WIADOMOŚCI *chemiczne* 2014, **68**, 9-10
PL ISSN 0043-5104

ENANCJOSELEKTYWNA ENZYMATYCZNA DESYMETRYZACJA KATALIZOWANA OKSYDOREDUKTAZAMI. DEHYDROGENAZY W REAKCJI REDUKCJI – CZĘŚĆ I

ENANTIOSELECTIVE ENZYMATIC DESYMMETRIZATION CATALYZED BY OXIDOREDUCTASES. DEHYDROGENASES IN REDUCTION REACTIONS – PART I

Renata Kołodziejska*[1], Aleksandra Karczmarska-Wódzka*[1], Agnieszka Tafelska-Kaczmarek[2], Renata Studzińska[3], Marcin Wróblewski[1], Beata Augustyńska[1]

[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. Mechanizm enzymatycznej redukcji dehydrogenazami
2. Przykłady enzymatycznej reakcji desymetryzacji związków karbonylowych; 2.1. Enzymatyczna reakcja redukcji prostych ketonów mikroorganizmami lub komórkami roślinnymi; 2.2. Enzymatyczna reakcja redukcji prostych ketonów izolowanymi reduktazami; 2.3. Enzymatyczna reakcja redukcji karbonylowych związków azotu 2.4. Enzymatyczna reakcja redukcji ketonów acetylenowych
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 Kołodziejska, 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 modyfikowanych 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

Enzymes act as biocatalysts whether are also mediating in all anabolic and catabolic pathways, playing an extremely important role in the cells of all life forms. Catalytic potential of oxidoreductases is most commonly used in reduction reactions. Dehydrogenases and reductases catalyze the reversible desymmetrization reactions of meso and prochiral carbonyl compounds and alkenes. The oxidoreductase-catalyzed reactions require cofactors to initiate catalysis. In most cases, it is nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) or its phosphorylated derivative (NADPH), which acts as a hydride donor. The necessity of employing expensive cofactors was, for the long time, one of the main limitations to the use of dehydrogenases. This problem was solved by developing a regeneration system of a cofactor in the reaction environment. Various systems are used for the cofactor recycling. In the case of a carbonyl compound reduction, an irreversible oxidation of formic acid to carbon dioxide is most frequently used. In this paper, selected examples of whole-cell and isolated enzymes applications in the carbonyl compound reduction are discussed. The application of baker's yeast, microorganisms and dehydrogenases in enantioselective enzymatic desymmetrization (EED) of prochiral ketones leads to a broad spectrum of chiral alcohols used as intermediates in the syntheses of many pharmaceuticals and compounds presenting a potential biological activity.

Keywords: asymmetric reduction, alcohol dehydrogenase, cofactor
Słowa kluczowe: asymetryczna redukcja, dehydrogenaza alkoholowa, kofaktor

WPROWADZENIE

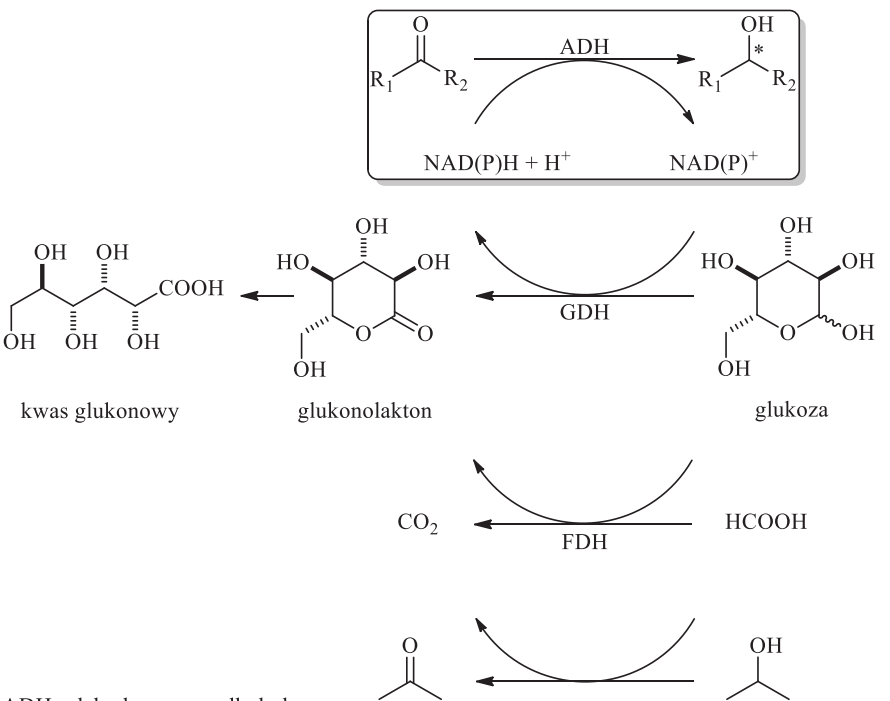
Enzymy działające jako biokatalizatory uczestniczą, czy też pośredniczą we wszystkich szlakach anabolicznych oraz katabolicznych, odgrywając niezwykle ważną rolę w komórkach organizmów żywych. W celu uregulowania i ujednoznacznienia nazewnictwa enzymów, Komitet Nazewnictwa (ang. *Nomenclature Committee*) Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (ang. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) w latach 1956–1972 opracował dla nich nomenklaturę naukową – numer EC. Według niej, każdy enzym jest opisany przez ciąg czterech segmentów cyfr, oddzielonych od siebie kropką, poprzedzonych literami „EC" (*Enzyme Commission* lub *Enzyme Catalogue*): EC x.xx.xx.xx. Pierwsza cyfra dzieli enzymy, według mechanizmu reakcji przez nie katalizowanych, na sześć głównych klas: ketonów. Białko to występuje bardzo powszechnie w komórkach bakterii, grzybów, zwierząt i roślin. U grzybów i u ludzi w miejscu aktywnym tego enzymu

	Nazwa	Ilość	Sposób i zakres działania
1.x.x.x	Oksydoreduktazy	258	katalizują reakcje redoks
2.x.x.x	Transferazy Transaminazy	133	przenoszą grupy funkcyjne
3.x.x.x	Hydrolazy	780	katalizują hydrolizę różnych wiązań
4.x.x.x	Liazy	71	rozcinają różne wiązania na drodze innej niż hydroliza czy utlenianie
5.x.x.x	Izomerazy	28	katalizują zmiany izomeryczne cząsteczek
6.x.x.x	Ligazy	8	katalizują powstawanie wiązań chemicznych pomiędzy cząsteczkami, zużywając do tego energię pochodzącą z hydrolizy ATP

W pracy tej omówiono enzymatyczne metody enancjoselektywnych transformacji prochiralych związków karbonylowych do odpowiednich chiralnych alkoholi. Enzymy, które katalizują asymetryczne reakcje redukcji nazywane są dehydrogenazami alkoholowymi (ADH) lub ketoreduktazami (KRED). Klasyfikuje się je jako enzymy klasy 1.1.x.x (EC 1.1.x.x) [1]. Dehydrogenaza alkoholowa (EC 1.1.1.1) katalizuje reakcje redukcji związków karbonylowych do odpowiednich alkoholi oraz reakcje utleniania przekształcające alkohole do odpowiadających im aldehydów lub ketonów. Białko to występuje bardzo powszechnie w komórkach bakterii, grzybów, zwierząt i roślin. U grzybów i u ludzi w miejscu aktywnym tego enzymu znajduje się atom cynku, u bakterii zawiera żelazo, a u owadów enzym ten nie zawiera żadnego metalu.

