

**ENANCJOSELEKTYWNA ENZYMATYCZNA
DESYMTRYZACJA KATALIZOWANA
OKSYDOREDUKTAZAMI.
REAKCJE REDUKCJI. CZĘŚĆ II**

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

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

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

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

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

**e-mail: Renatakol@poczta.fm, *e-mail: akar@cm.umk.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Enzymatyczna desymetryzacja ketoestrów
2. Asymetryczna redukcja prochiralnych poliketonów
3. Enzymatyczna redukcja ketonitryli
4. Bioredukcja wiązania podwójnego

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



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



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



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



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



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



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

ABSTRACT

Biotransformation reactions of many organic compounds under the influence of enzymes take place with the high selectivity, rarely achieved by other methods. Ketoesters represent an extensive group of selectively bioreduced compounds. Chiral hydroxyesters and, subsequently, hydroxyacids are valuable intermediates in the syntheses of various biologically active compounds. Acyclic α - and β -ketoesters are transformed to the corresponding (*R*)- and (*S*)-hydroxyesters by using a specific dehydrogenases. The whole-cells enzymes, e.g. baker's yeast, may exhibit a different catalytic activity depending on the substrate structure. Baker's yeast enzymes selectively reduce the cyclic β -ketoesters providing mainly anti diastereomers due to the lack of rotation around the single α,β carbon-carbon bond. The enzymatic reduction of the esters, cyclopentanone, and cyclohexanone derivatives gave the optically active anti-alcohol enantiomers. The reductive EED of prochiral α -ketoesters, as well as β -ketoesters is an interesting transformation in organic chemistry due to the importance of the resulting chiral α -hydroxy acids and their derivatives used as building blocks. Baker's yeast-catalyzed reduction of alkyl esters derived from pyruvate and benzoylformate allows the preparation of the (*R*)-alcohols.

Polyketones can also be subjected to the reductive EED to give different compounds bearing the quaternary stereogenic centers which are broadly applied in asymmetric synthesis. In asymmetric synthesis, similarly to carbon-oxygen double bonds, carbon-carbon double bonds of prochiral alkanes can be reduced to obtain the optically active saturated compounds. The reduction of alkenes is catalyzed by both, the whole cells (microorganisms, plant cells) as well as isolated enzymes belonging to the oxydoreductases, so-called ene-reductases. The whole-cell catalysts are suitable, most frequently, for the preparative scale syntheses, but they are less chemoselective in comparison to the isolated reductases. In the case of polyfunctionalized alkenes, microorganisms can cause the additional side reaction reducing the desired product yield.

Keywords: asymmetric reduction, biocatalysis, enzymes

Słowa kluczowe: redukcja asymetryczna, biokataliza, enzymy

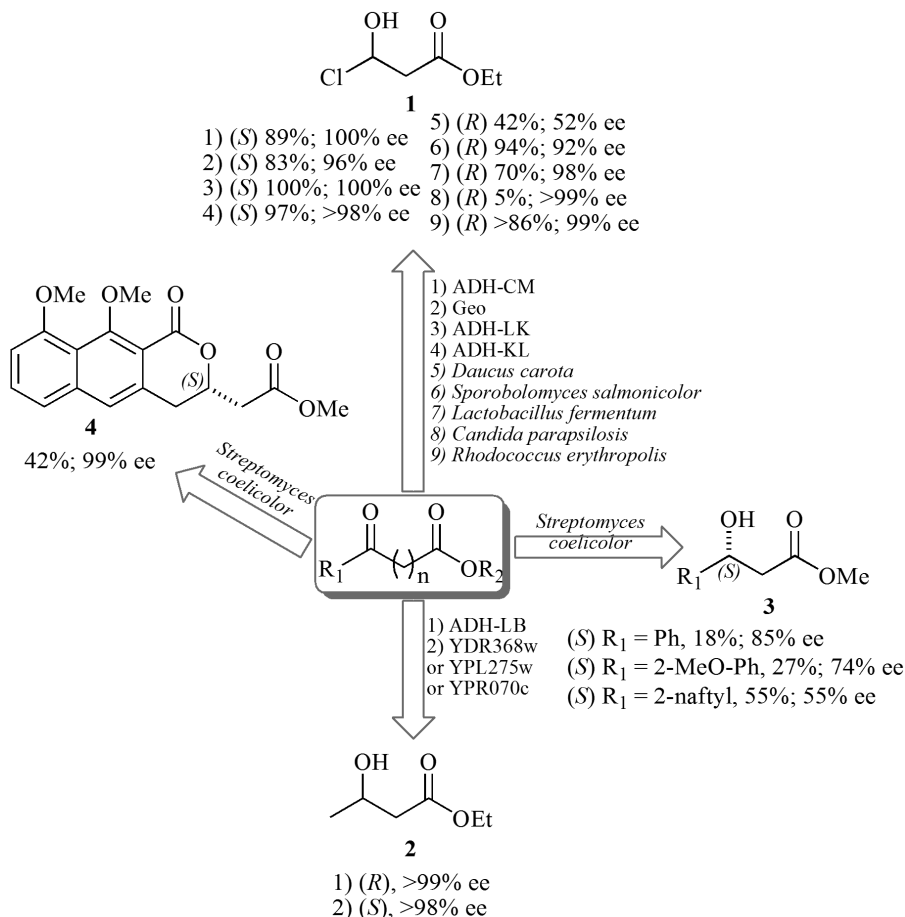
WPROWADZENIE

Stosowanie komórek mikroorganizmów jest metodą dobrze znaną w biokatalitycznej syntezie organicznej. Ostatnie lata wykazały znaczny rozwój procesów biotechnologicznych, w których enzymy wykorzystywane są na skalę przemysłową, między innymi w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, chemicznym, tekstylnym, a także do oczyszczania ścieków. Nic więc dziwnego, że znalazły zastosowanie również w laboratoriach chemicznych. Biotransformacje zachodzące pod wpływem enzymów umożliwiają przemianę wielu związków organicznych z selektywnością rzadko osiąganą innymi sposobami. Szczególne znaczenie w syntezie organicznej mają asymetryczne reakcje enzymatyczne. Biokatalizator przekształca związki achiralne w optycznie czynne o wysokiej czystości diastereo- lub enancjomerycznej. Jednym z typów reakcji selektywnie katalizowanej przez katalizatory białkowe jest reakcja redukcji. W niniejszym opracowaniu szczegółowo omówiono aspekty dotyczące reakcji redukcji prochiralnych ketoestrów, poliketonów, ketonitryli oraz związków nienasyconych z podwójnym wiązaniem.

1. ENZYMATYCZNA DESYMETRYZACJA KETOESTRÓW

Ketoestry stanowią istotną grupę związków selektywnie bioredukowanych. W wyniku enzymatycznych i chemicznych reakcji otrzymuje się hydroksykwas, które stanowią cenne półsyntetyki w syntezie ważnych związków biologicznie czynnych. Acykliczne α - lub β -ketoestry mogą być selektywnie przekształcane do odpowiednich hydroksyestrów o konfiguracji (*R*) lub (*S*) przez specyficzne dehydrogenazy. Dehydrogenazy znajdujące się w całych komórkach, na przykład w drożdżach, wykazują zróżnicowaną aktywność katalityczną w zależności od budowy substratu. W większości przypadków, w drożdżach piekarskich *D*-enzym (enzym specyficzny dla substratów o konfiguracji (*R*)) wykazuje zwiększoną aktywność w stosunku do β -ketoestrów zawierających krótkołańcuchowe reszty acylowe. Natomiast *L*-dehydrogenaza ((*S*)-dehydrogenaza) chętniej przekształca β -ketoestry o długich łańcuchach. W reakcji mikrobiologicznej redukcji, katalizowanej drożdżami piekarskimi β -ketoestru, pochodnego kwasu 4-chlorobutanowego, ester etylowy był redukowany do *D*-produktu (enancjomer (*S*)), podczas gdy jego długołańcuchowy analog zawierający resztę *n*-heksylową do *L*-enancjomeru (enancjomer (*R*)). W jednym i drugim przypadku uzyskano umiarkowany nadmiar enancjomeryczny (Schemat 1, 1). Konkurencyjne działanie enzymów obniża stereoselektywność reakcji. Dodatek substancji inhibującej konkretną oksyreduktazę umożliwia otrzymanie produktu o wyższej czystości optycznej. Poprawę selektywności, na przykład, uzyskuje się przez zastosowanie alkoholu allilowego, który selektywnie inhibuje jedną z dehydrogenaz. Otrzymano produkt o konfiguracji *D* z 85% nadmiarem enancjomerycznym. Bez obecności alkoholu allilowego czystość optyczna produktu wynosiła tylko 43% ee. Dehydrogenazy z innych mikroorganizmów umożliwiają również

selektywną redukcję estru etylowego kwasu 4-chloro-3-oksobutanowego w obecności *Candida magnoliae* [1], *Geotrichum candidum* SC5469 [2], *Lactobacillus kefir* [3], *Kluyveromyces lactis* [4] oraz dehydrogenazy glukozy (GDH) z *Bacillus megaterium* jako katalizatora otrzymuje się czysty optycznie hydroksyester o konfiguracji (S).

