

**ENANCJOSELEKTYWNA ENZYMATYCZNA
DESYMETRYZACJA KATALIZOWANA
OKSYDOREDUKTAZAMI.
REAKCJE UTLENIANIA. CZĘŚĆ II**

**ENANTIOSELECTIVE ENZYMATIC
DESYMMETRIZATION CATALYZED
BY OXIDOREDUCTASES.
OXIDATION REACTIONS. PART II**

**Aleksandra Karczmarska-Wódzka^{*1},
Renata Kołodziejska^{*1}, Agnieszka Tafelska-Kaczmarek²,
Renata Studzińska³, Marcin Wróblewski¹,
Beata Augustyńska¹**

¹ *Katedra i Zakład Biochemii, Collegium Medicum Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz*

² *Katedra Chemii Organicznej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń*

³ *Katedra i Zakład Chemii Organicznej,
Collegium Medicum Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. dr. A. Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz*

**e-mail: akar@cm.umk.pl*

**e-mail: Renatakol@poczta.fm*

Abstract

Wprowadzenie

1. Dioksygenazy

2. Zastosowanie oksydaz w reakcjach desymetryzacji

3. Przykłady enzymatycznej reakcji desymetryzacji w obecności peroksydazy

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



Dr Aleksandra Karczmarska-Wódzka, pracownik Katedry i Zakładu Biochemii Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autorki obejmują badania nad enancjoselektywną redukcją analogów nukleozydowych.



Dr Renata Kołodziejka, pracownik Katedry i Zakładu Biochemii Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autorki związane są z badaniami nad regio- i stereoselektywnymi właściwościami biokatalizatorów oraz modyfikacją analogów nukleozydów pirymidynowych.



Dr Agnieszka Tafelska-Kaczmarek, pracownik Katedry Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autorki obejmują badania nad asymetryczną syntezą fluoropochodnych związków biologicznie czynnych.



Dr Renata Studzińska, pracownik Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autorki związane są z badaniami nad syntezą układów heterocyklicznych m.in. zmodyfikowanych analogów nukleozydów pirymidynowych o potencjalnej aktywności biologicznej.



Dr Marcin Wróblewski, pracownik Katedry i Zakładu Biochemii Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autora obejmują syntezę organiczną z wykorzystaniem enzymów jak również syntezę zmodyfikowanych nukleozydów pirymidynowych.



Dr hab. n. med. Beata Augustyńska, kierownik Katedry i Zakładu Biochemii Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autorki obejmują ocenę stanu oksydacyjnego z zastosowaniem enzymatycznych i nieenzymatycznych wykładników.

ABSTRACT

In continuation of our work, we herein describe next enzyme classes applied for oxidation reaction. Dioxygenases, oxidases, and peroxidases are successfully used in the synthesis of desymmetrization products with high yields and enantiomeric excesses.

Aromatic dioxygenases, such as toluene dioxygenase (TDO), naphthalene dioxygenase (NDO), and biphenyl dioxygenase (BPDO) found in the prokaryotic microorganisms are enzymes belonging to the dioxygenase class and are the most commonly used in organic synthesis.

The α -oxidation of various fatty acids in the presence of an α -oxidase from germinating peas is one of the few examples of oxidases application in asymmetric organic synthesis. The intermediary α -hydroxyperoxyacids can undergo two competing reactions: decarboxylation of the corresponding aldehydes or reduction to the (*R*)-2-hydroxy acids. In order to eliminate the competitive decarboxylation reaction tin(II) chloride is used as an *in situ* reducing agent.

Peroxidases are the redox enzymes found in various sources such as animals, plants, and microorganisms. Due to the fact that, in contrast to monooxygenases, no additional cofactors are required, peroxidases are highly attractive for the preparative biotransformation. Oxidation reactions catalyzed by (halo)peroxydases are also often used in organic synthesis. *N*-Oxidation of amines, for instance, leads to the formation of the corresponding aliphatic *N*-oxides, aromatic nitro-, or nitroso-compounds. From a preparative synthesis standpoint, however, sulfoxidation of thioether is important since it was proven to proceed in a highly stereo- and enantioselective manner. Furthermore, depending on the source of haloperoxidase, chiral sulfoxides of opposite configurations can be obtained.

