

ZASTOSOWANIA ENZYMÓW Z TKANEK ZWIERZĘCYCH W SYNTEZIE ORGANICZNEJ I BIOKATALIZIE. CZĘŚĆ I. HYDROLAZY

APPLICATIONS OF HYDROLASES FROM ANIMAL TISSUES IN ORGANIC SYNTHESIS

Hanna Hibner¹, Ryszard Ostaszewski^{*2}

¹ *Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa*

² *Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk
ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa
e-mail: rysza@icho.edu.pl*

Abstract

Wstęp

- 1.1. Enzymy; 1.2. Ogólna metoda izolacji enzymów z tkanek zwierzęcych
2. Wybrane zastosowania hydrolaz; 2.1. Lipazy; 2.1.1. Zastosowania PPL w biokatalizie; 2.1.2. Inne lipazy; 2.2. Esterazy; 2.2.1. Zastosowanie esteraz zwierzęcych jako katalizatorów reakcji chemicznych; 2.3. *L*-aminoacylaza z nerek ssaków; 2.4. Imidazy; 2.5. Pepsyna; 2.6. Trypsyna; 2.7. Hydrolazy aldoheksoz; 2.7.1. β -Glukuronidaza; 2.7.2. α -*L*-Fukozydaza; 2.7.3. β -Galaktozydaza; 2.7.4. α -Glukozydaza; 2.8. Pirofosfatazy nukleotydów (NPP)

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Hanna Hibner w 2011 r. ukończyła studia inżynierskie, Biotechnologię na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Obecnie kontynuuje naukę na studiach magisterskich na tym samym kierunku. Od 2010 r. bierze udział w projekcie Innowacyjna Gospodarka „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym” realizowanym w Instytucie Chemii Organicznej PAN w Warszawie.



Prof. dr hab. inż. Ryszard Ostaszewski w roku 1984 ukończył studia magisterskie na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej; specjalność Chemia i Technologia Ciała Stałego. W tym roku rozpoczął staż w Instytucie Chemii Organicznej (IChO) PAN w Warszawie i po roku obowiązkowej służby wojskowej (1985) rozpoczął studia doktoranckie (1986). Pracę doktorską z zakresu chemii supramolekularnej wykonywał w zespole prof. Janusza Jurczaka, którą obronił z wyróżnieniem w 1989 roku. Zaraz po zakończeniu doktoratu został zatrudniony na stanowisku adiunkta w IChO PAN

gdzie pracuje do chwili obecnej. Odbił dwumiesięczny staż naukowy w zespole prof. D.N. Reinhoudta, Uniwersytet Twente, Holandia, oraz roczny staż w tym samym ośrodku (1989/1990). Kolejny roczny staż naukowy już, jako stypendysta ETH odbył u profesora H.J. Hansena, Uniwersytet Zurych, Szwajcaria (1994/1995). W roku 1999 obronił pracę habilitacyjną, którą także wykonał w IChO PAN. W roku 2009 otrzymał tytuł profesora. Pracował na Wydziale Chemicznym, Międzywydziałowym Centrum Biotechnologii oraz Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej PW w latach 2000–2009. Jest autorem bądź współautorem 65 publikacji naukowych z listy filadelfijskiej, jednego rozdziału z książki Wiley „Novel Concepts in Catalysis and Chemical Reactors: Improving the Efficiency for the Future”, pięciu patentów oraz 25 innych publikacji. Wypromował czterech doktorów nauk chemicznych i jest promotorem kolejnych czterech doktoratów. Jego zainteresowania naukowe związane są ze stereokontrolowaną syntezą organiczną, chemią reakcji multikomponentowych, biokatalizą, biotechnologią oraz chemią medyczną.

ABSTRACT

This work presents systematically enzymes which can be obtained from animal tissue and their applications in synthesis of pharmaceuticals and nonracemic organic compounds. It lays out similarities in procedures of isolation and purification of particular enzymes. Such procedures usually are so simple that they can be used in every industrial or research laboratory.

Most animal enzymes are well-investigated and their structures and substrate specificity are known. They are used as biocatalysts in many chemical processes. Others were used in one or a few reactions but their natural substrates and biochemical properties are described. Trials of predicting potential applications of such enzymes and other substrates for them were done.

In this part typical applications of hydrolases: lipases (porcine pancreatic lipase [8–17], lamb pregastric lipase [22]), esterases (porcine, horse liver esterase, liver acetone powders [34–43, 46]), *L*-aminoacylase [48, 49], pepsin [56], trypsin [58, 59], imidase [52, 53], aldohexose hydrolases [60, 62–64], nucleotide pyrophosphatase [65]; were described.

Also examples of immobilized [10, 32] or recombined [49] enzymes are given in the text. These modifications enhance catalytic properties or reduce costs of using enzymes.

In practical applications a biocatalytic effect of enzymes from animal sources is often compared with microbial ones. This text is focused on processes where animal enzymes gave much better results (yield and enantioselectivity) than microorganisms. They are also proper, unlike whole microorganisms, to investigate and computer analysis of mechanism of the reaction. Enzymes isolated from animal tissues usually have well-defined structure of active site which is a key to predict mechanisms.

Keywords: animal enzymes, biocatalysis, organic synthesis, applications of hydrolases

Słowa kluczowe: enzymy zwierzęce, biokataliza, synteza organiczna, zastosowania hydrolaz

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACE	– acetylocholinoesteraza
AcOH	– kwas octowy
ee	– nadmiar enancjomeryczny
Fuc	– fukoza
Gal	– galaktoza
GDP	– guanozynodifosforan
HCV	– wirus zapalenia wątroby typu C
HLAP	– proszek acetonowy z wątroby końskiej
KAP	– proszek acetonowy z nerek (ang. <i>kidney acetone powder</i>)
LAP	– proszek acetonowy z wątroby (ang. <i>liver acetone powder</i>)
LPGL	– lipaza owcza (ang. <i>lamb pregastric lipase</i>)
NPP	– pirofosfataza nukleotydów
PLAP	– proszek acetonowy z wątroby wieprzowej
PLE	– esteraza z wątroby wieprzowej
PPL	– lipaza z trzustki wieprzowej
<i>rac</i>	– racemat
<i>t</i> Bu-O-Me	– eter <i>tert</i> -butylowo-metylowy

WSTĘP

Współczesna chemia organiczna jest dynamicznie rozwijającą się dziedziną wiedzy, w której coraz powszechniej stosuje się reakcje katalizowane przez proste i złożone układy katalityczne. Niewątpliwie enzymy są biokatalizatorami o złożonej strukturze, które katalizują różnego typu reakcje chemiczne. Wysoka selektywność substratowa enzymów, jako biokatalizatorów reakcji chemicznych umożliwia uzyskanie odpowiednich produktów z wysoką chemo-, regio- i stereo- selektywnością. Dlatego też we współczesnych laboratoriach chemicznych enzymy są już stosowane w rutynowych eksperymentach, co nie budzi żadnych zastrzeżeń. Ponadto reakcje katalizowane przez enzymy spełniają wszystkie wymagania zielonej chemii, których spełnienie jest niezwykle ważne w eksperymentach laboratoryjnych i procesach przemysłowych. Zalecenia organizacji międzynarodowych idą w kierunku wprowadzania nowych metod wytwarzania związków chemicznych dla których uciążliwość środowiskowa jest niewielka. Ponieważ większość reakcji katalizowanych przez enzymy przebiega w łagodnych warunkach pod ciśnieniem atmosferycznym i w temperaturze pokojowej lub niewiele wyższej zainteresowanie procesami biokatalitycznymi rośnie. Niestety, wysoka selektywność substratowa enzymów wymusza stosowanie szerokiej gamy biokatalizatorów, które są trudno dostępne komercyjnie. Wydaje się, więc, że należy szerzej korzystać ze źródeł naturalnych, w których występują enzymy w dużych ilościach. Barię trudną do pokonania jest jednak brak wiedzy i umiejętności korzystania z tych zasobów, co jest bardzo istotnym ograniczeniem. Dlatego wydaje się celowe przedstawienie ogólnej metody wydziałania i izolowania enzymów z tkanek zwierzęcych, które są powszechnie dostępnym źródłem tych biokatalizatorów, wskazując przy tym na ich prostotę i uniwersalność. Ponieważ omówienie wszystkich klas enzymów nie jest możliwa w ramach tylko jednej publikacji w niniejszej części zostanie przedstawiona ogólna metoda izolowania enzymów z komórek zwierzęcych oraz zastosowanie hydrolaz w syntezie organicznej i biokatalizie.

W pracy przedstawiono również wybrane przykłady zastosowania enzymów rekombinowanych i immobilizowanych, które pierwotnie były wydziałone z tkanek zwierzęcych. Szczególnie immobilizacja enzymów umożliwia obniżenie kosztów procesów poprzez zwiększenie wydajności a także wielokrotne zastosowanie tego samego biokatalizatora. Ten bardzo ważny aspekt biokatalizy był omówiony uprzednio [1] i nie jest przedmiotem niniejszej pracy

1.1. ENZYMY

Enzymy są to białka o aktywności katalitycznej (oprócz rybozymów, ale nie są one przedmiotem tej pracy i zostaną pominięte), które nie zmieniają równowagi reakcji, ale przyspieszają ich przebieg dzięki obniżeniu energii aktywacji. Ogólnie akceptowany mechanizm reakcji katalizowanej przez enzym polega na

dopasowaniu substratu w miejsce aktywne enzymu, co prowadzi do powstania kompleksu enzym–substrat, który jest przekształcany w kompleks enzym–produkt i w kolejnym etapie reakcji powstały kompleks rozpada się uwalniając enzym i produkt do środowiska reakcji [2]. W obecności enzymu, będącego cząsteczką chiralną, stałe szybkości reakcji poszczególnych enancjomerów substratu różnią się. Stosunek tych stałych definiuje się, jako enancjoselektywność reakcji.

