

**DWIE DEKADY CHEMO-ENZYMATYCZNEJ  
REAKCJI BAEYERA-VILLIGERA**

**TWO DECADES OF CHEMO-ENZYMATIC  
BAEYER-VILLIGER REACTION**

**Agnieszka Drożdż, Rafał Bielas, Anna Chrobok\***

*Politechnika Śląska, Wydział Chemiczny,  
Katedra Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii,  
ul. Krzywoustego 4, 44-100 Gliwice  
\*e-mail: Anna.Chrobok@polsl.pl*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Ogólna charakterystyka lipazy B *Candida antarctica*

2. Chemo-enzymatyczna reakcja Baeyera-Villigera – rys historyczny

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---



**Mgr inż. Agnieszka Drożdż** w roku 2011 ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej na kierunku Chemia o specjalności Procesy Biochemiczne. W październiku 2011 roku rozpoczęła studia doktoranckie na tym samym Wydziale w Katedrze Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii. Jej zainteresowania badawcze koncentrują się wokół reakcji Baeyera-Villigera utleniania cyklicznych ketonów do odpowiednich chiralnych oraz achiralnych laktonów z zastosowaniem kompleksów glinu lub enzymów.



**Mgr inż. Rafał Bielas** w 2014 roku ukończył studia magisterskie na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej na kierunku Chemia, obecnie doktorant w Katedrze Fizykochemii i Technologii Polimerów na tym samym Wydziale. Jego zainteresowania naukowe obejmują zastosowanie cieczy jonowych w kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej.



**Dr hab. inż. Anna Chrobok** profesor nadzwyczajny Politechniki Śląskiej, w roku 1996 ukończyła Wydział Chemiczny Politechniki Śląskiej. W 2001 roku uzyskała tytuł doktora nauk technicznych, a w 2011 roku stopień doktora habilitowanego na tym samym Wydziale. Obecnie jest zatrudniona na stanowisku kierownika Katedry Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii. Specjalność – technologia chemiczna organiczna.

---

**ABSTRACT**

The Baeyer–Villiger oxidation of ketones to lactones or esters is a reaction of significant interest in organic chemistry owing to very wide range of possible applications, e.g. in the synthesis of antibiotics, steroids, pheromones and monomers for polymerisation. The organic percarboxylic acids typically used as oxidants in these reactions are fairly expensive, often poorly stable and hazardous, and this consequently limits their commercial application. Therefore, the chemo-enzymatic approach appears to be a very attractive alternative. The paper presents literature reports concerning the application the use of lipase B from *Candida antarctica* in the chemo-enzymatic Baeyer-Villiger oxidation. It involves oxidation of long- or medium-chain carboxylic acids with  $H_2O_2$  or urea hydrogen peroxide to generate in situ peracid which is later used to oxidise ketones to lactones.

Keywords: chemo-enzymatic Baeyer–Villiger reaction, lactones, cyclic ketones oxidation, lipase B *Candida antarctica*

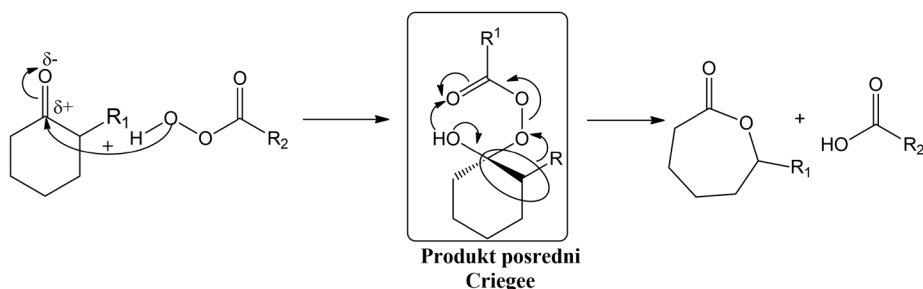
Słowa kluczowe: chemo-enzymatyczna reakcja Baeyera-Villigera, laktony, utlenianie cyklicznych ketonów, lipaza B *Candida antarctica*

---

---

## WPROWADZENIE

Reakcja Baeyera-Villigera (BV) polega na utlenianiu cyklicznych i acyklicznych ketonów do odpowiednich laktonów lub estrów [1]. Do najczęściej wykorzystywanych czynników utleniających w tej reakcji należą nadkwasy organiczne, nadtlenek wodoru oraz wodoronadtlenki alkilowe. Mechanizm reakcji opisany przez Criegee przebiega w sposób uzgodniony i jest dwuetapowy [2]. Na początku następuje nukleofilowy atak związku nadtlenowego na węgiel karbonylowy ketonu, w wyniku czego powstaje tetraedryczny produkt pośredni, zwany adduktem Criegee (Schemat 1). Następnie dochodzi do migracji grupy alkilowej bądź arylovej ketonu w kierunku dodatnio naładowanego atomu tlenu związku nadtlenowego, z równoczesnym rozerwaniem wiązania O-O. Etap ten jest zazwyczaj najwolniejszym etapem reakcji i determinuje jej szybkość [3–5]. W drugim etapie energetycznie preferowane jest ustawienie grupy migrującej w pozycji antiperiplanarnej w stosunku do wiązania O–O grupy opuszczającej, oraz w pozycji antiperiplanarnej w odniesieniu do wolnej pary elektronowej grupy hydroksylowej. Uprzywilejowanie konformacji antiperiplanarnej wynika z mniejszej bariery energetycznej migracji. Reakcja jest stereoselektywna, a więc migrujące grupy zachowują swoją konfigurację [2–6].

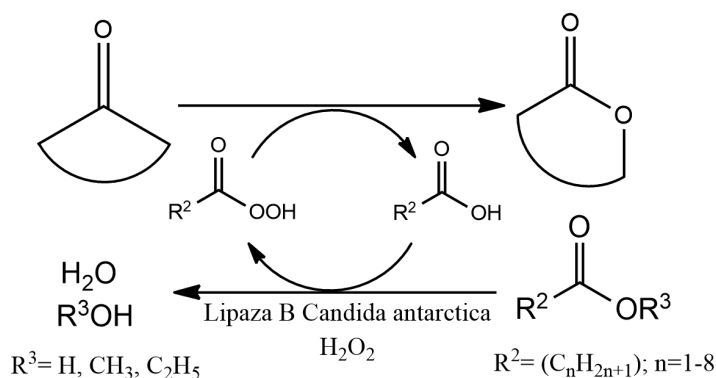


Schemat 1. Mechanizm reakcji Baeyera-Villigera [2]

Scheme 1. The mechanism of Baeyer-Villiger reaction [2]