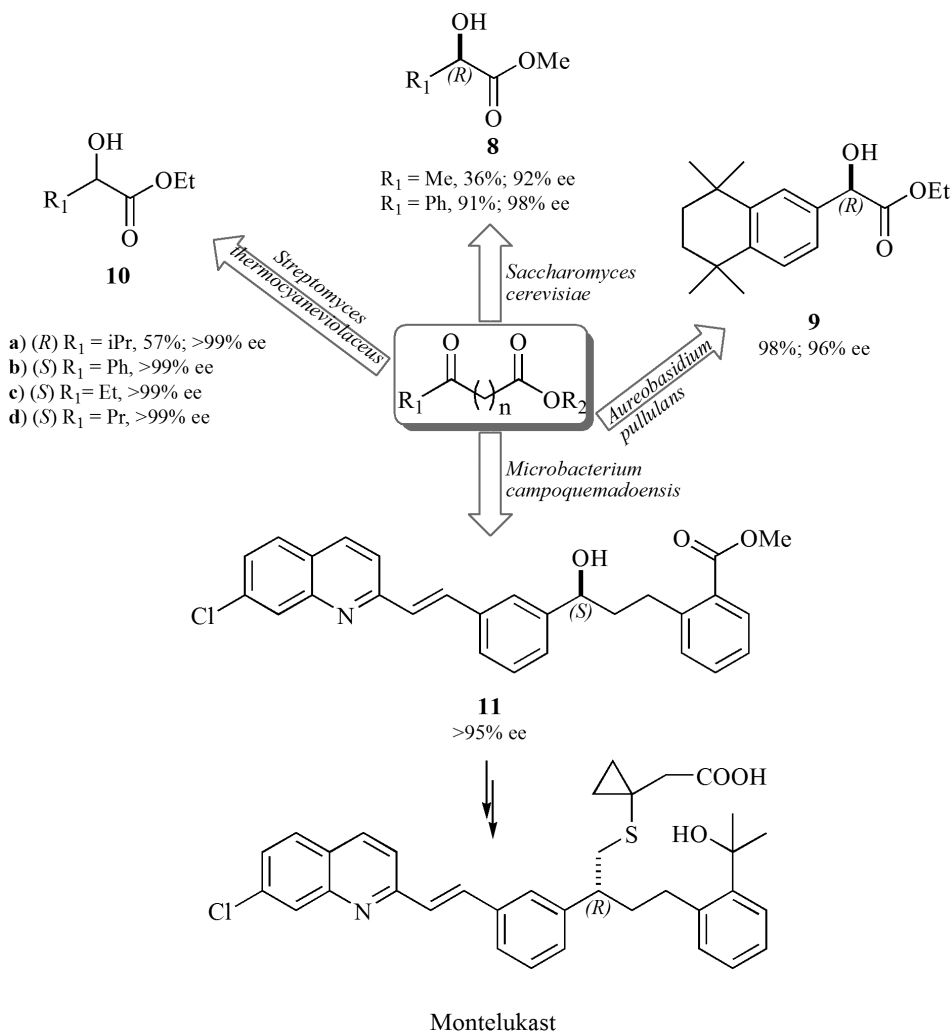


Schemat 1. Enzymatyczna redukcja acyklicznych ketoestrów
 Scheme 1. Enzymatic reduction of acyclic ketoesters

Zastosowane takich komórek jak na przykład: *Daucus carota* [5], *Sporobolomyces salmonicolor* [6], *Lactobacillus fermentum* [3], *Candida parapsilosis* [7], a także reduktazy karbonylowej z *Rhodococcus erythropolis* [8] i reduktazy fenyloacetaldehydowej szczepu *Corynebacterium* ST-10 [9] daje enancjomer o konfiguracji (R). Kwas 4-chloro-3-hydroksybutanowy oraz jego analogii mają zastosowanie jako bloki budulcowe do syntezy środków farmaceutycznych (np. chlorowodoru L-karnityny) oraz do syntezy inhibitora reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-

-koenzymu A [10–12]. W wyniku bioredukcji z użyciem enzymów z *Lactobacillus brevis* oraz z drożdży YDR 389w, YPL 275w, YPR070c uzyskano również enancjomerycznie czyste (*R*)- i (*S*)-hydroksyestry pochodne kwasu butanowego (Schemat 1, 2). Zastosowanie syntazy poliketydowej ze *Streptomyces coelicolor* A3(2) (CH999) do redukcji β -ketotioestrów umożliwia otrzymanie β -hydroksykwasów o konfiguracji (*S*), które następnie przekształcane są w estry w celu łatwiejszego rozdzielenia mieszaniny poreakcyjnej (Schemat 1, 3). W przypadku reakcji redukcji ketodiestru produktem końcowym był (*S*)-lakton (Schemat 1, 4) [13].

β -Ketoestry zawierające w pozycji α dodatkowe centrum stereogeniczne są mało stabilne stereochemicznie, z powodu możliwego procesu enolizacji *in situ*, prowadzącego do racemizacji wyjściowych reagentów, dlatego czystość optyczna uzyskanych produktów z reguły nie jest zbyt duża. Redukcja mikrobiologiczna w obecności drożdży piekarskich umożliwia otrzymanie dodatkowego chiralnego atomu węgla w α -podstawionych β -ketoestrach prowadząc do diastereoizomerycznych produktów *syn* i *anti*. Przewaga jednego z diastereoizomerów jest w głównym stopniu determinowana wielkością podstawnika w pozycji α . Jeśli podstawnik w pozycji α jest mały objętościowo to preferencyjnie powstaje *syn*-izomer. Obecność podstawnika większego objętościowo powoduje zmianę stereoselektywności reakcji i w przewadze powstaje diastereoizomer *anti*. W reakcji redukcji drożdżami estru etylowego kwasu 2-metylo-3-oksobutanowego otrzymano diastereoizomery *syn* i *anti* w stosunku 83:17, natomiast w reakcji z estrem etylowym kwasu 2-benzyl-3-oksobutanowego uzyskano w przewadze *anti*-izomer. W tym przypadku stosunek izomerów *syn*:*anti* wynosił 33:67 (Schemat 2, 5a przykład 1) i 5b) [14, 15]. W obecności *Klebsiella pneumoniae* IFO 3319 ester etylowy kwasu 2-metylo-3-oksobutanowego jest również selektywnie redukowany do (2*R*,3*S*)-hydroksyestru z wysokim nadmiarem enancjo- i diastereoizomerycznym (Schemat 2, 5a przykład 2)). Konfiguracja absolutna przy 3 atomie węgla jest podyktowana stereoselektywnością zastosowanego biokatalizatora. W przypadku drożdży piekarskich oraz *Klebsiella pneumoniae* IFO 3319 uzyskuje się izomer 3-(*S*). Jeśli α -podstawnik w β -ketoestrach ma charakter elektronoakceptorowy to racemizacja *in situ* nie ma miejsca ponieważ nie tworzy się enolowa forma przejściowa. W konsekwencji uzyskuje się wysoką czystość diastereoizomeryczną produktów. Przykładem jest redukcja α -chloro- β -ketoestru, który selektywnie, w zależności od zastosowanego enzymu wyizolowanego z drożdży piekarskich ulega przekształceniu do jednego z enancjomeru (*R*) lub (*S*) z wysokim nadmiarem diastereoizomerycznym. W obecności reduktazy aldozowej YDL124w otrzymuje się *syn*-(2*S*,3*R*)-hydroksyester, natomiast zastosowanie krótkołańcuchowej dehydrogenazy YGL039w daje mieszaninę dwóch diastereoizomerów *syn*-(2*R*,3*S*)- i *anti*-(2*S*,3*S*)-alkoholi w stosunku 9:1 (Schemat 2, 6). Oba izomery są prekursorami w syntezie taksolu, leku o działaniu cytostatycznym stosowanym przy leczeniu nowotworów [16]. Cykliczne ketoestry, w obecności drożdży piekarskich, są selektywnie przekształcane głównie do diastereoizomerów *anti*, ponieważ nie ma możliwości rotacji wokół pojedynczego α , β wiązania C-C. Z tego powodu redukcja estrów pochodnych cyklopentanonu lub cykloheksanonu prowadzi do optycznie



