

**ZASTOSOWANIA WYBRANYCH ENZYMÓW
Z TKANEK ZWIERZĘCYCH W SYNTEZIE
ORGANICZNEJ I BIOKATALIZIE, CZĘŚĆ II.
OKSYDOREDUKTAZY, TRANSFERAZY, LIAZY,
IZOMERAZY**

**APPLICATIONS OF ENZYMES FROM ANIMAL TISSUES
IN ORGANIC SYNTHESIS, PART 2**

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

Wprowadzenie

1. Kofaktory

2. Zastosowania enzymów; 2.1. Wybrane zastosowania oksydoreduktaz w syntezie organicznej; 2.1.1. Dehydrogenaza alkoholowa z wątroby końskiej (HLADH); 2.1.1.1. Reakcje utleniania; 2.1.1.2. Reakcje redukcji; 2.1.2. Dehydrogenaza mleczanowa; 2.1.3. Dehydrogenaza glutaminianowa; 2.1.4. Reduktaza karbonylowa; 2.1.5. Katalaza; 2.2. Wybrane zastosowania transferaz w syntezie organicznej; 2.2.1. Transaldolaza; 2.2.2. Galaktozylotransferaza; 2.2.3. Transferaza UDP-glukozy; 2.2.4. Fukozylotransferaza; 2.2.5. Syntaza difosforanu farnezyli; 2.3. Zastosowania liaz w syntezie organicznej; 2.3.1. Dekarboksylaza DOPA (3,4-dihydroksyfenyloalaniny); 2.3.2. Aldolazy; 2.4. Zastosowania izomeraz w syntezie organicznej; 2.4.1. *N*-acylo-*D*-glukozamino-2-epimeraza (GlcNAc-2-epimeraza); 2.5. Ligazy

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 shows systematically known types of animal enzymes 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 performed.

Typical applications of:

- Oxidoreductases: horse liver alcohol dehydrogenase [3–13], lactate dehydrogenase [16–18], glutamate dehydrogenase [19, 20], carbonyl reductase [24], catalase [27];
- Transferases: transaldolase [29], galactosyltransferase [30], UDP-glucuronosyltransferase [31], fucosyltransferase [34], farnesyl diphosphate synthase [35];
- Lyases: DOPA decarboxylase [38, 39], aldolase [42];
- Isomerases: *N*-acyl-*D*-glucosamine 2-epimerase [44]

were described.

Also examples of or recombined [24, 39, 44] 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.

A quantitative analysis of applications of these enzymes was performed. Among animal enzymes hydrolases and oxidoreductases have found the most applications in synthesis. Transferases are also often used. Other classes of enzymes seldom act as biocatalysts. It is general tendency, true also in relation to microbial and plant enzymes.

Key words: animal enzymes, biocatalysis, organic synthesis, applications of enzymes

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

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AcOH	- kwas octowy
AldDH	- dehydrogenaza aldehydowa
DOPA	- 3,4-dihydroksyfenyloalanina
ee	- nadmiar enancjomeryczny
FMN	- mononukleotyd flawinowo adeninowy
Fuc	- fukoza
GDH	- dehydrogenaza glutaminianowa
GDP	- guanozynodifosforan
GlcNAc	- N-acetyloglukozamina
HLADH	- dehydrogenaza alkoholowa z wątroby końskiej
LDH	- dehydrogenaza mleczanowa
NADH	- dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NE	- norepinefryna
Neu5Ac	- kwas N-acetyloneuraminowy
Ni (Ra)	- nikiel Raney'a
<i>p</i> -NP	- <i>para</i> -nitrofenol
PLP	- pirydoksyno-5'-fosforan
<i>rac</i>	- racemat
rPHCR	- rekombinowana reduktaza karbonylowa z serca świni
UDP	- urydynodifosforan

WPROWADZENIE

Ważnym wyzwaniem w syntezie organicznej jest uzyskanie odpowiednich produktów w reakcjach o wysokiej chemo-, regio- i stereoselektywności.

Ponieważ katalizatory chemiczne nie zawsze umożliwiają przeprowadzenie odpowiednich reakcji w zadowalający sposób, warto zwrócić uwagę na reakcje, które są katalizowane przez enzymy. W pierwszej części tego opracowania przedstawiono zastosowania hydrolaz w syntezie organicznej. Wynika to z tego, iż ta klasa enzymów znalazła zdecydowanie najszersze zastosowanie w syntezie. W niniejszej części zostały przedstawione zastosowania oksydoreduktaz, transferaz, liaz i izomeraz. Enzymy należące do tych klas nie znalazły, aż tak szerokiego zastosowania, ale zdecydowanie powinno się to szybko zmieniać. Niestety odpowiednie dane literaturowe zostały opublikowane nie tylko w czasopismach chemicznych, co bardzo utrudnia zapoznanie się z tym zagadnieniem. Dlatego w tej części opracowania przedstawiono znane zastosowania enzymów należących do odpowiednich klas tak, aby w możliwie przejrzysty sposób usystematyzować dane literaturowe. Szczególnie hydrolazy i oksydoreduktazy znalazły szerokie zastosowanie w syntezie złożonych produktów końcowych, które zwykle posiadają wysoką cenę jednostkową [1].

1. KOFAKTORY

Często do prawidłowego działania enzymy wymagają obecności kofaktorów, czyli związków chemicznych o małej masie cząsteczkowej, nieorganicznych (takich jak jony metali) bądź organicznych, (dla których dinukleotyd nikotynoamidoadeniny – NADH jest dobrym przedstawicielem). Ten fakt jest często pomijany w literaturze. Należy jednak podkreślić, że bez kofaktorów aktywność szeregu enzymów jest niewielka, co rzutuje na uzyskiwane wyniki i prowadzi do błędnych wniosków. Zastosowanie nieoczyszczonych preparatów biologicznych, które jak może się wydawać nie są zbyt atrakcyjnymi biokatalizatorami, zapewnia obecność kofaktorów, co przekłada się na ich wysoką aktywność katalityczną. Warto więc w przesiewowych badaniach laboratoryjnych, których celem jest tylko znalezienie dogodnego biokatalizatora stosować takie preparaty.

2. WYBRANE ZASTOSOWANIA ENZYMÓW

2.1. WYBRANE ZASTOSOWANIA OKSYDOREDUKTAZ W SYNTEZIE ORGANICZNEJ

Oksydoreduktazy są to enzymy, które katalizują reakcje utleniania i redukcji. Utleniają np. grupy hydroksylowe, aminowe, jony metali, wiązania pojedyncze

węgiel-węgiel do wiązań podwójnych. Redukują np. grupy karbonylowe. Kofaktory takie jak NAD(P)H, mononukleotyd flawinowo adeninowy (FMN), są niezbędne do prawidłowego działania tych enzymów ponieważ umożliwiają regenerację biokatalizatora.

2.1.1. Dehydrogenaza alkoholowa z wątroby końskiej (HLADH)

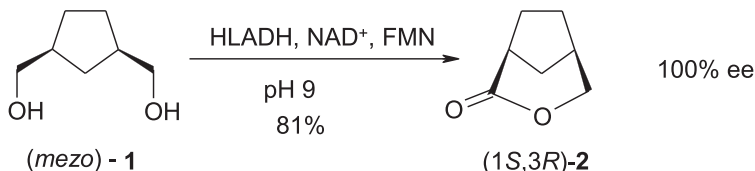
Dehydrogenazy to podklasa oksydoreduktaz katalizująca reakcje odszczepienia wodoru od cząsteczki. Dehydrogenaza alkoholowa znalazła zastosowanie, jako biokatalizator zarówno w reakcjach utleniania jak i redukcji.