Najczęściej stosowane utleniacze w reakcji BV to nadkwasy organiczne. Charakteryzują się one stosunkowo wysoką ceną i relatywnie niską stabilnością. Są one również szczególnie wrażliwe na wstrząsy, co powoduje utrudnienia w ich transporcie i przechowywaniu. Wady wynikające z zastosowania nadkwasów zostały wyeliminowane w 1948 r. dzięki pionierskiemu odkryciu Truffitta [7], który zaproponował enzymatyczną wersję reakcji Baeyera-Villigera. Zastosowanie wyselekcjonowanych enzymów w reakcji utleniania BV umożliwiło otrzymanie najwyższych wydajności (>99%) oraz czystości enancjomerycznych (>99%) laktonów ze wszystkich dotychczasowo poznanych katalitycznych układów [8–13]. Biokatalizatory wykorzystywane w niniejszej metodzie to monooksygenazy Baeyera-Villigera. Są to flawoproteiny charakteryzujące się wysoką specyficznością substratową oraz łagodnym środowiskiem prowadzenia biotransformacji. Na szczególną uwagę zasługuje monooksygenaza cykloheksanonu, którą zalicza

się do I typu monooksygenaz BV. Zawiera ona dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD), który jest koenzymem pełniącym funkcję przenośnika elektronów i protonów oraz wykorzystuje fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH), który jest źródłem elektronów. Główną wadą metody jest konieczność stosowania stechiometrycznych ilości drogiego kofaktora NADPH. Co więcej procesy wydzielania monooksygenaz są uciążliwe, a ich aktywność oraz stabilność w środowisku rozpuszczalników organicznych drastycznie spada [7–13].



Schemat 2. Chemo-enzymatyczna reakcja Baeyera-Villigera

Scheme 2. Chemo-enzymatic Baeyer-Villiger reaction

Alternatywnym rozwiązaniem, wykorzystującym stabilniejszy enzym jest chemo-enzymatyczna wersja reakcji BV (Schemat 2). W tym przypadku czynnikiem utleniającym jest wprowadzony nadkwas organiczny, lecz jest on wygenerowany *in situ* w trakcie trwania procesu wobec biokatalizatora. W pierwszym etapie, katalizowanym za pomocą lipazy B pochodzącej z *Candida antarctica* (CaLB), estry bądź kwasy karboksylowe o długich lub średnich łańcuchach alkilowych ulegają utlenieniu za pomocą nadtlenu wodoru do nadkwasów. Następnie świeżo utworzony nadkwas zużywa się w procesie utleniania ketonów do laktonów [14–21]. Unika się dzięki temu niebezpiecznych operacji z niestabilnymi nadkwasami. Do opisanego procesu najczęściej stosuje się lipazę immobilizowaną na makroporowatej żywicy akrylowej. Preparat ten jest dostępny handlowo pod nazwą Novozyme-435 i jest wielokrotnie tańszy od monooksygenazy cykloheksanonu.

Do dnia dzisiejszego ukazało się niewiele doniesień literaturowych opisujących chemo-enzymatyczną reakcję BV. Autorzy tych prac prawie we wszystkich przypadkach wykorzystują, jako katalizator lipazę w formie preparatu Novozyme-435 [14–18]. Tylko w trzech pracach zastosowano w roli biokatalizatora usieciowane agregaty enzymatyczne lipazy [19] lub perhydrolazy [21], jak również lipazę immobilizowaną na powierzchni krzemionki [20].

W powyższych pracach, jako prekursorzy nadkwasów wykorzystano kwas mirstynowy, oktanowy lub octan etylu wraz z utleniaczami w postaci 35–50% wodnego

roztworu  $H_2O_2$  lub kompleksu nadtlenu wodoru z mocznikiem (UHP). Spośród najczęściej stosowanych substratów w chemo-enzymatycznej reakcji BV można wymienić alkilocykloheksanony, wśród nich modelowy 2-metylocykloheksanon oraz alkilocyklopentanony takie jak 2-metylocyklopentanon, a także acykliczne ketony jak oktanon. Procesy zwykle prowadzone były w temperaturze pokojowej w środowisku toluenu lub octanu etylu. Wymagany czas prowadzenia reakcji sięgał nawet do kilku dni.

## 1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA LIPAZY B *CANDIDA ANTARCTICA*

Organizmy żyjące w ekstremalnych warunkach przyciągają coraz większą uwagę. Stanowią one często źródło interesujących substancji i biokatalizatorów. Jednym z najpopularniejszych przykładów mogą być drożdże *Candida antarctica*. Jak większość organizmów, wydzielają one lipazy, a konkretnie lipazę A oraz lipazę B. Pierwsze doniesienia na temat zastosowania tych enzymów pochodzą z roku 1992 i dotyczą asymetryzacji 2-mezo-cykloalkeno-1,4-dioli [22]. Opisują one zastosowanie oczyszczonej lipazy B immobilizowanej na żywicy akrylowej oraz dowodzą jej wysokiej enancjoselektywności w rozdziale racemicznych alkoholi drugorzędowych. Porównania obu lipaz dokonali w 1993 roku Theil i Björkling. [23] Zauważyli oni, że lipaza B wykazuje zdecydowanie większą selektywność i ma to miejsce niezależnie od tego czy enzym ten występuje samodzielnie, czy też jako składnik preparatu zawierającego obie lipazy.

W 1994 roku zespół badawczy pod kierownictwem Uppenberga opublikował wyniki badań, na podstawie których określona została sekwencja aminokwasów oraz sekwencja DNA kodująca ten enzym. [24] Po raz pierwszy dowiedziono, że lipaza B pochodząca z drożdży *Candida antarctica* składa się z 317 aminokwasów, a jej masa wynosi 33273Da. W strukturze enzymu obecnych jest również 286 cząsteczek wody, z których tylko 7 jest całkowicie „pochowanych” między łańcuchami aminokwasów. Zaskoczeniem był fakt, że sekwencja aminokwasów nie wykazuje znaczącej homologii do struktury innych lipaz. Mimo tego, tak jak w innych lipazach kluczowymi dla centrum aktywnego aminokwasami są w tym przypadku seryna, kwas asparaginowy i histydyna. Samo centrum aktywne jest dostępne dla zewnętrznego rozpuszczalnika poprzez wąski kanał o wymiarach  $10 \times 4 \times 12 \text{ \AA}$ . Ściany tego kanału są hydrofobowe i nie występują w nich elementy aromatyczne z wyjątkiem tryptofanu poprzedzającego w sekwencji katalityczną serynę. Azot obecny w łańcuchu bocznym tego aminokwasu tworzy wiązanie wodorowe z karbonylowym tlenem katalitycznej histydyny, co stabilizuje w tym miejscu strukturę. Lipaza B posiada w swej strukturze również dużą powierzchnię hydrofobową otaczającą wejście do kanału miejsca aktywnego, zajmującą około  $450 \text{ \AA}$  i będącą prawdopodobnie w bliskim kontakcie z powierzchnią lipidów podczas hydrolizy. Ta cecha jest szczególnie ważna i decyduje o wyższej aktywności CaLB w środowisku hydrofobowym. W 1995 roku ten sam zespół naukowców dowiódł na podstawie modelowania mole-

kularnego, że na dnie wnęki z miejscem aktywnym, tuż obok katalitycznej seryny znajduje się zagłębienie decydujące o stereospecyficzności enzymu [25].

