Perkin-Elmer 343 -polarimetrilla.

### 7.2 Substraattien synteesi

#### 3-nitro-6,7,8,9-tetrahydro-5H-bentso[7]annulen-5-oni (**45**)

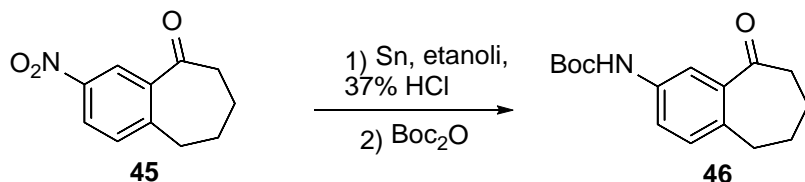


Bentsosuberonin **44** (960 mg, 6.0 mmol, 0.9 ml) ja väkevän rikkihapon (1.8 ml) seos jäädytettiin jää/suola-hauteella -5 °C:een. Väkevän rikkihapon (0.72 ml) ja 65% typpihapon (7.8 mmol, 0.54 ml) seos lisättiin hitaasti 30 min aikana niin, että reaktioseoksen sisälämpötila pysyi koko ajan alle 0 °C:ssa. Heti lisäyksen jälkeen kolviin kaadettiin 30 g jäätä, 20 ml kylmää vettä ja 20 ml eetteriä sisältävä seos ja sekoitettiin 10 minuuttia. Reaktioseos uutettiin 40 ml:lla Et<sub>2</sub>O/EtOAc 1:1 seosta. Orgaaninen faasi pestiin NaHCO<sub>3</sub>:lla, kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla, suodatettiin ja haihdutettiin. Raakatuote puhdistettiin pylvällä (20 → 30% EtOAc heksaanissa), jolloin saatiin tuotetta **45** kellertävänä kiinteänä aineena (770 mg, 64%).

sp = 91-94 °C (kirjallisuudessa<sup>111</sup> 89-90 °C); <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.55 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz), 8.25 (dd, 1H, *J* = 8.3, 2.5 Hz), 7.39 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 3.04 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz), 2.80

(t, 2H,  $J = 5.8$  Hz), 1.99-1.83 (m, 4H); Spektri vastaa kirjallisuudessa<sup>111</sup> esitettyä spektriä. Liite 1:  $^1\text{H}$  NMR -spektri.

***tert*-butyyli(9-oxo-6,7,8,9-tetrahydro-5H-bentso[7]annulen-2-yyli)karbamaatti (46)**

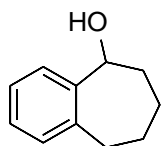


Ketonin **45** (50 mg, 0.25 mmol), etanolin (1.3 ml), 37% HCl:n (1.3 ml) ja tinajauheen (90 mg, 0.75 mmol) seosta sekoitettiin 30 min 72 °C:ssa. Lisättiin 5 ml eetteriä ja 30% NaOH:ia, kunnes pH oli emäksinen. Kerrokset erotettiin toisistaan erotussuppilossa ja eetterikerros pestiin suolavedellä, kuivattiin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:lla, suodatettiin ja haihdutettiin. Tuote liuotettiin etyyliiasetaattiin (1 ml) ja etanoliin (0.3 ml) ja lisättiin Boc-anhydridia (220 mg, 1.0 mmol). Seoksen annettiin sekoittua yön yli, liuottimet haihdutettiin ja raakatuote puhdistettiin pylväällä (heksaani/EtOAc 90:10), jolloin saatiin tuotetta **46** (44 mg, 63%).

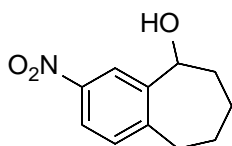
sp = 154-157 °C;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.64 (d, 1H,  $J = 7.5$  Hz), 7.49 (d, 1H,  $J = 2.5$  Hz), 7.14 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz), 6.47 (br s, 1H), 2.88 (t, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 2.71 (t, 2H,  $J = 5.2$  Hz), 1.87-1.78 (m, 4H), 1.52 (s, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  205.6, 152.9, 139.4, 137.3, 136.2, 130.8, 122.7, 118.7, 41.0, 32.1, 28.5, 25.5, 21.1; Liite 2:  $^1\text{H}$  NMR -spektri, Liite 3:  $^{13}\text{C}$  NMR -spektri.

### 7.3 Rasemaattien synteesi

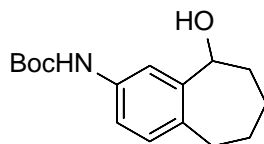
Ketonin ja metanolin 0.3 M liuos jäähdytettiin 0 °C:een. NaBH<sub>4</sub>:n vesiliuos (4.4 M) lisättiin ja reaktiota sekoitettiin noin 5 min 0 °C:ssa. Tämän jälkeen lämpötila nostettiin huoneenlämpöön ja sekoittamista jatkettiin, kunnes lähtöaine oli kulunut (seurattiin TLC:lla). Tavallisesti tähän meni noin 20 min. Seokseen lisättiin kuumaa vettä, jolloin se muuttui sameaksi. Seos uutettiin DCM:lla ja haihdutettiin. Tuotteita käytettiin entsyymireaktioiden vertailuaineina ilman lisäpuhdistusta.

**6,7,8,9-tetrahydro-5H-bentso[7]annulen-5-oli (55)**

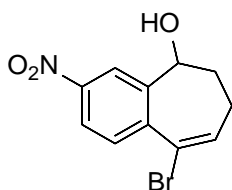
sp = 103-105 °C;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.44 (d, 1H,  $J = 7.1$  Hz), 7.24-7.08 (m, 3H), 4.95-4.93 (m, 1H), 2.97-2.68 (m, 2H), 2.11-1.72 (m, 6H); Spektri vastaa kirjallisuudessa<sup>112</sup> esitettyä spektriä. HPLC: Chiralpak AY-H, 90:10 Hex/IPA, 1 ml/min, 254 nm,  $t_r(1) = 5.4$  min,  $t_r(2) = 5.7$  min, Liite 4:  $^1\text{H NMR}$  -spektri.

**3-nitro-6,7,8,9-tetrahydro-5H-bentso[7]annulen-5-oli (56)**

sp = 114-116 °C (kirjallisuudessa<sup>113</sup> 115-117 °C);  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.40 (d, 1H,  $J = 2.3$  Hz), 8.00 (dd, 1H,  $J = 8.2, 2.4$  Hz), 7.23 (d, 1H,  $J = 8.3$  Hz), 5.02-4.97 (m, 1H), 3.03-2.74 (m, 2H), 2.12-2.00 (m, 2H), 1.93-1.69 (m, 4H); Spektri vastaa kirjallisuudessa<sup>113</sup> esitettyä spektriä. HPLC: Chiralpak AY-H, 85:15 Hex/IPA, 1 ml/min, 254 nm,  $t_r(1) = 10.4$  min,  $t_r(2) = 12.4$  min; Liite 5:  $^1\text{H NMR}$  -spektri.

