

**PRZEMYSŁOWE ZASTOSOWANIA LIPAZ
W SYNTEZIE ZWIĄZKÓW O WYSOKIEJ WARTOŚCI
DODANEJ – 85 LAT KATALIZY ENZYMATYCZNEJ
LIPAZAMI. CZĘŚĆ II**

**INDUSTRIAL APPLICATIONS OF LIPASES IN THE
SYNTHESIS OF HIGH ADDED-VALUE CHEMICALS
– 85 YEARS OF LIPASE-BASED ENZYMATIC
CATALYSIS. PART II**

Paweł Borowiecki

*Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny, Instytut Biotechnologii,
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa
e-mail: pawel_borowiecki@onet.eu lub pborowiecki@ch.pw.edu.pl*

*Niniejszą pracę pragnę zadedykować wielkiemu mistrzowi
– Prof. dr hab. inż. Janowi Plenkiewiczowi z okazji jego 80-tych urodzin*

Abstract

Wprowadzenie

1. Procesy katalizowane przez lipazę z *Pseudomonas fluorescens* (PFL)
2. Procesy katalizowane przez lipazę z *Candida rugosa* (CRL)
3. Procesy katalizowane przez lipazę z *Thermomyces lanuginosus* (TLL)
4. Procesy katalizowane przez lipazę z *Rhizomucor miehei* (RML)
5. Procesy katalizowane przez lipazy: CAL-A, PPL, BPL, SML oraz SC-YM-1

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane



Mgr inż. Paweł Borowiecki w roku 2010 ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Uczestnik stażu zagranicznego w zespole Profesora Michela Therisod w Laboratoire de Chimie Bioorganique et Bioinorganique-LCBB Universite PARIS-SUD 11. Od 2010 r. pracownik Zakładu Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych (ZTiBŚL) w Instytucie Biotechnologii, Wydziału Chemicznego PW. Specjalność – synteza i stereochemia biologicznie aktywnych związków heterocyklicznych oraz kataliza enzymatyczna z zastosowaniem lipaz. Zainteresowania naukowe: *biała*

biotechnologia (biotransformacje związków organicznych), chemia medyczna oraz biotechnologia farmaceutyczna.

ABSTRACT

Biotransformations are processes, in which chemical reactions are catalyzed by isolated enzymes or whole cells containing them. Among the biocatalysts, lipases are the most commonly used chiral selectors that exhibit high chemo-, regio-, and stereo-selectivity toward wide spectrum of organic compounds of xenobiotic nature. Moreover, lipases are very stable and active in organic solvents, as well as in neat solvents or in supercritical fluids in the absence of added water. Biotransformations by using lipases can be carried out at high substrate concentrations, at ambient temperature and neutral pH, without need for addition of cofactors, application of high pressures, extremely harsh reaction conditions or complex chemical apparatus. In addition, processes based on efficient biocatalytic technologies has proven to be beneficial for the chemical industry, as the lipases are able to catalyze reactions, which are not easily conducted by classical methods or in other cases allow reactions, which can replace several chemical steps. The above mentioned features of lipase-based biotransformations often cause significant improvement in energy efficiency (savings), and lead to a reduction in waste generation thereby making manufacturing processes even more economically attractive and environmentally acceptable.

Since the mid-1980s the use of biotransformations with lipases in industry for the production of high added-value compounds, including pharmaceuticals, vitamins, cosmetics, fragrances and flavors, diagnostic preparations and therapeutics, high-tonnage preparation of agrochemicals, modified foods, nutraceuticals, detergents, polymers, advanced materials and biofuels has steadily increased.

In this part of the review article on industrial applications of lipases, next group of popularly utilized enzymes relevant for the production of high added-value chemicals are described. It was also shown on several examples that enzymatic catalysis can significantly simplify manufacturing processes of complex structures being green and economical alternative for conventional chemical-based processes.

Keywords: lipases, industrial applications, biocatalysis, enantiomerically pure compounds

Słowa kluczowe: lipazy, zastosowania przemysłowe, biokataliza, związki enancjomerycznie czyste

WPROWADZENIE

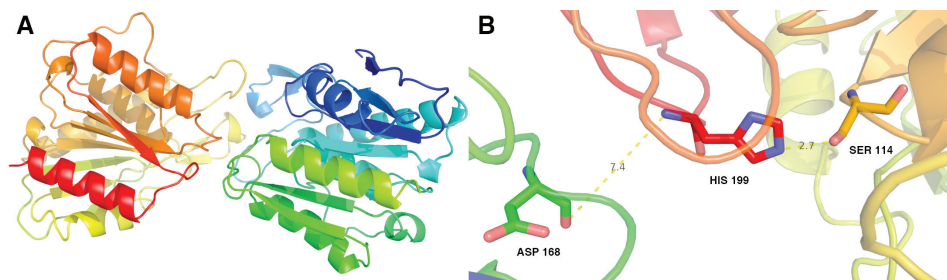
Biotechnologia jest uważana za jedną z dziedzin, która może decydować o prawidłowym rozwoju gospodarki w XXI wieku i co za tym idzie o postępie cywilizacyjnym oraz technicznym. Bardzo ważną rolę w rozwoju tej dziedziny odgrywa kataliza enzymatyczna, wchodząca w skład tzw. „białej biotechnologii”. Zaletą biokatalizy z udziałem enzymów lub całych komórek mikroorganizmów jest możliwość prowadzenia wysoce chemo-, regio- i stereo-selektywnych przekształceń związków organicznych w dużo prostszy i efektywniejszy sposób aniżeli za pomocą konwencjonalnych reakcji chemicznych. Ponadto zastosowanie biokatalizatorów umożliwia często realizację procesów, które z użyciem klasycznych metod są bardzo skomplikowane lub całkowicie niemożliwe do wykonania. Wprowadzenie biokatalizy do wielu istniejących już technologii chemicznych zagwarantowało zachowanie „czystości produkcji” z możliwością recyklingu, obniżenie nakładów na energię, redukcję liczby etapów syntezy oraz zmniejszenie ilości powstawania niebezpiecznych dla środowiska odpadów. Co więcej, możliwość zastąpienia drogich i trudnych w użyciu syntetycznych katalizatorów, bazujących często na toksycznych kompleksach metali grup przejściowych, przez biodegradowalne enzymy powoduje, że biotransformacje zalicza się do tzw. „zielonej chemii”. Dzięki wyżej wymienionym zaletom, różne gałęzie przemysłu coraz chętniej wykorzystują enzymy, w tym przede wszystkim lipazy, do wytwarzania produktów o wysokiej wartości dodanej. Dzisiaj lipazy, głównie z uwagi na ogromną różnorodność zastosowań, stanowią niezwykle ważną, z praktycznego punktu widzenia, grupę enzymów [1–3]. Ponieważ ich naturalnymi substratami są lipidy (triglicerydy, triacyloglicerole) znalazły one przede wszystkim szerokie zastosowanie w przemyśle tłuszczowym [4–13]. Jednakże lipazy z powodzeniem wykorzystywane są również w wielu innych gałęziach przemysłu, służąc jako katalizatory do wytwarzania modyfikowanej żywności [14–22], w tym nutraceutyków [23–33] oraz witamin [34–39] dla przemysłu spożywczego i/lub paszowego, a także farmaceutyków [40–58], agrochemikaliów [59–66], kosmetyków [67], związków zapachowych i smakowych [68–75], polimerów (w tym biodegradowalnych polimerów) [76–85], środków piorących (np. komponentów detergentów, surfaktantów etc.) [86–88], biopaliw [89–102] oraz zaawansowanych materiałów użytkowych [103–107]. Lipazy stosuje się coraz częściej w przerobie surowców odnawialnych [108], w przemyśle papierniczym [109, 110] czy w ochronie środowiska przy utylizacji zużytych olejów i smarów [111–113] oraz biodegradacji toksycznych ksenobiotyków [114].

W pierwszej części przeglądu literaturowego zaprezentowano dwie najczęściej stosowane w przemyśle lipazy, tj. lipazę B z *Candida antarctica* (CAL-B) oraz lipazę z *Burkholderia cepacia* (BCL). Celem niniejszej części jest przedstawienie praktycznych metod syntezy enancjomerycznie wzbogaconych związków o określonych właściwościach użytkowych, w tym m.in. aktywnych substancji farmaceutycznych (API) przy użyciu innych lipaz. Poniżej zaprezentowano przykłady przemysłowych

biotransformacji z użyciem lipaz pochodzenia bakteryjnego, grzybowego oraz zwierzęcego, w kolejności od najczęściej do najrzadziej stosowanych biokatalizatorów.

1. PROCESY KATALIZOWANE PRZEZ LIPAZĘ Z *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* (PFL)

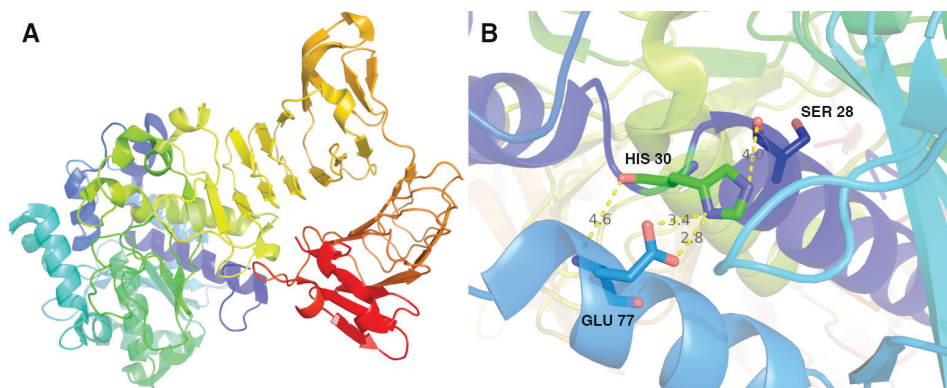
Lipaza izolowana z bakterii tlenowej *Pseudomonas fluorescens* (PFL) jest obok lipazy B z *Candida antarctica* oraz lipazy z *Burkholderia cepacia* najczęściej stosowanym enzymem w kinetycznych rozdzielach mieszanin racemicznych. PFL jest jednak zdecydowanie rzadziej używana w procesach przemysłowych pomimo swojej dużej skuteczności w działaniu, szerokiej tolerancji substratowej, dość niskiej cenie rynkowej oraz całkiem sporej stabilności operacyjnej jak na katalizator, który dostępny jest głównie w postaci natywnej (zachowuje pełną aktywność nawet w temperaturze 60–70°C). Niestety dość poważną wadą natywnej lipazy z *Pseudomonas fluorescens* jest forma bardzo drobnego beżowego proszku, w której występuje, a który to w sposób znaczny utrudnia jej skuteczne oddzielenie od składników mieszaniny porakcyjnej, uniemożliwiając przez to w większości przypadków powtórne jej wykorzystanie. Być może właśnie ta uciążliwość jest główną przyczyną, iż technolodzy sięgają zdecydowanie częściej po inne lipazy. Co ciekawe, pomimo upływu wielu lat od momentu pierwszej skutecznej próby wyizolowania PFL oraz przeprowadzonych licznych badań nad zastosowaniem jej w syntezie asymetrycznej [115, 116], można śmiało stwierdzić, że nadal niewiele wiadomo na temat tego enzymu. Powodem jest brak jednoznacznej struktury krystalicznej, co w znaczny sposób utrudnia badania. Początkowo błędnie sądzono, że lipaza ta jest zbliżona budową do innego enzymu wydzielanego z *Pseudomonas fluorescens*, a mianowicie karboksyoesterazy (PFC) (Rys. 1) [117].



Rysunek 1. (A) Struktura 3D karboksyoesterazy z *Pseudomonas fluorescens* (PFC) (PDB ID: 1AUO). (B) Ułożenie przestrzenne reszt aminokwasowych (AK) wchodzących w skład tzw. „triady katalitycznej” (Asp 168, His 199, Ser 114) należącej do centrum aktywnego PFC (wzajemne odległości między AK podane zostały w Angstrmach). Struktura krystaliczna białka enzymatycznego została pobrana z bazy Protein Data Bank (PDB) oraz przetworzona za pomocą programu Pymol vs 0,99

Figure 1. (A) The 3D structure of carboxyesterase from *Pseudomonas fluorescens* (PFC) (PDB ID: 1AUO). (B) The spatial orientation of the amino acid (AAs) residues in the so-called “catalytic triad” (Asp 168, His 199, Ser 114) belonging to the active-site of PFC (the mutual distance between the AAs are given in Angstroms). Crystal structure of enzymatic protein was downloaded from the Protein Data Bank (PDB), and processed using Pymol vs 0,99

Obecnie, dzięki znajomości jej sekwencji aminokwasowej (liczącej 617 AK) dostępnej na stronie internetowej bazy UniProtKB o kodzie: Q0PM63_PSEFL [118] oraz na podstawie przeprowadzonej analizy porównawczej polegającej na wyszukiwaniu homologii strukturalnej z użyciem internetowej bazy SRS@EBI [119], przypuszcza się jak potencjalnie wygląda PFL. I tak, na podstawie analizy porównawczej stwierdzono, że jest ona w 88% homologiem innego taksonomicznie zbliżonego doń enzymu – lipazy z *Pseudomonas sp.* MIS30 (Rys. 2) [120].