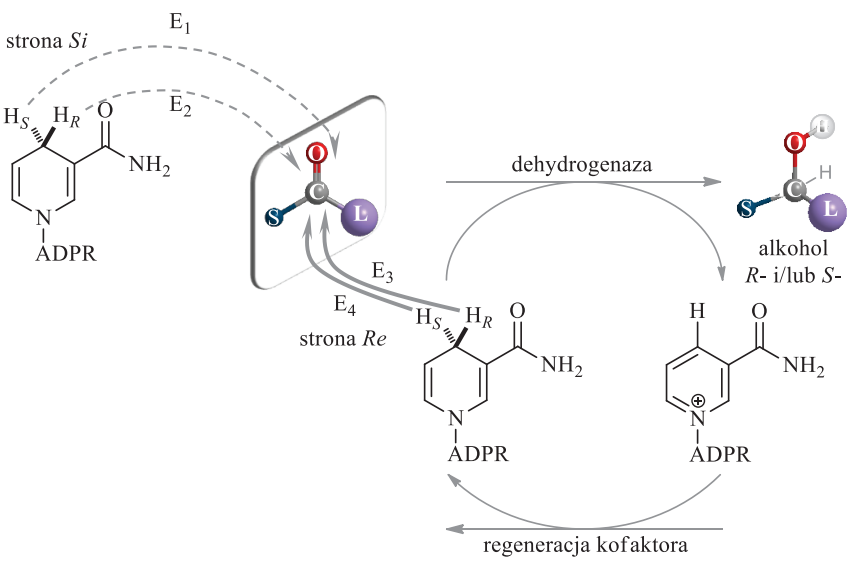
1. MECHANIZM ENZYMATYCZNEJ REDUKCJI DEHYDROGENAZAMI

Potencjał katalityczny oksydoreduktaz wykorzystuje się najczęściej w reakcjach redukcji. Dehydrogenazy i reduktazy katalizują odwracalne reakcje desymetryzacji *mezo*- i prochiralnych związków karbonylowych i alkenów. Reakcje katalizowane oksydoreduktazami wymagają obecności kofaktorów. W przypadku dehydrogenaz jest to zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NADH) lub jego fosforan (NADPH). NADH oraz NADPH pełnią formalnie rolę donora anionu wodorkowego. Konieczność stosowania bardzo drogich kofaktorów przez długi czas, było jednym z głównych argumentów przemawiających przeciwko stosowaniu dehydrogenaz. Problem ten został rozwiązany przez opracowanie systemu prowadzącego do regeneracji kofaktora w środowisku reakcji. Do regenerowania kofaktora stosowane są różne układy. W przypadku redukcji grupy karbonylowej, najlepiej sprawdza się reakcja nieodwracalnego utleniania mrówczanu do tlenku węgla(IV), którą katalizuje dehydrogenaza mrówczanowa. Układy regenerujące zostały przedstawione na Schemacie 1.



Schemat 1. Układy regenerujące kofaktor
Scheme 1. Cofactor regeneration systems

Reakcja redukcji związków karbonylowych za pomocą dehydrogenazy alkoholowej zachodzi przez przeniesienie jednego z diastereotopowych atomów wodoru pierścienia dihydropirydynowego koenzymu (w postaci jonu wodorkowego) do określonego lica wiązania C=O. W cząsteczce kofaktora w pozycji 2 znajdują się dwa równocenne atomy wodoru. W momencie ataku jeden atom wodoru, w postaci jonu wodorkowego, ulega przyłączeniu do karbonylowego atomu węgla, drugi natomiast jako proton atakuje atom tlenu. Atak następuje od strony *si* lub *re* na atom węgla o hybrydyzacji sp^2 w grupie karbonylowej przez jon wodorkowy pro-*S* (H_S) lub pro-*R* (H_R) kofaktora (NAD(P)H) (Schemat 2). W etapie E1 i E2 następuje atak od przodu (od strony *si*), natomiast w E3 i E4 atak zachodzi od tyłu (od strony *re*) [2]. Dehydrogenazy mogą przenosić selektywnie jon wodorkowy pro-*S* lub pro-*R* na węgiel karbonylowy ze strony *si* lub *re*. Dehydrogenazy alkoholowe z *Pseudomonas sp*., *Lactobacillus kefir*, drożdży piekarskich, wątroby końskiej oraz *Moraxella sp*. przenoszą jon wodorkowy pro-*R*, z tą jednak różnicą, że w przypadku dwóch pierwszych dehydrogenaz atak następuje na lico *si* (E1), w przypadku pozostałych na lico *re* (E3). Dehydrogenaza glicerolowa z *Geotrichum candidum* oraz reduktaza dihydroksyacetonowa z *Mucor javanicus* selektywnie przenoszą jon wodorkowy pro-*S* na lico *si* (E2) [1].



Schemat 2. Mechamizm regio- i stereoselektywnego przeniesienia jonu wodorkowego z kofaktora NAD(P)H na karbonylowy atom węgla

Scheme 2. Mechanism of the regio- and stereoselective hydride transfer from the cofactor NAD(P)H to the carbonyl carbon atom

Kofaktory, często stosowane w ilościach katalitycznych, można regenerować *in situ*. Najczęściej jednak w syntezie organicznej używa się całych komórek mikroorganizmów, komórki/tkanki roślinne i zwierzęce.

2. PRZYKŁADY ENZYMATYCZNEJ REAKCJI DESYMETRYZACJI ZWIĄZKÓW KARBONYLOWYCH

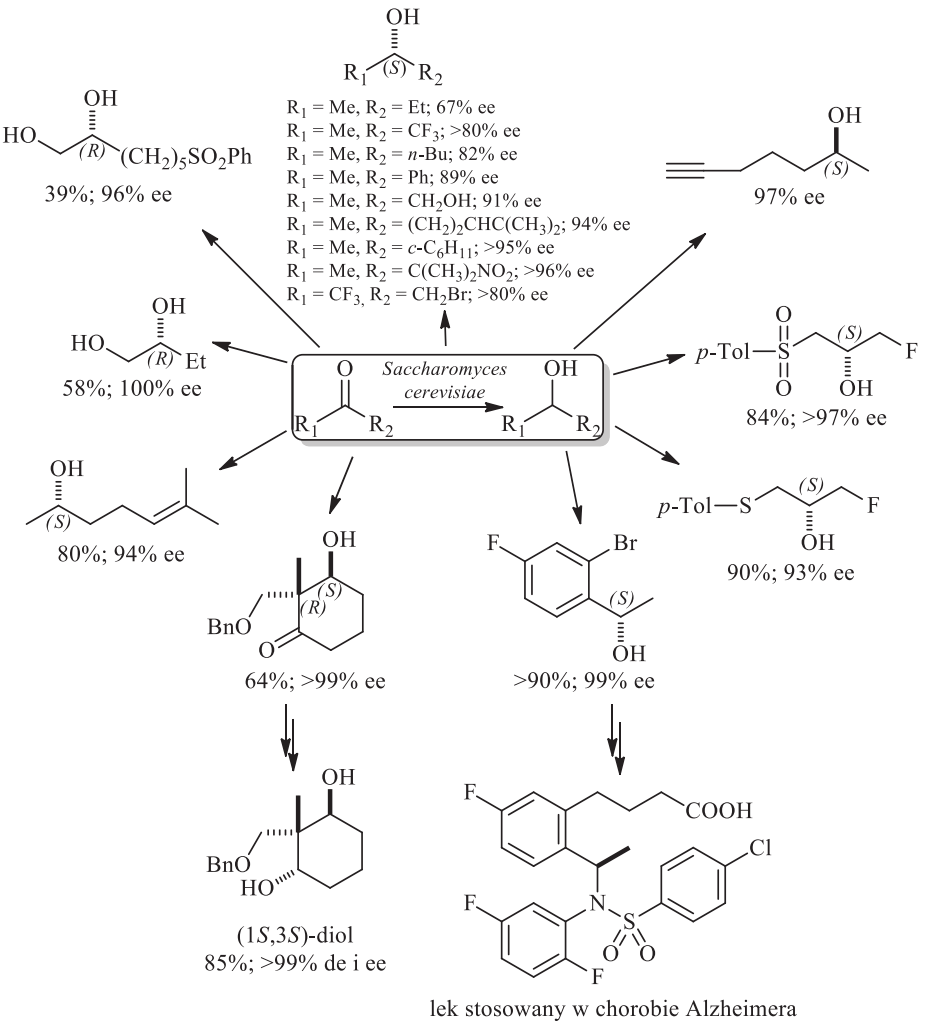
2.1. ENZYMATYCZNA REAKCJA REDUKCJI PROSTYCH KETONÓW MIKROORGANIZMAMI LUB KOMÓRKAMI ROŚLINNYMI