W 1999 roku zespół pod kierownictwem Koopsa zbadał wpływ chemicznych modyfikacji enzymu oraz jego adsorpcji na nośniku stałym na aktywność i termostabilność. [26] Jak wykazały wyniki tych badań, adsorpcja enzymu na hydrofobowym nośniku pozwala na wielokrotne zwiększenie aktywności, a także na zwiększenie termostabilności. Zauważono jednak, że specyficzna aktywność maleje wraz ze wzrostem upakowania enzymu na powierzchni nośnika. Kowalencyjne modyfikacje nie wpływają pozytywnie na właściwości enzymu, kiedy jest on adsorbowany na nośniku hydrofobowym, a nawet mogą prowadzić do denaturacji. Zupełnie inaczej wpływają jednak one na adsorpcję na nośniku hydrofilowym, kiedy to pozwalają na większe upakowanie i zwiększenie aktywności. Należy jednak zauważyć, że niezależnie od modyfikacji, lipaza B *Candida antarctica* wykazuje lepsze właściwości, kiedy jest adsorbowana na nośnikach hydrofobowych.

Lipaza B *Candida antarctica* jest enzymem dobrze opisanym i scharakteryzowanym. W wielu publikacjach pokazano również, że jest to enzym wydajnie katalizujący znaczną liczbę reakcji organicznych, w tym wiele prowadzonych na skalę przemysłową. Najczęściej jednak stosuje się go do rozdziału racemicznych alkoholi, amin i kwasów oraz do syntezy aktywnych optycznie produktów ze związków *mezo* [27].

Novozyme-435 jest preparatem enzymatycznym często wykorzystywanym do procesów peroksydacji, o czym świadczy jego wysoka stabilność w rozpuszczalnikach organicznych oraz zdolność do przetwarzania *in situ* różnych średniołańcuchowych kwasów karboksylowych do odpowiednich nadkwasów w łagodnych warunkach.

W 1990 roku zespół pod kierownictwem Bjorklinga [28], jako pierwszy wykorzystał lipazę w celu generowania *in situ* nadkwasu przy pomocy nadtlenu wodoru. Wyniki tych badań wykazały, że najskuteczniejszym enzymem dla tego procesu jest lipaza pochodząca ze szczepu *Candida antarctica*. Nieco gorsze wyniki uzyskano stosując lipazy z *Pseudomonas sp.* czy *Candida cylindracea*. W toku dalszych badań okazało się, że lipaza najlepiej przekształca średniołańcuchowe kwasy karboksylowe, takie jak kwas oktanowy czy dodekanowy. Reakcja ta najefektywniej przebiega w niemieszających się z wodą rozpuszczalnikach, takich jak toluen czy heksan. Zaobserwowano również, że stosowany enzym nie wykazuje wrażliwości na duży nadmiar kwasu karboksylowego, natomiast szybko ulega dezaktywacji w kontakcie z dużymi stężeniami nadtlenu wodoru. Zauważono również, że biokatalityczne utlenianie kwasów karboksylowych do nadkwasów może z powodzeniem zostać wykorzystane w innych procesach utleniania [28].

W 2002 roku zespół pod kierownictwem Yadava [29] zbadał możliwości syntezy kwasu nadlaurylowego z wykorzystaniem szeregu różnych lipaz i rozpuszczalników. Badania te również wykazały, że enzymem najefektywniej katalizującym proces utleniania jest immobilizowana lipaza pochodząca ze szczepu *Candida antarctica*. Najlepszym rozpuszczalnikiem dla tego procesu jest toluen. Dobrano odpowiednie

parametry procesu: szybkość wytrząsania (600 rpm), 1,3-krotny nadmiar molowy 50% roztworu  $\text{H}_2\text{O}_2$  w stosunku do kwasu laurylowego oraz temperatura  $52^\circ\text{C}$ . Niestety, aktywność enzymu spadła o 50% po pierwszym cyklu. Po ustaleniu, że jedynymi czynnikami wywołującymi denaturację białka były nadtlenek wodoru oraz wyższa temperatura przystąpiono do wyznaczenia kinetyki tego procesu. Stwierdzono, że przebiega ona według mechanizmu pseudo-pierwszorzędowego [29].

## 2. CHEMO-ENZYMATYCZNA REAKCJA BAEYERA-VILLIGERA – RYS HISTORYCZNY

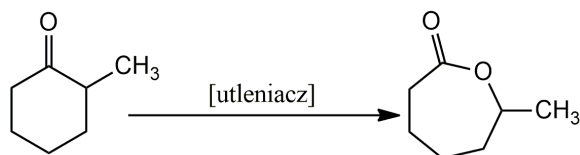
Pierwsze wzmianki na temat chemo-enzymatycznej reakcji Baeyera-Villigera pojawiły się w 1995 roku. [14] W pracy tej zaproponowane zostało całkowicie nowatorskie rozwiązanie, które zakładało użycie lipazy B *Candida antarctica* jako katalizatora. Przeprowadzono cykl badań z zastosowaniem enzymatycznego dodatku na przebieg procesu utleniania cyklicznych ketonów wobec stechiometrycznych ilości kwasu mirystynowego oraz Novozyme-435 w ilości  $225\text{g/mol}_{\text{ketonu}}$ . W roli utleniacza użyto czterokrotny nadmiar molowy 30% roztworu  $\text{H}_2\text{O}_2$  w wodzie. Proces prowadzono w środowisku toluenu w temperaturze pokojowej. Stężenie ketonu wynosiło  $0,1\text{ mol/dm}^3$ . Nadtlenek wodoru dozowano porcjami do układu reakcyjnego przez okres 10 h. Czas trwania reakcji od momentu zakończenia dozowania był relatywnie długi i wynosił 5,5 dnia. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń zaobserwowano, iż w przypadku utleniania 2-podstawionych cyklopentanonów lub 2-podstawionych cykloheksanonów, wydajności produktów mieszczą się w zakresie 57–73% (Tab. 1, poz. 1; Tab. 2, poz. 1). Zaproponowana metoda jest równie efektywna jak metoda utleniania przy użyciu kwasu *m*-chloronadbenzoesowego (*m*-CPBA) bądź kwasu trifluoronadctowego, a wydajności produktów są niższe zaledwie o 5–10%.

Choć opracowana przez grupę badawczą Lemoult metoda nie wymaga operacji z niebezpiecznymi nadkwasami przy jednoczesnym zachowaniu wysokich wydajności to posiadała ona również wady. Wyjątkowo długi czas prowadzenia procesu, trudności związane z pozbyciem się odpadowego kwasu mirystynowego oraz niemożliwość przewidzenia stereochemia reakcji stanowiły niewątpliwie niedogodności [14].