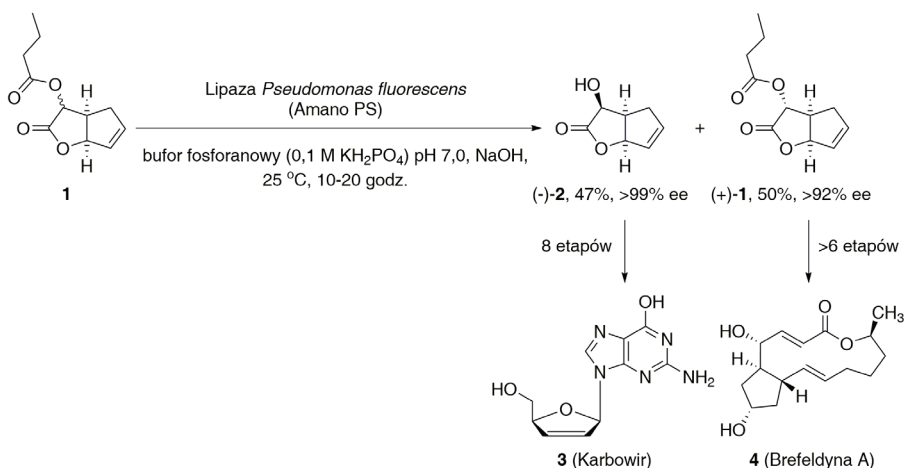
Rysunek 2. (A) Struktura 3D lipazy z *Pseudomonas sp.* MIS38 (PDB ID: 2Z8X). (B) Ułożenie przestrzenne reszt aminokwasowych (AK) wchodzących w skład tzw. „triady katalitycznej” (Glu 77, His 30, Ser 28) należącej do centrum aktywnego [wzajemne odległości między AK podane zostały w Angstrmach]. Struktura krystaliczna białka enzymatycznego została pobrana z bazy Protein Data Bank (PDB) oraz przetworzona za pomocą programu Pymol vs 0,99

Figure 2. (A) The 3D structure of lipase from *Pseudomonas sp.* MIS38 (PDB ID: 2Z8X). (B) The spatial orientation of the amino acid (AAs) residues in the so-called “catalytic triad” (Glu 77, His 30, Ser 28) belonging to the active-site (the mutual distance between the AAs are given in Angstroms). Crystal structure of enzymatic protein was downloaded from the Protein Data Bank (PDB), and processed using Pymol vs 0,99

Po zastosowaniu odpowiednich metod komputerowych, w tym narzędzi do modelowania porównawczego (MOE align tool), modeli homologii, modeli subtelnych z użyciem minimalizacji energii całkowitej oraz lokalnej, jak również analizy wyników wykresów Ramachandrana [wykresów wartości międzycząsteczkowych kątów torsyjnych φ (fi) względem wartości kątów ψ (psi), obrazujących dozwolone i niedozwolone rotacje w łańcuchu peptydowym] ustalono, że PFL złożona jest z dwóch strukturalnie różnych domen, których rdzeń składa się z β -kartki połączonej kilkoma rzadko ułożonymi pętlami. Domena zawierająca triadę katalityczną (Ser 207, His 313, Asp 255) wykazuje klasyczny dla hydrolaz typ pofałdowania cylindra (α/β -pofałdowanie).

Preparat natywnej lipazy z *Pseudomonas fluorescens* (Amano PS) zastosowano m.in. do rozdziału kinetycznego 4-*endo*-butanoiloksy-Z-oksabicyklo[3.3.0]okt-7-en-3-onu (**1**) polegającego na diastereoselektywnej hydrolizie w buforze fosforanowym (Schemat 1) [121–123]. Niżej przedstawiony proces enzymatyczny został opra-

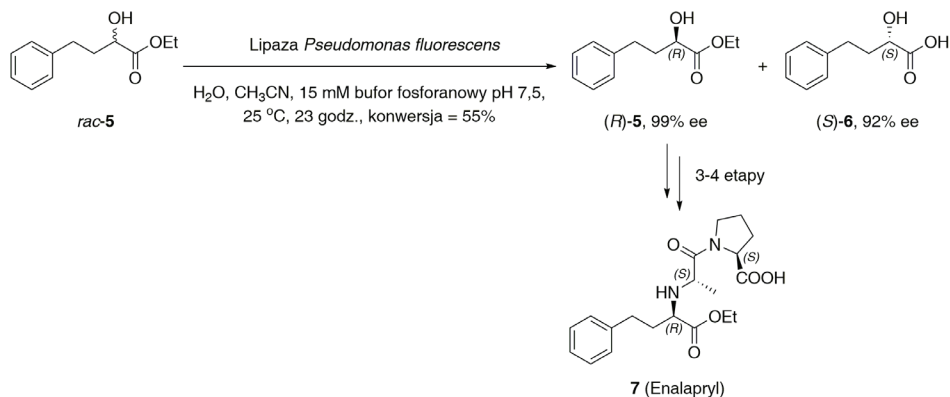
cowany w skali 2,4 kg użytego substratu **1** przez angielską firmę *Celltech Group plc*, a rozdzielone w ten sposób enancjomery wydzielone chromatograficznie w postaci powstałego alkoholu (-)-**2** (>99% ee) oraz nieprzereagowanego estru (+)-**1** (92% ee) posłużyły odpowiednio do syntezy bardzo skutecznego leku antywirusowego stosowanego w przypadku zakażeń HIV [karbowiru (**3**)] oraz makrocyklicznego laktonu o właściwościach antybiotycznych [brefeldyny A (**4**)], którego działanie polega na hamowaniu wczesnej sekrecji białek między retikulum endoplazmatycznym a aparatem Golgiego.



Schemat 1. Chemoenzymatyczna synteza karbowiru (**3**) oraz brefeldyny A (**4**) katalizowana natywną lipazą z *Pseudomonas fluorescens* (Amano PS)

Scheme 1. Chemoenzymatic synthesis of carbovir (**3**) and brefeldin A (**4**) catalyzed by native lipase from *Pseudomonas fluorescens* (Amano PS)

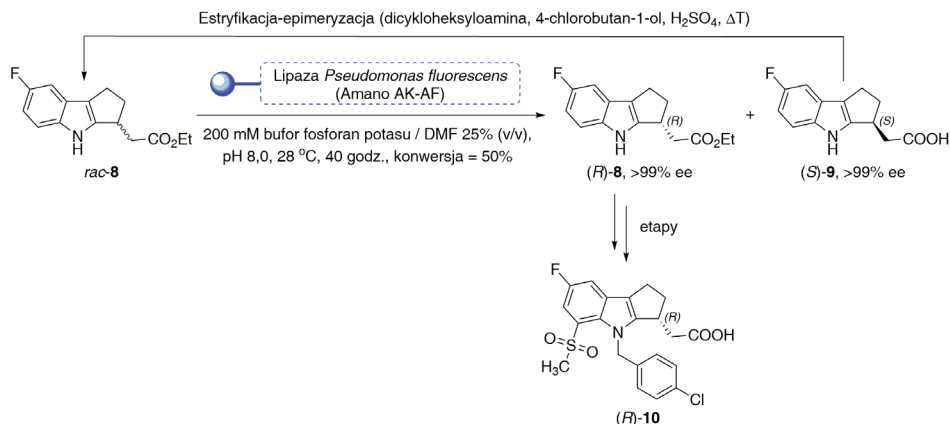
Zastosowanie przez hiszpańską firmę *Vita-Invest S.A.* natywnej lipazy z *Pseudomonas fluorescens* w procedurze hydrolitycznego rozdziału kinetycznego 2-hydroksy-4-fenyllobutanianu etylu (*rac*-**5**) przyczyniło się do opracowania wydajnej technologii produkcji enalaprylu (**7**) – leku należącego do grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny, wykazującego działanie hipotensyjne i stosowanego w terapii nadciśnienia tętniczego oraz w innych schorzeniach układu sercowo-naczyniowego (Schemat 2) [124]. Kluczowy do jego syntezy, optycznie czynny prekursor – α -hydroksy ester (*R*)-**5** – otrzymywano w skali 10 gramowej z bardzo wysoką czystością optyczną (99% ee) po 23 godzinach reakcji dla konwersji substratu *rac*-**5** wynoszącej 55%. Co ciekawe, enzym pomimo natywnej formy, ze względu na zastosowanie bardzo łagodnych warunków reakcji [woda/ acetonitryl/bufor; pH 7,5; 25°C] mógł zostać użyty powtórnie co najmniej w kolejnych 10 cyklach.



Schemat 2. Chemoenzymatyczna synteza enancjomerycznie wzbogaconego enalaprylu (7) z użyciem natywnej PFL

Scheme 2. Chemoenzymatic synthesis of enantiomerically enriched enalapril (7) by using native PFL

Lipaza z *Pseudomonas fluorescens* została również zastosowana przez koncern Merck & Co., Inc. w technologii otrzymywania kwasu [(3*R*)-4-(4-chlorobenzyl)-7-fluoro-5-(metylosulfonylo)-1,2,3,4-tetrahydrocyclopenta[*b*]indol-3-yl]octowego [(*R*)-**10**] – chiralnego antagonisty receptora prostaglandyny D2 (DP) stosowanego w leczeniu alergicznego nieżytu nosa (ANN) (Schemat 3) [125, 126]. Zoptymalizowane medium reakcyjne zawierające dimetyloformamid oraz bufor fosforanowy pozwalający na utrzymanie lekko zasadowego środowiska (pH 8,0) umożliwia efektywne katalizowanie hydrolizy racemicznego estru *rac-8* przez immobilizowaną lipazę Amano AK-AF. W ciągu 40 godzin prowadzenia reakcji w temperaturze 28°C zastosowana lipaza katalizuje z 50% konwersją wysoce enancjoselektywną transformację niepotrzebnego (*S*)-enancjomeru racematu *rac-8* w optycznie czysty kwas (*S*)-**9** (>99% ee), pozostawiając pożądany (*R*)-enancjomer w postaci nieprze-reagowanego enancjomerycznie czystego indolowego estru (*R*)-**8** (>99% ee). W celu zwiększenia produktywności procesu, kwas (*S*)-**9** poddawany jest recyklingowi przez estryfikację z jednoczesną epimeryzacją realizowaną z użyciem dicykloheksyloaminy oraz 4-chlorobutan-1-olu w obecności kwasu siarkowego. Zoptymalizowany proces realizowany jest okresowo w skali 400 litrowej z zastosowaniem 40 kg racemicznego substratu *rac-8*.



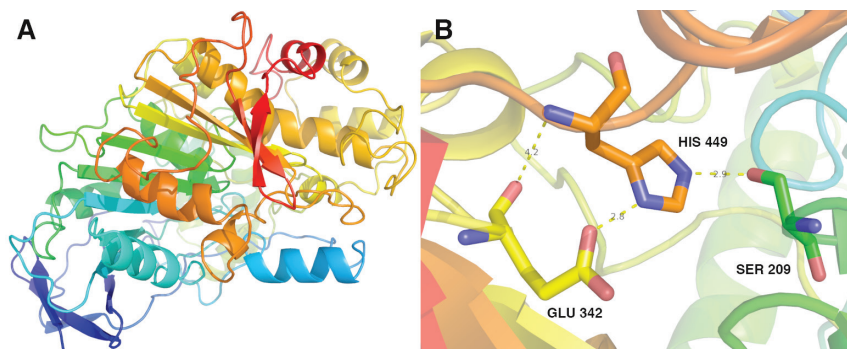
Schemat 3. Chemoenzymatyczna synteza antagonisty receptora prostaglandyn D2 (DP) [(R)-10] katalizowana lipazą Amano AK-AF

Scheme 3. Chemoenzymatic synthesis of prostaglandin D2 receptor antagonist [(R)-10] catalyzed by Amano AK-AF lipase

2. PROCESY KATALIZOWANE PRZEZ LIPAZĘ Z *CANDIDA RUGOSA* (CRL)

Kolejnym, chętnie stosowanym w laboratoriach oraz przemyśle biokatalizatorem jest lipaza z patogennego grzyba *Candida rugosa* (CRL) (formalnie *Candida cylindracea*, CCL) (Rys. 3). Mikroorganizm ten wytwarza różne izoformy lipaz (Lip1, Lip2, Lip3), które znacznie różnią się od siebie właściwościami katalitycznymi [127]. Każdy gen koduje łańcuch polipeptydowy składający się z 534 reszt aminokwasowych o łącznej masie cząsteczkowej rzędu 60 kDa [128]. CRL jest złożona z pojedynczej domeny białkowej z charakterystycznym dla hydrolaz pofałdowaniem typu α/β . Białkowe rusztowanie zbudowane jest z centralnej 11-skrętej β -kartki oraz *N*-terminalnej 3-skrętej β -kartki [129]. Obie struktury krystaliczne tego enzymu, występujące zarówno w konformacji otwartej (PDB ID: 1CRL) jak również zamkniętej (PDB ID: 1GZ7) dostępne są za pośrednictwem bazy PDB. Lipaza z *Candida rugosa* jest bardzo uniwersalnym enzymem przejawiającym szczególnie wysoką aktywność katalityczną w reakcjach estryfikacji i transestryfikacji triacylgliceroli, a także hydrolizy i alkoholizy wielu hydrofobowych estrów. Dzięki swym doskonałym właściwościom, CRL znalazła wszechstronne zastosowanie głównie przy produkcji modyfikowanych cukrów, olejów oraz kwasów tłuszczowych wykorzystywanych w przemyśle spożywczym oraz perfumeryjnym [130–135]. Cechą charakterystyczną tej lipazy oprócz faktu, że w skład jej triady katalitycznej zamiast kwasu asparaginowego (Asp) wchodzi kwas glutaminowy (Glu), jest posiadanie bardzo szerokiej i łatwo dostępnej kieszeni zlokalizowanej wokół centrum aktywnego [136]. To sugerować może, że enzym ten powinien katalizować skuteczne przekształcenia licznej grupy ksenobiotyków, włącznie z tymi o bardzo rozbudowanych

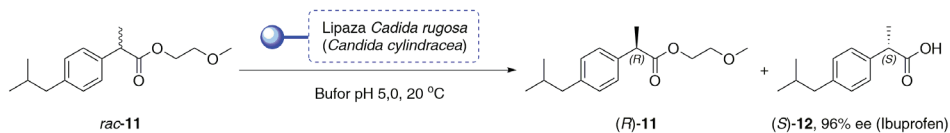
strukturach, które nie są w stanie dyfundować do centrów katalitycznych innych lipaz o węższych kieszeniach. Niestety, wielkość tej kieszeni, w której znajduje się centrum aktywne, stanowi dodatkowo też wadę, gdyż uniemożliwia w wielu przypadkach zachowanie pożądanej selektywności wobec biotransformowanych cząstek. Najprawdopodobniej właśnie z tym faktem wiąże się mała ilość zastosowań przemysłowych tego enzymu. Niemniej jednak, trzy zaprezentowane poniżej technologie opracowane w skali multi-kilogramowej zasługują na wyróżnienie.



