

BIOKATALITYCZNE METODY OTRZYMYWANIA NIERACEMICZNYCH ALKOHOLI ARYLOALLILOWYCH

BIOCATALYTIC METHODS FOR PREPARATION OF NONRACEMIC ARYLALLYLIC ALCOHOLS

Sara Szymkuć¹, Ryszard Ostaszewski²

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. Enancjoselektywne hydroksylowanie
2. Mikrobiologiczna deracemizacja
3. Enzymatyczny dynamiczny rozdział kinetyczny;
 - 3.1. Enancjoselektywna transestryfikacja;
 - 3.2. Enancjoselektywna hydroliza;
 - 3.3. Enancjoselektywne utlenianie
4. Enzymatyczny dynamiczny rozdział kinetyczny
 - 4.1. Enzymatyczny rozdział kinetyczny z zastosowaniem kompleksów palladu
 - 4.2. Enzymatyczny dynamiczny rozdział kinetyczny z zastosowaniem kompleksów rutenu
5. Enzymatyczna enancjoselektywna redukcja

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Sara Szymkuć (ur. 1988 r.) w lutym 2011 r. ukończyła z wyróżnieniem pierwszy stopień studiów na kierunku Biotechnologia, Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. Obecnie kontynuuje naukę na studiach magisterskich na tym samym kierunku, specjalności Biotechnologia Chemiczna: Leki i Kosmetyki. Od 2009 r. współpracuje z zespołem XX Instytutu Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk, którego kierownikiem jest prof. Ryszard Ostaszewski.



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 IChOPAN. 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 66 publikacji naukowych z listy filadelfijskiej, jednego rozdziału z książki Wiley „Novel Concepts in Catalysis and Chemical Reactors”, pięciu patentów oraz 29 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

Different methods for preparing nonracemic arylallylic alcohols are presented in this work. A key feature was an application the biocatalyst as a mean to obtain final products. These compounds play an important role in pharmaceutical industry, because they are substrates in the synthesis of various important therapeutics [1–3]. Methods presented in this work are divided into five main groups:

1. enantioselective hydroxylation,
2. microbiological deracemization,
3. enzymatic kinetic resolution,
4. enzymatic dynamic kinetic resolution,
5. enantioselective reduction.

First two methods use only microorganisms like bacteria [4, 5, 10], fungi [6–8] or yeasts [11] as biocatalysts. Owing to the metabolic processes in the cells it was possible to obtain nonracemic arylallylic alcohol (results for method 2 are presented in Table 1). Unfortunately, the data were insufficient to create direct correlation between values of enantiomeric excess and types of applied microorganisms.

Methods 3 and 4 used only isolated enzymes as biocatalysts. They belong to two classes: hydrolases and oxidoreductases. Oxidoreductases were used in the enzymatic kinetic resolution based on the enantioselective oxidation [28] of one enantiomer of the racemic arylallylic alcohol. Nevertheless, hydrolases [12–27], mainly lipases, isolated from microorganisms are enzymes of common use in enzymatic kinetic resolution. Owing to this method it was possible to obtain final products with excellent enantioselectivity (results are presented in Tables 2 and 3). Because kinetic resolution and dynamic kinetic resolution are related processes, in most cases similar enzymes are used. The choice of lipases as biocatalysts for method 4 was caused by the fact that they are able to catalyze enantioselective transesterification of arylallylic alcohols or their acetates. Furthermore, racemization is very important factor for efficacy of dynamic kinetic resolution processes. In most cases they are catalyzed by different types of complexes based on palladium [30, 31] and ruthenium [32, 34]. Final products prepared by this method had very high enantiomeric excesses and yields up to 93% (results are presented in Tables 4 and 5).

The only method, presented in this work, that allowed to use both enzymes [39–41] and microorganisms [35–38] as biocatalysts, was enantioselective reduction. This method allows to obtain nonracemic arylallylic alcohols with excellent enantiomeric excess and yields up to 85% (results are presented in Table 6).

In summary, all methods presented in this work show the advantages of biocatalysis as an alternative route to traditional chemical methods.

Keywords: biocatalysis, nonracemic arylallylic alcohols, organic synthesis, enzymes, microorganisms

Słowa kluczowe: biokataliza, nieracemiczne alkohole aryloallilowe, synteza organiczna, enzymy, mikroorganizmy

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW SKRÓTÓW

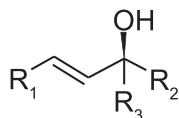
Ac	– grupa acetylowa,
AChE	– esteraza acetylocholinowa
antranylo	– podstawnik antranylowy
CAL	– lipaza z <i>Candida antarctica</i>
CPCR	– reduktaza karbonylowa wyizolowana z drożdży <i>Candida parapsilosis</i>
E	– enancjoselektywność
ee	– nadmiar enancjomeryczny
Et	– podstawnik etylowy, CH ₃ CH ₂ -
FDH	– dehydrogenaza mrówczanowa wyizolowana z drożdży <i>Candida boidinii</i>
furylo	– podstawnik furylowy
k	– stała szybkości reakcji
M-TEADH	– zmutowana dehydrogenaza alkoholowa wyizolowana z bakterii <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>
NAD	– dinukleotyd aminoadeninowy
NADH	– zredukowana forma dinukleotydu aminoadeninowego
NADP	– fosforan dinukleotydu aminoadeninowego
NADPH	– zredukowana forma fosforanu dinukleotydu aminoadeninowego
naftylo	– podstawnik naftylowy
Ph	– podstawnik fenylowy, C ₆ H ₅
PSL	– lipaza wyizolowana z bakterii <i>Pseudomonas fluorescens</i>
THF	– tetrahydrofuran

WSTĘP

Biokataliza stanowi dziedzinę nauki, która w obecnych czasach dynamicznie się rozwija, ponieważ spełnia wszystkie wymagania zielonej chemii. Procesy biokatalityczne są wykonywane za pomocą izolowanych enzymów, całych komórek: roślinnych, zwierzęcych lub mikroorganizmów, niezależnie od ich postaci (komórki żywe, liofilizowane itd.). Przeprowadzenie reakcji z udziałem całych komórek czy enzymów często jest bardziej selektywne i mniej toksyczne od metod chemicznych.

W pracy przedstawiono zalety i możliwości biokatalizy w aspekcie syntezy nieracemicznych alkoholi aryloallilowych jako ogólnej metody umożliwiającej otrzymanie ważnych, dla przemysłu chemicznego, farmaceutycznego oraz kosmetycznego związków w enancjomerycznie czystej postaci.

Na Schemacie 1 przedstawiono ogólną budowę tej grupy związków.

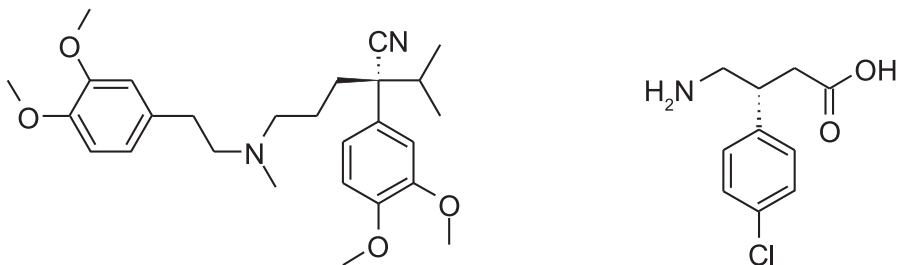


Schemat 1. Ogólna budowa alkoholi aryloallilowych.

Scheme 1. General structure of arylallylic alcohols.

