

**DEHYDROGENAZY ALKOHOLOWE POCHODZENIA  
MIKROBIOLOGICZNEGO  
– WŁAŚCIWOŚCI I ICH ZASTOSOWANIE**  
**MICROBIAL ALCOHOL DEHYDROGENASES  
– PROPERTIES AND THEIR APPLICATION**

**Ewa Szczepańska, Filip Boratyński\***

*Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
Katedra Chemii  
ul. C. K. Norwida 25/27, 50-375 Wrocław  
\*e-mail: filip.boratynski@up.wroc.pl*

---

Abstract

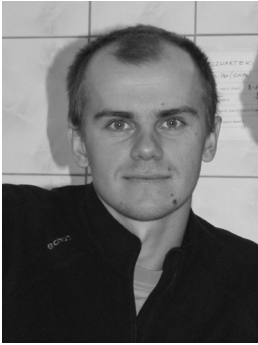
Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Dehydrogenazy alkoholowe zależne od  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ; 1.1. Drożdżowa alkoholowa dehydrogenaza (YADH); 1.2. Alkoholowa dehydrogenaza z *Rhodococcus erythropolis* (READH); 1.3. Alkoholowa dehydrogenaza z *Rhodococcus ruber* (ADH-A); 1.4. Alkoholowa dehydrogenaza z *Leifsonia* sp. (LSADH); 1.5. Alkoholowa dehydrogenaza z *Nocardia globerula* (NGADH); 1.6. Alkoholowa dehydrogenaza z *Pseudomonas fluorescens* (PFADH); 1.7. Alkoholowa dehydrogenaza z *Bacillus thuringiensis* (BtADH); 1.8. Alkoholowa dehydrogenaza z *Bacillus stearothermophilus* (BSADH); 1.9. Alkoholowa dehydrogenaza z *Sulfolobus solfataricus* (SsADH); 1.10. Alkoholowa dehydrogenaza z *Sulfolobus acidocaldarius* (SaADH); 1.11. Alkoholowa dehydrogenaza z *Thermus* sp. (TADH); 1.12. Alkoholowa dehydrogenaza z *Thermus thermophilus* (TtADH); 1.13. Alkoholowa dehydrogenaza z *Acetobacter pasteurianus*; 1.14. Alkoholowa dehydrogenaza z *Moraxella*
2. Dehydrogenazy alkoholowe zależne od  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  lub  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ; 2.1. Alkoholowa dehydrogenaza z *Nocardia fusca* (NFADH); 2.2. Alkoholowa dehydrogenaza z *Pyrococcus furiosus* (PFADH); 2.3. Alkoholowa dehydrogenaza z *Micrococcus* sp.
3. Dehydrogenazy alkoholowe zależne od  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ; 3.1. Alkoholowa dehydrogenaza z *Lactobacillus kefir* (LKADH); 3.2. Alkoholowa dehydrogenaza z *Lactococcus brevis* (LBADH); 3.3. Alkoholowa dehydrogenaza z *Thermoanaerobacter brockii* (TBADH); 3.4. Alkoholowa dehydrogenaza z *Thermoanaerobacter ethanolicus* (TeSADH)

Piśmiennictwo cytowane

---



**Dr inż. Filip Boratyński**, w 2004 roku ukończył Biotechnologię Żywności na Wydziale Nauk o Żywności na Akademii Rolniczej (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy) we Wrocławiu. Obecnie jest adiunktem w Katedrze Chemii tej samej Uczelni. Zajmuje się biotransformacjami laktonów, zarówno przy zastosowaniu enzymów, jak i całych komórek mikroorganizmów.



**Inż. Ewa Szczepańska**, studiuje Biotechnologię na Wydziale Nauk o Żywności na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu. Od 2012 roku aktywnie działa w Studenckim Kole Naukowym „OrgChem”, gdzie zajmuje się biotransformacjami laktonów z użyciem całych komórek mikroorganizmów.

---

**ABSTRACT**

Biotransformations involve mainly microorganisms or individual enzymes applied to catalyze chemical reactions [1]. This field of science is particularly important, because it allows to obtain optically active compounds, which are valuable raw materials for pharmaceutical (Fig. 3, Fig. 6, Fig. 20, Fig. 21), wood and paper (Fig. 18), food (Fig. 4), textile (Fig. 12), cosmetic (Fig. 14) industries and environmental protection (Fig. 19).

Oxidoreductases, in particular alcohol dehydrogenases (E.C.1.1.1.1, ADH) are valuable biocatalysts enabling to obtain enantiomerically pure products. These enzymes, commonly found in nature, catalyze both oxidation and reduction reactions [3].

Described dehydrogenases descend from mesophilic, psychrophilic and thermophilic microorganisms. The increasing application of thermophiles is due to their exceptional resistance against heat and organic solvents.

The article describes and explains how microbial ADH's interact with  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  or  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  and present those enzymes which catalyze reactions with both forms of cofactors. The alcohol dehydrogenases from yeast are particularly commonly used [9–14]. Bacterial enzymes, among them ADH isolated from *Thermoanaerobacter brockii* [47–51], are widely distributed too. In addition, the literature describes a number of (*R*)-specific ADH's from *Lactobacillus kefir* [40–42], *L. brevis* [45, 46], *Leisofonia* sp. [20] *Pseudomonas fluorescens* [23] and (*S*)-specific ADH's from *Rhodococcus erythropolis* [15, 16], *Thermus* sp. [30], *Sulfolobus solfataricus* [23, 28] and many others.

**Keywords:** alcohol dehydrogenase, biotransformations, bacteria

**Słowa kluczowe:** dehydrogenaza alkoholowa, biotransformacje, bakterie

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ADH	– dehydrogenaza alkoholowa
CBMDH	– dehydrogenaza mrówczanowa z <i>Candida boidinii</i>
G6PDH	– dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa (ang. <i>glucose-6-phosphate dehydrogenase</i> )
LDH	– dehydrogenaza mleczanowa (ang. <i>lactate dehydrogenase</i> )
GDH	– dehydrogenaza glukozowa
NAD <sup>+</sup> /NADH	– dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy forma utleniona/forma zredukowana (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide oxidized/reduced form</i> )
NADP <sup>+</sup> /NADPH	– fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego forma utleniona/forma zredukowana (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized/reduced form</i> )
YADH	– drożdżowa alkoholowa dehydrogenaza (ang. <i>yeast alcohol dehydrogenase</i> )
READH	– alkoholowa dehydrogenaza z <i>Rhodococcus erythropolis</i>
ADH-A	– alkoholowa dehydrogenaza z <i>Rhodococcus ruber</i>
LSADH	– alkoholowa dehydrogenaza z <i>Leifsonia</i> sp.
NGADH	– alkoholowa dehydrogenaza z <i>Nocardia globerula</i>
PFADH	– alkoholowa dehydrogenaza z <i>Pseudomonas fluorescens</i>
BtADH	– alkoholowa dehydrogenaza z <i>Bacillus thuringiensis</i>
BSADH	– alkoholowa dehydrogenaza z <i>Bacillus stearothermophilus</i>
SsADH	– alkoholowa dehydrogenaza z <i>Sulfolobus solfataricus</i>
SaADH	– alkoholowa dehydrogenaza z <i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
TADH	– alkoholowa dehydrogenaza z <i>Thermus</i> sp.
TtADH	– alkoholowa dehydrogenaza z <i>Thermus thermophilus</i>
NFADH	– alkoholowa dehydrogenaza z <i>Nocardia fusca</i>
PFADH	– alkoholowa dehydrogenaza z <i>Pyrococcus furiosus</i>
LKADH	– alkoholowa dehydrogenaza z <i>Lactobacillus kefir</i>
LBADH	– alkoholowa dehydrogenaza z <i>Lactococcus brevis</i>
TBADH	– alkoholowa dehydrogenaza z <i>Thermoanaerobacter brockii</i>
TeSADH	– alkoholowa dehydrogenaza z <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>

## WPROWADZENIE

Jedną z najlepiej rozwijających się aktualnie dziedzin łączącą ze sobą nauki chemiczne i biologiczne to biotransformacje, czyli zastosowanie mikroorganizmów lub organizmów, bądź wyizolowanych z nich enzymów w celu przekształcania związków chemicznych. Takie reakcje charakteryzują się stereospecyficznością oraz enancjo-, chemo- i regioselektywnością. Ponadto zachodzą w łagodnych warunkach, a zarazem są bezpieczne dla środowiska, gdyż nie ma potrzeby utylizacji toksycznych odpadów, a ilość ubocznych produktów reakcji jest ograniczona. Ograniczeniami biotransformacji są czynniki zewnętrzne, które mają wpływ na zdolności katalityczne enzymów takie jak: temperatura, pH, ciśnienie, stężenia substratu i produktu [1]. Wciąż poszukiwane są enzymy o wyższej enancjoselektywności, specyficzności substratowej i aktywności oraz o podwyższonej odporności na rozpuszczalniki organiczne [2].