Rysunek 3. (A) Struktura 3D lipazy z *Candida rugosa* (PDB ID: 1TRH) występującej w konformacji nieaktywnej. (B) Ułożenie przestrzenne reszt aminokwasowych (AK) wchodzących w skład tzw. „triady katalitycznej” (Glu 341, His 449, Ser 209) należącej do centrum aktywnego CRL (wzajemne odległości między AK podane zostały w Angstrmach). Struktura krystaliczna białka enzymatycznego została pobrana z bazy Protein Data Bank (PDB) oraz przetworzona za pomocą programu Pymol vs 0,99

Figure 3. (A) The 3D structure of lipase from *Candida rugosa* (PDB ID: 1TRH). (B) The spatial orientation of the amino acid (AAs) residues in the so-called “catalytic triad” (Glu 341, His 449, Ser 209) belonging to the active-site of CRL (the mutual distance between the AAs are given in Angstroms). Crystal structure of enzymatic protein was downloaded from the Protein Data Bank (PDB), and processed using Pymol vs 0,99

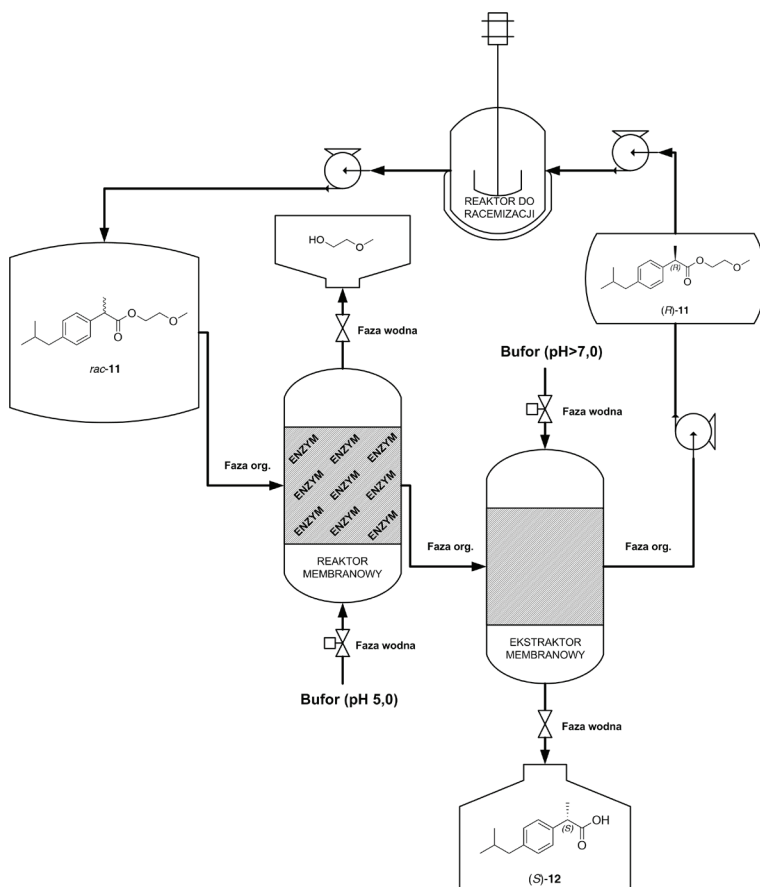
Historycznie pierwszym, w pełni komercyjnym procesem biokatalitycznym z udziałem lipazy z *Candida rugosa* (*cylindracea*) jest opracowana przez międzynarodowy koncern *Pfizer Inc.* przemysłowa metoda syntezy farmakologicznie czynnego (S)-(+)-enancjomeru ibuprofenu [(S)-**12**] (deksibuprofenu) – jednego z najlepiej sprzedających się niesteroidowych leków przeciwzapalnych (Schemat 4) [137–139]. Enancjomerycznie wzbogacony kwas (2S)-2-[4-(2-metylopropylo)fenylo]propanowy [(S)-**12**] (96% ee) otrzymywany jest w wyniku rozdziału kinetycznego polegającego na enancjoselektywnej hydrolizie racemicznego estru 2-metoksyetylowego kwasu 2-[4-(2-metylopropylo)fenylo]propanowego (*rac*-**11**) katalizowanej immobilizowaną lipazą CCL w układzie dwufazowym w temperaturze 20°C.



Schemat 4. Chemoenzymatyczna synteza farmakologicznie aktywnego (S)-enancjomeru ibuprofenu [(S)-12] z zastosowaniem lipazy z *Candida rugosa* immobilizowanej na porowatej membranie

Scheme 4. Chemoenzymatic synthesis of pharmacologically active (S)-enantiomer of ibuprofen [(S)-12] by using lipase from *Candida rugosa* immobilized on the porous membrane

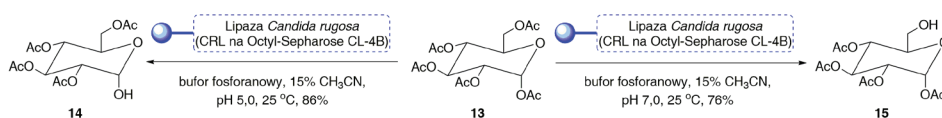
Koszty wydzielania produktów rozdziału kinetycznego z medium reakcyjnego stanowią istotną część kosztów całej produkcji, stanowiąc o jej efektywności ekonomicznej. Rozdział kwasu i estru jest stosunkowo prosty, nie mniej w firmie *Pfizer* postanowiono zastosować alternatywny sposób rozdziału enancjomerów przy produkcji deksibuprofenu [(S)-12]. Użyto układu dwóch połączonych reaktorów membranowych wyposażonych w selektywne przegrody filtracyjne wykonane z odpowiednich polimerów. W pierwszym reaktorze zachodzi katalizowana lipazą enancjoselektywna hydroliza (S)-estru i oddzielenie metoksyetanolu, a w drugim oddzielenie nieprzereagowanego (R)-estru od deksibuprofenu [(S)-12] (Schemat 5). Membrana w pierwszym reaktorze spełnia obok swej funkcji rozdzielczej, również rolę katalizatora przemiany racemicznego estru *rac-11*, gdyż dodatkowo w jej porach, w sposób niekowalencyjny, „uwięziony” został enzym. Zastosowanie w tym przypadku techniki membranowej nie tylko zmniejszyło zużycie energii oraz materiałów, ale także w sposób prosty umożliwiło oddzielenie katalizatora od produktów reakcji. Co więcej, ponieważ rozpuszczalność hydrofobowego estru *rac-11* w wodzie jest znacznie ograniczona (<1 mM), zastosowanie dwukomorowego reaktora z membraną oddzielającą oraz stabilizującą obie fazy (H₂O/organiczna) umożliwiło ograniczenie użycia dużych objętości obu cieczy. Membrana poza wyżej wymienionymi zasadniczymi funkcjami (rozdzielczą i katalityczną), korzystnie wpływa na stan równowagi w układzie reagentów poprzez zagwarantowanie sukcesywnego usuwania powstającego kwasu (S)-12 z medium reakcyjnego. Ta operacja jest możliwa dzięki zastosowaniu dodatkowego modułu membranowego w postaci ekstraktora, w którym powstający optycznie czynny kwas (S)-12 wymywany jest na bieżąco za pomocą roztworu buforowego o zasadowym pH. Ostatecznie, aby otrzymać finalny produkt (S)-12, pH roztworu powstałej soli tego kwasu doprowadzono odpowiednio do odczynu kwaśnego. Natomiast w fazie organicznej pozostaje wówczas nieprzereagowany chiralny ester (R)-11, który poddany racemizacji może być ponownie wykorzystywany.



Schemat 5. Schemat technologiczny produkcji deksibuprofenu [(S)-12]
 Scheme 5. Technological scheme for the production of dexibuprofen [(S)-12]

Bardzo ciekawą przemysłową metodę regioselektywnej hydrolizy pentaocetanowej pochodnej glukozy **13** do tetraoctanu glukozy (**14** lub **15**) w obecności immobilizowanej lipazy z *Candida rugosa* opracowała firma Vita-Invest S.A. (Schemat 6) [140]. Olbrzymią zaletą tego procesu jest możliwość prostego sterowania regioselektywnością reakcji enzymatycznej za pomocą zmiany pH roztworu. W przypadku gdy kwasowość medium reakcyjnego ustali się na poziomie pH 5,0 otrzymuje się z bardzo wysoką selektywnością oraz wydajnością (86%) 2-*O*-deacylowaną pochodną **14**. Natomiast gdy środowisko reakcji będzie obojętne (pH 7,0), wówczas przeważającym produktem reakcji izolowanym z wydajnością 76% jest 6-*O*-deacylowana pochodna glukozy **15**. Metoda zaprezentowana przez hiszpańskich inżynierów stanowi bardzo atrakcyjny sposób otrzymywania nieracemicznych, nienaturalnych pochodnych glukozy. Co więcej, w technologii tej wykorzystuje się stosunkowo tanią i łatwo dostępną pentaacetylo- β -*D*-glukopiranozę (**13**), a samą reakcję prowadzi się w łagodnych warunkach (roztwór buforu z dodatkiem

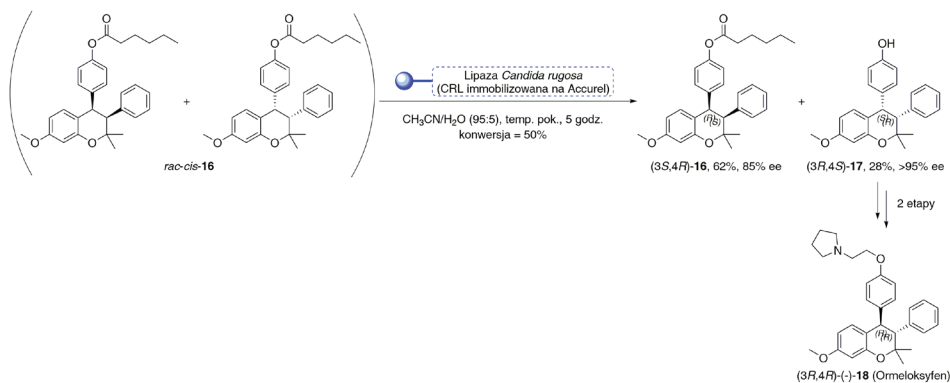
acetonitrylu, w temperaturze 25°C). Dodatkowym atutem procesu jest zastosowanie lipazy z *Candida rugosa* immobilizowanej na oktylo-sefarozie (Octyl-Sepharose CL-4B), co pozwoliło zwiększyć jej aktywność hydrolityczną prawie 100-krotnie w porównaniu z natywnym enzymem oraz powtórnie zastosować ją w co najmniej kilkunastu cyklach reakcyjnych.



Schemat 6. Regioselektywna hydroliza 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetylo-β-*D*-glukopiranozy (**13**) katalizowana przez lipazę z *Candida rugosa* immobilizowaną na Octyl-Sepharose CL-4B

Scheme 6. Regioselective hydrolysis of 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl-β-*D*-glucopyranose (**13**) catalyzed by lipase from *Candida rugosa* immobilized on Octyl-Sepharose CL-4B

Kolejnym przykładem komercyjnego użycia lipazy z *Candida rugosa* jest opracowana przez duńską firmę *Novo Nordisk A/S* technologia otrzymywania optycznie czynnego (–)-ormeloksyfenu [(3*R*,4*R*)-(–)-**18**] – selektywnego modulatora receptorów estrogenowych, stosowanego głównie jako niehormonalny, niesteroidowy lek antykoncepcyjny (Schemat 7) [141]. (–)-Ormeloksyfen [(3*R*,4*R*)-(–)-**18**] wykorzystywany jest również w leczeniu nieprawidłowych krwawień z macicy wywołanych mięśniakami tego narządu, w terapiach raka piersi, a także w profilaktyce osteoporozy. Kluczowy do jego syntezy chiralny, nieracemiczny związek pośredni (3*R*,4*S*)-(–)-**17** otrzymywany jest w wyniku zastosowania bardzo prostego i wydajnego rozdziału kinetycznego polegającego na hydrolizie racemicznego heksanianu *rac-cis*-**16** katalizowanej lipazą z *Candida rugosa* immobilizowaną na hydrofobowym porowatym nośniku Accurel®. W warunkach rozdziału kinetycznego prowadzonego w acetonitrylu z dodatkiem wody, w temperaturze pokojowej, uzyskiwano po 5 godzinach 50-procentową konwersję estru *rac-cis*-**16** w odpowiedni nieracemiczny fenol (3*R*,4*S*)-(–)-**17** o nadmiarze enancjomerycznym >95% z wydajnością 28% przy enacjoselektywności reakcji *E*>100. Co prawda proces został zoptymalizowany zaledwie w skali 10 gramowej, ale nieprzereagowany ester (3*S*,4*R*)-(–)-**16** (85% ee) izolowany z wydajnością 62% można poddawać powtórnemu rozdziałowi. Użyty w procesie katalizator stosowany był bez znacznych strat aktywności oraz selektywności w co najmniej kilku cyklach reakcyjnych.

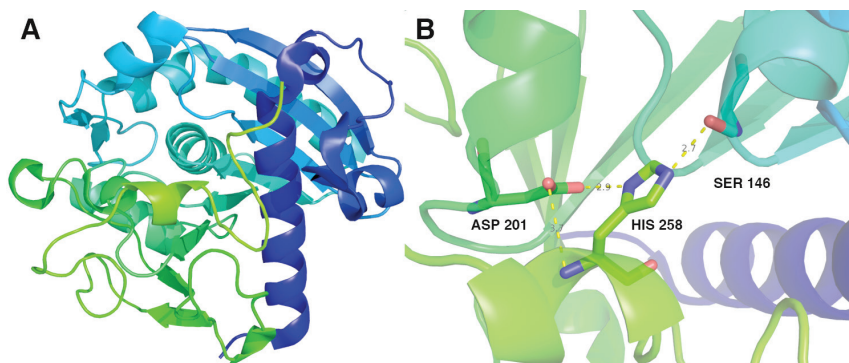


Schemat 7. Chemoenzymatyczna synteza enancjomerycznie wzbogaconego (-)-ormeloksyfenu [(3*R*,4*R*)-(-)-**18**] z zastosowaniem lipazy z *Candida rugosa* immobilizowanej na Accurel®

Scheme 7. Chemoenzymatic synthesis of enantiomerically enriched (-)-ormeloxifen [(3*R*,4*R*)-(-)-**18**] by using lipase from *Candida rugosa* immobilized on Accurel®

3. PROCESY KATALIZOWANE PRZEZ LIPAZĘ Z *THERMOMYCES LANUGINOSUS* (TLL)

Enzymem również wartym omówienia jest lipaza izolowana z *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (formalnie *Humicola lanuginosus*). Enzym ten składa się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego zbudowanego z 269 reszt aminokwasowych. Jego masa cząsteczkowa wynosi 31 700 g/mol (ok. 30 kDa), a punkt izoelektryczny (pI) ma wartość 4,4. Lipaza ta posiada sferyczny kształt o wymiarach $35 \text{ \AA} \times 45 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA}$ i zawiera centralnie położoną 8-skrętną β -kartkę z pięcioma połączonymi ze sobą α -helisami (Rys. 4). Kieszkań aktywna ulokowana w hydrofobowej szczeliny zawiera typową dla hydrolaz triadę katalityczną (Ser-His-Asp) i przesłaniana jest przez powierzchnię amfipatycznej α -helikalnie skręconej pętli składającej się z 86–93 reszt aminokwasowych [142]. Fragment ten ulega swobodnej rotacji i odgrywa w białku rolę ruchomego „wieczka”, broniącego dostępu do centrum katalitycznego. Lipaza TLL z racji na swoją dużą aktywność w temperaturach 55–60°C, z jej maksimum przypadającym na pH w okolicach 9,0 (choć niektóre źródła podają pH 11–12), zaliczana jest do tzw. „termo-stabilnych alkalifilów”, szczególnie skutecznych w procesach hydrolitycznych. Poza licznymi zastosowaniami przemysłowymi, takimi jak produkcja środków piorących czy biopaliw, modyfikacja olejów oraz tłuszczów z przeznaczeniem dla sektora spożywczego (w tym m.in. przetwórstwo tłuszczów mlecznych oraz synteza glicerydów dla margaryn), enzymatyczna degradacja polimerów, zużytych olejów i przetworzonych smarów, a także oczyszczanie ścieków technologicznych z przemysłu mięsnego [143], najciekawszymi z punktu widzenia tematyki tego przeglądu są technologie poświęcone produkcji substancji biologicznie aktywnych.