Ich aktywność, jako biokatalizatorów reakcji jest silnie regulowana. Czynniki, które najbardziej wpływają na ich aktywność katalityczną są rodzaj rozpuszczalnika, pH, temperatura oraz obecność inhibitorów i/lub aktywatorów. Najczęściej używanym rozpuszczalnikiem w reakcjach katalizowanych przez enzymy jest woda lub mieszaniny woda rozpuszczalnik organiczny. Obecnie coraz więcej reakcji tego typu przeprowadza się tylko w rozpuszczalnikach organicznych lub też w mieszaninach rozpuszczalników zawierających niewielkie ilości wody.

W zależności od typu reakcji katalizowanej przez enzym dzielimy enzymy się na sześć klas, czyli: oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, liazy, izomerazy, ligazy. Najczęściej w syntezie organicznej wykorzystywane są hydrolazy. Enzymy te katalizują reakcje rozrywania wiązań chemicznych, w których bierze udział cząsteczka wody. Dlatego też do ich efektywnego działania niezbędne jest środowisko wodne. Ostatnie dane literaturowe wskazują wyraźnie, że szereg z dotychczas opracowanych procesów biegnących w roztworach wodnych można przeprowadzić w rozpuszczalnikach organicznych, co ma ogromne znaczenie dla procesów przemysłowych [3].

1.2. OGÓLNA METODA IZOLACJI ENZYMÓW Z TKANEK ZWIERZĘCYCH

Przygotowanie surowego preparatu enzymatycznego jest proste i nie wymaga żadnego specjalistycznego sprzętu. Jest to możliwe do wykonania w każdym laboratorium. Ponadto ten sam preparat, np. proszek acetonowy z wątroby końskiej, jest źródłem wielu enzymów należących do różnych klas. Można go zastosować, jako katalizator reakcji zarówno utleniania bądź redukcji, jak i hydrolizy czy transestryfikacji.

Typowe procedury przygotowania różnych enzymów są bardzo podobne. Różnią się najczęściej rodzajem użytego rozpuszczalnika organicznego (aceton, chloroform, chlorek metylenu, metanol), pH stosowanego buforu oraz stężeniem siarczanu amonu najczęściej używanego do wysalania białka, jeżeli ten etap jest konieczny do wykonania.

Opracowano kilka metod izolowania enzymów. Ponieważ można je w dogodny sposób modyfikować warto zawsze zastosować ogólną procedurę przygotowania preparatu enzymatycznego. Dogodną metodą przygotowania takiego biokatalizatora jest procedura opracowana przez Garnera i Smitha [4]. Autorzy zaproponowali następujący sposób uzyskania surowego preparatu zawierającego lipazę z trzustki wieprzowej (PPL). Zamrożoną trzustkę wieprzową pocięto na kawałki i homogenizowano z acetonem. Następnie homogenat był wirowany, a uzyskany osad przemyto

dwukrotnie zimnym acetonem, ponownie wirowano i suszono w eksykatorze pod zmniejszonym ciśnieniem. Tak otrzymany proszek acetonowy może być bezpośrednio zastosowany, jako biokatalizator do reakcji. Kolejne etapy oczyszczania polegały na dwukrotnym ługowaniu proszku acetonowego układem chloroform/metanol (2:1) i wirowaniu. Tak uzyskany osad przemyto acetonem oraz eterem i następnie suszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Tak uzyskany proszek acetonowy można poddać kolejnym etapom oczyszczania. Każdy z nich jest charakterystyczny dla określonego enzymu, ale należy zauważyć, że nie gwarantuje to uzyskania biokatalizatora bardziej aktywnego. Co więcej, znane są przypadki tracenia aktywności przez enzym po jego dokładnym oczyszczeniu. Dlatego też do katalizowania reakcji używa się często właśnie proszków acetonowych, gdyż są one dużo tańsze niż oczyszczone enzymy, a ich własności katalityczne są znakomite i często przewyższają komercyjnie dostępne biokatalizatory. Wynika to, między innymi, z obecności w surowych ekstraktach różnych związków, które pełnią rolę kofaktorów, np. jony metali, aktywatorów bądź związków stabilizujących strukturę enzymów.

2. WYBRANE ZASTOSOWANIA HYDROLAZ

Hydrolazy są enzymami katalizującymi rozpad wiązań chemicznych w cząsteczkach związków chemicznych z udziałem cząsteczek wody i co jest niezmiernie ważne, nie wymagają stosowania kofaktorów. Ponadto hydrolazy zachowują wysoką aktywność katalityczną nie tylko w wodzie a także w układach woda/rozpuszczalnik organiczny lub tylko w rozpuszczalnikach organicznych. Dlatego też są najczęściej używanymi biokatalizatorami w syntezie organicznej. Każda klasa enzymów dzieli się na podklasy. Dla hydrolaz podział zależy od rodzaju hydrolizowanego wiązania. Najważniejsze dla syntezy organicznej podklasy hydrolaz to: esterazy, lipazy, glikozydazy, proteazy.

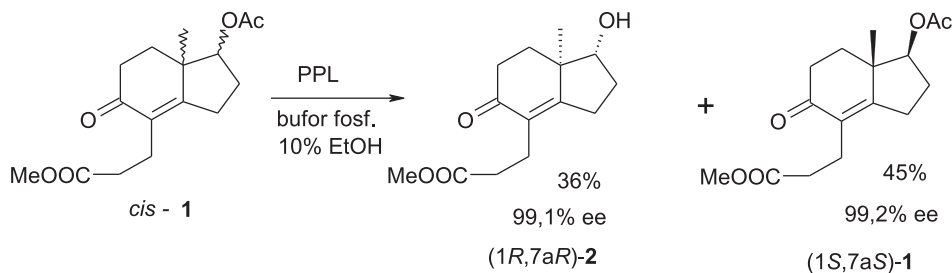
2.1. LIPAZY

Lipazy są często stosowane w syntezie z uwagi na ich wysoką enancjoselektywność i szeroką specyficzność substratową. Mają różnorodne zastosowania [5]. Dużo biologicznie czynnych związków (jak antybiotyki, nukleotydy, pestycydy) było syntetyzowanych z użyciem lipaz, jako biokatalizatorów [6]. Wśród zwierzęcych lipaz lipaza z trzustki wieprzowej (PPL) jest najbardziej użyteczną i łatwą do przygotowania [4]. Aktywność biochemiczna lipazy trzustkowej w organizmie jest dobrze znana [7].

2.1.1. Zastosowania PPL w biokatalizie

a) a) Lipaza z trzustki jest szeroko stosowana w reakcjach hydrolizy estrów alkoholi pierwszo- i drugorzędowych:

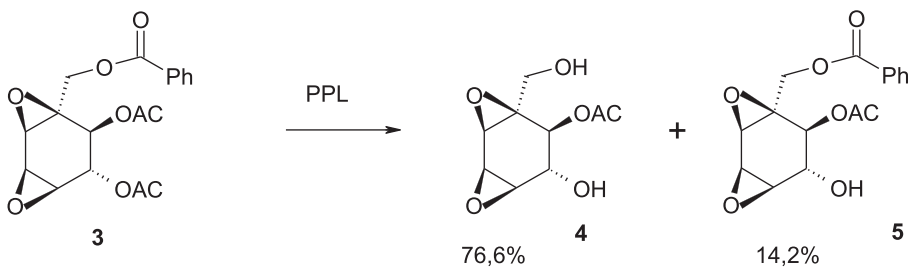
Hydroliza estrów alkoholi drugorzędowych z zastosowaniem PPL jako biokatalizatora przebiega często bez naruszania ugrupowania estrowego alkoholu pierwszorzędowego [8], czyli jest chemoselektywna. Na Schemacie 1 przedstawiono chemoselektywną reakcję hydrolizy tylko jednego z dwóch obecnych w cząsteczce substratu **1** wiązań estrowych. Produkt **2** jest ważnym substratem do syntezy steroidów jak estradiol, oesteron [8].



Schemat 1
Scheme 1

Enancjoselektywność tej reakcji była bardzo wysoka, większa niż 1000. Kilka bakteryjnych i grzybowych lipaz było również badanych, ale odpowiednie produkty otrzymano z niską wydajnością i bardzo niskimi nadmiarami enancjomerycznymi.

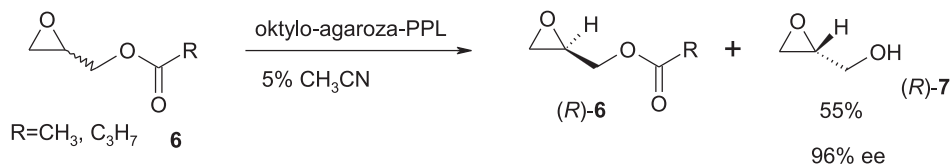
Krotepoksyd (**3**) jest związkiem naturalnym, bardzo trudnym do uzyskania w syntezie organicznej, ponieważ posiada trzy grupy estrowe i dwa pierścienie epoksydowe o zdefiniowanej konfiguracji. Cykloheksanole uzyskane z hydrolizy tego związku są ważnymi związkami biologicznie czynnymi oraz prekursorami leków. Zastosowanie PPL do hydrolizy wiązań estrowych w związku **3** umożliwiło uzyskanie tylko dwóch produktów, których pierwszy posiadający strukturę **4** otrzymano z wydajnością 76,6% a drugi związek **5** z wydajnością 14,2% [9]. Reakcja była regio- i chemoselektywna.