Schemat 3. Reakcje redukcji ketoestrów wobec różnych enzymów

Scheme 3. Reduction reactions of ketoesters with various enzymes

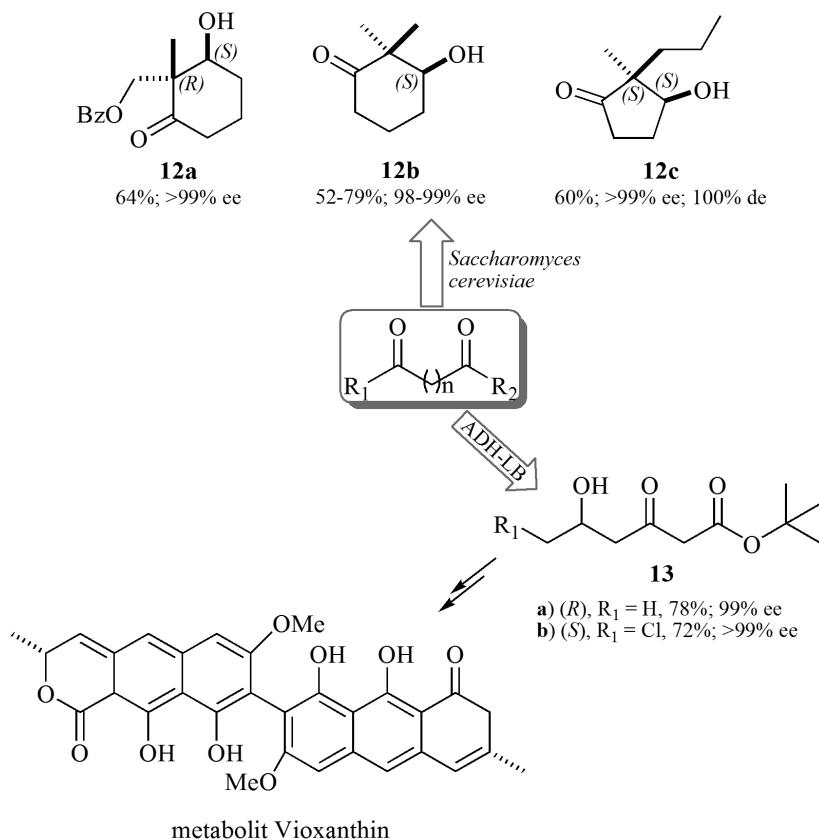
Mikroorganizmy jak również izolowane enzymy mogą być skutecznymi biokatalizatorami α -oksoestrów. Redukcja alkilowych α -ketoestrów kwasu pirogronowego i benzoilomrówczanu w obecności drożdży piekarskich umożliwia otrzymanie preferencyjnie (*R*)-alkoholi (Schemat 3, 8). Czystość optyczną uzyskanych produktów zwiększono przez dodanie ketonu metyloowo-winylowego, inhibitora dehydrogenaz o innej stereopreferencji [19]. Reakcja redukcji innego α -ketoestru z dużą zawadą przestrzenną w obecności *Aureobasidium pullulans* SC 13849 prowadzi do otrzymania chiralnego hydroksyestru o konfiguracji (*R*) z wysoką wydajnością zarówno chemiczną jak i optyczną (Schemat 3, 9) [20]. Związek ten ma zastosowa-

nie w syntezie kwasu retinowego, agonisty gamma receptorów. Można go otrzymać w bezpośredni sposób w wyniku bioredukcji w obecności *Candida maltosa* SC 16112 i dwóch szczepów *Candida utilis* (SC 13983, SC 13984). Ester etylowy kwasu 3-metylo-2-oksobutanowego i benzoilomrówczan etylu są dobrymi substratami w enzymatycznej reakcji desymetryzacji katalizowanej ciepłolubnym mikroorganizmem z *Streptomyces thermocyaneviolaceus* IFO 14271. Otrzymane α -hydroksyestry charakteryzowały się wysoką czystością optyczną (Schemat 3, **10a,b**). Jeśli jednak w obecności tego samego katalizatora zredukowano estry etylowe kwasu 2-oksobutanowego i 2-oksopenatnowego to uzyskano enancjomery o konfiguracji przeciwnej z niezbyt jednak wysokim nadmiarem enancjomerycznym. Selektywność redukcji wzrosła, gdy do układu reakcyjnego dodano kwas asparaginowy (Schemat 3, **10c,d**). Natomiast dodatek kwasu glutaminowego do estru etylowego kwasu 3-metylo-2-oksobutanowego i benzoilomrówczanu etylu umożliwia otrzymanie enancjomerów o konfiguracji przeciwnej w porównaniu z reakcją bez substancji dodatkowej (enancjomery (S)) [21]. Ciekawym przykładem wykorzystania mikrobiologicznej redukcji w farmakologii jest reakcja otrzymania estru metylowego kwasu (S)-E-2-{3-[3-[2-(7-chloro-2-chinolinyl)etenyl]-3-hydroksypropyl]benzoowego (Schemat 3, **11**) [22]. Jest to kluczowy związek przejściowy w syntezie przeciwastmatycznego i przeciwalergicznego leku o nazwie Montelukast. Związek ten został otrzymany przez bioredukcję odpowiedniego ketoestru w obecności *Microbacterium campoquemaensis* (MB5614) lub *Mucor hiemalis*.

2. ASYMETRYCZNA REDUKCJA PROCHIRALNYCH POLIKETONÓW

Związki poliketonowe również ulegają asymetrycznej reakcji bioredukcji. W wyniku enancjoselektywnej enzymatycznej desymetryzacji (EED) z prochiralnych poliketonów otrzymuje się związki z czwartorzędowymi centrami stereogenicznymi, które znalazły zastosowanie w syntezie asymetrycznej. Za pomocą drożdży piekarskich możliwa jest redukcja α - i β -diketonów. W przypadku β -diketonów mikrobiologiczna redukcja prowadzi głównie do hydroksyketonów, podczas gdy α -diketony, w zależności od warunków reakcji, mogą redukować się do monohydroksylowych pochodnych oraz do dioli. Jeśli drożdżami piekarskimi redukowane są cykliczne β -diketony ważne jest, aby kwasowe protony znajdujące się przy atomie węgla α były podstawione, gdyż zapobiega to racemizacji produktu. Na przykład w obecności drożdży piekarskich selektywnie zredukowano 2,2-dipodstawione cykloalkanodiony; 2-benzyloksymetylo-2-metylocykloheksano-1,3-dionu, 2,2-dimetylocykloheksano-1,3-dionu oraz 2-propylo-2-metylocyklopentano-1,3-dionu do czystych optycznie 3-(S)-hydroksyketonów (Schemat 4, **12**) [23]. Chiralne hydroksyketony mogą stanowić materiał budulcowy w syntezie terpenów. β -Diketoester w reakcji redukcji katalizowanej dehydrogenazą alkoholową z *Lactobacillus brevis* (rec-ADH-LB) umożliwia otrzymanie δ -hydroksyketoestru o wysokiej czystości enancjomerycznej. Otrzymane produkty łatwo cyklizują do

δ -laktonów (Schemat 4, **13**) [24]. Lakton o konfiguracji (*R*) znalazł zastosowanie jako naturalny związek zapachowy [25], natomiast otrzymany w wyniku bioredukcji (*S*) enancjomer można wykorzystać jako związek wyjściowy do syntezy poliketonów: (–)-kallistatyny A, (–)-20-epi-kallistatyny A [26, 27], (*S*)-6-[(*Z*)-1-heptynylo]-5,6-dihydro-2H-piran-2-onu ((*S*)-argentilacton) i (*S*)-5,6-dihydro-6 α -[(*E*)-2-fenyloetenyl]-2H-piran-2-onu (*S*)-goniothalamin [28].