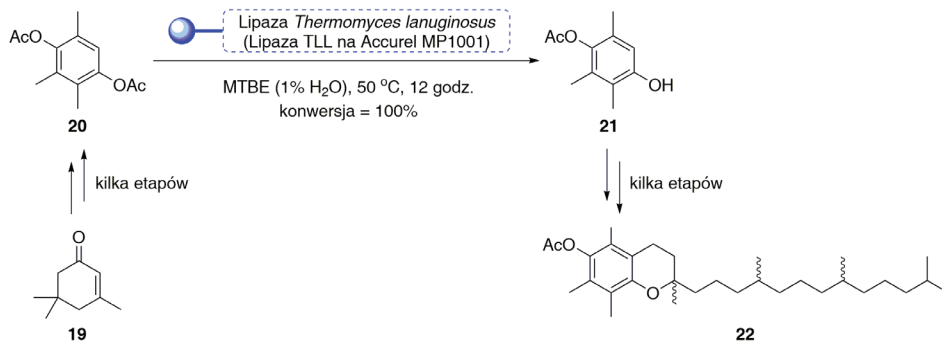


Rysunek 4. (A) Struktura 3D lipazy z *Thermomyces lanuginosus* (PDB ID: 1DTE). (B) Ułożenie przestrzenne reszt aminokwasowych (AK) wchodzących w skład tzw. „triady katalitycznej” (Asp 201, His 258, Ser 146) należącej do centrum aktywnego TLL (wzajemne odległości między AK podane zostały w Angstrmach). Struktura krystaliczna białka enzymatycznego została pobrana z bazy Protein Data Bank (PDB) oraz przetworzona za pomocą programu Pymol vs 0.99

Figure 4. (A) The 3D structure of lipase from *Thermomyces lanuginosus* (PDB ID: 1DTE). (B) The spatial orientation of the amino acid (AAs) residues in the so-called “catalytic triad” (Asp 201, His 258, Ser 146) belonging to the active-site of TLL (the mutual distance between the AAs are given in Angstroms). Crystal structure of enzymatic protein was downloaded from the Protein Data Bank (PDB), and processed using Pymol vs 0,99

Przykładem jest opracowana przez technologów ze szwajcarskiej firmy *Roche Vitamins AG* chemoenzymatyczna metoda syntezy octanu α -tokoferolu (**22**, Schemat 8) – estrowej pochodnej jednego z głównych składników witaminy E o bardzo silnych właściwościach antyoksydacyjnych [144, 145]. W procesie tym wykorzystano tani i łatwo dostępny α -izoforon (**19**), który w wyniku kilku etapowej syntezy z użyciem klasycznych reakcji chemicznych przekształcono w dioctan trimetylohydrochinonu (**20**). Związek ten następnie poddano regioselektywnej hydrolizie katalizowanej immobilizowaną na hydrofobowym polipropylenowym nośniku (Accurel MP1001) lipazą z *Thermomyces lanuginosus*. Dzięki zastosowaniu immobilizowanego preparatu TLL, zawieszono w nasyconym wodą eterze *tert*-butyloowo-metylowym (MTBE), otrzymano w sposób praktycznie ilościowy odpowiedni mono-octan **21** (z konwersją 100%), bez nawet śladowych ilości zanieczyszczeń drugim regioizomerem czy produktem całkowitej hydrolizy (trimetylohydrochinonem). Co więcej, zastosowanie matrycy Accurel MP1001 umożliwiło 10-krotne zwiększenie aktywności hydrolitycznej enzymu bez negatywnego wpływu na wyniki regioselektywności nawet w podwyższonej temperaturze (55°C). Warto zwrócić uwagę, że przy pomocy opracowanej metodologii możliwa była nie tylko wysoce regioselektywna enzymatyczna hydroliza dioctanu **20**, której nie sposób przeprowadzić wyłącznie za pomocą metod chemicznych, ale również całkowite zastąpienie dotychczas stosowanego w przemyśle neuralgicznego etapu kondensacji trimetylohydrochinonu izofitolem w obecności kwaśnego chlorku cynku, która wymaga użycia bardzo kosztownego 2,3,6-trimetylofenolu jako substratu. Dodatkowo, produkcja α -tokoferolu w postaci pochodnej octanowej **22** zwiększa jego odporność na działanie promienio-

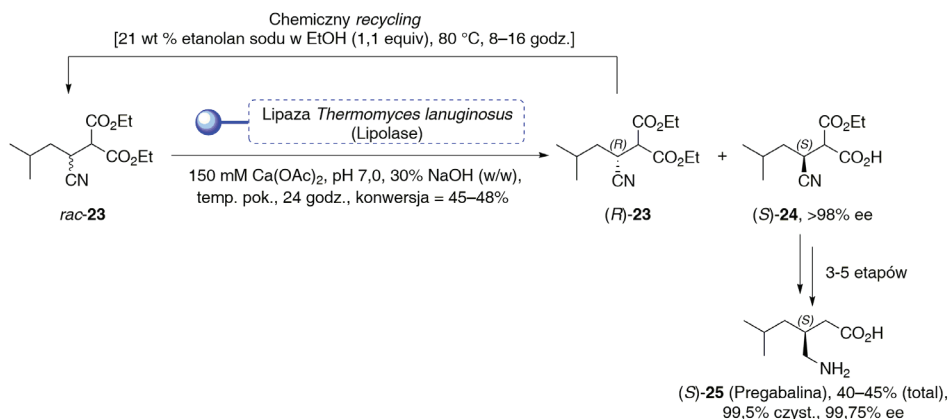
wania UV co powoduje, że jest on chętniej wykorzystywany jako przeciwutleniacz w produktach spożywczych i/lub jako surowiec kosmetyczny wchodzący w skład kremów, ze względu na możliwość dłuższego ich przechowywania.



Schemat 8. Chemoenzymatyczna synteza racemicznego octanu α -tokoferolu (**22**) katalizowana lipazą z *Thermomyces lanuginosus* immobilizowaną na Accurel MP1001

Scheme 8. Chemoenzymatic synthesis of racemic α -tocopherol (**22**) catalyzed by lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on Accurel MP1001

Innym przykładem zastosowania lipazy z *Thermomyces lanuginosus* jest opracowana przez firmę Pfizer bardzo wydajna chemoenzymatyczna synteza kwasu (S)-(+)-3-aminometylo-5-metyloheksanowego [(S)-**25**, pregabaliny] (Schemat 9) – lipofilowej pochodnej kwasu γ -aminomasłowego (GABA) stosowanej w leczeniu epilepsji, bólu neuropatycznego, fobii społecznej oraz zespołu lęku uogólnionego [146]. Metoda otrzymywania tego leku polega na enzymatycznej hydrolizie racemicznego estru etylowego kwasu 2-karboksyetylo-3-cyjano-5-metyloheksanowego (*rac*-**23**) za pomocą wodnego roztworu hemihydratu dioctanu wapnia katalizowanej immobilizowaną lipazą TLL dostępną w handlu w postaci usieciowanego agregatu (Lipolase®). Reakcja prowadzona jest w skali 10 kg *rac*-**23** w warunkach kontroli kinetycznej w temperaturze pokojowej przez 24 godziny, utrzymując pH w zakresie neutralnym za pomocą ciągłego dodawania 30% (w/w) wodnego roztworu wodorotlenku sodu. Rozdział kinetyczny stereoizomerów chiralnego diestru *rac*-**23** przerywany przy konwersji 45–48% umożliwia otrzymanie optycznie czynnego kwasu (S)-2-karboksyetylo-3-cyjano-5-metyloheksanowego [(S)-**24**] o nadmiarze enancjomerycznym sięgającym >98%. Nieprzereagowany β -cyjanodiester (*R*)-**23** wykorzystywany jest ponownie w tym procesie dzięki optymalnie dobranym warunkom jego racemizacji w środowisku zasadowym. Aktywny farmaceutycznie, enancjomerycznie czysty produkt (S)-**25** (>99% ee) otrzymywany jest w wyniku szeregu klasycznych reakcji chemicznych, z łączną wydajnością rzędu 40–45% po wszystkich etapach syntezy, uwzględniając w tym pojedynczy cykl zawrotowy zbędnego enancjomery (*R*)-**23**.

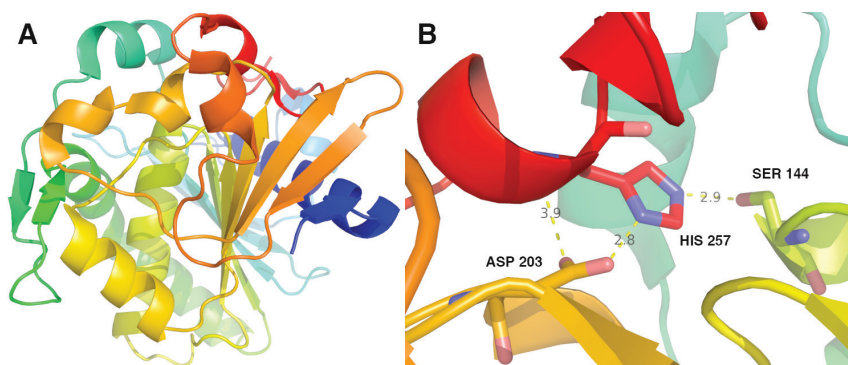


Schemat 9. Chemoenzymatyczna synteza pregabaliny [(S)-25] katalizowana lipazą z *Thermomyces lanuginosus* w formie usieciowanego agregatu (Lipolase*)

Scheme 9. Chemoenzymatic synthesis of pregabalin [(S)-25] catalyzed by lipase from *Thermomyces lanuginosus* as a cross-linked enzyme aggregate (Lipolase*)

4. PROCESY KATALIZOWANE PRZEZ LIPAZĘ Z *RHIZOMUCOR MIEHEI* (RML)

Omawiając temat biokatalizy przemysłowej z zastosowaniem lipaz nie sposób nie wspomnieć o enzymie, który w biotransformacjach związków organicznych odegrał jedną z kluczowych ról. Jest nim odkryta w roku 1973 zewnątrzkomórkowa lipaza z grzyba *Rhizomucor miehei* (RML) (formalnie *Mucor miehei*) zbudowana z 269 aminokwasów o łącznej masie cząsteczkowej rzędu 31 600 Da [147] oraz punkcie izoelektrycznym (pI) wynoszącym 3,8 (Rys. 5).



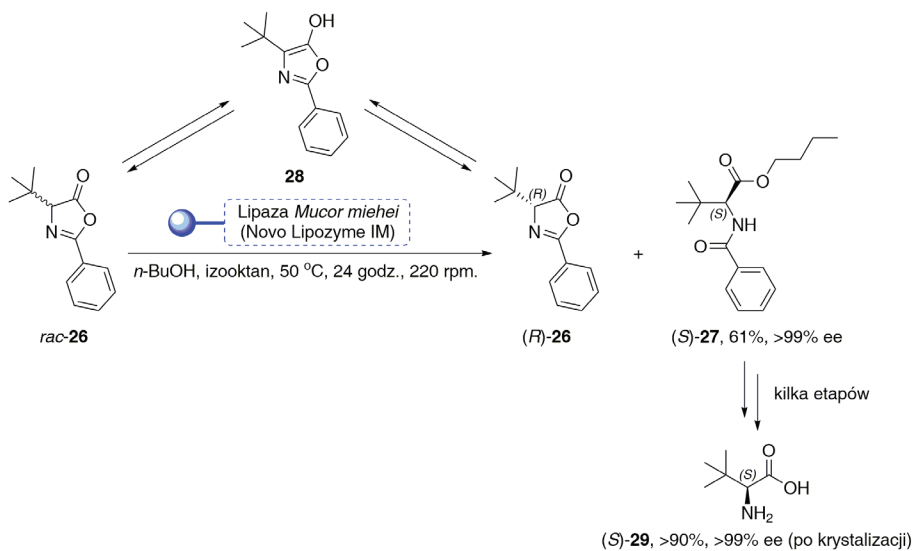
Rysunek 5. (A) Struktura 3D lipazy z *Mucor miehei* (PDB ID: 3TGL). (B) Ułożenie przestrzenne reszt aminokwasowych (AK) wchodzących w skład tzw. „triady katalitycznej” (Asp 203, His 257, Ser 144) należącej do centrum aktywnego RML (wzajemne odległości między AK podane zostały w Angstromach). Struktura krystaliczna białka enzymatycznego została pobrana z bazy Protein Data Bank (PDB) oraz przetworzona za pomocą programu Pymol vs 0,99

Figure 5. (A) The 3D structure of lipase from *Mucor miehei* (PDB ID: 3TGL). (B) The spatial orientation of the amino acid (AAs) residues in the so-called “catalytic triad” (Asp 203, His 257, Ser 144) belonging to the active-site of RML (the mutual distance between the AAs are given in Angstroms). Crystal structure of enzymatic protein was downloaded from the Protein Data Bank (PDB), and processed using Pymol vs 0,99

Inne źródło podaje, że RML charakteryzuje się nieco mniejszą masą cząsteczkową (29 472 Da) oraz nieco innym punktem izoelektrycznym (pI 3,5) [148]. Z racji na fakt, iż RML była pierwszą lipazą, której strukturę krystaliczną wyznaczono z wysoką rozdzielczością rzędu 1,9 Å, mechanizmy jej aktywacji oraz funkcjonowania zostały poznane jak dotąd najlepiej [149]. W bazie PDB zdeponowane są struktury tego enzymu, zarówno w konformacji zamkniętej (3TGL) [150] jak i w otwartej (4TGL) [151]. Początkowo enzym ten stosowany był powszechnie do modyfikacji żywności [152], ale od momentu kiedy okazało się, iż wykazuje on bardzo wysoką aktywność oraz stabilność w różnych warunkach procesowych, wliczając w to użycie bezwodnych rozpuszczalników organicznych, płynów w stanie nadkrytycznym czy detergentów, zaczęto szybko odkrywać dla niego znacznie użyteczniejsze zastosowania przemysłowe. I tak, RML stał się popularnym katalizatorem w modyfikacjach tłuszczów i olejów [153], produkcji biopaliw, syntezy estrów zapachowych, modyfikacji strukturalnych cukrów, steroli, stanoli oraz steroidów, a skończywszy na rozdziale mieszanin racemicznych pochodnych kwasów karboksylowych, alkoholi i estrów [154]. Enzym ten, produkowany obecnie przez firmę *Novozymes*, jest ogólnie dostępny w sprzedaży zarówno w postaci rozpuszczonej (Palatase 2000 L) jak również immobilizowanej (Lipozyme RM IM). W preparacie immobilizowanym nośnikiem służącym do unieruchamiania RML jest żywica jonowymienna Duolite ES 562, przygotowywana na bazie kopolimeru fenolowo-formaldehydowego.