Schemat 2
Scheme 2

Po przeanalizowaniu składu uzyskanych produktów można sądzić, że PPL najpierw hydrolizuje grupę 3-OAc, a następnie grupę 7-OBz. Kolejne badania pokazały, że lipazy mikrobiologiczne z *Mucor miehei* i *Pseudomonas cepacia* katalizują hydrolizę tych samych wiązań estrowych związku **3**. Próby zastosowania lipaz z innych mikroorganizmów nie powiodły się, gdyż okazało się, że hydrolizowane są wszystkie trzy wiązania estrowe substratu **3** lub też reakcje nie przebiegają.

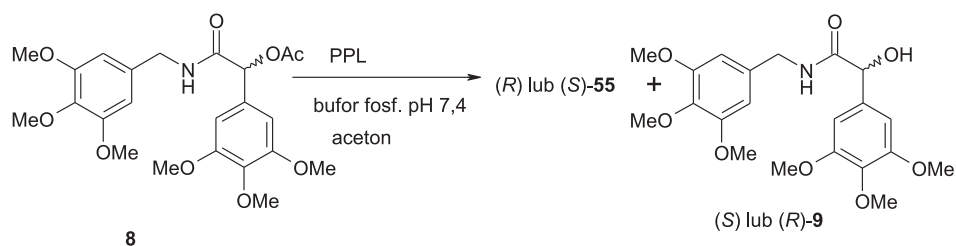
Istotnym problemem w syntezie organicznej jest uzyskanie enancjomerycznie czystych estrów zawierających pierścień epoksydowy. Hydroliza takich estrów bez rozrywania pierścienia epoksydowego jest możliwa z zastosowaniem lipazy z trzustki wieprzowej. Otrzymano w ten sposób enancjomer (*R*)-glicydołu (**7**) z wydajnością 55% i nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 96% [10]. Ten związek jest używany do syntezy enancjomerycznie czystych 3-aryloksy-1,2-propanodiolu, ważnych dla przemysłu farmaceutycznego [11]. Ponadto jest on substratem do syntezy kwasu 3-(4-metoksyfenylo)glicydowego z którego produkuje się diltiazem – lek będący antagonistą receptorów wapnia.



Schemat 3
Scheme 3

Zastosowano różne procedury immobilizacji tego enzymu takie jak: immobilizacja na żelu oktylo-agarozą, fenylo-agarozą oraz oktadecylo-polimetakrylat. W przypadku użycia biokatalizatora na żelu oktylo-agarozowym konwersja była największa, a enancjoselektywność dla estru butylowego wynosiła około 30.

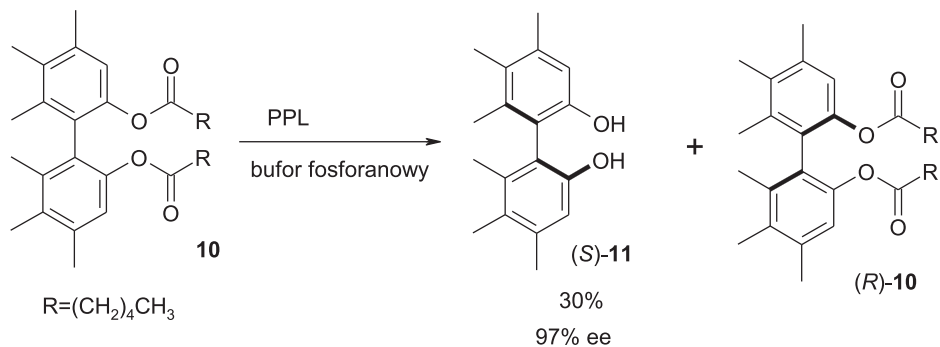
PPL zastosowano również, jako katalizator reakcji hydrolizy α -acetoksyamidów [12], przykład takiego procesu przedstawiono na Schemacie 4. Związek **9** jest analogiem podofilotoksyny, która ma własności antynowotworowe.



Schemat 4
Scheme 4

W przypadku stosowania natywnego enzymu reakcja trwała 7 godzin, konwersja wyniosła 48% a enancjoselektywność $E = 3,5$. Gdy zastosowano enzym immobilizowany w alginianie wapnia czas reakcji wydłużył się do 20 godzin, a konwersja obniżyła się do 41%, ale enancjoselektywność reakcji wzrosła do 5,1.

b) Również estry fenoli i bifenoli (takich jak związek **10**) są hydrolizowane z wysoką enancjoselektywnością dzięki zastosowaniu PPL [13].

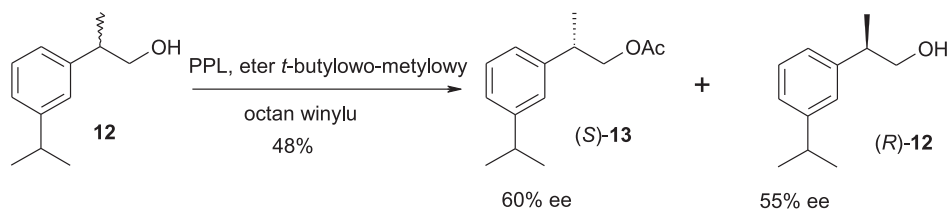


Schemat 5
Scheme 5

Związek **11** otrzymano z dobrą wydajnością i nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 97%. Enancjoselektywność tej reakcji była wysoka, powyżej 100. Inne lipazy również były badane, ale otrzymywano produkt **11** ze znacznie mniejszą wydajnością. Drugi enancjomer był otrzymany z podobną enancjoselektywnością przez chemiczną hydrolizę pozostałego po reakcji enzymatycznej nieprzereagowanego diestru o konfiguracji R.

c) Lipaza z trzustki wieprzowej jest bardzo często stosowanym biokatalizatorem w reakcjach transestryfikacji. Reakcje takie przeprowadza się w rozpuszczalnikach organicznych, gdyż w środowisku wodnym przebiegają reakcje hydrolityczne. Pierwszorzędowe i drugorzędowe alkohole są acetylowane z dobrą enancjoselektywnością.

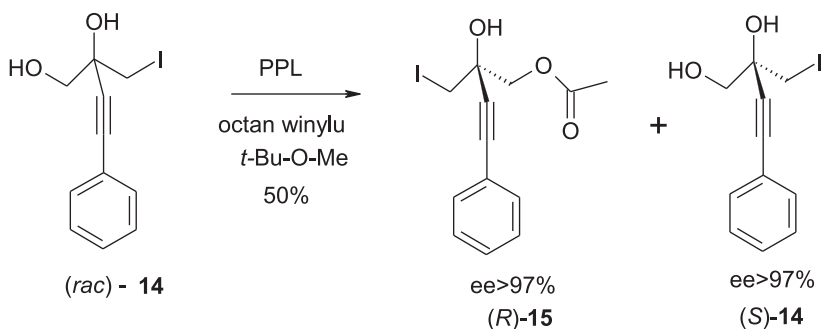
PPL zastosowano do syntezy enancjomerycznie wzbogaconych oraz enancjomerycznie czystych związków zapachowych (Schemat 6) [14].



Schemat 6
Scheme 6

Produkty otrzymano z bardzo dobrą wydajnością i nadmiarami enancjomerycznymi wynoszącymi 60% dla estru **13** i 55% dla alkoholu (*R*)-**12**. Aby uzyskać wyższe nadmiary enancjomeryczne nieprzereagowany alkohol był ponownie poddany reakcji transestryfikacji, w wyniku czego jego nadmiar enancjomeryczny wzrósł do 99%. Ester octowy był chemicznie hydrolizowany (wodorotlenek potasu w metanolu) do alkoholu, który poddano kolejnej reakcji transestryfikacji z PPL jako katalizatorem. Nadmiar enancjomeryczny octanu wyniósł 99%. Alkohol (*R*)-**12** i octan **13** były następnie przekształcane w stereoizomery florhydralu, które mają różne zapachy (znacznie silniejsze niż zapach racemicznego florhydralu) i są stosowane w przemyśle kosmetycznym.

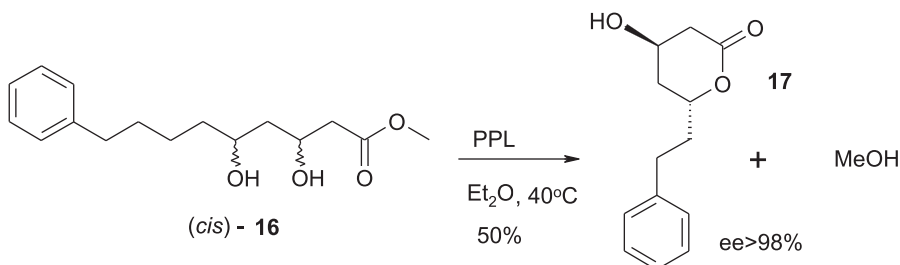
W przypadku dioli z pierwszorzędowymi i trzeciorzędowymi grupami hydroksylowymi, acetylowane są tylko grupy pierwszorzędowe [15]. Jest to typowe dla katalizowanych enzymatycznie reakcji acetylowania. Metodę tę zastosowano do otrzymywania chiralnych trzeciorzędowych alkoholi (*S*)-**14**, co pokazano na Schemacie 7. Produkty tej reakcji są stosowane w syntezie metabolitów ze ścieżki biosyntezy witaminy D₃ lub analogów prostaglandyny.



Schemat 7
Scheme 7

Produkt **15** i nieprzereagowany substrat (*S*)-**14** uzyskano z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi, powyżej 97%. Enancjoselektywność tej reakcji jest bardzo wysoka, powyżej 1000.

PPL zastosowano również jako biokatalizator transestryfikacji wewnątrzcząsteczkowej [16], w wyniku której powstają laktony. Lakton statyny (**17**) jest używany w produkcji leków, takich jak lowastatyna i simwastatyna, które obniżają poziom cholesterolu we krwi.