Najczęściej występującymi podstawnikami w strukturze alkoholi aryloallilowych są; $R_1 = \text{Ar}$, $R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = \text{H}$ - wtedy wiązanie podwójne znajduje się w środku cząsteczki oraz $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Ar}$, $R_3 = \text{H}$ - w tym przypadku wiązanie podwójne jest terminalne. Natomiast struktury cykliczne tych alkoholi należą do wyjątków.

Nieracemiczne alkohole aryloallilowe są cennymi substratami w syntezie organicznej a szczególnie w otrzymywaniu związków biologicznie czynnych takich jak, na przykład, werapamil [1], baklofen [2] (Rys. 1), czy cukrów, które rzadko występują w przyrodzie [3].



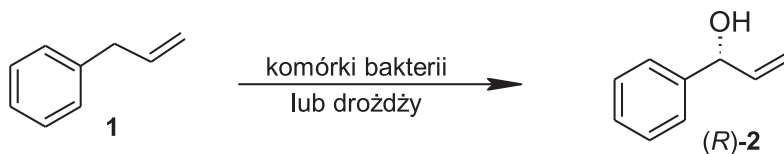
Rysunek 1. Struktura werapamilu (po lewej) oraz baklofenu (po prawej).

Figure 1. Structure of verapamil (left) and baclofen (right).

1. ENANCJOSELEKTYWNE HYDROKSYLOWANIE

Pierwszą metodą, która nie jest zbyt powszechnie stosowana w syntezie nieracemicznych alkoholi aryloalilowych, jest enancjoselektywne hydroksylowanie, nazwane także biohydroksylowaniem. Metoda polega na wprowadzeniu grupy hydroksylowej na miejsce atomu wodoru w pozycji benzylovej 3-arylopropenu (**1**). Najprawdopodobniej reakcję tą katalizuje pojedynczy enzym lub kilka enzymów które są NAD(P)⁺-zależnymi monooksygenazami. Mechanizm reakcji jak dotąd nie został poznany.

Proces przeprowadzono za pomocą różnych rodzajów bakterii oraz grzybów (Schemat 2).



Schemat 2. Schemat mikrobiologicznego hydroksylowania.
Scheme 2. Schematic representation of microbial hydroxylation.

Chen i współpracownicy [4] przeprowadzili enancjoselektywne hydroksylowanie alkenu **1** za pomocą szczepu TA-5 bakterii *Pseudomonas monteilli*. Wymienione mikroorganizmy należą do grupy bakterii degradujących toluen lub etylobenzen. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów z alkenem **1** otrzymano alkohol (R)-**2** z 64% wydajnością i 92% nadmiarem enancjomerycznym.

W kolejnych badaniach wykorzystano bakterie *Bacillus megaterium* [5] co umożliwiło otrzymanie alkoholu (R)-**2** z 70% nadmiarem enancjomerycznym przy 49% konwersji; wartości wydajności nie podano w publikacji, ale wydaje się, że nie była zbyt wysoka.

Uzura i współpracownicy wykonali badania nad enancjoselektywnym hydroksylowaniem alkenu **1** komórkami grzybów, *Fusarium moniliforme*, w których zastosowano szczep MS31, w fazie spoczynku [6–8]. W wyniku tych badań uzyskano alkohol (R)-**2** z 63% nadmiarem enancjomerycznym. Niestety, również w tym przypadku, nie podano wydajności reakcji.

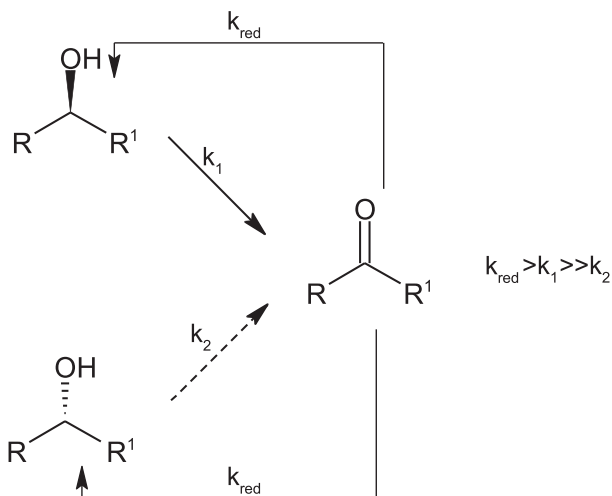
Wydaje się, że kolejne badania nad reakcją enancjoselektywnego hydroksylowania substratu **1** i jego analogów będą miały na celu opracowanie procedur, które umożliwią otrzymanie odpowiednich produktów z wyższą wydajnością oraz o zdecydowanie wyższej czystości enancjomerycznej.

2. MIKROBIOLOGICZNA DERACEMIZACJA

Metody chemiczne prowadzące do racemicznych alkoholi aryloallilowych są doskonale znane. Niestety, rozdzielanie otrzymanych racematów jest procesem złożonym i wymagającym dużego nakładu pracy i zazwyczaj kosztownym. Zdecydowanie lepszym rozwiązaniem jest wykorzystanie koncepcji deracemizacji ogólnej [9] polegającej na przekształcaniu mieszaniny racemicznej w enancjomerycznie czysty związek.

W przypadku alkoholi ogólną ideę procesu deracemizacji przez stereoinwersję przedstawiono na Schemacie 3. Każdy z enancjomerów ulega dwóm reakcjom: enancjoselektywnego utlenienia oraz nieselektywnej redukcji. Ponieważ reakcja utleniania jest enancjoselektywna, jeden z enancjomerów zostanie przekształcony w keton z dużą przewagą. Keton ten będzie redukowany do racemicznego alkoholu.

Jeżeli stała szybkości redukcji k_{red} będzie wyższa od stałej szybkości reakcji utleniania k_1 enancjomeru preferowanego przez enzym, wtedy po kilku cyklach można otrzymać enancjomerycznie czysty produkt z wydajnością bliską 100%.

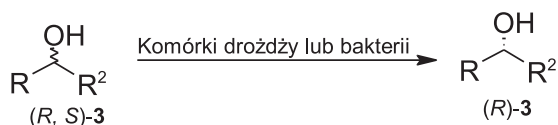


Schemat 3. Mechanizm deracemizacji przez stereoinwersję alkoholi drugorzędowych.

Scheme 3. Deracemisation of secondary alcohols via stereoinversion.

Enzymami odpowiedzialnymi za katalizowanie tych reakcji są dehydrogenazy, obecne w komórkach mikroorganizmów.

Mikrobiologiczną deracemizację alkoholi aryloallilowych prowadzono z użyciem bakterii *Pseudomonas paucimobilis* [10], oraz drożdży *Candida parapsilosis* [11].



Schemat 4. Schemat mikrobiologicznej deracemizacji.

Scheme 4. Schematic representation of microbial deracemization.

Metodzie poddano niepodstawione racemiczne alkohole aryloallilowe **3a**, **3b** oraz **3c**, **3d**, **3e**, **3f**, **3g**, **3h**, **3i** zawierające grupę fenylową z podstawnikami w pozycji *ortho* i *para*, a także alkohole **3j**, **3k** o sterycznie rozbudowanych grupach aromatycznych. W Tabeli 1 zestawiono wydajności reakcji oraz nadmiary enancjomeryczne otrzymanych tą metodą nieracemicznych alkoholi (*R*)-**3a-k**.

Tabela 1.

Table 1.