Ważną grupę katalizatorów stosowanych w biotransformacjach stanowią dehydrogenazy alkoholowe (ADH), ponieważ mogą one przeprowadzać zarówno reakcję utleniania jak i redukcji.

Dehydrogenazy alkoholowe (E.C.1.1.1.1) należą do klasy oksydoreduktaz. Występują powszechnie w naturze i są jednymi z najlepiej zbadanych enzymów [3]. Charakteryzują się wysoką enancjoselektywnością, przez co są znakomitymi biokatalizatorami stosowanymi w przemyśle farmaceutycznym umożliwiającymi otrzymanie optycznie czystych leków z wykorzystaniem „zielonej chemii” [4]. Największą grupę ADH stanowią dehydrogenazy współdziałające z  $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$  jako kofaktorem [5]. W procesach biotransformacji wymagana jest regeneracja kofaktora, która zachodzi z wykorzystaniem między innymi dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (G6PD), dehydrogenazy alkoholowej (ADH), dehydrogenazy glukozowej (GDH) [6].

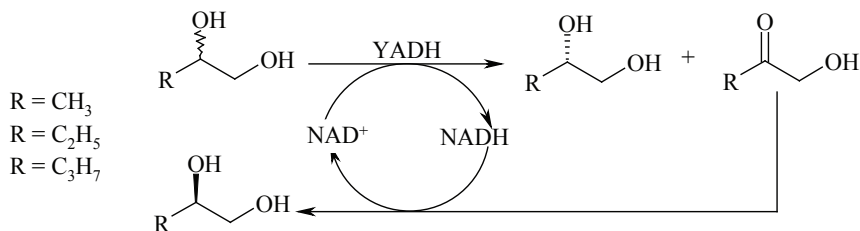
Różnorodność dehydrogenaz alkoholowych sprawia, że istnieje w literaturze wiele kryteriów ich klasyfikacji (budowa enzymu, źródło pochodzenia, rodzaj katalizowanej reakcji, środowisko działania). Poniżej przedstawiono podział w zależności od rodzaju koenzymu z jakim dany enzym współdziała. Wśród nich można wyróżnić dehydrogenazy alkoholowe  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -zależne,  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ -zależne oraz takie, które katalizują reakcje w obecności obu tych kofaktorów.

## 1. DEHYDROGENAZY ALKOHOLOWE ZALEŻNE OD NAD<sup>+</sup>/NADH

### 1.1. DROŻDŻOWA ALKOHOLOWA DEHYDROGENAZA (YADH)

Enzymem odpowiedzialnym za właściwości oksydo-redukcyjne drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jest tetrameryczna dehydrogenaza alkoholowa YADH, która występuje aż w pięciu izoformach (YADH1 – YADH5) [7]. Enzym ten składa się z dwóch domen – katalitycznej oraz tej odpowiedzialnej za wiązanie z NAD<sup>+</sup>/NADH [8]. Posiada masę 150 kDa i zbudowany jest z 347 aminokwasów, a jego struktura stabilizowana jest obecnością jonów cynku [9, 10]. YADH katalizuje, zgodnie z regułą Preloga, reakcje redukcji aldehydów [11] i metyloketonów [12] oraz nierozgałęzionych alifatycznych pierwszo- i drugorzędowych alkoholi [13].

YADH wykorzystano, między innymi, w celu otrzymania optycznie czynnych krótkołańcuchowych alifatycznych nasyconych dioli (Rys. 1). Jako kosubstrat do regeneracji NAD<sup>+</sup> wykorzystano etanol. Pierwszy etap biotransformacji polegał na enancjoselektywnym utlenieniu racemicznych dioli w celu otrzymania mieszaniny zawierającej enancjomerycznie czysty diol i hydroksyketon. W drugim etapie otrzymano przeciwny enancjomer danego diolu poprzez asymetryczną redukcję prochiralnych hydroksyketonów [14].

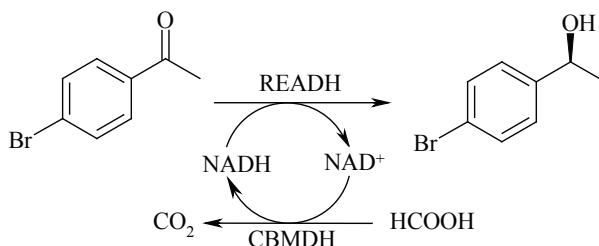


Rysunek 1. Kinetyczny rozdział racemicznych dioli za pomocą YADH

Figure 1. Kinetic resolution of racemic diols with YADH

### 1.2. ALKOHOLOWA DEHYDROGENAZA Z *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* (READH)

Średniołańcuchowa NAD<sup>+</sup>/NADH-zależna dehydrogenaza alkoholowa z *Rhodococcus erythropolis* (READH) wykazuje szerszy od poprzedniej (YADH) zakres działania i katalizuje redukcję ketonów zarówno alifatycznych jak i aromatycznych do enancjomerycznie czynnych (S)-alkoholi [15, 16]. Enzym ten transformował z wysoką wydajnością pochodne acetofenonu podstawione bromem lub fluorem w pozycji *para*. Regeneracja koenzymu zachodziła poprzez utlenienie kwasu mrówkowego do dwutlenku węgla za pomocą dehydrogenazy mrówczanowej z *Candida boidinii* (CBMDH; Rys. 2).

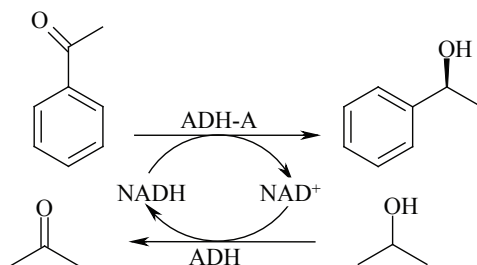


Rysunek 2. Redukcja *para*-bromoacetofenonu za pomocą READH

Figure 2. Reduction of *para*-bromoacetophenon with READH

### 1.2. ALKOHOŁOWA DEHYDROGENAZA Z *RHODOCOCCUS RUBER* (ADH-A)

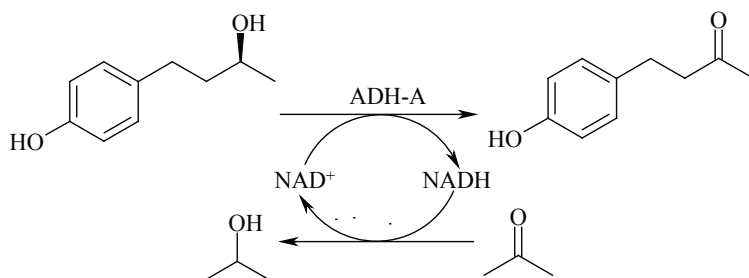
Dehydrogenaza alkoholowa z *Rhodococcus ruber* (ADH-A) zależna od NAD<sup>+</sup>/NADH jest wysoce chemo- i termotolerancyjna. Ma ona budowę homodimeryczną a podjednostki (38 kDa) są stabilizowane przez jony cynku. Optymalna temperatura jej działania mieści się w zakresie 30–50°C, zaś optymalne pH wynosi 6,5 dla reakcji redukcji oraz 9,0 dla utlenienia. Enzym ten katalizuje oksydację średniołańcuchowych drugorzędowych alkoholi i asymetryczną redukcję ketonów [17]. ADH-A została użyta przez Rauter i in. do syntezy enancjomerycznie czystego 1-(S)-fenyloetanolu z acetofenonu, zaś NADH regenerowano poprzez utlenienie izopropanolu za pomocą dehydrogenazy glukozowej. W wyniku biotransformacji otrzymano 1-(S)-fenyloetanol o czystości optycznej 98,3% z 90% konwersją acetofenonu (Rys. 3) [18].