Keywords: dioxygenase, oxidase, peroxidase, oxidation reaction

Słowa kluczowe: dioksygenaza, oksydaza, peroksydaza, reakcja utleniania

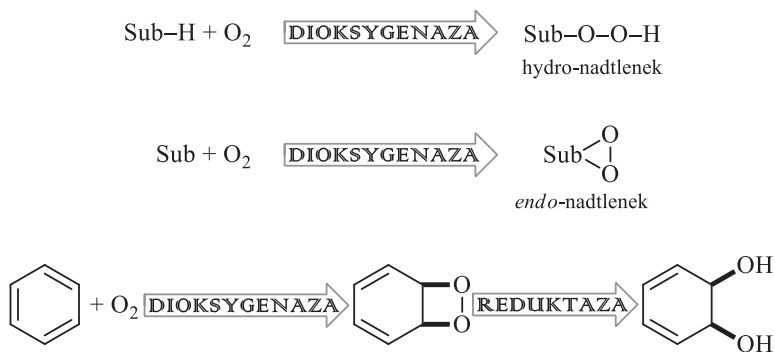
WPROWADZENIE

Enzymy zwane często biokatalizatorami wpływają na reakcje chemiczne zachodzące w organizmie nie zmieniając końcowego składu mieszaniny reagującej ani stałej równowagi danej reakcji. Białka te wykazują dużą swoistość w przyspieszaniu lub nadawaniu odpowiedniego kierunku reakcjom chemicznym. Dzięki biotransformacjom zachodzącym pod wpływem enzymów możliwe jest przeprowadzanie przemian związków organicznych z selektywnością rzadko osiąganą innymi metodami. Fakt ten stanowi ważny aspekt w dynamicznym rozwoju chemii organicznej.

Przyjmując mechanizm działania za kryterium umownego podziału enzymów klasy oksydoreduktaz w tej części przedstawiono przykłady reakcji enzymatycznego utleniania w obecności dioksygenaz, oksydaz i peroksydaz. Praca ta, jest kontynuacją wcześniejszych rozważań dotyczących reakcji redoks wobec białkowych katalizatorów.

1. DIOKSYGENAZY

Dioksygenazy należą do grupy oksygenaz, które utleniają substrat wbudowując do jego cząsteczki dwa atomy tlenu. W obrębie tej klasy enzymów wyróżnia się dioksygenazy rozrywające wiązania węgiel-węgiel oraz dioksygenazy hydroksylujące wprowadzające do pierścienia dwie grupy hydroksylowe. Są to niehemowe oksygenazy typu Riesego, które w centrum aktywnym zawierają kłaster [2Fe-2S] oraz posiadają jedno lub dwa białka transportujące elektrony. Typowe reakcje zachodzące wobec dioksygenazy przedstawione na Schemacie 1 zachodzą przy jednoczesnym przenoszeniu dwóch atomów tlenu na substrat [1, 2].



Schemat 1. Reakcje zachodzące wobec dioksygenazy

Scheme 1. Dioxygenases in the oxidation reactions

We wszystkich przypadkach, tworzą się bardzo reaktywne i niestabilne formy nadtlenkowe, które mogą być przedmiotem dalszych enzymatycznych lub chemicznych przekształceń, takich jak redukcja czy przegrupowanie. Alkany mogą być

utleniane w pozycji allilowej przez lipooksygenazę, otrzymując wodoronadtlenek allilu, który po redukcji (np. borowodorkiem sodu) daje alkohol allilowy. Reaktywne formy tlenu takie jak nadtlenki lipidowe reagują ze składnikami organizmów żywych. Reakcje te mogą mieć niepożądane dla organizmów skutki, wywołując niektóre z poważnych chorób w tym miażdżycę czy nawet niektóre rodzaje nowotworów.