Typowa, szeroko stosowana procedura izolacji tego enzymu została opisana przez Dalziela [2].

2.1.1.1. Reakcje utleniania

HLADH znalazł szerokie zastosowanie w reakcjach utleniania dioli:

a) Dzięki zastosowaniu tego enzymu w reakcji utleniania 1,3-mezo-dioli [3] (takich jak związek **1**) do laktonów otrzymano enancjomerycznie czyste bicykliczne [3.2.1] laktony o strukturze związku **2** oraz jego analogi i [3.3.1] laktony, które są cennymi intermediami w syntezie organicznej.



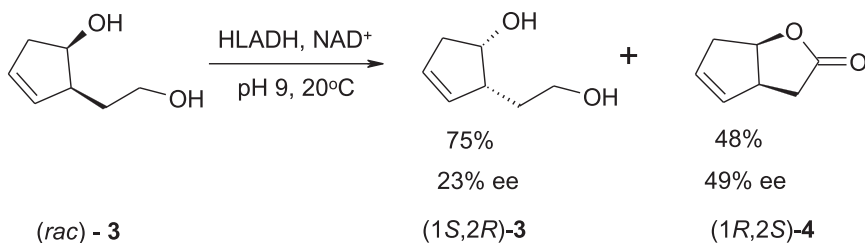
Schemat 1
Scheme 1

Jak pokazano na Schemacie 1, lakton **2** otrzymano z wysoką wydajnością oraz nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 100%. Analogiczne związki otrzymano z podobną wydajnością. Aby umożliwić regenerację dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego (NAD⁺), do reakcji dodano mononukleotyd flawinowo adeninowy (FMN). Dodatek FMN znacznie zwiększa koszty syntezy, ale jest to dużo tańsze niż dodawanie NAD⁺ w większej ilości i nie regenerowanie go. Przeprowadzone badania wykazały, że diole z pierścieniem cyklopentanowym bądź cykloheksanowym są akceptowane przez enzym. Wykazano ponadto, że *cis*-1,3-bis(hydroksymetylo)cycloheksan i (1*R*,3*S*,5*R*)-*syn-anti*-1,3-bis(hydroksymetylo)-5-(metoksymetylo)cycloheksan były doskonałymi substratami dla tego enzymu.

b) Również utlenianie 1,2-mezo-dioli w warunkach analogicznych do przedstawionych na Schemacie 1, jest katalizowane przez ten enzym [4]. Takie lak-

tony są ważnymi substratami do syntezy leków i biocydów, np. lakton cyklobutanowy był dalej przekształcany do grandizolu – feromonu używanego do ochrony upraw bawełny przed wołkiem zbożowym. Utlenianie *cis-mezo* dioli dało bardzo dobre rezultaty. Natomiast utlenianie racemicznych *trans* dioli przebiegało z niską wydajnością i uzyskiwano produkty racemiczne. Aby to wyjaśnić zaproponowano model sześciennych przestrzeni w miejscu aktywnym, w którym oba izomery *trans* wpasowują się dobrze w te przestrzenie, co wyjaśnia tworzenie racemicznych produktów.

c) HLADH katalizuje również utlenianie hydroksycyklopentenów [5] takich jak związek **3** do laktonów, co pokazano na Schemacie 2.



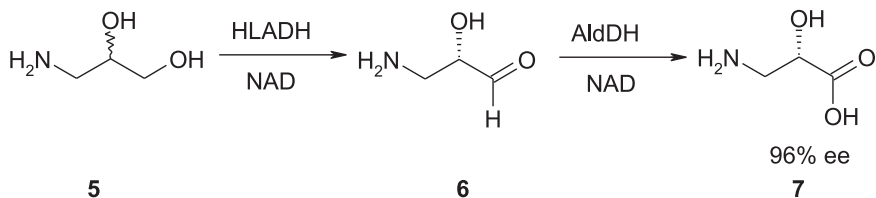
Schemat 2
Scheme 2

Wydajność liczona jest względem odpowiedniego enancjomeru substratu. Dzięki zastosowaniu tego enzymu reakcja jest regio- i enancjoselektywna. Regioselektywność reakcji jest zgodna z przewidywaniami, tzn. utleniana jest pierwszorzędowa, a nie drugorzędowa grupa hydroksylowa, co prowadzi do powstania laktonu **4** i odzyskiwany jest wzbogacony enancjomerycznie substrat (1S,2R)-**3**. Produkty otrzymywane są z umiarkowanymi nadmiarami enancjomerycznymi.

Otrzymywanie optycznie czynnych laktonów z wykorzystaniem różnych biotransformacji zostało opisane [6]. W niniejszej pracy przedstawiono kilka przykładów otrzymywania laktonów z zastosowaniem enzymów zwierzęcych.

d) Zastosowanie HLADH oraz dehydrogenazy aldehydowej immobilizowanych razem w żelu poliakrylamidowym umożliwiło utlenianie dioli (np. związku **5**) do L- α -hydroksykwasów [7]. Kwas 3-amino-2-hydroksypropionowy (**7**) otrzymany w ten sposób może być wykorzystany do syntezy blokerów receptorów β -adrenergicznych, które są stosowane jako leki.

Jest to interesujący przykład współdziałania dwóch różnych enzymów. Zgodnie z ideą przedstawioną na Schemacie 3, najpierw dehydrogenaza alkoholowa utlenia pierwszorzędową grupę hydroksylową diolu do aldehydu **6**, a następnie dehydrogenaza aldehydowa utlenia powstałą grupę związku **6** do grupy karboksylowej kwasu **7**. Konwersja aldehydu do kwasu przesuwaa równowagę pierwszej reakcji w stronę produktu, co zwiększa wydajność całej przemiany.



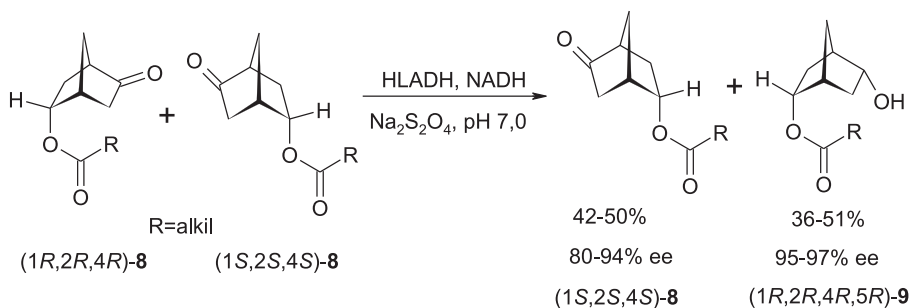
Schemat 3
Scheme 3

Zastosowanie drożdżowej dehydrogenazy alkoholowej pokazało, że enzym ten był niestabilny i mniej aktywny w przypadku utleniania dioli i α -aminoalkoholi.