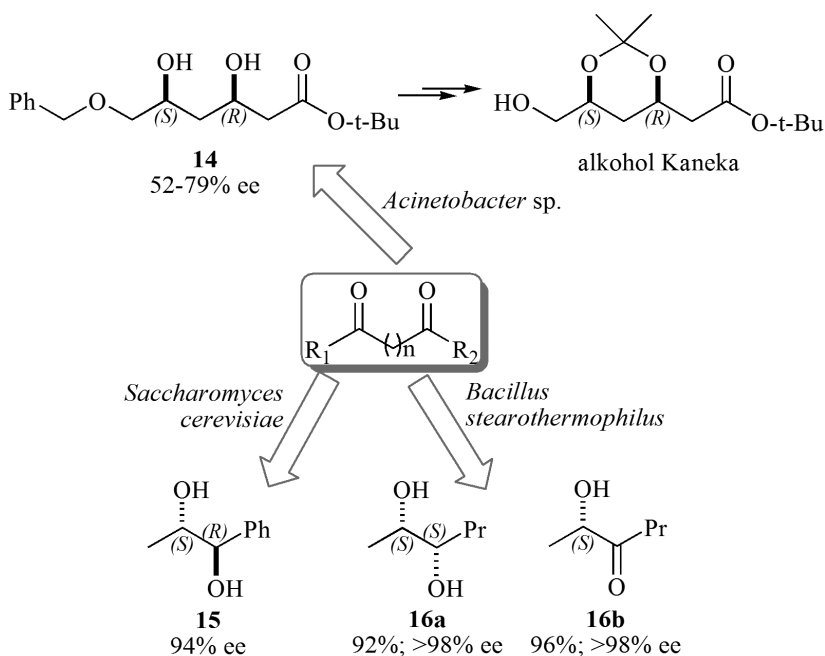
Schemat 4. EED prochiralnych poliketonów

Scheme 4. EED prochiral polyketones

Szczepy *Acinetobacter sp.* SC13874 zawierające ketoreduktazy stereoselektywnie redukują ester etylowy kwasu 3,5-dioksy-6-(benzyloksy)-heksanowego do odpowiedniego *syn*-diolu **14**. W zależności od zastosowanego szczepu otrzymano enancjomery o konfiguracji (*R*) lub (*S*) (Schemat 5, **14**) [29]. Z otrzymanego związku w kilku etapach syntetyzowano alkohol Kaneka, który jest prekursorem inhibitora reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A.

Inaczej jest w przypadku redukcji α -diketonów. Jest to metoda otrzymywania głównie dioli, szczególnie w reakcjach redukcji z zastosowaniem mikroorganizmów

jako katalizatorów. W pierwszym etapie, redukcji ulega ta grupa karbonylowa, która jest mniej osłonięta. Dalsze prowadzenie reakcji redukcji (redukowana jest zwykle grupa z większą zawadą przestrzenną) prowadzi do otrzymania odpowiedniego diolu w przewadze o konfiguracji *anti*. W reakcji redukcji z zastosowaniem mikroorganizmów jako katalizatorów otrzymuje się głównie diole. Przykładem może być zastosowanie drożdży piekarskich w reakcji redukcji 1-fenylpropano-1,2-dionu, która prowadzi do otrzymania czystego enancjomerycznego diolu izomeru *anti* (Schemat 5, 15) [30, 31]. Reakcja redukcji α -diketonów w obecności reduktazy z *Bacillus stearothermophilus*, w zależności od zastosowanych warunków, może prowadzić do diolu lub zatrzymać się na etapie hydroksyketonu. Jeśli w reakcji do regeneracji kofaktora jako źródło jonu wodorkowego zastosuje się endo-bicyklo[3.2.0]hept-2-en-6-ol to redukcji ulegają obie grupy karbonylowe, natomiast użycie dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej umożliwi otrzymanie hydroksyketonów z dobrą wydajnością i wysoką enancjoselektywnością (Schemat 5, 16a i b) [32].

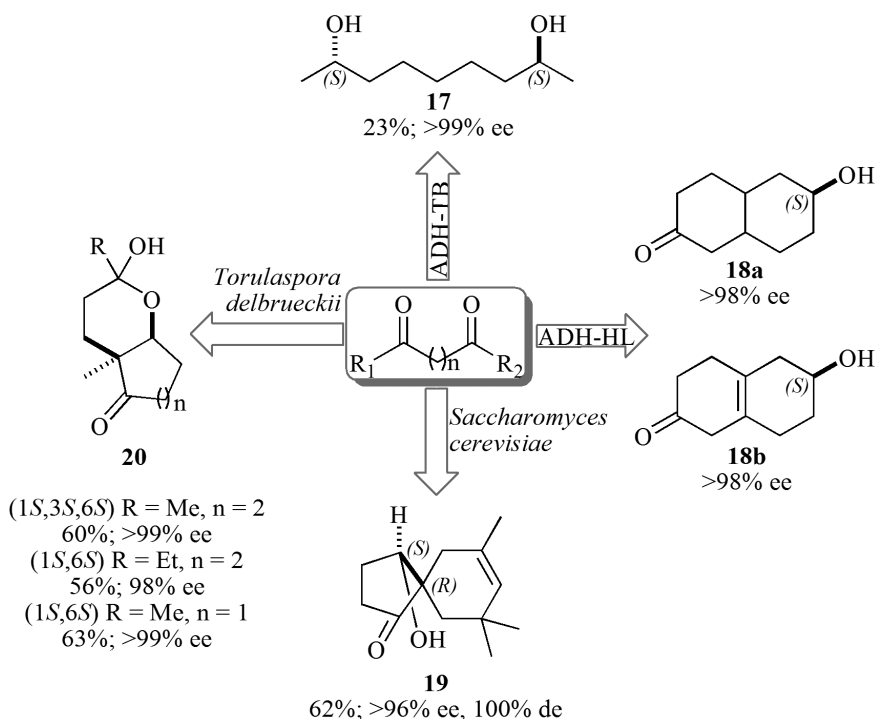


Schemat 5. Asymetryczna bioredukcja poliketonów

Scheme 5. Asymmetric bioreduction of polyketones

W enzymatycznej reakcji desymetryzacji z powodzeniem również redukuje się diketony, w których grupy karbonylowe są znacznie oddalone. W reakcji redukcji alifatycznego 2,8-nonandionu, w obecności dehydrogenazy alkoholowej z *T. brockii* otrzymano czysty enancjomeryczny diol w wyniku redukcji dwóch grup karbonylowych (Schemat 6, 17) [33]. W zależności od zastosowanego katalizatora tylko jedna z dwóch grup ketonowych może być selektywnie redukowana. Dehydroge-

naza alkoholowa z wątroby końskiej (HLADH) preferencyjnie desymetryzuje bicykliczne diketony do hydroksyketonów. W reakcji z *cis*- i *trans*-dekalinedionów uzyskano enancjomer o konfiguracji (*S*) z wysokim nadmiarem enancjomerycznym. Podobnie w reakcji z nienasyconym diketonem, selektywnie redukowana była jedna grupa karbonylowa. Otrzymano nienasycony alkohol o tej samej konfiguracji absolutnej (Schemat 6, **18**) [34, 35]. Zastosowanie drożdży piekarskich jako katalizatorów umożliwia selektywną redukcję spirodionu do odpowiednich hydroksyketonów z doskonałym nadmiarem enancjo- i diastereoizomerycznym (Schemat 6, **19**) [36]. Pochodne triketonów w obecności drożdży z *Torulaspora delbrueckii* IFO10921 selektywnie zredukowano do czystych optycznie hydroksydiketonów, które spontanicznie w środowisku reakcji cyklizowały do bicyklicznych (1*S*,6*S*)-acetalu z wysoką wydajnością chemiczną i optyczną (Schemat 6, **20**) [37, 38].

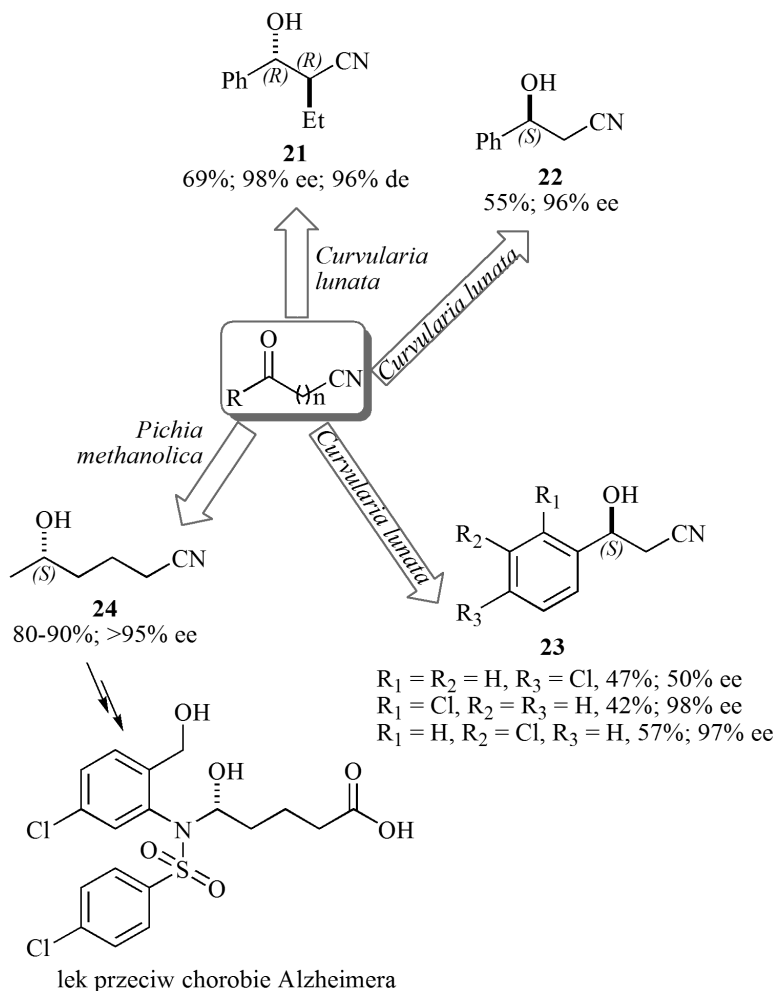


Schemat 6. Desymetryzacja prochiralnych poliketonów
Scheme 6. Desymmetrization of prochiral poliketones