**tert-butyyl-(9-hydroksi-6,7,8,9-tetrahydro-5H-bentso[7]annulen-2-yyli)karbamaatti (57)**

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.39 (d, 1H,  $J = 2.2$  Hz), 7.18 (dd, 1H,  $J = 8.0, 2.3$  Hz), 7.01 (d, 1H,  $J = 8.1$  Hz), 6.42 (br s, 1H), 4.90-4.87 (m, 1H), 2.89-2.61 (m, 2H), 2.07-1.89 (m, 2H), 1.85-1.70 (m, 4H), 1.51 (s, 9H); HPLC: Chiralpak AY-H, 85:15 Hex/IPA, 1 ml/min, 254 nm,  $t_r(1) = 7.0$  min,  $t_r(2) = 7.7$  min; Liite 6:  $^1\text{H NMR}$  -spektri.

**9-bromi-3-nitro-6,7-dihydro-5H-bentso[7]annulen-5-oli (58)**

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.57 (d, 1H,  $J = 2.4$  Hz), 8.18 (dd, 1H,  $J = 8.6, 2.4$  Hz), 7.73 (d, 1H,  $J = 8.5$  Hz), 6.82 (dd, 1H,  $J = 6.3, 8.5$  Hz), 4.98-4.91 (m, 1H), 2.73-2.63 (m, 1H), 2.19-1.99 (m, 3H); HPLC: Chiralpak AY-H, 85:15 Hex/IPA, 1 ml/min, 254 nm,  $t_r(1) = 8.9$  min,  $t_r(2) = 9.5$  min; Liite 7:  $^1\text{H}$  NMR -spektri.

**7.4 Entsyymireaktiot**

KRED 1-5, substraatit **44** ja **45**

Noin 5.0 mg entsyymiä punnittiin vialiin. KRED Recycle Mix N (150 mg) liuotettiin veteen (3 ml)<sup>a</sup> ja liuokseen lisättiin noin 0.3 mmol substraattia. Jos substraatti ei liuennut, lisättiin liuokseen myös DMSO:a (0.12 ml). Reaktio käynnistettiin lisäämällä 0.5 ml tätä liuosta vialiin, jossa on entsyymiä. Reaktiota sekoitettiin 24 h 30 °C:ssa, minkä jälkeen lisättiin 0.5 ml heksaani/IPA 90:10-liuosta. Seos siirrettiin Eppendorf-putkeen ja sentrifugoitiin. Orgaaninen faasi erotettiin, suodatettiin HPLC-vialiin ja analysoitiin HPLC:lla.

a = tällä tavalla tehty liuos sisältää: kaliumfosfaattia 250 mM, magnesiumsulfaattia 2 mM,  $\text{NADP}^+$  1.1 mM,  $\text{NAD}^+$  1.1 mM, D-glukoosia 80 mM, GDH 10 U/ml, pH 7.0

KRED 6-24, substraatit **44-46**

Noin 5 mg entsyymiä punnittiin vialiin. KRED Recycle Mix P<sup>b</sup> (300 mg) liuotettiin veteen (10 ml)<sup>b</sup> ja noin 1.0 mmol substraattia liuotettiin isopropanoliin (2 ml). Jos substraatti ei liennut, lisättiin substraattiliuokseen myös DMSO:a (0.5 ml). Reaktio käynnistettiin lisäämällä 0.45 ml puskuriliuosta ja 50  $\mu\text{l}$  substraattiliuosta vialiin, jossa on entsyymiä.



Reaktiota sekoitettiin 20-24 h 30 °C:ssa, minkä jälkeen lisättiin 0.5 ml heksaani/IPA 90:10 -liuosta. Seos siirrettiin Eppendorf-putkeen ja sentrifugoitiin. Orgaaninen faasi erotettiin, suodatettiin HPLC-vialiin ja analysoitiin HPLC:lla.

b = tällä tavalla tehty liuos sisältää: kaliumfosfaattia 125 mM, magnesiumsulfaattia 1.25 mM, NADP<sup>+</sup> 1.0 mM, pH 7.0

#### KRED 6-24, substraatit **47** ja **48**

Noin 2.5 mg entsyymiä punnittiin vialiin ja liuotettiin 0.19 ml:aan KRED Recycle Mix P -liuosta (valmistettu yllä mainitulla tavalla). Substraatti (0.013 mmol) liuotettiin 60 µl:aan DMSO:a ja 50 µl:aan IPA:a ja 0.19 ml KRED Recycle Mix P -liuosta lisättiin. Reaktio käynnistettiin lisäämällä entsyymiliuos substraattiliuokseen. Reaktiota sekoitettiin 20 h 30 °C:ssa, minkä jälkeen lisättiin 0.5 ml heksaani/IPA 85:15 -liuosta. Seos siirrettiin Eppendorf-putkeen ja sentrifugoitiin. Orgaaninen faasi erotettiin, suodatettiin HPLC-vialiin ja analysoitiin HPLC:lla.

#### KRED 7 ja 14, skaalaus substraatilla **45**

Noin 2.5 mg entsyymiä punnittiin vialiin ja liuotettiin 0.13 ml:aan KRED Recycle Mix P -liuosta (valmistettu yllä mainitulla tavalla). Substraatti **45** (16 mg, 0.08 mmol) liuotettiin 40 µl:aan DMSO:a ja 0.2 ml IPA:a ja 0.13 ml KRED Recycle Mix P -liuosta lisättiin. Reaktio käynnistettiin lisäämällä entsyymiliuos substraattiliuokseen. Reaktiota sekoitettiin 45 h 30 °C:ssa, minkä jälkeen se siirrettiin erotussuppiloon ja uutettiin eetterillä. Orgaaninen faasi kuivattiin ja haihdutettiin, jolloin tuotteena saatiin enantiopuhdasta (+)- tai (-)-alkoholia **56**.

(-)-**56**:  $sp = 100-102$  °C,  $[\alpha]_D = -31.0$  ( $c$  0.0078, DCM), HPLC: Chiralpak AY-H, 85:15 Hex/IPA, 1 ml/min, 254 nm,  $t_r = 10.4$  min.

(+)-**56**:  $sp = 100-102$  °C,  $[\alpha]_D = +26.7$  ( $c$  0.0091, DCM), HPLC: Chiralpak AY-H, 85:15 Hex/IPA, 1 ml/min, 254 nm,  $t_r = 12.4$  min.