Enzymy należące do klasy dioksygenaz najczęściej wykorzystywane w syntezie organicznej to tzw. aromatyczne dioksygenazy znajdujące się w mikroorganizmach prokariotycznych, w tym dioksygenaza toluenowa (TDO), dioksygenaza naftalenowa (NDO), i dioksygenaza bifenyłowa (BPDO). Rekombinant szczepu *E. coli* JM109(pDTG141) z ekspresją genu NDO z *Pseudomonas sp.* NCIB 9816-4 został użyty do bioutleniania siarczków aryloalkilowych i dialkilowych (Schemat 2) [3]. W wyniku takiego procesu w większości przypadków otrzymano optycznie czyste (*S*)-sulfotlenki. Siarczki aryloalkilowe **1b-d** posiadające *n*- i *izo*-alkilowe grupy z trzema lub większą liczbą atomów węgla oraz siarczki dialkilowe **1e-g** z podstawnikiem alkilowym zawierającym siedem lub większą liczbę atomów węgla zostały utlenione do enancjomerów o konfiguracji (*R*). Selektowność sulfoutleniania siarczków chlorofenylo-metylowych była uzależniona od położenia atomu chloru w pierścieniu aromatycznym. Im bliżej atomu siarki znajdował się ten podstawnik tym mniejszą wartość *ee* odnotowano, selektowność malała w szeregu 1,4->1,3->1,2-.



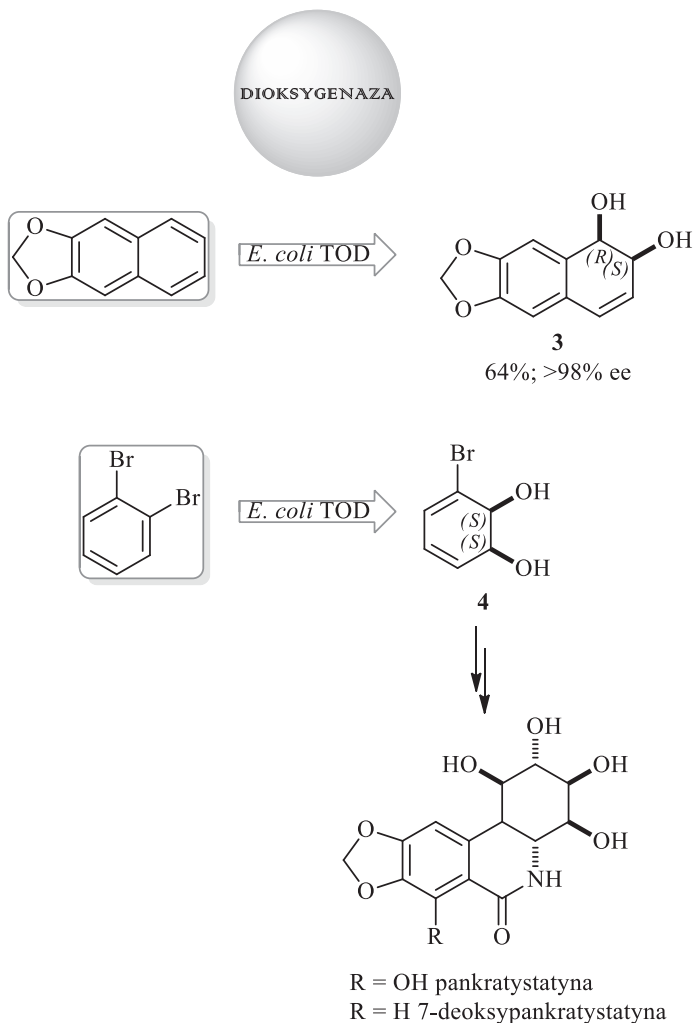
Siarczek	R1	R2	wyd. [%]	<i>ee</i> [%]	Konfig.
a	Ph	Me	98	98	<i>S</i>
b	Ph	Pr	58	76	<i>R</i>
c	Ph	iPr	69	74	<i>R</i>
d	Ph	Bu	25	97	<i>R</i>
e	Me	Hep	<5	3	<i>R</i>
f	Me	Oct	<5	4	<i>R</i>
g	Me	Nom	<5	5	<i>R</i>
h	4-Cl-Ph	Me	10	90	<i>S</i>
i	3-Cl-Ph	Me	21	75	<i>S</i>
j	2-Cl-Ph	Me	12	31	-