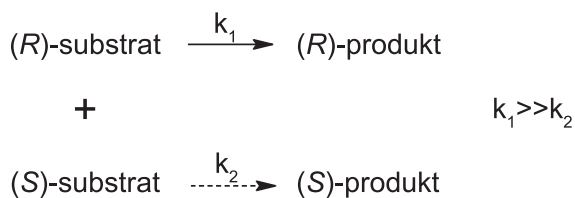
3	R	R ²	ee (%)	Wydajność (%)	Biokatalizator
a	Ph	CH ₂ =CH ₂	45	90	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> [10]
b	Ph	CH ₃	>99	75	<i>Candida parapsilosis</i> [11, 12]
c	4-CH ₃ -Ph-CH ₂ =CH	CH ₃	98	72	<i>Candida parapsilosis</i> [11]
d	2-CH ₃ -Ph-CH ₂ =CH	CH ₃	95	73	<i>Candida parapsilosis</i> [11]
e	4-OCH ₃ -Ph-CH ₂ =CH	CH ₃	>99	70	<i>Candida parapsilosis</i> [11]
f	2-OCH ₃ -Ph-CH ₂ =CH	CH ₃	94	69	<i>Candida parapsilosis</i> [11]
g	4-Cl-Ph-CH ₂ =CH	CH ₃	>99	79	<i>Candida parapsilosis</i> [11]
h	2-Cl-Ph-CH ₂ =CH	CH ₃	92	70	<i>Candida parapsilosis</i> [11]
i	2,4-Cl-Ph-CH ₂ =CH	CH ₃	90	68	<i>Candida parapsilosis</i> [11]
j	1-nafteno-CH ₂ =CH ₂	CH ₃	76	71	<i>Candida parapsilosis</i> [11]
k	9-antreno-CH ₂ =CH ₂	CH ₃	10	78	<i>Candida parapsilosis</i> [11]

Poddanie alkoholi **3c**, **3e**, **3g**, zawierających w pierścieniu aromatycznym podstawnik w pozycji 4, procesowi deracemizacji prowadziło do uzyskania związków, z wyższym nadmiarem enancjomerycznym od alkoholi **3d**, **3f**, **3h** zawierających analogiczne podstawniki w pozycji 2. Z kolei nadmiar enancjomeryczny uzyskanych w wyniku deracemizacji związków **3j** i **3k** posiadających sterycznie rozbudowane grupy aryłowe (naftyłową i antryłową) malał ze wraz ze wzrostem jej wielkości. Widoczny jest również spadek wartości nadmiaru enancjomerycznego dla alkoholu **3b**, który różni się od pozostałych, terminalnym położeniem wiązania podwójnego.

Uzyskane wyniki pokazują, że mikrobiologiczna deracemizacja jest metodą odpowiednią dla alkoholi posiadających proste i monopierścieniowe grupy aromatyczne oraz wiązania podwójne położone w środku cząsteczek. W takich przypadkach otrzymuje się odpowiednie alkohole z doskonałymi wartościami nadmiarów enancjomerycznych oraz dobrymi wydajnościami

3. ENZYMATYCZNY ROZDZIAŁ KINETYCZNY

Najpopularniejszą biokatalityczną metodą syntezy nieracemicznych alkoholi aryloallilowych jest enzymatyczny rozdział kinetyczny, którego idea została przedstawiona na Schemacie 5. W reakcji katalizowanej przez enzym stałe szybkości reakcji poszczególnych enancjomerów mogą się znacznie różnić. W przypadku, kiedy $k_1 \gg k_2$, uzyskamy w przewodzie zdecydowanie większą ilość produktu otrzymanego z szybciej reagującego enancjomeru substratu a tym samym w mieszaninie reakcyjnej będzie rosło stężenie drugiego z enancjomerów.



Schemat 5. Schemat enzymatycznego rozdziału kinetycznego.
 Scheme 5. Schematic representation of enzymatic kinetic resolution.

W idealnym przypadku, jeden z enancjomerów w całości ulega danej reakcji, zaś drugi pozostaje nieprzereagowany. Tym samym można bez problemu, metodami fizycznymi, oddzielić substrat od produktu.

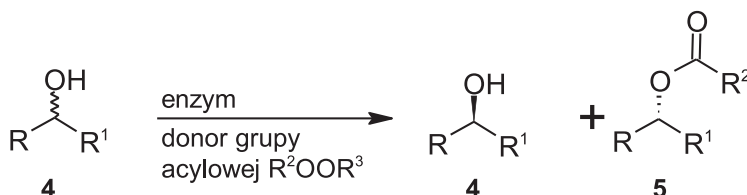
Do zalet enzymatycznego rozdziału kinetycznego należy prostota wykonania, jednoetapowość oraz niski koszt metody. Niestety można uzyskać tylko 50% wydajność tego procesu.

Istnieją trzy warianty enzymatycznego rozdziału kinetycznego umożliwiające otrzymanie nieracemicznych alkoholi aryloallilowych:

- enancjoselektywna transestryfikacja racemicznych alkoholi aryloallilowych,
- enancjoselektywna hydroliza estrów alkoholi aryloallilowych,
- enancjoselektywne utlenienie racemicznych alkoholi.

3.1. ENANCJOSELEKTYWNA TRANSESTRYFIKACJA

Spośród wszystkich wariantów, enancjoselektywna transestryfikacja jest najczęściej stosowaną procedurą. Ogólna idea procesu została przedstawiona na Schemacie 6.



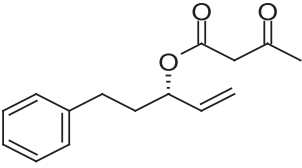
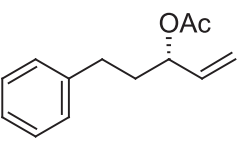
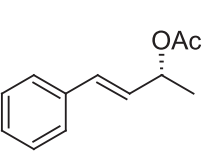
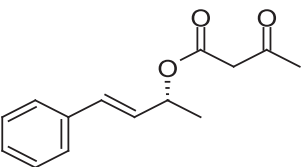
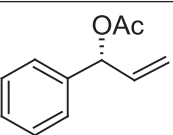
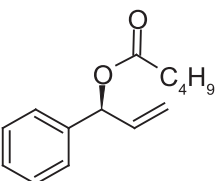
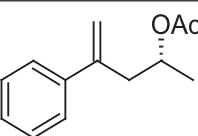
Schemat 6. Schemat enancjoselektywnej transestryfikacji racemicznych octanów aryloallilowych.
Scheme 6. Enantioselective transesterification of racemic arylallylic acetates.

Biokatalizatorami w tej metodzie są głównie lipazy; natywne lub modyfikowane poprzez: immobilizację, opłaszczanie cieczami jonowymi [12] lub surfaktantami [13] oraz połączenie z magnetycznymi nanocząsteczkami [14]. Mimo, że lipazy stanowią dominującą grupę biokatalizatorów, Martin-Matute i Backväll [15] przeprowadzili (*S*)-stereoselektywny enzymatyczny rozdział kinetyczny z zastosowaniem subtilizyny Carlsberga. Prócz biokatalizatorów, warianty enancjoselektywnej transestryfikacji różnią się zastosowanym donorem grupy acylowej. Najczęściej był to powszechnie dostępny octan winylu, który jest nieodwracalnym czynnikiem estyfikującym. Ponadto stosowano: walerian izopropenylu, maślan trifluoroetylu oraz acetylooctan etylu, który jednocześnie pełnił rolę rozpuszczalnika [16].