3. ENZYMATYCZNA REDUKCJA KETONITRYLI

Alifatyczne i aromatyczne ketonitryle redukowano w reakcji katalizowanej *Curvularia lunata* CECT 2130. W zależności od zastosowanego rozpuszczalnika, uzyskano czyste optycznie produkty. Stosując etanol otrzymano głównie (2*R*,1'*R*)-

α -alkilo- β -hydroksynitryle z wysokim nadmiarem diastereo- i enancjomerycznym (Schemat 7, **21**) [39, 40]. Natomiast w obecności metanolu redukcja grupy karbonylowej umożliwiła uzyskanie (*S*)-hydroksynitryli (Schemat 7, **22**) [41].



Schemat 7. Enancjoselektywna redukcja ketonitryli
Scheme 7. Enantioselective reduction of ketonitriles

Z tego wynika, że biokatalizator *Curvularia lunata* CECT 2130 jest bardzo uniwersalny i w zależności od warunków reakcji umożliwia otrzymanie całej gamy różnych alifatycznych i aromatycznych hydroksynitryli o określonej konfiguracji absolutnej. W aromatycznych ketonitrylach na enancjoselektywność reakcji redukcji ma wpływ również położenie podstawnika w reszcie arylovej. Jeśli podstawnik znajduje się w pozycji 1,4- uzyskuje się produkty z mniejszym nadmiarem enancjomerycz-

nym, szczególnie gdy jest to podstawnik wyciągający elektrony, na przykład chlor. Natomiast obecność podstawnika w pozycji 1,3- i 1,2-, nawet jeśli podstawnik ma charakter elektronoakceptorowy, nie wpływa na pogorszenie selektywności reakcji. W każdym z tych przypadków, uzyskuje się czyste optycznie hydroksynitryle (Schemat 7, 23) [41]. (S)-5-Hydroksyheksanonitryl jest kluczowym związkiem pośrednim w syntezie leku przeciw chorobie Alzheimera (Schemat 7, 24) [42]. Związek ten otrzymano w wyniku enancjoselektywnej reakcji redukcji 5-oksoheksanonitrylu poprzez zastosowanie *Pichia methanolica* SC 16116 jako katalizatora. Reakcja przebiegała z dobrą wydajnością oraz bardzo dobrą enancjoselektywnością.

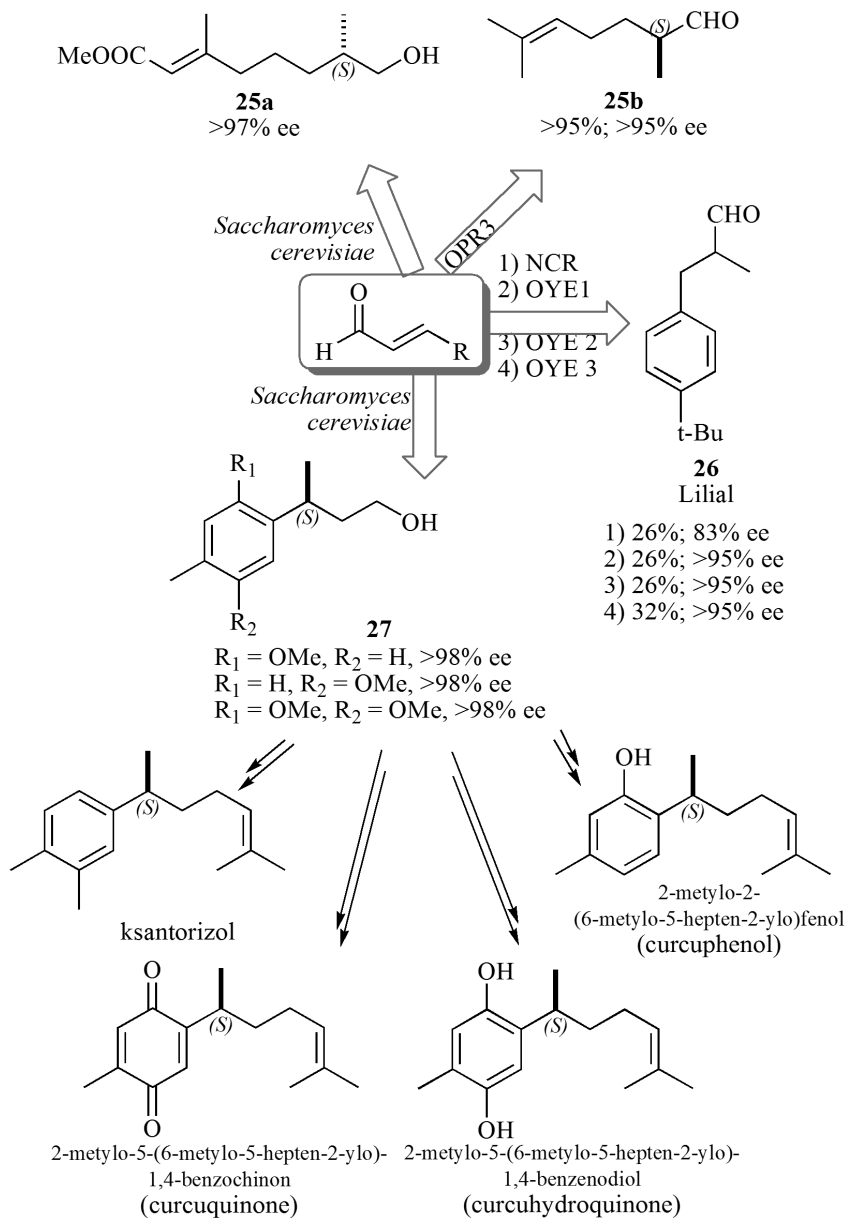
4. BIOREDUKCJA WIĄZANIA PODWÓJNEGO

W asymetrycznej syntezie, obok związków karbonylowych, redukowane są również nienasycone związki z podwójnym wiązaniem węgiel-węgiel. Wiązanie podwójne można zredukować stosując zarówno całe komórki (mikroorganizmy, komórki roślinne) oraz wyizolowane enzymy należące do oksydoreduktaz tzw. en-reduktazy (ERED). Zastosowanie całych komórek, sprawdza się szczególnie w syntezach na skalę preparatywną, jednak w porównaniu do wyizolowanych reduktaz preparaty enzymatyczne z mikroorganizmów są mniej chemoselektywne. W przypadku polifunkcyjnych alkenów, enzymy zawarte w mikroorganizmach mogą przeprowadzać dodatkowe reakcje uboczne, zmniejszając przy tym wydajność pożądanego produktu [43]. Przez długi czas jedynym wyizolowanym enzymem należącym do en-reduktaz stosowanym w bioredukcji była dehydrogenaza NADPH (Old Yellow Enzyme Flavoproteins, OYE EC 1.6.99.1) ekstrahowana z drożdży. Naturalną funkcją tego enzymu jest redukcja wiązania podwójnego w związkach karboksylowych. Na początku lat 80. podczas prac prowadzonych nad enzymem OYE i jego homologami, Simon i współpracownicy wyizolowali z bakterii beztlenowych z gatunku *Clostridium* (*C. kluyveri*, *C. tyrobutyricum*, i *C. sporogenes*) en-reduktazy (EC 1.3.1.31, ang. 2-enoate reductase), które również katalizują reakcję redukcji podwójnego wiązania węgiel-węgiel w α,β -nienasyconych anionach karboksylowych. Enzymy te należą do różnych podklas oksydoreduktaz. Pełnią jednak identyczną funkcję w syntezach organicznych, to jest selektywnie redukują wiązania C=C. Takie reduktazy z bakterii beztlenowych są wrażliwe na obecność tlenu atmosferycznego, dlatego też rzadziej są wykorzystywane w bioredukcjach [44]. Przyłączenie wodoru, w asymetrycznej reakcji redukcji, do wiązania C=C z użyciem en-reduktaz flawinozależnych odbywa się poprzez tzw. *trans*-addycję. Jon wodorkowy z kofaktora flawinowego jest stereoselektywnie przenoszony na atom węgla β , natomiast proton z rozpuszczalnika na atom węgla α z przeciwnej strony. Regeneracja kofaktora odbywa się przy udziale NAD(P)H, który staje się dawcą jonu wodorkowego. Taka stereoselektywna addycja wodoru w obecności en-reduktazy umożliwia otrzymanie produktów redukcji o wysokiej czystości enan-

cjo- lub diastereoselektywnej. EED alkenów jest możliwa, jeśli w zredukowanym związku znajdują się podstawniki elektronoakceptorowe (EWG), które zwiększają kwasowość atomu wodoru w pozycji α względem podstawnika. Mikroorganizmy, całe komórki roślinne, a przede wszystkim izolowane enzymy OYE z rodziny flavoprotein umożliwiają selektywną redukcję wiązania podwójnego w związkach zawierających dodatkowe grupy funkcyjne: karbonylowe, karboksylowe, estrowe, imidowe, nitrylowe, nitrowe.

