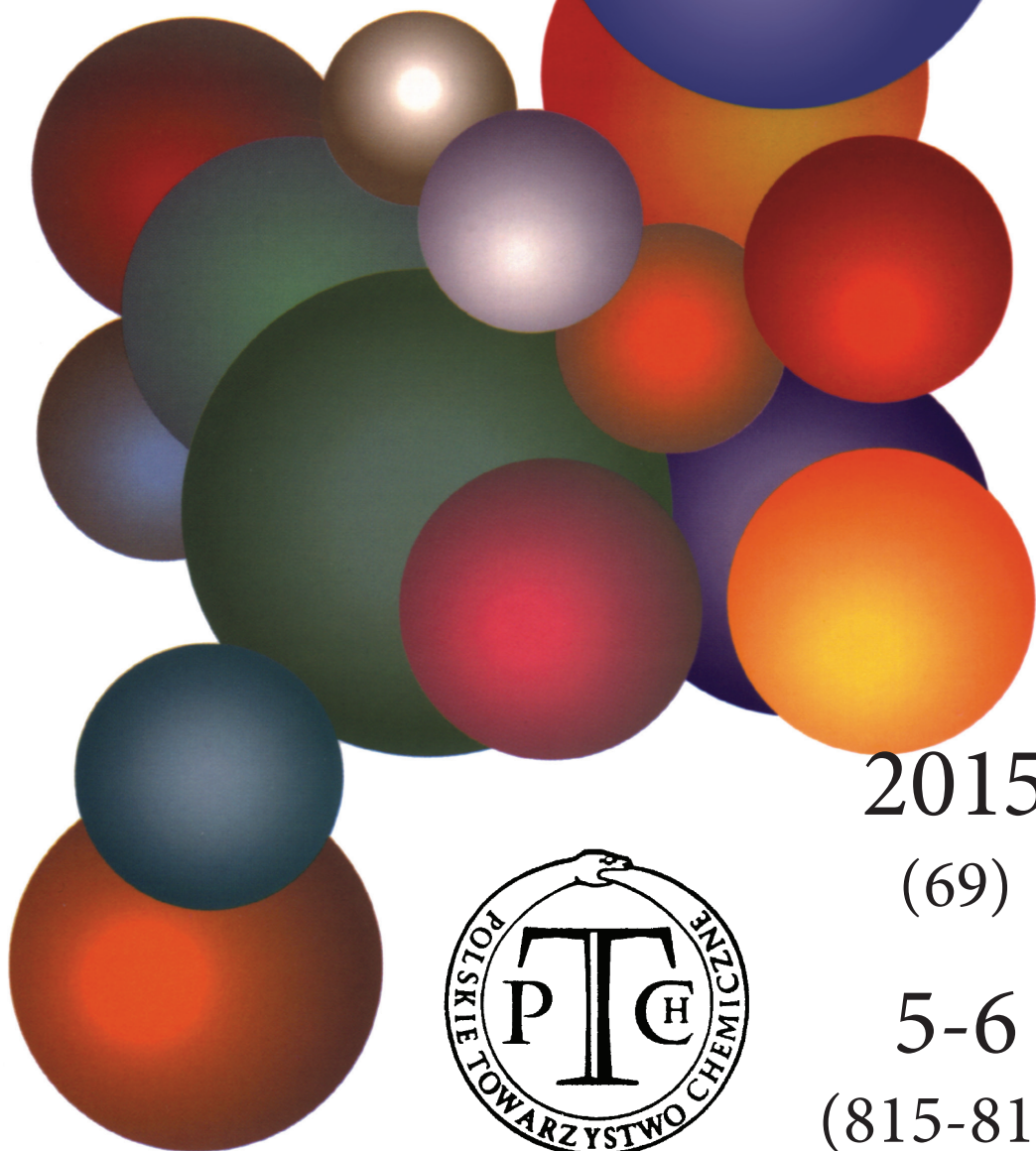


WIADOMOŚCI *chemiczne*

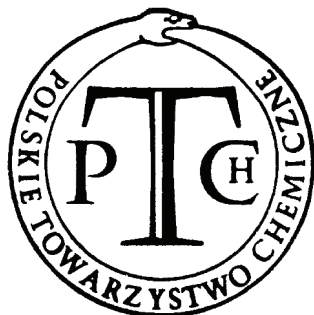


2015

(69)

5-6

(815-816)



CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez MNiSW

RADA REDAKCYJNA

RYSZARD ADAMIAK, IRENA BARANOWSKA, ANDRZEJ BARAŃSKI,
JERZY BŁAŻEJOWSKI, ANATOL KOJŁO, TADEUSZ M. KRYGOWSKI, ANDRZEJ KUTNER,
PIOTR PANETH (PRZEWODNICZĄCY), K. MICHAŁ PIETRUSIEWICZ, DARIUSZ POGOCKI,
MAREK POTRZEBOWSKI, GRZEGORZ SCHROEDER, ANDRZEJ SOKALSKI, ARTUR P. TERZYK

KOMITET REDAKCYJNY

JERZY P. HAWRANEK, ADAM JEZIEFSKI, LUDWIK KOMOROWSKI, MIROSLAW SOROKA,
MARIA SUSZYŃSKA, SŁAWOMIR SZAFERT, ANDRZEJ TROCHIMCZUK

REDAKTOR NACZELNY

ZDZISŁAW LATAJKA

SEKRETARZ REDAKCJI

BEATA ŚWIĄTEK-TRAN

BARBARA LATKO (FINANSE)

KAZIMIERA LUKJAN (KOLPORTAŻ)

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław

tel.: 71 375 73 89, tel./fax: 71 322 14 06

e-mail: wchem@wchuwr.pl

INTERNET

<http://www.wchuwr.pl/wiadchem.htm> (English abstracts)

<http://www.dbc.wroc.pl> (pełne teksty publikacji od roku 2006)

„Wiadomości Chemiczne” są wydawane w ramach serii *Acta Universitatis Wratislaviensis*

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2015

pISSN 0043-5104

eISSN 2300-0295

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w czerwcu 2015

Przygotowanie do druku i druk:

Firma Wydawnicza K2, al. Stanów Zjednoczonych 51, 04-026 Warszawa

tel. 22 517 78 12, fax 22 517 78 11, e-mail: k2@druk-k2.pl

**OLIGONUKLEOTYDY DNA
JAKO WARSTWY RECEPTOROWE SENSORÓW
ELEKTROCHEMICZNYCH**

**DNA OLIGONUCLEOTIDES AS RECEPTOR LAYERS
OF ELECTROCHEMICAL SENSORS**

**Łukasz Górski, Robert Ziólkowski, Agnieszka Bala,
Marta Jarczewska, Elżbieta Malinowska**

*Institut Biotechnologii, Zakład Mikrobioanalitiky, Wydział Chemiczny,
Politechnika Warszawska
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa
e-mail: lukegor@ch.pw.edu.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Kwasy nukleinowe jako warstwy receptorowe i ich zastosowanie w biosensorach DNA do oznaczania jonów metali ciężkich
2. Opracowanie biosensorów DNA przeznaczonych do detekcji kationów: UO_2^{2+} , Hg^{2+} i Pb^{2+}

Podsumowanie

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

dr inż. Łukasz Górski uzyskał tytuł zawodowy magistra inżyniera (2001) oraz stopień naukowy doktora nauk chemicznych (2006) na Wydziale Chemicznym PW. Jest członkiem grupy profesor Malinowskiej w Zakładzie Mikrobioanalitiky oraz wykładowcą akademickim dla kierunków technologia chemiczna i biotechnologia. Prowadzone przez niego badania dotyczą elektrod jonoselektywnych, analizy wstrzykowo-przepływowej oraz zastosowania samoorganizujących się monowarstw jako elementów receptorowych w biosensorach.

dr inż. Robert Ziółkowski uzyskał tytuł zawodowy magistra inżyniera (2005) oraz stopień naukowy doktora nauk chemicznych (2013) na Wydziale Chemicznym PW. Od 2008 r. jest członkiem grupy profesor Malinowskiej w Zakładzie Mikrobioanalitiky oraz wykładowcą akademickim dla kierunków technologia chemiczna i biotechnologia. Jego badania dotyczą zastosowania samoorganizujących się warstw, cząsteczek DNA, aptamerów oraz grafenu do tworzenia warstw receptorowych w biosensorach.

mgr inż. Agnieszka Bala uzyskała tytuł zawodowy magistra inżyniera w 2013 r. na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Od 2014 r. jest członkiem grupy badawczej profesor Malinowskiej i uczestniczką studiów doktoranckich. Prowadzone przez nią badania dotyczą zastosowania analogów kwasów nukleinowych do tworzenia warstw receptorowych w biosensorach.

mgr inż. Marta Jarczevska uzyskała tytuł zawodowy magistra inżyniera w 2012 na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Od 2012 jest członkiem grupy profesor Malinowskiej i uczestniczką studiów doktoranckich. Jej badania dotyczą opracowania biosensorów zawierających w warstwie receptorowej cząsteczki kwasów nukleinowych.

prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska uzyskała stopień naukowy doktora (1984), doktora habilitowanego (2002) oraz tytuł naukowy profesora (2007) na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Jest szefem Laboratorium Biosensorów w Zakładzie Mikrobioanalitiky oraz wykładowcą akademickim dla kierunku biotechnologia. W latach 1984–1985 była członkiem grupy prof. Wilhelma Simona w Swiss Federal Institute of Technology (ETH), a w latach 1993–1995 współpracowała z prof. Mark E. Meyerhoffem na University of Michigan. Prowadzone przez nią badania dotyczą opracowania chemicznych sensorów i biosensorów.

ABSTRACT

The need for elaboration of analytical devices of small dimensions and the accessibility of novel nanomaterials caused the increase in the number of publications referring to the development of biosensors. DNA-based biosensors are of special interest and they were primarily used for the determination of a specific sequence which is crucial in the detection of cancer, genetic mutations, pathogens, as well as analysis of modified food. Interestingly, they could be also applied for the detection of other analytes including heavy metal ions, especially in connection with electrochemical techniques. It should be noted that the design of DNA biosensor concerns not only the development of transducer, but also careful preparation of sensing layer and the choice of the method of analytical signal generation.

Selectivity is one of the essential parameter of the biosensor that determines its utility, particularly in real samples of complex matrices. In case of DNA sensors dedicated for the detection of complementary sequence, high selectivity is provided by the hybridization process. A pronounced specificity of sensing layer-analyte interaction can be also achieved with the use of functional nucleic acids - aptamers, which change their conformation upon binding an analyte.

Herein, DNA-modified electrodes were firstly used for the detection of uranyl ions, as they exhibit high affinity towards phosphate moieties of nucleic acids. It was shown that UO_2^{2+} interacts with sensing layer independently from the chosen oligonucleotide sequence. Moreover, the influence of Pb^{2+} was reduced by elimination of adenine, which strongly interacts with lead ions.

Another oligonucleotide-based sensor was developed for detection of mercury ions. The results indicate that Hg^{2+} concentration can be determined only with the use of sequence containing 100% thymine residues. Oligonucleotide-based sensor with receptor layer containing aptamers was elaborated for the detection of Pb^{2+} ions. In the presence of lead cations, an aptamer probe forms a G-quadruplex structure, a proposed biosensor could be characterized with selectivity towards Pb^{2+} .

The performance of DNA-based sensors for UO_2^{2+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} ions was optimized and addressed the choice of the manner of analytical signal generation, the influence of electrode modification with blocking agent, sensitivity dependence on the oligonucleotide sequence and the possibility of regeneration of sensing layer. Finally, the utility of proposed DNA sensors was tested by analysis in real samples.

Keywords: biosensors, heavy metals, nucleic acids, self-assembled monolayers, voltammetry, redox indicators

Słowa kluczowe: biosensory, metale ciężkie, kwasy nukleinowe, samoorganizujące się monowarstwy, woltamperometria, znaczniki redoks

WPROWADZENIE

Obserwowany w ostatnich latach intensywny wzrost liczby publikacji dotyczących biosensorów jest z jednej strony odpowiedzią na zapotrzebowanie na niewielkie urządzenia analityczne, przekształcające informację chemiczną (np. stężenie) na sygnał analityczny [1]. Z drugiej strony rozwój biosensorów wynika z dostępności nowoczesnych materiałów, których umiejętne zastosowanie prowadzi do poprawy parametrów pracy konstruowanych urządzeń [2–4]. Szczególnie ciekawą grupę biosensorów stanowią sensory DNA, które są wykorzystywane przede wszystkim do identyfikacji sekwencji nukleotydowej badanej nici DNA [5], co jest istotne w diagnostyce chorób nowotworowych i genetycznych [6], określaniu rodzaju patogenu wywołującego chorobę [7], a także w badaniu jakości żywności modyfikowanej genetycznie [8]. Innym, dość niekonwencjonalnym, a rozwijanym od niedawna zastosowaniem biosensorów DNA jest oznaczanie innych analitów, takich jak np. jony metali ciężkich [9]. W sensorach DNA zazwyczaj są wykorzystywane przetworniki optyczne, jednak coraz popularniejsze stają się elektrochemiczne techniki detekcji, głównie ze względu na niskie granice oznaczalności, łatwość miniaturyzacji oraz niskie koszty aparatury [10].

Opracowanie biosensora DNA o korzystnych parametrach analitycznych, niezależnie od jego zastosowania, wymaga przemyślanego zaprojektowania i wykonania zarówno przetwornika, jak i warstwy receptorowej. Istotny jest również sposób generowania sygnału analitycznego, który w przypadku elektrochemicznych sensorów DNA może być związany z właściwościami elektroaktywnymi analitu lub pochodzący z utlenienia zasad azotowych występujących w kwasach nukleinowych [11]. Jednak ograniczona ilość takich związków, a także konieczność poprawy czułości oraz granicy oznaczalności spowodowały, że coraz częściej stosowane są znaczniki elektroaktywne [12]. Optymalizacja kolejnych etapów przygotowania sensorów DNA jest niezbędna do określenia ich użyteczności, dzięki czemu w przyszłości mogłyby zostać wykorzystane m.in. w analizie środowiskowej oraz klinicznej [13, 14].

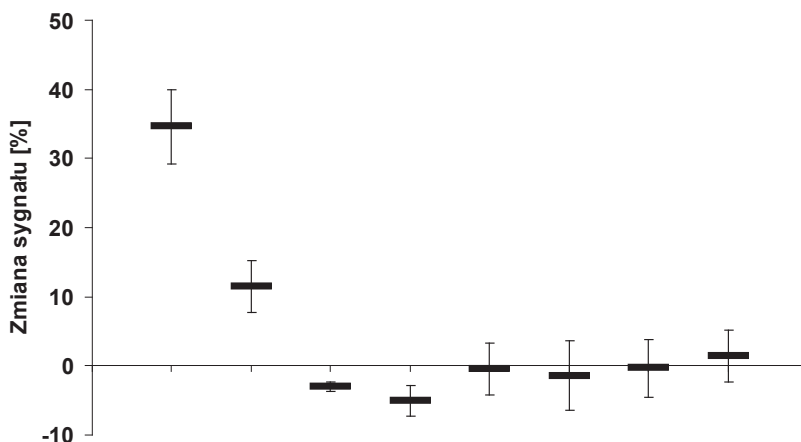
1. KWASY NUKLEINOWE JAKO WARSTWY RECEPTOROWE I ICH ZASTOSOWANIE W BIOSENSORACH DNA DO OZNACZANIA JONÓW METALI CIĘŻKICH

Selektywność jest jednym z najistotniejszych parametrów sensorów chemicznych, który umożliwia oznaczanie analitu nawet w próbkach o złożonych matrycach, w których substancje przeszkadzające występują w znacznym nadmiarze do substancji oznaczanej. O selektywności sensorów chemicznych decyduje warstwa receptorowa, bezpośrednio kontaktująca się z próbką i oddziałująca z jej składnikami. W przypadku sensorów DNA przeznaczonych do wykrywania w próbce sekwencji komplementarnych wysoką selektywność rozpoznania sekwencji ozna-

czanej wśród wielu różnych fragmentów DNA zapewnia proces hybrydyzacji nici nukleotydowych, który zachodzi w warstwie receptorowej sensora [15].

Stosunkowo nowym kierunkiem badań jest zastosowanie jako warstw receptorowych tzw. funkcjonalnych kwasów nukleinowych (FNA). Grupę FNA stanowią cząsteczki DNA i RNA, które wykazują właściwości receptorowe (np. aptamery) oraz katalityczne (m.in. DNAzy) [16]. Aptamery to krótkie sekwencje DNA lub RNA, które posiadają zdolność do oddziaływania z różnymi cząsteczkami organicznymi lub nieorganicznymi. Zdolność ta wynika zarówno z obecności w strukturze kwasów nukleinowych atomów donorowych, jak i z możliwości przyjmowania przez określonego kształtu aptamery w przestrzeni, zdefiniowanego przez sekwencję oligonukleotydu. Wiązanie aptameru z określoną cząsteczką prowadzi do zmiany jego konformacji, co prowadzi do zmiany mierzonego sygnału analitycznego [17, 18].

Kwasy nukleinowe mogą zatem pełnić rolę receptorów, a wśród potencjalnych analitów, które mogą być oznaczane z ich zastosowaniem, są jony metali. Z tego powodu podjęto próby opracowania elektrod modyfikowanych DNA, przeznaczonych do detekcji jonów metali ciężkich. Wstępnym etapem prowadzonych badań było określenie, czy istnieje wyraźna zależność między doбором sekwencji oligonukleotydowej dowiązanej do elektrody, a selektywnością jej oddziaływań z jonami metali. Przedmiotem analizy był kation uranylowy UO_2^{2+} , który wykazuje znaczne powinowactwo do grup fosforanowych, obecnych również w strukturze DNA. Przypuszczano więc, że niezależnie od wykorzystanej sekwencji oligonukleotydu, będzie obserwowana znaczna selektywność sensora na jony UO_2^{2+} . Istotnie, wyniki doświadczeń [19] wykazały, że elektrody zmodyfikowane losowo wybranym oligonukleotydem charakteryzowały się wysoką selektywnością wobec kationów uranylowych w porównaniu do innych badanych jonów. Najsilniej przeszkadzającym kationem był Pb^{2+} , który zgodnie z danymi literaturowymi, wykazuje znaczne powinowactwo do adeniny, obecnej w stosowanej losowej sekwencji. Podjęto zatem próbę ograniczenia wpływu jonów Pb^{2+} na oznaczanie UO_2^{2+} poprzez zmniejszenie liczby zasad adeninowych w oligonukleotydzie zaimmobilizowanym na elektrodzie [20]. Okazało się, że elektrody modyfikowane oligonukleotydami zawierającymi mniejszą ilość zasad adeninowych lub w ogóle ich nie zawierającymi generowały znacznie niższą odpowiedź na jony ołowiu w porównaniu do sekwencji wyjściowej. Co więcej, odpowiedź na jony UO_2^{2+} była niezależna od użytej sekwencji, co potwierdza tezę, że oddziaływanie tego jonu z DNA zachodzi przede wszystkim poprzez grupy fosforanowe.



Rysunek 1. Selektyność elektrody złotej modyfikowanej oligonukleotydem 5'-SH-(CH₂)₆-TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3' wobec wybranych jonów metali ciężkich

Figure 1. Selectivity of gold electrode, modified with 5'-SH-(CH₂)₆-TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3' oligonucleotide, towards selected heavy metal ions

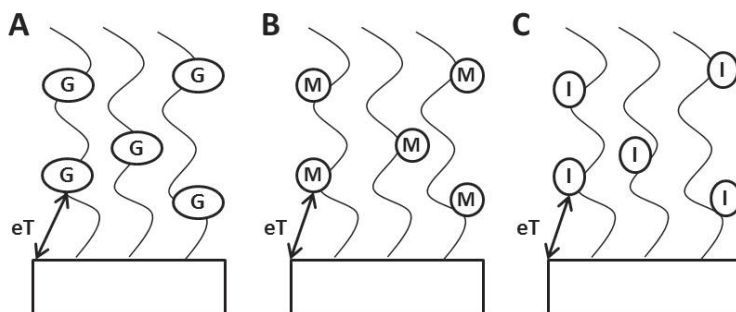
Kolejnym jonem, oznaczanym z użyciem elektrochemicznego sensora DNA, był kation Hg²⁺ [21, 22]. W literaturze występują informacje o silnym wiązaniu jonów rtęci między dwiema zasadami tyminowymi. W tym przypadku oczekiwano, że odpowiedź sensora będzie zależna od sekwencji oligonukleotydu zaimmobilizowanego na elektrodzie. Rzeczywiście, badania wykazały, że odpowiedź elektrochemiczna na jony Hg²⁺ generowana jest tylko w przypadku elektrod modyfikowanych oligonukleotydami składającymi się jedynie z zasad tyminowych. W przypadku zastosowania oligonukleotydów zawierających 33% oraz 0% zasad tyminowych, odpowiedź prądowa na jony rtęci nie była obserwowana. Co ważne, elektrody modyfikowane oligonukleotydem 5'-SH-(CH₂)₆-(T)₁₅-3' charakteryzowały się bardzo wysoką selektywnością na jony rtęci wobec większości badanych jonów przeszkadzających (Rys. 1). Jedynie kation uranylowy miał wyraźny wpływ na odpowiedź elektrody, co należy tłumaczyć oddziaływaniem tego jonu z grupami fosforowymi, obecnymi w we wszystkich sekwencjach oligonukleotydowych.

Szczególnie ciekawa wydaje się również możliwość oznaczania jonów metali z użyciem aptamerów. W przypadku tej grupy oligonukleotydów, sekwencja zasad jest istotna nie tylko z uwagi na specyficzne oddziaływania zasad z analitem (np. jonem metalu), ale także poprzez wpływ sekwencji na przestrzenny układ nici oligonukleotydu. Aptamery mogą bowiem tworzyć formy przestrzenne, preferujące swym kształtem i wielkością oddziaływanie z określoną cząsteczką [18]. Jedną z najczęściej opisywanych w literaturze sekwencji aptamerowych jest aptamer wiążący trombinę (ang. *thrombin binding aptamer*, TBA) [23]. Najważniejszym elementem strukturalnym tego receptora jest układ dwóch równoległych kwartetów guaninowych. Z uwagi na opisane w literaturze znaczne powinowactwo jonów ołowiu do zasady

guaninowej, ciekawym wydało się sprawdzenie, czy możliwe jest opracowanie sensora elektrochemicznego do oznaczania jonów Pb^{2+} wykorzystującego w warstwie receptorowej TBA [24]. Dla porównania przeprowadzono badania z elektrodami modyfikowanymi oligonukleotydem o takiej samej długości i losowej sekwencji. Wyniki pomiarów elektrochemicznych z zastosowaniem tak przygotowanych elektrod pozwoliły stwierdzić, że sekwencja TBA wykazuje, zgodnie z oczekiwaniami, znaczną selektywność wobec jonów ołowiu, podczas gdy sekwencja losowa daje znikomą odpowiedź na te jony. Co więcej, przeprowadzone pomiary spektroskopii impedancyjnej (EIS) wskazują, że struktura przestrzenna aptameru tworzy się dopiero w obecności jonów ołowiu (tzw. dopasowanie indukowane).

Podsumowując tę część badań, należy stwierdzić, że sekwencje oligonukleotydów tworzących warstwy receptorowe sensorów elektrochemicznych, przeznaczonych do oznaczania jonów metali, mają znaczny wpływ na ich selektywność. Możliwe jest wykorzystanie zarówno oddziaływań jonów metali z grupami fosforanowymi DNA, z zasadami azotowymi, jak i dopasowania przestrzennego oligonukleotydu (aptameru) do oznaczanego jonu. Podobne wnioski można wyciągnąć na podstawie przeglądu publikacji innych grup badawczych, zajmujących się tą tematyką [25].

2. OPRACOWANIE BIOSENSORÓW DNA PRZEZNACZONYCH DO DETEKcji KATIONÓW: UO_2^{2+} , Hg^{2+} I Pb^{2+}

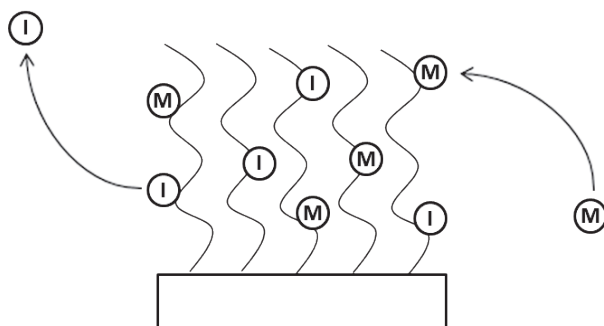


Rysunek 2. Strategie generowania sygnału analitycznego w elektrochemicznych sensorach DNA. G – guanina; M – jon metalu; I – znacznik elektrochemiczny

Figure 2. Generation of analytical signal in electrochemical DNA sensors. G – guanine; M – metal ion; I – redox indicator

Istotnym zagadnieniem w opracowaniu elektrochemicznego sensora DNA jest zawsze sposób generowania sygnału prądowego. Możliwe jest wykorzystanie właściwości redoks zasad azotowych (najczęściej guaniny) [9], redukcji lub utleniania analitu związanego z warstwą receptorową [26] lub też zastosowanie znaczników elektroaktywnych [12]. W przypadku sensorów przeznaczonych do oznaczania jonów metali ciężkich oczywistym wydaje się wykorzystanie ich właściwości redu-

kująco-utleniających (Rys. 2). Jednakże przy zastosowaniu detekcji elektrochemicznej takie rozwiązanie nie zawsze jest optymalne. Zbyt skrajne potencjały przykładane do elektrody pracującej modyfikowanej DNA mogą powodować desorpcję warstwy receptorowej, a więc uszkodzenie sensora. Dlatego w badaniach wykorzystano popularny znacznik redoks – błękit metylenowy (MB) [12]. Zaproponowano nowatorski sposób uzyskiwania sygnału analitycznego, polegający na pomiarze różnicowym (Rys. 3). W pierwszym etapie mierzony jest prąd dla elektrody modyfikowanej oligonukleotydem, zanurzonej w odpowiednim elektrolicie zawierającym MB. Następnie elektroda jest inkubowana w próbce zawierającej oznaczany jon oraz MB. Jony metali silnie oddziałujące z oligonukleotydem wypierają część cząsteczek błękitu z warstwy receptorowej, a więc prąd pochodzący od MB mierzony po ustaleniu się równowagi jest niższy. Jest to związane z dodatnim ładunkiem zarówno kationów metali, jak i błękitu metylenowego. Sygnałem analitycznym jest zatem zmiana wielkości prądu dla MB, rejestrowanego dla badanego sensora przed i po kontakcie z oznaczanym jonem metalu [19]. Zaletami takiego układu są: możliwość zastosowania znacznika dającego sygnał prądowy o możliwie niskim potencjale oraz zmniejszenie wpływu jakości powierzchni elektrody oraz niedoskonałości utworzonej oligonukleotydowej warstwy receptorowej DNA na powtarzalność wyników z uwagi na różnicowy charakter pomiaru. Z drugiej strony, wadą tego układu jest brak możliwości wykorzystania potencjału przyłożonego do elektrody do poprawy selektywności analizy, co sprawia, że jedynym czynnikiem decydującym o selektywności pozostaje oddziaływanie warstwy receptorowej ze składnikami próbki.