Rysunek 3. Otrzymywanie 1-(S)-fenyloetanolu z acetofenonu za pomocą ADH-A

Figure 3. Biosynthesis of 1-(S)-phenylethanol from acetophenone with ADH-A

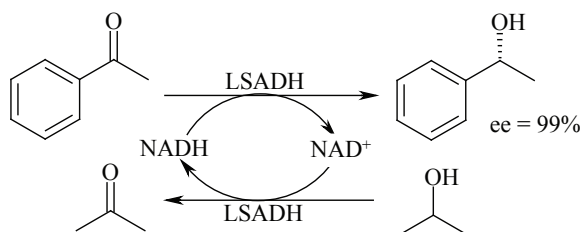
Kolejnym przykładem zastosowania dehydrogenazy alkoholowej z *Rhodococcus ruber* jest produkcja ketonu malinowego z rododendrolu w skali preparatywnej. Keton malinowy (4-(*p*-hydroksyfenyl)butan-2-on) stosuje się głównie jako składnik smakowo-zapachowy w przemyśle spożywczym. Jest obecny w owocach takich jak brzoskwinie, winogrona, jabłka oraz w korze sosny, cisu i klonu, jednakże jego ilość jest zbyt mała, aby jego izolacja z tych źródeł była opłacalna w skali przemysłowej (Rys. 4) [19].



Rysunek 4. Utlenianie rododendrolu za pomocą ADH-A  
Figure 4. Oxidation of rhododendrol with ADH-A

#### 1.4. ALKOHOŁOWA DEHYDROGENAZA Z *LEIFSONIA SP.* (LSADH)

NAD<sup>+</sup>/NADH-zależna dehydrogenaza alkoholowa z *Leifsonia* wysoce enancjoselektywnie katalizuje redukcję prochiralnych ketonów, w tym pochodnych acetofenonu, 2-alkanonów i ketoestrów niezgodnie z regułą Preloga, w wyniku czego powstają (*R*)-alkohole (Rys. 5) [20]. LSADH wykazuje wysoką aktywność w reakcjach utlenienia średniołańcuchowych drugorzędowych alkoholi (C5-C8) przy czym aktywność ta jest zdecydowanie wyższa w stosunku do izomeru (*R*) niż (*S*) [21]. Enzym ten wykorzystano w połączeniu z monoooksygenazą styrenu z *Rhodococcus sp.* (SMO) do produkcji enancjomerycznie czystych (*S*)-epoksydów z pochodnych styrenu [22].



Rysunek 5. Redukcja pochodnych acetofenonu z udziałem LSADH  
Figure 5. Reduction of acetophenone derivatives with LSADH

#### 1.5. ALKOHOŁOWA DEHYDROGENAZA Z *NOCARDIA GLOBERULA* (NGADH)

Krótko- i średniołańcuchowa dehydrogenaza alkoholowa z *Nocardia globerula* jest NAD<sup>+</sup>/NADH-zależnym tetramerem o masie 135 kDa. Optimum działania to 35°C i pH 6,5. Wyróżnia się specyficznością substratową w stosunku do prochiralnych alifatycznych ketonów i ketoestrów o podstawnikach większych objętościowo oraz tioestrów [2]. Przeprowadzone badania przez Parkot i in. wykazały, że enzym ten redukuje 4-chloro-3-oksobutanian etylu do (*S*)-4-chloro-3-hydroksybutanianu etylu z ee > 99% oraz 2-okso-4-fenylbutanian etylu do (*S*)-2-hydroksy-4-fenyl-



butanianu etylu z  $ee > 96\%$  (Rys. 6). Co ciekawe, standardowy substrat większości znanych dehydrogenaz alkoholowych, acetofenon nie ulega redukcji.

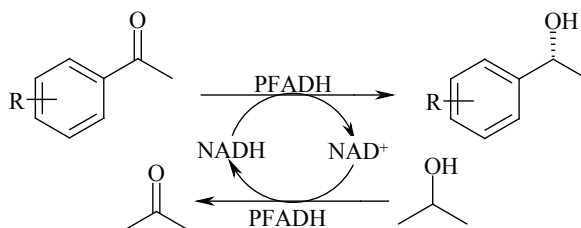


Rysunek 6. Redukcja 2-okso-4-fenylobutanianu etylu za pomocą NGADH

Figure 6. Reduction of ethyl 2-oxo-4-phenylbutanoate with NGADH

### 1.6. ALKOHOŁOWA DEHYDROGENAZA Z *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* (PFADH)

Jak wykazały badania Hildenbrandt i in. dehydrogenaza alkoholowa z *Pseudomonas fluorescens* redukuje szeroki wachlarz arylo-alifatycznych ketonów niezgodnie z regułą Preloga, w wyniku czego powstają (*R*)-alkohole. PFADH wykazuje szeroką aktywność i stereoselektywność w redukcji acetofenonu i jego pochodnych ( $ee = 45\text{--}99\%$ ). Recykling kofaktora NADH zachodzi poprzez dodanie do środowiska reakcji 10–20% v/v izopropanolu (Rys. 7).



Rysunek 7. Redukcja arylo-alifatycznych ketonów katalizowana przez PFADH

Figure 7. Reduction of aryl-aliphatic ketones catalyzed by PFADH

Rezultaty desymetryzacji substratów przez PFADH przedstawiono w Tabeli 1. Najefektywniej prowadzona była biotransformacja modelowego związku, czyli acetofenonu (1). Mimo iż enzym akceptuje również pochodne tego związku, to na konwersję substratu i nadmiar enancjomeryczny znacząco wpływa natura podstawionego pierścienia. Redukcja substratu z grupą metylową (2) i grupą metoksyłową (5) przy węglu w pozycji 4 przebiegała z niską stereoselektywnością wynoszącą 42–45%. Natomiast wysokie nadmiary enancjomeryczne ( $ee = 91\text{--}99\%$ ) uzyskano z pochodnymi 2- i 3-metoksyacetofenonem (3, 4) oraz 4-fluoroacetofenonem (6) jako substratami. Pochodne zawierające grupę nitrową i aminową nie były akceptowane przez PFADH [23].

Tabela 1. Wyniki desymetryzacji substratów 1–6 z użyciem PFADH  
 Table 1. Results of desymmetrization of substrates 1-6 using PFADH.

Substrat/R	Konwersja (%)	ee (%)	Czas (godz.)
1/H	95	92	21
2/4-Me	82	42	19
3/2-MeO	31	>99	21
4/3-MeO	89	92	19
5/4-MeO	38	45	20
6/4-F	91	91	21

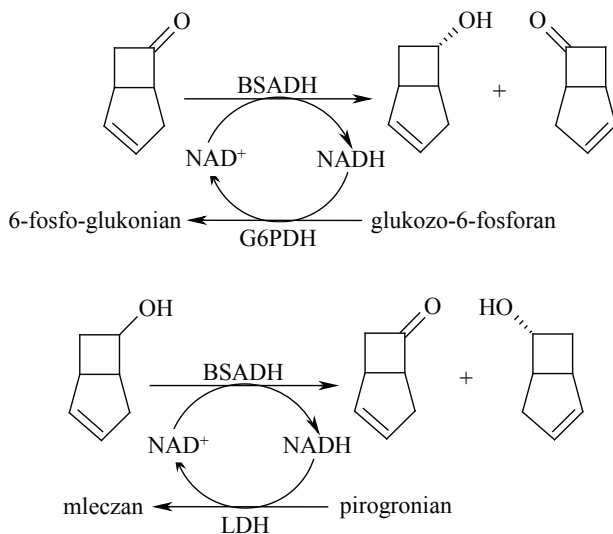
### 1.7. ALKOHOŁOWA DEHYDROGENAZA Z *BACILLUS THURINGIENSIS* (BTADH)

Dehydrogenaza alkoholowa z *Bacillus thuringiensis* utlenia krótko- i średniołańcuchowe alkohole (od C2-C9) oraz redukuje proste ketony takie jak aceton, keton metylo-etylowy oraz metylo-propylowy do odpowiednich drugorzędowych alkoholi. Do tego celu wykorzystuje  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  jako kofaktor. BtADH często używa się do regeneracji kofaktora nikotynoamidowego, przez co może być zastosowany ponownie podczas biotransformacji. Najczęściej regeneracja zachodzi poprzez konwersję acetonu do izopropanolu lub w reakcji odwrotnej [24].