Z pośród licznych zastosowań przemysłowych lipazy RML, jedną z najbardziej spektakularnych jest opracowana przez brytyjskie przedsiębiorstwo biotechnolo-

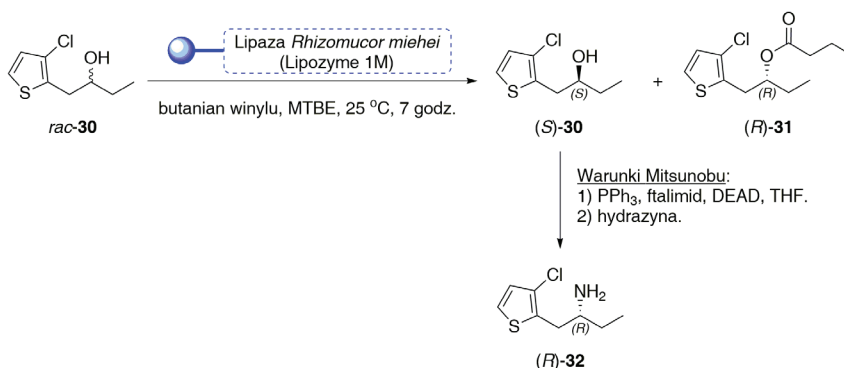
giczne *Celltech Group plc* produkcja syntetycznego aminokwasu – (*S*)-*tert*-leucyny [(*S*)-**29**] (Schemat 10) [155]. Związek ten, ze względu na swoje właściwości głównie związane ze sterycznie rozbudowaną grupą *tert*-butylową, jest niezmiernie cennym blokiem budulcowym dla wielu chiralnych pomocników, ligandów oraz organokatalizatorów stosowanych w syntezie asymetrycznej. Do ważnych przykładów substancji chemicznych o tym charakterze, zsyntetyzowanych w oparciu o strukturę (*S*)-*tert*-leucyny, należą m.in.: (i) 4-*tert*-butylo-3-propionilo-oksazolidyn-2-on, (ii) 4-izopropilo-2-metylo-4,5-dihydro-oksazol oraz (iii) {1-[(difenylfosfanylo)-metylo]-2,2-dimetylo-propylo}-dimetyloamina. Oprócz tego, (*S*)-*tert*-leucyna [(*S*)-**29**] jest doskonałym lipofilowym komponentem wielu syntetycznych białek oraz peptydomimetyków o zastosowaniu medycznym, gdyż dzięki rozgałęzionej grupie *tert*-butylowej chroni ich wiązania amidowe przed hydrolizą z udziałem peptydaz, pozwalając w rezultacie otrzymać związki o lepszej stabilności metabolicznej. Przedstawiona na poniższym schemacie przemysłowa synteza tego aminokwasu (*S*)-**29** polega w głównej mierze na wykorzystaniu immobilizowanej lipazy z *Mucor miehei* (Novo Lipozyme IM) katalizującej enancjoselektywną alkoholizę racemicznego 4-*tert*-butylo-2-fenylo-1,3-oksazol-5(4*H*)-onu (*rac*-**26**) z użyciem bezwodnego *n*-butanolu. Rozdział kinetyczny chiralnego azalaktanu *rac*-**26** przebiega z jednoczesną racemizacją *in situ* nieprzereagowanego (*R*)-enancjomeru (*R*)-**26**, biegnącą przez stadium 4-*tert*-butylo-2-fenylo-1,3-oksazol-5-olu (**28**). W związku z tym, że do racemizacji azalaktanu dochodzi samorzutnie gdy tylko stężenie (*R*)-**26** w roztworze przekroczy 20%, toteż proces ten z formalnego punktu widzenia raczej zaliczyć należy do enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego (EDKR) aniżeli klasycznego rozdziału kinetycznego. Powstały w tym czasie ester butylowy kwasu (2*S*)-2-(benzoiloamino)-3,3-dimetylobutyłowego [(*S*)-**27**] jest trwały i może być z powodzeniem przekształcany do enancjomerycznie czystego aminokwasu (*S*)-**29** (>99% ee). Wyżej opisany EDKR racemicznego substratu *rac*-**26** przeprowadzony był w skali 138 gramowej. Pamiętać jednak należy, że odbezpieczanie grupy aminowej powinno być prowadzone w warunkach zasadowych, albowiem hydrolyza wiązania amidowego w warunkach kwasowych powodowałaby spontaniczną re-cyklizację z odtworzeniem stereochemicznie labilnego azalaktanu i w związku z tym częściową racemizację, przyczyniającą się do znacznego zanieczyszczenia produktu (*S*)-**29** przeciwnym enancjomerem.



Schemat 10. Chemoenzymatyczna synteza (*S*)-*tert*-leucyny [(*S*)-**29**] przy użyciu immobilizowanej lipazy z *Mucor miehei* (Novo Lipozyme IM)

Scheme 10. Chemoenzymatic synthesis of (*S*)-*tert*-leucine [(*S*)-**29**] by using immobilized lipase from *Mucor miehei* (Novo Lipozyme IM)

Drugim bardzo ciekawym przykładem przemysłowego zastosowania lipazy z *Rhizomucor miehei* jest produkcja (*R*)-2-(2-aminobutylo)-3-chlorotiofenu [(*R*)-**32**]. Proces ten został zrealizowany przez ówczesnie funkcjonującą na rynku farmaceutycznym firmę *Zeneca* (obecnie *Astra Zeneca*) i polegał na rozdzieleniu kinetycznym racemicznego 1-(3-chlorotiofen-2-yl)butan-2-olu (*rac*-**30**) w reakcji transestryfikacji maślanem winylu katalizowanej Lipozymem IM (Schemat 11) [156]. W wyniku tej reakcji otrzymywano mieszaninę odpowiedniego estru butylowego (*R*)-**31** oraz nieprzereagowanego alkoholu (*S*)-**30**. Po wydzieleniu alkoholu (*S*)-**30** oraz poddaniu go reakcji aminowania w warunkach procedury Mitsunobu, otrzymywano ostatecznie (*2R*)-1-(3-chlorotiofen-2-yl)butan-2-aminę [(*R*)-**32**] – ważny półprodukt w syntezie leków na nadciśnienie tętnicze, pochodnych adenozy. Reakcja enzymatycznego rozdzielenia kinetycznego *rac*-**30** prowadzona była w skali 24 gramowej.



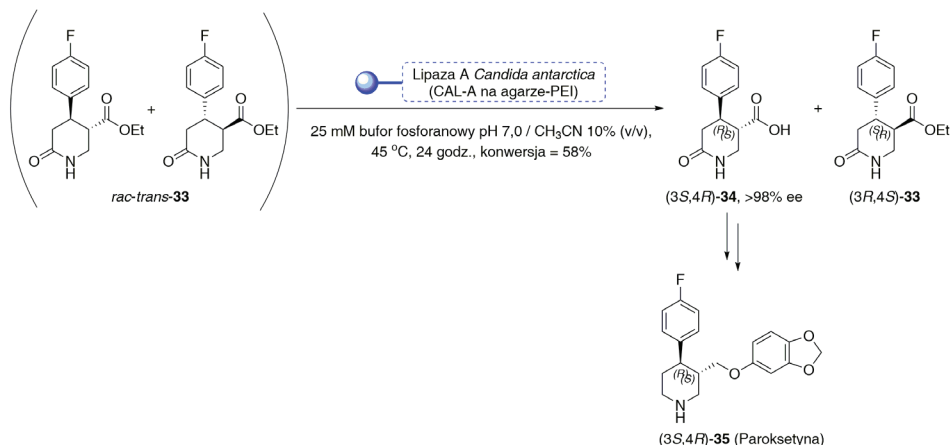
Schemat 11. Chemoenzymatyczna synteza (R)-2-(2-aminobutyl)-3-chlorotiofenu [(R)-32] z zastosowaniem immobilizowanej lipazy z *Rhizomucor miehei* (Lipozyme 1M)

Scheme 11. Chemoenzymatic synthesis of (R)-2-(2-aminobutyl)-3-chlorothiophene [(R)-32] by using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei* (Lipozyme 1M)

5. PROCESY KATALIZOWANE PRZEZ LIPAZY: CAL-A, PPL, BPL, SML ORAZ SC-YM-1

W ostatniej części niniejszego przeglądu poświęconego przemysłowemu zastosowaniu katalizy enzymatycznej z udziałem lipaz w syntezie optycznie czynnych związków o wysokiej wartości dodanej, przedstawiono kilka procesów, które cieszą się olbrzymim sukcesem komercyjnym, a w których to kluczową rolę odegrały następujące enzymy: lipaza A z *Candida antarctica* (CAL-A), wieprzowa lipaza trzuskowa (PPL), lipaza z *Burkholderia plantarii* (BPL), lipaza z *Serratia marcescens* (SML) oraz lipaza z *Chromobacterium* (szczepu SC-YM-1).

Chemoenzymatyczna synteza znanego leku antydepresyjnego – paroksetyny (3*S*,4*R*)-35 – z zastosowaniem lipazy A z *Candida antarctica* (CAL-A) opracowana przez hiszpańską firmę *Vita-Invest S.A.* jest jednym z nich (Schemat 12) i stanowi skuteczną alternatywę dla metody chemicznej opatentowanej i przez długi czas stosowanej przez przedsiębiorstwo *SmithKline Beecham* [157]. Kluczowy w tej syntezie wysoce enancjomerycznie wzbogacony kwas (3*S*,4*R*)-4-(4-fluorofenyl)-6-oksopiperidyno-3-karboksylowy [(3*S*,4*R*)-34] (>98% ee) otrzymywany jest w reakcji enzymatycznej hydrolizy racemicznego estru etylowego *rac-trans*-33 w roztworze buforowym z dodatkiem acetonitrylu. Najlepsze wyniki dla zastosowanego rozdziału kinetycznego estru *rac-trans*-33 uzyskano stosując lipazę CAL-A immobilizowaną kowalencyjnie na agarze z dodatkiem polietylenoiminy (PEI). Dzięki zastosowaniu tej formy enzymu możliwe było wydajne otrzymanie optycznie czynnego kwasu (3*S*,4*R*)-34 z konwersją substratu wynoszącą 58% w łagodnych warunkach temperaturowych oraz pH. Reakcja enzymatyczna przeprowadzona została w skali 318 gramowej, używając 30 mM roztworu *rac-trans*-33.

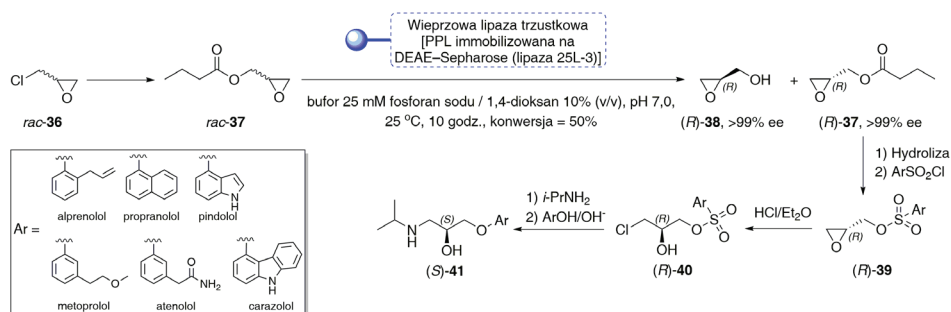


Schemat 12. Chemoenzymatyczna synteza paroksetyny [(3S,4R)-35] z zastosowaniem lipazy A z *Candida antarctica* immobilizowanej na agarze-PEI

Scheme 12. Chemoenzymatic synthesis of paroxetine [(3S,4R)-35] by using lipase A from *Candida antarctica* immobilized on agar-PEI

Kolejnym przykładem zastosowania katalizy enzymatycznej na skalę przemysłową jest opracowana przez holenderską firmę chemiczną DSM chemoenzymatyczna synteza estru (2R)-oksiran-2-ylometylowego kwasu butanowego [(R)-37] (Schemat 13) [158–160]. Ponieważ optycznie czynny oksiran (R)-37 stanowi cenny półprodukt w syntezie wielu skutecznych i powszechnie stosowanych w terapii nadciśnienia tętniczego leków β -adrenolitycznych [tzw. (S)- β -blokerów], jego produkcja w skali światowej wynosi obecnie 10 ton/rok i jest czwartym co do wielkości biotechnologicznym procesem przemysłowym z użyciem lipaz, zaraz po enzymatycznej produkcji masła kakaowego wynoszącej dla porównania 104 ton/rok oraz dwóch innych technologiach, o których mowa poniżej [patrz: synteza (R)-1-feniloetyloaminy oraz diltiazemu]. Zestawiając ze sobą korzyści wynikające z zastosowania różnych sposobów otrzymywania czystych (S)-enancjomerów pochodnych aryloksypropyloamin, należy podkreślić, że opracowana przez holenderską firmę DSM enzymatyczna metoda kinetycznego rozdzielania hydrolytycznego mieszaniny racemicznej *rac*-37 jest niezmiernie prosta, wydajna i co za tym idzie ekonomicznie bardziej uzasadniona w porównaniu np. z bezpośrednią syntezą z zastosowaniem wygodnych, ale bardzo kosztownych handlowych enancjomerów (R)-(-)- i (S)-(+)-epichlorohydryny. W zaprezentowanej poniżej metodzie syntezy (S)- β -blokerów substratem jest bardzo tania racemiczna epichlorohydryna *rac*-36, która poddawana jest hydrolizie do glicydotu z jednoczesną jego estryfikacją przy użyciu chlorku kwasu masłowego w środowisku zasadowym. Otrzymany racemiczny ester kwasu masłowego *rac*-37 hydrolizowany jest następnie w sposób całkowicie stereoselektywny do optycznie czynnego glicydotu (R)-38 (>99% ee) oraz nieprzereagowanego maślanu (R)-37 (>99% ee). Proces ten katalizowany jest przez jedną z najtańszych dostępnych na rynku lipaz, a mia-

nowicie lipazę PPL będącą ekstraktem z trzustki wieprzowej. Istotnym czynnikiem jest możliwość regeneracji tego enzymu, ponieważ występuje on w formie immobilizowanej na komercyjnie dostępnym złożu – aktywowanej dietyloaminoetanolem agarozie [DEAE–Sepharese, *Pharmacia Biotech* (Uppsala, Sweden)]. Dodatkowo, zastosowanie bardzo łagodnych warunków procesowych, w tym użycie roztworu buforowego z dodatkiem 1,4-dioksanu, utrzymywanie pH obojętnego oraz niskiej temperatury (25°C), umożliwiła niewielkie zużycie katalizatora. Nieprzereagowany ester enancjomerycznie czystego glicydotu (*R*)-37 poddawany jest następnie szeregowi prostych reakcji chemicznych, dobranych w taki sposób, iż straty w całkowitej wydajności oraz czystości optycznej otrzymanych (*S*)- β -blokerów są minimalne.