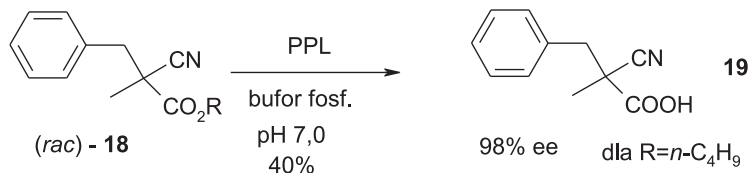


Schemat 8
Scheme 8

Zastosowanie enzymu zwierzęcego umożliwiło otrzymanie produktu **17** z wysoką wydajnością i nadmiarem enancjomerycznym przewyższającym 98%. Wydajność zwiększono z 25% do 50% stosując stałą matrycę – sita molekularne usuwające wodę z natywnego enzymu. W przypadku stosowania lipaz z mikroorganizmów odpowiedni produkt otrzymano z niższą wydajnością.

d) Typowym zastosowaniem PPL jest użycie tego enzymu, jako biokatalizatora hydrolizy estrów prowadzącej do chiralnych kwasów:

Kwasy 2-cyano-2-metylo-podstawione (**19**) otrzymano z wysoką enancjoselektywnością (większą niż 150) stosując PPL, jako biokatalizator [17]. Obecność dwóch grup funkcyjnych w bezpośrednim sąsiedztwie grupy karboksylowej powoduje, że są to związki bardzo użyteczne w syntezie organicznej.



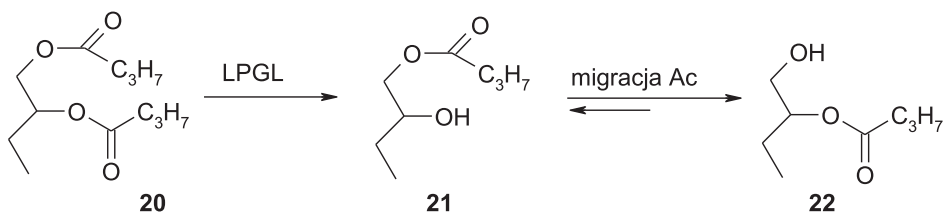
Schemat 9
Scheme 9

Autorzy nie określili konfiguracji absolutnej hydrolizowanego enancjomeru. Enancjoselektywność zależy od rodzaju grupy alkoksylowej R estrze będącym substratem reakcji (**18**). Odpowiednie produkty otrzymano z wydajnościami od 13 do 51% oraz nadmiarami enancjomerycznymi zmieniającymi się w zakresie 79–98%. Reakcję, w której otrzymano najlepszą enancjoselektywność przedstawiono na Schemacie 9. Enzymy mikrobiologiczne nie były przydatne w tej reakcji, gdyż produkty otrzymano ze znacznie niższymi nadmiarami enancjomerycznymi.

2.1.2. Inne lipazy

Również lipazy z różnych gatunków ryb [18], owczych organów [19], brązowego tłuszczu szczura [20] oraz psiej trzustki [21] były izolowane i oczyszczane. W większości przypadków do homogenizacji używano acetonu. Aktywności enzymatyczne były mierzone odpowiednio dla palmitynianu *p*-nitrofenyłu, triacylogliceroli, trioleiny i tributyriny jako substratów, zatem prawdopodobnie reakcje związków podobnych do tych mogą być katalizowane przez wymienione lipazy. Zwłaszcza surowy ekstrakt lipazy z psiej trzustki wykazywał dużą aktywność i jest potencjalnie użyteczny w biotransformacjach.

Lipazę z narządów owczego przewodu pokarmowego zastosowano do katalizowania hydrolizy 1,2-propanodiolu (**20**) [22].



Schemat 10
Scheme 10

W stanie równowagi 1-monoester (**21**):2-monoester (**22**) występują w stosunku 33,2:66,8. Przeniesienie reszty acylowej w drugim etapie jest obserwowane również bez obecności enzymu. Pozycja 2 jest preferowana przez lipazę prawdopodobnie dlatego, że jest bardziej hydrofobowa.

2.2. ESTERAZY

Mechanizm katalizowania reakcji przez esterazy jest dobrze znany [23], a ich bardzo liczne zastosowania zostały opisane [24]. Znanych jest bardzo wiele esteraż pochodzenia mikrobiologicznego, jednak niewiele z nich ma zastosowanie w syntezie. Natomiast esterazy zwierzęce są szeroko wykorzystywane. Własności oraz zastosowania najbardziej popularnej z nich, esterazy z wątroby wieprzowej, zostały zestawione i opisane [25].

Esterazy izolowano z wątroby różnych zwierząt, najczęściej świni i konia. Są używane głównie jako proszki acetonowe. Procedury przygotowania proszków acetonowych z wątroby różnych zwierząt są podobne [26]. Są również podobne do standardowej procedury podanej w rozdziale 2.2., ale prostsze od niej. Do homogenizacji tkanki używa się zimnego acetonu, po wirowaniu osad suszy się i rozciera, nie ma kolejnych etapów ekstrakcji.

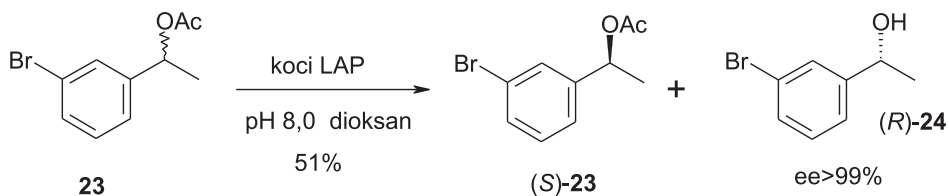
Esteraza z wątroby wieprzowej (PLE) jest enzymem występującym w postaci kilku izoenzymów. Wszystkie one mają aktywność esterazy, zatem nie ma sensu oczyszczanie ich do pojedynczych białek i następnie łączenie. Lepiej zastosować surowy proszek acetonowy, który zawiera wszystkie izoenzymy obecne w danej tkance, ma taką samą specyficzność substratową, a jest go o wiele łatwiej otrzymać.

PLE została sklonowana i eksprymowana w drożdżach *Pichia pastoris* [27]. Uzyskano rekombinowane izoenzymy inne niż γ -PLE które posiadały wyższą aktywność specyficzną w reakcji hydrolizy (*R*)-metylo-(4*E*)-5-chloro-2-izopropyl-4-pentenianu (enantjoselektywność powyżej 200), niż surowe PLE. Mutanty PLE również były eksprymowane [28]. Dają one lepszą enantjoselektywność podczas hydrolizy 1-fenyl-1-etylooctanu i preferują inny enancjomer 1-fenyl-3-butylooctanu niż enzym natywny.

2.2.1. Zastosowanie esteraz zwierzęcych, jako katalizatorów reakcji chemicznych

a) Esterazy są bardzo popularnymi katalizatorami hydrolizy estrów, w wyniku, której otrzymuje się chiralne alkohole drugorzędowe:

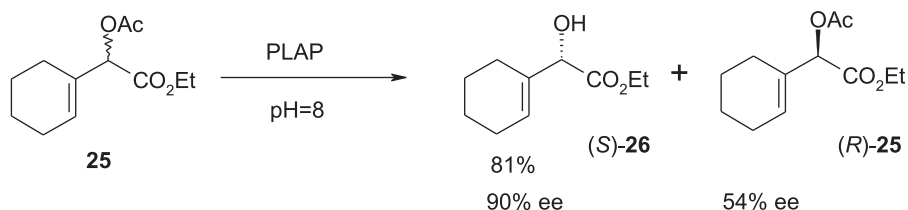
Pochodne 1-fenyletanolu i 1-fenylpropanolu były rozdzielane z użyciem proszków acetonowych z krowy, kota, kurczaka, indyka, owcy, świni i szczura [29]. Przykład takiej reakcji przedstawiono na Schemacie 11. Powstające w ten sposób chiralne alkohole (np. związek **24**) są jednostkami budulcowymi w syntezie leków oraz chemikaliów stosowanych w rolnictwie.



Schemat 11
Scheme 11

1-(3-Bromofenyl)etanol (**24**) otrzymano z wydajnością 51% i świetnym nadmiarem enancjomerycznym, powyżej 99%. Reakcje prowadzono z dodatkiem różnych rozpuszczalników organicznych. W zależności od źródła enzymu, zastosowanie innych rozpuszczalników dawało optymalne rezultaty. W większości przypadków produkty otrzymano z dobrą wydajnością i nadmiarami enancjomerycznymi powyżej 80%. We wszystkich przypadkach otrzymano alkohol o konfiguracji *R*, niezależnie od gatunku, z którego pochodził enzym.

Synteza α -hydroksy- β,γ -nienasyconych estrów (**26**) z zastosowaniem proszku acetonowego z wątroby wieprzowej została opisana przez Vankara i współpracowników [30]. Produkty były używane do syntezy chiralnych epoksydów winylowych.

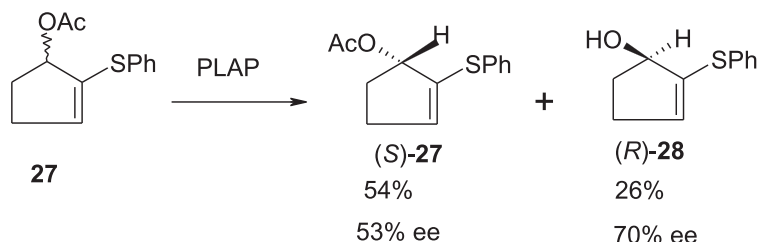


Schemat 12
Scheme 12

W tej reakcji enzym hydrolizuje wiązanie estrowe, w którym bierze udział alkohol drugorzędowy, a pozostawia nienaruszone wiązanie z alkoholem pierwszorzędowym. Jest to powszechne zjawisko w przypadku hydrolizy enzymatycznej. Produkt **26** otrzymano z wydajnością 81% i nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 90%. Odzyskano również wzbogacony enancjomerycznie substrat (*R*)-**25**.