Enzymy produkowane przez hipertermofilne mikroorganizmy coraz częściej znajdują zastosowanie w biotransformacjach ze względu na to, że zachowują one swoje właściwości w warunkach denaturujących (wysoka temperatura, niekorzystne pH, obecność rozpuszczalników organicznych, SDS i proteaz) [25]. Istotne jest również to, że wysoka temperatura środowiska reakcji pozwala na użycie większego stężenia substratu oraz na uniknięcie zastosowania rozpuszczalników organicznych w stosunku do ciężko rozpuszczalnych substancji [26].

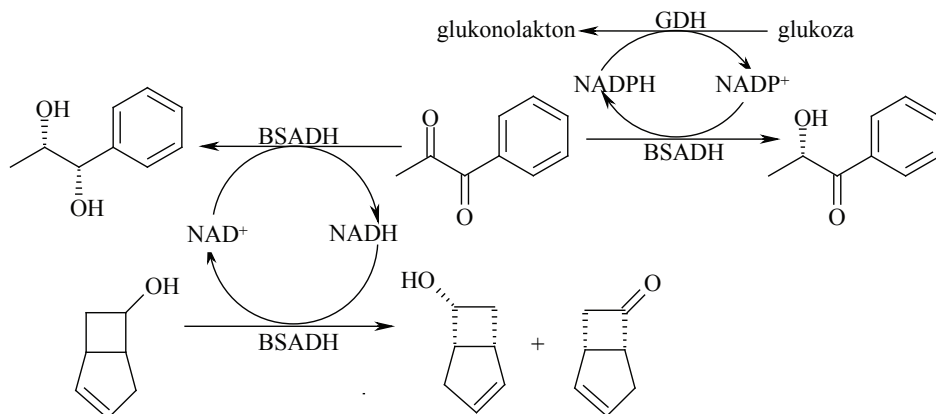
### 1.8. ALKOHOŁOWA DEHYDROGENAZA Z *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* (BSADH)

Jednym z termofilnych enzymów jest dehydrogenaza z *Bacillus stearothermophilus* zależna od  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . W doświadczeniu opisanym przez Giovannini i in. BSADH wykorzystano do reakcji redukcji ketonów i utlenienia alkoholi. Enzym ten w obu przypadkach katalizował biotransformacje z wysoką wydajnością oraz stereoselektywnością. Pozwoliło to na uzyskanie optycznie czystych bicyklicznych ketonów i alkoholi. W reakcji redukcji do regeneracji koenzymu zastosowano dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową, zaś przy utlenianiu dehydrogenazę mleczanową (Rys. 8) [27].



Rysunek 8. Redukcja ketonów i utlenianie alkoholi katalizowane za pomocą BSADH  
 Figure 8. Reduction of ketones and oxidation of alcohols catalyzed by BSADH

W wyniku redukcji  $\alpha$ -diketonu za pomocą dehydrogenazy alkoholowej z *B. stearothermophilus* otrzymano produkty z wysoką czystością optyczną ( $ee > 98\%$ ) (Rys. 9). Zastosowanie BSADH zarówno do redukcji grup karbonylowych diketonu, jak i regeneracji koenzymu dostarczyło odpowiedniego diolu. Natomiast zastosowanie dehydrogenazy glukozowej do regeneracji NADH pozwoliło uzyskać (S)- $\alpha$ -hydroksyketony. Zatem enzymu tego można użyć do produkcji dwóch interesujących związków równocześnie.



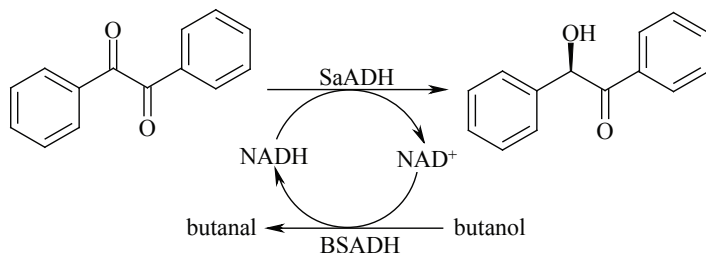
Rysunek 9. Możliwe procesy redukcji 1-fenylpropan-1,2-dionu katalizowane przez BSADH w zależności od systemu regenerującego koenzym  
 Figure 9. Possible processes of reduction of 1-phenylpropan-1,2-dion catalyzed by BSADH depending on the coenzyme regenerating system

### 1.9. ALKOHOŁOWA DEHYDROGENAZA Z *SULFOLOBUS SOLFATARICUS* (SSADH)

Dehydrogenaza alkoholowa z *Sulfolobus solfataricus* jest termofilnym  $\text{NAD}^+$ / $\text{NADH}$ -zależnym homotetramerem stabilizowanym jonami cynku. Enzym ten jest (S)-specyficzny i wykazuje aktywność w stosunku do pierwszorzędowych rozgałęzionych i alifatycznych alkoholi oraz drugorzędowych aromatycznych i alifatycznych alkoholi [28]. Optymalna temperatura dla SsADH to  $50^\circ\text{C}$  (czas półtrwania  $> 100$  h), lecz zachowuje on również swoje właściwości nawet w  $85^\circ\text{C}$  (czas półtrwania 3 h) [23].

### 1.10. ALKOHOŁOWA DEHYDROGENAZA Z *SULFOLOBUS ACIDOCALDARIUS* (SAADH)

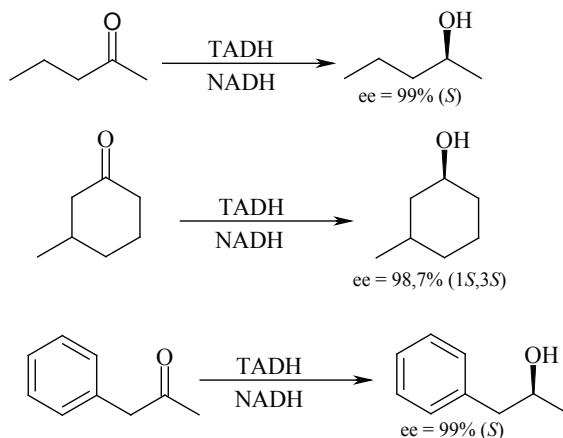
$\text{NAD}^+$ / $\text{NADH}$ -zależna dehydrogenaza alkoholowa z *Sulfolobus acidocaldarius* jest tetramerem zawierającym identyczne podjednostki o masie 27 kDa zbudowane z 255 aminokwasów. Zachowuje aktywność w temperaturach sięgających nawet  $88^\circ\text{C}$ . Enzym ten efektywnie katalizuje redukcję alicyklicznych, bicyklicznych oraz aromatycznych ketonów i  $\alpha$ -ketoestrów. Z kolei niską wydajność wykazuje w stosunku do alifatycznych, cyklicznych i aromatycznych alkoholi. Rysunek 10 przedstawia biokonwersję benzylu z udziałem SaADH do enancjomerycznie wzbogaczonego (R)-izomeru benzoiny (ee = 80%). Do regeneracji kofaktora użyto butanol, jako substrat w reakcji redukcji z udziałem innego enzymu – BSADH [29].



Rysunek 10. Produkcja chiralnego diarylowego alkoholu za pomocą SaADH  
Figure 10. Production of chiral diaryl alcohol by SaADH

### 1.11. ALKOHOŁOWA DEHYDROGENAZA Z *THERMUS SP.* (TADH)

Dehydrogenaza alkoholowa została również zidentyfikowana u hipertermofilnego drobnoustroju *Thermus sp.* TADH jest homotetramerem zbudowanym z 347 aminokwasów i jest zależna od niefosforylowanego kofaktora  $\text{NAD}^+$ / $\text{NADH}$ . Redukuje szereg aldehydów i ketonów takich jak 2-pentanon, 3-metylocykloheksanon i fenyloaceton do odpowiednich (S)-alkoholi z wysoką enancjoselektywnością (Rys. 11). TADH wykazuje aktywność w wysokich temperaturach sięgających nawet  $100^\circ\text{C}$  i toleruje obecność rozpuszczalników organicznych o stężeniu wynoszącym 50% v/v [30].