Do asymetrycznej redukcji związków karbonylowych powszechnie używanym mikroorganizmem są drożdże piekarskie *Saccharomyces cerevisiae*. Głównie ze względu na nieograniczoną dostępność, niską cenę oraz łatwość hodowli. Szeroki zakres działania drożdży piekarskich jest uwarunkowany obecnością wielu dehydrogenaz, jak również dużą tolerancją substratową. Jednak dehydrogenazy zawarte w mikroorganizmie posiadają najczęściej różne preferencje stereochemiczne. W konsekwencji może to prowadzić do zmniejszenia czystości optycznej uzyskanego produktu. Istnieje wiele sposobów, które umożliwiają usunięcie niekompatybilności enzymatycznej. Na przykład, selektywne wyłączenie przeszkadzającego biokatalizatora, zmiana stężenia i struktury substratów, zastosowanie rozpuszczalnika organicznego, liofilizacja i immobilizacja mikroorganizmu oraz modyfikacje genetyczne.

Reakcje w obecności drożdży, można przeprowadzić zarówno w środowisku wodnym, jak również w rozpuszczalnikach organicznych. W warunkach fermentacyjnych żywe komórki syntetyzują i regenerują enzymy i kofaktory. Tę metodę zastosować można tylko do wąskiej grupy substratów rozpuszczalnych w wodzie.

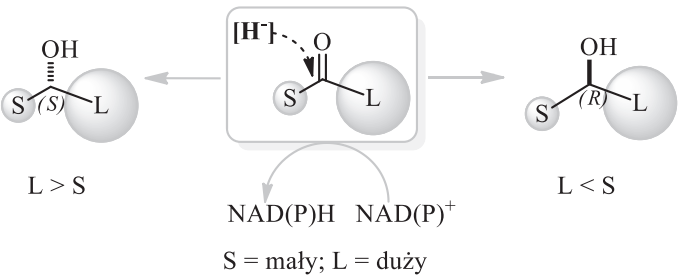
Obok drożdży piekarskich, w asymetrycznej syntezie, wykorzystuje się potencjał katalityczny enzymów zawartych w innych mikroorganizmach. Na przykład, w innych drożdżach *Rhodotorula rubra*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces ontanus*, *Rhodotorula glutinis*, *Zygosaccharomyces balii*, bakteriach *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus fermentum*, *Corynebacterium* lub w całych komórkach roślinnych takich jak marchwi zwyczajnej (*Daucus carota*), bielunia dziędzierzawy (*Datura stramonium*). Najlepsze rezultaty w bioredukcji, głównie jeśli chodzi o czystość optyczną uzyskanych produktów, dają wyizolowane enzymy. Aspekt ekonomiczny, w wielu przypadkach, powoduje że większość syntez w obecności wyizolowanych enzymów nie opuszcza stołu laboratoryjnego. Syntezy tanie i łatwe w wykonaniu chętniej wykorzystuje się w procesach biotechnologicznych. Zastosowanie drożdży piekarskich w enancjoselektywnej enzymatycznej desymetryzacji (EED) prochiralnych ketonów prowadzi do otrzymania całej gamy chiralnych alkoholi. Mogą one stanowić cenne półprodukty w syntezie farmaceutyków, czy innych związków chemicznych o potencjalnym działaniu biologicznym.

Na schemacie 3 przedstawiono niektóre przykłady zastosowania drożdży w asymetrycznej syntezie chiralnych alkoholi drugorzędowych, otrzymanych w wyniku redukcji alifatycznych, aromatycznych, alifatyczno-aromatycznych i cyklicznych ketonów [3–9].



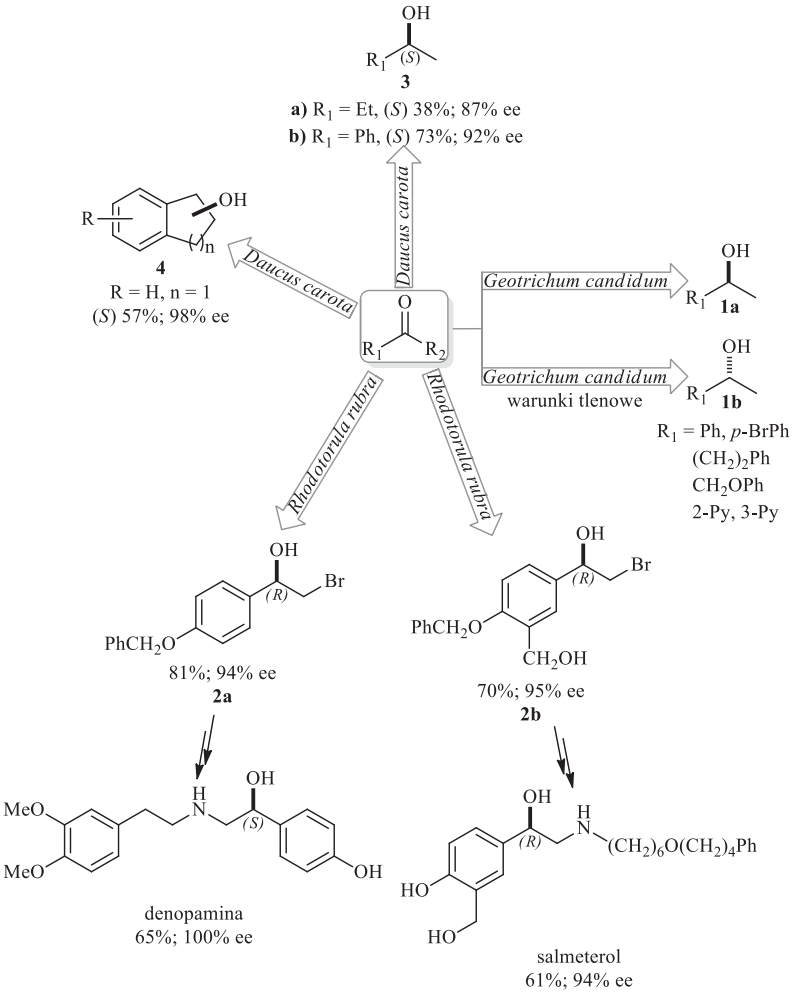
Schemat 3. EED prochiralnych ketonów wobec drożdży piekarskich
Scheme 3. EED of prochiral ketones via baker's yeast

Stereochemia produktu redukcji w przypadku prostych ketonów określona jest regułą Preloga. Jon wodorkowy atakuje karbonylowy atom węgla od strony *re*. Z tego powodu w warunkach fermentacyjnych w obecności drożdży najczęściej otrzymuje się alkohole o konfiguracji (*S*), o ile podstawnik mniejszy objętościowo jest mniej ważny od podstawnika dużego objętościowo (S < L). [10] Jeśli pierwszeństwo ulegnie zmianie (jak na przykład w hydroksyketonach), to w obecności drożdży, w wyniku ataku na lico *re* powstaje enancjomer o konfiguracji (*R*) (Schemat 4) [11, 12].