## Kirjallisuusviitteet

1. D. Munos Solano, P.Hoyos, M.J.Hernáiz, A.R. Alcántara ja J.M. Sánchez-Montero, *Biores. Technol.*, **2012**, *115*, 196-207
2. G.W. Huisman ja S.J. Collier, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2013**, *17*, 284-292
3. T. Matsuda, R. Yamanaka ja K. Nakamura, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, *20*, 513-557
4. R.M. Patel, *Biomolecules*, **2013**, *3*, 741-777
5. M.M. Musa ja R.S. Phillips, *Catal. Sci. Technol.*, **2011**, *1*, 1311-1323
6. J.C. Moore, D.J. Pollard, B. Kosjek ja P.N. Devine, *Acc. Chem. Res.*, **2007**, *40*, 1412-1419
7. K. Nakamura, R. Yamanaka, T. Matsuda ja T. Harada, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, *14*, 2659-2681
8. R. Noyori ja T. Okhuma, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 40-73
9. E.J. Corey, R.K. Bakshi ja S. Shibata, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 5551-5553
10. E.J. Corey, R.K. Bakshi, S. Shibata, C.P. Chen ja V.K. Singh, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 7925-7926
11. K. Noyori ja S. Hashiguchi, *Acc. Chem. Res.*, **1997**, *30*, 97-102
12. X. Wu, J. Liu, D.D. Tommaso, J.A. Iggo, C.R.A. Catlow, J. Bacsá ja J. Xiao, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 7699-7715
13. T. Matsuda, Y. Nakajima, T. Harada ja K. Nakamura, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, *13*, 971-974
14. P.A. Frey ja A.D. Hegeman, *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, USA, **2007**, pp 679-694
15. M. Kokkinidis, N.M. Glykos ja V.E. Fadoulglou, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, **2012**, *87*, 181-218
16. S. Baskar Raj, S. Ramaswamy ja B.V. Plapp, *Biochemistry*, **2014**, *53*, 5791-5803
17. J.K. Rubach, S. Ramaswamy ja B.V. Plapp, *Biochemistry*, **2001**, *40*, 12686-12694
18. S. Ramaswamy, D.H. Park ja B.V. Plapp, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 13951-13959
19. B.V. Plapp ja S. Ramaswamy, *Biochemistry*, **2012**, *51*, 4035-4048
20. U. Oppermann, C. Filling, M. Hult, N. Shafqat, X. Wu, M. Lindh, J. Shafqat, E. Nordling, Y. Kallberg, B. Persson ja H. Jörnvall, *Chem. Biol. Interact.*, **2003**, *143-144*, 247-253
21. S. Kamitori, A. Iguchi, A. Ohtaki, M. Yamada ja K. Kita, *J. Mol. Biol.*, **2005**, *352*, 551-558
22. E. Maser, G. Xiong, C. Grimm, R. Ficner ja K. Reuter, *Chem. Biol. Interact.*, **2001**, *130-132*, 707-722

23. H. Jörnvall, B. Persson, M. Krook, S. Atrian, R. Gonzales-Duarte, J. Jeffery ja D. Ghosh, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 6003-6013
24. Z.Q. Ren, Y. Liu, X.Q. Pei, H.B. Wang ja Z.L. Wu, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2015**, *113*, 76-81
25. S. Morikawa, T. Nakai, Y. Yasohara, H. Nanba, N. Kizaki ja J. Hasegawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2005**, *69*, 544-552
26. M. Katzberg, N. Skorua-Parachin, M.F. Gorwa-Grauslund ja M. Bertau, *Int. J. Mol. Sci.*, **2010**, *11*, 1735-1758
27. T.M. Penning, *Chem. Biol. Interact.*, **2015**, *234*, 236-246
28. W. Hussain, D.J. Pollard, M. Truppo ja G.J. Lye, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2008**, *55*, 19-29
29. W. Hummel ja H. Gröger, *J. Biotech.*, **2014**, *191*, 22-31
30. W. Hummel, *TiBTech*. **1999**, *17*, 487-492
31. D. Monti, G. Ottolina, G. Carrea, ja S. Riva, *Chem. Rev.*, **2011**, *111*, 4111-4140
32. B.H. Hoff ja E. Sundby, *Bioorg. Chem.*, **2013**, *51*, 31-47
33. M. Takeda, S. Anamizu, S. Motomatsu, X. Chen ja R. Thapa Chhetri, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2014**, *78*, 1879-1886
34. S. Leuchs, S. Naammieh ja L. Greiner, *Green Chem.*, **2013**, *15*, 167-176
35. W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger ja K. Faber, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2004**, *8*, 120-126
36. D.E. Torres Pazmino, R. Snajdrova, B.J. Baas, M. Ghobrial, M.D. Mihovilovic ja M.W. Fraaije, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2275-2278
37. D.E. Torres Pazmino, A. Riebel, J. de Lange, F. Rudolf, M.D. Mihovilovic ja M.W. Fraaije, *ChemBioChem*, **2009**, *10*, 2595-2598
38. K. Nakamura ja R. Yamanaka, *Chem. Commun.*, **2002**, 1782-1783
39. A.M. Klibanov, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, *14*, 427-431
40. S. Bräutigam, D. Dennewald, M. Schürmann, J. Lutje-Spelberg, W.R. Pitner ja D. Weuster-Botz, *Enzyme Microb. Technol.*, **2009**, *45*, 310-316
41. H. Gröger, W. Hummel, S. Buchholz, K. Drauz, T. Van Nguyen, C. Rollmann, H. Husken ja K. Abokitse, *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 173-176
42. K. Nakamura, M. Fujii ja Y. Ida, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2000**, *1*, 3205-3211
43. Y. Yasohara, N. Kizaki, J. Hasegawa, M. Wada, M. Kataoka ja S. Shimizu, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, *12*, 1713-1718
44. A.M. Klibanov, *TiBTech*, **1997**, *15*, 97-101
45. C. Laane, S. Boeren ja K. Vos, *TiBTech*, **1985**, *3*, 251-252

46. Y.N. Li, X.A. Shi, M.H. Zong, C. Meng, Y.Q. Dong ja Y.H. Guo, *Enzyme Microb. Technol.*, **2007**, *40*, 1305-1311
47. G. de Gonzalo, I. Lavandera, K. Faber ja W. Kroutil, *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 2163-2166
48. M.H. Wermüe ja J. Tramper, *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 345-373
49. V.Y. Mozhaev, Y.L. Khmel'nitsky, M.V. Sergeeva, A.B. Belova, M.L. Klyachko, A.V. Levashov ja K. Martinek, *Eur. J. Biochem.*, **1989**, *184*, 597-602
50. M. Villela Filho, T. Stillger, M. Müller, A. Liese ja C. Wandrey, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 2993-2996
51. H. Hirakawa, N. Kamiya, Y. Kawarabayashi ja T. Nagamune, *Biochim. Biophys. Acta*, **2005**, *1748*, 94-99
52. T. Matsuda, Y. Yamagishi, S. Koguchi, N. Iwai ja T. Kitazume, *Tetrahedron Letters*, **2006**, *47*, 4619-4622
53. H. Pfruenden, R. Jones ja D. Weuster-Botz, *J. Biotech.*, **2006**, *124*, 182-190
54. W. Wang, M.H. Zong ja W.Y. Lou, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2009**, *56*, 70-76
55. X. Ju, Y. Sun, L. Xue, X. Huang ja Y. Qu, *Top. Catal.*, **2014**, *57*, 923-934
56. T. Harada, Y. Kubota, T. Kamitanaka, K. Nakamura ja T. Matsuda, *Tetrahedron Letters*, **2009**, *50*, 4934-4936
57. T. Matsuda, K. Watanabe, T. Harada ja K. Nakamura, *Catalysis Today*, **2004**, *96*, 103-111
58. T. Matsuda, K. Watanabe, T. Kamitanaka, T. Harada ja K. Nakamura, *Chem. Commun.*, **2003**, 1198-1199
59. R.S. Phillips, *TiBTech*, **1996**, *14*, 13-16
60. D. Zhu, B.A. Hyatt ja L. Hua, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2009**, *56*, 272-276
61. T.C. Rosen, R. Feldmann, P. Dünkemann ja T. Daußmann, *Tetrahedron Letters*, **2006**, *47*, 4803-4806
62. N. Richter ja W. Hummel, *Enzyme Microb. Technol.*, **2011**, *48*, 472-479
63. F. Secundo ja R.S. Phillips, *Enzyme Microb. Technol.*, **1996**, *19*, 487-492
64. E. Keinan, E.K. Hafeli, K.K. Seth ja R. Lamed, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 162-169
65. C. Gao, L. Zhang, Y. Xie, C. Hu, Y. Zhang, L. Li, Y. Wang, C. Ma ja P. Xu, *Biores. Technol.*, **2013**, *137*, 111-115
66. N. Itoh, M. Nakamura, K. Inoue ja Y. Makino, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2007**, *75*, 1249-1256
67. T. Yang, Z. Man, Z. Rao, M. Xu, X. Zhang ja Z. Xu, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **2014**, *41*, 1743-1752
68. M. Müller, M. Katzberg, M. Bertau ja W. Hummel, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 1540-1550