Rysunek 3. Mechanizm działania oligonukleotydowego biosensora z użyciem znacznika redoks. M – jon metalu; I – znacznik elektrochemiczny

Figure 3. Working mechanism for oligonucleotide-based biosensor with the use of redox indicator. M – metal ion; I – redox indicator

Opisany powyżej sposób został z powodzeniem wykorzystany do uzyskania sygnału analitycznego w sensorach DNA przeznaczonych do oznaczania jonów UO_2^{2+} , Hg^{2+} oraz Pb^{2+} . Kolejne badania zmierzały do optymalizacji parametrów analitycznych opracowanych sensorów poprzez dobór składu warstwy receptorowej. Badania rozpoczęto od przygotowania sensora na jony uranowe [19]. Zbadano

wpływ wprowadzenia do monowarstwy oligonukleotydu tzw. czynnika blokującego – 6-merkpto-1-heksanolu (MCH). Obecność tego związku prowadzi do lepszego uporządkowania monowarstwy oraz pokrycia obszarów nie związanych z oligonukleotydem. Stwierdzono, że wprowadzenie MCH do warstwy receptorowej sensora jonów UO_2^{2+} powoduje zmniejszenie nachylenia krzywej kalibracji, co można wytłumaczyć mniejszą gęstością pokrycia powierzchni elektrody przez oligonukleotydy. Jednocześnie poprawie uległa wartość korelacji liniowej krzywej kalibracji (R^2), co można wiązać z lepszym uporządkowaniem monowarstwy DNA [20].

Istotnym parametrem warstwy receptorowej jest długość oligonukleotydu zastosowanego do jej wytworzenia. Badano elektrody modyfikowane sekwencjami o długości 5, 10, 15 i 20 zasad. Stwierdzono, że największą czułością na jony UO_2^{2+} charakteryzowały się sensory zmodyfikowane oligonukleotydem o długości 10 zasad. Niższa czułość, obserwowana w przypadku sekwencji zawierającej 5 zasad, wynika z niewielkiej ilości grup fosforanowych wiążących jon uranylowy. Natomiast nieznacznie niższa czułość dla sekwencji o długości 15 i 20 zasad jest związana z możliwością wyginania się i hybrydyzacji oligonukleotydów tworzących warstwę receptorową. Określono także wpływ czasu kontaktu sensora z próbką zawierającą jony UO_2^{2+} na czułość odpowiedzi. Zgodnie z oczekiwaniami, dłuższy czas inkubacji skutkował większą zmianą sygnału analitycznego przy zmianie stężenia analitu [20]. Należy więc stwierdzić, że czułość sensora może być w znacznym stopniu regulowana poprzez dobór długości oligonukleotydu tworzącego warstwę receptorową oraz czas inkubacji sensora w próbce.

Podjęto także próby regeneracji sensora po jego użyciu poprzez usunięcie jonów uranylowych z warstwy receptorowej. Procedura polegała na 20-krotnym skanowaniu elektrody techniką woltamperometrii cyklicznej w roztworze zawierającym EDTA. Przeprowadzone 4 cykle regeneracji wykazały, że znaczący spadek odpowiedzi obserwowany jest jedynie po pierwszej procedurze regeneracji sensora, natomiast w następnych cyklach sygnał stabilizuje się. Zastosowana procedura regeneracji, choć niedoskonała, umożliwia więc kilkukrotne wykorzystanie tego samego sensora do oznaczania jonów uranylowych. Zoptymalizowany sensor charakteryzuje się dolną granicą oznaczalności dla jonów UO_2^{2+} wynoszącą 30 nmol L^{-1} , przy maksymalnym stężeniu tego jonu dopuszczalnym w wodzie pitnej przez US Environmental Protection Agency wynoszącym 130 nmol L^{-1} [20].

Opisany powyżej sposób generowania sygnału analitycznego, wykorzystujący różnicowy pomiar prądu pochodzącego od błękitu metylenowego, został zastosowany także dla sensora jonów rtęci [21, 22]. Jak już wspomniano, w tym przypadku elektroda złota była modyfikowana oligonukleotydem składającym się z zasad tyminowych. Wykorzystując spektroskopię impedancyjną, sprawdzono celowość dodatkowego wprowadzenia do warstwy receptorowej 6-merkpto-1-heksanolu. Stwierdzono, że w monowarstwie mieszanej oligonukleotydy są rzadziej upakowane, co może sprzyjać wnikaniu w strukturę monowarstwy jonów Hg^{2+} i tworzeniu przez nie kompleksu z dwiema zasadami tyminowymi, znajdującymi się w sąsiednich

niciach DNA. Ponadto, MCH blokuje fragmenty elektrody złotej nie pokryte oligonukleotydami, co zapobiega ewentualnej redukcji jonów rtęci w czasie pomiaru i tworzeniu się amalgamatu złota. Na podstawie powyższych przesłanek, w dalszych badaniach stosowano monowarstwy zbudowane z oligonukleotydu i MCH.

Z uwagi na sposób powstawania sygnału analitycznego w badanych sensorach, polegający na wypieraniu z warstwy receptorowej cząsteczek znacznika (MB) przez jon rtęci, czynnikiem istotnym dla parametrów analitycznych jest stężenie MB w próbce pomiarowej. W związku z tym zmierzono odpowiedź sensora przy stałym stężeniu jonów rtęci i różnych stężeniach błękitu metylenowego. Największy sygnał analityczny zarejestrowano przy stężeniu MB wynoszącym $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ i takie stężenia znacznika stosowano w dalszych badaniach [22].

Procesy elektrodowe, prowadzone w warunkach hydrodynamicznych, a więc gdy dominującym sposobem transportu cząsteczek w elektrolicie jest konwekcja wymuszona, charakteryzują się znacznie wydajniejszą wymianą masy na granicy faz elektroda/elektrolit niż procesy prowadzone w warunkach stacjonarnych. W związku z tym wykonano krzywe kalibracji opracowanych sensorów zarówno w warunkach stacjonarnych, jak i dynamicznych (z mieszaniem próbki zawierającej jony rtęci). W warunkach stacjonarnych dolna granica oznaczalności dla jonów rtęci wyniosła $70,2 \text{ nmol L}^{-1}$, co jest wartością zbyt wysoką do praktycznych zastosowań sensora. W warunkach hydrodynamicznych zarejestrowano znacznie niższą wartość dolnej granicy oznaczalności, wynoszącą $4,63 \text{ nmol L}^{-1}$. Wartość ta jest niższa niż maksymalne dopuszczalne stężenie jonów rtęci w wodzie pitnej, ustalone przez US Environmental Protection Agency na poziomie $0,002 \text{ mg L}^{-1}$ (około 10 nM L^{-1}). Możliwość zastosowania opracowanego sensora do oznaczania rtęci w próbkach rzeczywistych sprawdzono, dokonując analizy certyfikowanego materiału odniesienia. Otrzymany wynik ($3,51 \mu\text{mol L}^{-1}$) jest na poziomie stężenia deklarowanego przez producenta ($3,00 \mu\text{mol L}^{-1}$) [22].

Interesujące wyniki otrzymano podczas badań nad sensorem przeznaczonym do oznaczania jonów ołowiu [23]. W tym przypadku w warstwie receptorowej sensora zastosowano aptamer – oligonukleotyd przyjmujący w obecności jonów ołowiu strukturę podwójnego kwadrupleksu guaninowego (TBA). Tworzony układ decyduje o selektywności tego sensora, ma jednak także wpływ na oddziaływanie z błękitem metylenowym stosowanym w celu uzyskania sygnału prądowego. Większe wyeksponowanie zasad guaninowych sprawia, że MB, wykazując znaczne powinowactwo do guaniny, silniej oddziałuje z aptamerem w konformacji kwadrupleksu niż w układzie liniowym. Mierzalnym efektem takiej sytuacji jest wzrost prądu pochodzącego od błękitu metylenowego, rejestrowany przy wzrastającym stężeniu jonów ołowiu w próbce. W przypadku opisywanych wcześniej sensorów przeznaczonych do oznaczania jonów UO_2^{2+} i Hg^{2+} , wraz ze wzrastającym stężeniem analitu sygnał malał.

Podobnie jak dla pozostałych badanych sensorów DNA, przeznaczonych do oznaczania jonów metali ciężkich, w sensorze jonów ołowiu zastosowano monowarstwę mieszaną, w skład której wchodził oligonukleotyd (aptamer) oraz 6-mer-

kapto-1-heksanol. Tak przygotowany sensor zastosowano do oznaczania ołowiu w próbkach wody wodociągowej, do której dodano $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ w stężeniu $1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Wynik analizy tak przygotowanej próbki z zastosowaniem sensora DNA, wynoszący $0,99 \mu\text{mol L}^{-1}$, świadczy o możliwości jego wykorzystania do analizy próbek rzeczywistych [23].

Opracowany sensor charakteryzował się dolną granicą oznaczalności dla jonów ołowiu wynoszącą $34,7 \text{ nmol L}^{-1}$. Choć jest to wartość niższa od maksymalnego dopuszczalnego stężenia jonów Pb^{2+} w wodzie pitnej, ustalonego przez US Environmental Protection Agency ($0,015 \text{ mg L}^{-1}$, 72 nmol L^{-1}), to należy jednak stwierdzić, że nie jest ona satysfakcjonująca na tle innych elektrochemicznych metod oznaczania ołowiu. Dlatego też podjęto prace nad obniżeniem dolnej granicy oznaczalności tych sensorów, między innymi poprzez zastosowanie innego znacznika redoks. Badania te są wciąż prowadzone, a ich wstępne wyniki wydają się bardzo obiecujące [23].

PODSUMOWANIE

W niniejszym artykule opisano zastosowanie biosensorów z warstwami receptorowymi DNA, przeznaczonymi do oznaczania jonów metali ciężkich. Można stwierdzić, że taki sposób modyfikacji jest prostszy i dający więcej możliwości, w porównaniu do zastosowania klasycznych receptorów. Opracowanie nowego związku, zdolnego do selektywnego oddziaływania z wybranym analitem, wymaga zazwyczaj syntezy kilku związków o zbliżonej strukturze, a wybór najlepszego z nich jest dokonywany na podstawie badań empirycznych. Synteza receptorów to najczęściej proces wieloetapowy, wymagający dużej wiedzy, czasu, a przede wszystkim generujący znaczne koszty. Oligonukleotydy są obecnie dostępne komercyjnie, zakupić można właściwie dowolną sekwencję zasad, dodatkowo istnieje możliwość modyfikacji oligonukleotydu różnego rodzaju grupami, np. w celu ułatwienia immobilizacji. Co szczególnie ważne, dzięki automatyzacji syntezy, koszty zakupu oligonukleotydów są niewielkie, nawet w przypadku oczyszczania HPLC i modyfikacji np. grupą $-\text{SH}$. Umożliwia to sprawne prowadzenie szeroko zakrojonych badań nad sensorami DNA.

Zastosowanie opracowanych sensorów DNA do oznaczania jonów metali ciężkich odbiega od najbardziej naturalnej aplikacji, jaką jest oznaczanie ważnych sekwencji kwasów nukleinowych. Mimo to, sensory te charakteryzują się wysoką selektywnością wobec oznaczanych jonów, przy czym selektywność może być w znacznym stopniu modyfikowana przez dobór odpowiedniej sekwencji oligonukleotydu. Dolne granice oznaczalności, wyznaczone dla tych sensorów, pozwalają na oznaczanie jonów uranilowych, ołowiu i rtęci w próbkach np. wody pitnej na poziomie poniżej dopuszczalnych norm.

PODZIĘKOWANIA

Badania zrealizowano dzięki finansowaniu z grantu NCN nr 2011/01/N/ST4/03330 oraz ze środków Politechniki Warszawskiej.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] G.S. Wilson, R. Gifford, *Biosens. Bioelectron.*, 2005, **20**, 2388.
- [2] N.L. Rosi, C.A. Mirkin, *Chem. Rev.*, 2005, **105** (4), 1547.
- [3] Y. Shao, J. Wang, H. Wu, J. Liu, I.A. Aksay, Y. Lin, *Electroanal.*, 2010, **22** (10), 1027.
- [4] J. Wang, *Electroanal.*, 2005, **17**(1), 7.
- [5] F.R.R. Teles, L.P. Fonseca, *Talanta*, 2008, **77**, 606.
- [6] A. Sassolas, B.D. Leca-Bouvier, L.J. Blum, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 109.
- [7] K.R. Rogers, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **568**, 222.
- [8] D.P. Kalogianni, T. Koraki, T.K. Christopoulos, P.C. Ioannou, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, **21**, 1069.
- [9] S.C.B. Oliveira, O. Corduneanu, A.M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry*, 2008, **72**, 53.
- [10] T.G. Drummond, M.G. Hill, J.K. Barton, *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21** (10), 1192.
- [11] J.J. Gooding, *Electroanal.*, 2002, **14** (17), 1149.
- [12] E.E. Ferapontova, *Curr. Anal. Chem.*, 2011, **7** (1), 51.
- [13] G. Bagni, D. Osella, E. Sturchio, M. Mascini, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **573–574**, 81.
- [14] P. D'Orazio, *Clin. Chim. Acta*, 2011, **412**, 1749.
- [15] E. Palecek, M. Fojta, M. Tomschik, J. Wang, *Biosens. Bioelectron.*, 1998, **13**, 621.
- [16] Y. Lu, J. Liu, *Curr. Opin. Biotech.*, 2006, **17**, 580.
- [17] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, *Biomem. Eng.*, 2007, **24**, 381.
- [18] S. Song, L. Wang, J. Li, J. Zhao, C. Fan, *Trac-Trend Anal. Chem.*, 2008, **27** (2), 108.
- [19] R. Ziółkowski, Ł. Górski, S. Oszałdowski, E. Malinowska, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **402**, 2259.
- [20] M. Jarczewska, R. Ziółkowski, Ł. Górski, E. Malinowska, *Bioelectrochemistry*, 2014, **96**, 1.
- [21] Ł. Górski, R. Ziółkowski, E. Malinowska, *ECS Trans.*, 2012, **50**, 333.
- [22] R. Ziółkowski, M. Jarczewska, Ł. Górski, E. Malinowska, *J. Electroche. Soc.*, 2013, **160**, B152.
- [23] A.-E. Radi, J.L.A. Sanchez, E. Baldrich, C.K. O'Sullivan, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 6320.
- [24] M. Jarczewska, E. Kierzkowska, R. Ziółkowski, Ł. Górski, E. Malinowska, *Bioelectrochemistry*, 2015, **101**, 35.
- [25] R. Ziółkowski, Ł. Górski, *Curr. Anal. Chem.*, 2014, **10**, 600.
- [26] A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, *Electroanal.*, 2009, **21** (11), 1237.

Praca wpłynęła do Redakcji 8 maja 2015

**ENZYMATYCZNE REAKCJE
ROZSZCZEPIENIA WIĄZANIA C-C.
ZASTOSOWANIE W SYNTEZIE ZWIĄZKÓW
ZAPACHOWYCH, FARMACEUTYKÓW
ORAZ W BIOREMEDIACJI**

**ENZYMATIC REACTIONS OF THE C-C BOND
CLEAVAGE. APPLICATIONS IN SYNTHESIS OF
AROMA COMPOUNDS, PHARMACEUTICALS
AND IN BIOREMEDIATION**

Anna Panek*, Natalia Milecka-Tronina, Alina Świzdor

*Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,
ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław
e-mail: anna.szpineter@up.wroc.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. Enzymatyczne reakcje rozszczepienia wiązania C-C
2. Wykorzystanie reakcji rozszczepienia wiązania C-C w syntezie
 - 2.1. Synteza związków zapachowych
 - 2.1.1. Otrzymywanie γ -laktonów
 - 2.1.2. Otrzymywanie metyloketonów
 - 2.1.3. Otrzymywanie waniliny
 - 2.2. Enzymatyczna modyfikacja steroli do produktów użytecznych w syntezie leków steroidowych
 - 2.2.1. Surowce do produkcji leków steroidowych
 - 2.2.2. Przebieg enzymatycznej degradacji łańcucha bocznego steroli
 - 2.2.3. Wykorzystanie produktów degradacji steroli w syntezie leków
3. Biodegradacja związków aromatycznych

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Anna Panek jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Uzyskała tytuł doktora nauk biologicznych z zakresu biotechnologii na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu. Obecnie jest adiunktem w Katedrze Chemii Wydziału Nauk o Żywności UP we Wrocławiu. Głównym obszarem jej zainteresowań badawczych jest enzymatyczna modyfikacja związków naturalnych, głównie izoprenoidów, z uwzględnieniem układów steroidowych.

Natalia Milecka-Tronina w roku 2009 ukończyła studia z zakresu biotechnologii na Wydziale Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, gdzie w 2013 roku uzyskała tytuł doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia. Obecnie jest asystentem w Katedrze Chemii wspomnianej uczelni. Wiodącym tematem jej badań są mikrobiologiczne przekształcenia związków steroidowych.

Alina Świzdor po ukończeniu studiów chemicznych na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego podjęła pracę w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, gdzie uzyskała stopień doktora oraz doktora habilitowanego nauk biologicznych z zakresu biotechnologii. Obecnie jest adiunktem na Wydziale Nauk o Żywności tej uczelni. Główne kierunki jej pracy naukowej to przekształcenia mikrobiologiczne naturalnych związków izoprenoidowych, w szczególności biotransformacje układów steroidowych.

ABSTRACT

The microorganisms are able to utilize natural and synthetic compounds of broad structural diversity as a source of carbon and energy, converting these substrates into low molecular weight products (mainly H_2O , CO_2 and NH_3). The main role in this metabolism is played by the enzymes that catalyze reactions of the C-C bond cleavage. Such reactions are the key step of the primary metabolism of fatty acids in eukaryotic cells by the β -oxidation. The enzymatic systems associated with the C-C bond cleavage have been applied in the synthesis of valuable natural products and in the bioremediation processes.

Microbial transformations of natural compounds, in which the reactions of β -oxidation cycle are used, allow the formation of natural aromatic compounds (used as food additives), pharmaceuticals and ingredients of cosmetic compositions. Using this path one can obtain methyl ketones (e.g. responsible for the characteristic smell of cheeses), γ -lactones determining the scent of several popular fruits, and vanillin.

A modification of the natural steroids: saponins, alkaloids, sterols, bile acids to products useful in the synthesis of steroid drugs is the most important area of use of the enzymatic C-C bond cleavage, due to the practical significance of the products. Enzymes that catalyze the C-C bonds cleavage are important in the process of biodegradation of toxic aromatic hydrocarbons and their derivatives (bioremediation).

Keywords: β -oxidation, vanillin, γ -decalactone, methyl ketones, steroid drugs, bioremediation

Słowa kluczowe: β -oksydacja, wanilina, γ -dekalakton, metyloketony, leki steroidowe, bioremediacja

WPROWADZENIE

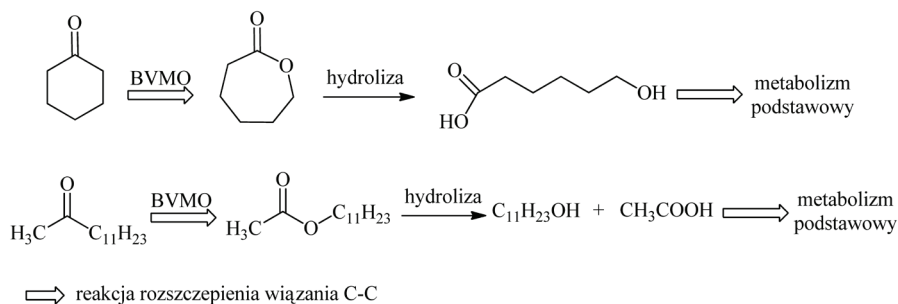
Zastosowanie biokatalizy w syntezie systematycznie wzrasta, głównie ze względu na wysoką aktywność katalityczną enzymów, selektywność ich działania, w tym chemo-, regio- stereo- i enancjoselektywność. Wyniki licznych doświadczeń wykazały, że stereochemia cząsteczki wpływa na aktywność biologiczną związku, m.in. właściwości sensoryczne, aktywność hormonalną i działanie terapeutyczne [1, 2]. Stanowi to uzasadnienie podjęcia intensywnych badań, których celem jest opracowanie metod syntezy chiralnych, biologicznie aktywnych cząsteczek w postaci wybranego enancjomeru. Zastąpienie niektórych tradycyjnych technologii przemysłowych procesami bazującymi na biokatalizie pozwoliło na efektywniejszą i bardziej ekologiczną produkcję np. licznych środków spożywczych, leków czy innych związków chemicznych. Naturalne zdolności mikroorganizmów do rozkładu związków organicznych coraz większego znaczenia nabierają w redukcji zanieczyszczeń środowiskowych. W opisanych powyżej procesach wykorzystywane są między innymi enzymy uczestniczące w reakcjach rozszczepienia wiązania C–C, np. monooksygenazy biorące udział w reakcji utlenienia typu Baeyera-Villigera oraz enzymy cyklu β -oksydacji

W niniejszym artykule dokonano krótkiej charakterystyki biotechnologicznych metod syntezy ważniejszych naturalnych związków zapachowych, w tym dodatków do żywności oraz leków steroidowych, w których rozszczepienie wiązania C–C jest jednym z istotnych etapów reakcji. Omówiono także wybrane przykłady wykorzystania mikroorganizmów w bioremediacji.

1. ENZYMATYCZNE REAKCJE ROZSZCZEPIENIA WIĄZANIA C–C

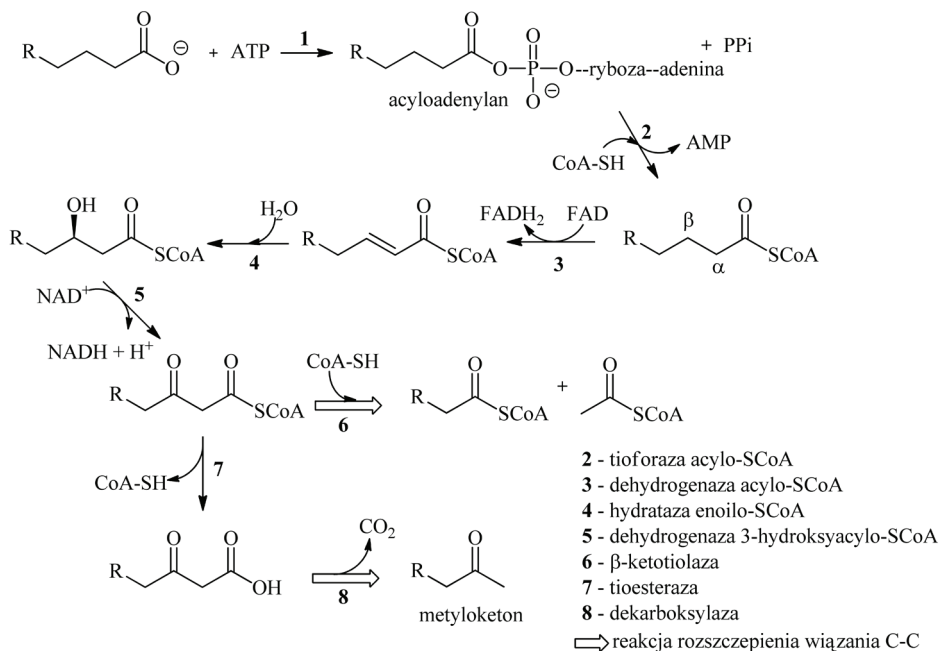
Substraty wykorzystywane przez mikroorganizmy jako źródło węgla i energii są związkami o różnorodnym składzie i strukturze. Mikroorganizmy syntetyzują enzymy, które w cyklu następujących kolejno po sobie reakcji katalizują przekształcenie tych związków do niskocząsteczkowych produktów (głównie H_2O , CO_2 i NH_3).

Dziki szczepy, występujące w środowisku zanieczyszczonym produktami przemysłu petrochemicznego produkują m.in. monooksygenazy Baeyera-Villigera (BVMO), które katalizują pierwszy etap metabolizmu ketonów – reakcję utlenienia do laktonów lub estrów (Schemat 1) [3]. Produktem następującej kolejno hydrolizy jest hydroksykwasy lub kwas, który degradowany jest ostatecznie do niskocząsteczkowych produktów na drodze β -oksydacji. Mechanizm enzymatycznego utlenienia Baeyera-Villigera oraz wykorzystanie tego typu reakcji zostało opisane w naszym artykule opublikowanym uprzednio w tym czasopiśmie [4].



Schemat 1. Utlenczenie Baeyera-Villigera jako pierwszy etap mikrobiologicznej degradacji ketonów
 Scheme 1. The Baeyer-Villiger oxidation as the first microbial step of ketones' degradation

β -Oksydacja jest podstawową ścieżką metabolizmu kwasów tłuszczowych w komórkach eukariotycznych, w której z kwasu tłuszczowego o nierozgałęzionym łańcuchu powstaje acetylo-SCoA i ester kwasu (R-COSCoA) krótszego o dwa atomy węgla (Schemat 2).