Rysunek 11. Przykładowe reakcje redukcji katalizowane przez TADH  
 Figure 11. Examples of reduction reactions catalyzed by TADH

### 1.12. ALKOHOŁOWA DEHYDROGENAZA Z *THERMUS TERMOPHILUS* (TTADH)

Krótkołańcuchowa  $NAD^+/NADH$ -zależna dehydrogenaza alkoholowa z *Thermus thermophilus* jest tetramerem zawierającym identyczne podjednostki o masie 26 kDa zbudowane z 256 aminokwasów. Pennachio i wsp. badali TtADH1, który enancjoselektywnie redukuje, zgodnie z regułą Preloga, aromatyczne ketony i  $\alpha$ -ketoestry takie jak acetofenon, 2,2,2-trifluoroacetofenon,  $\alpha$ -tetralon,  $\alpha$ -metylobenzen i  $\alpha$ -etylobenzen (Tab. 2). Jednakże wykazuje niską aktywność względem aromatycznych alkoholi i aldehydów [31].

Tabela 2. Asymetryczna redukcja związków karbonylowych przez TtADH  
 Table 2. Asymmetric reduction of carbonyl compounds by TtADH

Substrat	Konwersja (%)	ee (%)	Konfiguracja
MBF	99	91	R
$\alpha$ -etylobenzen	90	95	R
acetofenon	70	>99	S
2,2,2-trifluoroacetofenon	100	93	R
$\alpha$ -tetralon	18	>99	S

Z kolei Rocha-Martin i in. analizowali właściwości TtADH2, enzymu specyficznego w stosunku do krótkołańcuchowych substratów prowadzącego zarówno reakcję utleniania jak i redukcji w pH neutralnym. Optymalna temperatura działania enzymu to 85°C. Nie wykazuje on aktywności oksydacyjnych w stosunku do pierwszorzędowych alifatycznych alkoholi, Natomiast redukuje substraty takie jak acetofenon i 2,2,2-trifluoroaceton z wysoką konwersją i enancjoselektywnością (Tab. 3) [4].

Tabela 3. Asymetryczna redukcja prochiralnych ketonów przez TtADH2  
 Table 3. Asymmetric reductions of prochiral ketones by TtADH2

Substrat	Konwersja (%)	ee (%)	Konfiguracja
acetofenon	100	71	S
2,2,2-trifluoroacetofenon	100	96	R

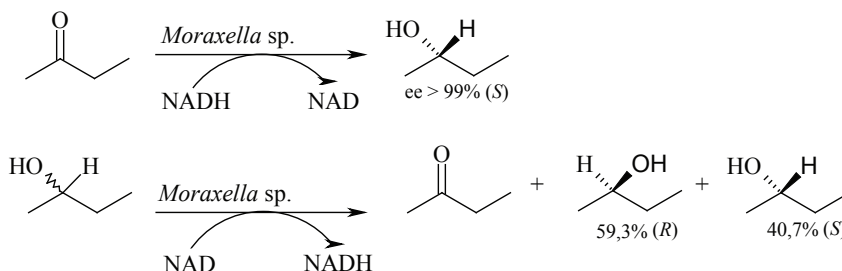
### 1.13. ALKOHOŁOWA DEHYDROGENAZA Z *ACETOBACTER PASTEURIANUS*

Chinnawirotpisan i in. wyizolowali i scharakteryzowali dwie dehydrogenazy (ADH I i ADH II) z *Acetobacter pasteurianus*. Obie są zależne od NAD<sup>+</sup>/NADH. Pierwsza z nich jest homotrimerem zawierającym podjednostki o masie 42 kDa i stabilizowane trzema jonami cynku, zaś druga dimerem zbudowanym z identycznych podjednostek o masie 31 kDa. ADH I wykazuje szeroką specyficzność substratową w stosunku do krótko- i średniołańcuchowych pierwszorzędowych alkoholi (C2-C10) i aldehydów. Z kolei ADH II preferuje średniołańcuchowe (C6-C8) drugorzędowe (R)-alkohole. Ich optimum działania to 37°C, zaś w 55°C tracą swoje właściwości po 30 min [32].

### 1.14. ALKOHOŁOWA DEHYDROGENAZA Z *MORAXELLA*

NAD<sup>+</sup>/NADH-zależna dehydrogenaza alkoholowa wyizolowana z psychrofilnego drobnoustroju *Moraxella* sp. TAE123 wykazuje głównie aktywność oksydacyjną w stosunku do pierwszo- i drugorzędowych alifatycznych alkoholi. Co ciekawe ADH z *Moraxella* sp., w przeciwieństwie do mezofilnego enzymu HLADH i termofilnego TBADH, katalizuje unikalną reakcję utlenienia benzohydrołu.

Velonia i in. przeprowadzili redukcję 2-butanonu z wykorzystaniem ADH z *Moraxella* sp. w celu sprawdzenia specyficzności transferu wodoru z NADH do substratu. Biotransformacja zaszła z 16% konwersją, a jedynym produktem był (S)-2-butanol (ee > 99%). Dodatkowo przeprowadzili utlenienie racemicznej mieszaniny 2-butanolu w wyniku czego otrzymano 59,3% (R)-2-butanolu i 40,7% (S)-2-butanolu z 16% konwersją substratu. Obydwie reakcje przeprowadzono w temperaturze 0°C (Rys. 12) [33].



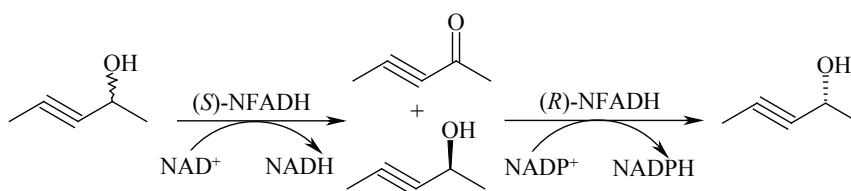
Rysunek 12. Redukcja 2-butanonu i utlenienie racemicznej mieszaniny 2-butanolu

Figure 12. Reduction of 2-butanone and oxidation of racemic mixture of 2-butanol

## 2. DEHYDROGENAZY ALKOHOŁOWE ZALEŻNE OD $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ LUB $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$

### 2.1. ALKOHOŁOWA DEHYDROGENAZA Z *NOCARDIA FUSCA* (NFADH)

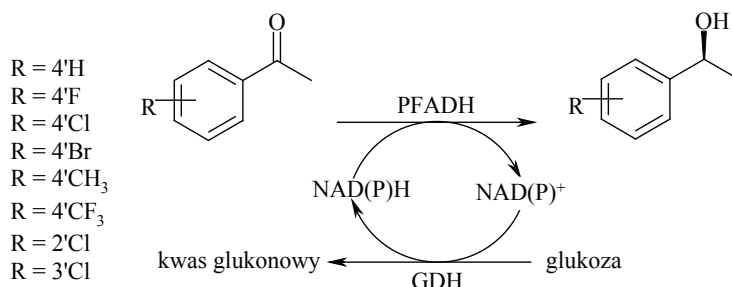
Rzadko spotykaną, choć niezwykle cenną właściwością mikroorganizmów jest odmienna specyficzność zawartych w nich dehydrogenaz w zależności od wykorzystywanego koenzymu.  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -zależna (S)-dehydrogenaza z *Nocardia fusca* (NFADH) jest zaliczana do średniołańcuchowych ADH posiadających w swojej strukturze jony cynku. Katalizuje ona głównie reakcje utleniania drugorzędowych alkoholi. Z kolei  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ -zależna (R)-ADH z *N. fusca* katalizuje redukcję ketonów do odpowiednich (R)-alkoholi. Xie i in. wykorzystali (S)- i (R)-dehydrogenazy alkoholowe tego samego szczepu *N. fusca* w celu otrzymania optycznie czynnych alkoholi (Rys. 13) [34].