2.1.1.2. Reakcje redukcji

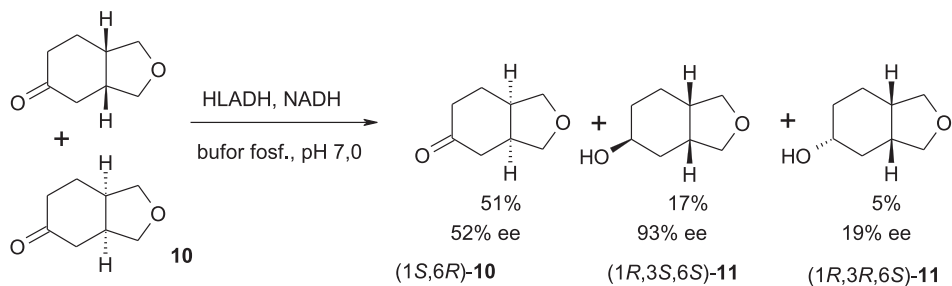
Dehydrogenaza alkoholowa jest również szeroko stosowana w reakcjach redukcji aldehydów i ketonów. Enancjoselektywne redukcje katalizowane odczynnikami organicznymi są zwykle bardzo trudne do przeprowadzenia szczególnie, gdy odpowiednie reakcje mają być enacjo- i diastereoselektywne.

- a) Typowe zastosowanie tego enzymu do redukcji bicyklicznych ketonów [8] przedstawione jest na Schemacie 4. Alkohole **9** otrzymano z dobrymi wydajnościami i nadmiarami enancjomerycznymi wynoszącymi 95–97%. Najlepsze rezultaty otrzymano, gdy jako grupę karboksylową w substracie **8** zastosowano resztę kwasu propionowego. Hydrofobowe łańcuchy boczne ketonów (**8**) oddziałują z hydrofobową strefą miejsca aktywnego enzymu, co zwiększa stabilizację kompleksu enzym–substrat. Reakcja była enancjoselektywna (tylko jeden z enancjomerów substratu jest redukowany) i diastereoselektywna (tworzy się drugie centrum stereogeniczne i powstaje tylko jeden z możliwych diastereoizomerów).

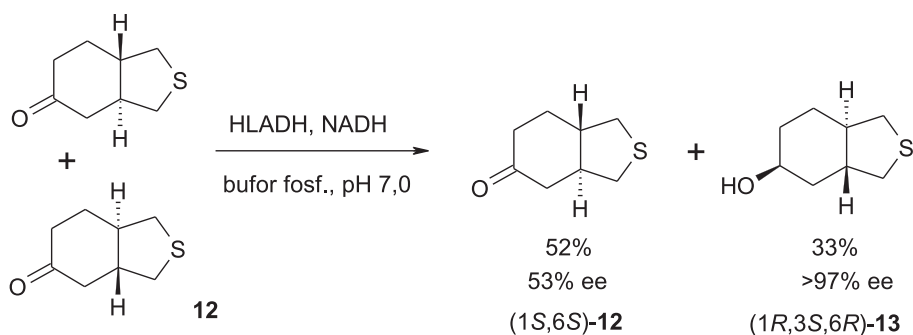


Schemat 4
Scheme 4

b) Zastosowano HLADH również do redukcji heterocyklicznych ketonów [9], co przedstawiono na Schematach 5 i 6.



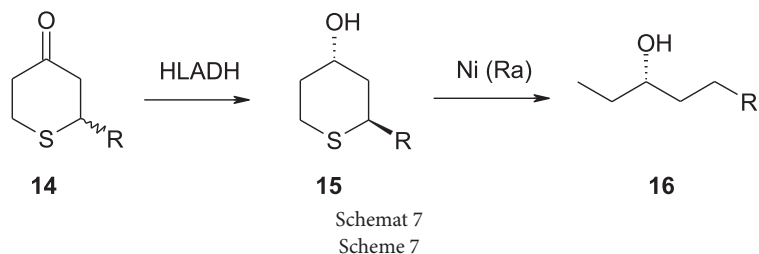
Schemat 5
Scheme 5



Schemat 6
Scheme 6

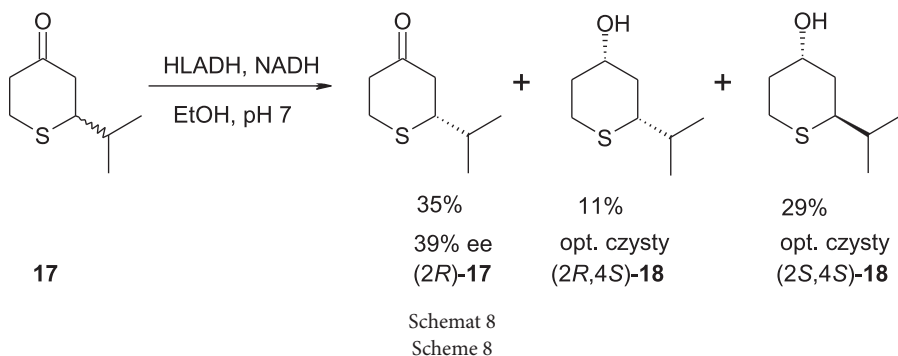
Stwierdzono, że substraty zawierające tlen (**10**) lub siarkę (**12**) są dobrze akceptowane przez HLADH, a ich redukcja przebiega tak jak dla węglowych analogów. Zauważono również, iż małe znaczenie ma czy substrat zawiera tlen czy siarkę. Znaczące jest natomiast jaką substrat ma konfigurację. Jeżeli ma konfigurację *trans* reakcja jest enacjo- i diastereoselektywna. W przypadku substratu o konfiguracji *cis* diastereoselektywność jest niższa.

c) Optycznie czystych acyklicznych alkoholi drugorzędowych nie da się otrzymać przez bezpośrednią redukcję biokatalityczną, gdyż acykliczne ketony nie są dobrymi substratami dla dehydrogenazy alkoholowej. Dlatego zaproponowano koncepcję przedstawioną na Schemacie 7 [10].



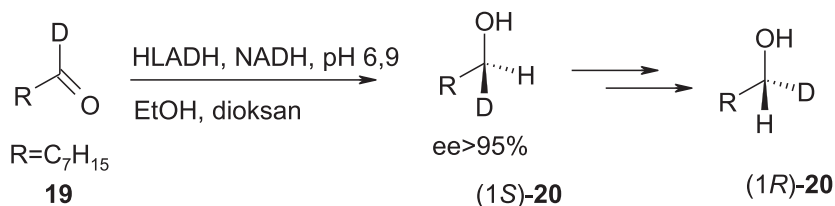
Polega ona na redukcji heterocyklicznych ketonów zawierających siarkę (**16**) do alkoholi, a następnie ich desulfuryzacji metodami chemicznymi (z zastosowaniem niklu Raney'a). W ten sposób powstają acykliczne, optycznie czyste alkohole drugorzędowe (**18**), które są bardzo trudne do otrzymania metodami chemicznymi.

Na Schemacie 8 przedstawiono warunki etapu enzymatycznego (redukcji 2-podstawionych tetrahydrotiopiran-4-onów do cyklicznych alkoholi).



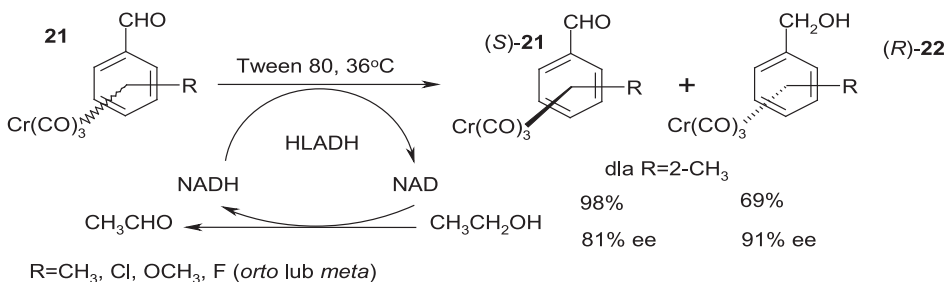
Enancjoselektywność tej reakcji jest niewielka, redukcji ulegają oba enancjomery związku **17**. Natomiast nowo powstające centrum stereogeniczne ma tylko jedną konfigurację, zatem reakcja jest diastereoselektywna. Produkty otrzymano z umiarkowaną wydajnością, ale są one optycznie czyste. Związki (2*R*,4*S*)-**18** i (2*S*,4*S*)-**18** są diastereoizomerami, więc można je rozdzielić metodami fizycznymi.