Schemat 4. Stereochemia produktu podczas redukcji enzymatycznej
Scheme 4. Stereochemistry of the product in the enzymatic reduction

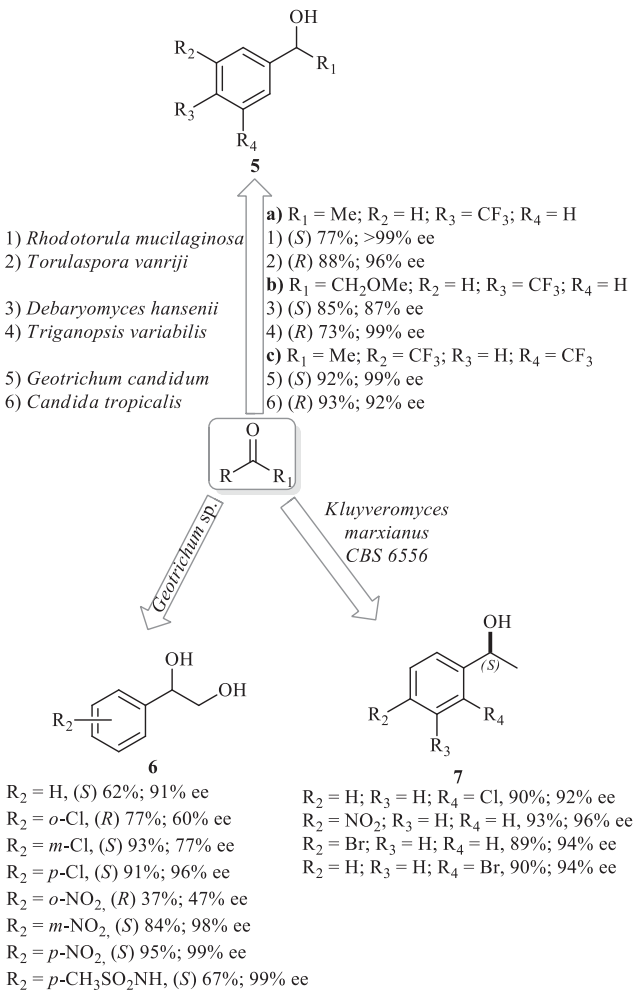
Skuteczność katalizy mikroorganizmami jest w dużym stopniu uwarunkowana budową substratu. Drożdże piekarskie nie reagują z małymi alifatycznymi ketonami, za wyjątkiem ketonów metylowych zawierających również alifatyczną resztę węglowodoru długołańcuchowego. Istotne jest, aby podstawniki przy karbonylowym atomie węgla różniły się wielkością, wtedy przeprowadzenie selektywnej katalizy jest możliwe [13]. Jednym z mikroorganizmów, który umożliwia selektywną redukcję najprostszych alifatycznych ketonów (na przykład pentan-2-onu, butan-2-onu, heksan-3-onu) jest grzyb *Geotrichum candidum*. Podobnie jak w przypadku drożdży piekarskich uzyskuje się alkohole o konfiguracji (*S*) (Schemat 5, **1a**). Zastosowanie tego samego mikroorganizmu z dodatkiem adsorbenta polimerowego Amberlit XAD-7, w reakcji innych ketonów aromatyczno-alifatycznych z dostępem tlenu atmosferycznego, prowadzi do alkoholu o konfiguracji (*R*) (Schemat 5, **1b**). Natomiast w warunkach beztlenowych otrzymano enancjomer o konfiguracji przeciwnej. Prawdopodobnie tlen atmosferyczny utlenia selektywnie (*S*)-alkohol do odpowiedniego ketonu, ponieważ proces ten, w przeciwieństwie do redukcji prowadzącej do (*R*)-enancjomeru, jest odwracalny [14]. Bromoalkohole o konfiguracji (*R*) otrzymano w reakcji redukcji mikroorganizmem *Rhodotorula rubra* z wysoką wydajnością i enancjoselektywnością. Najlepsze rezultaty uzyskano z zastosowaniem siarczanu laurylu jako środka powierzchniowo czynnego, w warunkach beztlenowych (w atmosferze argonu). Związki **2a** i **2b** (Schemat 5) używane są jako półprodukty w syntezie denopaminy i salmeterolu [15, 16]. Całe komórki korzenia marchwi (*Daucus carota*) również z powodzeniem stosowane są w bioredukcjach. Jest to nie tylko tania metoda, ale również bardzo skuteczna. Za pomocą dehydrogenaz zawartych w komórkach *D. carota* można redukować ketony alifatyczne, alifatyczno-aromatyczne, jak również cykliczne nie tylko z dobrą wydajnością, ale przede wszystkim selektywnie (Schemat 5, **3**, **4**). W każdym przypadku uzyskano produkty o konfiguracji (*S*) [17].



Schemat 5. Selektywna redukcja ketonów alifatycznych
Scheme 5. Selective reduction of aliphatic ketones

Trifluorometylopodstawione aromatyczno-alifatyczne ketony redukowano w obecności różnych mikroorganizmów otrzymując alkohole drugorzędowe o różnej konfiguracji absolutnej w zależności od użytego preparatu enzymatycznego. Otrzymane produkty **5** mają zastosowanie w farmakologii (Schemat 6). Związki **5a** i **b** są stosowane jako leki przeciwwirusowe antagoniści receptora CC chemokin typu 5, natomiast **5c** jako lek przeciwdepresyjny antagonista receptora neurokininowego NK1 [18]. 1,2-, 1,3-, 1,4-(*R*)-Podstawione hydroksymetyloetanony zredukowano w obecności *Geotrichum sp.* do odpowiednich 1,2-dioli. Czystość optyczna, jak również konfiguracja absolutna otrzymanych produktów była uzależniona od położenia podstawnika w pierścieniu aromatycznym. W reakcji z 1,2-podstawionymi ketonami otrzymano (*R*)-diole z umiarkowanym nadmiarem enancjomerycznym, natomiast

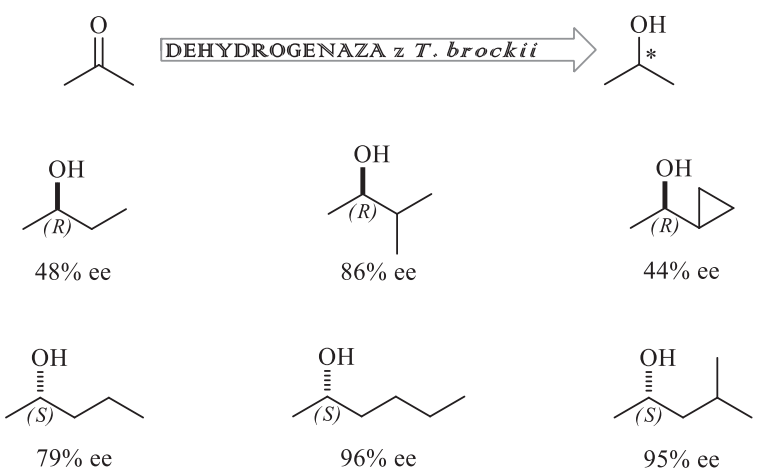
1,3- i 1,4-podstawione ketony dawały enancjomery o konfiguracji przeciwnej z dobrą lub bardzo dobrą czystością optyczną (Schemat 6, **6**) [19]. Badano również stereoselektywność reakcji redukcji prochiralnych acetofenonów zawierających grupy elektronodonorowe (Me, OMe) lub elektronoakceptorowe (Cl, Br, NO_2). Redukcja acetofenonów zawierających podstawniki elektronoakceptorowe w pozycji orto- lub para- za pomocą *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 zachodzi enancjoselektywnie ze znakomitą wydajnością dając odpowiednie alkohole o konfiguracji (*S*). Obecność podstawnika elektronodonorowego w pozycji para wpływa na pogorszenie selektywności (Schemat 6, **7**) [20].