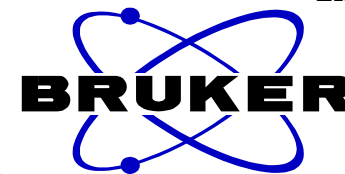
69. K. Edegger, W. Stampfer, B. Seisser, K. Faber, S.F. Mayer, R. Oehrlein, A. Hafner ja W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 1904-1909
70. M. Wada, A. Yoshizumi, Y. Noda, M. Kataoka, S. Shimizu, H. Takagi ja S. Nakamori, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2003**, *69*, 933-937
71. D. Zhu, J.E. Stearns, M. Ramirez ja L. Hua, *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 4535-4539
72. D. Zhu, C. Mukherjee, J.D. Rozzell, S. Kambourakis ja L. Hua, *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 901-905
73. S. Shimizu, M. Kataoka ja K. Kita, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **1998**, *5*, 321-325
74. R.C. Simon, F.G. Mutti ja W. Kroutil, *Drug Discov. Today Technol.*, **2013**, *10*, 37-44
75. L.J. Wang, C.X. Li, Y. Ni, J. Zhang, X. Liu ja J.H. Xu, *Biores. Technol.*, **2011**, *102*, 7023-7028
76. Z.Q. Liu, J.J. Ye, Z.Y. Shen, H.B. Hong, J.B. Yan, Y. Lin, Z.Q. Chen, Y.G. Zheng ja J.C. Shen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2015**, *99*, 2119-2129
77. Y. Ni, C.X. Li, L.J. Wang, J. Zhang ja J.H. Xu, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 5463-5468
78. S. Shanmuganathan, D. Natalia, L. Greiner ja P. Domínguez de María, *Green. Chem.*, **2012**, *14*, 94-97
79. M. Wolberg, M. Villela Filho, S. Bode, P. Geilenkirchen, R. Feldmann, A. Liese, W. Hummel ja M. Müller, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **2008**, *31*, 183-191
80. M. Wolberg, W. Hummel ja M. Müller, *Chem. Eur. J.*, **2001**, *7*, 4562-4571
81. D. Zhu, H.T. Malik ja L. Hua, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, *17*, 3010-3014
82. D. Zhu, Y. Yang ja L. Hua, *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 4202-4205
83. G. Krix, A.S. Bommarius, K. Drauz, M. Kottenhahn, M. Schwarm ja M.R. Kula, *J. Biotechnol.*, **1997**, *53*, 29-39
84. N. Itoh, M. Mizuguchi ja M. Mabuchi, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **1999**, *6*, 41-50
85. W. Yang, J.H. Xu, Y. Xie, Y. Xu, G. Zhao ja G.Q. Lin, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, *17*, 1769-1774
86. P. Vitale, C. D'Introno, F.M. Perna, M.G. Perrone ja A. Scilimati, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2013**, *24*, 389-394
87. Y. Liu, T.X. Tang, X.Q. Pei, C. Zhang ja Z.L. Wu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2014**, *102*, 1-8
88. T.X. Tang, Y. Liu ja Z.L. Wu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2014**, *105*, 82-88
89. D. Zhu, C. Mukherjee ja L. Hua, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, *16*, 3275-3278
90. B. Barkakaty, Y. Takaguchi ja S. Tsuboi, *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 970-976
91. G.C. Xu, H.L. Yu, X.Y. Zhang ja J.H. Xu, *ACS Catal.*, **2012**, *2*, 2566-2571

92. K. Matsuo, S. Kawabe, Y. Tokuda, T. Eguchi, R. Yamanaka ja K. Nakamura, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, *19*, 157-159
93. A. Hage, D.G.I. Petra, J.A. Field, D. Schipper, J.B.P.A. Wijnberg, P.C.J. Kamer, J.N.H. Reek, P.W.N.M. van Leeuwen, R. Wever ja H.E. Schoemaker, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, *12*, 1025-1034
94. R. van Deursen, W. Stampfer, K. Edegger, K. Faber ja W. Kroutil, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004**, *31*, 159-163
95. Y.C. Liu, Y. Liu ja Z.L. Wu, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 2146-2152
96. C. Heiss ja R.S. Phillips, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2000**, *1*, 2821-2825
97. B.B. Zhang, W.Y. Lou, M.H. Zong ja H. Wu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2008**, *54*, 122-129
98. M. Krauß, W. Hummel ja H. Gröger, *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, 5175-5179
99. B. Kosjek, D.M. Tellers, M. Biba, R. Farr ja J.C. Moore, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, *17*, 2798-2803
100. J. Kulig, R.C. Simon, C.A. Rose, S.M. Husain, M. Häckh, S. Lüdeke, K. Zeitler, W. Kroutil, M. Pohl ja D. Rother, *Catal. Sci. Technol.*, **2012**, *2*, 1580-1589
101. I. Lavandera, A. Kern, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, S. de Wildeman ja W. Kroutil, *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 6003-6005
102. D. Acetti, E. Brenna, C. Fuganti, F.C. Gatti ja S. Serra, *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, 142-151
103. M. Heidlindemann, G. Rulli, A. Berkessel, W. Hummel ja H. Gröger, *ACS Catal.*, **2014**, *4*, 1099-1103
104. A. Berkessel, C. Rollmann, F. Chamouleau, S. Labs, O. May ja H. Gröger, *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, *349*, 2697-2704
105. J.S. Yadav, G.S.K.K. Reddy, G. Sabitha, A.D. Krishna, A.R. Prasad, H.U.R. Rahaman, K.W. Rao ja A.B. Rao, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, *18*, 717-723
106. S. Borchert, E. Burda, J. Schatz, W. Hummel ja H. Gröger, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2012**, *84*, 89-93
107. E. Burda, W. Bauer, W. Hummel ja H. Gröger, *ChemCatChem*, **2010**, *2*, 67-72
108. K. Nakamura, T. Matsuda, M. Shimizu ja T. Fujisaw, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 8393-8402
109. Erwin, A. Noor, N.H. Soekamto, I van Altena ja Y.M. Syah, *Biochem. Syst. Ecol.*, **2014**, *55*, 358-361
110. B.B. Corson ja R.K. Hazen, *Org. Synth.*, **1930**, *10* 74
111. G. Murineddu, S. Ruiu, G. Loriga, I. Manca, P. Lazzari, R. Reali, L. Pani, L. Toma ja G.A. Pinna, *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 7351-7362
112. M. Bietti, O. Lanzalunga ja M. Salamone, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 1417-1422

113. D.E. Lizos, C. McKerchar, J. Murphy, Y. Shiigi, C. Suckling, H. Yasumatsu, S. Zhou, J. Pratt ja B. Morris, Compounds having serotonin 5-HT<sub>17</sub> receptor antagonist activity and muscarinic M<sub>4</sub> receptor agonist activity and their use in the treatment of psychotic disorders, *US Pat.*, 10/551,138, 2006.