LAPy zastosowano również do rozdziału estrów z innymi grupami funkcyjnymi:

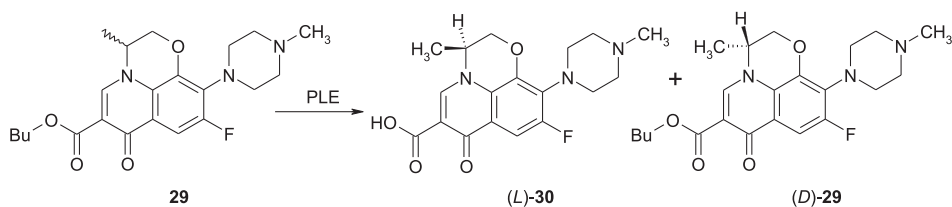
Reakcje octanów fenylotycykloalkenylów (**27**) [31] przebiegają z niewielką enancjoselektywnością (około 10), jednak było to wystarczające, aby wykorzystać otrzymane produkty do dalszej syntezy użytecznych związków chemicznych.



Schemat 13
Scheme 13

Produkt **28** otrzymano z umiarkowaną wydajnością i nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 70%. Po przeprowadzeniu reakcji z analogami substratu **27** stwierdzono, że wpływ grupy fenylsulfidowej na przebieg hydrolizy zmniejsza się, gdy znajduje się ona dalej od centrum stereogenicznego.

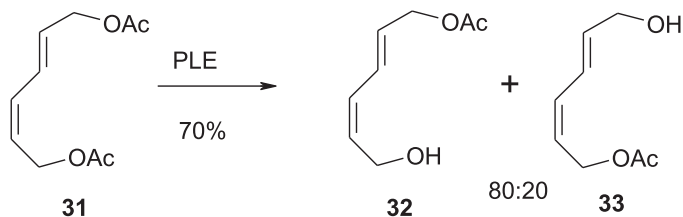
Immobilizowana PLE była zastosowana w reakcji hydrolizy estru butyloвого ofloksacyny (**29**) do chiralnej lewofloksacyny (**30**) [32]. Jest to antybiotyk z grupy leków fluorochinolonowych. Lewofloksacyna jest znacznie aktywniejsza biologicznie niż forma *D*, ponadto *D*-ofloksacyna może być toksyczna przy dłuższym stosowaniu, dlatego ważne jest otrzymanie izomeru *L*.



Schemat 14
Scheme 14

Produkt otrzymano z nadmiarem enancjomerycznym ok. 60%. Centrum stereogeniczne znajduje się daleko od centrum reakcji, mimo to wykazano, że ma wpływ na enancjoselektywność reakcji. W kolejnym etapie badań enzym był immobilizowany w alginianie, żelu poliakrylamidowym i przez adsorpcję. Dwie pierwsze metody umożliwiły uzyskanie biokatalizatorów, które zastosowane w powyższej reakcji katalizowały powstawanie produktu z podobnym nadmiarem enancjomerycznym, co w przypadku stosowania natywnego enzymu (53–60%). Adsorpcja okazała się tym razem metodą zmieniającą własności enzymu tak, iż stał się nieprzydatny jako biokatalizator.

b) Zastosowano PLE do regioselektywnej hydrolizy octanów dioli (**31**) [33].

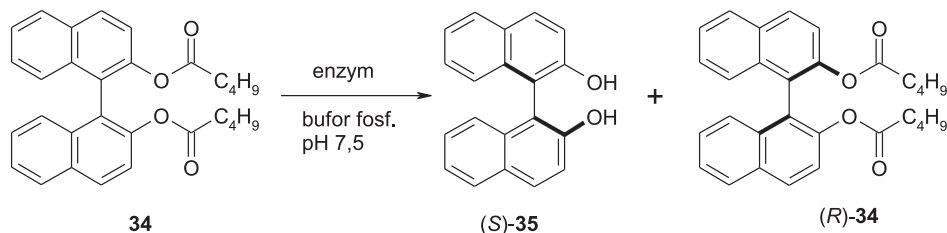


Schemat 15
Scheme 15

Badania wykazały, że wiązanie estrowe w pobliżu wiązania podwójnego o konfiguracji *Z* było łatwiej hydrolizowane przez enzym pochodzenia zwierzęcego, powstaje głównie związek **32** (*Z:E* 80:20). Lipaza z grzyba *Mucor miehei* preferuje hydrolizę drugiego wiązania estrowego, głównie otrzymano związek **33** (*Z:E* 20:80). Mikrobiologiczne lipazy były używane do acetylowania dioli, a PLE była najlepszym enzymem do przeprowadzenia selektywnej hydrolizy.

c) Zastosowanie proszków acetonowych do enancjoselektywnej hydrolizy estrów fenoli:

Proszek acetonowy z trzustki wieprzowej katalizuje hydrolizę dipentanianu 1,1'-bi-2-naftyłu (**34**) [34]. Enancjomery binaftolu w kompleksie z tytanem znalazły zastosowanie, jako katalizatory np. w reakcji Friedela-Craftsa z fluoranem [35] lub w reakcji utleniania sulfidów [36].



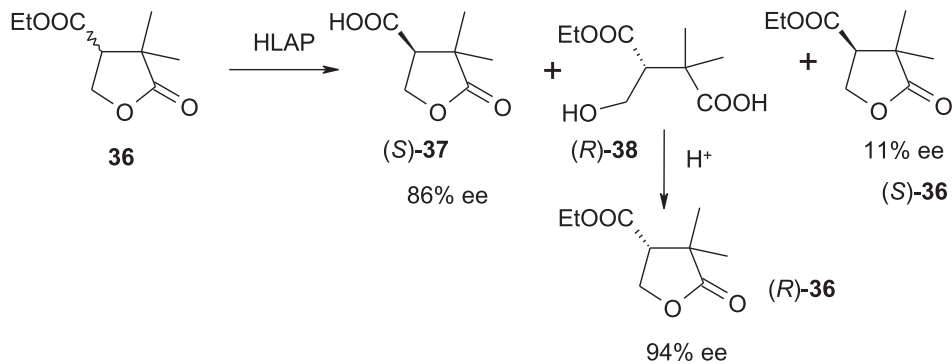
Schemat 16
Scheme 16

W wyniku reakcji enzymatycznej otrzymano (*S*)-bi-2-naftol (**35**) z wydajnością 64–67%. (*R*)-Bi-2-naftol otrzymano stosując chemiczną hydrolizę nieprzereagowanego estru **34** (metanol i wodorotlenek sodu). Po krystalizacji z toluenu czystość chemiczna i optyczna były większe niż 99%.

d) Enancjoselektywna hydroliza estrów z użyciem proszków acetonowych z wątroby jako biokatalizatorów, w wyniku której otrzymuje się optycznie czynne kwasy i estry:

Hydroliza może przebiegać bez otwierania pierścienia laktonu [37]. Powstający (*4R,5R*)-4-karboksy-5-pentyl- γ -butyrolakton jest prekursorem związku naturalnego; kwasu (-)-fazeolinowego. Używano tu proszku acetonowego z wątroby wieprzowej, gdyż esterazy mikrobiologiczne bądź z innych zwierząt nie katalizują tej reakcji lub produkt powstaje z bardzo małym nadmiarem enancjomerycznym.

HLAP zastosowano także do syntezy pochodnych kwasu parakonowego [38], co przedstawiono na Schemacie 17.



Schemat 17
Scheme 17

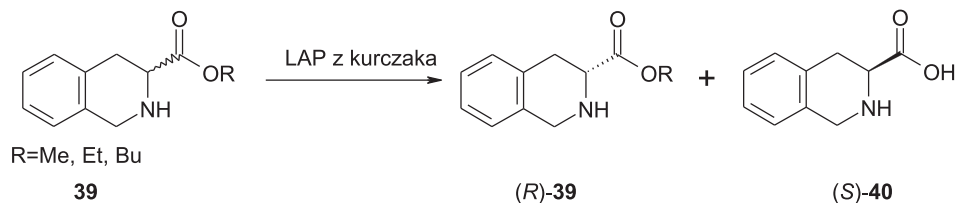
Produkt hydrolizy, czyli lakton z wolną grupą karboksylową (**37**) otrzymano z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 86%. (*S*)-lakton **36** był obecny w mieszaninie reakcyjnej, ale jego nadmiar enancjomeryczny był niewielki. Natomiast (*R*)-lakton **36** wyizolowano po dodaniu kwasu do uzyskania pH = 2, z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 94%. Lipazy mikrobiologiczne nie wykazywały regioselektywności i hydrolizowały pierścień laktonowy, natomiast zastosowanie proszku acetonowego z wątroby końskiej (HLAP) umożliwiło otrzymanie optycznie czynnego laktonu.

Hydroliza laktonu bez rozrywania innych wiązań estrowych również jest możliwa dzięki zastosowaniu HLAP:

Kiedy γ -butyrolakton jest podstawiony grupą alkilową w pozycji 5, wiązanie laktonowe jest tworzone przez alkohol drugorzędowy i zachodzi jego enzymatyczna hydroliza [39]. HLAP hydrolizuje substraty o konfiguracji *cis*, mimo że tego typu związki nie są dobrymi substratami do enzymatycznej hydrolizy. Enzymy z innych źródeł katalizowały nieenancjoselektywną hydrolizę.

W przypadku 5-arylopodstawionych parakonianów PPL i α -chymotrypsyna nie są selektywne. Natomiast gdy zastosowano HLAP nieprzereagowane estrы wyizolowano z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi [40]. Hydroliza laktonów o konfiguracji *trans* jest szybsza, ale nie regioselektywna, otrzymuje się mieszaninę kwasów.