Schemat 6. Mikroorganizmy w reakcji redukcji ketonów aromatyczno-alifatycznych
Scheme 6. Microorganisms in the reduction reaction of the aromatic-aliphatic ketones

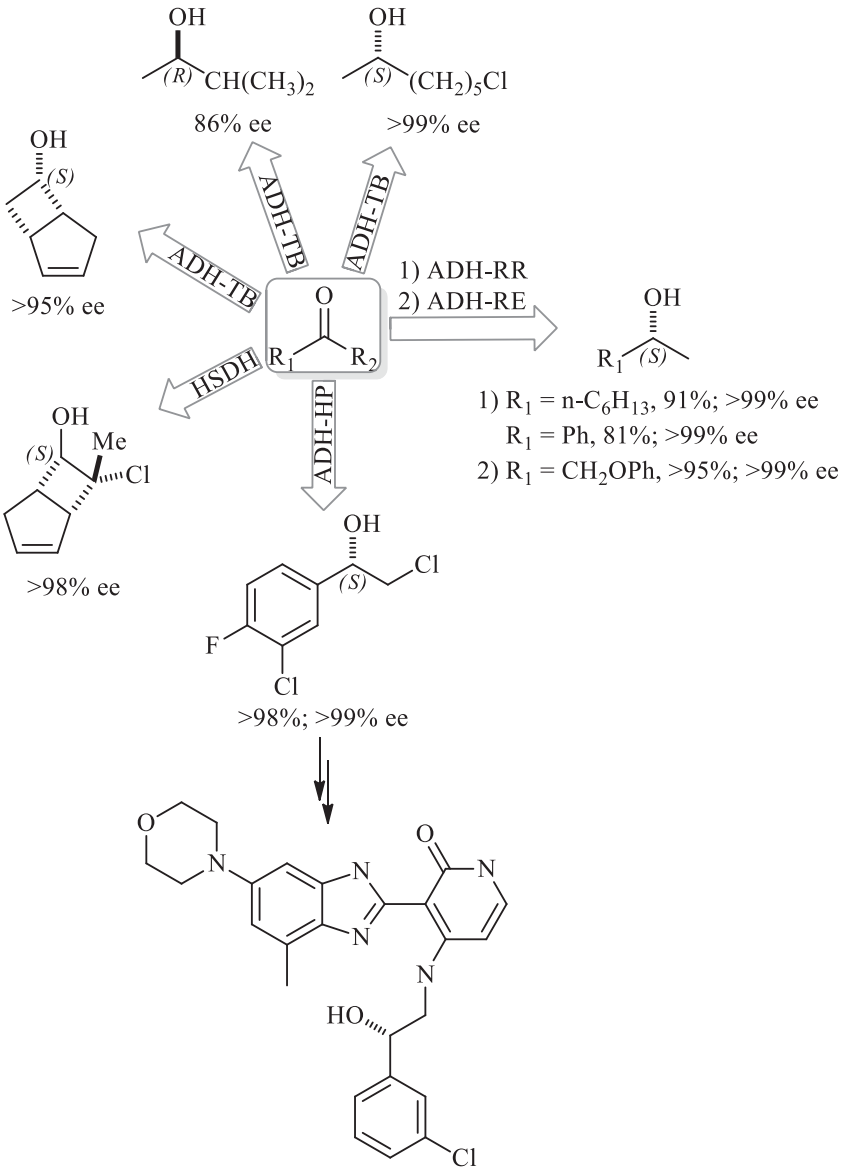
2.2. ENZYMATYCZNA REAKCJA REDUKCJI PROSTYCH KETONÓW IZOLOWANYMI REDUKTAZAMI

Zastosowanie wyizolowanych enzymów jak całych komórek do bioredukcji ketonów umożliwia uzyskanie drugorzędowych alkoholi o wysokiej czystości optycznej. W odróżnieniu do mikroorganizmów i komórek roślinnych, pojedyncze dehydrogenazy, wykazują specyficzną stereopreferencję, dlatego w sposób całkowicie selektywny można otrzymać określony enancjomer. Spośród całej gamy różnych dehydrogenaz, wybiera się enzymy (*R*)- lub (*S*)-stereospecyficzne, które prowadzą do otrzymania produktu zgodnego lub niezgodnego z regułą Preloga. Do grupy (*R*)-stereospecyficznych dehydrogenaz można zakwalifikować enzymy z *Pseudomonas* sp., *Lactobacillus kefir*, dehydrogenazę alkoholową z drożdży, dehydrogenazę alkoholową z końskiej wątroby, *Moraxella* sp., dehydrogenazę alkoholową z *Thermoanaerobium brockii*. Natomiast dehydrogenazy o (*S*)-stereopreferencji głównie izoluje się z *Geotrichum candidum*, *Mucor javanicus*, *Candida parapsilosis*. Nie należy jednak zapominać, że na enancjopreferencję biokatalizatorów, w dużym stopniu, ma wpływ budowa wyjściowego reagenta, jak również warunki prowadzenia reakcji. Przykładem dehydrogenazy, która w zależności od budowy substratu wykazuje zróżnicowaną stereopreferencję jest dehydrogenaza alkoholowa z *Thermoanaerobium brockii* (ADH-TB). Małe ketony (metylowo-etylowy, metylowo-izopropylowy czy metylowo-cyklopropylowy) są redukowane przez ADH-TB do (*R*)-enancjomerów, natomiast duże ketony są selektywnie przekształcane w alkohole o konfiguracji przeciwnej (Schemat 7) [21].



Schemat 7. Redukcja ketonów wobec ADH-TB
Scheme 7. Reduction of ketones via ADH-TB

Na Schemacie 8 przedstawiono niektóre przykłady zastosowania wybranych dehydrogenaz w reakcji bioredukcji prostych ketonów [22–30].



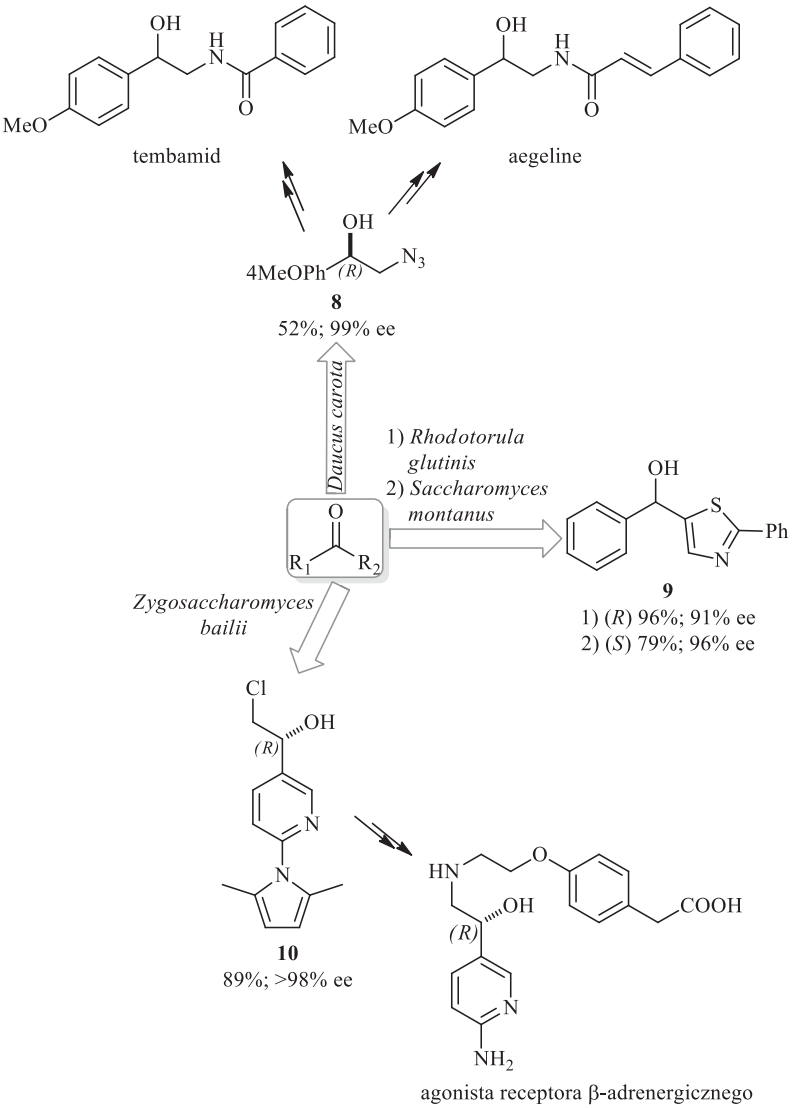
potencjalny lek przeciwnowotworowy
IGH - 1R Inhibitor