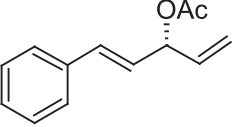
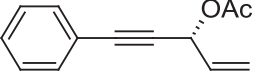
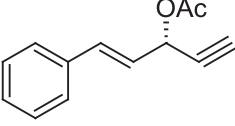
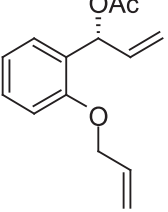
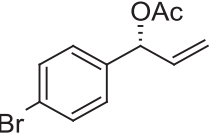
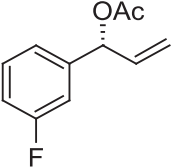
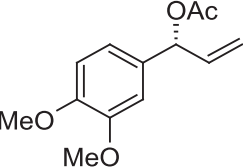
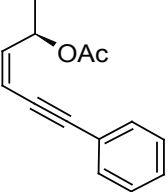
Innym czynnikiem, istotnym dla prawidłowego przebiegu enzymatycznego rozdziału kinetycznego, jest dobór odpowiedniego rozpuszczalnika. W przedstawionych wariantach stosowano niepolarne, aprotyczne rozpuszczalniki organiczne: toluen, heksan, eter etylowy lub izopropylowy i tetrahydrofuran. Wyjątkiem był rozdział kinetyczny w cieczy jonowej, przeprowadzony przez Tsukadę i współpracowników [17].

W Tabeli 2 zestawiono produkty otrzymane za pośrednictwem reakcji enancjoselektywnej transestryfikacji.

Tabela 2.
 Table 2.

5	Struktura produktu	Wydajność (%)	E	Literatura
a		42	70	[16]
b		49 bd	>1200 >200	[18] [12]
c		50 47 bd 32 31 52,1 ^a 32 49	>20 >100 >200 165 >200 >200 165 357	[19, 20] [23] [12] [17] [17] [22] [14] [15]
d		41	226	[16]
e		32 bd 47	9 60 >1000	[19, 20] [23] [21]
f		51	30	[13]
g		47	>20	[19, 20]

a – podana wartość to konwersja

5	Struktura produktu	Wydajność (%)	E	Literatura
h		49	>20	[19, 20]
i		42	>20	[19, 20]
j		44	>20	[19, 20]
k		46	200	[25]
l		42	>1000	[21]
m		41	>1000	[21]
n		45	>1000	[21]
o		bd	77	[26]

a – podana wartość to konwersja

5	Struktura produktu	Wydajność (%)	E	Literatura
p		45	44	[15]
r		52	105	[15]
s		47	278	[15]
t		42	645	[15]

a – podana wartość to konwersja

Estry **5a** i **5b**, otrzymane zostały z tego samego alkoholu i różnią się wyłącznie częścią kwasową pochodzącą od czynnika estryfikującego. Z porównania metod ich syntezy wynika, że wyższą enancjoselektywność reakcji osiągnięto stosując rozdział kinetyczny z octanem winylu wobec lipazy z *Burkholderia cepacia* [18], gdy porównać to z reakcją z acetylooctanem etylu wobec lipazy z *Candida antarctica* [16]. Najwyższą enancjoselektywność o wartości powyżej 1200 uzyskano dodając do mieszaniny reakcyjnej, siarkowych eterów koronowych [12]. Niemniej jednak w przypadku związków **5c** i **5d**, które również powstały z tego samego alkoholu, transestryfikacja acetylooctanem etylu była bardziej enancjoselektywna oraz wydajna od większości zastosowanych transestryfikacji octanem winylu, w której biokatalizatorem była lipaza z *Burkholderia cepacia*.

Spśród wszystkich wariantów otrzymywania octanu **5e**, najskuteczniejszy okazał się rozdział kinetyczny z zastosowaniem Novozymu 435 [21]. Ponadto w przypadku enancjoselektywnej transestryfikacji związku **5f** różniącego się od **5e** wyłącznie grupą kwasową, z udziałem subtilizyny Carlsberga nastąpił wyraźny spadek enancjoselektywności oraz otrzymano ester o przeciwnej konfiguracji.

Octany **5h**, **5i**, **5j**, **5o** zawierające dodatkowe wiązania podwójne w łańcuchu alifatycznym zostały poddane transestryfikacji, której enancjoselektywność wyniosła powyżej 20. W przypadku związków **6h**, **6i**, **6j**, dokładna wartość enancjoselektywności nie jest znana, ponieważ autorzy publikacji przyjęli liczbę 20 jako górną wartość podawanej enancjoselektywności. Uznali, iż rozdział kinetyczny o takiej

enantjoselektywności zapewnia całkowity rozdział mieszaniny racemicznej. Ponieważ nadmiar enancjomeryczny otrzymanych produktów przekraczał 95%, można uznać, że ten wariant enzymatycznego rozdziału kinetycznego jest odpowiedni do otrzymywania alkoholi aryloallilowych o większej liczbie wiązań nienasyconych.

Octany **5k**, **5l**, **5m**, **5n** zawierające terminalne wiązanie podwójne oraz podstawniki w pierścieniu aromatycznym, otrzymano z doskonałą wydajnością i enantjoselektywnością. Rozdział kinetyczny prowadzono Novozymem 435, gdy octan winylu pełnił rolę donora grupy acylowej [21, 25]. Różnica w wartościach enantjoselektywności mogła być spowodowana, zastosowaniem różnych rozpuszczalników: toluenu w przypadku związków **5l**, **5m**, **5n** i eteru izopropylowego dla **5k**.

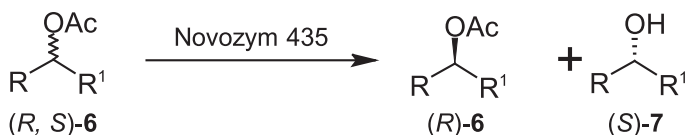
Ponadto, w wyniku rozdziału kinetycznego otrzymano z bardzo wysoką wydajnością oraz enantjoselektywnością nieracemiczne octany **5r**, **5s** o rozbudowanej przestrzennie grupie aromatycznej. Katalizatorem tej transestryfikacji była lipaza z *Burkholderia cepacia*, a donorem grupy arylowej – octan winylu [15].

Należy również zwrócić uwagę na fakt, że związek **5p** o analogicznej strukturze do **5c** otrzymano z dużo gorszą enantjoselektywnością. Przyczyną mogła być obecność podstawnika chlorowcowego w pierścieniu.

Octan **5t** otrzymano z doskonałą enantjoselektywnością. Fakt ten może wskazywać na usztywnienie konformacyjne poprzez wprowadzenie układu cyklicznego, odpowiadające budowie centrum aktywnego enzymu. Analogiczny octan **5c** o acyklicznej strukturze, w najlepszym przypadku został otrzymany z dwukrotnie mniejszą enantjoselektywnością [15].

3.2. ENANTJOSELEKTYWNA HYDROLIZA

Zdecydowanie mniej popularną metodą otrzymywania nieracemicznych alkoholi aryloallilowych jest enantjoselektywna hydroliza [27], która stanowi odwrotność enantjoselektywnej transestryfikacji (Schemat 7).



Schemat 7. Schemat enantjoselektywnej hydrolizy racemicznych octanów.
Scheme 7. Enantioselective hydrolysis of racemic acetates.

Enantjoselektywnej hydrolizie poddano szereg alkoholi aryloallilowych, niepodstawionych oraz tych zawierających podstawniki elektrondonorowe lub elektronoakceptorowe w pierścieniu fenylowym. Wyniki zestawiono w Tabeli 3.

Tabela 3.
Table 3.