KK-227  
CDCl3 30 deg  
proton, 300MHz  
May 06, 2016

LIITE 1



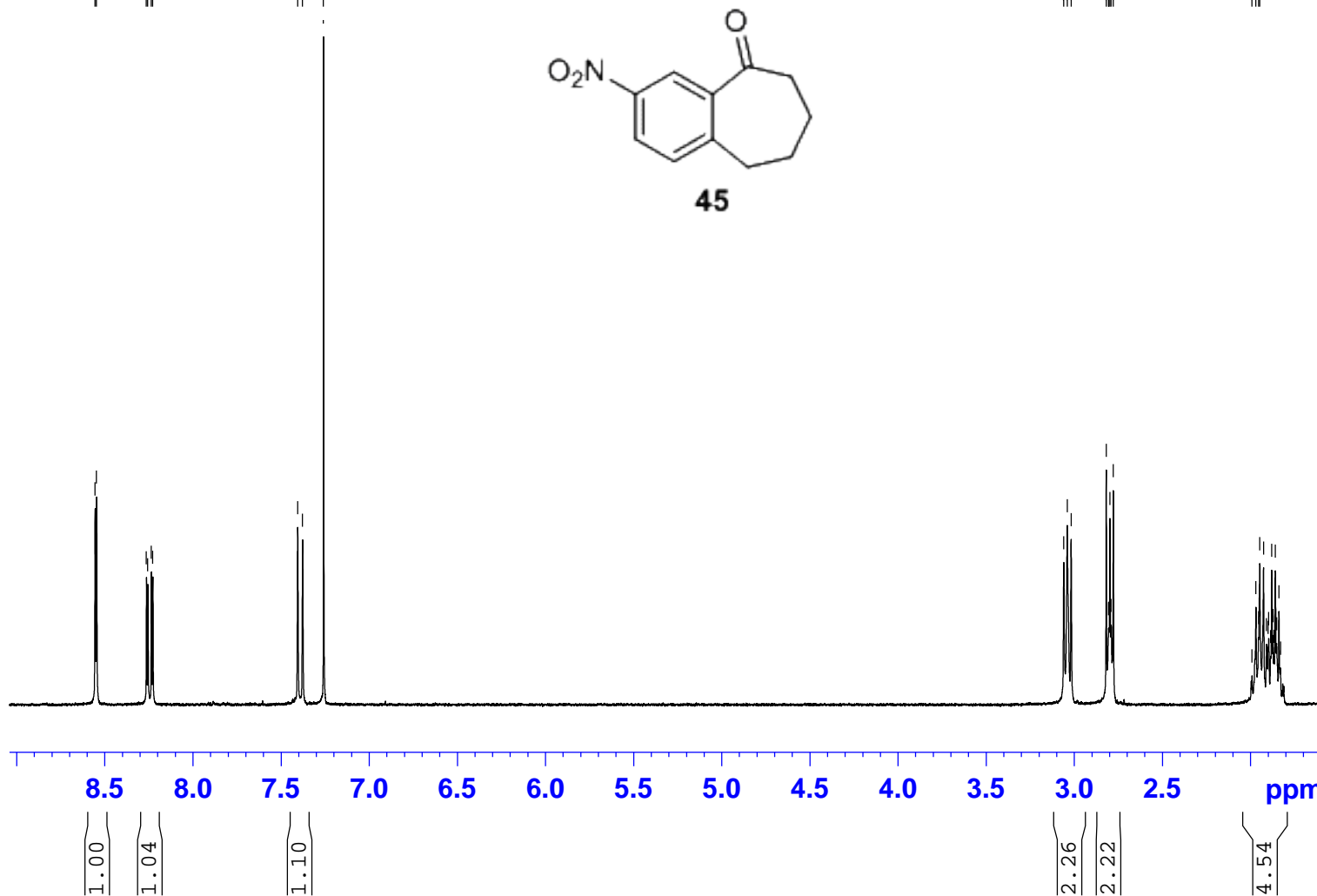
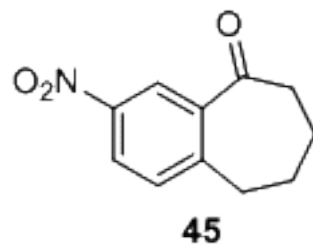
NAME  
EXPNO  
PROCNO

KK-227  
3  
1

8.556  
8.548  
8.265  
8.257  
8.237  
8.229

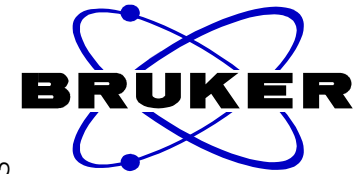
7.407  
7.379  
7.260

3.060  
3.040  
3.018  
2.819  
2.806  
2.804  
2.798  
2.792  
2.779  
1.992  
1.970  
1.955  
1.948