Schemat 2. Reakcja utleniania siarczków aryloalkilowych wobec *E. coli* JM109(pDTG141)

Scheme 2. Oxidation of aryl-alkyl sulfides by *E. coli* JM109(pDTG141)

W enzymatycznej reakcji dihydroksylacji dioksolu katalizowanej rekombinowanymi komórkami szczepu *E. coli* wykorzystującymi ekspresję genu dioksygenazy

z *Pseudomonas putida* G7 otrzymano optycznie czysty policykliczny (5*R*,6*S*)-diol z dobrą wydajnością (Schemat 3, **3**). Związek ten może mieć zastosowanie w syntezie analogów alkaloidu pankratystatyny. Dibromobenzeny (izomery 1,2-, 1,3- i 1,4-) zostały przekształcone do odpowiednich dioli *cis*-cykloheksadienowych metodą fermentacyjną całymi komórkami ze szczepu *E. coli* z nadekspresją genu TOD. Za pomocą tego szczepu w asymetrycznej syntezie uzyskano również (+)-pankratystatynę i (+)-7-deoksypankratystatynę (obiecujące środki przeciwnowotworowe). Jednym z produktów przejściowych był (1*S*,2*S*)-3-bromo-1,2-dihydroksycykloheksa-3,5-dien (Schemat 3, **4**) [4].



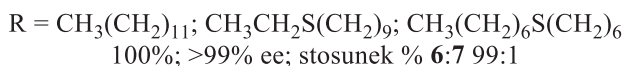
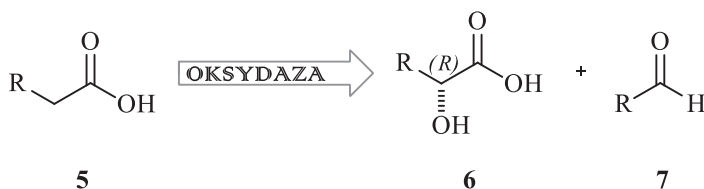
Schemat 3. Reakcje katalizowane dioksygenazami

Scheme 3. Dioxygenation catalyzed reactions

2. ZASTOSOWANIE OKSYDAZ W REAKCJACH DESYMETRYZACJI

Oksydazy (EC 1.1.3.X) biorą udział w reakcjach, w których tworzą się reaktywne formy tlenu (RFT). Należą do grupy oksydoreduktaz, w których elektrony lub atomy wodoru przenoszone są na atom tlenu. Niektóre z tych enzymów zawierają w centrum aktywnym jon metalu, inne obok jonu metalu zawierają dinukleotyd flawinoadeninowy jako koenzym. W przypadku tych pierwszych produktem jest woda, a produktem działania tych drugich nadtlenek wodoru.

Jednym z nielicznych przykładów zastosowania oksydaz w asymetrycznej syntezie organicznej jest przykład reakcji α -utlenienia różnych kwasów tłuszczowych w obecności α -oksydazy z kielkującego groszku. Jako związki pośrednie tworzą się kwasy α -hydroksonadtlenowe, które mogą ulegać dwóm konkurencyjnym reakcjom. Pierwsza to reakcja dekarboksylacji prowadząca do odpowiednich aldehydów 7 lub reakcji utleniania do (*R*)-2-hydroksykwasów 6. W celu wyeliminowania konkurencyjnej reakcji dekarboksylacji do mieszaniny reakcyjnej dodaje się chlorek cyny(II). Utlenianie nadtlenokwasów chlorkiem cyny(II) umożliwia otrzymanie czystych enancjomerycznie hydroksykwasów z dobrą wydajnością (Schemat 4) [5].