7	R	R ²	Wydajność (%)	E	Literatura
a	Ph-CH=CH	CH ₃	45	>100	[22]
b	Ph	CH=CH ₂	51,2 ^b	>100	[27]
c	<i>p</i> -CN-Ph	CH=CH ₂	49	>100	[27]
d	<i>p</i> -Cl-Ph	CH=CH ₂	48	>100	[27]
e	<i>p</i> -O ₂ N-Ph	CH=CH ₂	51,3 ^b	>100	[27]
f	<i>p</i> -CH ₃ -Ph	CH=CH ₂	53 ^b	>500	[27]
g	3-pirydyno	CH=CH ₂	48,1 ^b	>100	[27]
h	1-naftylo	CH=CH ₂	51,2 ^b	>100	[27]

a – podana wartość to konwersja.

b – wydajność określona za pomocą NMR.

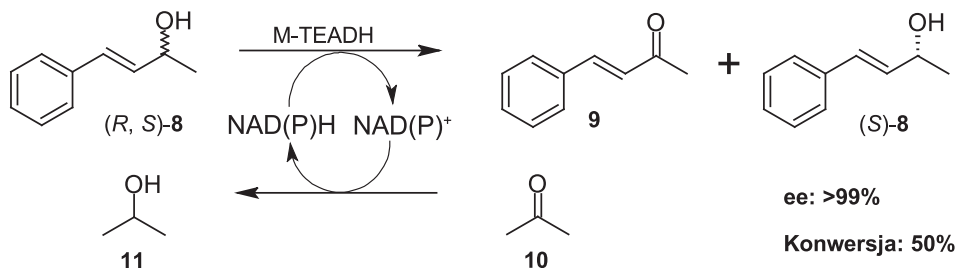
Wykazano, że dogodnym biokatalizatorem tej reakcji jest Novozym 435. Zastosowanie innych lipaz jest możliwe, ale otrzymane wyniki są znacznie gorsze. Ze względu na charakter procesu, niezbędne jest zastosowanie wodnego lub wodno-organicznego środowiska reakcji.

Dla związków **7c**, **7d**, **7e** czas reakcji, w tych samych warunkach, był od 8 do 16 razy krótszy w porównaniu z innymi alkoholami. Wskazuje to na istnienie związku pomiędzy przebiegiem hydrolizy, a obecnością podstawnika elektronoakceptorowego w pierścieniu aromatycznym. Niezależnie od rodzaju podstawnika aromatycznego oraz usytuowania wiązania podwójnego, wszystkie produkty enancjoselektywnej transestryfikacji otrzymano z doskonałą wydajnością oraz enancjoselektywnością.

3.3. ENANCJOSELEKTYWNE UTLENIE NIE

Musa [28] i współpracownicy zaproponowali inny wariant rozdziału kinetycznego, polegający na enancjoselektywnym utlenieniu racemicznego alkoholu **8** przez zmutowaną dehydrogenazę z *Thermoanaerobacter ethanolicus* (M-TEADH).

W celu prawidłowego przebiegu redukcji, niezbędny był dodatek katalitycznej ilości kofaktora: NADP⁺(H). Reakcję prowadzono w buforze Tris o pH 8 z dodatkiem acetonu, który regenerował kofaktor (Schemat 8).



Schemat 8. Schemat enzymatycznego rozdzielania kinetycznego poprzez enantjoselektywne utlenienie.

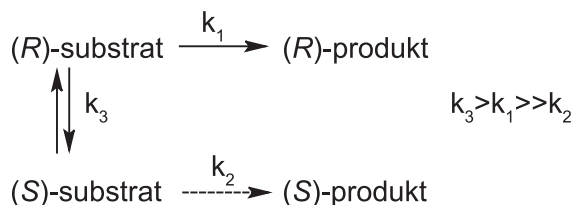
Scheme 8. Schematic representation of kinetic resolution via enantioselective oxidation.

Enancjomer *R* substratu, uległ enantjoselektywnemu utlenieniu, w wyniku czego nastąpił znaczny wzrost udziału enancjomerycznego alkoholu (*S*)-8 w mieszaninie reakcyjnej. Po zakończeniu procesu alkohol ten otrzymano w enancjomerycznie czystej postaci.

Wydaje się, że rozwój enzymatycznej enantjoselektywnej reakcji utleniania można połączyć z enantjoselektywną reakcją redukcji katalizowaną przez enzym o przeciwnej stereopreferencji. Redukcja ta umożliwiłaby przekształcenie ketonu (np. 9) do alkoholu (np. (*S*)-8) o tej samej konfiguracji, co enancjomer nie ulegający reakcji utleniania. Takie działania umożliwiłoby otrzymanie nieracemicznych alkoholi aryloallilowych ze zdecydowanie wyższą wydajnością niż 50%.

4. ENZYMATYCZNY DYNAMICZNY ROZDZIAŁ KINETYCZNY

Metodą syntezy nieracemicznych alkoholi aryloallilowych, która obecnie zyskuje coraz większą popularność, jest dynamiczny rozdział kinetyczny będący połączeniem enzymatycznego rozdzielania kinetycznego z reakcją racemizacji *in situ* [29]. Aby proces mógł przebiegać efektywnie, substrat poddawany jest reakcji racemizacji (Schemat 9). W następczej reakcji katalizowanej przez enzym każdy z enancjomerów substratu przekształcany jest w produkt z różną szybkością, tak jak w rozdziale kinetycznym. Z tego względu w enzymatycznym dynamicznym rozdziale kinetycznym, mogą być rozpatrywane wyłącznie reakcje enzymatyczne, których enantjoselektywność jest wyższa od 30. Jeżeli stała szybkości reakcji racemizacji k_r będzie znacznie wyższa od stałej szybkości reakcji enancjomerycznego faworyzowanego przez enzym k_p , wtedy uzyskać można enancjomerycznie wzbogacony produkt z wydajnością bliską 100%.



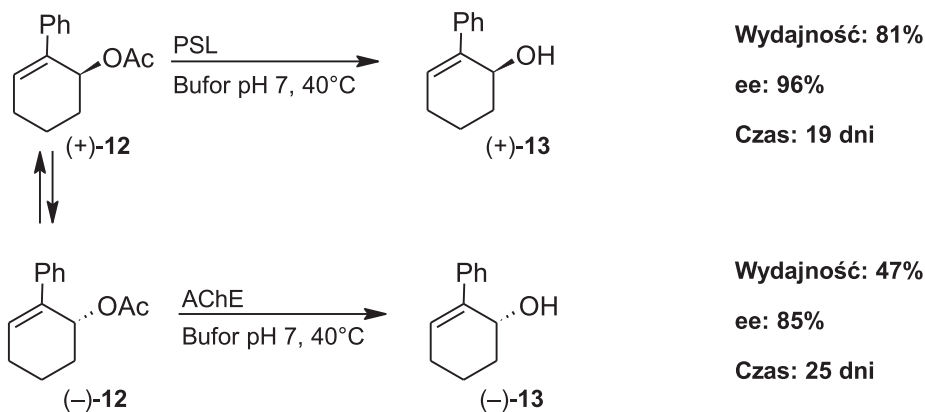
Schemat 9. Schemat enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego.

Scheme 9. Schematic representation of enzymatic dynamic kinetic resolution (DKR).

Czynnikami racemizującymi, powszechnie stosowanymi w DKR są kompleksy rutenu lub palladu.