KK-231  
CDCl3 30 deg  
proton, 300MHz  
May 06, 2016



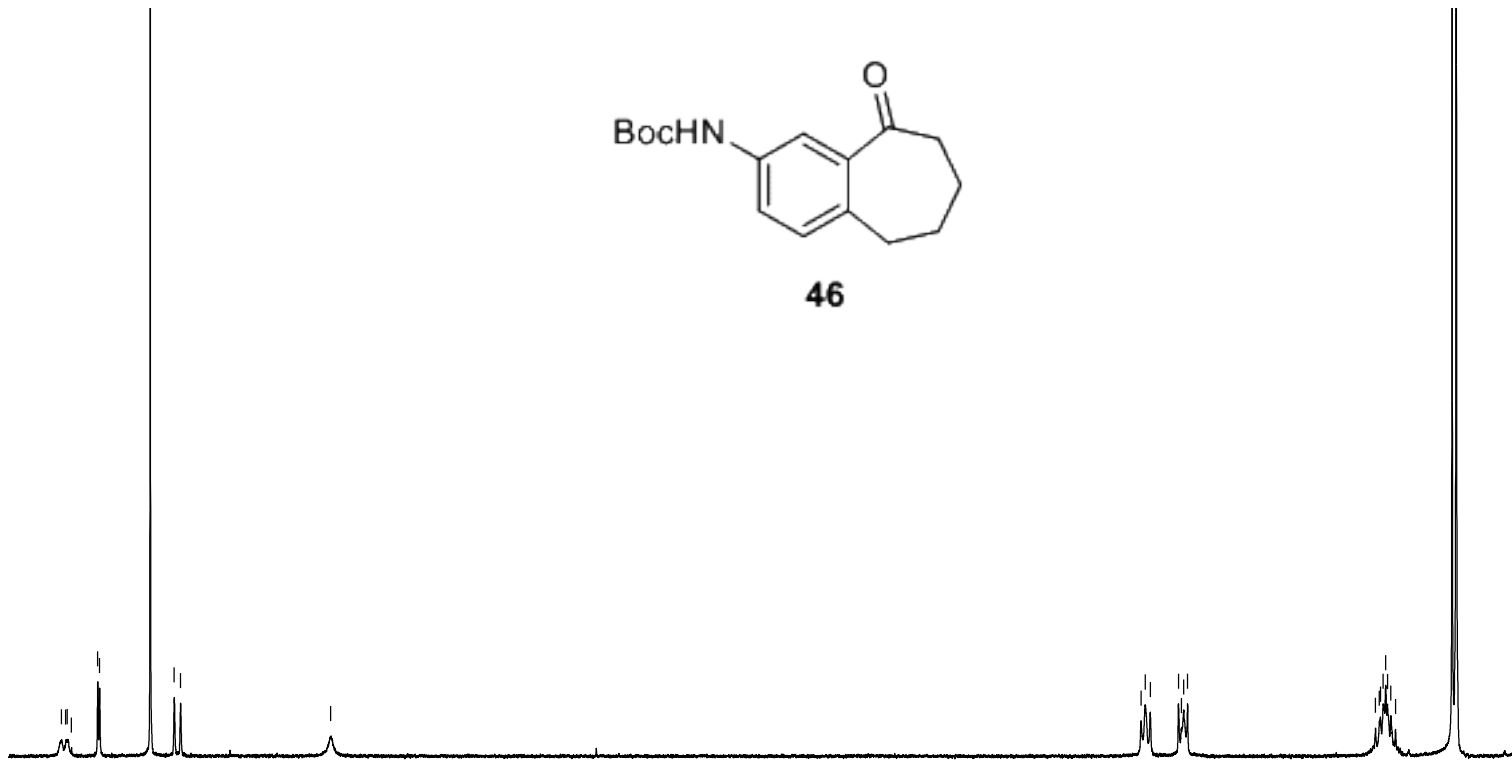
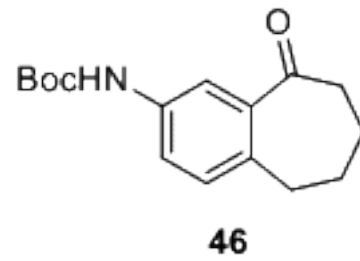
NAME  
EXPNO  
PROCNO

KK-231  
2  
1

7.624  
7.606  
7.491  
7.483  
7.260  
7.154  
7.127

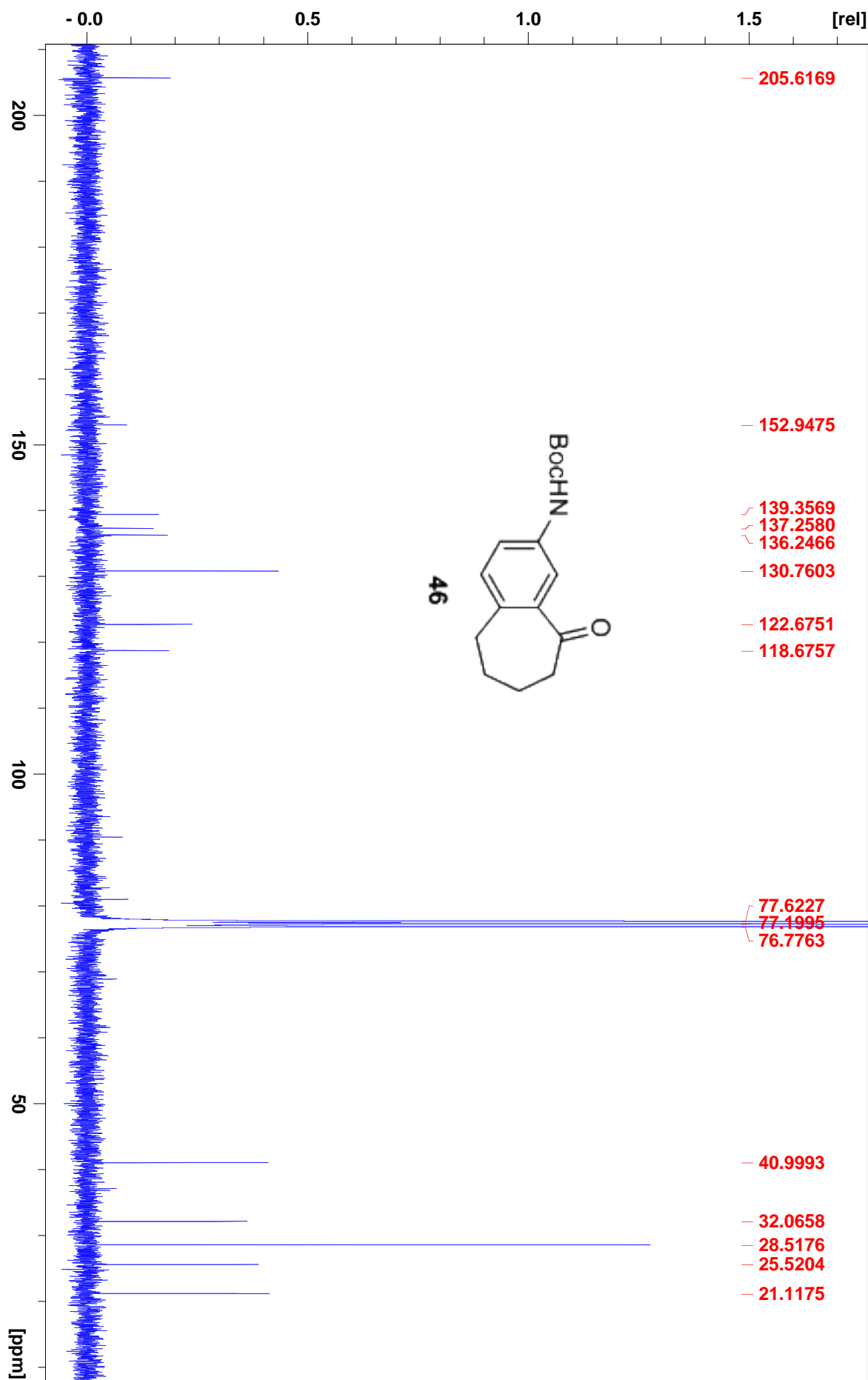
6.466

2.902  
2.884  
2.861  
2.738  
2.725  
2.715  
2.697  
1.871  
1.854  
1.849  
1.837  
1.826  
1.818  
1.803



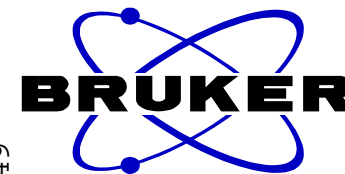
7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 ppm