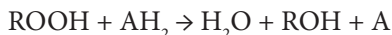


Schemat 4. α -Utlenianie pochodnych kwasów tłuszczowych

Scheme 4. α -Oxidation of fatty acid derivatives

3. PRZYKŁADY ENZYMATYCZNEJ REAKCJI DESYMETRYZACJI W OBECNOŚCI PEROKSYDAZY JAKO KATALIZATORA

Peroksydazy katalizują utlenianie różnych substratów organicznych i nieorganicznych za pomocą nadtlenu wodoru [6],

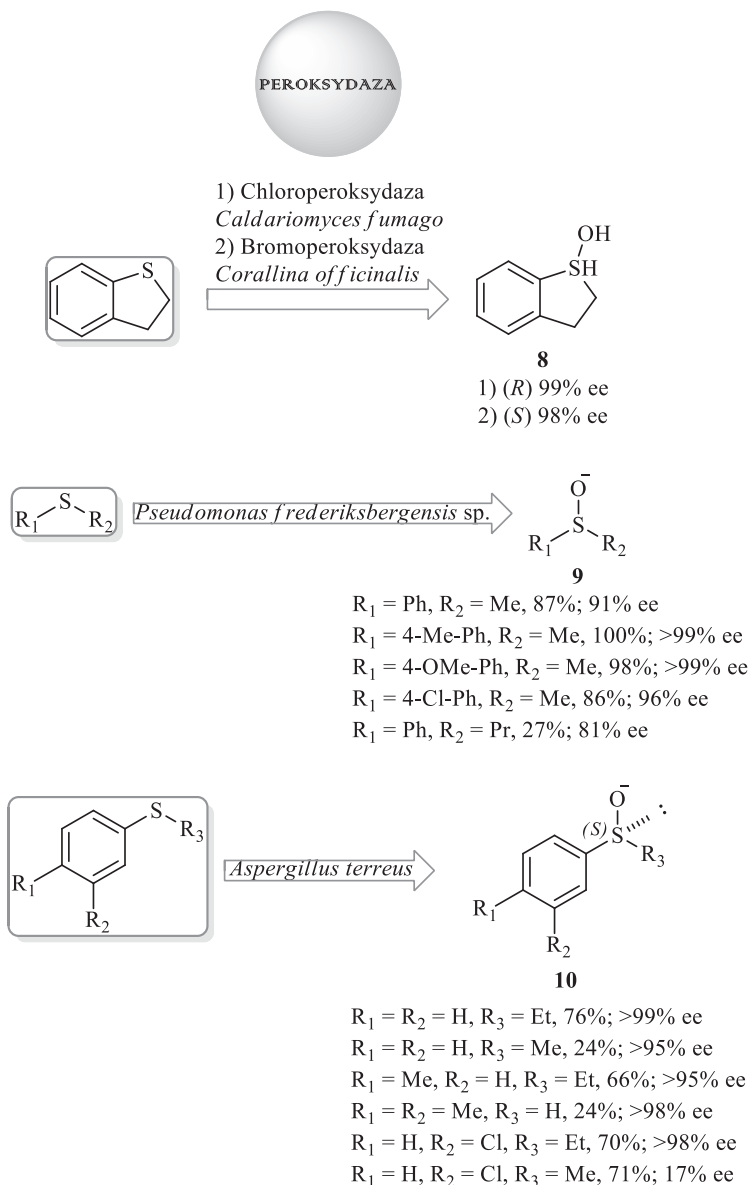


gdzie AH_2 to typowy donor wodorowy, który jest utleniany przez nadtlenek. Typowymi substratami ulegającymi działaniu peroksydaz są substraty aromatyczne, czyli związki o charakterze wodorodonorowym. Niezbędne w tej reakcji czynniki utleniające to np.: wodoronadtlenek kwasu tłuszczowego lub nadtlenek wodoru.

Peroksydazy roślinne biorą udział w rozwoju komórek roślinnych, a także pełnią funkcję enzymów o charakterze antyoksydantów pomagając w likwidowaniu reaktywnych form tlenu. Jest to istotne bo nadmierne nagromadzenie RFT w żywej komórce prowadzi do stresu „oksydacyjnego” uszkadzając białka, lipidy oraz kwasy nukleinowe [7]. Peroksydazy biorące udział w usuwaniu RFT to peroksydaza glutationowa, gwajakolowa czy askorbinianowa [8].