Jedną z grup substancji selektywnie redukowaną z zastosowaniem enzymów OYE są nienasycone związki karbonylowe. Redukcja nienasyconych aldehydów, w obecności mikroorganizmów, prowadzi najczęściej do nasyconych alkoholi pierwszorzędowych. W reakcji biotransformacji pochodnej cytralu, w obecności drożdży piekarskich, redukcji ulega wiązanie podwójne w pozycji α względem grupy karbonylowej, jak również grupa aldehydowa (Schemat 8, 25a). Dla porównania redukcja z zastosowaniem en-reduktazy OPR3 (reduktaza kwasu 12-oksofitodienowego pozyskiwana z *Lycopersicon esculentum*) przebiega całkowicie chemoselektywnie i uzyskuje się związek zapachowy cytronelal z wysoką chemiczną i optyczną wydajnością (Schemat 8, 25b) [45, 46]. Podobnie nienasycone aldehydy z wiązaniem podwójnym w położeniu α , pochodne aldehydu cynamonowego, z powodzeniem redukowano en-reduktazami, otrzymując nieracemiczne arylopodstawione aldehydy α -metylodihydrocynamonowe (Schemat 8, 26). Najlepsze wyniki uzyskano z zastosowaniem reduktazy z *Zymomonas mobilis* (NCR), i z drożdży OYE 1–3 (OYEs 1–3). Otrzymane związki znalazły zastosowanie w przemyśle perfumeryjnym (Lilial, Helional) [47]. β -Nienasycone aldehydy są również przekształcane w odpowiednie nasycone alkohole przez drożdże piekarskie. Na przykład redukcja aromatycznych propenali prowadzi do enancjomerycznie czystych pierwszorzędowych (*S*)-alkoholi (Schemat 8, 27). Otrzymane związki stanowią chiralne bloki budulcowe w syntezie bisabolenów (monocykliczne seskwiterpeny) [48].

Redukcja związków pochodnych metakroleiny w obecności drożdży piekarskich umożliwia uzyskanie nasyconych i nienasyconych alkoholi (Schemat 9, 28), które wykorzystuje się jako bifunkcyjne syntony. Stereochemia bioredukcji tego typu związków była uwarunkowana położeniem wiązania podwójnego, jak również stopniem utlenienia siarki. W obecności podstawnika PhS- w β -nienasyconych aldehydach, drożdże redukowały grupę aldehydową oraz wiązanie podwójne C=C umożliwiając powstawanie nasyconych alkoholi ((*R*)-28a). Jeśli podstawnik R = PhSO₂ reakcja przebiega nieselektywnie i otrzymano zarówno nasycone jak i nienasycone alkohole z podobną wydajnością. W tym przypadku nasycone alkohole miały konfigurację przeciwną ((*S*)-28b) niż nasycone alkohole uzyskane w reakcji redukcji związku z podstawnikiem -SPh ((*R*)-28a). Natomiast aldehydy allilowe redukują się łatwiej niż β -nienasycone związki karbonylowe z tą jednak różnicą, że reakcja w tym przypadku przebiega mniej selektywnie ((*S*)-28a) [49].

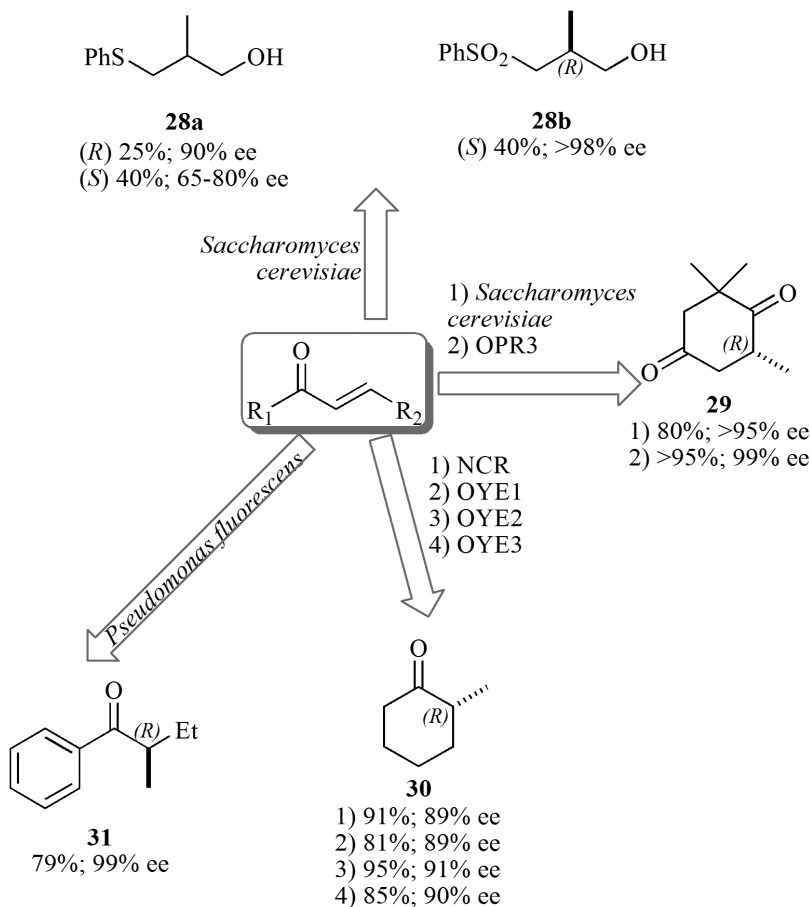


Schemat 8. Asymetryczna bioredukcja alkenów z użyciem flawinozależnych en-reduktaz

Scheme 8. Asymmetric bioreduction of activated alkenes using flavin-dependent ene-reductases

W przeciwieństwie do nienasyconych aldehydów redukcja α,β -nienasyconych ketonów w obecności drożdży jest selektywna. Redukcja 2,6,6-trimetylocykloheks-2-eno-1,4-dionu (ketoisophorone) przebiega praktycznie chemoselektywnie, uzyskuje się czysty optycznie, nasycony (*R*)-2,2,6-trimetylo-1,4-cykloheksanodion

(Schemat 9, **29**) z wysoką 80% wydajnością (niewielka ilość produktów ubocznych). Związek ten jest prekursorem karotenoidów [50]. Ta sama redukcja w obecności reduktazy OPR3 prowadzi tylko do jednego produktu, bez nawet śladowych ilości produktów redukcji grup karbonylowych [51]. W obecności większości en-reduktaz: NCR, OYE 1-3, YqiM z *Bacillus subtilis*, OPR1 (reduktaza 1 kwasu 12-oksofitodienowego), 2-metylocykloheksenon, inny karbonylowy związek nienasycony, był selektywnie redukowany do enancjomeru o konfiguracji (*R*) z dobrą lub bardzo dobrą stereoselektywnością (Schemat 9, **30**) [52, 53].