- d) Redukcja 3-podstawionych tetrahydrotiopiran-4-onów [11] była przeprowadzana w takich samych warunkach jak podane na Schemacie 8. W tym przypadku produkty otrzymano z wyższą wydajnością (do 49% izomeru *trans*), ale z niższymi nadmiarami enancjomerycznymi (78–90%).
- e) Dehydrogenazę alkoholową zastosowano również do katalizowania redukcji [$1\text{-}^2\text{H}$] oktanalu (**19**) [12].

Schemat 9
Scheme 9

Enzym odróżnia wodór od deuteru. Tak małe różnice są niezauważalne w przypadku metod chemicznych, zatem zastosowanie biokatalizy jest bardzo trudne do zastąpienia. Produkt otrzymano z nadmiarem enancjomerycznym większym niż 95%. Enancjomer (*S*) (związek **20**) otrzymany w ten sposób był chemicznie przekształcony w mniej dostępny enancjomer (*R*), zatem możliwe jest otrzymanie tą metodą obydwu enancjomerów.

f) HLADH akceptuje również związki organometaliczne jako substraty. Dzięki temu z powodzeniem zastosowano ten enzym do redukcji trikarbonylo- (η^6 -benzaldehydo) kompleksów chromu [13].

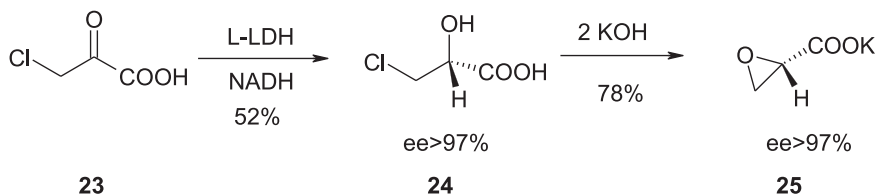
Schemat 10
Scheme 10

Na Schemacie 10 przedstawiono przebieg reakcji oraz rolę, jaką spełnia dodatek etanolu (umożliwia regenerację kofaktora). W zależności od reszty R produkty otrzymano z wydajnością od 60 do prawie 100% oraz nadmiarami enancjomerycznymi od kilku do ok. 91%. W przypadku izomeru *meta* otrzymywano zawsze alkohol o konfiguracji *R*, ale w przypadku izomeru *orto* produkty 2-metoksy i 2-fluoro powstawały z przewagą enancjomeru *S*. Aby to wyjaśnić zastosowano komputerowe modelowanie dopasowania substratów do miejsca aktywnego enzymu. Okazało się, że układ oddziaływań hydrofobowych i wiązań wodorowych enzym-substrat zmienia się w zależności od podstawnika i stąd różnice w enancjopreferencji.

2.1.2. Dehydrogenaza mleczanowa

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) była izolowana np. z osocza i leukocytów krów i koni [14]. Jednak otrzymanie LDH z tkanki mięśniowej świni jest wydajniejsze i tańsze [15]. Zastosowano nietypową procedurę wydzielenia tego enzymu. Tkankę mięśniową homogenizowano z buforem Tris-HCl, a następnie mieszano z pianą wytworzoną z surfaktanta, NaOH i barwnika. Po wirowaniu w fazie wodnej znajdował się oczyszczony enzym. LDH akceptuje duże spektrum kwasów jako substratów, zatem jest uniwersalnym katalizatorem.

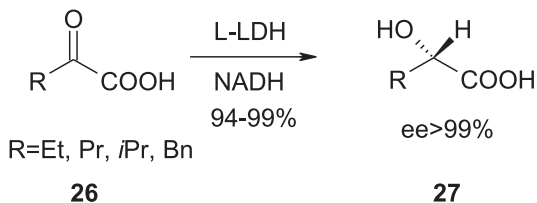
Dehydrogenazę mleczanową zastosowano, jako biokatalizator reakcji syntezy kwasu β -chloromlekowego (**24**) oraz glicydolanu potasu (**25**) [16].



Schemat 11
Scheme 11

Na Schemacie 11 przedstawiono etap enzymatyczny i chemiczny reakcji. Produkt otrzymano z nadmiarem enancjomerycznym powyżej 97% i umiarkowaną wydajnością. Enzym był używany w formie immobilizowanej (zamykany w żelu). NADH był regenerowany za pomocą glukozo-6-fosforanu oraz dehydrogenazy glukozo-6-fosforanu. Stosując zwierzęcą LDH otrzymywano kwas *L*- β -chloromlekowy oraz *L*-glicydol. Izomery *D* uzyskiwano w ten sam sposób z podobnymi nadmiarami enancjomerycznymi używając *D*-LDH z *Lactobacillus leichmannii*.

Opisano również zastosowanie LDH do syntezy innych 2-hydroksykwasów (**27**) [17], które są ważnymi substratami zastosowanymi w syntezie epoksydów, glikoli i haloestrów.

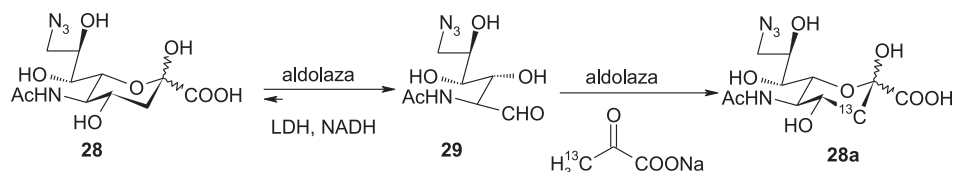


Schemat 12
Scheme 12

Na Schemacie 12 pokazano ogólnie reakcję tego typu. Wydajność i nadmiary enancjomeryczne produktów były bardzo wysokie. NADH regenerowano za pomocą

mrówczanu i dehydrogenazy mrówczanowej. Enzym był immobilizowany w żelu poliakrylamidowym. Dehydrogenaza mleczanowa ma grupę tiolową łatwo ulegającą utlenieniu na powietrzu, co jest dużym utrudnieniem w zastosowaniu tego enzymu. Immobilizacja enzymu daje trwały biokatalizator, który jest zabezpieczony przed utlenianiem.

Dehydrogenaza mleczanowa była również wykorzystana podczas syntezy glikoproteiny, której fragmentem był związek **28a** [18].