1.00  
1.04  
1.13  
0.96  
2.25  
2.26  
4.69  
9.18



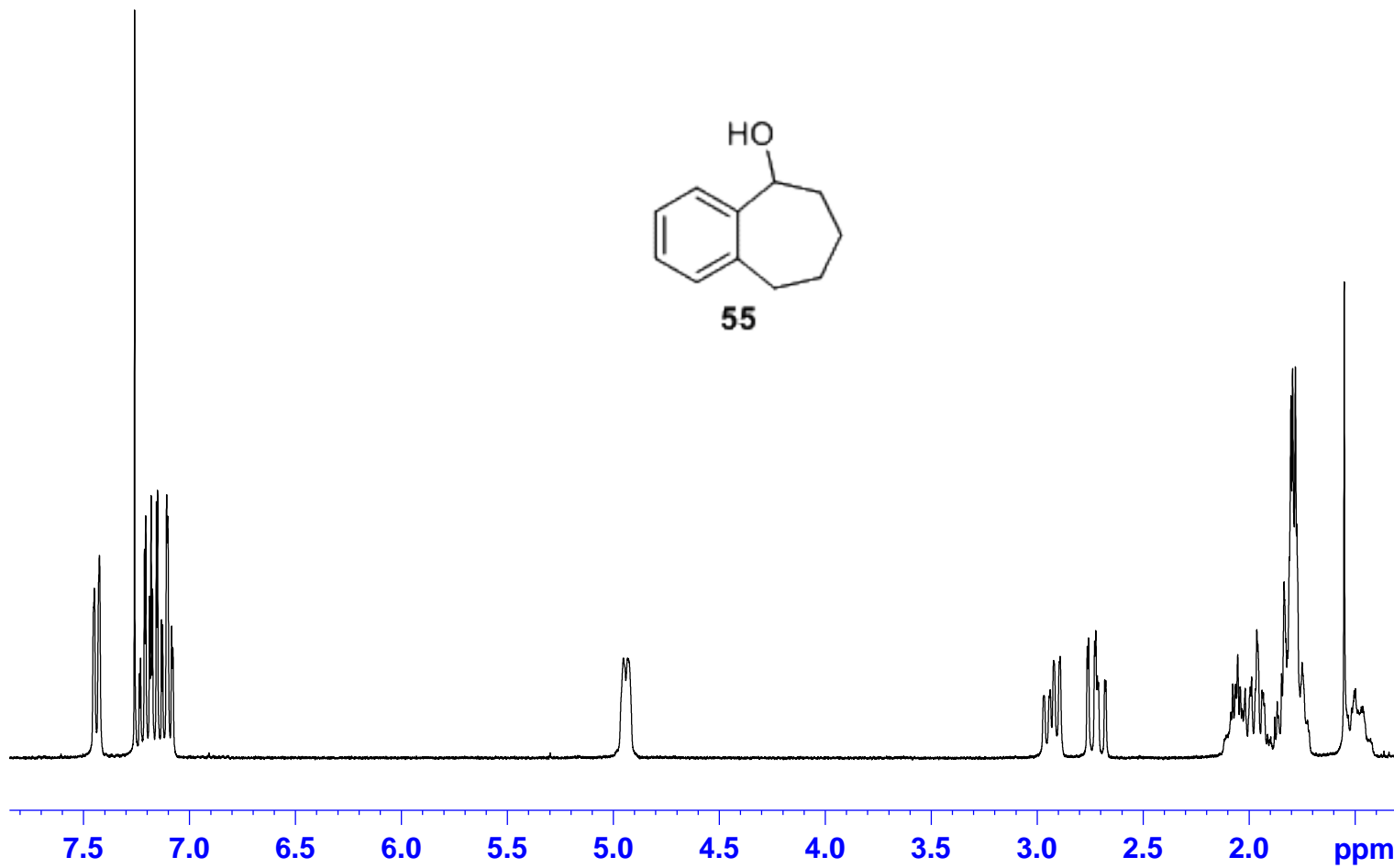
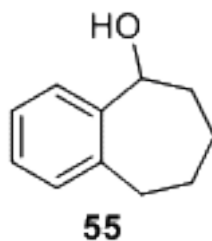
KK-231 101 1 C:\Bruker\TOPSPIN Katja

KK-225  
 CDCl3 30 deg  
 proton, 300MHz  
 May 06, 2016



NAME KK-225  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

7.449  
 7.425  
 7.260  
 7.237  
 7.232  
 7.213  
 7.207  
 7.189  
 7.182  
 7.175  
 7.157  
 7.152  
 7.133  
 7.128  
 7.108  
 7.104  
 7.085  
 7.080  
 4.952  
 4.933  
 2.922  
 2.891  
 2.763  
 2.757  
 2.728  
 2.723  
 2.716  
 2.710  
 2.681  
 2.676  
 2.053  
 1.988  
 1.963  
 1.958  
 1.846  
 1.834  
 1.825  
 1.819  
 1.810  
 1.802  
 1.794  
 1.781  
 1.775  
 1.749



1.00

3.08

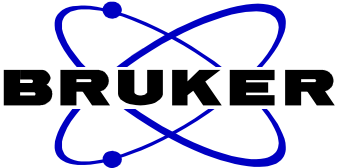
0.99

2.12

6.47

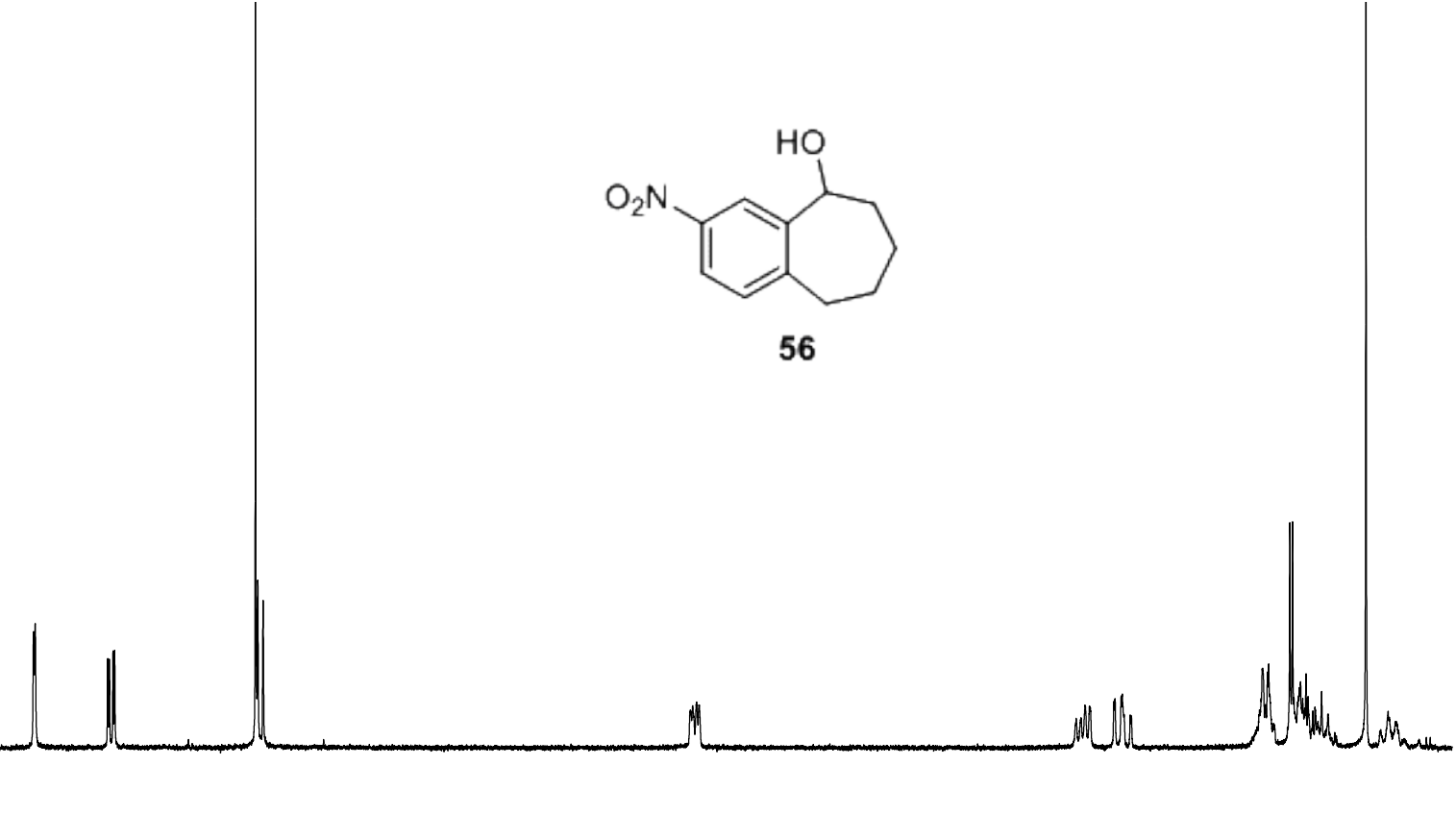
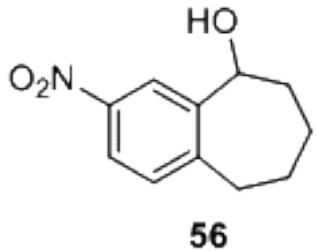
ppm