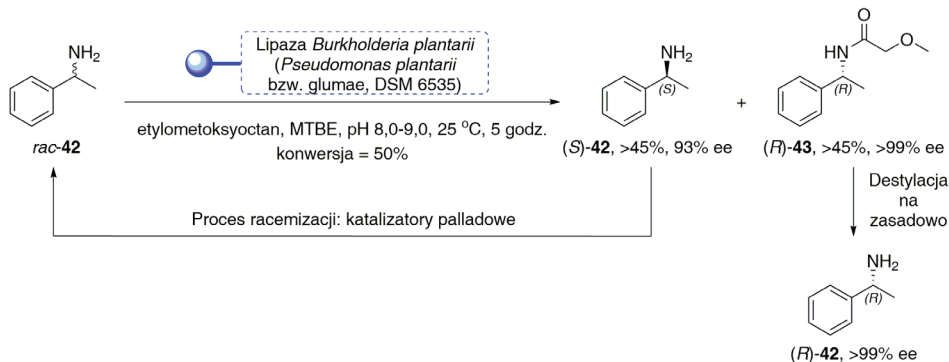


Schemat 13. Chemoenzymatyczna synteza optycznie czynnych (*S*)- β -blokerów otrzymanych w oparciu o rozdział kinetyczny butanianu glicydotu (*rac*-37) katalizowanego ekstraktem (wyciągiem) lipazy z trzustki wieprzowej (PPL) immobilizowanym na modyfikowanej agarozie (DEAE–Sepharese)

Scheme 13. Chemoenzymatic synthesis of optically active (*S*)- β -blockers obtained on the basis of kinetic resolution of glycidyl butyrate (*rac*-37) catalyzed by porcine pancreatic lipase (PPL) extracts immobilized on modified agarose (DEAE–Sepharese)

Innym przykładem wdrożenia przemysłowego o dużym znaczeniu dla gospodarki światowej jest opracowana przez koncern *BASF AG* produkcja enancjomerycznie czystej (*R*)-1-fenyletyloaminy [(*R*)-42] – cennego półproduktu wykorzystywanego w syntezie farmaceutyków oraz pestycydów (Schemat 14) [161, 162]. Firma *BASF AG* w procesie dynamicznego rozdziału kinetycznego racemicznej aminy *rac*-42 zastosowała dość rzadko używaną lipazę z *Burkholderia plantarii* immobilizowaną na poliakrylanie (DSM 6535). Do racemizacji zbędnego (*S*)-42 zaproponowano w tym przypadku katalizator palladowy, który jest znacznie mniej toksyczny od powszechnie używanych w tym celu katalizatorów rutenowych. Stosując lipazę DSM 6535 zawieszoną w mieszaninie eteru *tert*-butyloowo-metylowego (rozpuszczalnik) i etylometoksyoctanu (donor grupy acylowej) otrzymano po 5 godzinach prowadzenia reakcji mieszaninę (*R*)-2-metoksy-*N*-(1-fenyletylo)acetamidu [(*R*)-43] (>99% ee) oraz nieprzereagowanej aminy (*S*)-42 (93% ee) z bardzo wysoką enancjoselektywnością ($E > 200$). Rozdział tej mieszaniny metodą ekstrakcyjną lub za pomocą destylacji pozwolił na otrzymanie obu enancjomerów z wydajnością >45% przy założeniu, iż reakcje przerywano dokładnie przy konwersji wynoszącej

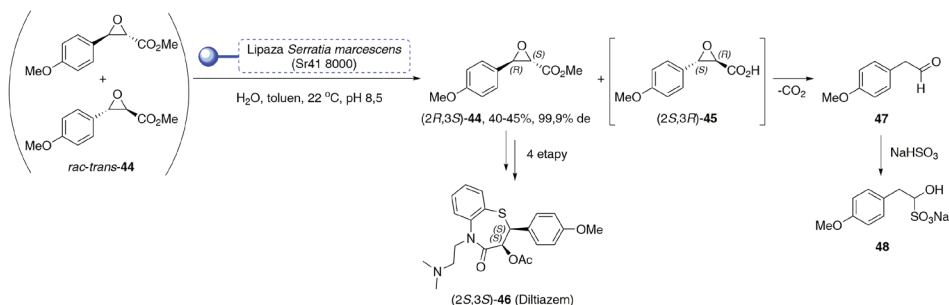
50%. Proces prowadzony jest w systemie przepływowym w sposób półciągły w skali 1,65 M (200 g×litr⁻¹) użytego substratu *rac*-**42**.



Schemat 14. Rozdział kinetyczny racemicznej 1-fenyletyloaminy (*rac*-**42**) katalizowany immobilizowaną lipazą z *Burkholderia plantarii* (DSM 6535)

Scheme 14. Kinetic resolution of racemic 1-phenylethylamine (*rac*-**42**) catalyzed by lipase from *Burkholderia plantarii* (DSM 6535)

Kolejnym przykładem wysoce wydajnego procesu biotechnologicznego z zastosowaniem lipaz jest przemysłowa produkcja diltiazemu [(2*S*,3*S*)-**46**] – pochodnej benzotiazepiny, będącej substancją czynną leku z grupy antagonistów wapnia (blokujących kanał wapienny typu L), stosowanego w leczeniu nadciśnienia tętniczego oraz choroby niedokrwiennej serca (Schemat 15) [163, 164].

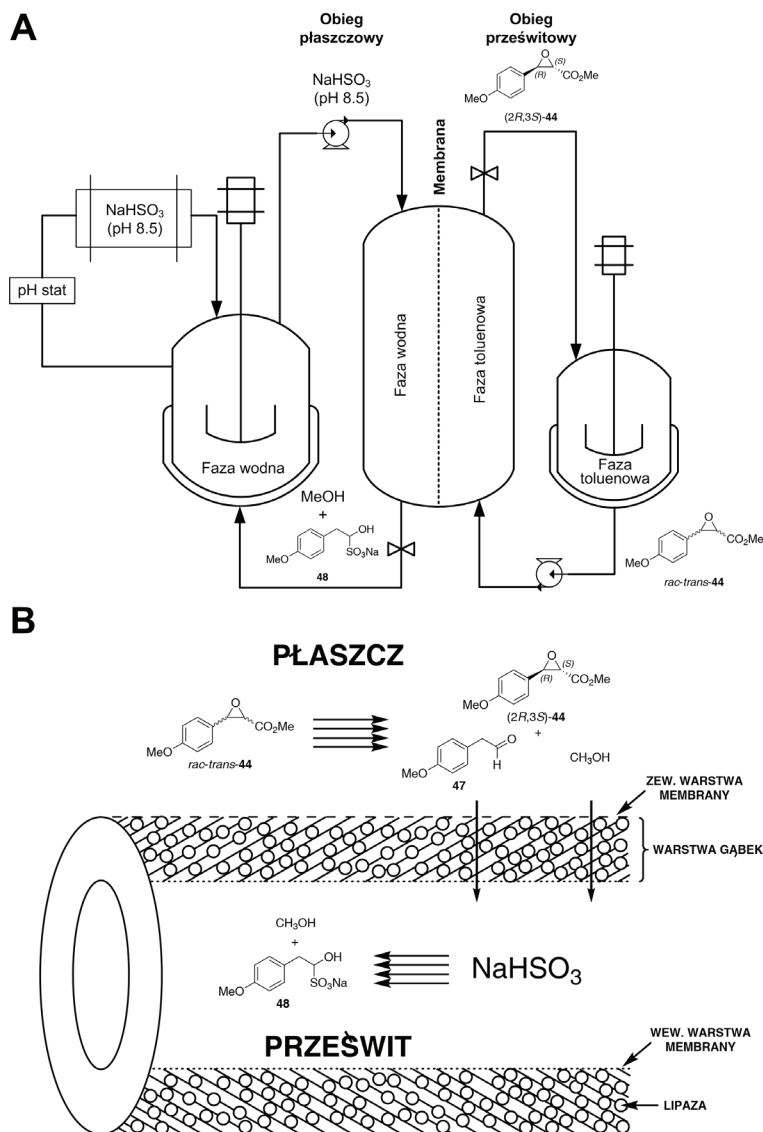


Schemat 15. Chemoenzymatyczna synteza diltiazemu [(2*S*,3*S*)-**46**] katalizowana rekombinowaną lipazą z *Serratia marcescens* (Sr41 8000)

Scheme 15. Chemoenzymatic synthesis of diltiazem [(2*S*,3*S*)-**46**] catalyzed by recombinant lipase from *Serratia marcescens* (Sr41 8000)

Chemoenzymatyczna synteza tego związku (2*S*,3*S*)-**46** opracowana została w 1993 roku przez japońskie przedsiębiorstwo farmaceutyczne *Tanabe Seiyaku Co., Ltd.*, obecnie wchodzące w skład *Mitsubishi Chemical Holdings*. Niezbędny chiralny półprodukt – racemiczny ester metylowy kwasu *trans*-3-(4-metoksyfenyl)glicydowego (*rac-trans*-**44**) – poddawany jest stereoselektywnej hydrolizie w warunkach kontroli kinetycznej celem uzyskania odpowiedniego diastereoizomeru (2*R*,3*S*)-**44**

wykorzystywanego do dalszych przekształceń. W toku dogłębnych badań poświęconych hydrolitycznemu rozdziałowi kinetycznemu *rac-trans*-**44** stwierdzono, iż idealnym katalizatorem jest zewnątrzkomórkowa lipaza z rekombinowanej Gram-(-) bakterii *Serratia marcescens* zwanej także Pałeczką krwawą (lub cudowną). W celu zwiększenia jej aktywności oraz stabilności operacyjnej, lipaza z *Serratia marcescens* (Sr41 8000) została dodatkowo immobilizowana na odpowiedniej warstwie utworzonej z gąbek morskich z użyciem techniki adsorpcyjnej z podciśnieniem. Cały proces enzymatyczny prowadzony jest w układzie dwufazowym (bufor/ toluen) w lekko zasadowym środowisku (pH 8,5), w temperaturze 22°C w reaktorze z zamontowaną półprzepuszczalną, hydrofilową, włóknisto-kanalikową membraną wykonaną z poliakrylonitrylu (Schemat 16). Ponadto, ustalono eksperymentalnie, że nieprzereagowany enancjomerycznie czysty ester (2*R*,3*S*)-**44** (99,9% ee) izolowany z mieszaniny reakcyjnej z wydajnością rzędu 40–45% jest jednocześnie inhibitorem kompetycyjnym dla stosowanej lipazy. Z kolei, powstający w toku reakcji enzymatycznej optycznie czynny kwas (2*S*,3*R*)-**45** jest bardzo niestabilny w panujących warunkach i ulega spontanicznej dekarboksylacji z utworzeniem 4-metoksyfenylacetaldehydu (**47**). Aldehyd ten **47**, podobnie jak tworzący się w reakcji metanol, dezaktywuje enzym, w związku z czym musi być wymywany z mieszaniny poreakcyjnej w sposób ciągły w postaci wodorosiarczynowego adduktu **48**. Specjalnie zaprojektowany reaktor membranowy (*Sepracor Inc. Massachusetts, USA*) (Schemat 16) nie tylko umożliwia skuteczne przeprowadzenie tej operacji jednostkowej, ale również w znaczny sposób upraszcza całą syntezę diltiazemu [(2*S*,3*S*)-**46**], skracając liczbę jej etapów z 9 do tylko 5. Ponadto, zastosowanie reaktora membranowego oprócz zwiększenia aktywności katalizatora, dodatkowo wydłuża czas jego pracy do $t_{0,5} = 127$ godz., co w porównaniu z klasycznym reaktorem emulsyjnym jest ok. 30-krotnie lepszym wynikiem. Proces prowadzony w systemie przepływowym w sposób okresowy w skali $< 0,6$ M (< 125 g \times liter⁻¹) użytego substratu *rac-trans*-**44** pozwala uzyskać 40 kg optycznie czynnego prekursora diltiazemu (2*R*,3*S*)-**44** w jednej szarży. Należy stanowczo podkreślić, że obecnie produkcja nieracemicznego diltiazemu [(2*S*,3*S*)-**46**] wyżej opisaną metodą enzymatyczną prowadzona jest w wielu przedsiębiorstwach (m.in. *DSM*) i wynosi ponad 100 ton/rok.