Peroksydazy, z uwagi na swój potencjał katalityczny są enzymami łatwo dostępnymi i szeroko stosowanymi. Źródłem peroksydaz mogą być zarówno zwierzęta, rośliny jak również mikroorganizmy. W odróżnieniu od monooksygenaz ich działanie nie wymaga dodatkowych kofaktorów, z tego powodu są wysoce atrakcyjne w biotransformacji preparatywnej.

Reakcje utleniania katalizowane peroksydazami są często stosowane w syntezie organicznej. *N*-Utlennianie amin, prowadzi do tworzenia się odpowiednich alifatycznych *N*-tlenków lub aromatycznych związków nitrozowych lub nitrowych. Z punktu widzenia syntezy preparatywnej utlenianie tioeterów jest jednak ważniejsze, gdyż zachodzi ono stereo i enancjoselektywnie. Ponadto, w zależności od źródła halo-peroksydaz, chiralne sulfotlenki można uzyskać o określonej konfiguracji. Chloroperoksydaza (CPO) z *Caldariomyces fumago* jest selektywnym katalizatorem w reakcji utleniania metylo tioeterów prowadząc do otrzymania (*R*)-sulfotlenków (Schemat 5, 8). Haloperoksydaza z alg morskich *Corallina officinalis* wykazuje przeciwną preferencję dając *S*-sulfotlenki. W celu otrzymania sulfotlenków wysokiej czystości optycznej ważne jest, aby podczas reakcji utrzymywać stałe, niskie stężenie H₂O₂ [9–12]. Enancjoselektywne sulfoutlenienie serii organicznych siarczków katalizowanych przez *Pseudomonas frederiksbergensis* sp. prowadzi do odpowiednich (*S*)-sulfotlenków z dobrą lub wysoką enancjoselektywnością (Schemat 5, 9) [13]. Zaobserwowano, że zarówno czas reakcji, pH oraz budowa substratu wpływają na wydajność i enancjoselektywność reakcji. Najlepsze wyniki uzyskano dla siarczków alkilowo-arylowych. Zauważono, że obecność podstawnika w pozycji *para*- reszty arylovej wpływała na wzrost enancjoselektywności. Natomiast wydłużenie łańcucha alkilowego, skutkuje spadkiem zarówno wydajności jak i stereoselektywności. W reakcji desymetryzacji innych sulfidów alifatyczno-aromatycznych w obecności *Aspergillus terreus* CCT 3320 otrzymano również sulfotlenki o konfiguracji (*S*) (Schemat 5, 10) [14]. Ta biotransformacja, w większości przypadków przebiega z nadmiarem enancjomerycznym wyższym niż 95%. Selektowność reakcji w dużym stopniu zależy od czasu prowadzenia reakcji. Uzyskany nadmiar enancjomeryczny produktów był wynikiem dwuetapowej reakcji: enancjotopowej desymetryzacji i rozdziału kinetycznego. Pierwszy etap charakteryzował się umiarkowaną selektywnością dopiero etap drugi umożliwił otrzymanie wzbogaconych enancjomerycznie produktów.



Schemat 5. Enzymatyczne reakcje zachodzące przy udziale peroksydazy

Scheme 5. Enzymatic reaction of compounds with peroxidase

Zastosowanie chloroperoksydazy jako katalizatora w reakcji hydroksylowania alkinów umożliwia otrzymanie *R*-alkoholi propargilowych (Schemat 6) [15]. Reakcje przeprowadzono w obecności nadtlenu wodoru. Wydajność reakcji rosła w miarę dodawanie enzymu jak i utleniacza. Generalnie, większość otrzymanych produktów charakteryzowała się dobrą lub bardzo dobrą czystością enancjomeryczną z różną

jednak wydajnością chemiczną. Najgorsze wyniki uzyskano dla najmniejszego objętościowo substratu (pent-2-ynu).