4.1. DYNAMICZNY ROZDZIAŁ KINETYCZNY Z ZASTOSOWANIEM KOMPLEKSÓW PALLADU

Po raz pierwszy dynamiczny rozdziel kinetyczny octanów aryloallilowych zastosowano do otrzymania cyklicznego alkoholu **12** (Schemat 8). W reakcji tej połączono racemizację kompleksem palladu(II): $\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$ (**M1**) oraz enancjoselektywną hydrolizę katalizowaną przez esterazę acetylocholinową (AChE) lub lipazę z *Pseudomonas fluorescens* (PSL).



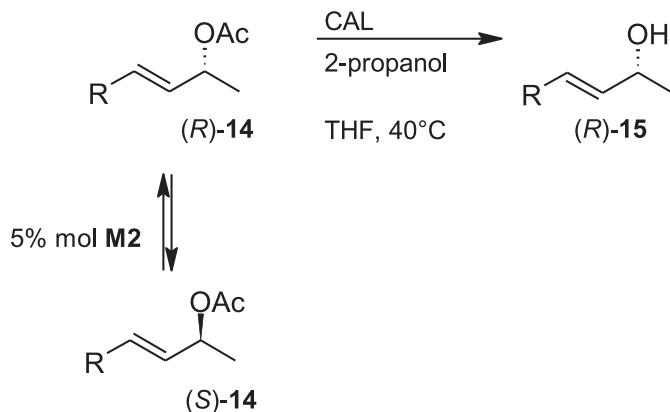
Schemat 10. Schemat dynamicznego rozdziału kinetycznego octanu aryloallilowego **13**.

Schem 10. DKR of arylallylic acetate **13**.

Wykonane eksperymenty umożliwiły otrzymanie nieracemicznego alkoholu aryloallilowego **13** o przeciwnych konfiguracjach, które zależały od zastosowanego enzymu. Niestety, aby uzyskać rozsądną konwersję należało bardzo długo prowadzić eksperymenty, co ogranicza praktyczne zastosowanie tej metody.

Inny DKR octanów aryloallilowych zastosowali Choi i współpracownicy. W tym wariantie wykorzystano kompleks palladu(0): $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (**M2**) jako czynnik

racemizujący [31]. W reakcji enzymatycznej zastosowano lipazę z *Candida antarctica*, która katalizowała przeniesienie grupy acylowej z substratu na 2-propanol.



Schemat 11. Schemat dynamicznego rozdziłu kinetycznego z kompleksem **M2**.

Scheme 11. Schematic representation of DKR with palladium complex **M2**.

Alkohole otrzymane przedstawioną metodą zamieszczono w Tabeli 4.

Tabela 4.

Table 4.

15	R	Wydajność (%)	ee (%)
a	Ph	71	98
b	4-Me-Ph	70	98
c	4-Cl-Ph	67	97
d	2-naftylo	78	>99
e	2-furylo	61	98

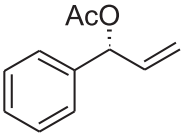
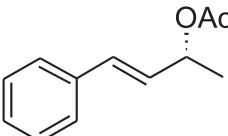
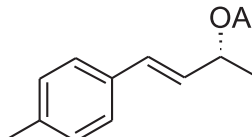
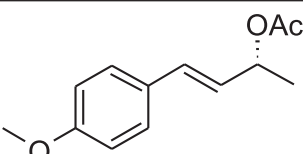
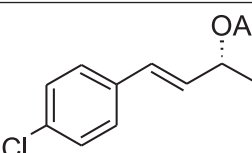
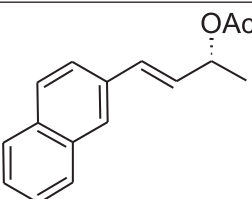
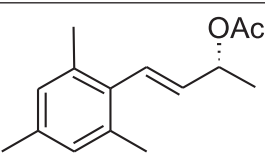
Wszystkie alkohole aryloallilowe otrzymano z dobrą wydajnością oraz wysokim nadmiarem enancjomerycznym. Alkohol **15d**, zawierający rozbudowaną sterycznie, grupę naftyłową, uzyskano z najwyższą wydajnością oraz doskonałym nadmiarem enancjomerycznym. Monopodstawione, w pozycji 4 pierścienia fenyłowego, alkohole **15b** i **15c** otrzymano z podobną wydajnością i nadmiarem enancjomerycznym do niepodstawionego alkoholu **15a**. Alkohol **15b** uzyskano z najniższą wydajnością, jednakże wartość ta nie różni się drastycznie od pozostałych.

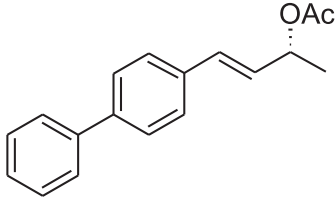
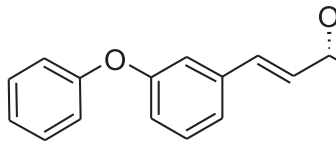
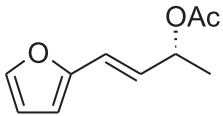
Okazało się, że najlepszymi biokatalizatorami tej reakcji są lipazy: Novozym 435 oraz wyizolowana z bakterii *Burkholderia cepacia*.

Produkty otrzymane tą metodą zestawiono w Tabeli 5.

Tabela 5.

Table 5.

17	Struktura produktu	Wydajność (%)	ee (%)	Literatura
a		62	80,6	[32]
b		93	98	[32]
		89	99	[33]
		83	99	[34]
c		92	>99	[32]
		86	>99	[34]
d		83	98,9	[32]
		81	98,9	[34]
e		92	98,8	[32]
		88	99	[34]
f		90	>99	[32]
		83	>99	[34]
g		94	>99	[32]

17	Struktura produktu	Wydajność (%)	ee (%)	Literatura
h		90	>99	[32]
i		93	>99	[32]
j		86	99	[34]

Z danych przedstawionych w Tabeli 5 wynika, że metoda działa bardzo dobrze dla substratów posiadających wiązanie podwójne pomiędzy grupami hydroksylową a aryłową (**17b–17j**) oraz zdecydowanie gorzej dla alkoholi z terminalnie położonym wiązaniem podwójnym (**17a**).

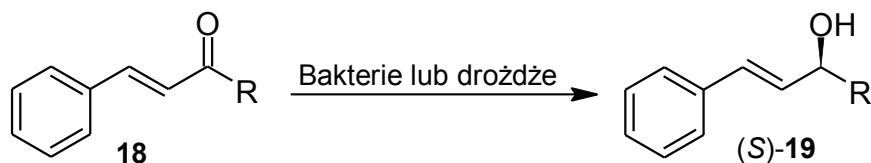
Rozdziałowi poddano alkohol fenylowy (**17b**), oraz inne, posiadające przestrzennie rozbudowane grupy aromatyczne (**17g**, **17h**, **17i**, **17j**), oraz monopodstawione w pierścieniu aromatycznym (**17c**, **17d**, **17e**). W każdym przypadku, otrzymano produkty z dobrym lub bardzo dobrym nadmiarem enancjomerycznym oraz porządną wydajnością. W przypadku, gdy dany związek był otrzymywany więcej niż jedną metodą, wyższą wydajność uzyskiwano stosując racemizację kompleksem **M5** wraz z enancjoselektywną transestryfikacją Novozymem 435 [32].

5. ENZYMATYCZNA ENANCJOSELEKTYWNA REDUKCJA

Metoda ta polega na wykorzystaniu zdolności dehydrogenaz do enancjoselektywnej redukcji (zwanej też asymetryczną redukcją) ketonów do alkoholi. Asymetryczna redukcja nie jest ograniczona 50% procentowym limitem wydajności, co ma miejsce w przypadku KR. Z tego względu, tą metodą można uzyskać enancjomerycznie czysty produkt z wysoką wydajnością.