Schemat 8. Bioredukcja ketonów za pomocą dehydrogenazy ADH-HP, HSDH, ADH-TB, ADH-RR (dehydrogenaza alkoholowa z *Rhodococcus ruber*), ADH-RE (dehydrogenaza alkoholowa z *Rhodococcus erythropolis*)

Scheme 8. Bioreduction of ketones by various dehydrogenases ADH-HP, HSDH, ADH-TB, ADH-RR (alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus ruber*), ADH-RE (alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis*)

2.3. ENZYMATYCZNA REAKCJA REDUKCJI KARBONYLOWYCH ZWIĄZKÓW AZOTU

Obok prostych związków karbonylowych, dehydrogenazy izolowane lub zawarte w mikroorganizmach, komórkach roślinnych czy zwierzęcych mogą również selektywnie redukować ketony zawierające dodatkowe grupy funkcyjne.

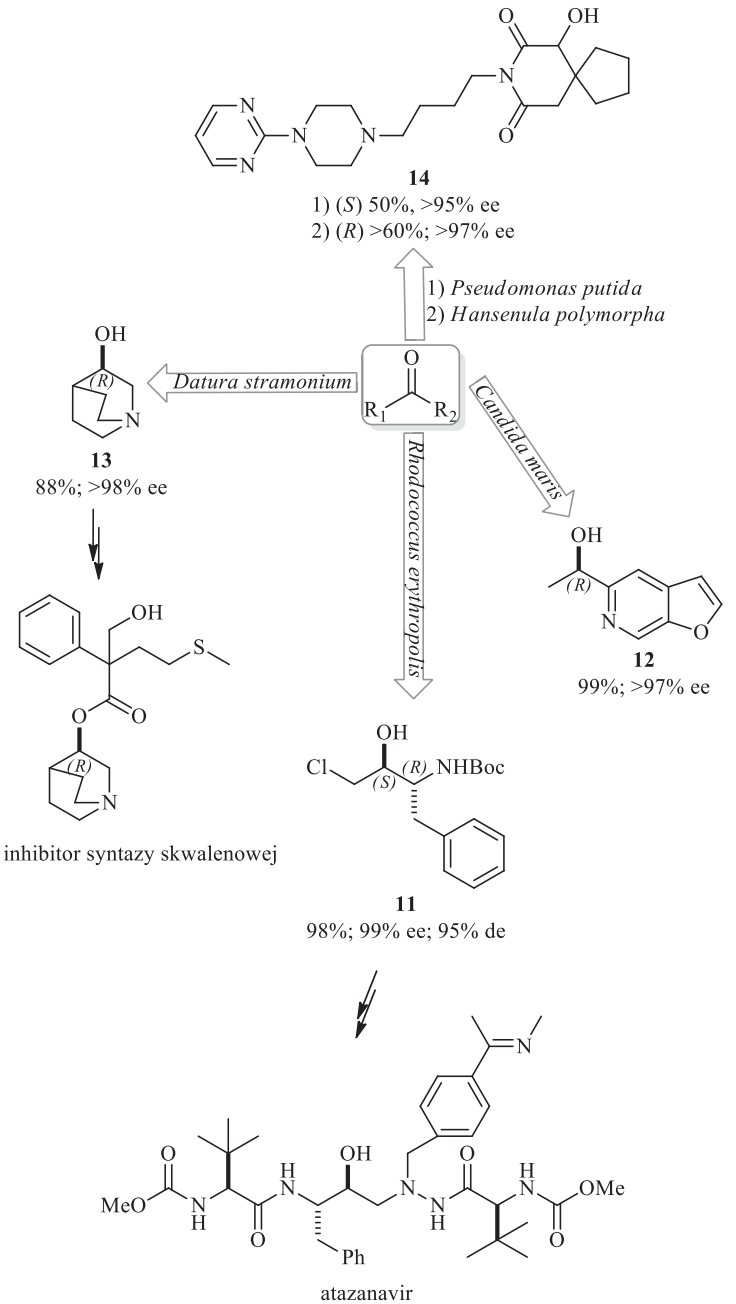


Schemat 9. Reakcje redukcji katalizowane przez mikroorganizmy
Scheme 9. Reduction reactions catalyzed by microorganisms

Substancje zawierające azot są szczególnie ważną grupą związków, ponieważ mają zastosowanie w farmakologii. Enancjoselektywna enzymatyczna desymetryzacja ketonów 2-azydo-1-arylowych katalizowana enzymami pochodzącymi z korzenia *D. carota* prowadzi do otrzymania odpowiednich chiralnych (*R*)-azydoalkoholi, które znalazły zastosowanie jako związki budulcowe do syntezy (*R*)-(−)-tembamidu (*N*-[2-hydroksy-2-(4-metoksyfenylo)etylo]benzamid) i (*R*)-(−)-aegeline (amid kwasu 2-hydroksy-2-(4-metoksyfenylo)etylo]cynamonowego) (Schemat 9, **8**) [31]. Inne 2-azydo-1-arylowe pochodne (*R*)-alkoholi drugorzędowych uzyskano w reakcji bioredukcji drożdżami piekarskimi w obecności alkoholu allilowego jako inhibitora (*S*)-dehydrogenazy. W ten sposób powstają wyłącznie optycznie czyste (*R*)-izomery 2-azydo-1-aryloetanoli [32]. Rozbudowane przestrzennie ketony także z powodzeniem ulegają desymetryzacji katalizowanej drobnoustrojami. Podczas mikrobiologicznej redukcji w obecności *Saccharomyces ontanus* CBS 6772 i *Rhodotorula glutinis* var. *dairenensis* MUCL 30607 powstaje (*R*)- i (*S*)-1-fenylo-1-(2-fenylotiazol-5-ylo)-metanol. *R. glutinis* var. *dairenensis* MUCL 30607 umożliwia otrzymanie enancjomeru o konfiguracji (*R*). Natomiast zastosowanie *S. ontanus* CBS 6772 prowadzi do (*S*)-produktu (Schemat 9, **9**) [33]. W podobny sposób uzyskano chiralne pochodne *β*-chlorohydryny. Obecność mikroorganizmu *Zygosaccharomyces bailii* ATCC No. 38924 w reakcji redukcji 2-chloro-1-[6-(2,5-dimetylopirol-1-ylo)-pirydyn-3-ylo]etanonu zapewnia wysoką wydajność chemiczną i optyczną, dając enancjomerycznie czystą (*R*)-chlorohydrynę. Związek ten jest intermediatem w syntezie agonistów receptora *β*-adrenergicznego (Schemat 9, **10**) [34].