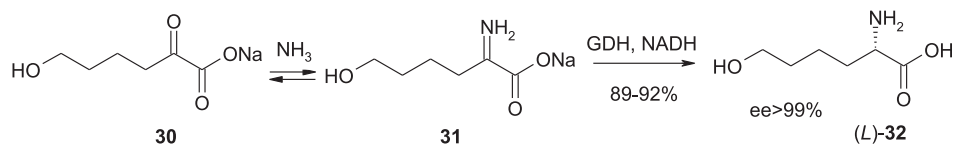
Schemat 13

Scheme 13

Sacharyd z izotopem węgla ^{13}C był syntetyzowany w celu zbadania mechanizmu formowania oligosacharydów w organizmie. Etapy enzymatyczne tej wielostopniowej syntezy przedstawiono na Schemacie 13. Jest to przykład współpracy dwóch enzymów w tym samym etapie syntezy. Aldolaza katalizuje tutaj zarówno reakcję retroaldolową (pierwszy etap), jak i aldolową (drugi etap). Gdy nie używano LDH jako dodatkowego katalizatora, pierwsza reakcja była odwracalna, a jej wydajność wynosiła 60%. Po dodaniu LDH, stwierdzono, że wydajność zwiększyła się do 98%, a w drugim etapie analog [3- ^{13}C] kwasu *N*-acetylneuraminowego (**28a**) otrzymano z wydajnością 93%.

2.1.3. Dehydrogenaza glutaminianowa

Dehydrogenaza glutaminianowa (GDH) z wątroby wołowej była użyta do syntezy *L*-6-hydroksynorleucyny (**32**) [19], która jest kluczowym substratem do syntezy omapatrilatu, leku przeciwko nadciśnieniu [20].

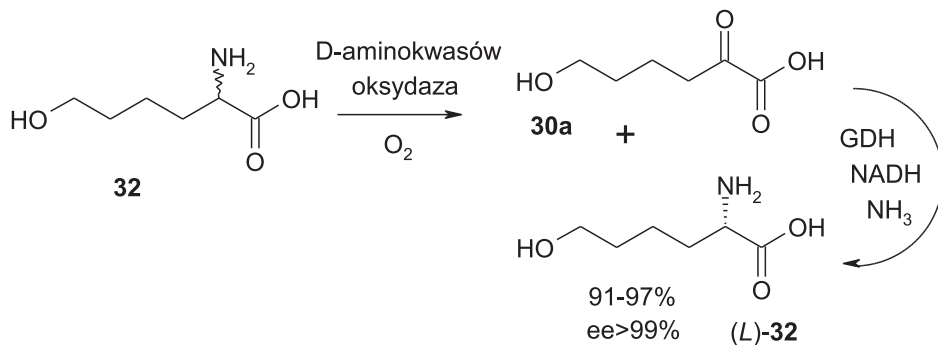


Schemat 14

Scheme 14

Produkt otrzymano z wysoką wydajnością i nadmiarem enancjomerycznym powyżej 99%. Zaobserwowano, że enzym katalizuje enancjoselektywną redukcję wiązania iminowego tworzącego się *in situ*, co pokazano na Schemacie 14.

L-6-hydroksynorleucyna była również otrzymana w reakcji deracemizacji, w dwóch etapach, z zastosowaniem dwóch enzymów (Schemat 15). Oksydaza *D*-aminokwasów z nerki wieprzowej katalizuje utleniające deaminowanie *D*-6-hydroksynorleucyny (czyli zbędnego enancjomeru), a GDH katalizuje redukujące aminowanie ketokwasu do *L*-enancjomeru, potrzebnego do produkcji leku.



Schemat 15
Scheme 15

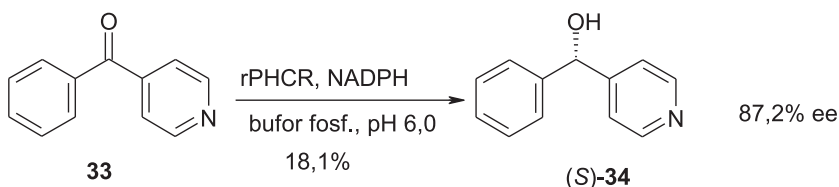
Produkt otrzymano z tak samo wysokim nadmiarem enancjomerycznym, ale z wyższą wydajnością niż powyżej. Tworzący się, jako produkt uboczny pierwszego etapu reakcji nadtlenek wodoru był rozkładany przez dodanie katalazy (enzym opisany w rozdziale 3.1.5.). Po przeprowadzeniu badań stwierdzono, że ekstrakty dehydrogenazy fenyloalaniny z mikroorganizmów *Sporosarcina sp.* i *Thermoactinomyces intermedius* były również efektywnymi biokatalizatorami. GDH z mikroorganizmów były aktywne przy użyciu NADPH, a nie NADH. Bakteryjne dehydrogenaza leucyny i dehydrogenaza alaniny były nieaktywne.

2.1.4. Reduktaza karbonylowa

Reduktazy karbonylowe są obecne we wszystkich tkankach i odgrywają ważną rolę w metabolizmie wielu leków. Ich biochemiczna aktywność została opisana przez Forresta i Gonzaleza [21]. Reduktaza karbonylowa była wyizolowana między innymi z serca królika [22]. Reduktazę karbonylową z serca świni sklonowano przez rekombinację plazmidu i transformację do *E. coli* [23].

Rekombinowana reduktaza karbonylowa z serca świni (rPHCR) została zastosowana do redukcji 4-benzoilopirydyny (33) [24]. α -Pirydylo alkohole są substratami w syntezie wielu leków. Mają aktywność analgetyczną i antykonwulsyjną [25]. Stosując chemiczne katalizatory trudno byłoby uzyskać alkohole podobne do związku 34 z dobrym nadmiarem enancjomerycznym, gdyż różnica pomiędzy pierścieniami benzenu i pirydyny jest mała.

Jak pokazano na Schemacie 16, po zastosowaniu tego enzymu otrzymano produkt z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 87,2%. α -Fenyl-pirydylo-metanole były wcześniej syntetyzowane z użyciem drożdży piekarnianych, ale uzyskano produkty z nadmiarami enancjomerycznymi od 3 do 86%, dlatego postanowiono zastosować rekombinowany enzym, by uzyskać produkty z większymi nadmiarami enancjomerycznymi. Niestety, uzyskano produkty z analogicznymi nadmiarami enancjomerycznym.

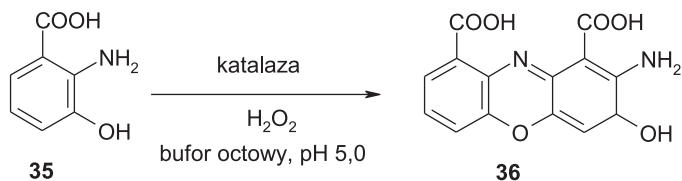


Schemat 16
Scheme 16

2.1.5. Katalaza

Enzym wyizolowano i oczyszczono z wątroby wołowej [26]. W odróżnieniu od najczęściej stosowanych procedur wątrobę homogenizowano z kwasem cytrynowym, a nie rozpuszczalnikiem organicznym. Po odwirowaniu osad rozpuszczono w buforze fosforanowym i wysalano enzym stałym siarczanem amonu.

Katalaza katalizuje reakcję rozkładu nadtlenku wodoru do wody i tlenu. Znalazła zastosowanie do katalizowania innych reakcji, np. utleniania kwasu 3-hydroksyantranilowego (35) [27].



Schemat 17
Scheme 17

Nadtlenek wodoru był stale dostarczany przez układ glukoza/oksydaza glukozy. Pokazany na Schemacie 17 związek **36** wykazuje aktywność antybakteryjną.