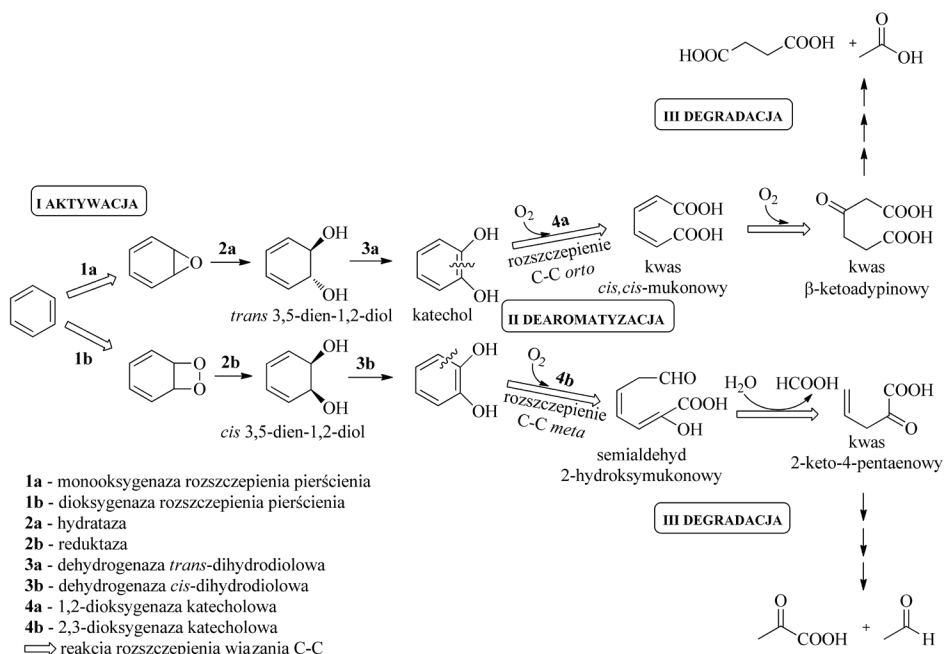
Schemat 2. Enzymy katalizujące cykl β -oksydacji i syntezę metyloketonu
 Scheme 2. Enzymes catalyzing the β -oxidation cycle and the methyl ketone synthesis

Pierwszym etapem cyklu przemian jest aktywacja grupy karboksylowej kwasu. Kwas, z udziałem ATP, przekształcany jest w odpowiedni acyloadenylan a ten kolejno w ester koenzymu A (Schemat 2, etapy 1 i 2) [5]. Następnie od tioestru odszczepiana

jest cząsteczka wodoru i powstaje enoilo-SCoA, z którego po hydratacji tworzy się 3-hydroksy-acylo-SCoA. Etapy odszczepienia cząsteczki wodoru (powstaje *trans* enoilo-SCoA) oraz addycji wody charakteryzują się stereoselektywnością (Schemat 2, etapy 3 i 4). Ta sama hydrataza katalizuje addycję cząsteczki wody do *trans* i *cis* enoilo-SCoA, jednakże produktem hydratacji wiązania *trans* jest L-hydroksy-produkt, a w wyniku hydratacji *cis* substratu powstaje D-izomer. Następnie, w wyniku utlenienia wprowadzonej grupy hydroksylowej powstaje β -ketoacylo-SCoA (Schemat 2, etap 5). Ostatnim etapem cyklu β -oksydacji jest tiolityczne rozszczepienie β -ketoacylo-SCoA, które prowadzi do acetylo-SCoA i tioestru kwasu (R-COSCoA) o krótszym łańcuchu węglowym (Schemat 2, etap 6) [5].

W kulturach niektórych mikroorganizmów β -ketoacylo-SCoA może być przekształcany również do metyloketonu w reakcji dekarboksylacji β -ketokwasu – produktu hydrolizy β -ketoacylo-SCoA (Schemat 2, etapy 7 i 8).

Enzymatyczne rozszczepienie wiązania C–C jest również ważnym etapem mikrobiologicznej degradacji węglowodorów aromatycznych, która może przebiegać zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Metabolizm węglowodorów aromatycznych obejmuje trzy zasadnicze etapy: (I) aktywację cząsteczki substratu, (II) rozszczepienie wiązania C–C w pierścieniu aromatycznym, (III) degradację acyklicznego kwasu karboksylowego (Schematy 3 i 4) [6].

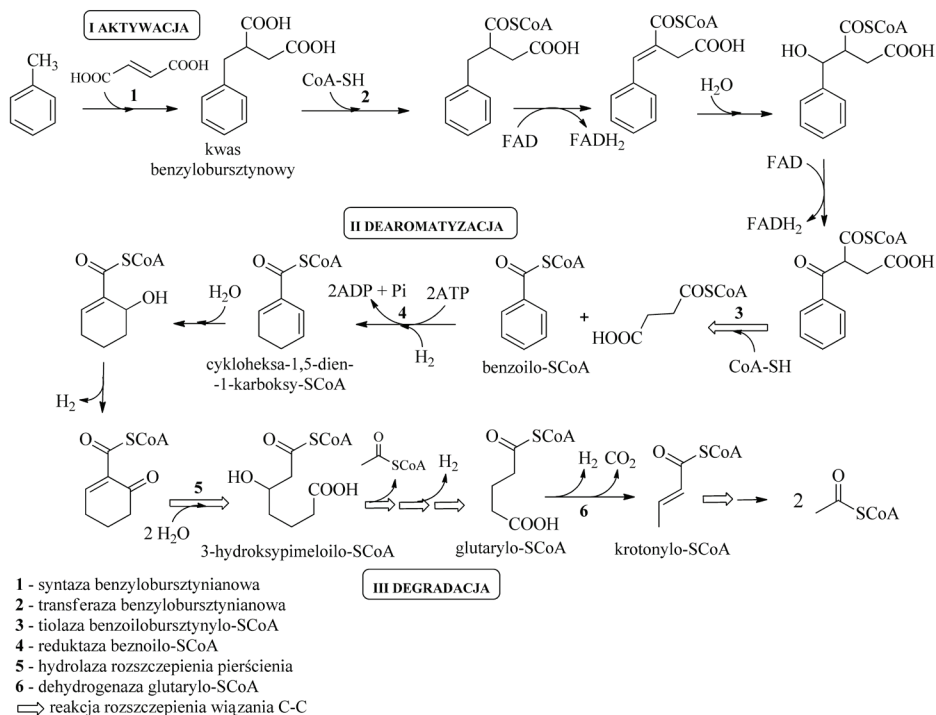


Schemat 3. Mikrobiologiczne utlenienie benzenu w warunkach tlenowych
 Scheme 3. Microbial oxidation of benzene in aerobic conditions

W warunkach tlenowych w reakcji katalizowanej przez monoooksygenazę lub diooksygenazę, węglowodór aromatyczny np. benzen utleniany jest do tlenku lub nadtlenu (Schemat 3, etapy 1a i 1b) [7, 8] przekształcanych w kolejnym etapie do *trans* lub *cis* 3,5-dien-1,2-diole (Schemat 3, etapy 2a i 2b). Oba izomeryczne diole pod wpływem selektywnych dehydrogenaz ulegają następnie rearomatyżacji do katecholu (Schemat 3, etapy 3a i 3b) [9].

Dalszy mikrobiologiczny metabolizm katecholu związany jest z rozczepieniem wiązania C-C_{orto} lub C-C_{meta} (Schemat 3, etapy 4a lub 4b) [10]. Powstające produkty ulegają dalszej degradacji na drodze β -oksydacji do kwasu bursztynowego i octowego (rozszczerzenie C-C_{orto}) lub kwasu pirogronowego i acetaldehydu (rozszczerzenie C-C_{meta}) (Schemat 3). Rozszczerzenie wiązania *orto* katalizowane jest przez dioksygenazę „wewnątrzdiolową”, a oksygenaza „zewnątrzdolowa” odpowiedzialna jest za rozszczerzenie wiązania *meta* [11].

W warunkach beztlenowych mikrobiologiczna degradacja węglowodorów aromatycznych rozpoczyna się reakcją, w której tworzy się nowe wiązanie C-C. Na przykład z toluenu, w wyniku enzymatycznej addycji cząsteczki kwasu fumarowego, powstaje kwas benzylobursztynowy (etap aktywacji) (Schemat 4, etap 1) [12, 13]. Produkt addycji, w cyklu β -oksydacji, przekształcany jest kolejno do benzylobursztynylo-SCoA i benzoilo-SCoA (Schemat 4, etapy 2 i 3) [14]. Ten ostatni związek jest produktem pośrednim większości przemian substratów aromatycznych. Z benzoilo-SCoA, przy udziale reduktazy benzoilo-SCoA, powstaje cykloheksa-1,5-dien-1-karboksy-SCoA (Schemat 4, etap 4). Addycja cząsteczki wody do układu skoniugowanego dienu prowadzi do produktu z allilową grupą hydroksylową w pierścieniu cykloheksanowym, która w następnym etapie utleniana jest do ketonu. Po addycji dwóch cząsteczek wody, powstaje dalej acykliczny 3-hydroksypimeloilo-SCoA (Schemat 4, etap 5). W cyklu β -oksydacji ester ten ulega przekształceniu do glutarylo-SCoA, który po dehydrogenacji przez dehydrogenazę glutarylo-SCoA i kolejno dekarboksylacji tworzy krotonylo-SCoA (Schemat 4, etap 6). Dalsze utlenienie krotonylo-SCoA prowadzi do dwóch cząsteczek acetylo-SCoA.



Schemat 4. Mikrobiologiczna degradacja toluenu w warunkach beztlenowych

Scheme 4. Microbial degradation of toluene in anaerobic conditions

2. WYKORZYSTANIE ROZSZCZEPIENIA WIĄZANIA C-C W SYNTYZIE

Enzymatyczne reakcje rozszczepienia wiązania C-C, które umożliwiają drobnoustrojom rozwój w środowisku, znalazły zastosowanie m.in. w syntezie związków biologicznie czynnych, głównie naturalnych aromatów i leków steroidowych oraz w procesach bioremediacji [15–24].

2.1. SYNTeza ZWIĄZKÓW ZAPACHOWYCH

Konkurencyjność przemysłu spożywczego oraz wzrost świadomości społeczeństwa podążającego za zdrowym trybem życia sprawiają, że konsumenci preferują produkty określane jako „naturalne”. Zgodnie z przepisami Unii Europejskiej (EU 88/388/EEC) związek klasyfikowany jest jako naturalny, jeśli otrzymywany jest w procesie biotransformacji naturalnego substratu. Ten sam produkt uzyskany na drodze chemicznej określany jest terminem „identyczny z naturalnym” [15]. Dążenie do żywności atrakcyjnej i spełniającej oczekiwania konsumentów powoduje

stały wzrost zainteresowania naturalnymi dodatkami spożywczymi, których produkcja opiera się na zastosowaniu procesów biotechnologicznych.

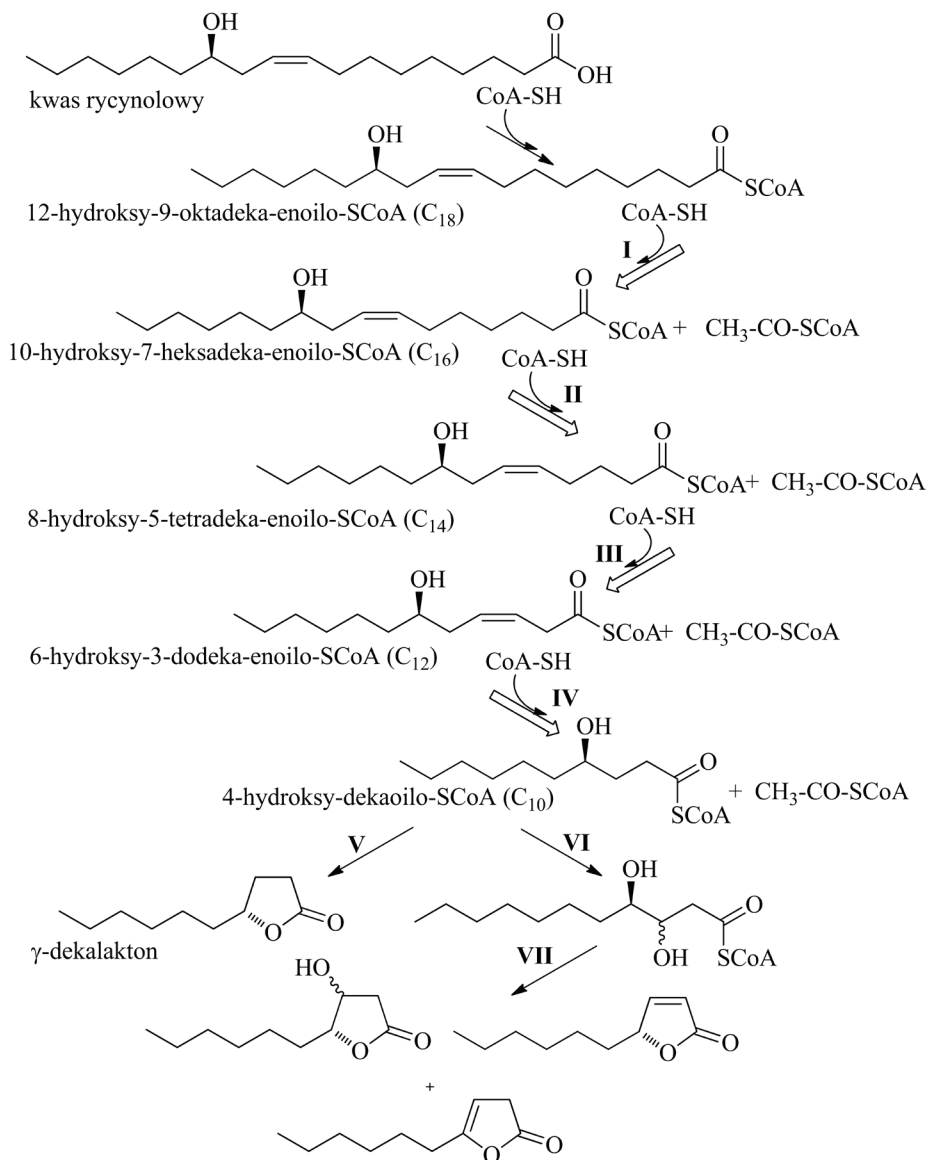
2.1.1. Otrzymywane γ -laktonów

Cennym dodatkiem aromatycznym stosowanym w produkcji żywności są γ - i δ -laktony. Laktony obecne w owocach i fermentowanych produktach decydują o ich charakterystycznej nucie zapachowej. γ -Dekalakton o owocowo-oleistym aromacie ma zasadniczy wpływ na zapach brzoskwiń, moreli i truskawek. Cena γ -dekalaktonu, przed opracowaniem biotechnologicznych metod jego uzyskiwania, wynosiła 20 tys. \$/kg.

Pierwszym etapem badań nad syntezą γ -dekalaktonu na drodze biokatalizy była selekcja szczepu, w kulturze którego następowało utlenienie kwasu rycynolowego do kwasu 4-hydroksydekanowego [25]. Kwas rycynolowy ((12*R*)-hydroksy-*cis*-9-oktadekenowy) to jeden z nielicznych naturalnych hydroksykwasów tłuszczowych dostępny w znacznych ilościach; przykładowo produkt hydrolizy oleju rącznikowego zawiera 90% kwasu rycynolowego. Produkcja γ -dekalaktonu z tego kwasu obejmuje dwa główne etapy: enzymatyczne utlenienie hydroksykwasu do kwasu 4-hydroksydekanowego a następnie jego cyklizację w środowisku kwasowym i podwyższonej temperaturze [16].

Pierwszy etap procesu katalizowany może być przez szereg szczepów drożdży, m.in. *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida maltosa*, *C. tropicalis*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Sporidiobolus spp.*, *S. salmonicolor*, *S. ruinenii*, *S. johnsonii*, *S. pararoseus* [16, 26-28].

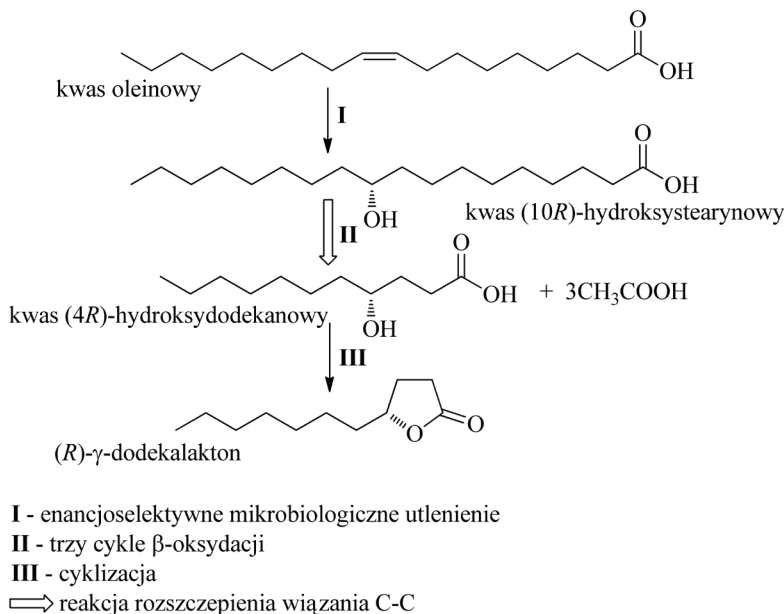
Kwas 4-hydroksydekanowy powstaje z kwasu rycynolowego w wyniku czterech cykli β -oksydacji (produktami pośrednimi są: C16-, C14-, C12- i C10-SCoA) (Schemat 5). Hydroliza 4-hydroksy-dekaido-SCoA prowadzi do kwasu 4-hydroksydekanowego, który ulega wewnątrzcząsteczkowej estryfikacji do γ -dekalaktonu [16]. W procesie biotransformacji kwasu rycynolowego uzyskuje się ten sam enancjomer γ -dekalaktonu, który występuje w brzoskwiniach i innych owocach. Efektywnym biokatalizatorem w tej syntezie jest szczep *Y. lipolytica* [17]. W kulturze *Y. lipolytica*, obok γ -dekalaktonu jako głównego produktu, zidentyfikowano m.in. 3-hydroksy- γ -dekalakton i analogi γ -dekalaktonu z wiązaniem podwójnym w pierścieniu laktonowym (Schemat 5) [25, 26, 29]. Mimo że, 3-en- γ -dekalakton odznacza się intensywniejszą nutą owocową niż γ -dekalakton, z powodu braku prostej metody oddzielenia go od 2-en izomeru (o zapachu grzybowym), nie jest stosowany w praktyce [27].



Schemat 5. Przekształcenie kwasu rycynolowego do γ -dekalaktonu z użyciem szczepu *Y. lipolytica*
 Scheme 5. Transformation of ricinoleic acid to γ -decalactone using *Y. lipolytica*

Inny zapachowy lakton – γ -dodekalakton, otrzymywany jest z kwasu oleinowego. W przekształceniu tym uczestniczą dwa biokatalizatory [30]. Gram-dodatni

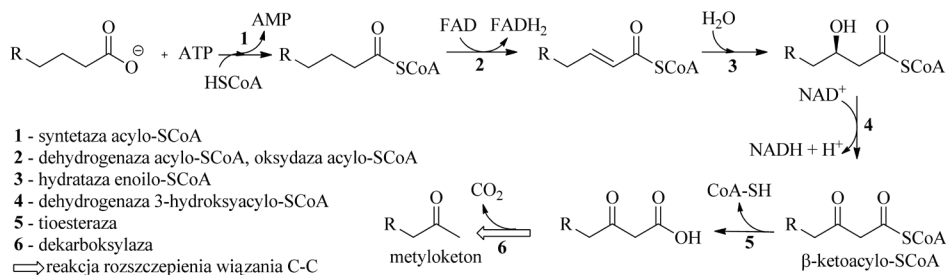
szczep bakterii katalizuje utlenienie kwasu oleinowego do kwasu (10*R*)-hydroksystearynowego [16], który kolejno utleniany jest przez drożdże piekarskie do kwasu (4*R*)-hydroksydodekanowego (Schemat 6). Cyklizacja powstałego produktu prowadzi do γ -dodekalaktonu. Wydajność całego procesu wynosi ponad 22%.



Schemat 6. Przekształcenie kwasu oleinowego do (*R*)- γ -dodekalaktonu na drodze biokatalizy
 Scheme 6. Transformation of oleic acid to (*R*)- γ -dodecalactone by biocatalysis

2.1.2. Otrzymywanie metyloketonów

Metyloketony o nieparzystej liczbie atomów węgla (C7, C9, C11) odznaczają się aromatem o charakterystycznej orzechowej nucie. Są one odpowiedzialne za specyficzny zapach serów pleśniowych oraz odgrywają istotną rolę w dostarczaniu aromatów kojarzonych z pieczonymi lub gotowanymi potrawami zawierającymi masło (3-hydroksybutanon i butanodion). W produkowanym klasycznie niebieskim serze pleśniowym (szczep *Penicillium roqueforti*) obecne są: 2-heptanon, 2-nonanon, 2-pentanon i 2-undekanon [18]. Metyloketony powstają w procesie dojrzewania sera, podczas którego obecne w pleśni enzymy katalizują hydrolizę trójglicerydów mleka w wolne kwasy tłuszczowe, które następnie są utleniane do metyloketonów [30] (Schemat 7).



Schemat 7. Enzymatyczne utlenienie kwasu karboksylowego do metyloketonu

Scheme 7. Enzymatic oxidation of a carboxylic acid to methyl ketone

Początkowe etapy transformacji kwasu tłuszczowego katalizowane są przez enzymy cyklu β -oksydacji (Schemat 7, etapy 1–4). Tworzący się β -keto-acyloSCoA ulega kolejno hydrolizie pod wpływem tioesterazy do β -ketokwasu, z którego w wyniku dekarboksylacji powstaje metyloketon, zawierający o jeden atom węgla mniej niż substrat [30, 31].

Metyloketony charakteryzują się nie tylko atrakcyjnymi właściwościami zapachowymi, ale także wysoką liczbą cetanową (LN). Liczba cetanowa świadczy o jakości paliwa do silników wysokoprężnych. Wartość LN dla 2-undekanonu wynosi 56,6 a dla mieszaniny (50/50 v/v) 2-undekanonu i 2-tridekanonu – 58,4. Oleje napędowe stosowane w USA mają LN nie niższe niż 40 [32].

W ostatnich latach podjęto intensywne badania nad mikrobiologicznym utlenieniem kwasów karboksylowych do metyloketonów, głównie w zakresie biochemii i genetyki. Ich rezultatem jest identyfikacja u jednej z odmian pomidora (*Solanum habrochaites*) metyloketonowej syntazy I (ShMKS1) i metyloketonowej syntazy II (ShMKS2). Postuluje się, że ShMKS1 wykazuje aktywność tioesterazy i dekarboksylazy, a ShMKS2 odpowiedzialny jest za hydrolizę wiązania estrowego β -ketoacylo-SCoA (Schemat 7, etapy 6 i 5) [33].

Innym genetycznie zmodyfikowanym mikroorganizmem zdolnym do efektywnej syntezy metyloketonów jest szczep *Escherichia coli*, który produkuje 700-krotnie więcej nasyconych i jednonienasyconych metyloketonów, w tym 2-undekanonu i 2-tridekanonu, względem szczepu z nadprodukcją kwasu tłuszczowego [32]. Modyfikacja genetyczna tego szczepu obejmowała nadekspresję dehydrogenazy acyl-CoA z *M. luteus*, nadekspresję natywnej hydratazy enoilo-SCoA, delecję genu β -ketotiolazy i nadekspresję natywnej tioesterazy.

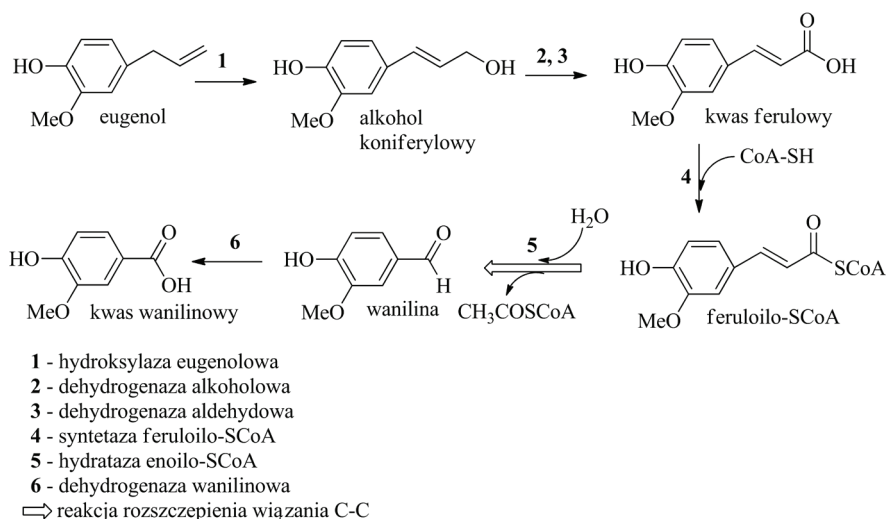
Rekombinant *E. coli* (EGS560) po nadekspresji tioesterazy do szczepu z nadprodukcją β -ketoacylo-SCoA syntezował 9-krotnie więcej 2-tridekanonu niż wyjściowy mikroorganizm [32]. Szczep ten, uznany za najlepszy do produkcji metyloketonów, produkował oprócz wymienionego składnika również 2-undekanon, 2-tridecenon, 2-tridekanon, 2-pentadecenon i 2-pentadekanon. Inny rekombinant *E. coli*, oznaczony symbolem DH1 (po nadekspresji natywnej hydratazy enoilo-SCoA i heterologicznej oksydazy acyl-CoA- w miejsce dehydrogenazy acyl-

-SCoA – przy równoczesnej delekcji genu β -ketotiolazy), odznaczał się szczególnie wysoką aktywnością katalityczną. Zastosowanie *E. coli* DH1 pozwoliło na uzyskanie blisko 75-krotnie więcej metyloketonów, głównie 2-tridekanonu. Heterologiczna oksydaza acylo-SCoA charakteryzowała się dobrą rozpuszczalnością i wysoką specyficznością [32].

Przedstawione rezultaty wskazują, że wykorzystanie inżynierii genetycznej pozwoli na opracowanie wydajnej metody syntezy metyloketonów na drodze biokatalizy. Otrzymane na tej drodze metyloketony będą mogły być zastosowane jako komponenty biopaliw.

2.1.3. Otrzymywanie waniliny

Intensywne badania nad opracowaniem biokatalitycznych, efektywnych metod uzyskiwania związków zapachowych dotyczą również waniliny [34–40]. Wanilina (4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd) wchodzi w skład kompozycji zapachowych żywności (głównie wyrobów cukierniczych i napojów), perfum, kosmetyków oraz farmaceutyków [15]. Roczne, globalne zapotrzebowanie na wanilinę sięga ponad 10 000 ton, a aktualnie udział naturalnej waniliny nie przekracza 0,5%. Syntetyczna wanilina jest tania (12 \$/kg), podczas gdy cena waniliny pozyskiwanej z *Vanilla planifolia*, z racji niskiej jej zawartości w strąkach (nieprzekraczającej 2%) to około 3 tys. \$/kg. Badania nad opracowaniem efektywnych metod otrzymywania naturalnej waniliny koncentrują się głównie na poszukiwaniu odpowiedniego naturalnego surowca oraz biokatalizatora zdolnego do jego przekształcenia. Niewielkie ilości waniliny i jej pochodnych (kwasu wanilinowego, dehydrodiwanilinowego) identyfikowane były m.in. w mieszaninie po degradacji ligniny przez grzyby białej zgnilizny drewna. Znacznie wyższe wydajności waniliny uzyskuje się w mikrobiologicznych transformacjach eugenolu lub kwasu ferulowego (Schemat 8). Kwas ferulowy przekształcany jest przez szereg szczepów bakterii, kultury tkankowe *Capsicum frutescens* i linie komórkowe *Vanilla planifolia* [15]. W kulturach mikroorganizmów *Bacillus subtilis*, *Polyporus versicolor*, *Pseudomonas acidovorans*, *Streptomyces setoni* i in. kwas ten utleniany jest do waniliny w reakcjach katalizowanych przez enzymy cyklu β -oksydacji [15, 34, 40]. Aktywację kwasu ferulowego do tioestru katalizuje syntetaza feruloilo-SCoA (Schemat 8, etap 4). Po hydratacji wiązania podwójnego następuje rozszczepienie wiązania C-C, którego produktami są wanilina i acetylo-SCoA (Schemat 8, etap 5). W kulturach wielu mikroorganizmów może zachodzić dalsze utlenienie produktu, co skutkuje obniżeniem zawartości akumulowanej waniliny (Schemat 8, etap 6). Reakcja ta jest elementem mechanizmu obronnego szczepu, ponieważ wanilina ma toksyczne działanie wobec większości mikroorganizmów [15].