Enancjoselektywna redukcja może być przeprowadzona za pomocą całych komórek mikroorganizmów lub izolowanych enzymów.

Mikroorganizmami zdolnymi do katalizowania asymetrycznej redukcji ketonów aryloallilowych są bakterie *Rhodococcus ruber* [35–37] oraz drożdże *Geotrichum candidum* [38] (Schemat 14).



(S)-19a: R=CF₃, ee=94%, biokatalizator: *Geotrichum candidum*

(S)-19b: R=CH₃, ee >99%, biokatalizator: *Rhodococcus ruber*

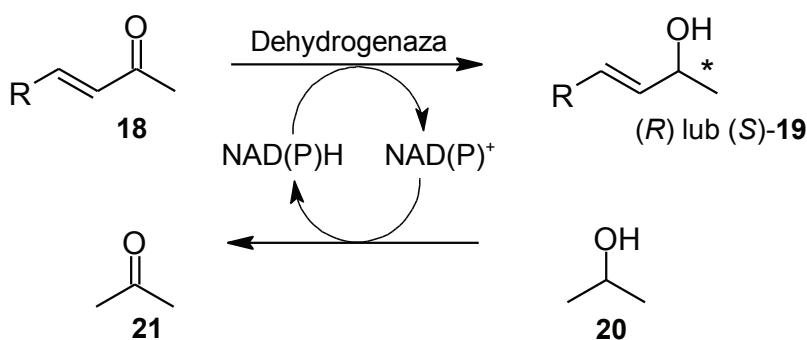
Schemat 14. Schemat asymetrycznej redukcji z udziałem mikroorganizmów.

Scheme 14. Schematic representation of microbiologically mediated asymmetric reduction.

W wyniku reakcji z tymi drobnoustrojami, powstają produkty o bardzo wysokim nadmiarze enancjomerycznym.

W przypadku, gdy reakcja enancjoselektywnej redukcji jest katalizowana przez izolowane enzymy- dehydrogenazy, niezbędny jest dodatek katalitycznej ilości kofaktora-NAD(P)⁺, umożliwiającego prawidłowe działanie biokatalizatora. Ponadto, ze względu na dezaktywację dehydrogenaz w rozpuszczalnikach organicznych, reakcję należy prowadzić w wodnym lub wodno-organicznym środowisku.

Najpowszechniej stosowaną procedurą jest sprzężenie enzymatycznej asymetrycznej redukcji ketonu aryloallilowego z utlenianiem 2-propanolu do acetonu (Schemat 15). Umożliwia to regenerację kofaktora, a dodatkowo 2-propanol ułatwia rozpuszczenie hydrofobowych ketonów. Stosowanymi biokatalizatorami są enzymy bakteryjne wyizolowane z gatunków *Rhodococcus*, *Thermoanaerobacter*, katalizujące redukcję (S)-enancjoselektywną oraz *Lactobacillus* katalizujący redukcję (R)-enancjoselektywną.



Schemat 15. Schemat enzymatycznej asymetrycznej redukcji.

Scheme 15. Schematic representation of enzymatic asymmetric reduction.

W Tabeli 6 zestawiono wyniki uzyskane dla szeregu alkoholi aryloallilowych, otrzymanych tą metodą.

Tabela 6.
Table 6.

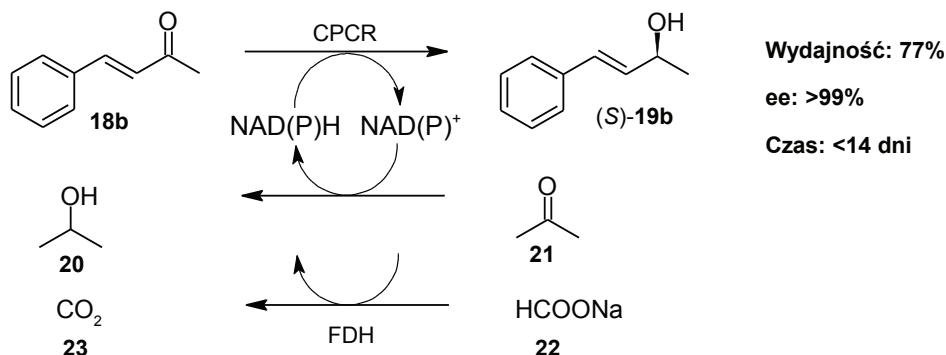
19	R	Wydajność (%)		ee (%)		Literatura
		R	S	R	S	
b	Ph	85	80	>99	>99	[39]
		-	64 ^a	-	>99	[40]
		52 ^a	58 ^a	>99	>99	[41]
c	<i>o</i> -MeO-Ph	77	70	>99	>99	[41]
		-	48 ^a	-	>99	[42]
d	<i>p</i> -Cl-Ph	84	79	>99	>99	[39]
e	4-Me-3-NO ₂ -Ph	80	77	>99	>99	[39]
f	<i>m</i> -Me-Ph	67	66	>99	>99	[39]
g	<i>m</i> -CF ₃ -Ph	74	70	>99	>99	[39]
h	<i>p</i> -(CH ₃ CO)-Ph	21	9	>99	>99	[39]
i	<i>p</i> -(EtOOC)-Ph	60	80	>99	>99	[39]
j	<i>p</i> -(CH ₃ COHN)-Ph	74	70	>99	>99	[39]
k	<i>p</i> -NO ₂ -Ph	82 ^a	90 ^a	>99	>99	[41]
l	<i>p</i> -Me-Ph	63 ^a	60 ^a	>95	>99	[41]

a – podana wartość to konwersja

Enancjoselektywna redukcja umożliwia otrzymanie enancjomerycznie czystych alkoholi aryloallilowych, głównie monopodstwionych w pozycjach 2, 3 lub 4 pierścienia aromatycznego, podstawnikami elektronodonorowymi lub elektronoakceptorowymi. Najniższą wydajność otrzymano w przypadku alkoholu (*R*)-**19h**, co było spowodowane powstawaniem produktów ubocznych spowodowanych redukcją drugiej grupy karbonylowej. Bardzo dużą zaletą tej metody jest fakt, że położenie oraz charakter elektronowy podstawników nie ma negatywnego wpływu na wydajność oraz enancjoselektywność reakcji. W każdym przypadku, otrzymano enancjomerycznie czysty produkt z dobrą wydajnością.

Enancjoselektywną redukcję można również przeprowadzić według innej procedury, w której stosuje się dwa sprzężone enzymy: reduktazę karbonylową z *Candida parapsilosis* (CPCR) i dehydrogenazę mrówczanową z *Candida boidinii* (FDH) [42]. CPCR redukuje nienasycony keton aryloallilowy (**18b**) oraz aceton (**21**), nato-

miast FDH utlenia mrówczan sodu (**22**) do dwutlenku węgla (**23**), wspomagając regenerację kofaktora.



Schemat 16. Schemat enzymatycznej redukcji z zastosowaniem sprzężonych enzymów.
Scheme 16. Schematic representation of asymmetric reduction with coupled enzymes.