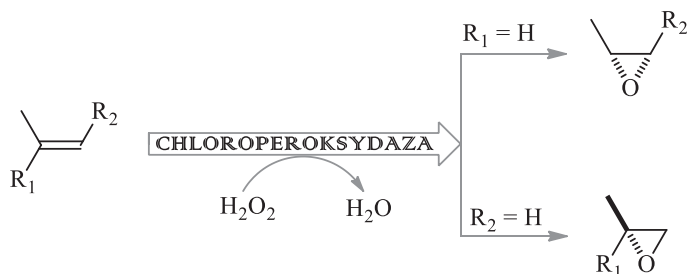


R1	R2	wydajność [%]	ee [%]
Me	Me	7	57
Et	Me	26	91
Pr	Me	30	87
Bu	Me	8	78
Ph	Me	15	86
CH ₂ OAc	Me	52	95
CH ₂ Br	Me	65	94
(CH ₂) ₂ OAc	Me	26	83
(CH ₂) ₂ Br	Me	25	94
CH ₂ OAc	Et	8	87

Schemat 6. Hydroksylowanie alkinów wobec chloroperoksydazy

Scheme 6. Hydroxylation of alkynes using chloroperoxidase

Chloroperoksydazy umożliwiają również przeprowadzenie reakcji epoksydowania związków nienasyconych. Najlepsze wyniki uzyskuje się dla niepodstawionych *cis*-alkenów i 1,1-dipodstawionych olefin, które były selektywnie utleniane za pomocą chloroperoksydazy ze znakomitą selektywnością (Schemat 7) [16–18].



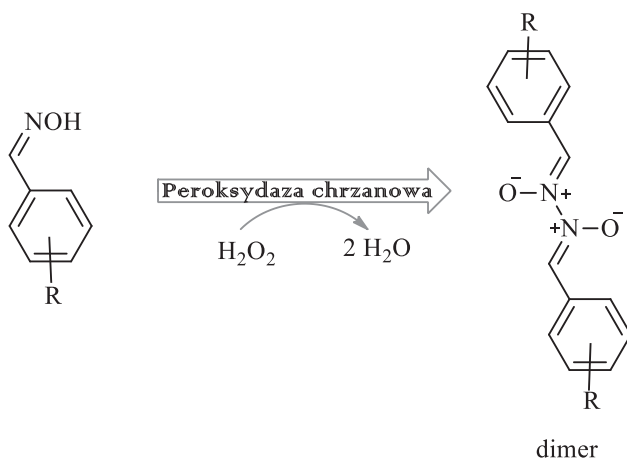
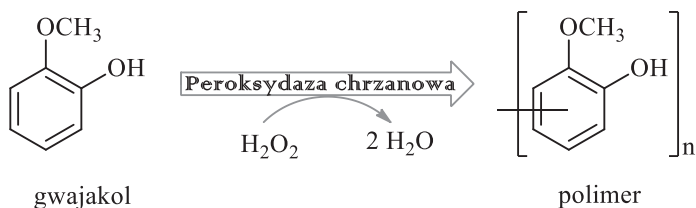
R1	R2	ee [%]
H	<i>n</i> -C ₄ H ₉	96
H	(CH ₃) ₂ CH-CH ₂	94
H	Ph	96
Ph	H	89
CH ₂ -COOEt	H	93–94
(CH ₂) ₂ -Br	H	85

R1	R2	ee [%]
<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	H	95

Schemat 7. Asymetryczna reakcja epoksydowania wobec chloroperoksydazy

Scheme 7. Asymmetric epoxidation of alkenes using chloroperoxidase

Ostatnim przedstawionym przykładem zastosowania peroksydaz jest utlenienie związków aromatycznych. Reakcję tego typu zalicza się to tzw. klasycznej reakcji peroksydaz, ponieważ została ona odkryta jako pierwsza. Utlenianie fenoli (np. gwajakolu, rezorcyny) i amin aromatycznych (np. anilina, *o*-dianizydyna) w łagodnych warunkach w obecności peroksydazy chrzanowej prowadzi do utworzenia oligomerów i polimerów [19–21]. Gwajakol (2-metoksyfenol) jest utleniany przez nadtlenek wodoru w wyniku czego powstają skomplikowane związki o charakterze kompleksów o barwie czerwonej lub brązowej. Ta reakcja jest katalizowana przez peroksydazy. W celu określenia aktywności peroksydaz występujących w różnych warzywach i owocach często stosuje się powyższą reakcję. W niektórych przypadkach, uzyskano również dimery (np. aldoksyminy), biaryle (Schemat 8) [22, 23].