2.2. WYBRANE ZASTOSOWANIA TRANSFERAZ W SYNTEZIE ORGANICZNEJ

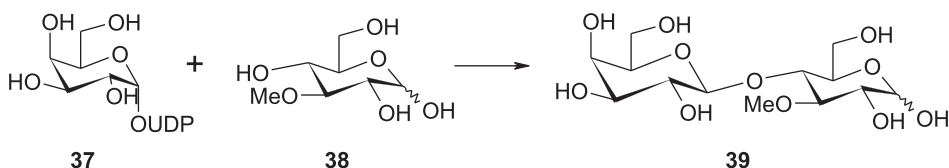
Transferazy są enzymami, które katalizują przenoszenie różnych grup pomiędzy cząsteczkami związków chemicznych. Najwięcej transferaz używanych w biokatalizie to te katalizujące przenoszenie grup cukrowych. Stosując je można otrzymać produkty z wysoką regio- i stereoselektywnością. Nie jest to możliwe przy użyciu metod chemicznych, gdyż cukry mają kilka chemicznie równocennych grup hydroksylowych nierozróżnialnych dla klasycznych katalizatorów.

2.2.1. Transaldolaza

Transaldolaza była otrzymana np. z wołowego gruczołu sutkowego [28]. Tkanka była homogenizowana z buforem o pH 4, a następnie supernatant frakcjonowano siarczanem amonu. Enzym ten był zastosowany do produkcji 2,5-*D*-treo-diketoheksozy [29]. Wszystkie wcześniej znane akceptory reszt przenoszonych przez transaldolazę miały grupę hydroksylową przy węglu sąsiadującym z grupą aldehydową. W przytoczonym tu eksperymencie okazało się, iż pomimo że aldehyd hydroksypirogronowy nie spełnia tego warunku, jest on również dobrym akceptorem w tej reakcji. Stąd wniosek, że transaldolaza jest bardziej uniwersalnym katalizatorem, niż wcześniej uważano.

2.2.2. Galaktozylotransferaza

Galaktozylotransferaza z mleka krowiego znalazła zastosowanie w syntezie 3-*O*-metylolaktozy (39) [30], co pokazano na Schemacie 18.

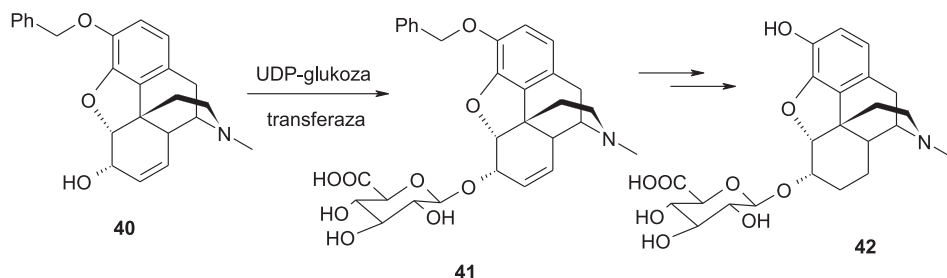


Schemat 18
Scheme 18

Ten β -1 \rightarrow 4 disacharyd był otrzymany z wydajnością 15%, co w przypadku syntezy sacharydów mających wiele tak samo reaktywnych grup hydroksylowych jest dobrym wynikiem. 3-*O*-metylolaktozy użyto w diagnostyce medycznej do sprawdzania aktywności laktazy w jelitach. β -galaktozydazy w analogicznej reakcji katalizują tworzenie wiązania 1 \rightarrow 6-glikozydowego.

2.2.3. Transferaza UDP-glukozy

Ten enzym (obecny w wątrobach ssaków) był zastosowany w reakcji glukuronidacji 3-O-benzylowej pochodnej morfiny (**40**) [31]. Na Schemacie 19 przedstawiono reakcję glukuronidacji oraz końcowy efekt przemian chemicznych.



Schemat 19
Scheme 19

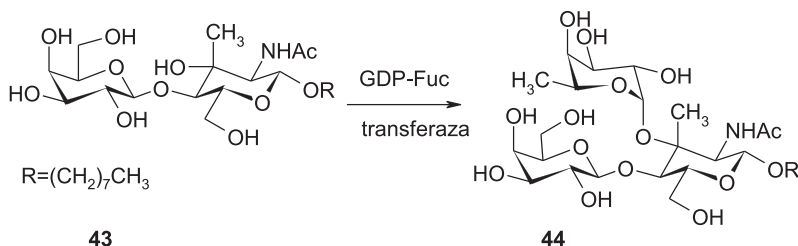
Stwierdzono, że mimo dość znacznego rozbudowania sterycznego, cząsteczką zmodyfikowanej morfiny jest akceptowana jako substrat dla tej transferazy. Hydroliza produktu przy użyciu wodorotlenku sodu w izopropanolu oraz uwodornienie (Pd/C, H₂O/MeOH/AcOH) dała 7,8-dihydromorfino-6-glukuronid (**42**), który ma lepsze właściwości przeciwbólowe niż morfina. Zabezpieczenie grupy OH w fenolu w pozycji 3 jest interesującym przykładem jak można chemicznie kierować reakcją katalizowaną przez enzym. Dla substratu z wolną grupą 3-OH enzym preferuje glukuronidację tej pozycji i nie jest możliwe uzyskanie produktu funkcjonalizowania w pozycji 6.

2.2.4. Fukozylotransferaza

Glikany biorą udział w procesach takich jak adhezja podczas zapalenia i metastazy lub rozpoznawanie komórek. Ta transferaza może być użyteczna w produkcji glikomimetyków będących inhibitorami powyższych procesów.

Enzym został wyizolowany z mleka ludzkiego [32], ale mleko innych ssaków może być również dobrym źródłem fukozylotransferazy. W natywnych tkankach stężenie tego enzymu jest niskie, dlatego ludzka fukozylotransferaza III była ekspresjonowana w komórkach *Spodoptera frugiperda* Sf9 [33], co umożliwiło zwiększenie produkcji enzymu.

Fukozylotransferaza jest enzymem przenoszącym resztę fukozy, również na trzeciorzędowy alkohol, co jest unikalną właściwością, zastosowaną do otrzymania analogu czynnika grupowego krwi – LeX trisacharydu (**44**) [34].



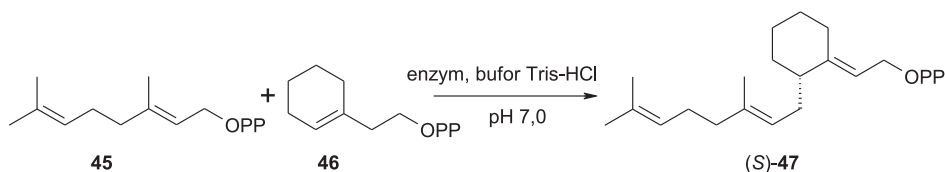
Schemat 20
Scheme 20

Stwierdzono, że reakcja przebiega równie dobrze, jak dla akceptora z drugorzędową grupą OH (bez grupy CH_3).

2.2.5. Syntaza difosforanu farnezylu

Ten enzym, nazywany również transferazą prenylu, był izolowany z wątroby wieprzowej [35] i kurczącej [36] (homogenizacja z buforem fosforanowym o pH 7 i frakcjonowanie siarczanem amonu). Syntazy mają zdolność katalizowania tworzenia wiązania C–C. Metody chemiczne tworzenia takich wiązań są trudne, wymagają dobrania specyficznych warunków reakcji i zastosowania drogiej katalizatorów. Syntazy powinny być przedmiotem zainteresowań naukowców i szczegółowych badań, gdyż ich zastosowanie może zdecydowanie rozwinąć znane metody syntezy nawet bardzo złożonych związków.