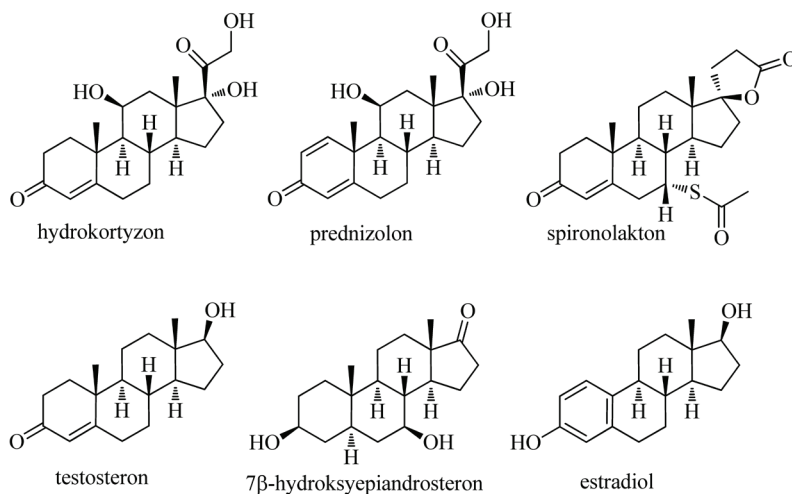


Schemat 8. Enzymatyczne przekształcenie eugenolu do waniliny

Scheme 8. Enzymatic transformation of eugenol to vanillin

2.2. ENZYMATYCZNA MODYFIKACJA STEROLI DO PRODUKTÓW UŻYTECZNYCH W SYNTEZIE LEKÓW STEROIDOWYCH

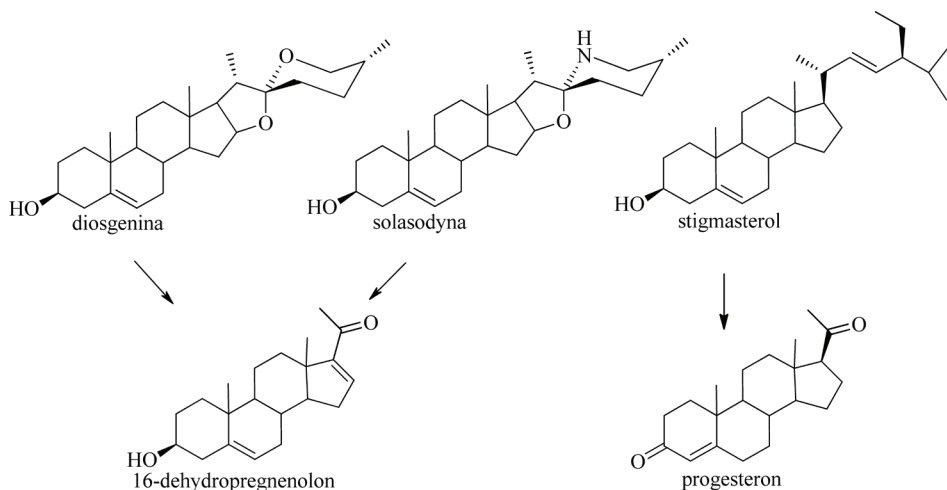
Naturalne związki steroidowe i ich syntetyczne analogi wykazują różnorodne działanie biologiczne m.in.: przeciwzapalne (hydrokortyzon, prednizolon), moczopędne (spironolakton), anaboliczne (testosteron, metylo testosteron), neuroprotektory (7 β -hydroksyepiandrosteron), poprawiające pracę serca (estradiol). Leki steroidowe stosowane są w terapii osteoporozy, nowotworów prostaty, w zaburzeniach pracy nadnerczy oraz profilaktyce chorób wieńcowych [19]. Struktury wybranych związków steroidowych o aktywności biologicznej przedstawione są na Schemacie 9.



Schemat 9. Struktury związków steroidowych wykazujących różną aktywność biologiczną
 Scheme 9. Structures of steroid compounds exhibiting diverse biological activity

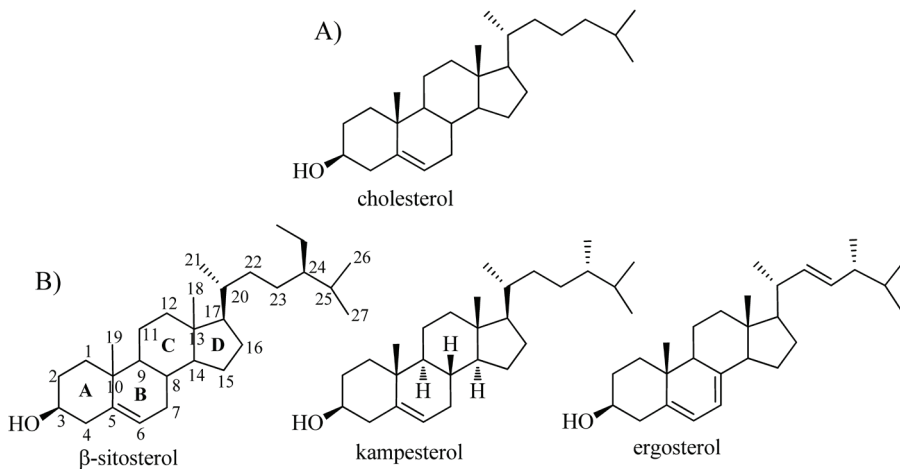
2.2.1. Surowce do produkcji leków steroidowych

Roczna wartość rynkowa produkowanych steroidów szacowana jest na 4–8 miliardów dolarów USA, w tym miliard dolarów przypada na androstendion (AD) i androstadiendion (ADD), które są substratami stosowanymi w syntezie szeregu leków steroidowych.



Schemat 10. Diosgenina, solasodyna i stigmasterol modyfikowane na drodze chemicznej do C21-steroidów
 Scheme 10. Chemical modification of diosgenine, solasodyne and stigmasterol to C21-steroids

Do lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku podstawowym surowcem do ich produkcji była diosgenina, uzyskiwana z bulw meksykańskiej rośliny *Dioscorea composita*. Następnie opracowano metodę, w której wykorzystuje się solasodynę (Schemat 10) [19].



Schemat 11. Struktury pospolitych steroli zwierzęcych A) i roślinnych B)

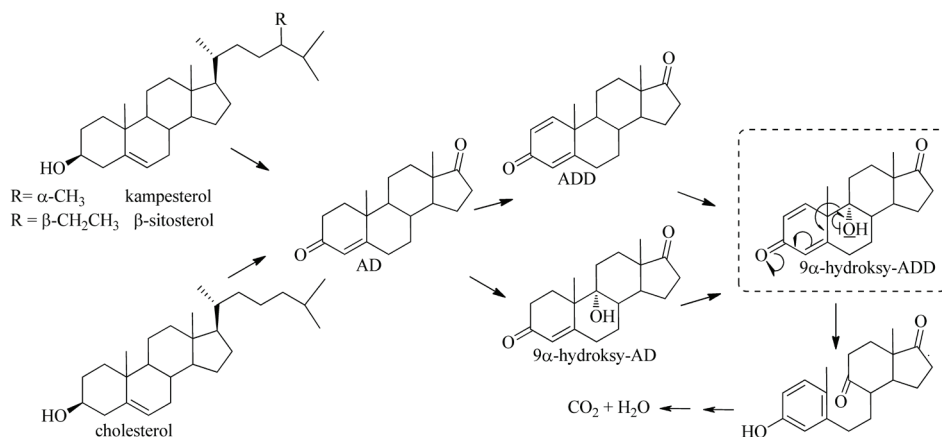
Scheme 11. Structures of commonly occurring sterols derived from A) animals and B) plants

Ze względu na rosnące zapotrzebowanie na leki steroidowe i ograniczoną oraz niestabilną (m.in. ze względu na warunki pogodowe) podaż diosgeniny, podjęto prace nad poszerzeniem bazy surowcowej o sterole, głównie cholesterol, stigmasterol i β -sitosterol (Schematy 10 i 11).

Znaczne ilości steroli głównie stigmasterolu, β -sitosterolu i kampesterolu zawierają oleje sojowy i rzepakowy a także miazga roślinna uzyskiwana np. z trzciny cukrowej czy odpady przemysłu papierniczego. Stigmasterol, sterol z wiązaniem podwójnym w łańcuchu bocznym, może być przekształcany na drodze chemicznej w reakcji utleniającego rozszczepienia wiązania C-22–C-23 do progesteronu (Schemat 10), podczas gdy układy z nasyconym łańcuchem węglowodorowym przez szereg lat stanowiły niepotrzebny balast [41]. Podjęte próby opracowania metody chemicznej modyfikacji łańcucha bocznego tych steroli nie dały zadowalających rezultatów. Uzyskiwano mieszaninę wielu produktów przy jednocześnie niewysokim stopniu konwersji substratów.

Założono, że ze względu na selektywność działania enzymów, możliwe będzie opracowanie metody selektywnego odszczepienia łańcucha bocznego steroli metodą transformacji mikrobiologicznej. Podstawą tej hipotezy była znana zdolność szczepów bakterii gram-dodatnich (*Brevibacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*) i gram-ujemnych (*Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Comamonas*, *Pseudomonas*) do wykorzystywania steroli jako źródła węgla [42]. Wiele grup badaczy przeprowadziło prace, które miały na celu wyselekcjonowanie ze środowiska natu-

ralnego szczepów zdolnych do selektywnej degradacji łańcucha bocznego steroli. Przetestowano setki mikroorganizmów, ale żaden z nich nie prowadził pożądanego przekształcenia: sterol \rightarrow C19- (C21- lub C22-) steroid. Badania wykazały, że dzięki szczepy katalizują utleniającą degradację łańcucha bocznego steroli, ale obok niej następuje utlenienie szkieletu steroidowego; końcowymi produktami transformacji były dwutlenek węgla i woda (Schemat 12). Po biotransformacji β -sitosterolu, kampesterolu czy cholesterolu w mieszaninie metabolitów identyfikowano niewielkie ilości użytecznych syntetycznie C19-steroidów: androsta-4-en-3,17-dionu (AD) i androsta-1,4-dien-3,17-dionu (ADD) (Schemat 12).

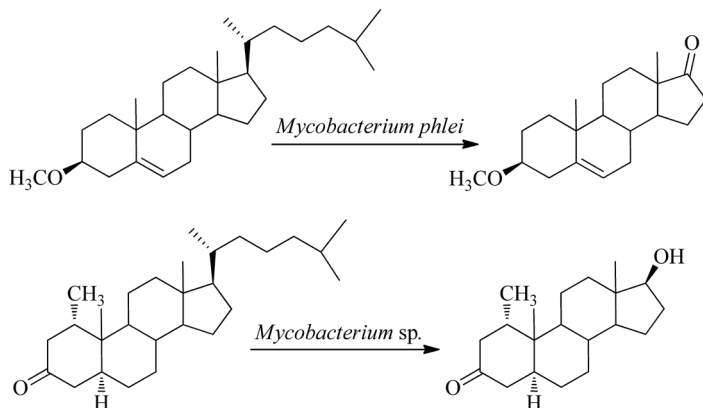


Schemat 12. Mikrobiologiczne przekształcenia kampesterolu, β -sitosterolu i cholesterolu do użytecznych C19-steroidów

Scheme 12. Microbial transformations of campesterol, β -sitosterol and cholesterol to useful C19-steroids

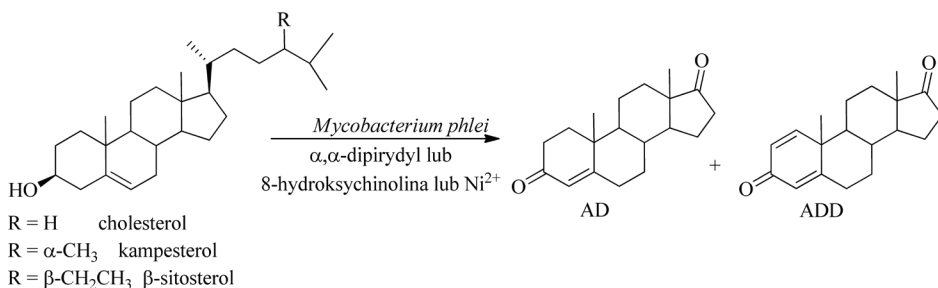
W przeprowadzonych doświadczeniach ustalono, że kluczową rolę w degradacji szkieletu steroidowego odgrywają utleniające reakcje w pierścieniach A i B: 1,2-dehydrogenacja i 9 α -hydroksylacja. Powstanie 9 α -hydroksy-androsta-1,4-dien-3,17-dionu (9 α -hydroksy-ADD) oznacza rozpad charakterystycznej struktury steroidowej [43], ponieważ związek ten ulega samorzutnej izomeryzacji do B-seko produktu z aromatycznym pierścieniem A (Schemat 12).

C19-Steroidy izolowano po transformacji przez dzięki szczepy pochodnych cholesterolu ze zmodyfikowanym pierścieniem A (Schemat 13) [43, 44]. W wyniku podstawienia atomu wodoru C-3-OH lub eliminacji wiązania podwójnego przy C-5, zablokowane było utlenienie grupy hydroksylowej przy C-3 lub powstawanie produktu z układem sprzężonych wiązań w pierścieniu A i w konsekwencji nie następowało rozszczepienie wiązania C-9-C-10.



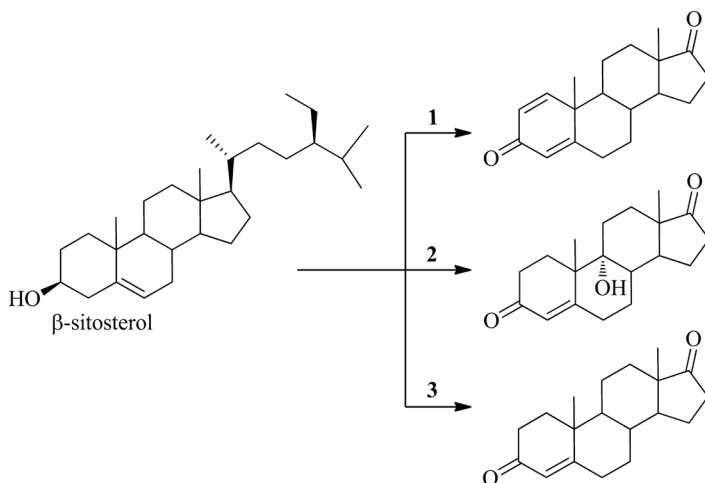
Schemat 13. Selektywna, mikrobiologiczna degradacja łańcucha bocznego pochodnych cholesterolu
 Scheme 13. Selective microbial side-chain degradation of cholesterol derivatives

AD lub mieszaninę AD i ADD uzyskiwano po transformacji steroli przez dzikie szczepy, prowadzonych w obecności znanych inhibitorów mikrobiologicznych hydroksylaz (8-hydroksychinoliny, α,α -dipirydyłu czy kationu Ni^{2+} , Schemat 14). Stanowiło to dodatkowe potwierdzenie kluczowej roli hydroksylacji w pozycji 9α - dla procesu degradacji szkieletu steroidowego [43].



Schemat 14. Selektywne, mikrobiologiczne utlenienie steroli w obecności inhibitora 9α -hydroksylazy
 Scheme 14. Selective microbial oxidation of sterols in the presence of 9α -hydroxylase inhibitor

Troska o ochronę środowiska i związane z nią koszty decydują o tym, że optymalną metodą selektywnego utleniania steroli jest użycie jako biokatalizatora mutanta dzikiego szczepu z deficytem 9α -hydroksylazy, 1,2-dehydrogenazy lub obu wymienionych enzymów. Takie mutanty wyselekcjonowano po chemicznej lub fizykochemicznej mutagenizacji (Schemat 15) [43, 45–48].



- 1 - mutant *Mycobacterium fortuitum* z deficytem 9 α -hydroksylazy
 2 - mutant *Mycobacterium fortuitum* z deficytem 1,2-dehydrogenazy
 3 - mutant *Mycobacterium fortuitum* z deficytem 9 α -hydroksylazy i 1,2-dehydrogenazy

Schemat 15. Mutanty *Mycobacterium fortuitum* katalizujące selektywne utlenienie β -sitosterolu do C19-produktu

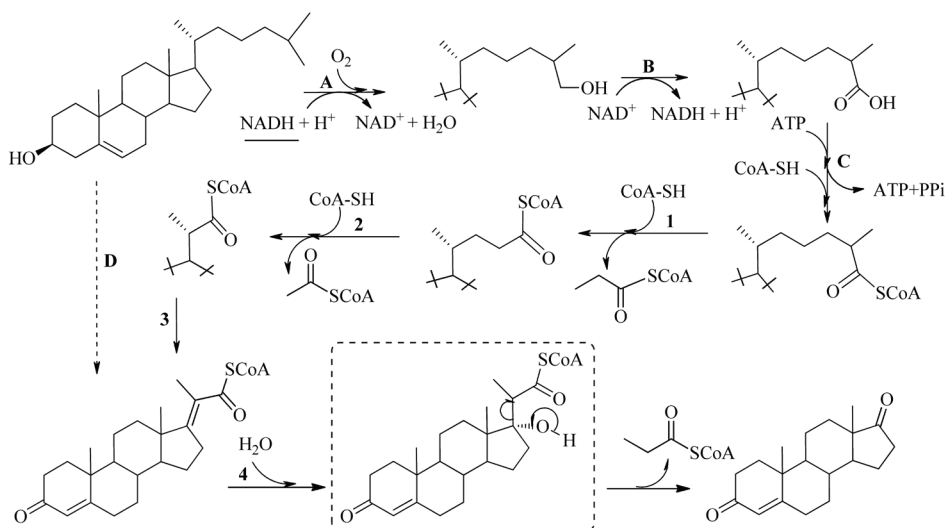
Scheme 15. *Mycobacterium fortuitum* mutants catalyzing selective oxidation of β -sitosterol to C19-product

Aktualnie mikrobiologiczne transformacje steroli przez zmutowane lub rekombinowane szczepy dostarczają substratów do produkcji ponad 1000 ton steroidów rocznie [49].

2.2.2. Przebieg enzymatycznej degradacji łańcucha bocznego steroli

Mimo, że znany jest przebieg degradacji łańcucha bocznego zarówno cholesterolu jak i steroli zawierających podstawnik alkilowy przy C-24 (kampesterol, β -sitosterol) [43, 50], a sekwencja reakcji w tym procesie została ustalona w 1968 roku [51], wciąż prowadzone są badania, których celem jest identyfikacja niektórych enzymów i znacznej części genów kodujących te enzymy. Na podstawie przeprowadzonych badań ustalono, że pierwszym etapem przemian jest hydroksylacja terminalnej grupy metylowej (ω -hydroksylacja). Powstały hydroksy-produkt przekształcany jest do kwasu. W ostatnich latach zidentyfikowano enzym odpowiedzialny za wprowadzenie grupy hydroksylowej przy C-26 w układ steroidowy – C-26-hydroksylazę (CYP125) [52]. Postuluje się, że enzym ten katalizuje również utlenienie tej grupy (Schemat 16, etapy A i B). Utworzony C26-karboksy-produkt, po odszczepieniu kolejno: propionilo-SCoA, acetylo-SCoA i propionilo-SCoA, przekształcany jest do AD. Dwie pierwsze odszczepione cząsteczki to produkty utlenienia w cyklu β -oksydacji (Schemat 16, etapy 1 i 2). Powstający równocześnie C22-tioester w zachodzących kolejno: C-17–C-20-dehydrogenacji, hydratacji (Schemat 16,

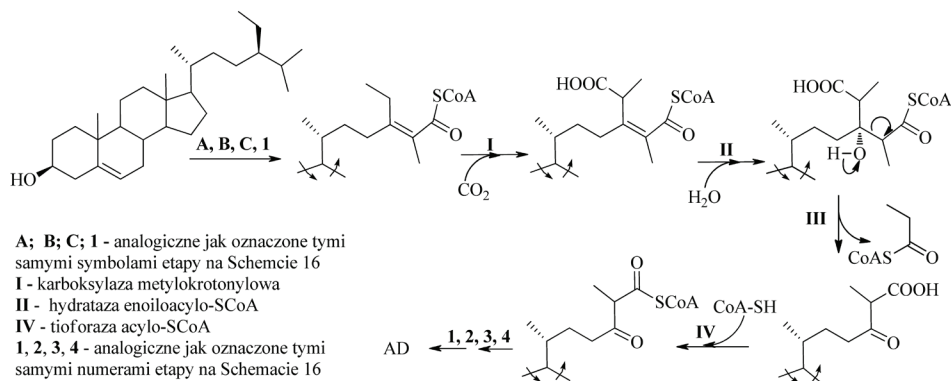
etapy 3 i 4) i reakcji retro-aldolowej, przekształcany jest ostatecznie do C-17-ketonu (AD) i propionilo-SCoA [43, 51, 52]. Nie ustalono dotychczas, czy przekształcenie fragmentu 3 β -hydroksy-5-en sterolu do układu 4-en-3-okso (Schemat 16, etap D) następuje przed degradacją łańcucha bocznego; nie jest też pewne, czy całkowita degradacja łańcucha jest niezbędna dla utleniających reakcji w pierścieniu A [52].



- A - ω -oksigenaza - CYP125
 B - dehydrogenaza alkoholowa lub CYP125
 C - tioforaza acylo-SCoA
 D - dehydrogenaza/ izomeraza 3 β -hydroksysteroidowa
 1, 2 - cykl β -oksydacji
 3 - dehydrogenaza acylo-SCoA
 4 - hydrataza enoilo-SCoA

Schemat 16. Mikrobiologiczne przekształcenie cholesterolu do AD
 Scheme 16. Microbial transformation of cholesterol to AD

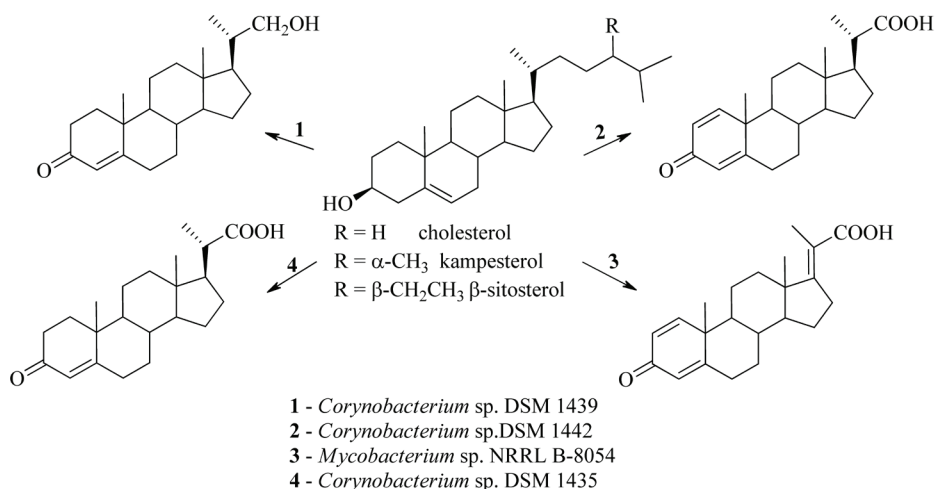
Mikrobiologiczny metabolizm cholesterolu i steroli z podstawnikiem alkilowym przy C-24 przebiega w znacznej części identycznie, z tym że podczas degradacji rozgałęzionych steroli zachodzi dodatkowo reakcja karboksylacji i jeden cykl β -oksydacji więcej (Schemat 17, etap III). Produktem pierwszych czterech etapów utlenienia β -sitosterolu jest α,β -nienasycony ester-SCoA (Schemat 17, etapy: A-C, 1). Ester ten ulega karboksylacji w pozycji allilowej (Schemat 17, etap I), po której ma miejsce hydratacja wiązania podwójnego C-24–C-25. Z produktu hydratacji, w wyniku reakcji retro-aldolowej (Schemat 17, etap III) odzłącza się propionilo-SCoA. Utworzony równocześnie β -ketokwas, po aktywacji do tioestru, utleniany jest do AD w sekwencji reakcji analogicznych jak w degradacji cholesterolu.



Schemat 17. Degradacja łańcucha bocznego β -sitosterolu
 Scheme 17. β -Sitosterol side-chain degradation

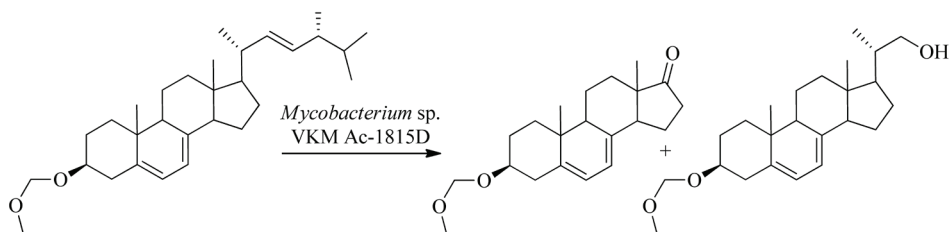
Badania, których celem było poznanie przebiegu metabolizmu steroli w kulturach mikroorganizmów, dostarczyły również informacji o tym, jaki jest wpływ parametrów, takich jak skład pożywki, pH, stężenie substratu, natlenienie, obecność induktorów lub inhibitorów na wydajność procesu. Ustalono, że enzymy katalizujące degradację steroli należą do indukowanych przez substraty. Aktywność indukowanej ω -hydroksylazy zależy od ilości rozpuszczonego w środowisku tlenu – wyższą aktywność enzymu obserwowano przy niskiej zawartości tlenu [43]. Już w początkowym okresie badań nad degradacją β -sitosterolu przez *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 ustalono, że wprowadzenie jonu HCO_3^- wyraźnie zwiększa stopień przekształcenia substratu, co sugerowało, że etap karboksylacji ma istotne znaczenie dla szybkości degradacji rozgałęzionych steroli [43]. Wyniki badań wykazały, że CO_2 jest lepszym odczynnikiem karboksylującym niż jon HCO_3^- , prawdopodobnie ze względu na łatwiejszy transport obojętnej cząsteczki przez błony komórkowe bakterii [43, 53]. β -Sitosterol jest induktorem C-28-karboksylazy, natomiast cholesterol nie indukuje tego enzymu [43]. Poznanie enzymów katalizujących niektóre etapy degradacji łańcucha bocznego steroli jest utrudnione głównie z powodu braku genetycznie stabilnych mutantów. Ostatnio zidentyfikowano gen SCoA-ligazy, która jest odpowiedzialna za metabolizm steroli z rozgałęzionym łańcuchem [54]. Mutant *R. rhodochrous* DSM43269 z deficytem genu *fadD19* nie był zdolny do utlenienia łańcucha β -sitosterolu, natomiast metabolizował cholesterol.