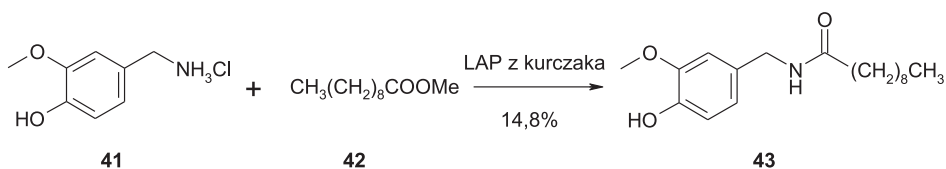
Zastosowanie krurzego LAPu do rozdziału estrów kwasu 1,2,3,4-tetrahydroizochinolino-3-karboksylowego (**40**) [41] przedstawiono na Schemacie 18. Kwas **40** jest jednostką budulcową biologicznie czynnych peptydów oraz inhibitorów enzymów, np. proteazy HCV [42] lub metaloproteinazy występującej w matrix [43].



Schemat 18
Scheme 18

Autorzy twierdzą, że produkty (*R*)-**39** i **40** otrzymali z wysoką wydajnością i świetnymi nadmiarami enancjomerycznymi, niezależnie od reszty alkoholu w substracie **39**, ale nie podają konkretnych wartości. Inne proszki acetonowe, PPL i lipaza z *Candida cylindracea* prowadziły do powstania produktów z mniejszymi nadmiarami enancjomerycznymi. Wydajność nie zależy od rodzaju alkoholu w hydrolizowanym estrze.

Proszki acetonowe zastosowano też do syntezy amidów z chlorowodorków amin i estrów (Schemat 19).

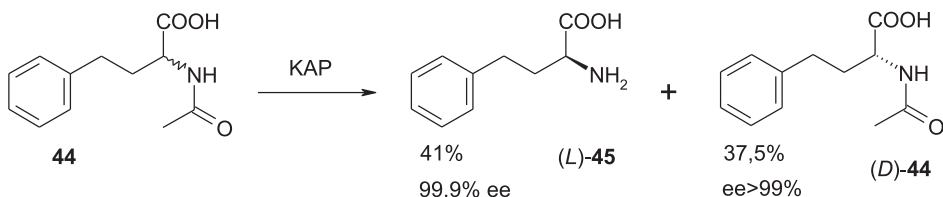
Schemat 19
Scheme 19

Bez dodatku enzymu do środowiska reakcji nie powstawał żaden produkt. Zastosowanie LAP pozwoliło otrzymać amidy **43** będące analogami kapsaicyny, które mają własności przeciwbólowe [44] i wpływają na przewodzenie bodźców nocycyptywnych [45]. Były otrzymywane z chlorowodoru wanilylaminu (**41**) oraz estrów metylowych różnych kwasów tłuszczowych (**42**) [46]. Enzym katalizuje formowanie nowego wiązania amidowego, co jest zupełnie różne od innych reakcji, w których był stosowany i pokazuje jak szerokie jest spektrum możliwych zastosowań. Produkt otrzymano z niską wydajnością, ale reakcja przebiegała w łagodnych warunkach i nie trzeba było stosować żadnych toksycznych reagentów.

2.3. L-AMINOACYLAZA Z NEREK SSAKÓW

Przygotowanie proszków acetonowych z nerek (KAP) zostało opisane przez Regła i współpracowników [47]. Jest to ta sama metoda, co do przygotowania proszków z wątroby. Tę procedurę zaadaptowano do przygotowania proszków z nerek wołowych, psich, wieprzowych, szcurzych i owczych.

Proszki acetonowe z nerek są wykorzystywane głównie do otrzymywania optycznie czynnych aminokwasów, np. *L*-homofenyloalaniny (**45**). Ester etylowy *L*-homofenyloalaniny jest stosowany do syntezy Benazeprilu, inhibitora ACE (acetylocholinoesterazy) [48].

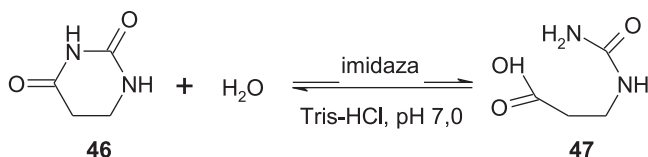
Schemat 20
Scheme 20

Stwierdzono, że KAP wołowy ma największą aktywność specyficzną i przy jego zastosowaniu uzyskano najlepsze rezultaty w powyższej reakcji. Produkty **45** i (*D*)-**44** otrzymano z wysokimi wydajnościami i nadmiarami enancjomerycznymi bliskimi 100%.

Wieprzowa aminoacylaza 1 była eksprymowana w *Escherichia coli*, konstruowano też różne mutanty tego enzymu [49]. Pozwoliło to odkryć mechanizm katalityczny i budowę miejsca aktywnego tej metaloproteiny. Dzięki temu nowe substraty dla tego enzymu mogą być projektowane *in silico*.

2.4. IMIDAZY

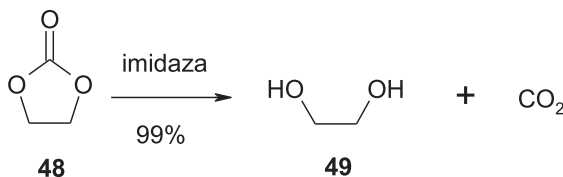
Imidazy to enzymy katalizujące reakcję hydrolizy wiązania imidowego, głównie w związkach cyklicznych, np. dihydrouracylu (**46**). Były izolowane z wątroby szczurzej [50], wieprzowej [51] i wołowej [52]. Procedury były podobne, polegały na ekstrakcji enzymu z proszku acetonowego za pomocą buforu (w odróżnieniu od podanej ogólnej procedury, gdzie ekstrahowano proszki rozpuszczalnikami organicznymi). Enzym (nazywany również dihydropirymidynazą) katalizuje reakcje hydrolizy 5-, 6- i 7-członowych pierścieni imidów oraz diacetamidu. Amidy, estry i *N*-podstawione imidy nie są hydrolizowane przez imidazy.



Schemat 21
Scheme 21

Stwierdzono, że produkt hydrolizy dihydrouracylu (**46**) – *N*-karbamyl- β -alanina (**47**) jest inhibitorem tego enzymu.

Imidaza ze szczurzej wątroby ma również zdolność katalizowania reakcji hydrolizy cyklicznych organicznych węglanów jak węglan etylenowy (**48**), który jest hydrolizowany do glikolu etylenowego (**49**) [53]. Jest to reakcja nietypowa dla tego enzymu, gdyż hydrolizowane jest wiązanie estrowe, a nie imidowe.



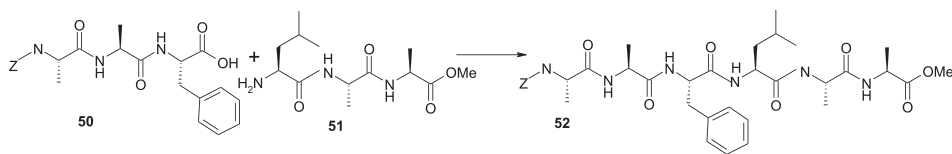
Schemat 22
Scheme 22

2.5. PEPSYNA

Pepsyna i trypsina to proteazy, czyli enzymy hydrolizujące wiązania peptydowe.

Surowe ekstrakty pepsyny były przygotowywane z żołądków różnych zwierząt, np. ryb [54] (homogenizacja z acetonem, zawieszenie w buforze o pH 6 i liofilizacja) i indyka [55] (ekstrakcja z użyciem HCl).

Enzym ten zastosowano jako katalizator syntezy peptydów [56]. Pepsyna immobilizowana na Celicie wykazywała aktywność syntazy w rozpuszczalnikach organicznych, jak acetonitryl, chlorek metylenu, etanol. Przykład syntezy peptydu z zastosowaniem pepsyny podano poniżej:



Schemat 23
Scheme 23

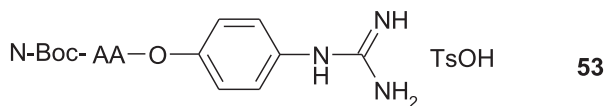
Wydajność wyniosła 90%. Metoda była efektywna w syntezie hydrofobowych peptydów, które nie mogą być syntetyzowane w rozpuszczalnikach wodnych.

2.6. TRYPSYNA

Ekstrakty trypsyny były izolowane z wnętrzości różnych gatunków ryb [57]. Wszystkie procedury były podobne (homogenizacja śledziona z acetonem, wirowanie, zawieszenie w buforze Tris-HCl i liofilizacja oraz czasem frakcjonowanie siarczanem amonu).

Trypsyna zwykle katalizuje hydrolizę wiązań peptydowych i jest często używana do dzielenia białek na mniejsze peptydy przed ich analizą w spektrometrze masowym. Jednak enzym ten ma również inne własności katalityczne. Trypsyna była użyta do badania kinetyki hydrolizy pochodnych aminokwasów: estrów metyloowych chlorowodorów *L*-argininy, *L*-homoargininy i *L*-ornityny [58]. Stwierdzono, że acylowanie enzymu jest szybkie, a deacylowanie kompleksu enzym-substrat jest etapem limitującym. Ester argininy był najlepszym substratem, zaś ester ornityny był hydrolizowany najwolniej i z najmniejszą stereoselektywnością.

Również hydroliza *p*-guanidynofenylowych estrów aminokwasów (53) i peptydów była przeprowadzana z użyciem trypsyny [59] (na Rysunku 1 skrót AA oznacza resztę aminokwasową).