Enzym syntaza difosforanu farnezylu wydzielony z wątroby wieprzowej oraz z *Bacillus stearothermophilus* były używane w syntezie difosforanów (47).



Schemat 21
Scheme 21

Reakcje z cyklicznym analogiem substratu (przykład pokazano na Schemacie 21) przebiegają z wydajnością 42,2% w przypadku enzymu pochodzenia zwierzęcego, a tylko 13,6% z enzymem bakteryjnym. Produkt zawiera resztę difosforanową i może służyć do tworzenia bardziej rozbudowanych cząsteczek.

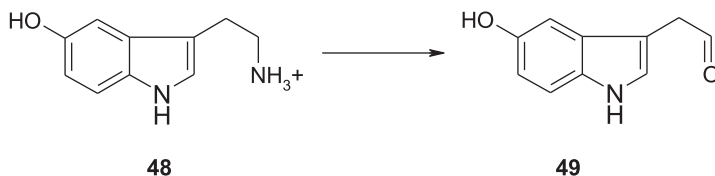
2.3. ZASTOSOWANIA LIAZ W SYNTEZIE ORGANICZNEJ

Liazy to enzymy, które katalizują rozszczepienie wiązań związków chemicznych bez udziału wody. Większość liaz z wyższych eukariotów używanych w syntezie organicznej pochodzi z roślin, ale te znajdujące się w organizmach zwierzęcych charakteryzują się cennymi właściwościami biokatalitycznymi.

2.3.1. Dekarboksylaza DOPA (3,4-dihydroksyfenyloalaniny)

Enzym ten był izolowany z nerek wieprzowych [37] poprzez homogenizację z buforem fosforanowym o pH 6,8 oraz frakcjonowanie supernatantu siarczanem amonu.

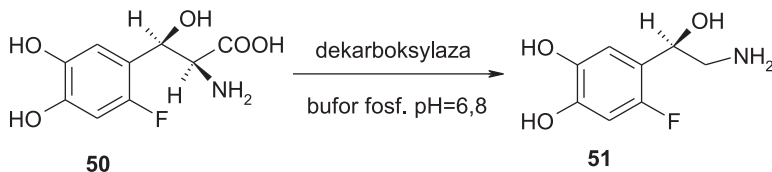
Główne działanie tego enzymu to dekarboksylacja aromatycznych *L*-aminokwasów, ale katalizuje on również pół-transaminację aromatycznych *D*-aminokwasów (w niskim pH i w warunkach beztlenowych) oraz utleniające deaminowanie aromatycznych amin (w wysokim pH, w warunkach tlenowych) [38]. W przypadku, gdy substratem jest serotonina (**48**) obydwa te mechanizmy są obserwowane i prowadzą do tego samego produktu (**49**).



Schemat 22
Scheme 22

Enzym jest związany z pirydoksyno-5'-fosforanem (PLP), do którego wiąże się substrat. PLP jest przekształcany podczas reakcji do pirydoksamino-5'-fosforanu.

Rekombinowaną w *E. coli* dekarboksylazę DOPA zastosowano w reakcji dekarboksylacji *L-treo*-(3,4-dihydroksyfenylo)seryny do norepinefryny (NE) [39]. 6-Fluoro-*L-treo*-(3,4-dihydroksyfenylo)seryna (**50**) była dekarboksylowana do 6-fluoro-NE (**51**), która jest agonistą α -adrenergicznym. Stwierdzono, że reakcje z 2-fluorowanym analogiem związku **50** nie zachodzą.

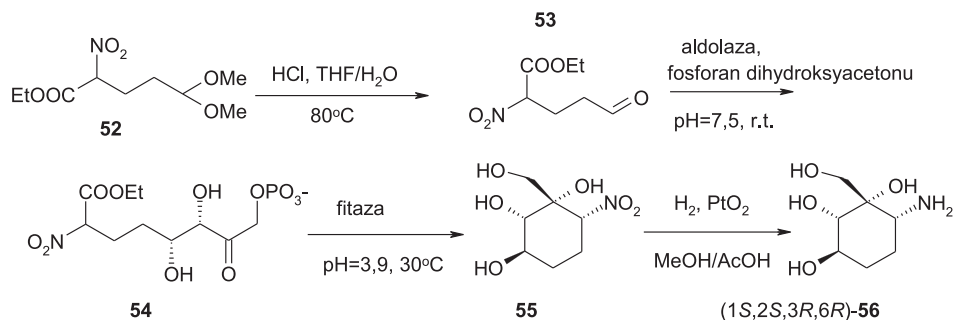


Schemat 23
Scheme 23

Związek **50** jest dekarboksylowany z taką samą szybkością jak jego niefluorowany analog.

2.3.2. Aldolazy

Aldolazy izolowano np. z wątroby wołowej [40] (zawieszenie w KCl, dodatek metanolu, filtracja) lub mięśni królika. Katalizują one reakcje kondensacji aldolowej, które prowadzą do formowania nowego wiązania C–C [41]. Fruktozo-1,6-difosforo aldolaza z mięśni królika była zastosowana w syntezie aminocykloheksitolu (**56**), który jest analogiem aminocyklitolowalioaminy, inhibitora glikozydaz [42]. Inhibitory takie są używane w leczeniu różnorodnych infekcji.



Kondensacja katalizowana przez aldolazę była wysoce stereoselektywna. Enzym kontroluje konfigurację na obu atomach węgla tworzącego się wiązania C–C. Produkt **56** otrzymano ze związku **55** poprzez chemiczną redukcję grupy nitrowej do aminowej. Wydajność całkowita wynosiła około 60%.

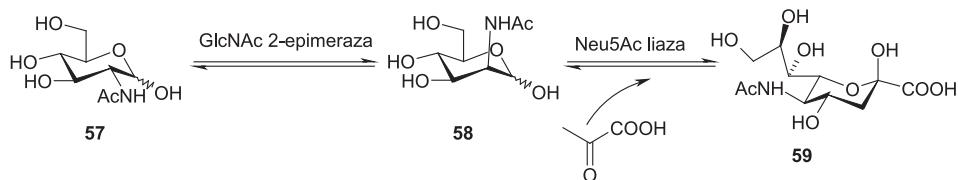
2.4. ZASTOSOWANIA IZOMERAZ W SYNTEZIE ORGANICZNEJ

Izomerazy są enzymami, które katalizują zmianę wzajemnego ułożenia atomów lub grup atomów w cząsteczce związku chemicznego, bez zmiany ich ilości. Są one rzadko używane w biotransformacjach i produkowane raczej przez mikroorganizmy. Jednak epimerazy można otrzymać również z tkanek zwierzęcych.

2.4.1. *N*-acylo-*D*-glukozamino-2-epimeraza (GlcNAc-2-epimeraza)

Ten enzym izolowano z nerek wieprzowych i eksprymowano w *E.coli* [43]. W nerkach wieprzowych ma on aktywność białka wiążącego reninę.

GlcNAc-2-epimeraza z liazą *N*-acetylneuraminianu pochodzącą z *E.coli* były zastosowane do produkcji kwasu *N*-acetylneuraminowego (59) z *N*-acetylo-*D*-glukozaminy (57) i kwasu pirogronowego [44]. Oba enzymy dodano jednocześnie do mieszaniny reakcyjnej.



Schemat 25
Scheme 25

Pierwszy etap jest enzymatyczną epimeryzacją do *N*-acetylo-*D*-mannozoaminy (58), a drugi to kondensacja aldolowa. Równowagę reakcji przesunięto w stronę kwasu Neu5Ac dzięki użyciu nadmiaru kwasu pirogronowego. Konwersja GlcNAc wyniosła 77%.