W rezultacie otrzymano alkohol (**S**)-**19b** z bardzo dobrym nadmiarem enancjomerycznym oraz dobrą wydajnością. Niestety, czas reakcji wynosi około dwóch tygodni, co poważnie ogranicza zastosowanie tej metody. Ponadto osiągnięte wyniki są gorsze od uzyskanych z zastosowaniem wyłącznie jednego enzymu, w którym związek (**S**)-**19b** został otrzymany z 80% wydajnością w dużo krótszym czasie [39].

PODSUMOWANIE

W pracy przedstawiono zestawienie biokatalitycznych metod syntezy nieracemicznych alkoholi aryloalilowych.

Najczęściej stosowany, enzymatyczny rozdział kinetyczny alkoholi aryloalilowych jest dobrze poznaną i zoptymalizowaną dla tej grupy związków metodą. W większości przypadków, alkohole otrzymane za pomocą tej metody są enancjomerycznie czyste i uzyskiwane z wydajnością około 50%, czyli bliską maksymalnej.

Metody enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego, enancjoselektywnej redukcji oraz mikrobiologicznej deracemizacji stosowane celem otrzymania tej grupy związków są porównywalne pod względem wydajności i nadmiaru enancjomerycznego otrzymanych alkoholi. Niestety są one zoptymalizowane wyłącznie dla alkoholi acyklicznych, w których wiązanie podwójne znajduje się w środku cząsteczki.

Enancjoselektywne hydroksylowanie aromatycznych alkenów ma marginalne znaczenie, ponieważ w pracach na ten temat badano wyłącznie reaktywność jednego substratu. Wydaje się, że metoda ta będzie dalej intensywnie rozwijana.

Przedstawione w pracy metody są konkurencyjne dla klasycznych metod chemicznych. Ponieważ spełniają zalecenia „zielonej chemii”, w tym nie obciążają środowiska naturalnego, to z całą pewnością ich rozwój oraz optymalizacja warunków reakcji będą kontynuowane.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] E. Brenna, C. Fuganti, P. Grasseli, S. Serra, *Eur. J. Org. Chem.*, 2001, **7**, 1349.
- [2] E. Brenna, N. Carraccia, C. Fuganti, D. Fuganti, P. Grasseli, *Tetrahedron: Assymetry*, 1997, **8**, 3801.
- [3] L. Zhu, J.P. Kedenburg, M. Xian, P.G. Wang, *Tetrahedron Letters*, 2005, **46**, 811.
- [4] Y. Chen, F. Lie, Z. Li, *Adv. Synth. Catal.*, 2009, **351**, 2107.
- [5] W. Adam, Z. Lukacs, C. Kahle, C.R. Saha-Möller C, P. Schreier, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, **11**, 377.
- [6] A. Uzura, T. Katsuragi, Y. Tani, *J. Biosci. Bioeng.*, 2001, **92**, 381.
- [7] A. Uzura, T. Katsuragi, Y. Tani, 2001, **92**, 288.
- [8] A. Uzura, T. Katsuragi, Y. Tani, *J. Biosci. Bioeng.*, 2001, **91**, 217.
- [9] B. Zwanenburg, M. Mikołajczyk, P. Kielbasiński, *Kluwer Academic: Dordrecht, The Netherlands*, 2000, 12.
- [10] G. Allan, A.J. Carnell, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 6495.
- [11] D. Titu, A. Chadha, *Tetrahedron: Asym.*, 2008, **19**, 1698.
- [12] T. Itoh, Y. Matsushita, Y. Abe, S. Han, S. Wada, S. Hayase, M. Kawatsura, S. Takai, M. Morimoto, Y. Hirose, *Chem. Eur. J.*, 2006, **12**, 9228 .
- [13] L. Borén, B. Martín-Matute, Y. Xu, A. Córdova, J-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.*, 2006, **12**, 225.
- [14] Y. Zhang, J. Li, D. Han, H. Zhang, P. Liu, C. Li, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, **365**, 609.
- [15] A. Kamal, M. Sandbohr, A.A. Shaik, *Tetrahedron: Assymetry*, 2003, **14**, 2839.
- [16] A. Córdova, K.D. Janda, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 1906.
- [17] Y. Tsukada, K. Iwamoto, H. Furutani, Y. Matsushita, Y. Abe, K. Matsumoto, K. Monda, S. Hayase, M. Kawatsura, T. Itoh, *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 1801.
- [18] Y. Takagi, J. Teramoto, H. Kihara, T. Itoh, H. Tsukube, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 4991.
- [19] K. Burgess, L.D. Jennings, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 7434.
- [20] K. Burgess, L.D. Jennings, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 6129.
- [21] J. Štambaský, A. V. Malkov, P. Kočovský, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 9148.
- [22] E. Lindner, A. Ghanem, I. Warad, K. Eichele, H.A. Mayer, V. Schurig, *Tetrahedron: Asym.*, 2003, **14**, 1045.
- [23] B. Morgan, A.C. Oehlschlager, T.M. Stokes, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 3231.
- [24] L. Borén, B. Martín-Matute, Y. Xu, A. Córdova, J-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.*, 2006, **12**, 225.
- [25] H. Shi-Hui, T. Hirakawa, T. Fukuba, S. Hayse, M. Kawatsura, T. Itoh, *Tetrahedron: Asym.*, 2007, **18**, 2484.
- [26] C. Raminelli, J.V. Comasseto, L. Andrade, A. Porto, *Tetrahedron: Asym.*, 2004, **15**, 3117.
- [27] E.N. Kadnikova, V.A. Thakor, *Tetrahedron: Asym.*, 2008, **19**, 1053.
- [28] M.M. Musa, K.I. Ziegelmann-Fjeld, C. Vieille, J.G. Zeikus, R.S. Phillips, *J. Org. Chem.* 2007, **72**, 30.
- [29] K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry*, Springer-Verlag New York, 1998, 4th edition, str. 57.
- [30] J. Williams, J.V. Allen, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 1859.
- [31] Y. Choi, J. Suh, D. Lee, I. Lim, J. Jung, M. Kim, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 8423.
- [32] J. Choi, Y. Choi, Y. Kim, E. Park, E. Kim, J. Park, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 1972.
- [33] B. Martín-Matute, M. Edin, K. Bogár, F.B. Kaynak, J-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, **127**, 8817.
- [34] R. Karvembu, R. Prabhakaran, M. Muthu Tamizh, K. Natarajan, C.R. Chimie, 2009, **12**, 951.
- [35] W. Stampfer, B. Kosjek, K. Faber, W. Kroutil, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 402.

- [36] R. van Deursen, W. Stampfer, K. Edegger, K. Faber, W. Kroutil, *J. Mol. Catal.B: Enz.*, 2004, **31**, 159.
- [37] B. Kosjek, W. Stampfer, M. Pogorevc, W. Goessler, K. Faber, W. Kroutil, *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, **86**, 55.
- [38] A. Arnone, R. Bernardi, F. Blasco, R. Cardillo, G. Resnati, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 2809.
- [39] S. Sgalla, G. Fabrizi, R. Cirilli, A. Macone, A. Bonamore, A. Boffi, S. Cacchi, *Tetrahedron: Asym.*, 2007, **18**, 2791.
- [40] M.M. Musa, K.I. Ziegelmann-Fjeld, C. Vieille, J.G. Zeikus, R.S. Phillips, *J. Org. Chem.* 2007, **72**, 30.
- [41] M. Kraußer, W. Hummel, H. Gröger, *Eur. J. Org. Chem.*, 2007, 5175.
- [42] T. Zelinski, A. Liese, C. Wandrey, M.-R. Kula, *Tetrahedron: Asym.*, 1999, **10**, 1681.

Praca wpłynęła do Redakcji 5 grudnia 2011