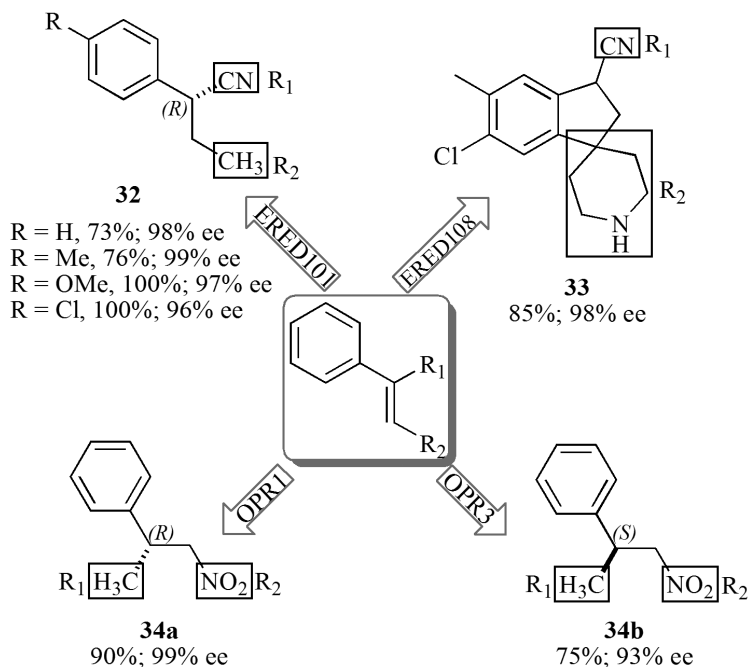


Schemat 9. Redukcja nienasyconych ketonów wobec en-reduktaz

Scheme 9. Reduction reaction of unsaturated ketones in the presence of ene-reductases

Jeszcze jednym przykładem mikrobiologicznej redukcji nienasyconych ketonów, jest reakcja biotransformacji metylenoketonów w obecności *Rhizopus arrhizus*, *Pseudomonas fluorescens* i immobilizowanej *S. cerevisiae*. Najlepsze wyniki uzyskano z zastosowaniem *P. fluorescens* jako biokatalizatora. Otrzymano czyste optycznie ketony nasycone z dobrą wydajnością (Schemat 9, **31**)

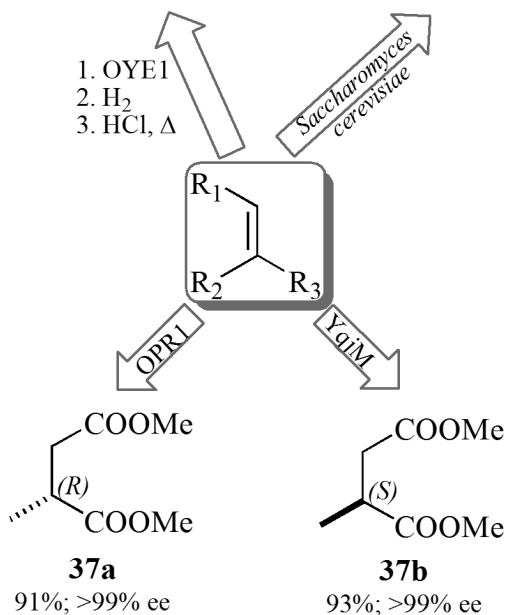
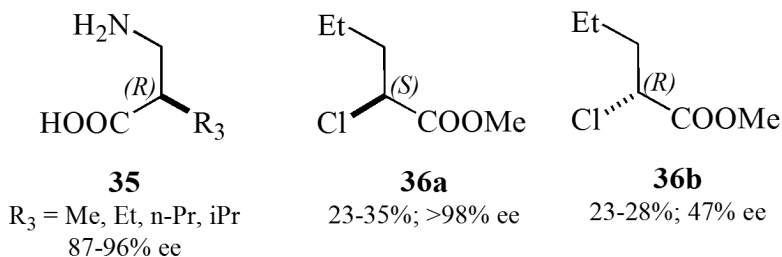
[54]. Drożdży *Saccharomyces cerevisiae* użyto do redukcji enonów otrzymując (*S*)- α -metyloketony z 63–96% ee. Enzymy zawarte w grzybie *Geotrichum candidum* były również w stanie zredukować tego typu związki, w ten sam sposób jak *S. cerevisiae*, chociaż nadmiary enancjomeryczne były niższe (17–87% ee) [55].



Schemat 10. Bioredukcja nitrozwiązków i α,β -nienasyconych nityrli
 Scheme 10. Bioreduction of nitro compounds and α,β -unsaturated nitriles

Jedną z ważniejszych grup związków selektywnie redukowanych za pomocą enzymów OYE są związki azotu: α,β -nienasycone nityryle oraz nitrozwiązki [56]. W reakcji bioredukcji uzyskuje się nasycone związki. Nityryle łatwo przekształca się do kwasów karboksylowych, amidów lub aldehydów, natomiast otrzymane nitrozwiązki stosuje się w syntezie amin, kwasów karboksylowych i węglowodorów. W obecności en-reduktaz selektywnie zredukowano 1,4-podstawione fenylbutenonityryle o geometrii *Z* z dobrą wydajnością i enancjoselektywnością. Enzym umożliwił otrzymanie czystych, optycznie nasyconych nityrli o konfiguracji (*R*) (Schemat 10, **32**). W wyniku bioredukcji w obecności tego samego katalizatora uzyskano jeden z ważniejszych chiralnych bloków budulcowych 6-chloro-5-metylospiro[1*H*-indeno-1,4'-piperidyno]-3-karbonityl (Schemat 10, **33**) [52, 53]. Redukcja 1-nitro-2-fenylpropenu, w zależności od zastosowanego enzymu z grupy OYE, prowadzi do czystych optycznie nasyconych nitrozwiązków o różnej konfiguracji absolutnej. Reduktazy OPR wykazują w stosunku do tego samego substratu odmienną enancjopreferencję. Enzym OPR1 katalizuje (*R*)-stereoselektywną redukcję dostarczając

(*R*)-1-nitro-2-fenylpropan, podczas gdy reduktaza OPR3, podobnie jak drożdże piekarskie, daje produkt o konfiguracji przeciwnej (Schemat 10, 34). W przypadku reduktaz reakcja przebiega ilościowo. Prawdopodobnie zmiana sekwencji aminokwasowej w enzymach: w OPR1 (Lys-79), w OPR3 (Pro-75) jest przyczyną zmian konformacyjnych, które mogą wymuszać inną orientację substratu w miejscu aktywnym [52, 53].



Schemat 11. Stereoselektywna redukcja wiązania podwójnego wobec en-reduktazy
Scheme 11. Stereoselective reduction of double bond catalysed by ene-reductase

W bioredukcji en-reduktazami proste estry monokarboksylowe nie są przekształcane, gdyż wymagana jest dodatkowa grupa aktywująca: chlorowiec, grupa nitrowa lub grupa estrowa. β -Nitroakrylany mogą być z sukcesem redukowane przez OYE1. W wyniku chemoenzymatycznej redukcji syntetyzowano α -ketoestry używane jako półprodukty w syntezie β -aminokwasów (Schemat 11, 35). Konfiguracja *R/S* otrzymanych produktów w niektórych przypadkach była uwarunkowana geometrią *Z/E* wyjściowych reagentów. Dużą rolę również odgrywa wielkość pod-

stawnika przy $C-\beta$. Jeśli podstawnik jest duży objętościowo utrudniony jest atak jonu wodorkowego, co w konsekwencji może mieć wpływ na obniżenie selektywności. Redukcja estrów metylowych kwasów 2-chloro-2-alkenokarboksylowych drożdżami piekarskimi, w zależności od konfiguracji E/Z wyjściowych substratów, umożliwia otrzymanie obu enancjomerów. Izomery Z były selektywnie redukowane do czystych optycznie (S)-enancjomerów. Natomiast substraty o konfiguracji E przekształcane w (R)-produkty (Schemat 11, **36a i b**). Selektywność redukcji izomerów o konfiguracji E była jednak niższa, niż izomerów Z . α -Podstawione estry kwasu butenodiowego mogą być również selektywnie redukowane do określonego enancjomeru. Wystarczy zastosować enzymy o różnej stereopreferencji lub wprowadzić enzym o określonej stereopreferencji do mieszaniny izomerów E/Z . Zastosowanie reduktazy OPR1 oraz SYE-4 (homolog OYE z *Shewanella oneidensis*) umożliwia otrzymanie (R)-produktu, natomiast redukcja tego samego substratu (izomer E) w obecności enzymu YqiM prowadzi do enancjomeru o konfiguracji przeciwnej (Schemat 11, **37 a i b**). Enancjomer o konfiguracji (R) można również uzyskać, jeśli do mieszaniny dwóch izomerów Z i E wprowadzi się enzym YqiM. Enzym selektywnie przekształca tylko jeden z izomerów – izomer o konfiguracji Z [52, 53, 57–59].

Ester kwasu (R)-3-hydroksy-2-metylopropanowego tzw. ester Rocha, otrzymuje się w wyniku redukcji en-reduktazami. Zabezpieczenie grupy hydroksylowej umożliwia otrzymanie produktów z wysoką czystością optyczną. Związek ten ma znaczenie przemysłowe, jest to popularny blok budulcowy wykorzystywany do syntezy witamin (np. α -tokoferolu), związków zapachowych (np. muskonu), antybiotyków (np. calcimycyny, rapamycyny, lub diktiostatyny) oraz innych produktów naturalnych (np. spiculoic acid A) [60].