2.5. LIGAZY

Ligazy to enzymy katalizujące tworzenie nowych wiązań chemicznych, łączenie cząsteczek w większe związki. Znajdują zastosowanie w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej, na razie brak doniesień o ich wykorzystaniu w syntezie organicznej. Są to enzymy pozyskiwane z mikroorganizmów, a nie z tkanek zwierzęcych, choć oczywiście występują w organizmach zwierząt.

PODSUMOWANIE

Na podstawie przytoczonego piśmiennictwa można stwierdzić, iż tkanki zwierzęce są źródłem bardzo wielu enzymów, używanych jako biokatalizatory różnorodnych reakcji. Zdecydowanie widać, że największe zastosowanie znalazły hydrolazy ponadto dużo jest też zastosowań oksydoreduktaz. W znacznie mniejszym stopniu wykorzystuje się transferazy, liazы i izomerazy, natomiast ligazy jak dotąd nie znalazły zastosowań w syntezie organicznej.

Znane są przykłady stosowania enzymów immobilizowanych, pokazano to dla dekarboksylazy DOPA (otrzymywanie 6-fluoronorepinefryny). Przytoczono również przykłady zastosowań enzymów rekombinowanych – reduktazy karbonylowej

z serca świni (redukcja 4-benzoilopirydyny) oraz GlcNAc-2-epimerazy (otrzymywanie kwasu *N*-acetyloneuraminowego).

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.

Z przytoczonych faktów wynika, iż biokataliza z użyciem enzymów zwierzęcych jest dynamicznie rozwijającą się dziedziną i w przyszłości będzie coraz szerzej wykorzystywana.

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.E. Leresche, H.-P. Meyer, *Org. Process. Res. Dev.*, 2006, **10**, 572.
- [2] K. Dalziel, *Biochem. J.*, 1960, **80**, 440.
- [3] A.J. Bridges, P. Sundara Raman, G.S.Y. Ng, J. Bryan Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 1461.
- [4] I.J. Jakovac, H.B. Goodbrand, K.P. Lok, J. Bryan Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 4659.
- [5] A.J. Irwin, J. Bryan Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, **99**, 1625.
- [6] W. Gładkowski, *Wiad. Chem.*, 2009, **63**, 361.
- [7] Ch.H. Wong, J.R. Matos, *J. Org. Chem.*, 1985, **50**, 1992.
- [8] H. Shigematsu, T. Matsumoto, G. Kawachi, Y. Hirose, K. Naemura, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 1995, **6**, 3001.
- [9] L.K.P. Lam, I.A. Gair, J. Bryan Jones, *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 1611.
- [10] J. Davies, J. Bryan Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 5405.
- [11] T. Takemura, J. Bryan Jones, *J. Org. Chem.*, 1983, **48**, 791.
- [12] E. Caspi, Ch.R. Eck, *J. Org. Chem.*, 1977, **42**, 767.
- [13] C. Baldoli, P. Del Buttero, S. Maiorana, G. Ottolina, S. Riva, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 1998, **9**, 1497.
- [14] T. Arai, A. Inoue, Y. Uematsu, T. Sako, N. Kimura, *Res. Vet. Sci.*, 2003, **75**, 15.
- [15] S. Fernandes, R. Hatti-Kaul, B. Mattiasson, *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, **79**, 472.
- [16] B.L. Hirschbain, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 4458.
- [17] M.-J. Kim, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 2959.
- [18] . Miyazaki, T. Sakakibara, H. Sato, Y. Kajihara, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 1411.
- [19] R.L. Hanson, M.D. Schwinden, A. Banerjee, D.B. Brzozowski, B.-Ch. Chen, B.P. Patel, C.G. McNamee, G.A. Kodersha, D.R. Kronenthal, R.N. Patel, L.J. Szarka, *Bioorgan. Med. Chem.*, 1999, **7**, 2247.
- [20] R.N. Patel, *Biomol. Eng.*, 2001, **17**, 167.
- [21] G.L. Forrest, B. Gonzalez, *Chem.-Biol. Interact.*, 2000, **129**, 21.

- [22] Y. Imamura, T. Migita, M. Otagiri, T. Choshi, S. Hibino, *J. Biochem.* (Tokyo), 1999, **125**, 41.
- [23] N. Usami, S. Ishikura, H. Abe, M. Nagano, M. Uebuchi, A. Kuniyasu, M. Otagiri, H. Nakayama, Y. Imamura, A. Hara, *Chem.-Biol. Interact.*, 2003, **143**, 353.
- [24] H. Shimada, S. Fujiki, M. Oginuma, M. Asakawa, T. Okawara, K. Kato, S. Yamamura, H. Akita, A. Hara, Y. Imamura, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2003, **23**, 29.
- [25] N.A. Salvi, S.R. Udupa, A. Banerji, *Biotech. Lett.*, 1998, **20**, 201.
- [26] Z. Yassen, S. Jadallah, *The Islamic Univ. J.*, 2009, **17**, 37.
- [27] S. Christen, P.T. Southwell-Keely, R. Stocker, *Biochem.*, 1992, **31**, 8090.
- [28] E. Kuhn, K. Brand, *Biochem.*, 1972, **11**, 1767.
- [29] E. Graci, M. Mangiarotti, S. Pontremoli, *Biochem.*, 1962, **1**, 628.
- [30] J.H. Yoon, G.H. Ryu, P. Finch, J.S. Rhee, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2001, **15**, 191.
- [31] G.N. Jenkins, A.V. Stachulski, F. Scheinmann, N.J. Turner, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2000, **11**, 413.
- [32] M.M. Palcic, *Methods Enzymol.*, 1994, **230**, 300.
- [33] V.A. Morais, J. Costa, *J. Biotech.*, 2003, **106**, 69.
- [34] X. Qian, O. Hindsgaul, H. Li, M.M. Palcic, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 2184.
- [35] J.K. Dorsey, J.A. Dorsey, J.W. Porter, *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**, 5353.
- [36] B.C. Reed, H.C. Rilling, *Biochem.*, 1975, **14**, 50.
- [37] C. Borri Voltattorni, A. Minelli, P. Vecchini, A. Fiori, C. Turano, *Eur. J. Biochem.*, 1979, **93**, 181.
- [38] M. Bertoldi, C. Borri Voltattorni, *Protein Science*, 2001, **10**, 1178.
- [39] C. Borri Voltattorni, M. Bertoldi, S. Bianconi, W.-P. Deng, K. Wong, I.H. Kim, B. Herbert, K.L. Kirk, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2002, **295**, 107.
- [40] R.J. Peanasky, H.A. Lardy, *J. Biol. Chem.*, 1958, **233**, 365.
- [41] a) G. Seoane, *Curr. Org. Chem.*, 2000, **4**, 283; b) J. Sukumaran, U. Hanefeld, *Chem. Soc. Rev.*, 2005, **34**, 530.
- [42] L. El Blidi, D. Crestia, E. Gallienne, C. Demuynck, J. Bolte, M. Lemaire, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2004, **15**, 2951.
- [43] I. Maru, Y. Ohta, K. Murata, Y. Tsukada, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 16294.
- [44] Z. Liu, R. Weis, A. Glieder, *Food Technol. Biotech.*, 2004, **42**, 248.

Praca wpłynęła do Redakcji 1 września 2011