Obok mutantów prowadzących utlenienie steroli do C19-produktów wyselekcjonowano również takie, które katalizowały przekształcenie sterol \rightarrow C22-steroidy. Po transformacji izolowano: 21-hydroksy-20-metylo-pregna-4-en-3-on, 20-karboksypregna-4-en-3-on, 20-karboksypregna-1,4-dien-3-on, 20-karboksy-17(20)-dehydro-pregna-1,4-dien-3-on (Schemat 18) [43].



Schemat 18. Mutanty *Corynebacterium* sp. i *Mycobacterium* sp. utleniające sterole do C22- produktów
 Scheme 18. *Corynebacterium* sp. and *Mycobacterium* sp. mutants oxidizing sterols to the C22-products

Przez wiele lat ergosterol (podstawowy składnik błon komórkowych grzybów) nie był traktowany jako potencjalny surowiec do syntezy leków steroidowych. Pierwsze doświadczenia nad degradacją łańcucha bocznego ergosterolu wykazywały, że sterol z układem wiązań podwójnych w pierścieniu B przekształcany jest znacznie wolniej niż inne sterole [55, 56]. W 2010 roku opublikowano wyniki transformacji ergosterolu przez szczep *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1815D [57]. Szczep ten przekształcał ergosterol i octan ergosterolu do AD, natomiast produktami O-metoksymetylo-ergosterolu była mieszanina 3-metoksymetoksy-androsta-5,7-dien-17-onu (główny metabolit) i 3-metoksymetoksy-20-hydroksymetylo-pregna-5,7-dieniu (Schemat 19).



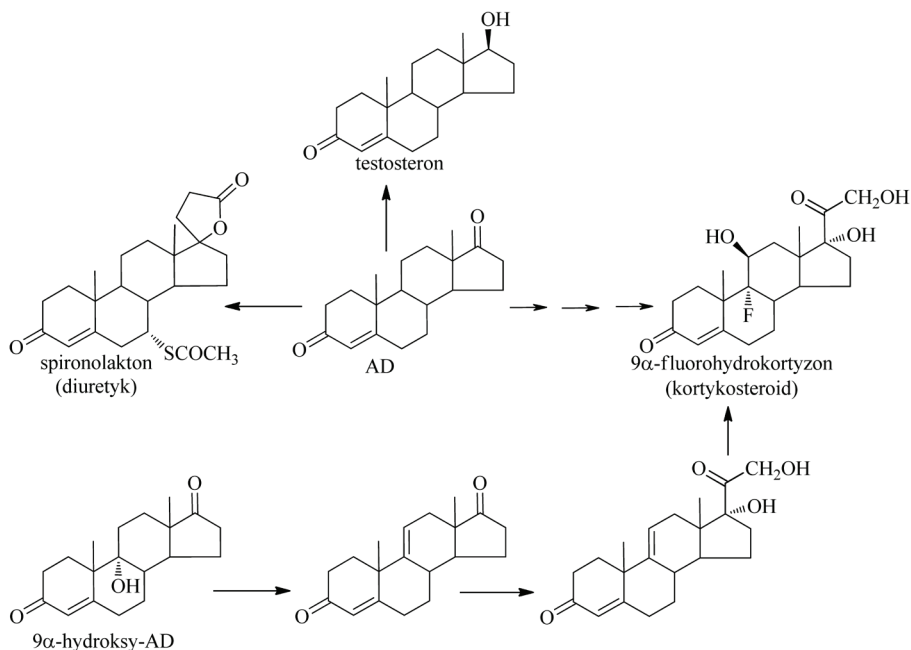
Schemat 19. Mikrobiologiczne przekształcenie O-metoksymetylo-ergosterolu
 Scheme 19. Microbial transformation of O-methoxymethyl-ergosterol

Uzyskane produkty z układem 5,7-dieniu są pożądanymi substratami syntez pochodnych witaminy D [58]. Występujące w naturze formy witaminy D (np. 1 α ,25-dihydroksy pochodne ergo- lub cholekalcyferolu) mogą, przy podaniu ich w dawkach farmakologicznych, wywołać hiperkalcemię lub hiperfosfatemię (stany podwyższonego stężenia jonów wapnia lub fosforanów nieorganicznych we krwi). Z tego

powodu, szeroko badane są naturalne i syntetyczne analogi witamin D_2 i D_3 zwane deltanoidami [59, 60]. Synteza witaminy D lub jej pochodnych oparta o 3-metoksymetoksy-androsta-5,7-dien-17-on jest korzystna, bowiem pozwala na pominięcie etapu zabezpieczenia grupy hydroksylowej przy C-3. Dodatkowo 3-metoksymetoksy-androsta-5,7-dien-17-on jest prekursorem $3\beta,17\beta$ -dihydroksy-androsta-5,7-dieniu i jego pochodnych o działaniu stymulującym system immunologiczny [61].

2.2.3. Wykorzystanie produktów degradacji steroli w syntezie leków

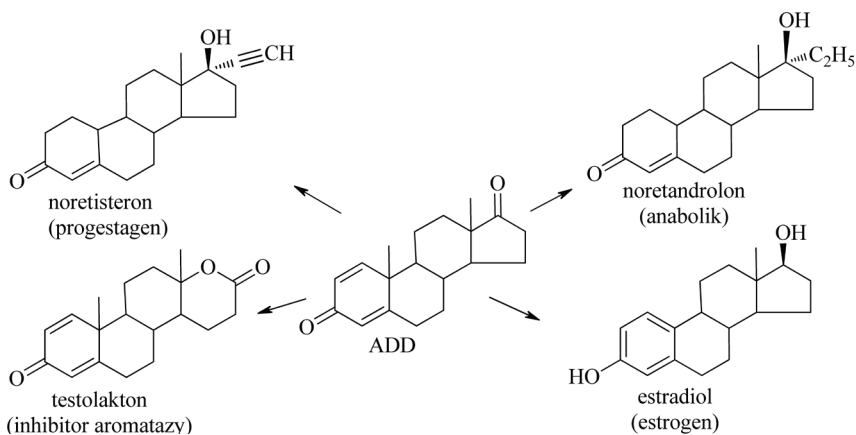
Przedstawione na Schemacie 9 wzory reprezentują trzy podstawowe struktury steroidów: C21-steroidy (hydrokortyzon, prednizolon), C19-steroidy (testosteron, 7β -hydroksypandrosteron) i C18-steroidy (estradiol). W mikrobiologicznych transformacjach otrzymuje się substraty do syntez naturalnych C19- i C21- steroidów oraz ich analogów (Schematy 20 i 21).



Schemat 20. Synteza C19- i C21- steroidów z AD i 9α -hydroksy-AD

Scheme 20. Synthesis of C19- and C21-steroids from AD and 9α -hydroxy-AD

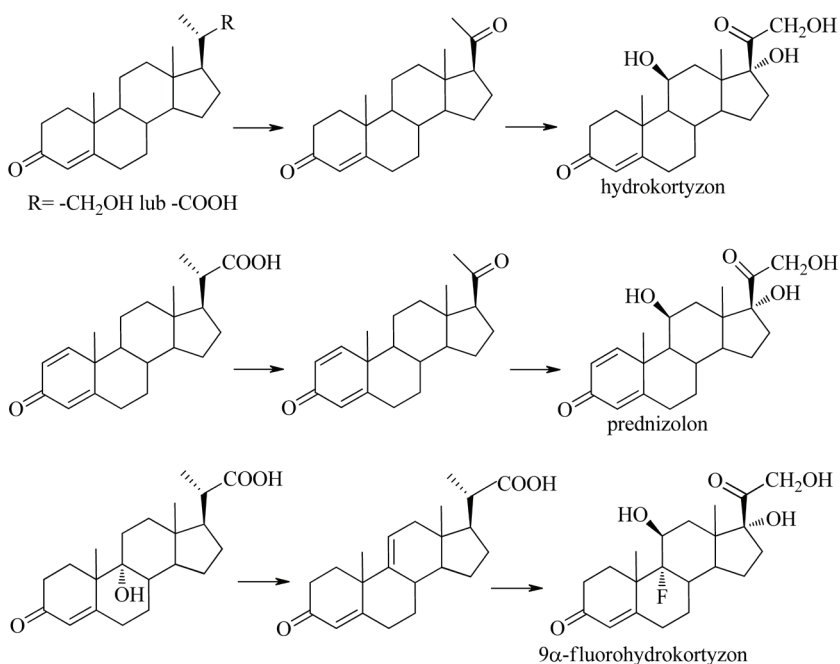
Sterole będące produktami reakcji enzymatycznych, podobnie jak inne naturalne chiralne połączenia, występują w postaci jednego enancjomeru (efekt enancjoselektywności enzymu). Dlatego w cyklu mikrobiologicznej degradacji łańcucha bocznego steroli otrzymuje się optycznie czyste syntony naturalnych steroidów, o zdefiniowanej konfiguracji podstawników przy chiralnych atomach węgla.



Schemat 21. ADD jako substrat w produkcji leków o właściwościach estrogennych, progestagennych i anabolicznych

Scheme 21. ADD as the substrate in production of drugs with oestrogenic, progestogenic and anabolic properties

Aktualnie wiele firm farmaceutycznych (Henkel, Schering, Searle, Mitsubishi) wykorzystuje C22-steroidy w syntezie hydrokortyzonu i jego analogów [43] (Schemat 22).



Schemat 22. Synteza hydrokortyzonu i jego analogów z C22-steroidowych substratów

Scheme 22. Synthesis of hydrocortisone and its analogues from C22-steroid substrates

Pomimo tego, iż biologiczne i terapeutyczne działanie steroidów jest znane od ponad 60 lat, wciąż prowadzone są badania nad opracowaniem nowych metod syntezy leków steroidowych. Lista naturalnych steroidów wciąż się wydłuża, co jest związane z postępem w zakresie izolowania związków, określaniem ich struktury i właściwości. Aktualnie w centrum zainteresowania są, syntetyzowane m.in. w mózgu ssaków, neurosteroidy: pregnenolon, dehydroepiandrosteron (DHEA), epiandrosteron i ich pochodne. Wymienione związki mają działanie neuroprotektorowe, przeciwdrgawkowe, antydepresyjne i przeciwłękowe [62, 63].

3. BIODEGRADACJA ZWIĄZKÓW AROMATYCZNYCH

Związki aromatyczne, ze względu na ich toksyczne właściwości, stanowią zagrożenie dla środowiska i zdrowia ludzi. Rosnąca systematycznie zawartość w środowisku aromatycznych połączeń o różnorodnej budowie była impulsem do podjęcia badań nad opracowaniem skutecznych, ekologicznych metod eliminowania tych toksycznych związków. Obiecującą metodą jest bioremediacja, w której zanieczyszczenia są degradowane przez autochtoniczne mikroorganizmy (bioremediacja naturalna, biostymulacja) lub drobnoustroje wyselekcjonowane względem określonego skażenia czy ksenobiotyku (bioaugmentacja).

W środowiskach skażonych węglowodorami aromatycznymi zidentyfikowano wiele szczepów, głównie bakterii glebowych i grzybów, które są zdolne do przekształceń zanieczyszczeń w nietoksyczne, niskcząsteczkowe produkty. Biodegradacja węglowodorów aromatycznych jest zazwyczaj wieloetapowym procesem, przebiegającym z udziałem kilku współpracujących ze sobą mikroorganizmów [64, 65]. Aktywność produkowanych enzymów (głównie monoooksygenaz, dioksygenaz, dehydrogenaz, dehalogenaz i hydrolaz) jest zasadniczym kryterium przydatności drobnoustroju w biodegradacji. Produkty enzymatycznego rozerwania wiązania C-C w aromatycznym pierścieniu są kolejno, głównie w cyklach β -oksydacji, przekształcane w niskcząsteczkowe, neutralne dla środowiska połączenia (Schematy 23–28).

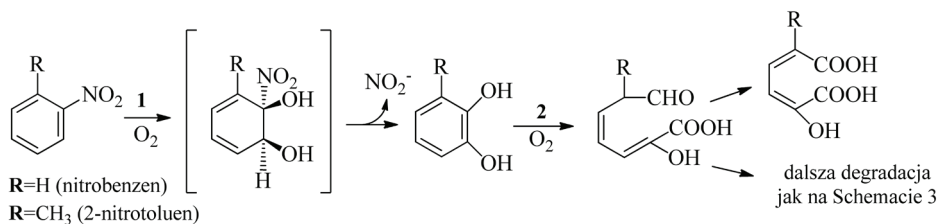
Szczególnie wysoką aktywnością degradacji związków aromatycznych charakteryzują się bakterie z rodzaju *Pseudomonas* (Tab. 1). Zalety szczepów bakterii tego rodzaju to: różnorodność szlaków metabolicznych, adaptacja do warunków środowiska oraz fakultatywne przełączanie aparatu metabolicznego na warunki beztlenowe. W genomie tych gram-ujemnych bakterii obecne są plazmidy kodujące enzymy odpowiedzialne za degradację m.in. oktanu, naftalenu, ksylenu i toluenu [64, 65].

Tabela 1. Szczepy bakterii z rodzaju *Pseudomonas* użyteczne w procesach bioremediacji
 Table 1. Bacterial strains of *Pseudomonas* genus useful in bioremediation processes

Szczep	Pochodzenie	Degradowane skażenie(a)	Literatura
<i>P. aeruginosa</i>	obszar skażony ściekami rafineryjnymi	ropa naftowa	[66]
<i>P. pseudoalcaligenes</i> JS45	gleba i wody gruntowe zanieczyszczone nitrobenzenem	nitrobenzen	[67]
<i>P. putida</i>	gleba skażona 2- i 3-nitrofenolem	2- i 3-nitrofenole	[68]
<i>Pseudomonas</i> sp. H12	ścieki	benzen, toluen, ksylen, heksylobenzen, butylobenzen	[69]
<i>Pseudomonas</i> sp. JS42	gleba zanieczyszczona nitrobenzenem	2-nitrotoluen	[70]
<i>P. stutzeri</i>	gleba skażona ropą naftową	alkilo-aromatyczne składniki oleju napędowego	[71]
<i>P. stutzeri</i> ZWLR2-1	gleba skażona chloronitrobenzenem	2-chloronitrobenzen	[72]
<i>P. pickettii</i> PKO1	mutant	toluen, benzen, fenol, <i>m</i> -krezol	[73]

Zbadano, że szczep *Pseudomonas* sp. H12, wyizolowany ze ścieku w Egipcie, w ciągu 24 godzin degradował petrochemiczne zanieczyszczenia środowiska z prawie 90% wydajnością [69]. Ustalono, że mieszanina aromatycznych węglowodorów była degradowana w wyższym stopniu niż poszczególne jej składniki, poddane działaniu biokatalizatora w analogicznych warunkach.

Efektywną degradację nitrobenzenu prowadził *Comamonas* sp. JS765 [67]. Ustalono, że w warunkach tlenowych, degradacja nitrobenzenu następuje w cyklu reakcji podanych na Schemacie 23.



1 - 1,2-dioksygenaza nitrobenzenowa

2 - 2,3-dioksygenaza katecholowa

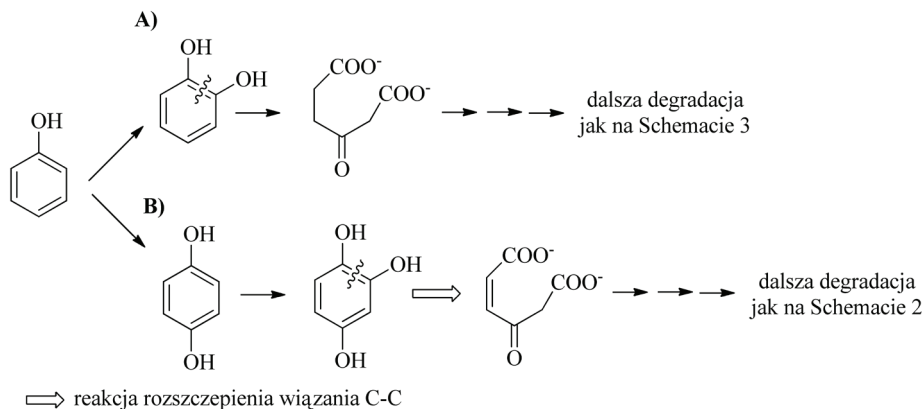
Schemat 23. Bakteryjna degradacja nitrobenzenu i 2-nitrotolueniu

Scheme 23. Bacterial degradation of nitrobenzene and 2-nitrotoluene

Badania wykazały, że *Corynebacterium glutamicum*, stosowany w produkcji aminokwasów i witamin metodą fermentacji metabolizuje m.in. benzoesy, fenole, protokatechol i *p*-krezol [74].

W bioremediacji węglowodorów aromatycznych, w tym wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), ważną rolę odgrywają również drożdże i grzyby strzępkowe m.in.: *Arxula adenivorans* [75], *Aspergillus ochraceus* [76], *Candida tropicalis* [77], *Cunninghamella elegans* [76], *Saccharomyces cerevisiae* [78] czy *Trichosporon cutaneum* [79].

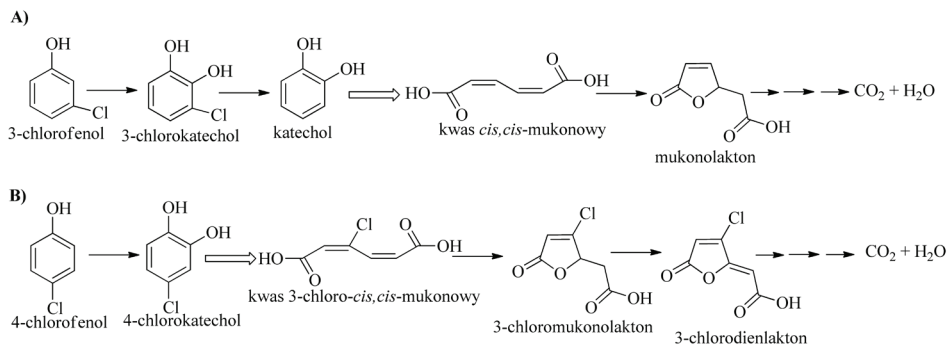
Szczep *Aspergillus fumigatus* ATCC 28282 wykorzystuje fenol, *p*-krezol i 4-etylofenol jako jedyne źródło węgla [80, 81]. Na podstawie analizy wyników doświadczeń, których celem było ustalenie drogi metabolizmu fenolu, postuluje się, że utlenienie tego substratu zachodzi na dwóch drogach (Schemat 24) [82]: *o*-hydroksylacji lub dihydroksylacji do 1,2,4-trihydroksybenzenu. Kolejno następuje *orto* rozszczepienie wiązania C-C układu *o*-diolu. Produkty rozszczepienia ulegają dalszej degradacji na drodze β -oksydacji.



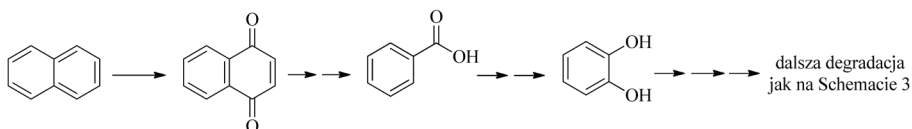
Schemat 24. Metabolizm fenolu w kulturze *A. fumigatus* ATCC 28282

Scheme 24. Phenol metabolism in *A. fumigatus* ATCC 28282 culture

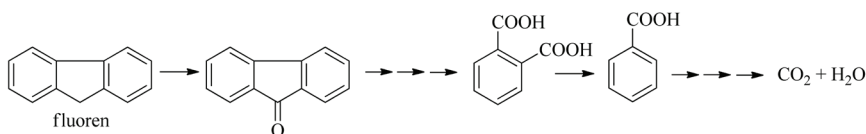
Inny szczep rodzaju *Aspergillus* (*A. nidulans*) degradował 3-chloro- i 4-chlorofenol. Chlorofenole akumulują się w glebie i mogą być przekształcane do toksycznych, trudno degradowanych metabolitów np. kwasu 2-chloromukonowego. Izomeryczne chlorofenole metabolizowane są przez *A. nidulans* w nieco odmienny sposób: 3-chlorofenol po utlenieniu do diolu (3-chlorokatecholu) ulega dehalogencji do katecholu, z którego kolejno powstaje mukonolakton (Schemat 25 A), natomiast produktem utleniania 4-chlorokatecholu jest 3-chloro-1,3-dienlakton. Oba γ -laktony ulegają również dalszej degradacji na drodze β -oksydacji (Schemat 25 B) [83].

Schemat 25. Schemat degradacji: A) 3-chlorofenolu, B) 4-chlorofenolu w kulturze *A. nidulans*Scheme 25. Degradation scheme of A) 3-chlorophenol, B) 4-chlorophenol in *A. nidulans* culture

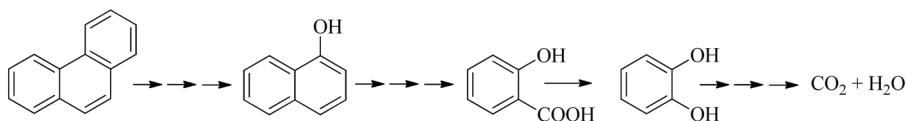
W deszczowych lasach tropikalnych występuje szczep *Pleurotus eryngii* wykorzystujący naftalen jako źródło węgla [84]. Proces degradacji naftalenu przez ten gatunek bocznika, rozpoczyna utlenienie przy C-1 i C-4 (Schemat 26). Powstały 1,4-naftochinon utleniany jest do kwasu benzoesowego, z którego w reakcji katalizowanej przez dioksygenazę, powstaje katechol (Schemat 26).

Schemat 26. Degradacja naftalenu przez *P. eryngii*Scheme 26. Degradation of naphthalene by *P. eryngii*

Szczep *P. eryngii* utylizuje również fluoren (Schemat 27) [85]. Taka aktywność mikroorganizmu spowodowana jest zdolnością do produkcji m.in. lakkazy i peroksydazy ligninowej.

Schemat 27. Degradacja fluorenu przez *Pleurotus eryngii*Scheme 27. Degradation of fluorene by *Pleurotus eryngii*

Fenantren jest utylizowany przez szczep *Sphingomonas* sp. GY2B. Zidentyfikowano trzy kolejne produkty pośrednie metabolizmu fenantrenu przez ten mikroorganizm: 1-naftol, kwas salicylowy i katechol (Schemat 28) [86].

Schemat 28. Degradacja fenantrenu przez *Sphingomonas* sp. GY2BScheme 28. Degradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. GY2B

Wyizolowano również szczep *Mycobacterium* sp., który utlenia piren. Po 72 godz. inkubacji w kulturze tego szczepu blisko 50% pirenu ulegało mineralizacji. Dodatkowo ustalono, że enzymy odpowiedzialne za rozkład pirenu są indukowane obecnością substratu [87].

Wśród drobnoustrojów metabolizujących WWA jest także wiele szczepów ekstremofilnych bakterii (odpornych na skrajne warunki środowiska) metabolizujących WWA. Należą do nich m.in.: *Bacillus thermooleovorans* [88], *Halomonas aromativorans* [89], *Halomonas organivorans* [90], *Thermus brockii* [91].

Czynnikiem znacząco ograniczającym proces biodegradacji WWA jest ich słaba rozpuszczalność w wodzie oraz adsorpcja w glebie [11, 71]. Dlatego też poszukuje się sposobów na zwiększenie solubilizacji tych związków. Szczególnie użyteczne dla zwiększenia rozpuszczalności WWA są wytwarzane przez mikroorganizmy biosurfaktanty. W odróżnieniu od syntetycznych odpowiedników biosurfaktanty odznaczają się niższą toksycznością i często wyższą stabilnością w ekstremalnych temperaturach i pH. Chociaż z uwagi na niskie koszty produkcji powszechnie stosowane są syntetyczne surfaktanty, naturalne związki powierzchniowo czynne preferowane są ze względu na ich biodegradowalność. Prowadzone są prace nad uzyskaniem rekombinowanych mikroorganizmów zdolnych do rozkładu węglowodorów aromatycznych i produkcji związków obniżających napięcie powierzchniowe [92, 93].

PODSUMOWANIE

Syntetyczne zastosowanie biokatalizy jest aktualnie przedmiotem intensywnych badań. Otrzymywanie nowych pochodnych dla potrzeb przemysłu farmaceutycznego, chemicznego a także spożywczego na drodze biotransformacji, jest obecnie uważane za dogodniejszą metodę, niż opracowanie syntezy chemicznej zarówno z ekonomicznego, jak i ekologicznego punktu widzenia. Dodatkowym atutem biokatalizy, głównie z użyciem całych komórek, jest możliwość modyfikacji substratu w wyniku szeregu następujących kolejno po sobie reakcji.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że mikroorganizmy izolowane ze skażonego środowiska posiadają duży potencjał w zakresie rozkładu związków aromatycznych, będących ważnym elementem składowym zanieczyszczeń. Niewielka inwazyjność, stosunkowo niskie koszty procesu, w którym wykorzystywany jest naturalnie istniejący potencjał katabolizny mikroorganizmów, stanowią istotne zalety bioremediacji [21, 94–96].