Rysunek 1
Figure 1

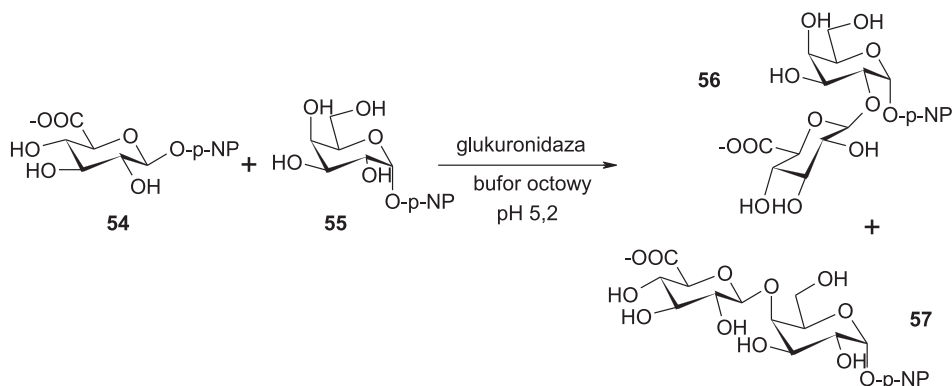
Badania wykazały, iż takie pochodne *D*- i *L*-aminokwasów mają duże powinowactwo do trypsyny, podobne do powinowactwa dla typowych substratów (*L*-lizyny i *L*-argininy). Natomiast *D* aminokwasy są wolniej acylowane niż enancjomery *L*.

2.7. HYDROLAZY ALDOHEKSOZ

Są to enzymy hydrolizujące wiązania glikozydowe pomiędzy resztami cukrowymi. Można je również stosować do reakcji syntezy oligosacharydów. Przykłady takich zastosowań przedstawiono poniżej.

2.7.1. β -Glukuronidaza

β -Glukuronidaza z wątroby wołowej była biokatalizatorem użytym w syntezie disacharydów zawierających β -*D*-glukuronian [60].



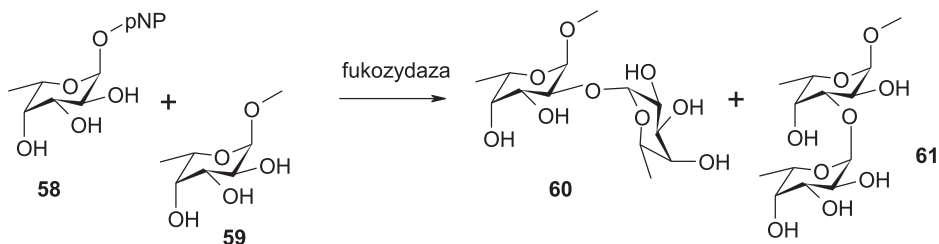
Schemat 24
Scheme 24

p-Nitrofenylo- β -*D*-glukuronian (54) był użyty jako donator, a *p*-nitrofenylo-galaktopiranoza (55) jako akceptor. Produkty 1 \rightarrow 2 (56) i 1 \rightarrow 4 (57) otrzymano z wydajnością 21% i 16%. Substraty zawierają po kilka grup hydroksylowych, zatem jest dużo teoretycznie możliwych produktów. Powstawanie tylko dwóch z nich świadczy o bardzo dużej selektywności enzymu. Powstało 40% produktów transglikozylacji, co jak na enzym hydrolityczny jest dobrym wynikiem.

2.7.2. α -L-Fukozydaza

α -L-Fukozydaza była izolowana z kilkunastu zwierząt (gadów, płazów, ptaków i ssaków) [61]. U różnych gatunków różne tkanki były bogate w ten enzym, głównie wątroba, nerki, śledziona. Stężenie tego enzymu w organizmie jest niewielkie i uzyskanie dostatecznie czystego do przeprowadzenia reakcji enzymu wymagało dokładnego oczyszczenia metodami chromatograficznymi.

α -L-Fukozydaza z mięczaków i psa ma aktywność trans glikozydazy [62]. Donorem fukozy był *p*-nitrofenylo- α -L-fukopiranozyd (58). Jako akceptory stosowano różne zmetylowane cukry. Typową reakcję przedstawiono na Schemacie 25.

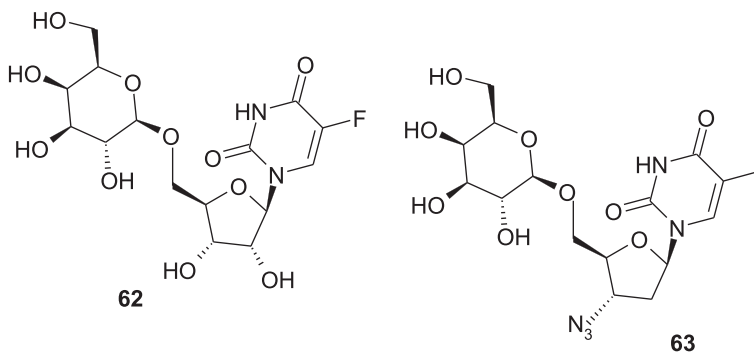


Schemat 25
Scheme 25

Najlepszymi akceptorami były zmetylowana α -L-fukoza (α -L-Fuc-O-Me, **59**) i zmetylowana β -D-galaktoza (β -D-Gal-O-Me). Regioselektywność zależy od akceptora: w przypadku α -L-Fuc-O-Me produkty 1 \rightarrow 2 (**60**) i 1 \rightarrow 3 (**61**) powstawały w proporcji 45/55, w przypadku β -D-Gal-O-Me produkty 1 \rightarrow 2, 1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6 otrzymano w proporcji 45/42/13. W drugim przypadku izolowano nie tylko di-, ale też tri- i tetrasacharydy. Posiadały one resztę fukozy w różnych pozycjach.

2.7.3. β -Galaktozydaza

β -Galaktozydazę zastosowano do syntezy β -galaktozylowanych pochodnych nukleozydów (Rys. 2), które mają aktywność antynowotworową i anty HIV [63]. Mimo że grupa 5'-hydroksylowa w nukleozydach jest nieaktywna, β -galaktozydaza z mięczaka pozwoliła otrzymać 5'- β -galaktozylonukleozydy ze świetną regioselektywnością.



Rysunek 2
Figure 2

5'-O-β-Galaktozylo-5-fluorourydyna (**62**) (pochodna leku przeciwnowotworowego) była otrzymana z wydajnością 60%, a 5'-O-β-galaktozylo-3'-azydo-3'-deoksytymidyna (**63**) (pochodna leku anty HIV) z wydajnością 43%. Analogi nukleozydów innych zasad otrzymano z niską wydajnością, ponieważ posiadają one grupy aminowe bardziej reaktywne niż hydroksylowe i glikozylacja zachodziła głównie na grupie aminowej.

2.7.4. α-Glukozydaza

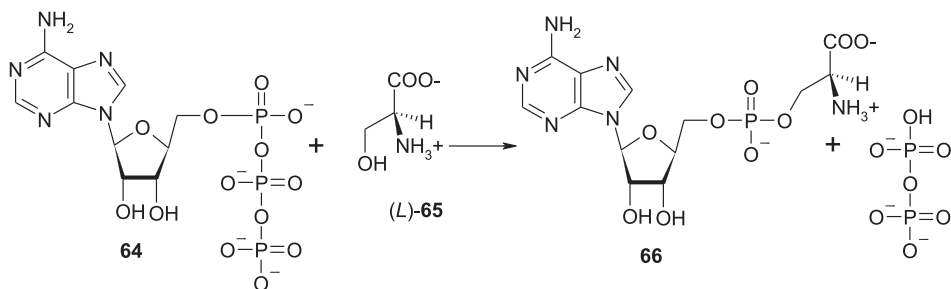
α-Glukozydaza również wykazuje aktywność transferazy. W pH 5,8 z użyciem p-nitrofenylo-α-D-glukozy jako substratu, katalizuje przeniesienie α-D-glukozy na celobiozę, sacharozę i izomaltozę. Na początku tworzy się głównie wiązanie 1→4, ale później kumuluje się produkt 1→6. Enzym ten katalizuje również glikozylację pirydoksyny [64].

2.8. PIROFOSFATAZY NUKLEOTYDÓW (NPP)

NPP katalizują reakcje:



gdzie X jest oligofosforanem lub resztą alkoholu, a NMP jest dowolnym 5'-nukleotydem. Pirofosfatazy nukleotydwów zastosowano również, jako katalizator reakcji alkoholizy [65]. Badano takie reakcje pirofosfataz pochodzących z wnętrza wołowych, wątroby szczurzej i ludzkiego serum. Stwierdzono, że NPP mają w tych reakcjach aktywność transferazy.



W przypadku wołowej i ludzkiej NPP tworzyły się estry (**66**) tylko w przypadku zastosowania alkoholu metylowego bądź etylowego. Natomiast pirofosfataza ze szczurzej wątroby katalizuje reakcje z glicerolem, seryną (**65**), glikolem polietylenowym, glicerolo-2-fosforanem.

PODSUMOWANIE

Na podstawie przytoczonego piśmiennictwa stwierdzono, iż tkanki zwierzęce są źródłem bardzo wielu hydrolaz, używanych jako biokatalizatory różnorodnych reakcji. Widać, że największe zastosowanie znalazły lipaza z trzustki wieprzowej i esteraza z wątroby wieprzowej.

Znane są przykłady stosowania enzymów immobilizowanych, pokazano to dla PPL (otrzymywanie (*R*)-glicydołu) i PLE (otrzymywanie lewofloksacyny).

W pracy zostały pokazane reakcje, w których enzymy pochodzenia zwierzęcego nierzadko okazywały się wydajniejszymi biokatalizatorami niż te z mikroorganizmów. Wskazano również zastosowania produktów reakcji enzymatycznych do dalszej syntezy, np. leków.