Chlorohydryna **11** otrzymana w enzymatycznej reakcji asymetryzacji jest prekursorem atanazawiru. Atanazawir jest lekiem przeciwwirusowym będącym azapeptydowym inhibitorem proteaz stosowanym w supresji wirusa HIV-1 (Schemat 10, **11**) [35, 36]. Najlepszą czystość optyczną zapewniło użycie do reakcji szczepów *Rhodococcus* sp. oraz *Streptomyces nodosus* SC 13149. Inny związek azotu (*R*)-5-(1--hydroksyetylo)furo[2,3-c]pirydyna jest intermediatem w syntezie inhibitora odwrotnej transkryptazy wirusa HIV oraz chiralnym blokiem budulcowym w asymetrycznej syntezie (Schemat 10, **12**). Spośród przetestowanych mikroorganizmów tylko szczep *Candida maris* IFO1003 umożliwił otrzymanie enancjomeru tego związku o konfiguracji (*R*) [37, 38]. W obecności reduktazy wyizolowanej z bielunia dzędzierzawy *Datura stramonium* otrzymano czysty optycznie aminoalkohol 3-chinuklidynol o konfiguracji (*R*) z wysoką wydajnością (Schemat 10, **13**) [39]. Związek ten jest ważnym reagentem pośrednim w uzyskaniu związków biologicznie czynnych. Wykorzystuje się go między innymi do syntezy inhibitora syntazy skwalenowej. Mikrobiologiczna redukcja 6-oksobuspironu prowadzi do otrzymania (*R*)- i (*S*)-6-hydroksybuspironu o potencjalnych właściwościach przeciwlękowych (Schemat 10, **14**) [40]. Spośród 150 przetestowanych mikroorganizmów *Rhizopus stolonifer* SC 13898, *R. stolonifer* SC16199, *Neurospora crassa* SC 13816, *Mucor racemosus* SC 16198, i *Pseudomonas putida* SC 13817 umożliwiają uzyskanie czystych optycznie enancjomerów o konfiguracji (*S*), natomiast szczepy drożdży *Hansenula*

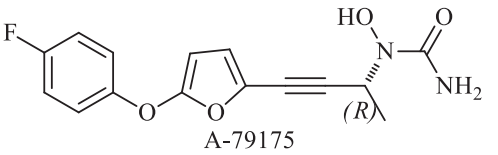
polymorpha SC 13845 i *Candida maltosa* SC 16112 dają (*R*)-produkt z wysokim nadmiarem enancjomerycznym.



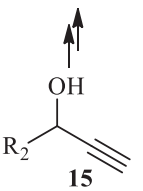
Schemat 10. Enancjoselektywna mikrobiologiczna redukcja ketonów
Scheme 10. Enantioselective microbial reduction of ketones

2.4. ENZYMATYCZNA REAKCJA REDUKCJI KETONÓW ACETYLENOWYCH

Związki z wiązaniem potrójnym są chętnie stosowane w chemii organicznej szczególnie w tzw. chemii „click". Koncepcja ta została wprowadzona stosunkowo niedawno przez Sharpless'a w 2001 roku. Proces polega na szybkim generowaniu substancji przez łączenie małych jednostek razem. Reakcja zachodzi tylko w określonym kierunku, stereospecyficznie oraz z bardzo dużą wydajnością. Aby móc reakcję chemiczną zaliczyć do reakcji typu chemii „click" to jej główny produkt musi być łatwy do oczyszczenia i rozdzielenia od pozostałych, które powstają w nieznacznej ilości. Sztandarowym przykładem reakcji chemii „click" jest cykloaddycja Huisgena katalizowana jonami miedzi(I) terminalnych alkinów z azydkami organicznymi, która umożliwia otrzymanie 1,4-dipodstawionych 1,2,3-triazoli [41, 42]. Ketony acetylenowe w enzymatycznej desymetryzacji, w obecności dehydrogenaz są chemoselektywnie przekształcane do odpowiednich alkoholi propargilowych. Różne ketony propargilowe zredukowano w obecności dehydrogenaz otrzymując alkohole o konfiguracji (*R*) lub (*S*) w zależności od zastosowanej dehydrogenazy. Dla przykładu, dehydrogenaza alkoholowa *Lactobacillus brevis* (rec-ADH-LB) jest *R*-stereospecyficzna, natomiast reduktaza karbonylowa z *Candida parapsilosis* (CPCR) oraz drugorzędowe dehydrogenazy alkoholowe (ADH-S) z *Thermoanaerobacter ethanolicus* są (*S*)-stereospecyficzne. W wyniku reakcji redukcji ketonów propargilowych z zabezpieczoną grupą acetylową w większości przypadków, w obecności dehydrogenazy rec-ADH-LB z rekombinatu *E. coli* otrzymano produkty o konfiguracji *R*, podczas gdy dehydrogenazy CPCR oraz ADH-S dają (*S*)-enancjomery. Jeśli jednak podstawnik R jest większy objętościowo i grupa acetylenowa nie jest zabezpieczona, dehydrogenazy rec-ADH-LB i ADH-S dają enancjomery o konfiguracji przeciwnej, enancjomery (*S*) (R_2>Me), ADH-S enancjomery (*R*) (R_2>^{n}Pr) (Schemat 11, **15**) [43]. Generalnie jednak ketony z niezabezpieczoną grupą acetylenową z dodatkowo niewielką grupą R, na przykład metylową, są redukowane mało selektywnie. Dla większych objętościowo podstawników obserwuje się poprawę enancjoselektywności. Dehydrogenazy preferencyjnie atakują jedną ze stron prochiralnego ketonu, jeśli jest duża różnica pomiędzy podstawnikami przy karbonylowym atomie węgla. Dlatego ketony z resztami arylowymi lub grupami sililowymi zabezpieczającymi grupę acetylenową są redukowane z wyjątkową selektywnością do czystych optycznie alkoholi (Schemat 11, **16**) [44]. Natomiast w przypadku ketoestrów etynylowych selektywność reakcji redukcji była uzależniona od wielkości reszty acylowej oraz ilości grup metylenowych pomiędzy karbonylowym atomem węgla i resztą estrową. Redukcja przebiega z wysoką czystością optyczną i wydajnością chemiczną im więcej jest reszt metylenowych (n >2) i większy objętościowo acyl (Schemat 11, **17**) [45]. Grupa estrowa pełni istotną rolę w miejscu aktywnym dehydrogenaz, dlatego niezależnie od wielkości reszty alkoholowej w obecności ADH-S otrzymano tylko enancjomery o konfiguracji (*R*).



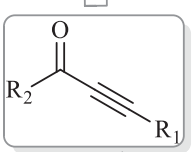
A-79175



15

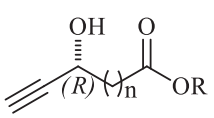
1) (*S*) R_2 = Et, 90%; 34% ee
(*S*) R_2 = nPr, 100%; >99% ee
(*S*) R_2 = nPn, 100%; >99% ee
2) (*S*) R_2 = Et, 32%; 80% ee
(*S*) R_2 = iPr, 50%; >98% ee
(*R*) R_2 = iBu, 20%; 50% ee
(*R*) R_2 = iPn, 55%; 80% ee

1) rec-ADH-LB
2) ADH-S



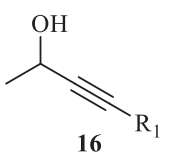
ADH-S

1) ADH-LB
2) CPCR



17

R = iPr, n = 2, 88%; >98% ee
R = Et, n = 3, 76%; 97% ee
R = Me, n = 4, 68%; >98% ee



16

a) R_1 = Ph
1) (*R*) >99%; >99% ee
2) (*S*) 80%; >99% ee
b) R_1 = $SiMe_2Ph$
1) (*R*) 60%; >99% ee
2) (*S*) 80%; >99% ee

Schemat 11. Redukcja dehydrogenazą ketonów acetylenowych
Scheme 11. Dehydrogenase-reduction of acetylene ketones