Prace, które mają na celu opracowanie efektywnych metod biokatalizy, stymulują równocześnie rozwój badań w zakresie fizjologii mikroorganizmów, biochemii i genetyki. Przykładowo, w doświadczeniach nad selektywną mikrobiologiczną degradacją łańcucha bocznego steroli ustalono, że patogenne szczepy *Mycobacterium* (*M. tuberculosis*, *M. bovis* i *M. avium*) mają zdolność do transformacji cholesterolu. Wykazano korelację między aktywnością szczepu względem metabolizowania cholesterolu a jego działaniem patogennym [97]. Wciąż izolowane są ze środowiska mikroorganizmy, których właściwości katalityczne różnią się od wcześniej opisanych, a także selekcjonowane są mutanty i rekombinanty pozwalające na zwiększenie wydajności syntezy pożądaných produktów. Liczne prace badawcze zmierzają w kierunku obniżenia kosztów produkcji tych związków lub w kierunku wykorzystania produktów odpadowych do ich syntezy.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.C. Leffingwell, *Leffingwell Rep.*, 2003, **3**, 1.
- [2] E. Brenna, C. Fuganti, S. Serra, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2003, **14**, 1.
- [3] N.A. Donoghue, D.B. Norris, P.W. Trudgill, *Eur. J. Biochem.*, 1976, **63**, 175.
- [4] T. Kołek, A. Świzdor, A. Szpineter, *Wiad. Chem.*, 2004, **68**, 245.
- [5] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa, 2009.
- [6] E. Díaz, J.I. Jiménez, J. Nogales, *Curr. Opin. Biotech.*, 2013, **24**, 431.
- [7] W.J. van Berkel, N.M. Kamerbeek, M.W. Fraaije, *J. Biotechnol.*, 2006, **124**, 670.
- [8] J.G. Leahy, P.J. Batchelor, S.M. Morcomb, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2003, **27**, 449.
- [9] D.T. Gibson, R.E. Parales, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000, **11**, 236.
- [10] A.L. Juhasz, R. Naidu, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 2000, **45**, 57.
- [11] S. Husain, *Remediation Journal*, 2008, **18**, 131.
- [12] A.M. Spormann, F. Widdel, *Biodegradation*, 2000, **11**, 85.
- [13] C. Leutwein, J. Heider, *Microbiology*, 1999, **145**, 3265.
- [14] J. Heider, G. Fuchs, *Eur. J. Biochem.*, 1997, **243**, 577.
- [15] H. Priefert, J. Rabenhorst, A. Steinbüchel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **56**, 296.
- [16] S. Gocho, N. Tabogami, M. Inagaki, C. Kawabata, T. Komai, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1995, **59**, 1571.
- [17] J. Schrader, M.M. Etschmann, D. Sell, J.M. Hilmer, J. Rabenhorst, *Biotechnol. Lett.*, 2004, **26**, 463.
- [18] P. Chalier, J. Crouzet, *Food Chem.*, 1998, **63**, 447.
- [19] P.M. Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd Edition, J. Wiley & Sons, Chichester, 2009.
- [20] L. Sedlaczek, *CRC. Crit. Rev. Biotechnol.*, 1988, **7**, 187.
- [21] O. Marchut-Mikołajczyk, E. Kwapisz, T. Antczak, *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, 2013, **16**, 39.
- [22] H. Liu, S.-J. Wang, N.-Y. Zhou, *Biotechnol. Lett.*, 2005, **27**, 275.
- [23] A. Belhaj, N. Desnoues, C. Elmerich, *Res. Microbiol.*, 2002, **153**, 339.
- [24] T. Ishiguro, Y. Othake, S. Nakayama, Y. Inamori, T. Amagai, M. Soma, H. Matsusita, *Environ. Technol.*, 2000, **21**, 1309.
- [25] Y. Waché, M. Aguedo, A. Choquet, I.L. Gatfield, J.M. Nicaud, J.M. Belin, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 5700.

- [26] I.L. Gatfield, M. Güntert, H. Sommer, P. Werkhoff, *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, 1993, **15**, 165.
- [27] Y. Waché, M. Aguedo, J.M. Nicaud, J.M. Belin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **61**, 393.
- [28] M. Alchihab, J. Destain, M. Aguedo, L. Majad, H. Ghalfi, J.P. Wathelet, P. Thonart, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2009, **158**, 41.
- [29] Y. Waché, M. Aguedo, M.T. LeDall, J.M. Nicaud, J.M. Belin, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2002, **19-20**, 347.
- [30] H.-J. Rehm, G. Reed, *Biotechnology: Biotransformations II*, **8b**, Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
- [31] J.E. Kinsella, D.H. Hwang, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1976, **8**, 191.
- [32] E.-B. Goh, E.E.K. Baidoo, J.D. Keasling, H.R. Beller, *Appl. Environ. Microb.*, 2012, **78**, 70.
- [33] G. Yu, T.T.H. Nguyen, Y. Guo, I. Schauvinhold, M.E. Auldridge, N. Bhuiyan, I. Ben-Israel, Y. Iijima, E. Fridman, J. P. Noel, E. Pichersky, *Plant Physiol.*, 2010, **154**, 67.
- [34] D. Di Gioia, F. Luziatelli, A. Negroni, A.G. Ficca, F. Fava, M. Ruzzi, *J. Biotechnol.*, 2011, **156**, 309.
- [35] D. Havkin-Frenkel, F.C. Belanger, *Biotechnology in Flavor Production*, Wiley-Blackwell: Oxford, 2008.
- [36] A. Muheim, K. Lerch, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **51**, 456.
- [37] S. Achterholt, H. Priefert, A. Steinbuchel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, **54**, 799.
- [38] M. Brunati, F. Marinelli, C. Bertolini, R. Gandol, D. Daffonchio, F. Molinari, *Enzyme. Microb. Technol.*, 2004, **34**, 3.
- [39] H.B. Bode, R. Müller, *Plant Physiol.*, 2003, **132**, 1153.
- [40] S. Ghosh, A. Sachan, S.K. Sen, A. Mitra, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, **34**, 131.
- [41] A.C.P. Dias, P. Fernandes, J.M.S. Cabral, H.M. Pinheiro, *Bioresource Technol.*, 2002, **82**, 253.
- [42] H.-J. Rehm, G. Reed, *Biotechnology, A Comprehensive Treatise in 8 Volumes*, **6a**, Verlag-Chemie, Weinheim, 1984.
- [43] A. Szentirmai, *J. Ind. Microbiol.*, 1990, **6**, 101.
- [44] C.J. Sih, S.S. Lee, Y.Y. Tsong, K.C. Wang, F.M. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, **87**, 2765.
- [45] FR Patent 2,408,621 Pat., 1977.
- [46] Ger. Patent 2,647,895 Pat., 1975.
- [47] U.S. Patent 4,345,033 Pat., 1982.
- [48] R. van der Geize, G.I. Hessels, L. Dijkhuizen, *Microbiology*, 2002, **148**, 3285.
- [49] A. Schmid, J.S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature*, 2001, **409**, 258.
- [50] H.M. Alvarez, *Microbiology Monographs: Biology of Rhodococcus*, Springer-Verlag, Berlin, 2010.
- [51] C.J. Sih, H.H. Tai, Y.Y. Tsong, S.S. Lee, R.G. Coombe, *Biochemistry*, 1968, **7**, 808.
- [52] K.Z. Rosłonec, M.H. Wilbrink, J.K. Capyk, W.W. Mohn, M. Ostendorf, R. van der Geize, L. Dijkhuizen, L.D. Eltis, *Mol. Microbiol.*, 2009, **74**, 1031.
- [53] M.H. Wilbrink, *Microbial sterol side chain degradation in Actinobacteria*, Praca doktorska, 2011, <http://irs.ub.rug.nl/ppn/332744558>.
- [54] M.H. Wilbrink, M. Petrusma, L. Dijkhuizen, R. van der Geize, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, **77**, 4455.
- [55] M.M. Klimashina, I.V. Viktorovskii, N.P. Mikhailova, K.A. V'iunov, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 1988, **24**, 647.
- [56] L. Pollegioni, L. Piubelli, G. Molla, *FEBS J.*, 2009, **276**, 6857.
- [57] D.V. Dovbnaya, O.V. Egorova, M.V. Donova, *Steroids*, 2010, **75**, 653.
- [58] T.G. Lobastova, S.M. Khomutov, L.L. Vasiljeva, M.A. Lapitskaya, K.K. Pivnitsky, M.V. Donova, *Steroids*, 2009, **74**, 233.
- [59] E.S. Agoston, M.A. Hatcher, T.W. Kensler, G.H. Posner, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 2006, **6**, 53.
- [60] U.S. Patent 6, 600,058, Pat. 2003.
- [61] U.S. Patent 5,776,921, Pat. 1998.

- [62] E. El Kihel, *Steroids*, 2012, **77**, 10.
- [63] C.N. Ahlem, T.M. Page, D.L. Auci, M.R. Kennedy, K. Mangano, F. Nicoletti, Y. Ge, Y. Huang, S.K. White, S. Villegas, D. Conrad, A. Wang, C.L. Reading, J.M. Frincke, *Steroids*, 2011, **76**, 145.
- [64] J. Nowak, *Biotechnologia*, 2008, **1**, 97.
- [65] J. Zamorska, D. Papiak, *Zeszyty Naukowe Politechniki Rzeszowskiej. Budownictwo i Inżynieria Środowiska*, 2004, z. 38, nr **218**.
- [66] A. Belhaj, N. Desnoues, C. Elmerich, *Res. Microbiol.*, 2002, **153**, 339.
- [67] S.F. Nishino, J.C. Spain, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 2520.
- [68] J. Zeyer, P.C. Kearney, *J. Agric. Food Chem.*, 1984, **32**, 238.
- [69] R.A. Amer, M.M. Nasier, E.R. El-Helow, *Biotechnology*, 2008, **7**, 630.
- [70] B.E. Haigler, W.H. Wallace, J.C. Spain, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**, 3466.
- [71] E. Kaczorek, K. Sałek, U. Guzik, T. Jesionowski, Z. Cybulski, *Chemosphere*, 2013, **90**, 471.
- [72] H. Liu, S.-J. Wang, N.-Y. Zhou, *Biotechnol. Lett.*, 2005, **27**, 275.
- [73] J.J. Kukor, R.H. Olsen, *J. Bacteriol.*, 1991, **173**, 4587.
- [74] X.H. Shen, N.Y. Zhou, S.J. Liu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, **95**, 77.
- [75] W.J. Middelhoven, A. Coenen, B. Kraakman, M.D.S. Gelpke, Antonie Van Leeuwenhoek, *J. Microbiol.* 1992, **62**, 181.
- [76] C.E. Cerniglia, R.H. Dodge, D.T. Gibson, *Botanica Marina*, 1980, **23**, 121.
- [77] M. Krug, G. Straube, *J. Basic. Microbiol.*, 1986, **26**, 271.
- [78] A. Wiseman, L.F.J. Woods, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1979, **29**, 320.
- [79] A. Gaal, H.Y. Neujahr, *J. Bacteriol.*, 1979, **137**, 13.
- [80] K.H. Jones, P.W. Trudgill, D.J. Hopper, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 1125.
- [81] K.H. Jones, P.W. Trudgill, D.J. Hopper, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**, 1978.
- [82] K.H. Jones, P.W. Trudgill, D.J. Hopper, *Arch. Microbiol.*, 1995, **163**, 176.
- [83] T.M. Martins, O. Nunez, H. Gallart-Ayala, M. C. Leitao, M.T. Galceran, C.S. Pereira, *J. Hazard. Mater.*, 2014, **268**, 264.
- [84] T. Hadibarata, Z.C. Teh, M.M.F.A. Rubiyatno, Zubir, A.B. Khudhair, A.R.M. Yusoff, M.R. Salim, T. Hidayat, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2013, **36**, 1455.
- [85] T. Hadibarata, R.A. Kristanti, *Fungal Biol.*, 2014, **118**, 222.
- [86] X.-Q. Tao, G.-N. Lu, Z. Dang, C. Yang, X.-Y. Yi, *Process Biochem.*, 2007, **42**, 401.
- [87] M.A. Heitkamp, W. Franklin, C.E. Cerniglia, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, **54**, 2549.
- [88] E. Annweiler, H.H. Richnow, G. Antranikian, S. Hebenbrock, C. Garms, S. Franke, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 518.
- [89] M.T. Garcia, A. Ventosa, E. Mellado, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2005, **54**, 97.
- [90] M.T. Garcia, E. Mellado, J.C. Ostos, A. Ventosa, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, **54**, 1723.
- [91] H. Feitkenhauer, R. Muller, H. Markl, *Biodegradation*, 2003, **14**, 367.
- [92] K.N. Timmis, D.H. Pieper, *Trends Biotechnol.*, 1999, **17**, 201.
- [93] N. Christofi, I.B. Ivshina, *J. Appl. Microbiol.*, 2002, **93**, 915.
- [94] M. Alcade, M. Ferrer, F.J. Plou, A. Ballesteros, *Trends Biotechnol.* 2006, **24**, 281.
- [95] T.D. Sutherland, I. Horne, K.M. Weir, C.W. Coppin, M.R. Williams, M. Selleck, R.J. Russel, J.G. Oakeshott, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2004, **31**, 817.
- [96] D. Paul, G. Pandey, J. Pandey, R.K. Jain, *Trends Biotechnol.*, 2005, **23**, 135.
- [97] R. van der Geize, K. Yam, T. Heuser, M.H. Wilbrink, H. Hara, M.C. Anderton, E. Sim, L. Dijkhuizen, J.E. Davies, W.W. Mohn, L.D. Eltis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007, **104**, 1947.

REAKCJA NIEMENTOWSKIEGO

THE NIEMENTOWSKI REACTION

Magdalena Łysakowska*, Dorota G. Piotrowska

*Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Farmaceutyczny,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi,
ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź
e-mail: magdalena.lysakowska@umed.lodz.pl

Abstract

Wstęp

1. Reakcja Niementowskiego
 - 1.1. Synteza chinoliny
 - 1.2. Synteza chinazoliny
2. Modyfikacje reakcji Niementowskiego
 - 2.1. Synteza chinoliny
 - 2.2. Synteza chinazoliny
3. Zastosowanie reakcji Niementowskiego

Podsumowanie

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Magdalena Łysakowska ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w 2010 r. Od 2010 r. pracuje jako asystent na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W swojej pracy naukowej zajmuje się syntezą i oceną aktywności biologicznej nowych izoksazolidynowych analogów homonukleotydów.

Dr hab. Dorota G. Piotrowska studiowała chemię (1991–1996) na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej, w 2002 roku uzyskała stopień doktora nauk farmaceutycznych na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, a w roku 2011 – stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Jej zainteresowania naukowe dotyczą, m.in. syntezy nitronów i ich zastosowania w reakcjach dipolarnej cykloaddycji, syntezy i stereochemii nowych pochodnych heterocyklicznych jako fosfonianowych mimetyków nukleozydów i nukleotydów o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych i przeciwwirusowych oraz zastosowania spektroskopii NMR w analizie konformacyjnej i konformacyjnej.

ABSTRACT

The Niementowski reaction depends on the fusion of anthranilic acid with carbonyl compounds or amides and dates back to the end of the nineteenth century. Numerous variations of the reaction components and modifications of the reaction conditions have appeared in the literature through years. Besides anthranilic acid other synthons including: methyl *o*-aminobenzoate [25], *o*-nitrobenzoic acid [26], *o*-acylaminobenzamide [21], *o*-aminobenzamide [27], *o*-aminobenzonitrile [28], isatoic anhydride [29], benzoxasinone [30, 31] have been employed as well. Replacement of the amide component with either amine [9, 32], nitrile [33], imidate [34], thioamide [35], amidine [36], aldehyde [37] or carboxylic acid [28] have also been reported. To increase yield and to reduce the reaction time a number of variables in reaction conditions have been investigated. The best results have been achieved by implementation of a microwave irradiation [38].

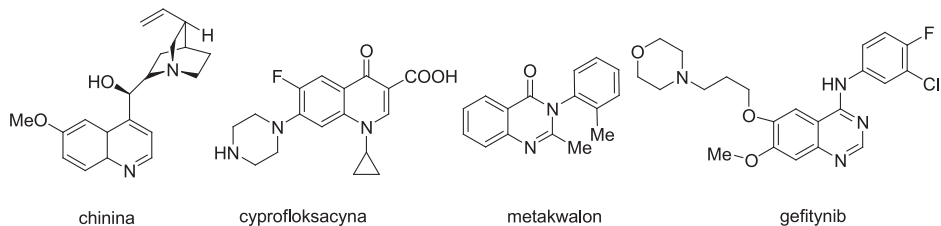
The Niementowski reaction and its variants have found widespread use in pharmaceutical and agrochemical fields for the synthesis of compounds containing quinoline and quinazoline systems which are present in a number of natural and synthetic alkaloids [12, 13] and many drugs [1–5].

Keywords: the Niementowski reaction, quinoline, quinazoline, quinazolin-4-one, anthranilic acid

Słowa kluczowe: reakcja Niementowskiego, chinolina, chinazolina, chinazolin-4-on, kwas antranilowy

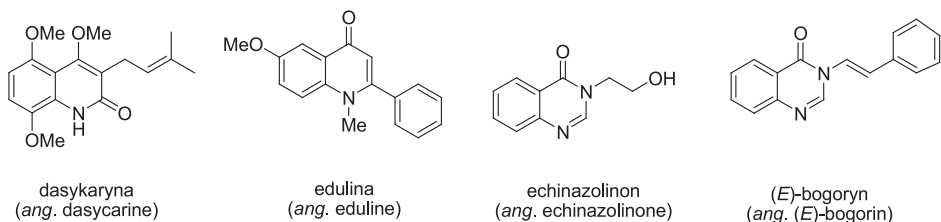
WSTĘP

Inspiracją badań nad syntezą chinoliny i jej pochodnych było odkrycie występowania szkieletu chinoliny i chinazoliny w produktach naturalnych, np. chininie stosowanej w leczeniu malarii [1]. Później wykazano, że liczne związki zawierające te pierścienie znalazły zastosowanie w lecznictwie: np. cyprofloksacyna – infekcje bakteryjne [2, 3], metakwalon – zaburzenia psychiczne [4, 5], gefitynib – choroby nowotworowe [6] (Rys. 1).



Rysunek 1. Przykłady leków zawierających pierścienie chinoliny i chinazoliny
Figure 1. Examples of drugs containing quinoline and quinazoline rings

Związki zawierające w swej strukturze pierścienie chinoliny bądź chinazoliny wykazują także działanie przeciwwgruźlicze [7, 8], przeciwzapalne [9], przeciwgrzybiczne [10], przeciwwirusowe i hipotensyjne [11]. Pierścienie chinoliny i chinazoliny występują w wielu alkaloidach np. w dasykarynie (ang. *dasycarine*) wyizolowanej z rośliny *Dictamnus dasycarpus*, edulinie (ang. *eduline*) wyodrębnionej z rośliny *Orixa japonica* [12], echinazolinonie (ang. *echinazolinone*), (*E*)-bogorynie (ang. (*E*)-*bogorin*) [13] (Rys. 2).



Rysunek 2. Przykłady alkaloidów chinoliny i chinazoliny
Figure 2. Examples of quinoline and quinazoline alkaloids

Ponadto pochodne chinoliny znajdują zastosowanie w syntezie środków grzybobójczych, biocydów, a także substancji zapachowych. Są również stosowane jako katalizatory, inhibitory korozji oraz środki konserwujące [1].

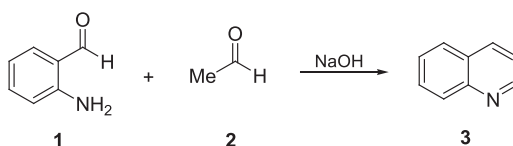
Ważną drogą syntezy związków zawierających pierścienie chinoliny są reakcje odkryte przez Niementowskiego w latach 1894 [14] i 1895 [15]. W niniejszej pracy przedstawiono ich modyfikacje umożliwiające otrzymanie zróżnicowanych strukturalnie chinolin i chinazolin w wysokimi wydajnościami, a także przykłady wyko-

rzystania tych reakcji w syntezie biologiczne czynnych chinolin i chinazolin oraz skondensowanych układów heterocyklicznych.

1. REAKCJA NIEMENTOWSKIEGO

1.1. SYNTEZA CHINOLINY

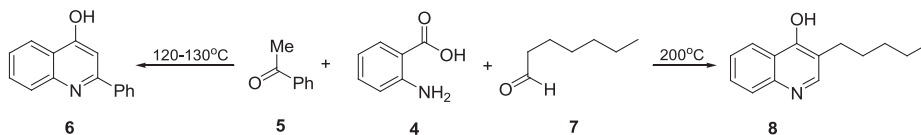
Od chwili odkrycia w 1880 roku przez Skraupa [16, 17] metody syntezy chinoliny nastąpił dynamiczny rozwój chemii chinolin. Jedną z ważnych dróg syntezy chinoliny **3** była reakcja kondensacji 2-aminobenzaldehydu **1** z acetaldehydem **2** opisana w 1882 roku przez Friedländera [18] (Schemat 1).



Schemat 1. Synteza chinoliny według Friedländera

Scheme 1. The Friedländer synthesis of quinoline

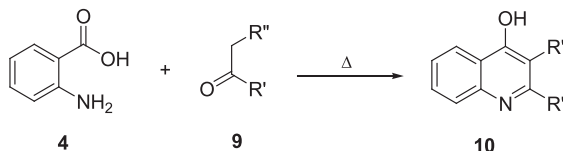
W roku 1894 Niementowski zastępując 2-aminobenzaldehyd kwasem antranilowym **4**, a acetaldehyd acetofenonem **5** otrzymał 2-fenyl-4-hydroksychinolinę **6** [14], a rok później ustalili, że podobna reakcja przebiega również między kwasem antranilowym **4** i aldehydem alifatycznym **7** z utworzeniem 4-hydroksy-3-pentylochinoliny **8** (Schemat 2) [15].



Schemat 2. Synteza 4-hydroksychinolin w reakcji Niementowskiego

Scheme 2. Synthesis of 4-hydroxyquinolines according to the Niementowski reaction

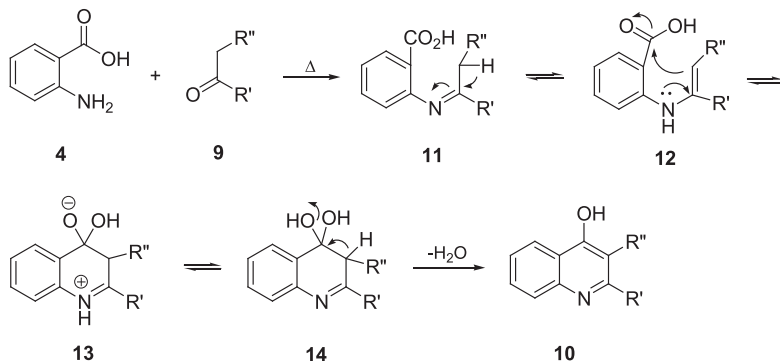
Uogólniając, reakcja Niementowskiego umożliwia syntezę 4-hydroksychinolin **10** z kwasu antranilowego **4** i związków karbonylowych **9** zawierających w pozycji α ugrupowanie metylenowe (Schemat 3).



Schemat 3. Synteza 4-hydroksychinolin w reakcji Niementowskiego

Scheme 3. Synthesis of 4-hydroxyquinolines according to the Niementowski reaction

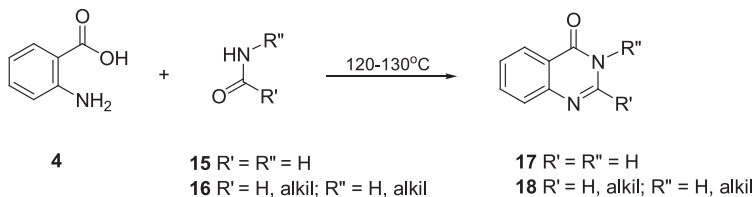
W reakcji kwasu antranilowego **4** i związku karbonylowego **9** najpierw powstają zasady Schiffa **11**, które ulegają przekształceniu w enaminy **12**. W wyniku cyklizacji związku **12** do produktu pośredniego **13**, migracji protonu i dehydratacji tworzą się podstawione chinoliny **10** (Schemat 4) [19].



Schemat 4. Mechanizm reakcji Niementowskiego na przykładzie syntezy 4-hydroksychinolin
Scheme 4. Mechanism of the Niementowski reaction for the synthesis of 4-hydroxyquinolines

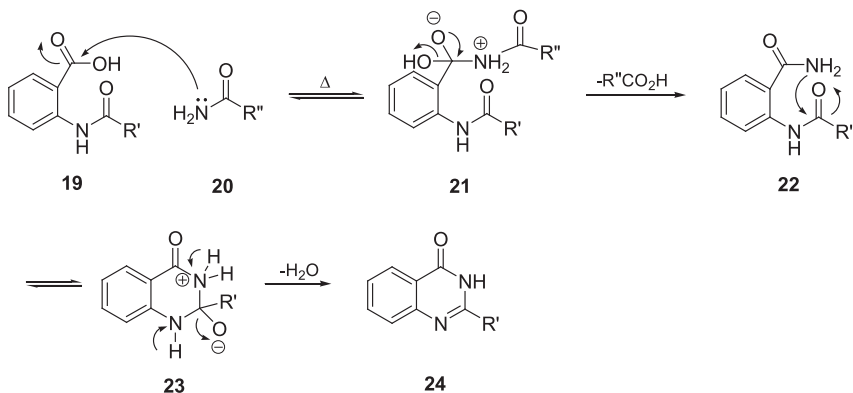
1.2. SYNTEZA CHINAZOLINY

W 1895 roku Niementowski opisał syntezę chinazolin-4-onu **17** wykorzystując jako substraty kwas antranilowy **4** oraz formamid **15**. W podobnych warunkach otrzymał odpowiednio podstawione chinazolin-4-ony **18** (Schemat 5) [20].



Schemat 5. Synteza chinazolin-4-onów w reakcji Niementowskiego
Scheme 5. Synthesis of quinazolin-4-ones according to the Niementowski reaction

Zaproponowany w 1965 roku mechanizm reakcji Niementowskiego zakłada, że ogrzewanie związku **19** z amidem **20** prowadzi do utworzenia związku **21**, z którego na drodze eliminacji powstaje produkt **22**, ulegający cyklizacji oraz dehydratacji do chinazolin-4-onu **24** (Schemat 6) [21].



Schemat 6. Mechanizm reakcji Niementowskiego dla syntezy chinazolin-4-onów zaproponowany przez Patela

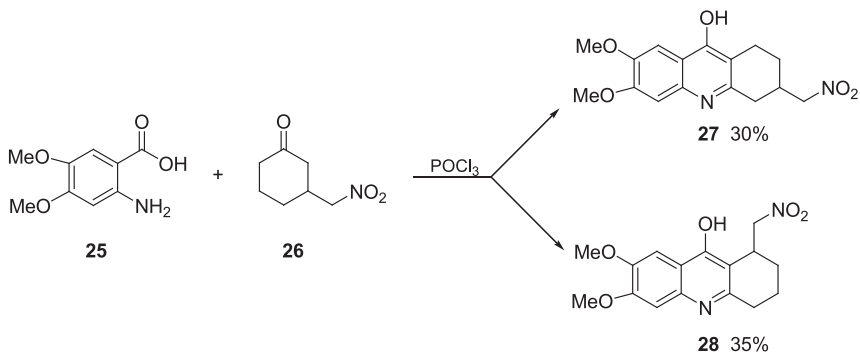
Scheme 6. Mechanism of the Niementowski reaction for the synthesis of quinazolin-4-ones proposed by Patel

2. MODYFIKACJE REAKCJI NIEMENTOWSKIEGO

2.1. SYNTEZA CHINOLINY

Opisano wiele modyfikacji reakcji Niementowskiego, które poprzez dobór substratów i optymalizację warunków pozwoliły na rozpoznanie zakresu jej zastosowań.