Tabela 1. Porównanie uzyskanych wydajności syntezy 6-metylo- $\epsilon$ -kaprolaktonu w różnych warunkach [6–12]

Table 1. Comparison of obtained yields of synthesis of 6-methyl- $\epsilon$ -caprolactone in various conditions [6–12]



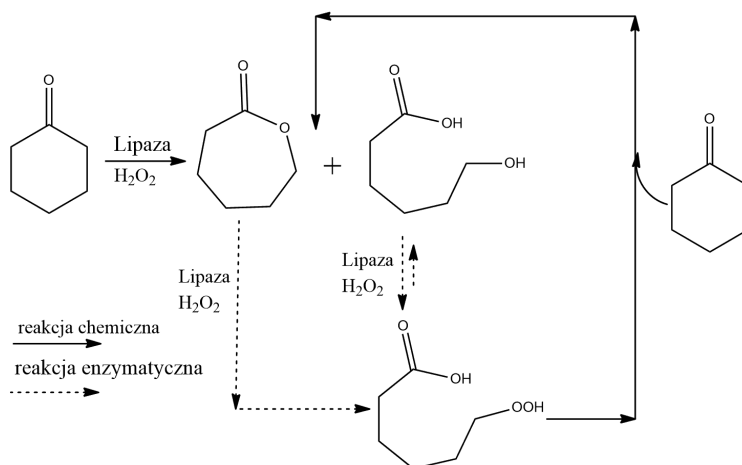
L.p.	Preparat enzymatyczny, ilość [g/mol <sub>ketonu</sub> ]	Kwas/ester	Utl.	Temp. [°C]	Czas [h]	Wyd. <sup>a</sup> [%]	Lit.
1.	Novozyme-435; 225 g/mol <sub>ketonu</sub>	kwas mirystynowy	30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	rt	144	57	[14]
2.	Novozyme-435; 500 g/mol <sub>ketonu</sub>	–	UHP	25	40	44	[15]
3.	Novozyme-435; 50 g/mol <sub>ketonu</sub>	octan etylu	UHP	27	72	95	[16]
4.	CaLB-CLEA; 50 g/mol <sub>ketonu</sub>	octan etylu	50% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	40	48	84 <sup>b</sup>	[19]
5.	CaLB immobilizowana na krzemionce; 20 g/mol <sub>ketonu</sub>	octan etylu	50% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	rt	29	97	[20]

<sup>a</sup> wydajność wyznaczona na podstawie analizy GC.

<sup>b</sup> konwersja wyznaczona na podstawie analizy GC.

Ponieważ, nowo odkryta metoda wymagała udoskonalień, zaledwie trzy lata później ukazała się następna praca. Grupa badawcza Guibé-Jampela postanowiła pójść o krok dalej i sprawdzić, czy istnieje możliwość przeprowadzenia autokatalitycznej reakcji BV wspomaganą przez lipazę B *Candida antarctica* [15].

Badania wstępne wykazały, że bez udziału lipazy reakcja chemo-enzymatycznego utleniania Baeyera-Villigera nie zachodzi. Efekt ten pozwolił wysnuć przypuszczenie, iż nadtlenek wodoru, wspierany obecnością grup karboksylowych pochodzących z bocznych łańcuchów lipazy odpowiedzialny jest za zainicjowanie reakcji BV. Utworzony w ten sposób lakton ulega reakcji hydrolizy pod wpływem działania lipazy oraz nadtlenu wodoru, przekształcając się w odpowiedni nadkwas, który następnie użyty jest jako kolejny czynnik utleniający keton. W ten sposób cykl autokatalityczny zostaje zamknięty (Schemat 3) [15].



Schemat 3. Autokatalityczny schemat chemo-enzymatycznej reakcji BV [15]

Scheme 3. Autocatalytic Baeyer-Villiger reaction [15]

Warto podkreślić, iż w metodzie tej nie stosuje się rozpuszczalnika. Przykładowy proces utleniania 2-metylocykloheksanonu (Tab. 1, poz. 2) prowadzony był w następujący sposób: Novozyme-435 w ilości 500 g/mol<sub>ketonu</sub> mieszało z roztworem wybranego ketonu w eterze dietylowym (0,5–1,0 mol/dm<sup>3</sup>), który następnie usunęto. Do mieszaniny substratu i immobilizowanej w ten sposób lipazy wprowadzany był w jednej porcji jedenastokrotny nadmiar utleniacza.

Autokatalityczny mechanizm nie był jedyną nowością. Modyfikacji poddany został również czynnik utleniający. 30% wodny roztwór nadtlenu wodoru zastąpiono kompleksem nadtlenu wodoru z mocznikiem (UHP), który jest komercyjnie dostępny, stabilny, łagodny i bezpieczny w użyciu.

Uzyskane wyniki dowiodły jednoznacznie, że reakcje prowadzone w bezwodnych warunkach z wykorzystaniem kompleksu UHP przebiegają szybciej oraz pozwalają otrzymać wyższe stopnie konwersji substratów w porównaniu do reakcji, w których czynnikiem utleniającym jest 30% nadtlenek wodoru. W przypadku autokatalitycznego utleniania 2-metylocykloheksanonu otrzymano 6-metylo-ε-kaprolakton z wydajnością 44% po upływie 40 godzin, czyli czas reakcji skrócono o 104 godziny w porównaniu z procedurą opracowaną przez grupę Lemoult [14]. (Tab. 1, poz. 1 i 2). Kolejny przykład, to utlenianie 2-hekso-cykloheksanonu, w którym można było zaobserwować, iż stopień konwersji ketonu po 24 godzinach prowadzenia procesu wynosił 11%, natomiast po 48 godzinach wynosił już 65%. W przypadku wykorzystania nadtlenu wodoru w tych samych przedziałach czasowych stopień konwersji wynosił odpowiednio jedynie 11% i 20%. Przeprowadzone doświadczenia wykazały również stereospecyficzny charakter autokatalitycznej syntezy laktonów, a także ścisłą zależność szybkości reakcji od wielkości oraz umiejscowienia podstawnika w utlenianym związku [15].

Kolejną nowością wprowadzoną do opisywanej metody było użycie octanu etylu w roli prekursora kwasu nadoctowego oraz rozpuszczalnika. [8] Octan etylu wybrany został ze względu na swoje charakterystyczne właściwości, a mianowicie relatywnie niską temperaturę wrzenia, zdolność do rozpuszczania wielu związków organicznych oraz niską toksyczność. Ponownie zastosowano Novozyme-435, którego zadaniem było przekształcenie octanu etylu w kwas nadoctowy w obecności kompleksu UHP, jako utleniacza. Powstały nadkwas jest właściwym czynnikiem utleniającym w reakcji BV i przekształca cykliczne ketony w odpowiednie laktony. Generowany w niniejszej reakcji produkt uboczny, czyli kwas octowy ulega utlenianiu do nadkwasu. Reakcja ta jest również katalizowana przez lipazę.

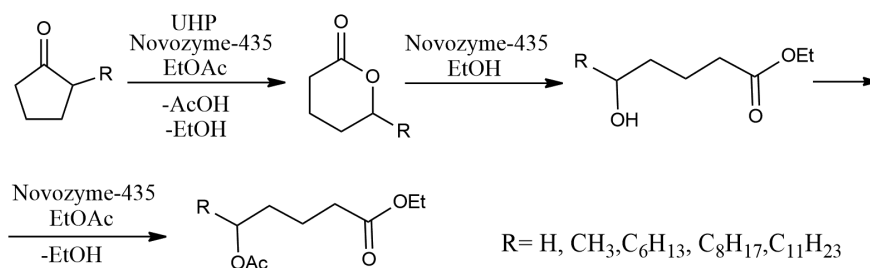
Przeprowadzono szereg optymalizacji, w których badano wpływ ilości enzymu, utleniacza (UHP) oraz rozpuszczalnika na stopień konwersji modelowego 2-fenylcykloheksanonu. Wykazano, że stopniowe zwiększanie ilości preparatu enzymatycznego wpływa na wzrost konwersji ketonu. Jednakże, przekroczenie pewnej wartości nie powoduje wzrostu szybkości reakcji, co świadczy o tym, że reakcja utleniania ketonu jest etapem limitującym szybkość procesu. Dlatego wyznaczono optymalną ilość Novozyme-435 (50 g preparatu na 1 mol ketonu). Zaobserwowano również, że reakcja przebiega wolniej w przypadku, gdy substrat jest bardziej rozcieńczony. Dlatego też na ogół nie stosuje się nadmiaru rozpuszczalnika, a jedynie taką ilość, aby rozpuścić używane reagenty.