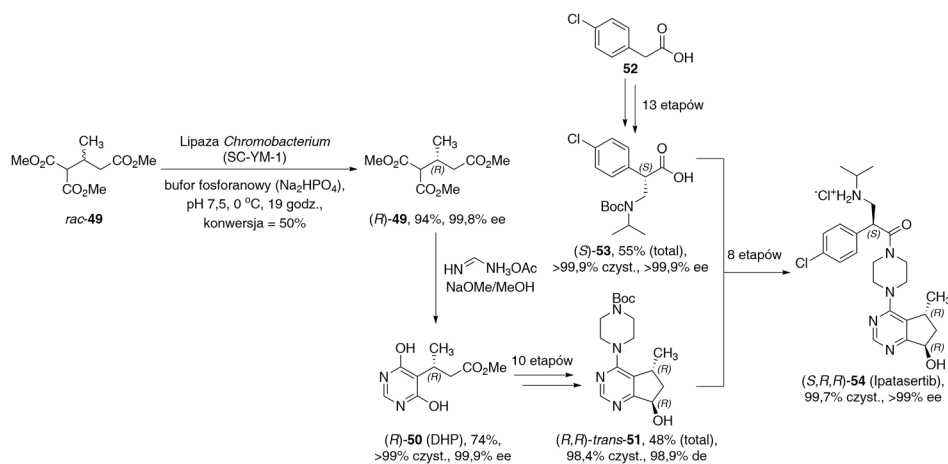


Schemat 16. (A) Schemat technologiczny syntezy diltiazemu [(2*S*,3*S*)-**46**] w przepływowym reaktorze membranowym; (B) Budowa oraz mechanizm działania membrany

Scheme 16. (A) Technological scheme for the synthesis of diltiazem [(2*S*,3*S*)-**46**] in the flow-through catalytic membrane reactor; (B) Structure and mechanism of action of the membrane

Innym ciekawym przykładem chemoenzymatycznej metody syntezy jest otrzymywanie inhibitora kinazy białkowej B (PKB albo Akt) – chlorowodoru ipatasertibu [(*S*,*R*,*R*)-**54**] – opracowana przez współpracujące ze sobą amerykańskie firmy farmaceutyczne: *Array BioPharma Inc.* oraz *Genentech, Inc.* (Schemat 17) [165]. Jednym z etapów tej żmudnej i dość skomplikowanej syntezy jest etap enzymatyczny,

w którym racemiczny triester *rac*-**49** (27,6 kg) hydrolizowany jest w środowisku buforu fosforanowego (pH 7,5) za pomocą odpowiedniej lipazy, pozyskiwanej ze zmutowanego szczepu bakteryjnego *Chromobacterium* (SC-YM-1). Po 19 godzinach prowadzenia reakcji w temperaturze 0°C w warunkach kontroli kinetycznej, otrzymywano praktycznie czysty enancjomerycznie ester trimetylowy kwasu (*R*)-2-metylopropano-1,1,3-trikarboksylowego [(*R*)-**49**] (12,9 kg, 99,8% ee) z bardzo wysoką wydajnością 94% przy konwersji wynoszącej 50%. Co ciekawe, użyty w tym procesie enzym wykazywał podczas hydrolizy racematu *rac*-**49** niezgodną z regułą Kazlauskasa [166], nietypową dla lipaz (*S*)-stereopreferencję względem biotransformowanych enancjomerów, pozostawiając w mieszaninie reakcyjnej wolniej reagujący (*R*)-izomer triestru. Enancjomerycznie czysty triester (*R*)-**49** poddawany jest następnie reakcji z octanem formamidyny w warunkach zasadowych (MeONa/MeOH) czego efektem jest wydzielanie (*R*)-3-(4,6-dihydroksypirydyn-5-yl)butanianu metylu (DHP) [(*R*)-**50**] (8,7 kg) o bardzo wysokiej czystości chemicznej (>99%), o doskonałym nadmiarze enancjomerycznym (99,9% ee) oraz z wysoką wydajnością (74%). Ostateczny produkt wieloetapowej syntezy – ipatasertib [(*S,R,R*)-**54**] – otrzymywany jest w postaci monochlorowodoru w ilości 3,23 kg z pojedynczej szarży produkcyjnej, z doskonałą czystością zarówno chemiczną (99,7%) jak również enancjomeryczną (>99% ee).



Schemat 17. Chemoenzymatyczna synteza monochlorowodoru ipatasertibu [(*S,R,R*)-**54**] z użyciem lipazy z *Chromobacterium* (SC-YM-1)

Scheme 17. Chemoenzymatic synthesis of ipatasertib monohydrochloride [(*S,R,R*)-**54**] by using lipase from *Chromobacterium* (SC-YM-1)

UWAGI KOŃCOWE

Niniejszy przegląd literaturowy poświęcony biokatalitycznym metodom z użyciem lipaz dobitnie przedstawia jak wielki potencjał tkwi w katalizie enzymatycznej i jak cennym narzędziem w przemysłowej syntezie organicznej są lipazy. W większości wyżej zaprezentowanych przykładów użycie lipaz jako biokatalizatorów spowodowało powiększenie wydajności otrzymywania cennych produktów w dużo krótszym czasie oraz w znacznie prostszy i bardziej przyjazny dla środowiska sposób aniżeli przy zastosowaniu klasycznej katalizy chemicznej. Zdecydowana większość przedstawionych w przeglądzie procesów cieszy się do dziś pełnym sukcesem komercyjnym, a przedsiębiorstwa które zdecydowały się zainwestować w technologie biochemiczne z udziałem lipaz podniosły swoją konkurencyjność na arenie międzynarodowej. Nie oznacza to oczywiście, że przemysłowe zastosowania lipaz i ogólnie rzecz biorąc metod biokatalitycznych zostały wyczerpane. Wręcz przeciwnie, pomimo iż prace badawcze poświęcone lipazom w rozpuszczalnikach organicznych trwają już od ponad 85 lat, to jak wynika z doniesień światowej literatury, odkrywane są ciągle nowe, dotąd nie brane pod uwagę, a równie efektywnie katalizowane przez nie reakcje (tzw. *promiskuityzm katalityczny lipaz*) [167–171]. Zatem możemy być zupełnie pewni, że ta dynamicznie rozwijająca się dziedzina naukowa w najbliższych dekadach stanowić będzie potężny impuls dla powstawania nowych małotonazowych technologii syntez produktów o wysokiej wartości dodanej o bardzo dużym znaczeniu gospodarczym.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki jako projekt badawczy nr 2014/13/N/ST5/01589. Autor pragnie dodatkowo podziękować za częściowe wsparcie finansowe ze strony projektu pt.: „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym” POIG.01.03.01-00-158/09 finansowanego ze środków Unii Europejskiej oraz anonimowym recenzentom za ich cenne wskazówki.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R. Gupta, A. Kumari, P. Syal, Y. Singh, *Prog. Lipid Res.*, 2015, **57**, 40.
- [2] A. Salihu, Alam, M.Z. *Process Biochem.*, 2015, **50**, 86.
- [3] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry: a Textbook*, 6th ed., SpringerVerlag, New York, NY, 2011.
- [4] E. Su, D. Wei, J. Agric. *Food Chem.*, 2014, **62**, 6375.
- [5] X.L. Qin, B. Yang, H.H. Huang, Y.H. Wang, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 2377.
- [6] S.A. Teichert, C.C. Akoh, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 9588.
- [7] I. Karabulut, G. Durmaz, A.A. Hayaloglu, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 10466.

- [8] K. Sabally, S. Karboune, R. St-Louis, S. Kermasha, *Biocatal. Biotransfor.*, 2007, **25**, 211.
- [9] H.J. Hsieh, G.R. Nair, W.T. Wu, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 5777.
- [10] *Handbook of Functional Lipids*, C.C. Akoh, (Red.), CRC Press (Taylor and Francis Co), Boca Raton, FL, 2005.
- [11] *Lipid Biotechnology*, T.M. Kuo, H.W. Gardner, (Red.), Marcel Dekker, New York, 2002.
- [12] *Enzymes in Lipid Modification*, U.T. Bornscheuer (Red.), Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
- [13] K.D. Mukherjee, *Prog. Lipid Res.*, 1994, **33**, 165.
- [14] M. Cao, L.M. Fonseca, L.C. Schoenfuss, S.A. Rankin, *J. Agric. Food Chem.*, 2014, **62**, 5726.
- [15] C.H. Okino-Delgado, L.F. Fleuri, *Food Chem.*, 2014, **163**, 103.
- [16] F. Valero, S. Ferreira-Dias, G. Sandoval, F. Plou, *Electronic J. Biotechnol.*, 2013, 16.
- [17] K.-M. Park, D.E. Lee, H. Sung, J. Lee, P.-S. Chang, *Food Chem.*, 2011, **129**, 59.
- [18] A. Rajendran, A. Palanisamy, V. Thangavelu, *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 2009, **52**, 207.
- [19] M. Lubary, J.H. ter Horst, G.W. Hofland, P.J. Jansens, *J. Agric. Food. Chem.*, 2009, **57**, 116.
- [20] R. Aravindan, P. Anbumathi, T. Viruthagiri, *Indian J. Biotechnol.*, 2007, **6**, 141.
- [21] A. Pometto, K. Shetty, G. Paliyath, R.E. Levin, *Food Biotechnology*, 2th ed. CRC Press (Taylor and Francis Co), Boca Raton, FL, 2005.
- [22] V.M. Balcão, F.X. Malcata, *Biotechnol. Adv.*, 1998, **16**, 309.
- [23] J. Wang, S. Wang, Z. Li, S. Gu, X. Wu, F. Wu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2015, **111**, 21.
- [24] M.-M. Zheng, L. Wang, F.-H. Huang, P.-M. Guo, F. Wei, Q.-C. Deng, C. Zheng, C.-Y. Wan, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2013, **95**, 82.
- [25] N. Sorour, S. Karboune, R. Saint-Louis, S. Kermasha, *J. Biotechnol.*, 2012, **158**, 128.
- [26] P. Torres, A. Poveda, J. Jimenez-Barbero, A. Ballesteros, F.J. Plou, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 807.
- [27] S. Karboune, R. St-Louis, S. Kermasha, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2008, **52-53**, 96.
- [28] M. Ardhaoui, A. Falcimaigne, J.-M. Engasser, P. Moussou, G. Pauly, M. Ghoul, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2004, **29**, 63.
- [29] V. Skouridou, E.D. Chrysinia, H. Stamatis, N.G. Oikonomakos, F.N. Kolisis, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2004, **29**, 9.
- [30] E. Enaud, C. Humeau, B. Piffaut, M. Girardin, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2004, **27**, 1.
- [31] A. Kontogianni, V. Skouridou, V. Sereti, H. Stamatis, F.N. Kolisis, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2003, **21**, 59.
- [32] D. Lambusta, G. Nicolosi, A. Patti, C. Sanfilippo, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2003, **22**, 271.
- [33] H. Stamatis, V. Sereti, F.N. Kolisis, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2001, **11**, 323.
- [34] C. Wei, X.-F. Fu, Z. Wang, X.-J. Yu, Y.-J. Zhang, J.-Y. Zheng, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2014, **106**, 90.
- [35] P. Torres, A. Kunamneni, A. Ballesteros, F.J. Plou, *The Open Food Sci. J.*, 2008, **2**, 1.
- [36] P. Torres, D. Reyes-Duarte, N. López-Cortés, M. Ferrer, A. Ballesteros, F.J. Plou, *Process Biochem.*, 2008, **43**, 145.
- [37] T. Maugard, B. Rejasse, M.D. Legoy, *Biotechnol. Prog.*, 2002, **18**, 424.
- [38] T. Maugard, J. Tudella, M.D. Legoy, *Biotechnol. Prog.*, 2000, **16**, 358.
- [39] Y. Yan, U.T. Bornscheuer, R.D. Schmid, *Biotechnology Lett.*, 1999, **21**, 1051.
- [40] T.d.S. Fonseca, M.R.D. Silva, M.d.C.F. de Oliveira, T.L.G.d. Lemos, R.d.A. de Marques, M.C. Matos, *Appl. Catal. A: Gen.*, 2015, **492**, 76.
- [41] S. Sayin, E. Akoz, M. Yilmaz, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 6634.
- [42] P. Borowiecki, D. Paprocki, M. Dranka, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2014, **10**, 3038.
- [43] J. González-Sabín, N. Ríos-Lombardía, V. Gotor, F. Moris, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2013, **24**, 1421.
- [44] G.W. Huisman, S.J. Collier, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2013, **17**, 284.
- [45] T. Siódmiak, M. Ziegler-Borowska, M.P. Marszał, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2013, **94**, 7.

- [46] E. Busto, L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Eur. J. Org. Chem.*, 2013, **2013**, 4057.
- [47] E. Busto, V. Gotor-Fernandez, V. Gotor, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 4842.
- [48] *Biocatalysis in the Fine Chemical and Pharmaceutical Industries*, J. Whittal, P.W. Sutton (Red.), 1st ed. John Wiley & Sons, Ltd., 2012.
- [49] J. Mangas-Sanchez, E. Busto, V. Gotor-Fernandez, F. Malpartida, V. Gotor, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 2115.
- [50] E.V. Johnston, K. Bogar, J.E. Bäckvall, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 4596.
- [51] K. Arunkumar, M.A. Reddy, T.S. Kumar, B.V. Kumar, K.B. Chandrasekhar, P.R. Kumar, M. Pal, Beilstein *J. Org. Chem.*, 2010, **6**, 1174.
- [52] M. Rodríguez-Mata, E. García-Urdiales, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.*, 2010, **352**, 395.
- [53] A. Ghanem, M.N. Aboul-Enein, A. El-Azzouny, M.F. El-Beairy, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 1063.
- [54] J. Mangas-Sanchez, M. Rodríguez-Mata, E. Busto, V. Gotor-Fernandez, V. Gotor, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 5304.
- [55] R.N. Patel, *Coordin. Chem. Rev.*, 2008, **252**, 659.
- [56] *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*, R.N. Patel (Red.), CRC Press Boca Raton, 2007.
- [57] V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2006, **40**, 111.
- [58] R.N. Patel, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **31**, 804–826;
- [59] R. Zhou, J.-H. Xu, *Biochem. Eng. J.*, 2005, **23**, 11.
- [60] Y.-C. Cheng, S.-W. Tsai, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, **15**, 2917.
- [61] K. Tanaka, K. Yoshida, C. Sasaki, Y.T. Osano, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 3131.
- [62] L.A. Spangler, M. Mikołajczyk, E.L. Burdge, P. Kiełbasiński, H.C. Smith, P. Łyzwa, J.D. Fisher, *J. Omelańczuk, J. Agr. Food Chem.*, 1999, **47**, 318.
- [63] P.-J. Um, D.G. Drueckhammer, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 5605.
- [64] M. Inagaki, J. Hiratake, T. Nishioka, J. Oda, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 5643.
- [65] M. Inagaki, J. Hiratake, T. Nishioka, J. Oda, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 9360.
- [66] U. Takeaki, H. Hideo, *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*, American Chemical Society, str. 371; 1989.
- [67] M.B. Ansorge-Schumacher, O. Thum, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 6475.
- [68] A.B. Martins, A.M. da Silva, M.F. Schein, C. Garcia-Galan, M.A. Záchia Ayub, R. Fernandez-Lafuente, R.C. Rodrigues, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2014, **105**, 18.
- [69] P. Lozano, J.M. Bernal, A. Navarro, *Green Chem.*, 2012, **14**, 3026.
- [70] E. Brenna, C. Fuganti, F.G. Gatti, S. Serra, *Chem. Rev.*, 2011, **111**, 4036.
- [71] G.A.B. Vieira, T.L.G. Lemos, M.C. de Mattos, M.d.C.F. de Oliveira, V.M.M. Melo, G. de Gonzalo, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2009, **20**, 214.
- [72] E. Brenna, C. Fuganti, S. Serra, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 2443.
- [73] S. Serra, C. Fuganti, E. Brenna, *Trends Biotechnol.*, 2005, **23**, 193.
- [74] M.D. Romero, L. Calvo, C. Alba, A. Daneshfar, H.S. Ghaziaskar, *Enzyme Microb. Technol.* 2005, **37**, 42.
- [75] S. Serra, E. Brenna, C. Fuganti, F. Maggioni, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, **14**, 3313.
- [76] H.Ö. Düşkünkörür, A. Bégué, E. Pollet, V. Phalip, Y. Güvenilir, L. Avérous, *J. of Mol. Catal. B: Enzym.*, 2015, **115**, 20.
- [77] Y. Yang, J. Zhang, D. Wu, Z. Xing, Y. Zhou, W. Shi, Q. Li, *Biotechnol. Adv.*, 2014, **32**, 642.
- [78] J. Zhang, H. Shi, D. Wu, Z. Xing, A. Zhang, Y. Yang, Q. Li, *Process Biochem.*, 2014, **49**, 797.
- [79] C. Robert, C.M. Thomas, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 9392.