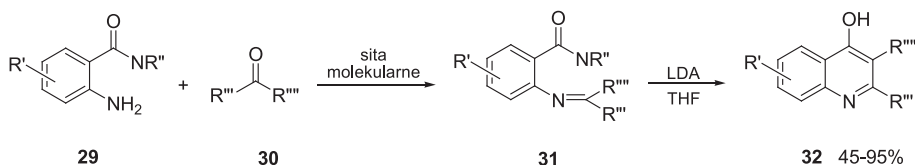
W reakcji kwasu antranilowego **25** i cyklicznego ketonu **26** w obecności tlenochlorku fosforu(V) otrzymano izomeryczne 1,2,3,4-tetrahydroakrydyny **27** i **28** (Schemat 7) [22].



Schemat 7. Synteza układów trójpięścieniowych w reakcji Niementowskiego

Scheme 7. Synthesis tricyclic systems in the Niementowski reaction

Wykorzystując amid kwasu antranilowego **29** oraz odpowiednie ketony **30** otrzymano iminy **31**, które w obecności LDA (diizopropylamidek litu) zostały przekształcone w 4-hydroksychinoliny **32** (Schemat 8) [23].

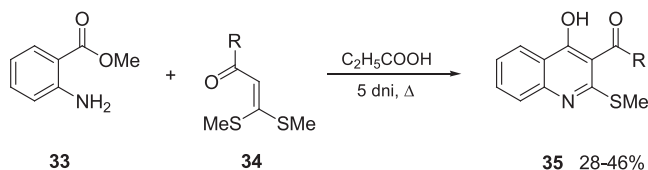


R' = H, OMe; R'' = R''' = Me, Et; R'''' = Me, Et, *n*-Pr, *n*-Pentyl, Ph, CO₂Et

Schemat 8. Reakcja Niementowskiego w temperaturze pokojowej

Scheme 8. The Niementowski reaction at room temperature

Ogrzewanie 2-aminobezoesanu metylu **33** oraz aryloketonu **34** w kwasie propanowym prowadzi do uzyskania chinolin **35** zawierających grupę tiometylową przy C2 (Schemat 9) [24].



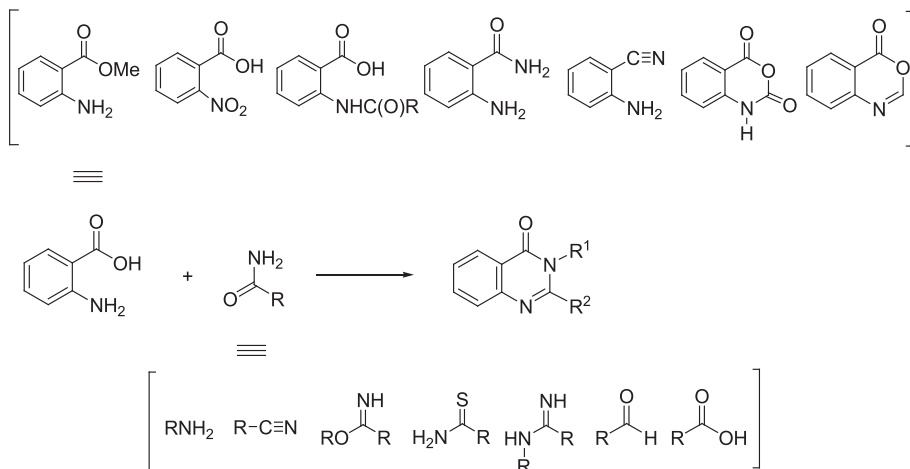
R = Ph, *p*-Cl-Ph, *p*-MeO-Ph

Schemat 9. Synteza 2-tiometylochinelin w reakcji Niementowskiego

Scheme 9. Synthesis of 2-thiomethyl substituted quinolines by the Niementowski reaction

2.2. SYNTEZA CHINAZOLINY

Znane są modyfikacje reakcji Niementowskiego, w których kwas antranilowy zastąpiono: *o*-aminobezoesanem metylu [25], kwasem *o*-nitrobenzoesowym [26], *o*-acyloaminobenzamidem [21], *o*-aminobenzamidem [27], *o*-aminobenzonitrylem [28], bezwodnikiem kwasu izatynowego [29], benzoksazynonem [30, 31]. Opisano także reakcje, w których w miejsce amidu wprowadzono: aminę [9, 32], nityl [33], iminoeter [34], tioamid [35], amidynę [36], aldehyd [37] czy też kwas karboksylowy [28] (Schemat 10), a ogrzewanie mieszaniny reakcyjnej zrealizowano również stosując promieniowanie mikrofalowe [38].



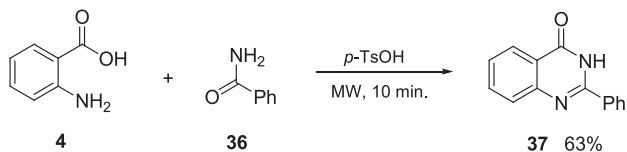
Schemat 10. Różne modyfikacje reakcji Niementowskiego

Scheme 10. Various modifications of the Niementowski reaction

Reakcje kwasu antranilowego i amidu z wykorzystaniem mikrofal (MW)

Zastosowanie promieniowania mikrofalowego w reakcji przedstawionej na Schemacie 5 pozwoliło na skrócenie czasu reakcji (z 6 godzin do 20 minut) i spowodowało zwiększenie wydajności (z 59% do 90%) [38, 39].

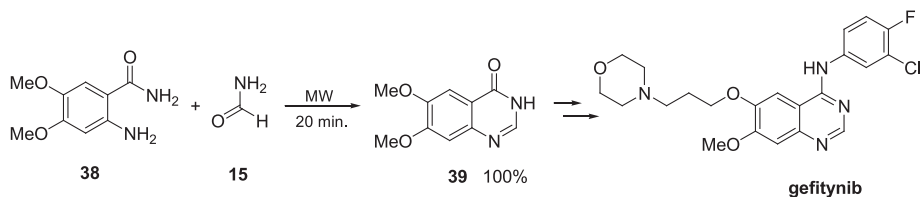
Podobnie, wykorzystując kwas antranilowy **4** oraz benzamid **36** w obecności kwasu *p*-toluenosulfonowego otrzymano 2-fenylchinazolin-4-on **37** skracając czas reakcji z 4 godzin do 10 minut (Schemat 11) [40].



Schemat 11. Reakcja Niementowskiego z wykorzystaniem ogrzewania mikrofalowego

Scheme 11. The microwave-assisted Niementowski reaction

Zastosowanie promieniowania mikrofalowego w syntezie związku **39**, produktu pośredniego w syntezie gefitynibu [41], leku stosowanego w leczeniu nowotworu płuc, spowodowało skrócenie czasu reakcji z 3 godzin do 20 minut i wzrost wydajności z 20% do 100% (Schemat 12) [42, 43].

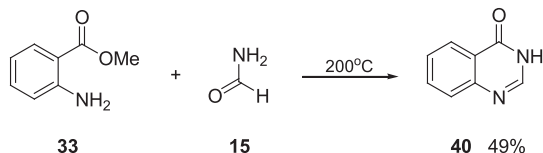


Schemat 12. Synteza gefitynibu

Scheme 12. Synthesis of gefitynib

Reakcje kwasu antranilowego i jego pochodnych z amidami

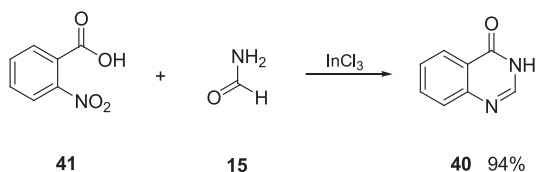
W 1943 roku Meyer i Wagner opisali wykorzystanie antranilanu metylu **33** w reakcji Niementowskiego (Schemat 13), co umożliwiło prowadzenie reakcji w temperaturze 200°C, ponieważ w tak wysokiej temperaturze kwas **4** ulega dekarboksylacji [25].



Schemat 13. Użycie antranilanu metylu w reakcji Niementowskiego

Scheme 13. Application of methyl anthranilate in the Niementowski reaction

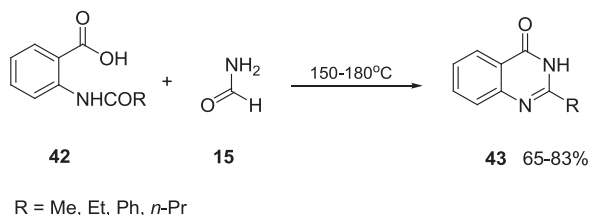
Zastąpienie kwasu antranilowego przez kwas 2-nitrobenzoesowy **41** i zastosowanie chlorku indy(III) jako reduktora spowodowało wzrost wydajności reakcji syntezy chinazolin-4-onu **40** z 59% do 94% (Schemat 14) [26, 38].



Schemat 14. Reakcja Niementowskiego z wykorzystaniem soli indy(III)

Scheme 14. Indium(III)-assisted Niementowski reaction

Modyfikacja polegająca na ogrzewaniu pochodnej kwasu antranilowego **42** z formamidem **15** prowadzi do otrzymania chinazolin-4-onów **43** (Schemat 15) [21].

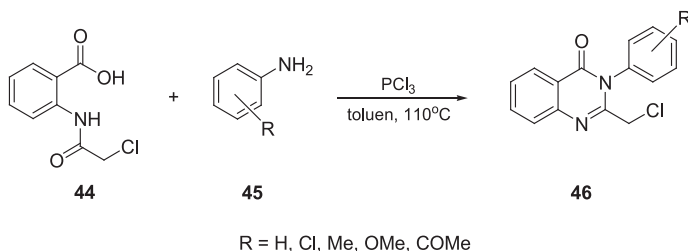


Schemat 15. Synteza 2-podstawionych chinazolin-4-onów w reakcji Niementowskiego

Scheme 15. Synthesis of 2-substituted quinazolin-4-ones in the Niementowski reaction

Reakcje kwasu antranilowego i jego pochodnych z aminami

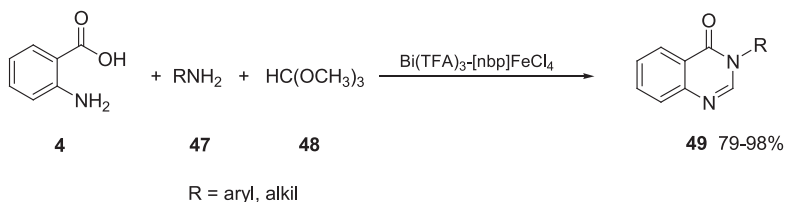
Zastosowanie kwasu *N*-acetyloantranilowego **44** oraz amin aromatycznych **45** w obecności chlorku fosforu(III) umożliwia otrzymanie 2,3-dwupodstawionych chinazolin-4-onów **46** (Schemat 16) [9].



Schemat 16. Synteza 2,3-dwupodstawionych chinazolin-4-onów w reakcji Niementowskiego

Scheme 16. Synthesis of 2,3-disubstituted quinazolin-4-ones according to the Niementowski reaction

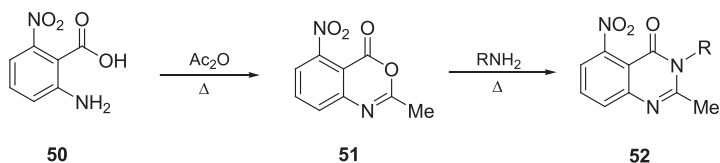
Reakcja cyklokondensacji kwasu antranilowego **4** z pierwszorzędową aminą **47** oraz ortomórwczanem trimetylu **48** w obecności katalitycznych ilości trifluorooctanu bizmutu w cieczy jonowej prowadzi do otrzymania chinazolin-4-onów **49**. Zastosowanie cieczy jonowej $[\text{nbp}]\text{FeCl}_4$ (tetrachlorożelazian *N*-butylopirydyniowy) umożliwiło prowadzenie reakcji już w temperaturze pokojowej i uzyskanie chinazolin-4-onów **49** z wysoką wydajnością (79–98%) w krótkim czasie (5–20 minut) (Schemat 17) [32].



Schemat 17. Trójskładnikowa kondensacja kwasu antranilowego, ortoestru i aminy

Scheme 17. A tri-component condensation of anthranilic acid, orthoester and amine

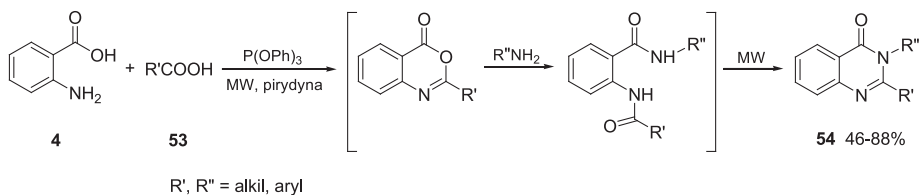
Już w 1905 roku udało się wyodrębnić benzoksazynon **51**, produkt pośredni reakcji kwasu 2-amino-6-nitrobenzoesowego **50** z bezwodnikiem octowym, z którego w reakcji z aminą otrzymano chinazolin-4-on **52** z ilościową wydajnością (Schemat 18). Utworzenie produktu pośredniego **51** umożliwiło syntezę 2-metylo-3-podstawionych chinazolin-4-onów [30].



Schemat 18. Synteza 2,3-dwupodstawionych chinazolin-4-onów **52**

Scheme 18. Synthesis of 2,3-disubstituted quinazolin-4-ones **52**

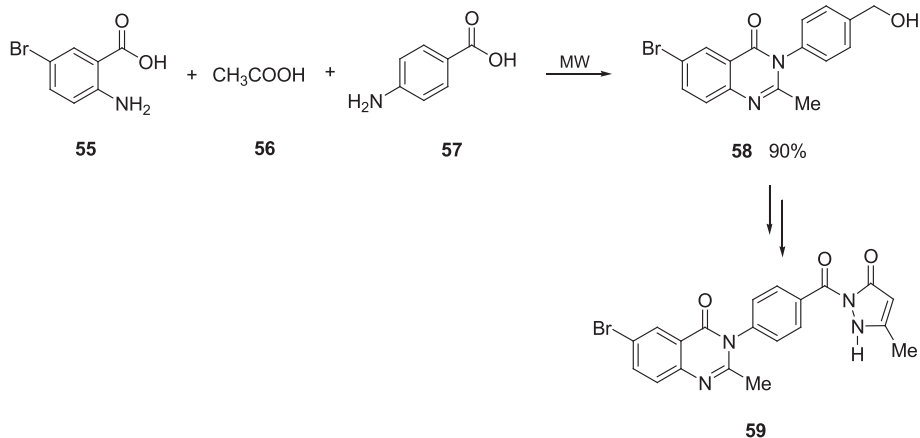
Zastosowanie kwasu karboksylowego **53** zamiast bezwodnika octowego i prowadzenie reakcji w obecności fosforynu trifenylowego z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego umożliwiło skrócenie jej czasu do kilku minut i utworzenie 2,3-dwupodstawionych chinazolin-4-onów **54** zawierających dowolne podstawniki przy C2 (Schemat 19) [31].



Schemat 19. Synteza 2,3-dwupodstawionych chinazolin-4-onów **54** z kwasu antranilowego i kwasu karboksylowego

Scheme 19. Synthesis of 2,3-disubstituted quinazolin-4-ones **54** from anthranilic acid and carboxylic acid

Trójskładnikową reakcję Niementowskiego, w której obok kwasu antranilowego użyto kwasu karboksylowego oraz aminy ilustruje przykład otrzymywania 2,3-dwupodstawionego chinazolin-4-onu **58** – produktu pośredniego w syntezie 3-metylo-1*H*-pirazol-5-onu **59** wykazującego aktywność przeciwbakteryjną, a także grzybobójczą względem drożdżaków z rodziny *Candida* (Schemat 20) [44].

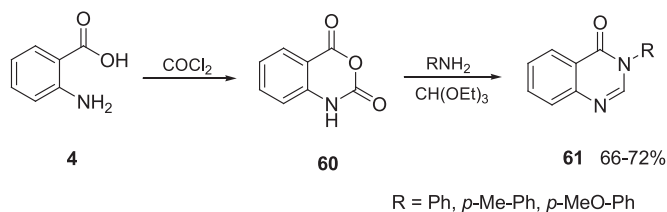


Schemat 20. Synteza chinazolin-4-onu 59

Scheme 20. Synthesis of a quinazolin-4-one 59

Reakcje bezwodnika izatynowego z aminami

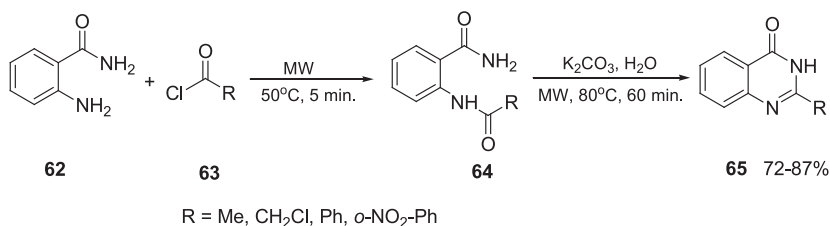
Wykorzystując bezwodnik izatynowy **60**, pierwszorzędowe aminy i ortomrówczan etylu otrzymano 3-arylochiazolin-4-ony **61** (Schemat 21) [29].



Schemat 21. Synteza chinazolin-4-onów 61

Scheme 21. Synthesis of quinazolin-4-ones 61

Reakcja 2-aminobenzamidu **62** oraz chlorku kwasowego **63** prowadzi do powstania *N*-acylowanych pochodnych 2-aminobenzamidu **64**, który w obecności węgłanu potasu ulega cyklizacji do związku **65** (Schemat 22) [27].



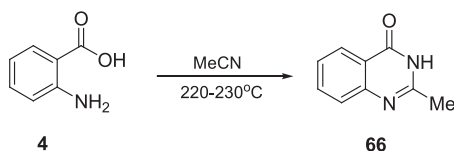
Schemat 22. Synteza chinazolin-4-onów 65

Scheme 22. Synthesis of quinazolin-4-ones 65

Zastąpienie stałego węgla potasu roztworem wodorotlenku sodu w etanolu umożliwia otrzymanie związków **65** bez konieczności użycia reaktora mikrofalowego [45].

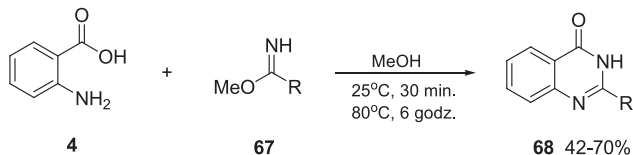
Reakcje kwasu antranilowego i jego pochodnych z nityrami, iminoeterami, tioamidami

Reakcję Niementowskiego, w której amid zastąpiono nityrem zbadano już w 1900 roku ogrzewając kwas antranilowy **4** oraz acetonitryl w zamkniętym naczyniu otrzymując 2-metylochinasolin-4-on **66** (Schemat 23) [33].



Schemat 23. Synteza chinazolin-4-onu **66**
Scheme 23. Synthesis of quinazolin-4-one **66**

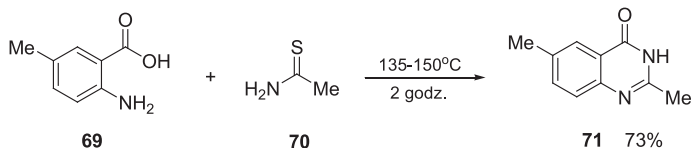
Chinazolin-4-ony **68** powstają także w czasie ogrzewania kwasu antranilowego **4** oraz iminoeteru **67**, co umożliwia prowadzenie reakcji w niższej temperaturze bez wpływu na wydajność (Schemat 24) [34].



R = Me, Bn, Cy, Ph, *i*-Pr, *t*-Bu, 2-Pirydył

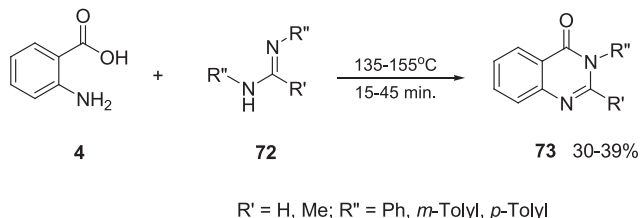
Schemat 24. Synteza chinazolin-4-onów **68**
Scheme 24. Synthesis of 4-quinazolinones **68**

Związek **71** powstał w reakcji kwasu 2-amino-5-metylobenzoesowego **69** z tioacetamidem **70**, którego użycie w miejsce acetamidu spowodowało skrócenie czasu reakcji z 4 do 2 godzin (Schemat 25) [35, 46].



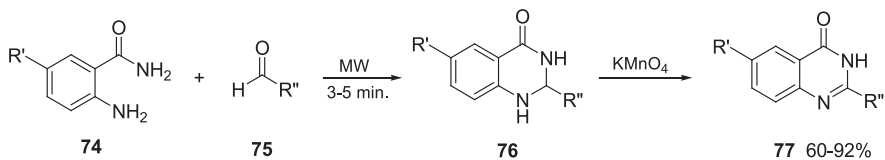
Schemat 25. Synteza chinazolin-4-onu **71**
Scheme 25. Synthesis of quinazolin-4-one **71**

Chinozalin-4-ony **73** tworzą się również w wyniku ogrzewania kwasu antranilowego **4** oraz amidyn **72**, co wprawdzie spowodowało skrócenie czasu reakcji do 15–45 minut, ale odbyło się to kosztem obniżenia wydajności (Schemat 26). W reakcji Niementowskiego wykorzystano również antranilan metylu **33**. Pozwoliło to na otrzymanie związków **73** z wyższą wydajnością (49–89%), ale wymagało to wydłużenia czasu reakcji do 90–180 minut i podwyższenia temperatury (200–230°C) [36].

Schemat 26. Synteza chinazolin-4-onów **73**Scheme 26. Synthesis of quinazolin-4-ones **73**

Reakcja aminobenzamidu z aldehydami

Wykazano, że chinazolin-4-ony **77** można otrzymać w reakcji Niementowskiego z wydajnością 60–92% z podstawionych 2-aminobenzamidów **74** oraz aldehydów **75**, ale wtedy konieczne jest dodatkowe utlenienie produktu pośredniego **76** (Schemat 27) [37].

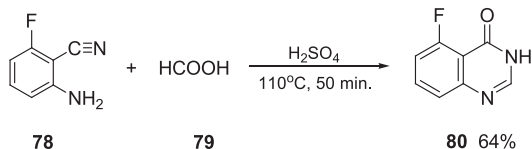
R' = H, Cl; R'' = H, Ph, *p*-Cl-Ph, *p*-Me-Ph, *p*-NO₂-PhSchemat 27. Synteza chinazolin-4-onów **77**Scheme 27. Synthesis of quinazolin-4-ones **77**

Zastosowanie jodu w jodku potasu jako odczynnika utleniającego przyczyniło się do wzrostu wydajności reakcji (84–98%) [47].

Reakcja aminobenzonitrylu z kwasem karboksylowym

Chinazolin-4-on **80** otrzymano w wyniku ogrzewania 2-aminobenzonitrylu **78** z kwasem mrówkowym w obecności kwasu siarkowego(VI) z wydajnością 64%

(Schemat 28) [28]. Wykorzystanie promieniowania mikrofalowego spowodowało skrócenie czasu reakcji do 5 minut nie obniżając wydajności [48].

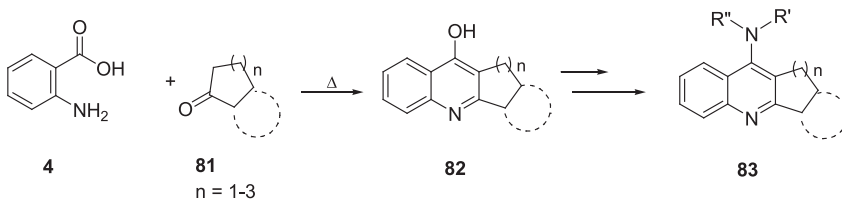


Schemat 28. Synteza chinazolin-4-onu **80**

Scheme 28. Synthesis of quinazolin-4-one **80**

3. ZASTOSOWANIA REAKCJI NIEMENTOWSKIEGO

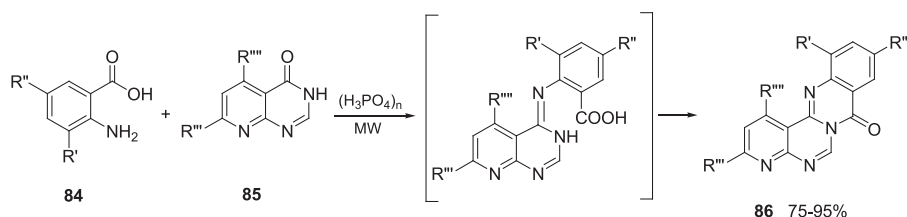
Reakcja Niementowskiego znalazła liczne zastosowania w syntezie związków o potencjalnej aktywności biologicznej zawierających heterocykliczne pierścienie skondensowane. Syntezę 2,3-polimetylenochinolin **83** (Schemat 29), które wykazują działanie pobudzające ośrodkowy układ nerwowy, tj. analeptyczne oraz przeciwhistaminowe, rozpoczyna kondensacja kwasu antranilowego **4** z cyklicznym ketonem **81**, co prowadzi do powstania 4-hydroksychinolin **82** (Schemat 29) [49].



Schemat 29. Synteza 2,3-polimetylenochinolin **83**

Scheme 29. Synthesis of 2,3-polymethylenochinolin **83**

W syntezie policyklicznych układów z pierścieniem chinazoliny **86**, strukturalnych analogów alkaloidów rutakarpiny i luotoniny A, wykorzystano reakcję pochodnej kwasu antranilowego **84** z pirydo[2,3-d]pirymidyną **85**, którą prowadzono w obecności kwasu polifosforowego stosując promieniowanie mikrofalowe (Schemat 30) [50].

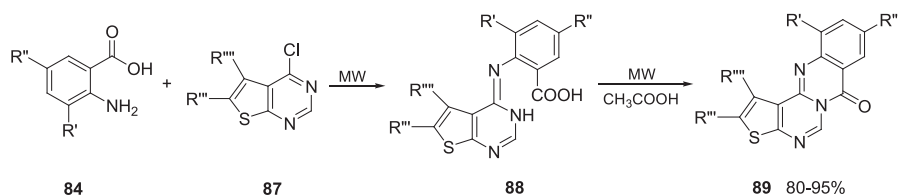


$R', R'' = \text{H, Br}; R''', R'''' = \text{aryl}$

Schemat 30. Synteza związków **86**

Scheme 30. Synthesis of compounds **86**

W podobny sposób z pochodnych kwasu antranilowego **84** i tieno[2,3-d]pirymidyn **87** powstały pośrednio związki **88**, które w warunkach reakcji łatwo ulegają wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji do układów poliheterocyklicznych **89** (Schemat 31) [51].