Korzystne warunki badanej chemo-enzymatycznej reakcji to: Novozyme-435 w ilości 50g/mol<sub>ketonu</sub>, stężenie ketonu w octanie etylu 0,3 mol/dm<sup>3</sup> oraz dwukrotny nadmiar molowy UHP. Zaobserwowano również, że na szybkość utleniania alkilocykloheksanonów wpływa rodzaj podstawnika znajdującego się w pozycji  $\alpha$  względem grupy karbonylowej ketonu. Jeśli jest to krótki łańcuch allilowy bądź podstawnik fenylowy czy benzylowy, uzyskuje się wyższą wydajność odpowiednich laktonów. W przypadku utleniania 2-metylocykloheksanonu już po 3 dniach prowadzenia reakcji w temperaturze pokojowej można otrzymać produkt z wydajnością 95% (Tab. 1, poz. 3). Natomiast w przypadku, gdy reakcji tej poddawane są alkilocykloheksanony posiadające duży podstawnik znajdujący się w pozycji  $\alpha$  względem grupy karbonylowej, reakcja przebiega wolniej. Związkiem tego typu jest 1-tetralon, z którego dopiero po 15 dniach prowadzenia procesu otrzymano lakton z wydajnością 28%. Omawiana metoda jest wysoce selektywna, nie zaobserwowano żadnych niepożądanych reakcji ubocznych, takich jak np. polimeryzacja z otwarciem pierścienia  $\epsilon$ -kaprolaktonu, hydroliza czy alkoholiza produktów. [16]

Ta sama grupa badawcza już rok później przeprowadziła cykl badań nad chemo-enzymatyczną reakcją utleniania BV cyklopentanonów i podstawionych cyklopentanonów do odpowiednich  $\delta$ -walerolaktonów. [17]

Prowadząc reakcję utleniania w warunkach opracowanych dla alkilocykloheksanonów otrzymano oprócz laktonów również niepożądane produkty uboczne. Reakcja octanu etylu z UHP w obecności Novozyme-435 prowadziła do powstania zarówno kwasu nadoctowego, jak również cząsteczki etanolu (Schemat 4). Kwas nadoctowy łatwo utlenia cyklopentanon do  $\delta$ -walerolaktonu generując równocześnie

śnie kwas octowy, jako produkt uboczny. Powstały w ten sposób  $\delta$ -walerolakton jest zdolny do utworzenia wiązania z centrum aktywnym lipazy z takim samym prawdopodobieństwem jak octan etylu czy kwas octowy, w wyniku czego tworzy się kompleks enzymu z tą cząsteczką. W reakcji octanu etylu bądź kwasu octowego z lipazą zostaje utworzony kompleks enzymu z resztą acylową, następnie nukleofilowy atak etanolu przyczynia się do regeneracji octanu etylu, a nukleofilowy atak nadtlenu wodoru na utworzony ester powoduje wygenerowanie kwasu nadoctowego. Dodatkowo, tak wygenerowany lakton reaguje z łańcuchem bocznym seryny w miejscu aktywnym lipazy tworząc hydroksyester. Doświadczenia te potwierdziły, że  $\delta$ -walerolakton reaguje z lipazą znacznie szybciej niż  $\epsilon$ -kaprolakton. Atak etanolu na kompleks enzymu z  $\delta$ -walerolaktonem może powodować powstanie 5-hydroksypentanianu etylu. Tak utworzony nowy alkohol może również konkurować o atak nukleofilowy na kompleks enzymu z resztą acylową, co pozwala otrzymać 5-acetoksypentanian etylu.



Schemat 4. Reakcja utleniania pochodnych cyklopentanonu w środowisku octanu etylu z zastosowaniem Novozyme-435 oraz kompleksu UHP [17]

Scheme 4. Oxidation of cyclopentanone derivatives in ethyl acetate with Novozyme-435 and UHP [17]

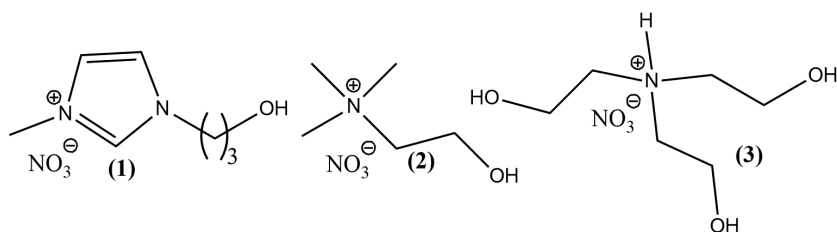
Przeprowadzono również próbę bez użycia enzymu, która wykazała, że reakcja utleniania nie zachodzi. Natomiast reakcja transestryfikacji  $\delta$ -walerolaktonów jest ściśle zależna od ich struktury, podobnie jak przebieg reakcji acylowania wynika bezpośrednio z budowy hydroksyestrów. Badania wykazały, że nowo utworzona cząsteczka  $\delta$ -walerolaktonu reaguje z lipazą i etanolem tworząc hydroksyester. Powstały hydroksyester ulega reakcji acylowania z utworzeniem diestru, który jest głównym produktem reakcji po 7 dniach prowadzenia procesu. W przypadku utleniania 2-metylocyklopentanonu, reakcja BV przebiegała szybciej w porównaniu do niepodstawionego cyklopentanonu, jednak i tym razem głównym produktem zaobserwowanym po 9 dniach prowadzenia reakcji nie był wcale preferowany lakton, lecz hydroksyester (Tab. 2, poz. 2).

W przypadku utleniania 2-*n*-heksylocyklopentanonu, który posiada większą zawadę steryczną, osiągnięto 50% konwersji po 3 dniach prowadzenia procesu. Transestryfikacja powstałego  $\delta$ -walerolaktonu z etanolem przebiegała wyjątkowo powoli, nie zaobserwowano reakcji acetylowania powstałego hydroksyestru.

W celu uniknięcia dalszej reakcji transestryfikacji  $\delta$ -walerolaktonów octan etylu zastąpiono acetonitrylem. Dodano również katalityczne ilości kwasu oktanowego do mieszaniny reakcyjnej. Opracowano korzystne warunki prowadzenia niniejszego procesu: temperatura 60°C, Novozyme-435 w ilości 25g/mol<sub>ketonu</sub>, stężenie ketonu w acetonitrylu 0.3 mol/dm<sup>3</sup> oraz dwukrotny nadmiar molowy UHP (Tab. 2, poz. 2) [17].