UWAGI KOŃCOWE

Od wielu lat powszechne jest poszukiwanie wydajnych i opłacalnych metod otrzymywania czystych enancjomerów. W przedstawionej pracy opisano metody redukcji enzymatycznej prochiralnych związków karbonylowych. Zastosowany w przytaczanych reakcjach enzym to dehydrogenaza alkoholowa, używana w postaci izolowanego enzymu lub też bez wyodrębniania, w postaci całych komórek bakterii, grzybów lub roślin.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] G.A.Ed. Molander, G. Thieme, Science of Synthesis, Stereoselective Synthesis 2, Stuttgart, New York 2011.
[2] K. Nakamura, R. Yamanaka, T. Matsudab, T. Haradab, Tetrahedron: Asymmetry, 2003, **14**, 2659.
[3] T. Sato, Y. Okumura, J. Itai, T. Ujisawa, Chem. Lett., 1988, **17**, 1537.
[4] R. MacLeod, H. Prosser, L. Fikentscher, J. Lanyi, H.S. Mosher, Biochemistry, 1964, **3**, 838.
[5] R. Bernardi, P. Bravo, R. Cardillo, D. Ghiringhelli, G. Resnati, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1988, 283.
[6] M. Iwamoto, H. Kawada, T. Tanaka, M. Nakada, Tetrahedron Lett., 2003, **44**, 7239.
[7] R.N. Patel, A. Goswami, L. Chu, M.J. Donovan, V. Nanduri, S. Goldberg, R. Johnston, P.J. Siva, B. Nielsen, J. Fan, W.X. He, Z. Shi, K.Y. Wang, R. Eiring, D. Cazzulino, A. Singh, R. Mueller, Tetrahedron: Asymmetry, 2004, **15**, 1247.
[8] C.V.C. Prasad, S. Vig, D.W. Smith, Q. Gao, C.T. Polson, J.A. Corsa, V.L. Guss, A. Loo, D.M. Barten, M. Zheng, K.M. Felsenstein, S.B. Roberts, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2004, **14**, 3535.
[9] D. Schenk, D. Games, P. Seubert, J. Mol. Neurosci., 2001, **17**, 259.
[10] Z. Guo, Y. Chen, A. Goswami, R.L. Hanson, R.N. Patel, Tetrahedron: Asymmetry, 2006, **17**, 1589.
[11] S. Kawano, M. Horikawa, Y. Yasohara, J. Hasegawa, Biosci., Biotechnol., Biochem., 2003, **67**, 809.
[12] R.N. Patel, L. Chu, R. Mueller, Tetrahedron: Asymmetry, 2003, **14**, 3105.
[13] R.N. Patel, Adv. Synth. Catal., 2001, **343**, 527.
[14] K. Nakamura, K. Takenaka, M. Fujii, Y. Ida, Tetrahedron Lett., 2002, **43**, 3629.
[15] A. Goswami, R.L. Bezbaruah, J. Goswami, N. Borthakur, D. Dey, A.K. Hazarika, Tetrahedron: Asymmetry, 2000, **11**, 3701.
[16] J. Goswami, R.L. Bezbaruah, A. Goswami, N. Borthakur, Tetrahedron: Asymmetry, 2001, **12**, 3343.
[17] J.S. Yadav, S. Nanda, P.T. Reddy, A.B. Rao, J. Org. Chem., 2002, **67**, 3900.
[18] M.J. Homann, R.B. Vail, E. Previte, M. Tamarez, B. Morgan, D.R. Dodds, A. Zaks, Tetrahedron, 2004, **60**, 789.
[19] Z.-L. Wei, G.-Q. Lin, Z.-Y. Li, Bioorg. Med. Chem., 2000, **8**, 1129.
[20] P. Vitale, C. D'Introno, F.M. Perma, M.G. Perrnone, A. Scilimati, Tetrahedron: Asymmetry, 2013, **24**, 389.
[21] K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry*, Springer, Berlin, 1992.
[22] W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber, Angew. Chem. Int. Ed., 2002, **41**, 1014.
[23] M. Wittman, J. Carboni, R. Attar, B. Balasubramanian, P. Balimane, P. Brassil, F. Beaulieu, C. Chang, W. Clarke, J. Dell, J. Eummer, D. Frennesson, M. Gottardis, A. Greer, S. Hansel, W. Hurlburt, B. Jacobson, S. Krishnananthan, F.Y. Lee, A. Li, T.-A. Lin, P. Liu, C. Ouellet, X. Sang, M.G. Saul-

nier, K. Stoffan, Y. Sun, U. Velaparthi, H. Wong, Z. Yang, K. Zimmermann, M. Zoeckler, D. Vyas, J. Med. Chem., 2005, **48**, 5639.
[24] R.L. Hanson, S. Goldberg, A. Goswami, T.P. Tully, R.N. Patel, Adv. Synth. Catal., 2005, **347**, 1073.
[25] S. Butt, H.G. Davies, M.J. Dawson, G.C. Lawrence, J. Leaver, S.M. Roberts, M.K. Turner, B.J. Wakefield, W.F. Wall, J.A. Winders, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1987.
[26] W. Hummel, K. Abokitse, K. Drauz, C. Rollmann, H. Gröger, Adv. Synth. Catal., 2003, **345**, 153.
[27] D. Zhu, Y. Yang, L. Hua, J. Org. Chem., 2006, **71**, 4202.
[28] E. Burda, W. Hummel, H. Gröger, Angew. Chem. Int. Ed., 2008, **47**, 9551.
[29] T. Matsuda, T. Harada, J. Org. Chem., 2000, **65**, 157.
[30] T. Ema, H. Moriya, T. Kofukuda, T. Ishida, K. Maehara, M. Utaka, T. Sakai, J. Org. Chem., 2001, **66**, 8682.
[31] J.S. Yadav, P.T. Reddy, S. Nanda, A.B. Rao, Tetrahedron: Asymmetry, 2001, **12**, 3381.
[32] J.S. Yadav, S. Nanda, P. Thirupathi Reddy, A. Bhaskar Rao, J. Org. Chem., 2002, **67**, 3900.
[33] S. Roy, V. Alexandre, M. Neuwels, L. Le Texier, Adv. Synth. Catal., 2001, **343**, 738.
[34] M.P. Burns, J.W. Wong, Chem. Abstr., 2002, **137**, 2466.
[35] G. Bold, A. Fässler, H.-G. Capraro, R. Cozens, T. Klimkait, J. Lazdins, J. Mestan, B. Poncioni, J. Rösel, D. Stover, M. Tintelnot-Blomley, F. Acemoglu, W. Beck, E. Boss, M. Eschbach, T. Hürlimann, E. Masso, S. Roussel, K. Ucci-Stoll, D. Wyss, M. Lang, J. Med. Chem., 1998, **41**, 3387.
[36] B.S. Robinson, K.A. Riccardi, Y.-F. Gong, Q. Guo, D.A. Stock, W.S. Blair, B.J. Terry, C.A. Deminie, F. Djang, R.J. Colonno, P.-F. Lin, Antimicrob. Agents Chemother., 2000, **44**, 2093.
[37] E.N. Kadnikova, N.M. Kostić, J. Non-Cryst. Solids, 2001, 63, 283.
[38] E.N. Kadnikova, N.M. Kostić, J. Org. Chem., 2003, **68**, 2600.
[39] H. Yamamoto, M. Ueda, P. Ritsuzui, T.E. Hamatani, Chem. Abstr., 2003, **139**, 35200.
[40] R.N. Patel, L. Chu, V.N. Nanduri, L. Jianqing, A. Kotnis, W.L. Parker, M. Liu, R. Mueller, Tetrahedron: Asymmetry, 2005, **16**, 2778.
[41] C. Spiteri, J.E. Moses, Angew. Chem. Int. Ed., 2010, **49**, 31.
[42] M. Meldal, C.W. Tornoe, Chem. Rev., 2008, **108**, 2952.
[43] T. Kolasa, A.O. Stewart, C.D.W. Brooks, Tetrahedron Asymmetry, 1996, **7**, 729.
[44] T. Schubert, W. Hummel, M.-R. Kula, M. Müller, Eur. J. Org. Chem., 2001, **22**, 4181.
[45] C. Heiss, R. S. Phillips, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2000, 2821.

Praca wpłynęła do Redakcji 9 czerwca 2014