PODZIĘKOWANIA

Praca wykonana w ramach projektu „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym” No. POIG.01.03.01-00-158/09-01 częściowo finansowana przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. Bryjak, *Wiad. Chem.*, 2004, **58**, 691.
- [2] R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, V. Rodwell, *Harper's Illustrated Biochemistry*, McGraw-Hill, 2003, 49.
- [3] P. Kielbasiński, R. Ostaszewski, W. Szymański, *Enzymatic Catalysis Today and tomorrow*, [w:] *Novel Concepts in Catalysis and Chemical Reactors*, pod redakcją A. Cybulski, J.A. Moulijn, A. Stankiewicz, WILEY-VCH, 2010, 95.
- [4] Ch.-W. Garner, L.C. Smith, *J. Biol. Chem.*, 1972, **247**, 561.
- [5] N.N. Ghandi, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1997, **74**, 621.
- [6] F. Theil, *Chem. Rev.*, 1995, **95**, 2203.
- [7] C. Chapus, M. Rovey, L. Sarda, R. Verger, *Biochimie*, 1988, **70**, 1223.
- [8] U.R. Kalkote, A.N. Purude, V.G. Puranik, M.K. Gurjar, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2006, **40**, 38.
- [9] N. Nazir, S. Koul, M.A. Qurishi, S.C. Taneja, G.N. Qazi, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2009, **59**, 121.
- [10] M. Pregnotato, M. Terreni, I.E. de Fuentes, A.R. Alcantara Leon, P. Sabuquillo, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2001, **11**, 757.
- [11] J. Chen, W. Shum, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 2379.
- [12] D. Koszelewski, A. Redzej, R. Ostaszewski, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2007, **47**, 51.
- [13] T. Takemura, G. Emoto, J. Satoh, Y. Kobayashi, C. Yaginuma, Y. Takahashi, T. Utsukihara, C.A. Horiuchi, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2008, **55**, 104.
- [14] A. Abate, E. Brenna, C. Fuganti, F.G. Gatti, S. Serra, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2004, **32**, 33.
- [15] S.-T. Chen, J.-M. Fang, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 4349.
- [16] C. Bonini, C. Cazzato, E. Cernia, C. Palocci, S. Soro, L. Viggiani, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2001, **16**, 1.
- [17] T. Miyazawa, M. Shimaoka, T. Yamada, *Biotechnol. Lett.*, 1991, **21**, 309.
- [18] A.N.A. Aryee, B.K. Simpson, R. Villalonga, *Enzyme Microb. Tech.*, 2007, **40**, 394.
- [19] J. De Caro, F. Ferrato, R. Verger, A. De Caro, *BBA Gen. Subjects*, 1995, **1252**, 321.
- [20] D. Guerrier, H. Pellet, *FEBS Lett.*, 1979, **106**, 115.
- [21] J.M. Steiner, D.A. Williams, *Biochimie*, 2002, **84**, 1243.
- [22] C.J. O'Connor, R.H. Barton, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 1998, **4**, 161.
- [23] J. Bryan Jones, *Pure & Appl. Chem.*, 1990, **62**, 1445.
- [24] T. Panda, B.S. Gowrishankar, *Appl. Microbiol. Biot.*, 2005, **67**, 160.
- [25] M. Mroczkiewicz, A. Fryszkowska, R. Ostaszewski, *Biotechnologia*, 2005, **2**, 32.
- [26] a) W.M. Connors, A. Pihl, A.L. Dounce, E. Stotz, *J. Biol. Chem.*, 1950, **184**, 29; b) K. Adachi, S. Kobayashi, M. Ohno, *Chimia*, 1986, **40**, 311.
- [27] M. Hermann, M.U. Kietzmann, M. Ivancić, C. Zenzmaier, R.G.M. Luiten, W. Skranc, M. Wubolts, M. Winkler, R. Birner-Gruenberger, H. Pichler, H. Schwab, *J. Biotech.*, 2008, **133**, 301.
- [28] A. Musidłowska-Persson, U.T. Bornscheuer, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2003, **14**, 1341.
- [29] A. Solis, S. Garcia, H.I. Perez, N. Manjarrez, H. Luna, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2008, **19**, 549.
- [30] P.S. Vankar, I. Bhattacharya, Y.D. Vankar, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 1996, **7**, 1683.
- [31] Y.D. Vankar, G. Kumaravel, I. Bhattacharya, P.S. Vankar, K. Kaur, *Tetrahedron*, 1995, **51**, 4829.
- [32] S.-Y. Lee, B.-H. Min, S.-H. Hwang, Y.-M. Koo, C.-K. Lee, S.-W. Song, S.-Y. Oh, S.-M. Lim, S.-L. Kim, D.-I. Kim, *Biotechnol. Lett.*, 2001, **23**, 1033.
- [33] C. Pichon, M.-E. Martin-Gourdel, D. Chauvat, C. Alexandre, F. Huet, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2004, **27**, 65.
- [34] R.J. Kazlauskas, *Organic Syntheses*, 1992, **70**, 60.
- [35] A. Ishii, V.A. Soloshonok, K. Mikami, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 1597.
- [36] N. Komatsu, M. Hashizume, T. Sugita, S. Uemura, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 4529.

- [37] S. Drioli, F. Felluga, C. Forzato, P. Nitti, G. Pitacco, E. Valentin, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 1997, **3**, 203.
- [38] S. Coriani, C. Forzato, G. Furlan, P. Nitti, G. Pitacco, M. Ringholm, K. Ruud, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2009, **20**, 1459.
- [39] A. Comini, C. Forzato, P. Nitti, G. Pitacco, E. Valentin, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2004, **15**, 617.
- [40] C. Forzato, G. Furlan, P. Nitti, G. Pitacco, E. Valentin, E. Zangrando, P. Buzzini, M. Goretti, B. Turchetti, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2008, **19**, 2026.
- [41] R. Sanchez, H. Luna, H.I. Perez, N. Manjarrez, A. Solis, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2001, **12**, 1399.
- [42] K.X. Chen, F.G. Njoroge, J. Pichardo, A. Prongay, N. Butkiewicz, N. Yao, V. Madison, V. Girijavallabhan, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 567.
- [43] H. Matter, M. Schudok, W. Schwab, W. Thorwart, D. Barbier, G. Billen, B. Haase, B. Neises, K.-U. Weithmann, T. Wollmann, *Bioorgan. Med. Chem.*, 2002, **10**, 3529.
- [44] R. Wrigglesworth, C.S.J. Walpol, S. Bevan, E.A. Campbell, A. Dray, G.A. Hughes, I. James, K.J. Masdin, J. Winter, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 4942.
- [45] A. Dray, *Biochem. Pharmacol.*, 1992, **44**, 611.
- [46] K. Kobata, K. Yoshikawa, M. Kohashi, T. Watanabe, *Tetrahedron-Lett.*, 1996, **37**, 2789.
- [47] I. Regla, H. Luna, H.I. Perez, P. Demare, I. Bustos-Jaimes, V. Zaldivar, M.L. Calcagno, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2004, **15**, 1285.
- [48] C.-Y. Chang, T.-K. Yang, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2003, **14**, 2239.
- [49] Z. Liu, Z. Zhen, Z. Zuo, Y. Wu, A. Liu, Q. Yi, W. Li, *J. Biochem.*, 2006, **139**, 421.
- [50] Y.-S. Yang, S. Ramaswamy, W.B. Jakoby, *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 10870.
- [51] T.-M. Su, Y.-S. Yang, *Protein Expres. Purif.*, 2000, **19**, 289.
- [52] J. Kautz, K.D. Schnackerz, *Eur. J. Biochem.*, 1989, **181**, 431.
- [53] Y.-L. Yang, S.G. Ramaswamy, W.B. Jacoby, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 7814.
- [54] S. Klomklao, H. Kishimura, M. Yabe, S. Benjakul, *Comp. Biochem. Phys. B*, 2007, **147**, 682.
- [55] H. Temiz, U. Aykut, E. Okumus, S. Turhan, *Biotechnol. Bioproc. E.*, 2007, **12**, 450.
- [56] I.Y. Filippova, E.N. Lysogorskaya, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2003, **29**, 496.
- [57] a) R. Balti, A. Barkia, A. Bougatef, N. Ktari, M. Nasri, *Food Chem.*, 2009, **113**, 146; b) I. Kurtovic, S.N. Marshall, B.K. Simpson, *Comp. Biochem. Phys. B*, 2006, **143**, 432; c) H. Kishimura, K. Hayashi, *Comp. Biochem. Phys. B*, 2002, **132**, 485; d) S. Klomklao, S. Benjakul, W. Visessanguan, K. Kishimura, B.K. Simpson, H. Saeki, *Comp. Biochem. Phys. B*, 2006, **144**, 47; e) S. Klomklao, H. Kishimura, Y. Nonami, S. Benjakul, *Food Chem.*, 2009, **115**, 155.
- [58] N.J. Baines, J.B. Baird, D.T. Elmore, *Biochem. J.*, 1964, **90**, 470.
- [59] H. Sekizaki, K. Itoh, E. Toyota, K. Tanizawa, *Chem. Pharm. Bull.*, 1996, **44**, 1577.
- [60] V. Langlois, J. Parisot, V. Bonnet, C. Rabiller, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2002, **13**, 2369.
- [61] B.J. Honas, U.M. Glassman, T.J. Wiese, *Comp. Biochem. Phys. B*, 2009, **153**, 359.
- [62] O. Berteau, J. Bielicki, A. Kilonda, D. Machy, D.S. Anson, L. Kenne, *Biochem.*, 2004, **43**, 7881.
- [63] G. Andreotti, A. Trincone, A. Giordano, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2007, **47**, 28.
- [64] G. Andreotti, A. Giordano, A. Tramice, E. Mollo, A. Trincone, *J. Biotech.*, 2006, **122**, 274.
- [65] J.C. Cameselle, A. Agudo, J. Canales, M.J. Costas, A. Fernandez, A. Flores, M. Garcia-Diaz, S. Gonzalez-Santiago, J. Lopez-Gomez, J.M. Ribeiro, J.M. Vergeles, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2001, **11**, 469.