UWAGI KOŃCOWE

Problemy redukcji enzymatycznej sprowadzają się do poszukiwania specyficznych i wydajnych katalizatorów. Dlatego w tej pracy przedstawiono zestawienie wybranych reakcji redukcji z udziałem enzymów pochodzenia grzybiczego lub bakteryjnego. Przy udziale tych enzymów dokonano selektywnej redukcji ketoestrów, poliketonów, ketonitryli, wiązania podwójnego $C=C$ związków nienasyconych zawierających grupę nitylową, estrową, karbonylową oraz nitrową.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] N. Kizaki, Y. Yasohara, J. Hasegawa, M. Wada, M. Kataoka, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **55**, 590.
- [2] R.N. Patel, C.G. McNamee, A. Banerjee, J.M. Howell, R.S. Robison, L. Szarka, *J. Enzyme Microb. Technol.*, 1992, **14**, 731.
- [3] F. Aragazzini, M. Valenti, E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, *Biocatalysis*, 1992, **5**, 325.
- [4] H. Yamamoto, N. Kimoto, A. Matsuyama, Y. Kabayashi, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2002, **66**, 1775.
- [5] Y. Akakabe, M. Takahashi, M. Kamezawa, K. Kikuchi, H. Tachibana, T. Ohtani, Y. Naoshima, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1995, 1295.
- [6] M. Kataoka, K. Yamamoto, H. Kawabata, M. Wada, K. Kita, H. Yanase, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **51**, 486.
- [7] H. Yamamoto, A. Matsuyama, Y. Kabayashi, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2002, **66**, 481.
- [8] T. Zelinski, M.-R. Kula, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, **2**, 421.
- [9] N. Itoh, M. Matsuda, M. Mabuchi, T. Dairi, J. Wang, *Eur. J. Biochem.*, 2002, **269**, 2394.
- [10] Y. Yasohara, N. Kizaki, J. Hasegawa, S. Takahashi, M. Wada, M. Kataoka, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **51**, 847.
- [11] M. Wada, M. Kataoka, H. Kawabata, Y. Yasohara, N. Kizaki, J. Hasegawa, S. Shimizu, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1998, **62**, 280.
- [12] M. Wada, H. Kawabata, A. Yoshizumi, M. Kataoka, S. Nakamori, Y. Yasohara, N. Kizaki, J. Hasegawa, S.J. Shimizu, *Biosci. Bioeng.*, 1999, **87**, 144.
- [13] C.E. Anson, M.J. Bibb, K.I. Booker-Milburn, C. Clissold, P.J. Haley, D.A. Hopwood, K. Ichinose, W.P. Revill, G.R. Stephenson, C.M. Surti, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2000, **39**, 224.
- [14] T. Fujisawa, T. Itoh, T. Sato, *Tetrahedron Lett.*, 1984, **25**, 5083.
- [15] D. Buisson, S. Henrot, M. Larcheveque, R. Azerad, *Tetrahedron Lett.*, 1987, **28**, 5033.
- [16] B.D. Feske, I.A. Kaluzna, J.D. Stewart, *J. Org. Chem.*, 2005, **70**, 9654.
- [17] K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry*, Springer, Berlin, 1992.
- [18] S.K. Padhi, I.A. Kaluzna, D. Buisson, R. Azerad, J.D. Stewart, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2007, **18**, 2133.
- [19] M.M. Kayser, M.D. Mihovilovic, J. Kearns, A. Feicht, J.D. Stewart, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 6603.
- [20] R.N. Patel, L. Chu, R. Chidambaram, J. Zhu, J. Kant, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2002, **13**, 349.
- [21] K. Ishihara, H. Yamaguchi, H. Hamada, N. Nakajiman, K. Nakamura, *J. Mol. Catal. B: Enzymol.*, 2000, **10**, 429.
- [22] A. Shafiee, H. Motamedi, A. King, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, **49**, 709.
- [23] M. Iwamoto, H. Kawada, T. Tanaka, M. Nakada, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 7239.
- [24] M. Wolberg, W. Hummel, M. Müller, *Chem. Eur. J.*, 2001, **7**, 4562.
- [25] M. Wolberg, A. Ji, W. Hummel, M. Müller, *Synthesis*, 2001, 937.
- [26] D. Enders, J.L. Vicario, A. Job, M. Wolberg, M. Müller, *Chem. Eur. J.*, 2002, **8**, 4272.
- [27] J.L. Vicario, A. Job, M. Wolberg, M. Müller, D. Enders, *Org. Lett.*, 2002, **4**, 1023.
- [28] A. Job, M. Wolberg, M. Müller, D. Enders, *Synthesis*, 2001, 1796.
- [29] Z. Guo, Y. Chen, A. Goswami, R.L. Hanson, R.N. Patel, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2006, **17**, 1589.
- [30] T. Fujisawa, E. Kojima, T. Sato, *Chem. Lett.*, 1987, 2227.
- [31] M. Takeshita, T. Sato, *Chem. Pharm. Bull.*, 1989, **37**, 1085.
- [32] O. Bortolini, G. Fantin, M. Fogagnolo, P.P. Giovannini, A. Guerrini, A. Medici, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 1854.
- [33] E. Keinan, S.C. Sinha, A. Sinha-Bagchi, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 3631.
- [34] D.R. Dodds, J.B. Jones, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1982, 1080.
- [35] D.R. Dodds, J.B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 577.

- [36] K. Nakamura, R. Yamanaka, T. Matsudab, T. Haradab, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, **14**, 2659.
- [37] K.-I. Fuhshuku, N. Funa, T. Akeboshi, H. Ohta, H. Hosomi, S. Ohba, T. Sugai, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 129.
- [38] K.-I. Fuhshuku, M. Tomita, T. Sugai, *Adv. Synth. Catal.*, 2003, **345**, 766.
- [39] V. Gotor, J.R. Dehli, F. Rebolledo, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2000, 307.
- [40] J.R. Dehli, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2001, **12**, 1485.
- [41] J.R. Dehli, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2000, **11**, 3693.
- [42] C.V.C. Prasad, O.B. Wallace, J.W. Noonan, C.P. Sloan, W. Lau, S. Vig, M.F. Parker, D.W. Smith, S.B. Hansel, C.T. Polson, D.M. Barten, K.M. Felsenstein, S.B. Roberts, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 3361.
- [43] E. Garcia-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 313.
- [44] M. Hall, A.S. Bommarius, *Chem. Rev.*, 2011, **111**, 4088.
- [45] P. Gramatica, P. Manitto, D. Monti, G. Speranza, *Tetrahedron*, 1987, **43**, 4481.
- [46] P. Gramatica, P. Manitto, D. Monti, G. Speranza, *Tetrahedron*, 1988, **44**, 1299.
- [47] C. Stueckler, N.J. Mueller, C.K. Winkler, S.M. Glueck, K. Gruber, G. Steinkellner, K. Faber, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 8472.
- [48] C. Fuganti, S.J. Serra, *Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2000, 3758.
- [49] S. Serra, C. Fuganti, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2001, **12**, 2191.
- [50] H.G. Leuenberger, W. Boguth, E. Widmer, R. Zell, *Helv. Chim. Acta*, 1976, **59**, 1832.
- [51] C. Stueckler, T.C. Reiter, N. Baudendistel, K. Faber, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 663.
- [52] M. Hall, C. Stueckler, W. Kroutil, P. Macheroux, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 3934.
- [53] M. Hall, C. Stueckler, B. Hauer, R. Stuermer, T. Friedrich, M. Breuer, W. Kroutil, K. Faber, *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, **9**, 1511.
- [54] M. de Mancilha, R. de Conti, P.J.S. Moran, J.A.R. Rodrigues, *Arkivoc*, 2001, 85.
- [55] B.R.S. de Paula, D.S. Zampieri, J.A.R. Rodrigues, P.J.S. Moran, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2013, **24**, 973.
- [56] S. Laval, W. Dayoub, L. Pehlivan, E. Métay, D. Delbrayelle, G. Mignani, M. Lemaire, *Tetrahedron Lett.*, 2014, **55**, 23.
- [57] M. Utaka, S. Konishi, A. Mizuoka, T. Ohkubo, T. Sakai, S. Tsuboi, A. Takeda, *J. Org. Chem.*, 1989, **54**, 4989.
- [58] A. Muller, B. Hauer, B. Rosche, *Biotechnol. Bioeng.*, 2007, **98**, 22.
- [59] C. Stueckler, M. Hall, H. Ehammer, E. Pointner, W. Kroutil, P. Macheroux, K. Faber, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 5409.
- [60] C. Stueckler, C.K. Winkler, M. Bonnekessel, K. Faber, *Adv. Synth. Catal.*, 2010, **352**, 2663.

Praca wpłynęła do Redakcji 19 czerwca 2014