KK-228  
CDC13 30 deg  
proton, 300MHz  
May 06, 2016



NAME  
EXPNO 2  
PROCNO 1

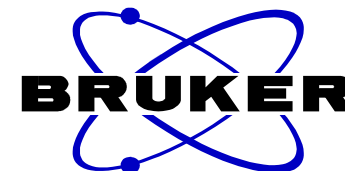
8.402  
8.395  
8.022  
8.014  
7.995  
7.987  
7.260  
7.248  
7.221  
5.017  
5.005  
4.985  
4.972  
3.027  
3.002  
2.982  
2.959  
2.833  
2.827  
2.795  
2.789  
2.748  
2.743  
2.082  
2.065  
2.051  
2.040  
2.034  
1.925  
1.911  
1.904  
1.885  
1.881  
1.876  
1.870  
1.859  
1.849  
1.842  
1.831  
1.807  
1.795  
1.780  
1.761  
1.728



8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 ppm

1.00  
1.03  
1.20  
1.07  
2.26  
2.38  
4.63

KK-229  
 CDC13 30 deg  
 proton, 300MHz  
 Mar 17, 2016



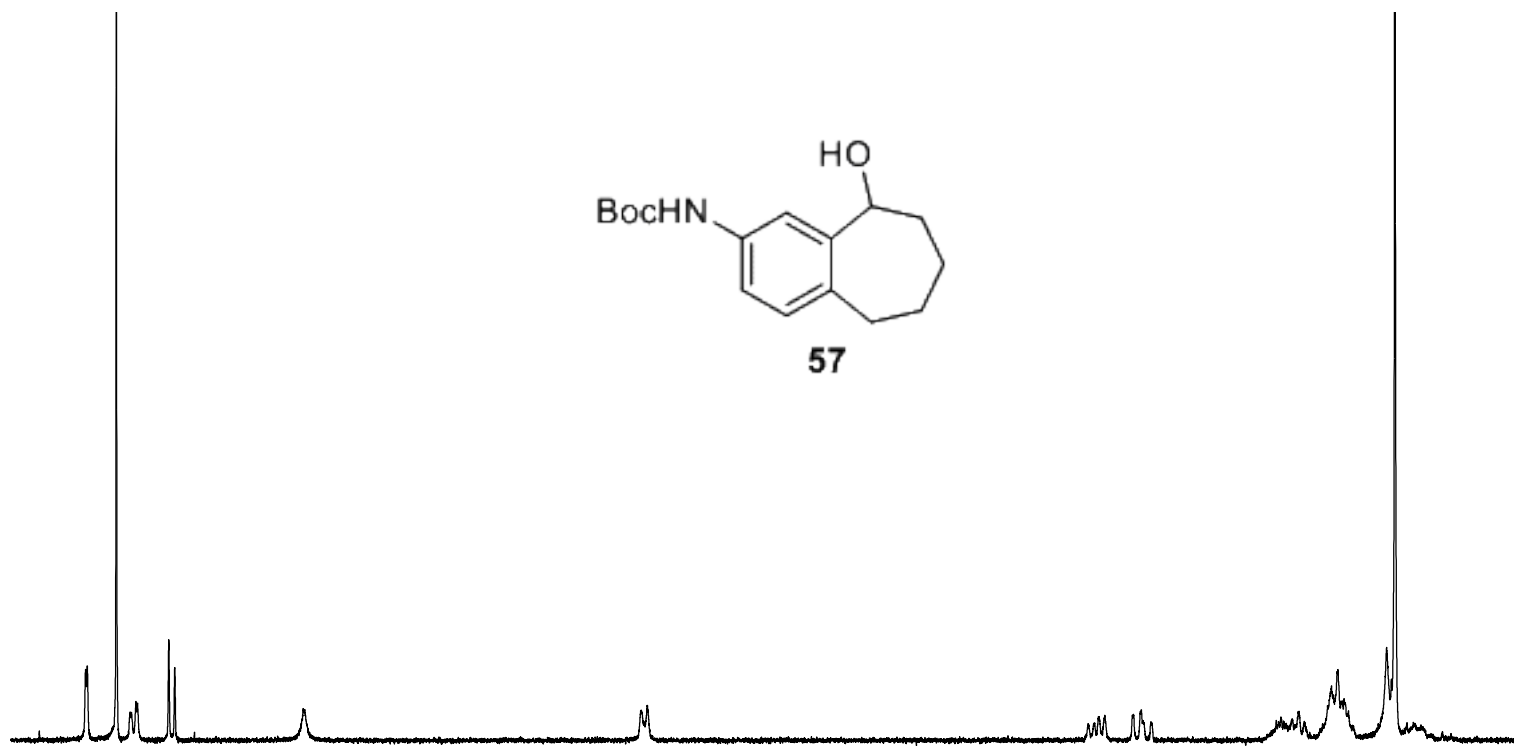
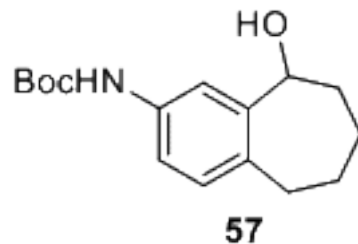
NAME  
 EXPNO  
 PROCNO

KK-229  
 3  
 1

7.260  
 7.198  
 7.192  
 7.172  
 7.165  
 7.024  
 6.997  
 — 6.420

4.900  
 4.874

2.891  
 2.861  
 2.844  
 2.817  
 2.687  
 2.651  
 2.608  
 2.067  
 2.045  
 2.035  
 2.025  
 2.013  
 2.000  
 1.973  
 1.944  
 1.919  
 1.910  
 1.895  
 1.847



7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 ppm

1.00  
 0.95  
 1.02

0.79

1.01

2.09

2.23  
 4.40  
 9.20

LIITE 7

KK-236  
CDCl3 30 deg  
proton, 300MHz  
May 06 2016



NAME  
EXPNO 2  
PROCNO 1

KK-236  
2  
1