Schemat 8. Peroksydaza chrzanowa jako katalizator reakcji utleniania związków aromatycznych

Scheme 8. Horseradish peroxidase catalyzed oxidation reaction of aromatics

UWAGI KOŃCOWE

W przedstawionej pracy omówiono zastosowanie kolejnych klas enzymów do przeprowadzenia reakcji utleniania. Z dobrymi wydajnościami oraz nadmiarami enancjomerycznymi uzyskano produkty desymetryzacji, z wykorzystaniem dioksygenaz, oksydaz i peroksydaz.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] D.T. Gibson, R.E. Parales, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000, **11**, 236.
- [2] C.S. Butler, J.R. Mason, *Adv. Microb. Physiol.*, 1997, **38**, 47.
- [3] A. Kerridge, A. Willetts, H. Holland, *J. Mol. Catal. B: Enzymol.*, 1999, **6**, 59.
- [4] A.N. Phung, M.T. Zannetti, G. Whited, W.-D. Fessner, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, **42**, 4821.
- [5] W. Adam, W. Boland, J. Hartmann-Schreier, H.-U. Humpf, M. Lazarus, A. Saffert, C.R. Saha-Möller, P. Schreier, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 11044.
- [6] S. Verma, R.S. Dubey, *Plant Sci.*, 2003, **164**, 645.
- [7] M. Zacchini, E. Rea, M. Tullio, M. de Agazio, *Plant Physiol. Biochem.*, 2003, **41**, 49.
- [8] H. Mehlhorn, M. Lelandais, H.G. Korth, C.H. Foyer, *FEBS Lett.*, 1996, **378**, 203.
- [9] S. Kobayashi, M. Nakano, T. Kimura, A.P. Schaap, *Biochemistry*, 1987, **26**, 5019.
- [10] M. Andersson, A. Willetts, S. Allenmark, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 8455.
- [11] S. G. Allenmark, M.A. Andersson, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1996, **7**, 1089.
- [12] M.A. Andersson, S.G. Allenmark, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 15293.
- [13] W. Adam, F. Heckel, C.R. Saha-Möller, M. Taupp, P. Schreier, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, **15**, 983.
- [14] A.L.M. Porto, F. Cassiola, S.L.P. Dias, I. Joekes, Y. Gushikem, J.A.R. Rodrigues, P.J.S. Moran, G.P. Manfio, A.J. Marsaioli, *J. Mol. Catal. B: Enzymol.*, 2002, **19-20**, 327.
- [15] S. Hu, L.P. Hager, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 872.
- [16] E.J. Allain, L.P. Hager, L. Deng, E.N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 4415.
- [17] A.F. Dexter, F.J. Lakner, R.A. Campbell, L.P. Hager, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 6412.
- [18] F.J. Lakner, L.P. Hager, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 3923.
- [19] J.S. Dordick, *Trends Biotechnol.*, 1992, **10**, 287.
- [20] H. Uyama, H. Kurioka, J. Sugihara, S. Kobayashi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1996, **69**, 189.
- [21] S. Kobayashi, S. Shoda, H. Uyama, *Adv. Polym. Sci.*, 1995, **121**, 1.
- [22] K. Fukunishi, K. Kitada, I. Naito, *Synthesis*, 1991, 237.
- [23] M.M. Schmitt, E. Schüler, M. Braun, D. Häring, P. Schreier, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 2945.

Praca wpłynęła do Redakcji 19 czerwca 2014