Rysunek 13. Otrzymywanie optycznie czynnych alkoholi w wyniku reakcji oksydoredukcyjnych katalizowanych przez (S)- i (R)-ADH z *Nocardia fusca*Figure 13. Biosynthesis of optically active alcohols by oxidation-reduction reactions catalyzed by (S)- and (R)-ADH from *Nocardia fusca*

### 2.2. ALKOHOŁOWA DEHYDROGENAZA Z *PYROCOCCUS FURIOSUS* (PFADH)

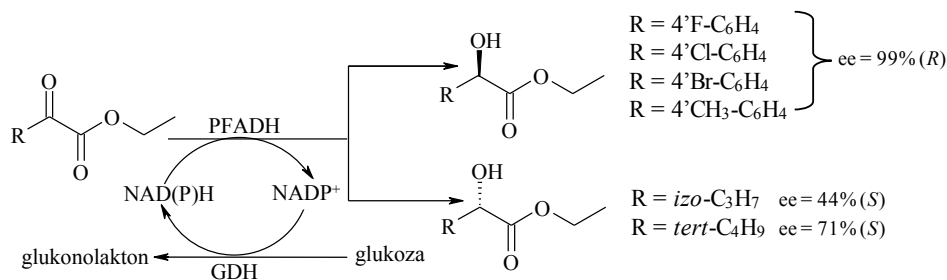
Kolejnym przykładem hipertermofilnego enzymu jest dehydrogenaza alkoholowa z *Pyrococcus furiosus* (PFADH), która jest zależna od  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  oraz

NADP<sup>+</sup>/NADPH, a jej okres półtrwania wynosi aż 130 min w 100°C. Enzym wykazuje szeroką specyficzność substratową, szczególnie względem rozbudowanych substratów. Dunming i in. przeprowadzili asymetryczną redukcję szeregu aromatycznych ketonów i  $\alpha$ -ketoestrów za pomocą PFADH. Badania wykazały, że enzym prowadzi redukcję ketonów arenowych oraz ketoestrów ze znacznie wyższą enancjoselektywnością, w porównaniu do alifatycznych związków. Produktami redukcji ketonów były odpowiednie (*S*)-alkohole (Rys. 14), zaś z aromatycznych ketoestrów odpowiednie (*R*)-hydroksyestry otrzymywane z ee = 99%. Alifatyczne ketoestry redukowane były natomiast do (*S*)-hydroksyestrów z mniejszą enancjoselektywnością (ee = 41–71%) (Rys. 15) [35].



Rysunek 14. Redukcja pochodnych acetofenonu za pomocą PFADH

Figure 14. Reduction of acetophenone derivatives with PFADH



Rysunek 15. Redukcja pochodnych  $\alpha$ -ketoestru za pomocą PFADH

Figure 15. Reduction of  $\alpha$ -ketoester derivatives with PFADH

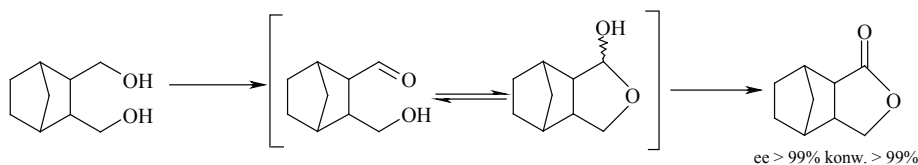
### 2.3. ALKOHOLOWA DEHYDROGENAZA Z *MICROCOCCLUS* SP.

Dehydrogenaza alkoholowa z *Micrococcus* sp. jest zależna zarówno od NAD<sup>+</sup>/NADH jak i NADP<sup>+</sup>/NADPH, jej masa wynosi 185 kDa. Optymalne pH dla reakcji utlenienia to 9,5–10, zaś dla redukcji 5,5–6,0. Jak wykazały badania Stibor i in. enzym ten utlenia krótko- i średniołańcuchowe alkohole drugorzędowe [36].



Dehydrogenazy alkoholowe pochodzenia mikrobiologicznego mogą służyć do zastąpienia ADH pochodzących z innych źródeł, lecz wykazujących specyficzną w stosunku do tych samych substratów. Przykładem jest eksperyment przeprowadzony przez Boratyńskiego i in., którzy poszukiwali mikrobiologicznego katalizatora w celu utlenienia mezo monocyklicznych i bicyklicznych dioli do odpowiednich chiralnych laktonów [37]. Poprzednio w tym celu wykorzystywano dehydrogenazę alkoholową izolowaną z wątroby końskiej (HLADH), lecz aktualnie nie jest ona już komercyjnie dostępna. Z kolei rekombinowany HLADH z *E. coli* (HLADH-rec) nie wykazuje również wysokiej stereoselektywności w stosunku do dioli jak naturalny HLADH [38, 39].

Badania skринingowe przeprowadzone wśród wielu szczepów bakterii pozwoliły wyselekcjonować *Micrococcus* sp. jako drobnoustrój najefektywniej katalizujący biotransformację mezo dioli do enancjomerycznie czystych laktonów z wysoką konwersją (72–99%), dzięki czemu drogie reakcje enzymatyczne z udziałem HLADH-rec z *E. coli* mogą zostać skutecznie zastąpione przez biotransformacje całymi komórkami *Micrococcus* sp. (Rys. 16) [37]. Wstępne badania wykazały, że dehydrogenaza alkoholowa z *Micrococcus* sp. wykorzystywana przez Boratyńskiego i in. jest zależna od  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , w porównaniu do enzymu badanego przez Stibor i in., który jest zależny od obu kofaktorów.



Rysunek 16. Utlenienie mezo bicyklicznych dioli do odpowiednich chiralnych laktonów za pomocą *Micrococcus* sp.

Figure 16. Oxidation of *meso* bicyclic diols to the corresponding chiral lactones using *Micrococcus* sp.

### 3. DEHYDROGENAZY ALKOHOLOWE ZALEŻNE OD $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$

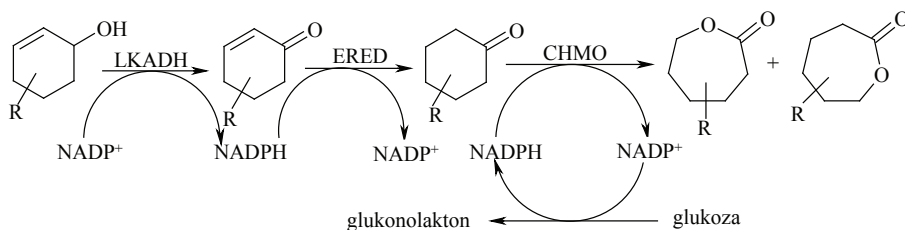
#### 3.1. ALKOHOLOWA DEHYDROGENAZA Z *LACTOBACILLUS KEFIR* (LKADH)

ADH wyizolowana z *Lactobacillus kefir* jest  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ -zależna i katalizuje reakcje niezgodnie z regułą Preloga [40–42]. Biokatalizator ten jest stosowany na skalę przemysłową w reakcji redukcji głównie alifatycznych i cyklicznych związków karbonylowych, szczególnie metyloketonów z rozbudowanym drugim podstawnikiem.

Interesujące wyniki uzyskali De Temiño i in., którzy wykorzystali LKADH do redukcji hydrofobowych ketonów do odpowiednich enancjomerycznie czystych (*R*)-alkoholi. Uzyskali dzięki temu (*R*)-fenyloetanol z ee = 98% i konwersją równą

60%. Dehydrogenaza alkoholowa z *L. kefir* z powodzeniem transformowała również związki rozbudowane przestrzennie o dużej masie cząsteczkowej, takie jak  $\alpha$ -tetralon i 1-benzyl-4-piperidon, które mogą mieć potencjalne zastosowanie w syntezie leków neuroleptycznych [43].

W celu otrzymania nasyconych cyklicznych laktonów, mogących służyć do syntezy biodegradowalnych surowców, Oberleitner i in. w ciekawy sposób zastosowali LKADH prowadząc trzyetapową reakcję enzymatyczną. Pierwszą biotransformację katalizowaną przez LKADH stanowiło utlenienie nienasyconych cyklicznych alkoholi do odpowiednich ketonów. Drugi etap polegał na redukcji podwójnego wiązania w pierścieniu cykloheksanonu za pomocą odpowiedniej reduktazy (ERED), zaś trzecim etapem było utlenianie Baeyera-Viligera poprzez zastosowanie CHMO (monooksygenaza cykloheksanolu) (Rys. 17). W wyniku kaskadowej reakcji otrzymano cykliczne laktony z wysokim nadmiarem enancjomerycznym. Najlepszy rezultat osiągnięto podczas biotransformacji (1*S*,5*S*)-karweolu (konwersja 97%, ee > 99%, czas 6 godz.) (Tab. 4) [44].