Nowe drogi syntezy związków organicznych powinny spełniać wymagania stawiane wymogom 12 zasad „zielonej chemii”. Jednym z istotnych problemów są poszukiwania nowych rozpuszczalników. Ciecze jonowe ze względu na swoje unikalne właściwości takie jak: niemierzalna prężność par, jednoczesna rozpuszczalność związków zarówno organicznych jak i nieorganicznych, czy szeroki zakres, w jakim związki te są cieciami, znalazły już szerokie zastosowanie w syntezie organicznej, jako efektywne rozpuszczalniki [30, 31]. W ostatniej dekadzie można zaobserwować duże zainteresowanie zastosowaniem cieczy jonowych, jako alternatywnych mediów dla reakcji enzymatycznych [32–34]. Wiąże się to przede wszystkim ze wzrostem stabilności oraz aktywności enzymów w ich środowisku. Struktura cieczy jonowych to rozbudowana sieć kationów i anionów powiązanych wiązaniami wodorowymi, które tworzą polarne i niepolarne regiony. Pozwala to na ochronę enzymu. Niezwykle uporządkowanie supramolekularnej budowy cieczy jonowych w fazie ciekłej może działać jak „forma” utrzymująca aktywną strukturę 3-D enzymu w wodnym nano-otoczeniu, a co za tym idzie pozwala uniknąć zmiany struktury czwartorzędowej białka. Dodatkowo po zakończeniu reakcji produkty można w łatwy sposób wydzielić z cieczy jonowej poprzez ekstrakcję za pomocą klasycznego rozpuszczalnika. Enzym pozostaje jednak „uwięziony” w cieczy jonowej. Może być to jeden ze sposobów immobilizacji enzymu, a układ taki można zawracać do kolejnych cykli reakcji [30–34].

Obecnie znana jest tylko jedna publikacja dotycząca zastosowania cieczy jonowych w chemo-enzymatycznej reakcji BV. Ukazała się ona w 2011 roku, kiedy to zespół pod kierownictwem Kotlewskiej do swoich badań zastosował trzy ciecze jonowe posiadające w swojej strukturze anion azotanowy i kationy: 1-metylo-3-(3-hydroksypropylo)-imidazoliowy (1), 2-hydroksyetylotrimetyloamoniowy (2) oraz trietanolamoniowy (3) (Schemat 5), które można zaliczyć do grupy HBD (Hydrogen Bond Donating) [18].



Schemat 5. Struktura cieczy jonowych użytych w chemo-enzymatycznej reakcji BV [18]

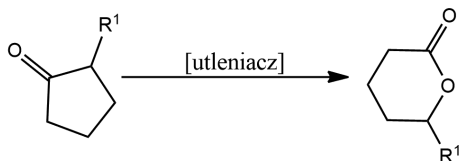
Scheme 5. Structure of ionic liquids used in chemo-enzymatic Baeyer-Villiger reaction [18]

Wybrane do badań cieczy jonowe stabilizują strukturę enzymu, a także zwiększają jego stabilność mechaniczną i termiczną. Najefektywniejsze warunki prowadzenia chemo-enzymatycznej reakcji Baeyera-Villigera w środowisku cieczy jonowej to: temperatura 50°C, Novozyme-435 w ilości 50 g/mol<sub>ketonu</sub>, stężenie ketonu 0,5 mol/dm<sup>3</sup>, dwukrotny nadmiar molowy 50% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz dwukrotny nadmiar kwasu oktanowego. Całkowity czas prowadzenia niniejszej reakcji w temperaturze 50°C wynosił jedynie 5 h.

Użycie cieczy jonowych (1) pozwala na uzyskanie  $\gamma$ -butyrolaktonu z bardzo wysoką wydajnością (99%) (Tab. 2, poz. 3). Jednakże w przypadku utleniania cykloheksanonu uzyskano nieco niższą wydajność laktonu (45%), za to efektywniejszą okazała się ciecz jonowa (2) (62%). Selektywność powstawania praktycznie wszystkich laktonów oscylowała w granicach 99%. Metoda z użyciem cieczy jonowych jest znacznie bardziej efektywna od opracowanej wcześniej przez grupę Olivo [16], gdyż przebiega z o wiele większą szybkością. W przypadku reakcji utleniania cykloheksanonu za pomocą UHP w środowisku octanu etylu dopiero po 6 dniach otrzymano lakton z 80% wydajnością, podczas gdy zastosowanie cieczy jonowej (2) pozwoliło zredukować czas do 5 godzin otrzymując  $\epsilon$ -kaprolakton z nieznacznie niższą wydajnością (62%). Dodatkową zaletą tej metody jest brak produktów ubocznych [18].

Tabela 2. Wyniki utleniania wybranych 2-podstawionych cyklopentanonów do odpowiednich  $\delta$ -walerolaktonów [14–20]

Table 2. The results of the oxidation of various 2-substituted cyclopentanones to the corresponding  $\delta$ -valerolactones [14–20]



Lp.	Preparat enzymatyczny, ilość [g/mol <sub>ketonu</sub> ]	Kwas/ester	Utl.	R <sup>1</sup>	Temp. [°C]	Czas [h]	Wyd. <sup>a</sup> [%]	Lit.
1.	Novozyme-435; 225 g/mol <sub>ketonu</sub>	kwas mirystynowy	30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	rt	144	73	[14]
				C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>			64	
				C <sub>11</sub> H <sub>23</sub>			66	
2.	Novozyme-435; 25 g/mol <sub>ketonu</sub>	octan etylu	UHP	CH <sub>3</sub>	rt	48	48	[17]
		kwas oktanowy				96	47	
						144	23	
		40			24	52 <sup>b</sup>		
		60				73 <sup>b</sup>		
3.	Novozyme-435; 50 g/mol <sub>ketonu</sub>	kwas oktanowy	50% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H	50	5	99	[18]

Lp.	Preparat enzymatyczny, ilość [g/mol <sub>ketonu</sub> ]	Kwas/ester	Utl.	R <sup>1</sup>	Temp. [°C]	Czas [h]	Wyd. <sup>a</sup> [%]	Lit.
4.	CaLB-CLEA; 50 g/mol <sub>ketonu</sub>	octan etylu	50% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H	40	48	88 <sup>b</sup>	[19]
5.	CaLB immobilizowana na krzemionce; 20 g/mol <sub>ketonu</sub>	octan etylu	50% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H	rt	6	35 <sup>c</sup>	[20]

<sup>a</sup> wydajność wyznaczona na podstawie analizy GC.

<sup>b</sup> konwersja wyznaczona na podstawie analizy GC.

<sup>c</sup> analiza NMR mieszaniny reakcyjnej potwierdziła tworzenie się hydroksykwasu.

Zespół pod kierownictwem Mamo w 2013 roku opublikował badania dotyczące zastosowania lipazy w formie usieciowanych agregatów lipazy (CaLB-CLEA) w chemo-enzymatycznej reakcji BV. [19] Otrzymywanie tego typu biokatalizatorów polega na wytrąceniu cząsteczek enzymów z roztworu oraz potraktowaniu ich bifunkcyjnym czynnikiem sieciującym, takim jak aldehyd glutarowy. Zaletą stosowania takiego rozwiązania jest fakt, że tak przygotowane preparaty CaLB-CLEA nie ulegają wymywaniu w środowisku wodnym.