- [80] Y. Yu, D. Wu, C. Liu, Z. Zhao, Y. Yang, Q. Li, *Process Biochem.*, 2012, **47**, 1027.
- [81] Y. Yang, Y. Yu, Y. Zhang, C. Liu, W. Shi, Q. Li, *Process Biochem.*, 2011, **46**, 1900.
- [82] S. Kobayashi, A. Makino, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 5288.
- [83] C.K. Williams, *Chem. Soc. Rev.*, 2007, **36**, 1573.
- [84] G. Rokicki, *Biotechnologia*, 2005, **69**, 48.
- [85] S. Kobayashi, H. Uyama, S. Kimura, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 3793.
- [86] M.K.B. Weerasooriya, A.A.N. Kumarasinghe, *Indian J. Chem. Techn.*, 2012, **19**, 244.
- [87] J.H. Jeon, J.T. Kim, Y.J. Kim, H.K. Kim, H.S. Lee, S.G. Kang, S.J. Kim, J.H. Lee, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, **81**, 865.
- [88] D. Bajpai, V.K. Tyagi, *J. Oleo. Sci.*, 2007, **56**, 327.
- [89] W.-W. Zhang, X.-L. Yang, J.-Q. Jia, N. Wang, C.-L. Hu, X.-Q. Yu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2015, **115**, 83.
- [90] J.K. Poppe, R. Fernandez-Lafuente, R.C. Rodrigues, M.A. Ayub, *Biotechnol. Adv.*, 2015, In Press.
- [91] S. Liu, K. Nie, X. Zhang, M. Wang, L. Deng, X. Ye, F. Wang, T. Tan, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2014, **99**, 43.
- [92] A.T. Pedersen, M. Nordblad, P.M. Nielsen, J.M. Woodley, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2014, **105**, 89.
- [93] Zhao, T. No, D.S. Kim, Y. Kim, Y.S. Kim, I.-H. J. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2014, **107**, 17.
- [94] P. Yin, W. Chen, W. Liu, H. Chen, R. Qu, X. Liu, Q. Tang, Q. Xu, *Bioresour. Technol.*, 2013, **140**, 146.
- [95] S. Yücel, P. Terzioğlu, D. Özçimen, *Lipase Applications in Biodiesel Production, Biodiesel – Feedstocks, Production and Applications*, Z. Fang (Red.), InTech, 2012. DOI: 10.5772/52662.
- [96] A.A. Mendes, R.C. Giordano, R.d.L.C. Giordano, H.F. de Castro, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2011, **68**, 109.
- [97] D.Y.C. Leung, X. Wu, M.K.H. Leung, *Appl. Energy*, 2010, **87**, 1083.
- [98] T. Tan, J. Lu, K. Nie, L. Deng, F. Wang, *Biotechnol. Adv.*, 2010, **28**, 628.
- [99] A. Bajaj, P. Lohan, P.N. Jha, R. Mehrotra, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, **62**, 9.
- [100] W. Du, L. Wang, D. Liu, *Green Chem.* 2007, **9**, 173.
- [101] A. Salis, M. Monduzzi, V. Solinas, *Industrial Enzymes*, J. Polaina, A. MacCabe (Red.), Springer Netherlands, 2007, str. 317.
- [102] H. Fukuda, A. Kondo, H. Noda, J. Biosci. Bioeng., 2001, **92**, 405.
- [103] C. Aouf, J. Lecomte, P. Villeneuve, E. Dubreucq, H. Fulcrand, *Green Chem.*, 2012, **14**, 2328.
- [104] Z. Jiang, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 1912.
- [105] H.R. Masoumi, A. Kassim, M. Basri, D.K. Abdullah, *Molecules*, 2011, **16**, 4672.
- [106] S.R. Jadhav, P.K. Vemula, R. Kumar, S.R. Raghavan, G. John, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2010, **49**, 7695.
- [107] G. Li, D. Yao, M. Zong, *Eur. Polym. J.*, 2008, **44**, 1123.
- [108] M.C. Franssen, P. Steunenbergh, E.L. Scott, H. Zuilhof, J.P. Sanders, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 6491.
- [109] P. Bajpai, *Biotechnol. Progr.*, 1999, **15**, 147.
- [110] S. Fukuda, S. Hayashi, H. Ochiai, T. Iizumi, K. Nakamura, *Improvers for deinking of wastepaper*, 1990, JP 2229290.
- [111] P. Saranya, K. Ramani, G. Sekaran, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 10680.
- [112] R. Margesin, D. Labbe, F. Schinner, C.W. Greer, L.G. Whyte, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**, 3085.
- [113] R. Margesin, G. Zimmerbauer, F. Schinner, *Biotechnol. Tech.*, 1999, **13**, 313.
- [114] L. Mita, V. Sica, M. Guida, C. Nicolucci, T. Grimaldi, L. Caputo, M. Bianco, S. Rossi, U. Bencivenga, M.S.M. Eldin, M.A. Tufano, D.G. Mita, N. Diano, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, **62**, 133.
- [115] P.J. Halling, H.L. Holland, *Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols*, E.N. Vulfson (Red.), Humana Press: Totowa, NJ. 2001.

- [116] Z.-F. Xie, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1991, **2**, 733.
- [117] K.K. Kim, H.K. Song, D.H. Shin, K.Y. Hwang, S. Choe, O.J. Yoo, S.W. Suh, *Structure* 1997, **5**, 1571.
- [118] <http://www.uniprot.org/uniprot/?query=yourlist:M201501202EOV51B2KV&sort=yourlist:M201501202EOV51B2KV&columns=yourlist%28M201501202EOV51B2KV%29,id,entry%20name,reviewed,protein%20names,genes,organism,length>
- [119] <http://srs.ebi.ac.uk/>
- [120] C. Angkawidjaja, D.J. You, H. Matsumura, K. Kuwahara, Y. Koga, K. Takano, S. Kanaya, *FEBS Lett.*, 2007, **581**, 5060.
- [121] R.A. MacKeith, R. McCague, H.F. Olivo, S.M. Roberts, S.J.C. Taylor, H. Xiong, *Bioorg. Med. Chem.*, 1994, **2**, 387.
- [122] R.A. MacKeith, R. McCague, H.F. Olivo, C.F. Palmer, S.M. Roberts, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1993, 313.
- [123] S.J.C. Taylor, R. McCague, *Resolution of a versatile hydroxylactone synthon 4-endohydroxy-2-oxa-bicyclo[3.3.0]oct-7-en-3-one by lipase deesterification*, [w:] *Chirality In Industry II*, A.N. Collins, G.N. Sheldrake, J. Crosby (Red.), John Wiley & Sons, New York 1997, str. 190.
- [124] J.M. Guisan Seijas, P. Armisen Gil, P. Sabuquillo Castrillo, G. Fernandez-Lorente, R. Fernandez-Lafuente, A. Bastida Codina, J. Huguet Clotet, A. Bosch Rovira, E. de Ramon Amat, *Enzymatic process for obtaining enantiomerically pure ethyl (R)-2-hydroxy-4-phenylbutanoate using immobilized-lipase biocatalysts*, 2000, Span ES2145702.
- [125] M. Journet, R.D. Larsen, S.T. Sarraf, A. Shafiee, M.D. Truppo, V. Upadhyay, *Enzymatic preparation of chiral indole esters*, 2004, WO 2004104205.
- [126] M.D. Truppo, M. Journet, A. Shafiee, J.C. Moore, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2006, **10**, 592.
- [127] P. Dominguez de Maria, J.M. Sanchez-Montero, J.V. Sinisterra, A.R. Alcantara, *Biotechnol. Adv.*, 2006, **24**, 180.
- [128] J.M. Mancheno, M.A. Pernas, M.J. Martinez, B. Ochoa, M.L. Rua, J.A. Hermoso, *J. Mol. Biol.*, 2003, **332**, 1059.
- [129] P. Grochulski, Y. Li, J.D. Schrag, M. Cygler, *Protein Sci.*, 1994, **3**, 82.
- [130] D. Herbst, S. Peper, J.F. Fernández, W. Ruck, B. Niemeyer, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2014, **100**, 104.
- [131] F. Kartal, M.H.A. Janssen, F. Hollmann, R.A. Sheldon, A. Kilinc, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2011, **71**, 85.
- [132] G. Ozyilmaz, E. Gezer, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, **64**, 140.
- [133] T. Raghavendra, D. Sayania, D. Madamwar, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, **63**, 31.
- [134] A. Padney, S. Benjamin, C.R. Soccol, P. Nigam, N. Krieger, V.T. Soccol, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1999, **29**, 119.
- [135] C. Tsitsimpikou, H. Daflos, F.N. Kolisis, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 1997, **3**, 189.
- [136] J. Schmitt, S. Brocca, R.D. Schmid, J. Pleiss, *Protein. Eng.*, 2002, **15**, 595.
- [137] R.A. Sheldon, *Chirotechnology*, Marcel Dekker Inc., New York, 1993.
- [138] F.X. McConville, J.L. Lopez, S.A. Wald, *Enzymatic resolution of ibuprofen in a multiphase membrane reactor*, [w:] *Biocatalysis*, D.A. Abramowicz (Red.), van Nostrand Reinhold, New York 1990, str. 167.
- [139] C.J. Sih, *Process for preparing (S)- α -methylarylacetic acids*, 1987, EP 0227078.
- [140] J.M. Guisan Seijas, P. Armisen Gil, P. Sabuquillo Castrillo, G. Fernandez Lorente, R. Fernandez-Lafuente, A. Bastida Codina, J. Huguet Clotet, A. Bosch Rovira, E. de Ramon Amat, *Immobilized lipase biocatalysts*, 1999, PCT Int. Appl., WO9951726.
- [141] S.r.V. Lehmann, J. Breinholt, P.S. Bury, T.E. Nielsen, *Chirality*, 2000, **12**, 568.
- [142] S. Santini, J.M. Crowet, A. Thomas, M. Paquot, M. Vandenberg, P. Thonart, J. P. Wathélet, C. Blecker, G. Lognay, R. Brasseur, L. Lins, B. Charlotiaux, *Biophys. J.*, 2009, **96**, 4814.
- [143] R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, **62**, 197.

- [144] W. Bonrath, D. Eisenkrätzer, V. Enjolras, R. Karge, T. Netscher, M. Schneider, *Process for the manufacture of a vitamin E intermediate*, 2002, European patent EP 1239045.
- [145] W. Bonrath, R. Karge, T. Netscher, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2002, **19-20**, 67.
- [146] C.A. Martinez, S. Hu, Y. Dumond, J. Tao, P. Kelleher, L. Tully, *Org. Process Res. Dev.*, 2008, **12**, 392.
- [147] X.Y. Wu, S. Jaaskelainen, Y.-Y. Linko, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1996, **59**, 145.
- [148] L. Brady, A.M. Brzozowski, Z.S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J.P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Høge-Jensen, L. Nørskov, L. Thim, U. Menge, *Nature*, 1990, **343**, 767.
- [149] Z.S. Derewenda, U. Derewenda, G.G. Dodson, *J. Mol. Biol.*, 1992, **227**, 818.
- [150] A.M. Brzozowski, Z.S. Derewenda, E.J. Dodson, G.G. Dodson, J.P. Turkenburg, *Acta Crystallogr. B Struct. Sci.*, 1992, **48**, 307.
- [151] U. Derewenda, A.M. Brzozowski, D.M. Lawson, Z.S. Derewenda, *Biochemistry*, 1992, **31**, 1532.
- [152] G.J. Moskowitz, R. Cassaigne, I.R. West, T. Shen, L.I. Feldman, *J. Agric. Food Chem.*, 1977, **25**, 1146.
- [153] R.C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, **66**, 15.
- [154] R.C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, **64**, 1.
- [155] N. Turner, J. Winterman, R. McCague, *A method for preparing tert-leucine and analogues thereof in enantiomeric form, and intermediates therein*, 1995, PCT Int Appl WO9512573.
- [156] J.A. Blacker, D. Schofield, *Esters of (R) 2-(2-hydroxybutyl)-3-chlorothiophene and a process for the resolution of (S) 2-(2-hydroxybutyl)-3-chlorothiophene*, 1996 Brit UK Pat Appl GB2299332.
- [157] J.M. Guisan Seijas, G. Fernandez-Lorente, R. Fernandez-Lafuente, C. Mateo Gonzalez, C. Ceinos Rodriguez, P. Dalmases Barjoan, E. de Ramon Amat, *Enzymatic hydrolysis for paroxetine synthesis intermediates production consists of enantioselective hydrolysis of a racemic ester based mixture*, 2001, Span ES2161167.
- [158] J.M. Palomo, R.L. Segura, C. Mateo, M. Terreni, J.M. Guisan, R. Fernández-Lafuente, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**, 869.
- [159] V.H.M. Elferink, *Progress in the application of biocatalysis in the industrial scale manufacture of chiral molecules*, Chiral USA 96, 11th International Spring Innovations Chirality Symposium, 1995, str. 79, Boston.
- [160] W.E. Ladner, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 7250.
- [161] F. Balkenhohl, K. Ditrich, B. Hauer, W. Ladner, *Journal für Praktische Chemie/Chemiker-Zeitung*, 1997, **339**, 381.
- [162] F. Balkenhohl, B. Hauer, W. Ladner, U. Schnell, U. Pressler, H.R. Staudenmaier, *Lipase katalysierte Acylierung von Alkoholen mit Diketonen*, (1995), BASF AG, DE 4329293 A1.
- [163] T. Shibatani, K. Omori, H. Akatsuka, E. Kawai, H. Matsumae, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2000, **10**, 141.
- [164] R.A. Sheldon, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1996, **67**, 1.
- [165] T. Remarchuk, F. St-Jean, D. Carrera, S. Savage, H. Yajima, B. Wong, S. Babu, A. Deese, J. Stults, M.W. Dong, D. Askin, J.W. Lane, K.L. Spencer, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2014, **18**, 1652.
- [166] R.J. Kazlauskas, A.N.E. Weissfloch, A.T. Rappaport, L.A. Cuccia, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 2656.
- [167] Z. Guan, L.-Y. Li, Y.-H. He, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 16801.
- [168] M. Kapoor, M.N. Gupta, *Process Biochem.*, 2012, **47**, 555.
- [169] M.S. Humble, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, **2011**, 3391.
- [170] E. Busto, V. Gotor-Fernandez, Gotor, *V. Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 4504.
- [171] U.T. Bornscheuer, R.J. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2004, **43**, 6032.