Rysunek 17. Kaskadowa biotransformacja

Figure 17. Cascade biotransformation

Tabela 4. Biokonwersja wybranych substratów za pomocą kaskadowej reakcji z LKADH, ERED i CHMO

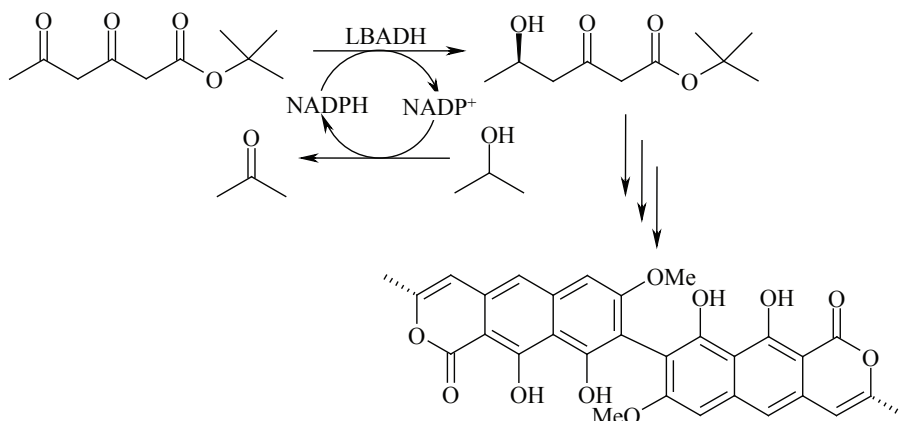
Table 4. Bioconversion of selected substrates using a cascade reaction with LKADH, ERED and CHMO

Substrat	Konwersja (%)	ee (%)
4-metylocykloheks-2-en-1-ol	>99	>99
2-metylocykloheks-2-en-1-ol	74	93
3-metylocykloheks-2-en-1-ol	82	>99
(1 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-karweol	55	>99
(1 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-karweol	99	>99
(1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-karweol	97	>99

### 3.2. ALKOHOLOWA DEHYDROGENAZA Z *LACTOCOCCUS BREVIS* (LBADH)

Kolejnym  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ -zależnym enzymem katalizującym enancjoselektywną redukcję prochiralnych ketonów do (*R*)-alkoholi jest dehydrogenaza alkoholowa z *Lactococcus brevis* [45]. Enzym ten przekształcał ester *tert*-butylo-3,5-dioksoheksanowy do odpowiedniego (*R*)-hydroksyestru z wydajnością równą 78% i ee

> 99% (Rys. 18). Produkt znalazł zastosowanie jako związek pośredni w syntezie dimeru vioksantyny, która pełni ważną funkcję w utlenianiu fenolu podczas procesu tworzenia lignin [46].

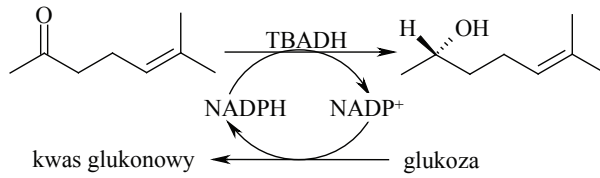


Rysunek 18. Redukcja estru *tert*-butylo-3,5-dioksoksoheksanowego za pomocą LBADH

Figure 18. Reduction of *tert*-butyl-3,5-dioxahexane with LBADH

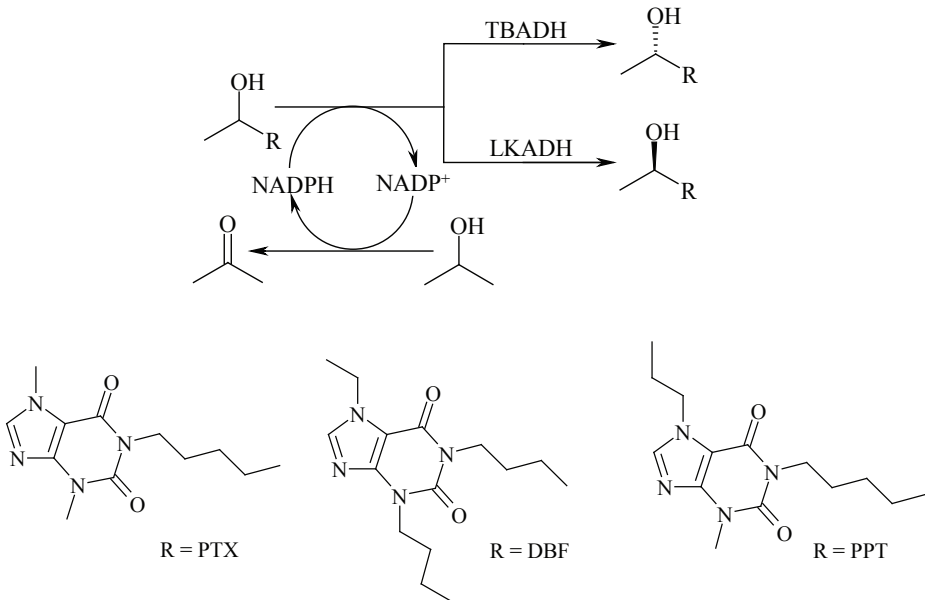
### 3.3. ALKOHOŁOWA DEHYDROGENAZA Z *THERMOANAEROBACTER BROCKII* (TBADH)

Średniołańcuchowa NADP<sup>+</sup>/NADPH-zależna dehydrogenaza alkoholowa wyizolowana z *Thermoanaerobacter Brockii* jest homotetramerem, a każda podjednostka zbudowana jest z 352 aminokwasów [47]. Zachowuje swoje właściwości w warunkach denaturujących takich jak wysoka temperatura (85°C) i wysokie stężenie rozpuszczalników organicznych [48]. Jej specyficzność substratowa jest bardzo szeroka i obejmuje zarówno mniejsze, jak większe objętościowo aldehydy oraz alifatyczne i cykliczne ketony. Ponadto biotransformacje z udziałem TBADH zachodzą z wysoką enancjoselektywnością. Niską wydajność wykazuje natomiast w stosunku do ketonów z długim łańcuchem alifatycznym lub pierścieniem aromatycznym. Ciekawym aspektem jest różna stereoselektywność powstających produktów, co wynika z obecności dwóch hydrofobowych domen (mniejszej i większej) wiążących substrat w centrum aktywnym. Produktami biokonwersji ketonów z niewielkim objętościowo podstawnikiem są (*R*)-alkohole, zaś o większym – (*S*)-alkohole [49]. TBADH z powodzeniem wykorzystano do produkcji feromonu jakim jest (*S*)-(+)-sulkatol poprzez wydajną konwersję (100%) i wysoce enancjoselektywną redukcję (*ee* > 99%) sulkatonu (Rys. 19) [48, 50].



Rysunek 19. Otrzymywanie sulcatolu z sulcotonu za pomocą TBADH  
 Figure 19. Biosynthesis of sulcatol from sulcotone with TBADH

Natomiast Pękała i Żelaszczyk przeprowadziły badania nad otrzymaniem obu enancjomerów pochodnych hydroksylowych metabolitów leków: pentoksyfiliny (PTX), denbufiliny (DBF) i propentofiliny (PPT) [51]. W tym celu zastosowano ADH z *T. brockii* i *L. kefir*. Biotransformacje z użyciem TBADH dostarczyły enancjomerycznie czystych form (S)-hydroksylowych pochodnych, zaś z LKADH izomerów R (Rys. 20).



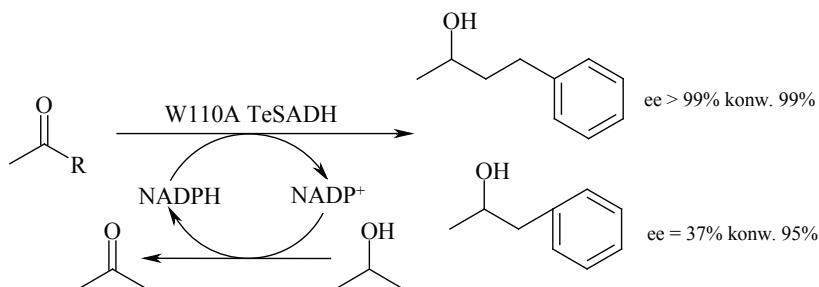
Rysunek 20. Utlenianie hydroksylowych pochodnych metabolitów leków za pomocą TBADH i LKADH  
 Figure 20. Oxidation of drug metabolites hydroxyl derivatives with TBADH and LKADH

#### 3.4. ALKOHOŁOWA DEHYDROGENAZA Z *THERMOANAEROBACTER ETHANOLICUS* (TESADH)

Połączenie technik chemicznych i biologicznych może służyć również w celu poszerzenia specyficzności substratowej enzymu oraz zwiększenia jego stereoselektywności. Przykładem jest modyfikacja sekwencji białkowej drugorzędowej dehydrogenazy wyizolowanej z *Thermoanaerobacter ethanolicus*. TeSADH jest wysoce

termostabilna i zachowuje właściwości katalityczne w rozpuszczalnikach organicznych oraz wykazuje aktywność w stosunku do szerokiego wachlarza substratów.