We wspomnianej powyżej pracy opisano wyniki badań, w których przetestowano wpływ struktury prekursora nadkwasu, jego stężenia oraz stężenia ketonu na aktywność enzymatyczną preparatu CaLB-CLEA. Dodatkowo porównano jego działanie do Novozyme-435. Wstępnie przetestowano szereg estrów, jako prekursorów utleniaczy w reakcji utleniania cykloheksanonu do  $\epsilon$ -kapolaktonu. Zauważono, że wszystkie stosowane estry z wyjątkiem estrów alkoholu amylowego pozwalają na uzyskanie zadowalających konwersji ketonów, a najlepsze wyniki uzyskano dla propionianu etylu.

W dalszych badaniach nowy biokatalizator użyto w procesie utleniania różnych cyklicznych ketonów o zróżnicowanym rozmiarze pierścienia i różnych podstawnikach w pierścieniu. Podobnie jak we wcześniejszych publikacjach, także tutaj zauważono, że im mniejszy jest pierścień, tym szybciej ulega utlenieniu. Najwyższą konwersję uzyskano dla cyklopentanonu (88%) (Tab. 2, poz. 4), natomiast nie zaobserwowano produktów utlenienia w przypadku reakcji z cyklooktanonem. Wykazano również, że najszybciej proces utleniania zachodzi dla cyklicznych ketonów podstawionych w pozycji 2 pierścienia. Najsłabsze wyniki uzyskano natomiast dla cyklicznych ketonów podstawionych w pozycji 3 pierścienia względem grupy karbonylowej.

Na koniec postanowiono zbadać wpływ składników mieszaniny reakcyjnej na aktywność enzymatyczną nowych biokatalizatorów. Wykazano, że podwyższenie stężenia ketonu nie powoduje obniżenia aktywności enzymu. Niezależnie od ilości stosowanego cykloheksanonu, wydajność uzyskanego laktonu wahała się w niewielkim zakresie od 69–77%. Dużo większy wpływ na stabilność enzymu miało stężenie nadtlenu wodoru. Zauważono mianowicie, że zastosowanie wyższych stężeń ( $> 0,8 \text{ mol/dm}^3$ ) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prowadzi do dezaktywacji preparatu białkowego



poprzez utlenianie aminokwasów i zrywanie mostków disiarczkowych enzymu. Wykazano, że powstający jako produkt uboczny kwas octowy ma również negatywny wpływ na stabilność enzymu. Wzrastające stężenie kwasu skutkuje bowiem zakwaszeniem środowiska reakcji, a co za tym idzie, zmianami konformacyjnymi enzymu co wpływa na jego dezaktywację. Korzystne warunki badanej metody to: Novozyme-435 w ilości 50 g/mol<sub>ketonu</sub>, stężenie ketonu w octanie etylu 0,5 mol/dm<sup>3</sup> oraz dwukrotny nadmiar molowy UHP lub H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Autorzy publikacji argumentują, że zastosowanie sieciowanych agregatów enzymatycznych pozwala na uzyskanie porównywalnych wyników jak w przypadku stosowania Novozyme-435 [19].

Zespół pod kierownictwem Chavez w 2014 roku zaprezentował nieco zmodyfikowaną metodę dla chemo-enzymatycznej reakcji BV również z zastosowaniem sieciowanych agregatów enzymatycznych. Tym razem użyto jednak perhydrolazy, którą wykorzystano do generowania nadkwasu *in situ* z dioctanu glikolu etylenowego [21]. Jak zaobserwowano, w tym przypadku najlepsze warunki procesu utleniania cykloheksanonu to czterokrotny nadmiar molowy utleniacza oraz stężenie ketonu w odpowiednim rozpuszczalniku 0,05 mol/dm<sup>3</sup>. Dodatkowo wpływ użytego rozpuszczalnika okazał się nie bez znaczenia dla niniejszej metody. Wydajności uzyskane dla reakcji w rozpuszczalnikach organicznych były niskie i wynosiły 30, 17 i 10% odpowiednio dla octanu etylu, toluenu i eteru metylowo *tert*-butylowego. Dużo wyższą wydajność, bo aż 63% udało się uzyskać dla reakcji prowadzonej w buforze fosforanowym. Są to jak do tej pory jedyne doniesienia dotyczące utleniania ketonów do laktonów w środowisku wodnym.

Tak więc zastosowanie usieciowanego agregatu enzymatycznego perhydrolazy jest kolejnym kamieniem milowym na drodze do stworzenia zielonej metody syntezy laktonów [21].

Kolejne wyzwania, takie jak obniżenie relatywnie długiego czasu procesu, podwyższenie stabilności lipazy w obecności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zostały podjęte przez zespół badawczy Chrobok w kolejnej pracy dotyczącej chemo-enzymatycznej reakcji BV z 2013 roku [20]. Enzym CaLB został unieruchomiony na mezoporowatym materiale krzemionkowym o zmodyfikowanej powierzchni. Do immobilizacji wykorzystano mezoporowaty nośnik krzemionkowy typu MH (rozdrobiony monolit) oraz materiał SBA-15, który jest nośnikiem proszkowym. Materiały te poddano modyfikacji różnymi hydrofobowymi grupami, takimi jak: metylowa, oktylowa bądź heksadecylowa. Na tak sfunkcjonalizowane nośniki naniesiono lipazę B *Candida antarctica* (75–198 mg/g nośnika).

Nowe biokatalizatory zastosowano w chemo-enzymatycznej reakcji BV utleniania cyklicznych ketonów do laktonów za pomocą wygenerowanego *in situ* z octanu etylu kwasu nadoctowego. Przeprowadzono cykl badań, w których użyto 2-metylocykloheksanonu w roli modelowego substratu. Korzystne warunki prowadzenia procesu to: temperatura 40°C, ilość lipazy CaLB immobilizowanej na krzemionce 20 g/mol<sub>ketonu</sub>, stężenie ketonu w octanie etylu 0,3 mol/dm<sup>3</sup> oraz dwukrotny nadmiar molowy 60% wodnego roztworu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tab. 1, poz. 5; Tab. 2, poz. 5). Stwierdzono, że najefektywniejszym katalizatorem jest katalizator oparty na matrycy MH



modyfikowanej grupą metylową. Zaobserwowano, że matryce zmodyfikowane grupami heksadecylowymi oraz oktylowymi są mocniej obciążone białkiem. W takim wypadku enzymy mają tendencję do agregacji, co utrudnia dostęp reagentów do miejsc aktywnych enzymu a tym samym źle wpływa na jego aktywność.

Badania wykazały, że nowe biokatalizatory są trzy krotnie aktywniejsze od Novozyme-435. Już po 28 h otrzymano produkt 6-metylo- $\epsilon$ -kaprolakton z wydajnością 99%. Prowadząc utlenianie 2-metylocykloheksanonu w tych samych warunkach w obecności Novozyme-435 otrzymano lakton z wydajnością 80% po upływie 50 h.

Ukoronowaniem badań były nieopisane dotychczas w literaturze z tego zakresu próby zawrotu biokatalizatorów. Wykazano, że nowe biokatalizatory są wysoce aktywne nawet w obecności 60% roztworu nadtlenu wodoru, który pozwala na skrócenie czasu reakcji o 8 h w temperaturze pokojowej. Co więcej, mogą one być ponownie wykorzystane, co najmniej pięć razy przy stosunkowo niewielkiej utracie masy oraz aktywności biokatalizatora. Wydajność reakcji utleniania 2-metylocykloheksanonu w każdym z pięciu cykli praktycznie nie ulegała zmianie i kształtuje się na poziomie 99% [20].

## PODSUMOWANIE

W pracy zamieszczono doniesienia literaturowe opisujące badania nad chemo-enzymatyczną reakcją BV, które są prowadzone od 1995 roku. Chemo-enzymatyczna wersja reakcji BV nie wymaga stosowania drogich oraz niebezpiecznych nadkwasów organicznych i potencjalnie może w przyszłości znaleźć zastosowanie w przemyśle zastępując stosowane dotychczas metody wykorzystujące stechiometryczne ilości niebezpiecznych nadkwasów.

W powyższych pracach, jako prekursorzy nadkwasów wykorzystano: kwasy, takie jak mirystynowy lub oktanowy w dwukrotnym nadmiarze, równomolowo lub w ilościach katalitycznych w stosunku do ketonu lub octanu etylu jako rozpuszczalnik i reagent. W roli utleniacza stosowano 30%, 50% bądź 60% wodny roztwór  $H_2O_2$  lub kompleks nadtlenu wodoru z mocznikiem zazwyczaj w dwukrotnym nadmiarze w stosunku do ketonu. Ilość stosowanego biokatalizatora mieściła się w przedziale od 500–20 g/mol<sub>ketonu</sub>. Procesy zwykle prowadzone były w temperaturze pokojowej, a wymagany czas prowadzenia reakcji sięgał nawet do kilku dni.

Opracowana metoda pozwala na otrzymanie szerokiej gamy laktonów z wysoką wydajnością. Dodatkowe atuty tej metody to łagodne warunki prowadzenia reakcji oraz możliwość zawrotu katalizatora. Dodatkowo lipaza, jako białko, jest całkowicie biodegradowalna, co upraszcza problem utylizacji zużytego biokatalizatora. Jest to doskonały przykład zielonej syntezy organicznej, przyjaznej dla środowiska, niegenerującej znacznych ilości odpadów. Chemo-enzymatyczna metoda jest również zdecydowanie tańsza od metody enzymatycznej, gdyż w przeciwieństwie do kosztownych monoooksygenaz lipaza B *Candida antarctica* nie wymaga stosowania drogich kofaktorów w reakcji.

Obniżenie czasów prowadzenia reakcji oraz nadmiarów reagentów oraz dalsze zwiększanie aktywności i stabilności biokatalizatora to wyzwania, które zachęcają do kontynuacji badań nad niniejszym problemem.

Niniejsza praca była finansowana przez Narodowe Centrum Nauki, Grant numer nr UMO-2013/09/N/ST8/02059.

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A. von Baeyer, V. Villiger, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1899, **32**, 3625.
- [2] W. von E. Doering, E. Dorfman, J. Am. Chem. Soc., 1953, **75**, 5595.
- [3] G. Strukul, Angew. Chem. Int. Ed., 1998, **37**, 1198.
- [4] M. Renz, B. Meunier, Eur. J. Org. Chem., 1999, **4**, 737.
- [5] G.J. Ten Brink, I.W.C.E. Arends, R.A. Sheldon, Chem. Rev., 2004, **104**, 4105.
- [6] M. Snowden, A. Bermudez, D.R. Kelly, J.L. Radkiewicz-Poutsma, J. Org. Chem., 2004, **69**, 7148.
- [7] G.E. Turfitt, Biochem. J., 1948, **42**, 376.
- [8] J.D. Stewart, Curr. Org. Chem. 1998, **2**, 195.
- [9] M.D. Mihovilovic, G. Chen, S. Wang, B. Kyte, F. Rochon, M.M. Kayser, J.D. Stewart, J. Org. Chem. 2001, **66**, 733.
- [10] M.D. Mihovilovic, Curr. Org. Chem. 2006, **10**, 1265.
- [11] M.D. Mihovilovic, F. Rudroff, B. Grötzl, J. Mol. Catal. B: Enzym., 2006, **39**, 135.
- [12] N.M. Kamerbeek, D.B. Janssen, W.J.H. van Berkel, J.M. Fraaije, Adv. Syn. Catal., 2003, **345**, 667.
- [13] D. Sheng, D.P. Ballou, V. Massey, Biochem., 2001, **40**, 11156.
- [14] S.C. Lemoult, P.F. Richardson, S.M. Roberts, J.Chem. Soc. Perkin Trans., 1995, **1**, 89.
- [15] B.K. Pchelka, M. Gelo-Pujic, E. Guibé-Jampel, J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1998, **1**, 2625.
- [16] M.Y. Rios, E. Salazar, H. F. Olivo, Green Chem., 2007, **9**, 459.
- [17] M.Y. Rios, E. Salazar, H.F. Olivo, J. Mol. Catal. B, 2008, **54**, 61.
- [18] A.J. Kotlewska, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, I.W.C.E. Arends, Green Chem., 2011, **13**, 2154.
- [19] G. Chavez, R. Hatti-Kaul, R.A. Sheldon, G. Mamo, J. Mol. Catal. B, 2013, **89**, 67.
- [20] A. Drożdż, A. Chrobok, S. Baj, K. Szymańska, J. Mrowiec-Białoń, A.B. Jarzębski, Appl. Catal. A, 2013, **467**, 163.
- [21] G. Chavez, J.-A. Rasmussen, M. Janssen, Top. Catal., 2014, **57**, 349.
- [22] C.R. Johnson, S.J. Bis, Tetrahedron Lett., 1992, **33**, 48, 7287.
- [23] F. Theil, F. Björkling, Biotechnol. Lett., 1993, **15**, 6, 605.
- [24] J. Uppenberg, M. Trier Hansen, S. Patkar, Structure, 1994, **2**, 293.
- [25] J. Uppenberg, Biochem., 1995, **34**, 16838.
- [26] B.C. Koops, E. Papadimou, Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, **52**, 791.
- [27] O. Kirk, M. Würtz Christensen, Org. Process Res. Dev., 2002, **6**, 446.
- [28] F. Bjoerkling, S.E. Godtfredsen, O. Kirk, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1990, **19**, 1301.
- [29] G.D. Yadav, K. Manjula Devi, Biochem. Eng. J., 2002, **10**, 93.
- [30] P. Lozano, Green Chem., 2010, **12**, 555.
- [31] T. Payagala, D.W. Armstrong, Chirality, 2012, **24**, 17.
- [32] H. Olivier-Bourbigou, L. Magna, D. Morvan, Appl. Cat. A, 2010, **373**, 1.
- [33] H. Zhao, J. Chem. Technol. Biotechnol., 2010, **85**, 891.
- [34] Z. Yang, W. Pan, Enzyme Microb. Technol., 2005, **37**, 19.