NADP<sup>+</sup>/NADPH-zależny TeSADH nie jest specyficzny dla (S)-1-fenyl-2-propanolu, który jest głównym prekursorem farmaceutyków zawierających drugorzędową grupę hydroksylową. W wyniku mutacji punktowej polegającej na wymianie jednej z walin na alaninę (W110A), TeSADH katalizował biotransformację (S)-1-fenyl-2-propanonu oraz (S)-4-fenyl-2-butanonu (Rys. 20), a także produkował (S)-4-fenyl-2-butanol z benzyloacetonu z ee > 99% [52]. Mutanta W110A TeSADH wykorzystano również do racemizacji enancjomerycznie czystych form (R)- i (S)- pochodnych fenylu posiadających drugorzędową grupę alkoholową [53].



Rysunek 21. Redukcja (S)-1-fenyl-2-propanonu oraz (S)-4-fenyl-2-butanonu za pomocą mutantu W110A TeSADH

Figure 21. Reduction of (S)-1-phenyl-2-propanone and (S)-4-phenyl-2-butanone by W110A TeSADH mutant

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] T. Kołek, *Biotransformacje*, AWA, Wrocław 2005.
- [2] J. Parkot, H. Gröger, W. Hummel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, **86**, 1813.
- [3] P. Goswami, S.S.R. Chinnadayala, M. Chakraborty, A.K. Kumar, A. Kakoti, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, **97**, 4259.
- [4] J. Rocha-Martín, D. Vega, J.M. Bolivar, A. Hidalgo, J. Berenguer, J.M. Guisán, F. López-Gallego, *Bioresour. Technol.*, 2012, **103**, 343.
- [5] A. Dołęga, *Coord. Chem. Rev.*, 2010, **254**, 916.
- [6] L. Lauterbach, O. Lenz, K.A. Vincent, *FEBS J.*, 2013, **280**, 3058.
- [7] O. de Smidt, J.C. du Preez, J. Albertyn, *FEMS Yeast Res.*, 2012, **12**, 33.
- [8] O. de Smidt, J. C. du Preez, J. Albertyn, *FEMS Yeast Res.*, 2008, **8**, 967.
- [9] Y. Pocker, *Chem. Biol. Interact.*, 2001, **130-132**, 383.
- [10] E. Magonet, P. Hayen, D. Delforge, E. Delaive, J. Remacle, *Biochem. J.*, 1992, **287** (2), 361.
- [11] F.M. Dickinson, G.P. Monger, *Biochem. J.*, 1973, **131**, 261.
- [12] B. Orlich, H. Berger, M. Lade, R. Schomäcker, *Biotechnol. Bioeng.*, 2000, **70**, 638.
- [13] F.M. Dickinson, S. Dack, *Chem. Biol. Interact.*, 2001, **130-132**, 417.
- [14] T. Kometani, Y. Morita, H. Yoshii, Y. Kiyama, R. Matsuno, *J. Ferment. Bioeng.*, 1995, **80**, 180.
- [15] K. Abokitse, W. Hummel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **62**, 380.
- [16] W. Kruse, W. Hummel, U. Kragl, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1996, **115**, 239.

- [17] B. Kosjek, W. Stampfer, M. Pogorevc, W. Goessler, K. Faber, W. Kroutil, *Biotechnol. Bioeng.*, 2004, **86**, 55.
- [18] M. Rauter, J. Kasprzak, K. Becker, K. Baronian, R. Bode, G. Kunze, H.-M. Vorbrod, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2014, **104**, 8.
- [19] B. Kosjek, W. Stampfer, R. van Deursen, K. Faber, W. Kroutil, *Tetrahedron*, 2003, **59**, 9517.
- [20] K. Inoue, Y. Makino, N. Itoh, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**, 2539.
- [21] N. Itoh, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, **98**, 3889.
- [22] H. Toda, R. Imae, N. Itoh, *Tetrahedron: Asymm.*, 2012, **23**, 1542.
- [23] P. Hildebrandt, T. Riermeier, J. Altenbuchner, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymm.*, 2001, **12**, 1207.
- [24] A. Çelik, F. Aktaş, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2013, **89**, 114.
- [25] C.A. Raia, S. D'Auria, *Biosens. Bioelectron.*, 1995, **10**, 135.
- [26] L. Álvarez, F. Acevedo, A. Illanes, *Process Biochem.*, 2011, **46**, 1342.
- [27] P.P. Giovannini, S. Hanau, M. Rippa, O. Bortolini, M. Fagnolo, A. Medici, *Tetrahedron*, 1996, **52**, 1669.
- [28] A. Pennacchio, L. Esposito, A. Zagari, M. Rossi, C.A. Raia, *Extremophiles*, 2009, **13**, 751.
- [29] A. Pennacchio, V. Sannino, G. Sorrentino, M. Rossi, C.A. Raia, L. Esposito, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, **97**, 3949.
- [30] H. Man, S. Gargiulo, A. Frank, F. Hollmann, G. Grogan, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2014, **105**, 1.
- [31] A. Pennacchio, B. Pucci, F. Secundo, F. La Cara, M. Rossi, C.A. Raia, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, **74**, 3949.
- [32] W. Kanchanarach, G. Theeragool, T. Yakushi, H. Toyama, O. Adachi, K. Matsushita, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, **85**, 741.
- [33] K. Velonia, I. Tsigos, V. Bouriotis, I. Smonou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1991, **9**, 65.
- [34] S.-X. Xie, J. Ogawa, S. Shimizu, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1999, **63**, 1721.
- [35] D. Zhu, H. T. Malik, L. Hua, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2006, **17**, 3010.
- [36] M. Stibor, M. Potocký, A. Picková, P. Karasová, N. J. Russell, B. Králová, *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, **32**, 532.
- [37] F. Boratyński, J. Pannek, P. Walczak, A. Janik-Polanowicz, E. Huszcza, E. Szczepańska, E. Martinez-Rojas, T. Olejniczak, *Process Biochem.*, 2014, **49**, 1637.
- [38] F. Boratyński, M. Smuga, C. Wawrzeńczyk, *Food Chem.*, 2013, **141**, 419.
- [39] T. Olejniczak, F. Boratyński, A. Białońska, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 6071.
- [40] C. Bradshaw, W. Hummel, C.H. Wong, *J. Org. Chem.*, 1992, **57** (5), 1532.
- [41] A. Weckebecker, W. Hummel, *Biocatal. Biotransform.*, 2006, **24**, 380.
- [42] P. Bisel, L. Walter, M. Nieger, W. Hummel, M. Müller, *Tetrahedron: Asymm.*, 2007, **18**, 1142.
- [43] D.M.-R. de Temiño, W. Hartmeier, M.B. Ansorge-Schumacher, *Enzyme Microb. Technol.*, 2005, **36**, 3.
- [44] N. Oberleitner, C. Peters, F. Rudroff, U.T. Bornscheuer, M.D. Mihovilovic, *J. Biotechnol.*, 2014, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.04.008.
- [45] M. Eckstein, M.V. Filho, A. Liese, U. Kragi, *Chem. Commun.*, 2004, 1084.
- [46] D. Drochner, M. Müller, *Eur. J. Org. Chem.*, 2001, **2001**, 211.
- [47] O. Bogin, M. Peretz, Y. Burstein, *Protein Sci.*, 1997, **6**, 450.
- [48] F.M. Bastos, T.K. França, G.D.C. Machado, G.F. Pinto, E.G. Oestreicher, L.M.C. Paiva, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2002, **19-20**, 459.
- [49] E. Keinan, E.K. Hafeli, K.K. Seth, R. Lamed, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 162.
- [50] F.M. Bastos, A.G. dos Santos, J. Jones Jr, E.G. Oestreicher, G.F. Pinto, L.M.C. Paiva, *Biotechnol. Tech.*, 1999, **13**, 661.
- [51] E. Pękala, D. Żelaszczyk, *Sci. Pharm.*, 2009, **77**, 9.

- 
- [52] M.M. Musa, K.I. Ziegelmann-Fjeld, C. Vieille, J.G. Zeikus, R.S. Phillips, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 30.
- [53] M.M. Musa, R.S. Phillips, M. Laivenieks, C. Vieille, M. Takahashie, S.M. Hamdane, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 2911.

Praca wpłynęła do Redakcji 4 listopada 2014