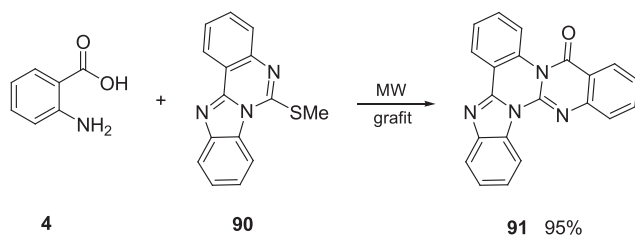


$R', R'' = \text{H, Br}; R'''' = \text{H, Me}; R''' = \text{H, Me, } n\text{-Bu, } p\text{-Cl-Ph, } p\text{-Me-Ph, } p\text{-MeO-Ph}$

Schemat 31. Synteza związków **89**

Scheme 31. Synthesis of compounds **89**

W reakcji kwasu antranilowego **4** z pochodną benzimido[1,2-c]chinazolin **90** powstaje związek **91** zawierający układ skondensowanych pierścieni heterocyklicznych (Schemat 32) [52]. Wykazano jego aktywność antyproliferacyjną wobec linii komórkowej mysiej białaczki L1210 [53].

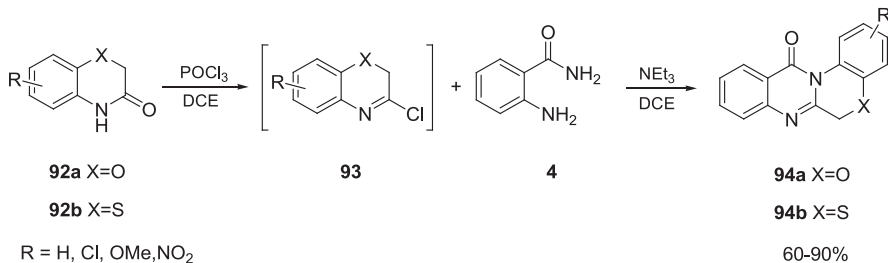


Schemat 32. Synteza związku **91**

Scheme 32. Synthesis of compound **91**

W syntezie chinazolinobenzoksazynonów **94a** oraz chinazolinobenzotiazyn **94b** wykorzystano cyklocondensację kwasu antranilowego **4** i związku **93**, który

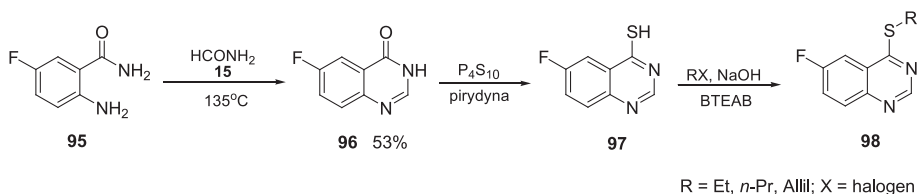
utworzył się w reakcji laktamów **92a-b** z tlenochlorkiem fosforu(V) (Schemat 33) [54].



Schemat 33. Synteza związków **94**

Scheme 33. Synthesis of compounds **94**

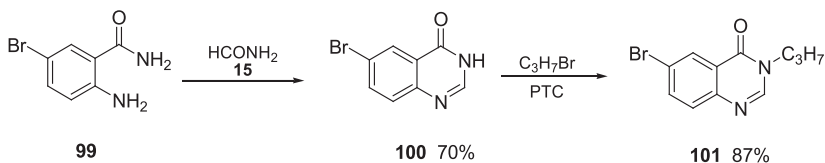
Serię fluorochinolinowych pochodnych **98** o aktywności przeciwgrzybiczej otrzymano wykorzystując kwas 5-fluoroantranilowy **95** oraz formamid **15**, z których najpierw utworzył się fluorochinazolinon **96** następnie przekształcony w fluorochinolinowe pochodne **98** z użyciem katalitycznych ilości bromku tribenzyletyloamoniowego (BTEAB) (Schemat 34) [55].



Schemat 34. Synteza chinazolin **98**

Scheme 34. Synthesis of quinazolines **98**

Chinazolin-4-on **101**, hamujący rozwój grzybów *Fusarium oxysporum*, *Gibberella zeae*, *Valsa mali*, zsyntetyzowano z kwasu 5-bromoantranilowego **99** i formamidu **15**, a utworzony pośrednio związek **100** poddano alkilowaniu w obecności katalizatora przeniesienia międzyfazowego (PTC) (Schemat 35) [56].

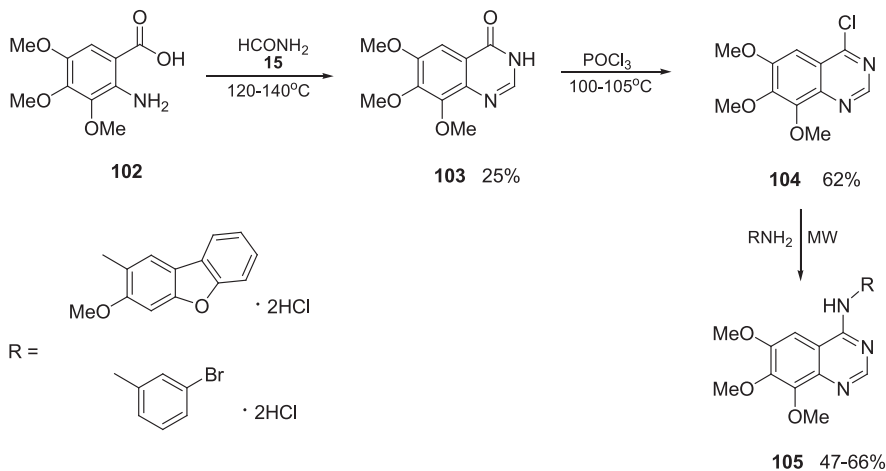


Schemat 35. Synteza chinazolin-4-onu **101**

Scheme 35. Synthesis of quinazolin-4-one **101**

W pierwszym etapie syntezy 4-aminochinazolin **105** wykazujących działanie antyproliferacyjne wobec linii komórkowych nowotworów prostaty, płuc, żołądka oraz macicy z pochodnej kwasu antranilowego **102** i formamidu **15** otrzymano pro-

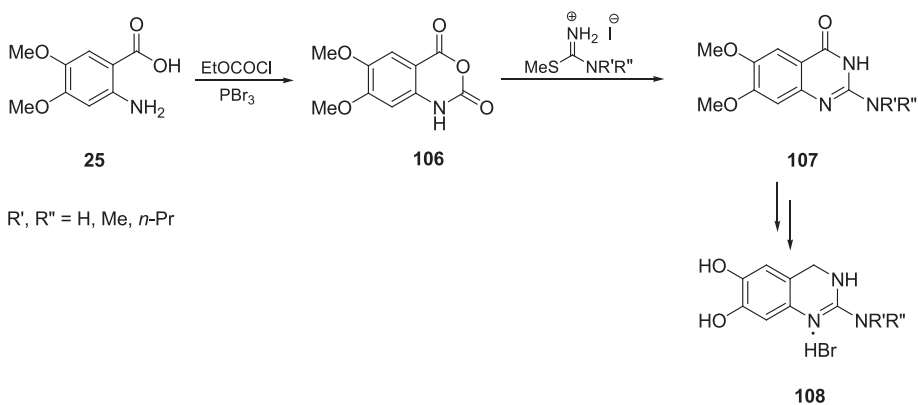
dukt pośredni **103**, który łatwo przekształcono w końcowe aminochinazoliny **105** (Schemat 36) [57].



Schemat 36. Synteza chinazoliny **105**

Scheme 36. Synthesis of quinazolines **105**

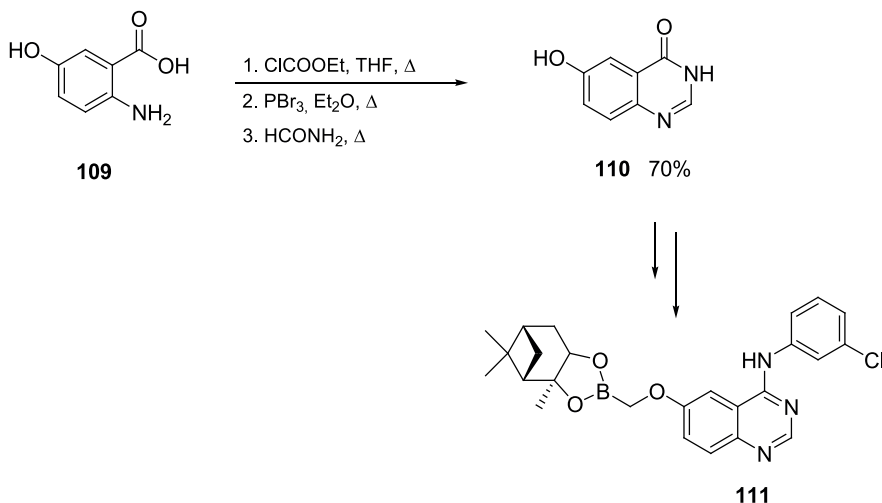
W syntezie związków **108**, potencjalnych agonistów dopaminy, w pierwszym etapie pochodną kwasu antranilowego **25** poddano reakcji z chloromrówczanem etylu w obecności bromku fosforu(III) otrzymując pochodną bezwodnika izatynowego **106**, z której powstały chinazolin-4-ony **107** (Schemat 37) [58].



Schemat 37. Synteza chinazoliny **108**

Scheme 37. Synthesis of quinazolines **108**

Analogiczną sekwencję przemian wykorzystano w celu otrzymania chinazolin-4-onu **110**, produktu pośredniego w syntezie 4-aminochinazoliny **111**, inhibitora kinazy tyrozynowej receptora naskórkowego czynnika wzrostu (Schemat 38) [59].

Schemat 38. Synteza chinazoliny **111**Scheme 38. Synthesis of quinazoline **111**

PODSUMOWANIE

W reakcji Niementowskiego wykorzystywany jest kwas antranilowy ulegający kondensacji ze związkiem karbonylowym albo amidem. Pojedyncze przykłady syntez opisane u schyłku XIX wieku stały się przedmiotem dalszych badań w wielu ośrodkach naukowych. W literaturze opisane są liczne ich modyfikacje, kwas antranilowy zastąpiono: *o*-aminobenzoesanem metylu, kwasem *o*-nitrobenzoesowym, *o*-acyloaminobenzamidem, *o*-aminobenzamidem, *o*-aminobenzonitrylem, bezwodnikiem kwasu izatynowego, benzoksazyonem, a zamiast amidów użyto: aminę, nitryl, iminoeter, tioamid, amidynę, aldehyd, kwas karboksylowy. Zastosowanie dowolnych amidów umożliwia otrzymanie strukturalnie zróżnicowanych 2,3-dwupodstawionych chinazolin-4-onów. Zmieniono również warunki reakcji w celu zwiększenia wydajności oraz skrócenia czasu. Największe sukcesy osiągnięto stosując promieniowanie mikrofalowe. Zainteresowanie wykorzystaniem reakcji Niementowskiego wynika przede wszystkim z potencjalnej aktywności biologicznej związków heterocyklicznych, które dość łatwo tworzą się w jej wyniku, ponieważ pierścienie chinoliny i chinazoliny występują w wielu naturalnych i syntetycznych alkaloidach oraz substancjach leczniczych.

PODZIĘKOWANIE

Praca realizowana w ramach badań statutowych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (502-34-030).

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] S. Madapa, Z. Tusi, S. Batra, *Curr. Org. Chem.*, 2008, **12**, 1116.
- [2] R. Kharb, H. Kaur, *Int. Res. Pharm.*, 2013, **4**, 63.
- [3] Y.M. Al-Hiari, I.S. Al-Mazari, A.K. Shakya, R.M. Darwish, R. Abu-Dahab, *Molecules*, 2007, **12**, 1240.
- [4] R. Arora, A. Kapoor, N.S. Gill, A.C. Rana, *Int. Res. J. Pharm.*, 2011, **12**, 22.
- [5] L. He, H. Li, J. Chen, X.-F. Wu, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 12065.
- [6] M.I. El-Gamal, M.A. Khan, M.S. Abdel-Maksoud, M.M.G El-Din, Ch.-H. Oh, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **87**, 484.
- [7] M.V.N. de Souza, K.C. Pais, C.R. Kaiser, M.A. Peralta, M. de L. Ferreira, M.C.S. Lourenço, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 1474.
- [8] S.S. Laddha, S.G. Wadodkar, S.K. Meghal, *Arkivoc*, 2006, **xi**, 1.
- [9] R.S. Giri, H.M. Thaker, T. Giordano, J. Williams, D. Rogers, V. Sudersanam, K.K. Vasu, *Eur. J. Med. Chem.*, 2009, **44**, 2184.
- [10] R. Musiol, M. Serda, S. Hensel-Bielowka, J. Polanski, *Curr. Med. Chem.*, 2010, **17**, 1960.
- [11] G.V.R. Sharma, A.R. Robert, *Int. J. Adv. Pharm. Biol. Chem.*, 2012, **3**, 337.
- [12] J.P. Michael, *Nat. Prod. Rep.*, 2002, **19**, 742.
- [13] S.B. Mhaske, N.P. Argade, *Tetrahedron*, 2006, **62**, 9787.
- [14] S. Niementowski, *Ber.*, 1894, **27**, 1394.
- [15] S. von Niementowski, B. Orzechowski, *Ber.*, 1895, **28**, 2809.
- [16] Z.H. Skraup, *Monatsh. Chem.*, 1880, **1**, 316.
- [17] Z.H. Skraup, *Monatsh. Chem.* 1881, **2**, 139.
- [18] P. Friedländer, *Ber.*, 1882, **15**, 2572.
- [19] J.J. Li, *Name Reaction for Heterocyclic Chemistry II*, John Wiley and Sons, NY, 2011, s. 377.
- [20] S. Niementowski, *J. Prakt. Chem.*, 1895, 564.
- [21] V.S. Patel, S.R. Patel, *J. Indian Chem. Soc.*, 1965, **42**, 531.
- [22] M. Rosini, A. Antonello, A. Cavalli, M.L. Bolognesi, A. Minarini, G. Marucci, E. Poggesi, A. Leonardi, C. Melchiorre, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 4895.
- [23] R.J. Chong, M.A. Siddiqui, V. Snieckus, *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 5323.
- [24] M.-X. Wang, Y. Liu, Z.-T. Huang, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 2553.
- [25] J.F. Meyer, E.C. Wagner, *J. Org. Chem.*, 1943, **8**, 239.
- [26] S.K. Kundu, M.P.D. Mahindaratne, M.V. Quintero, A. Bao, G.R. Negrete, *Arkivoc*, 2008, **ii**, 33.
- [27] Y. Kabri, A. Gellis, P. Vanelle, *Green Chem.*, 2009, **11**, 201.
- [28] A.A. Layeva, E.V. Nosova, G.N. Lipunova, T.V. Trashakhova, V.N. Chaurushin, *Russ. Chem. Bull.*, 2007, **56**, 1821.
- [29] R.H. Clark, E.C. Wagner, *J. Org. Chem.*, 1944, **9**, 55.
- [30] M.T. Bogert, V.J. Chambers, *J. Am. Chem. Soc.*, 1905, **27**, 649.
- [31] J.-F. Liu, J. Lee, A.M. Dalton, G. Bi, L. Yu, C.M. Baldino, E. McElory, M. Brown, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 1241.
- [32] A.R. Khosropour, I. Mohammadpoor-Baltork, H. Ghorbankhani, *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 3561.
- [33] M.T. Bogert, A.H. Gotthelf, *J. Am. Chem. Soc.*, 1900, **22**, 129.
- [34] D.J. Connolly, P.J. Guiry, *Synlett*, 2001, **26**, 1707.
- [35] S.-L. Cao, Y.-P. Feng, Y.-Y. Jiang, S.-Y. Liu, G.-Y. Ding, R.-T. Li, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, **75**, 1915.
- [36] J.F. Meyer, E.C. Wagner, *J. Org. Chem.*, 1943, **8**, 239.
- [37] M. Bakavoli, O. Sabzevari, M. Rahimizadeh, *Chin. Chem. Lett.*, 2007, **18**, 1466.

- [38] F.-R. Alexandre, A. Berecibar, T. Besson, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 3911.
- [39] F.-R. Alexander, A. Berecibar, R. Wrigglesworth, T. Besson, *Tetrahedron*, 2003, **59**, 1413.
- [40] F. Li, Y. Feng, Q. Meng, W. Li, Z. Li, Q. Wang, F. Tao, *Arkivoc*, 2007, **i**, 40.
- [41] Y. Seimille, M.E. Phelps, J. Czernin, D.H.S. Silverman, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 2005, **48**, 829.
- [42] A. Gazit, J. Chen, H. App, G. McMahon, P. Hirth, I. Chen, A. Levitzki, *Bioorg. Med. Chem.*, 1996, **4**, 1203.
- [43] L. Örfi, F. Wączek, J. Pató, I. Varga, B. Hegymegi-Barakonyi, R.A. Houghten, G. Kéri, *Curr. Med. Chem.*, 2004, **11**, 2549.
- [44] A.R. Desai, K.R. Desai, *Arkivoc*, 2005, **xiii**, 98.
- [45] F. Gellibert, M.-H. Fouchet, V.-L. Nguyen, R. Wang, G. Krysa, A.-C. de Gouville, S. Huet, N. Dodic, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, **19**, 2277.
- [46] S.M. Roopan, T. Maiyalagan, F.N. Khan, *Can. J. Chem.*, 2008, **86**, 1019.
- [47] M. Bakavoli, A. Shiri, Z. Ebrahimpour, M. Rahimizadeh, *Chin. Chem. Lett.*, 2008, **19**, 1403.
- [48] R. Saari, J.-C. Törma, T. Neavalainen, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, **19**, 939.
- [49] J.J. Li, *Name Reaction for Heterocyclic Chemistry II*, John Wiley and Sons, NY, 2011, s. 381.
- [50] S.S. Laddha, S.P. Bhatnagar, *Arkivoc*, 2007, **xvi**, 1.
- [51] S.S. Laddha, S.P. Bhatnagar, *Arkivoc*, 2008, **xvii**, 212.
- [52] M. Soukri, G. Guillaumet, T. Besson, D. Aziane, M. Aadil, E.M. Essassi, M. Akssira, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 5857.
- [53] V. Bénéteau, T. Besson, J. Guillard, S. Léonce, B. Pfeiffer, *Eur. J. Med. Chem.*, 1999, **33**, 1053.
- [54] C.V. Reddy Sastry, K. Srinivasa Rao, V.S.H. Krishnan, K. Rastogi, M.L. Jain, *Synthesis*, 1998, 336.
- [55] G.-F. Xu, B.-A. Song, P.S. Bhadury, S. Yang, P.-Q. Zhang, L.-H. Jin, W. Xue, D.-Y. Hu, P. Lu, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, **15**, 3768.
- [56] G. Ouyang, P. Zhang, G. Xu, B. Song, S. Yang, L. Jin, W. Xue, D. Hu, P. Lu, Z. Chen, *Molecules*, 2006, **11**, 383.
- [57] G. Liu, D.-Y. Hu, L.-H. Jin, B.-A. Song, S. Yang, P.-S. Liu, P.S. Bhadury, Y. Ma, H. Luo, X. Zhou, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, **15**, 6608.
- [58] J.A. Grosso, D.E. Nichols, J.D. Kohli, D. Glock, *J. Med. Chem.*, 1982, **25**, 703.
- [59] H.S. Ban, T. Usui, W. Nabeyama, H. Morita, K. Fukuzawa, H. Nakamura, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 4415.

Praca wpłynęła do Redakcji 1 kwietnia 2015

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

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

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 pamięci
Ernesta Aleksandra Syma (1893–1950) – polskiego biochemika,
enzymologa z okazji 85-lecia katalizy enzymatycznej lipazami*

Abstract

Wprowadzenie

1. Procesy katalizowane przez lipazę B z *Candida antarctica* (CAL-B)
2. Procesy katalizowane przez lipazę z *Burkholderia cepacia* (BCL)

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

Lipases (EC 3.1.1.3; triacylglycerol acylhydrolases) are the most commonly used enzymes in biotransformations of organic compounds. In living organisms lipases catalyze hydrolysis of higher fatty acid esters of glycerol, thus fulfill an essential function in metabolism of lipids (e.g. fats and oils) and lipoproteins. This year marks 125 years since J.R. Green has identified and described the first lipase isolated from germinated castor-oil beans (*Ricinus communis* L.) in the form of an extract showing hydrolytic properties. Plants, as well as bacteria are able to produce lipases what was reported in 1901 by Dutch scientist – Christiaan Eijkman. Lipases are also produced by fungi, yeasts, and various organs of higher organisms.

A strong foundation, which had a huge impact on the development of global lipase-mediated biotransformations was the discovery made in 1935 and described in *Biochemistry Journal* and *Biochemische Zeitschrift* by Polish biochemist-enzymologist Ernest Alexander Sym (1893-1950) that these enzymes retain almost full catalytic activity even in nearly anhydrous organic solvents. This was exactly fifty years before Russian chemist Alexander Klibanov in 1985 described a lipase-catalyzed reaction carried out in organic solvents. Since that moment, lipases have become extremely popular in both academic and industrial usage, nowadays being the most important among all biocatalysts used in biochemical processes carried out on an industrial scale.

The purpose of this article is to provide a brief characterization of the two most widely used in industrial biotransformations lipases – lipase B from *Candida antarctica* (CAL-B) and lipase from *Burkholderia cepacia* (BCL) – and familiarize the readers with the issues of biotechnological processes catalyzed by them. The specifics of a range of industrial applications based on lipase catalysis, including the chemical, pharmaceutical, cosmetic and food industries are also discussed.

Keywords: lipases, *Candida antarctica* lipase B (CAL-B), *Burkholderia cepacia* lipase (BCL), industrial applications, biocatalysis, enantiomerically pure compounds

Słowa kluczowe: lipazy, lipaza B *Candida antarctica* (CAL-B), lipaza *Burkholderia cepacia* (BCL), zastosowania przemysłowe, biokataliza, związki enancjomerycznie czyste

WPROWADZENIE

Pierwsze udokumentowane zastosowanie procesów biotechnologicznych miało miejsce ok. 5000 lat temu, kiedy to na obszarach bliskiego wschodu i w Egipcie wykorzystywano mikroorganizmy do różnego rodzaju fermentacji spożywczych, w tym m.in. w piekarnictwie, w serowarstwie, browarnictwie oraz przy produkcji alkoholu [1]. Natomiast pierwsze świadome zastosowanie procesów biotransformacji miało miejsce w 1823 roku, kiedy użyto bakterii kwasu octowego z rodzaju *Acetobacter* zaadsorbowanych na złożu wiórów bukowych w przemysłowej produkcji octu metodą Schützenbacha [2]. Od tamtej pory nastąpiło wiele zmian, począwszy od technik selekcji i hodowli mikroorganizmów oraz izolacji i oczyszczania enzymów, a skończywszy na chemicznych lub genetycznych modyfikacjach, służących poprawie nie tylko ich właściwości katalitycznych, ale również zwiększeniu stabilności w warunkach procesowych [3–9].

Jednymi z najczęściej wykorzystywanych enzymów w biotransformacjach są lipazy (EC 3.1.1.3; acylohydrolazy triacylogliceroli). W tym roku mija 125 lat od czasu gdy J. R. Green zidentyfikował oraz opisał pierwszą lipazę w postaci ekstraktu o hydrolitycznych właściwościach, wydzielonego z kiełkujących nasion rącznika pospolitego (*Ricinus communis* L.) [10]. Jak się później okazało, zdolność produkowania lipaz posiadają nie tylko rośliny, ale również bakterie, o czym doniósł w 1901 roku holenderski mikrobiolog Christiaan Eijkman [10]. Lipazy wytwarzane są również przez grzyby, drożdże, a także poszczególne organy organizmów wyższych, dzięki czemu szacuje się, że obecnie na rynku dostępnych jest w sprzedaży około 70 preparatów lipaz [12–15].

Omawiając początki biokatalizy z udziałem lipaz nie sposób również nie wspomnieć o Ernestie Alexandre Teofilu Symie (1893–1950) (Rys. 1) [16–20].



Rysunek 1. Ernest Alexander Teofil Sym (1893–1950)

Figure 1. Ernest Alexander Teofil Sym (1893–1950)

Zdumiewające jest, iż postać tego wybitnego przedwojennego polskiego biochemika-enzymologa została prawie całkowicie zapomniana, a informacja, że był on światowym pionierem badań nad katalizą enzymatyczną w układach niewodnych oraz w syntezie organicznej, nie dociera do świadomości społeczności nauko-

Pierwsze zastosowanie przemysłowe biotransformacji związków hydrofobowych, nierozpuszczalnych w wodzie z użyciem lipaz datuje się na rok 1980. W tym czasie koncern *Unilever* zaczął produkcję masła kakaowego z użyciem 1,3-specyficznych lipaz izolowanych z *Aspergillus niger* oraz *Rhizopus japonicus* [27]. Podobnym wielkotonażowym procesem interestryfikacji tłuszczów, w tym między innymi oleju palmowego kwasem stearynowym z zastosowaniem tych samych enzymów, trudniła się od 1981 roku firma *Fuji Oil, Co Ltd.* [28]. Datą przełomową dla rozkwitu biotransformacji syntetycznych związków organicznych okazał się rok 1985, kiedy to rosyjski chemik Alexander Klibanov stwierdził (a tak naprawdę jedynie przypomniał po Ernieście Symie), że enzymy wykazują aktywność katalityczną również w środowisku rozpuszczalników organicznych, posiadając tym samym użyteczne działanie w systemach niewodnych [29]. Wkrótce po tym, w roku 1988 dochodzi do powstania instalacji przemysłowej w koncernie *Sumitomo* do produkcji enancjomerycznie czystych 4-hydroksy-2-cyklopentanonów w procesie enzymatycznej hydrolizy ich estrów [30]. Z kolei pierwszą na skalę przemysłową transestryfikację triacylogliceroli z użyciem krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, katalizowaną 1,3-specyficzną lipazą pochodzenia grzybowego z *Mucor miehei*, wdrożyła w roku 1990 firma *Unilever* [31].

W ostatnim 25-leciu technologie z udziałem lipaz [32–35] koncentrują się wyraźnie na obszarach produkcji małotonażowej i na syntezie związków wysoko-specjalistycznych oraz drogich, wymagających szczególnej czystości, a więc wszędzie tam gdzie nie ma konkurencji ze strony metod wielkoprzemysłowej syntezy organicznej. Poniżej zaprezentowano przykłady przemysłowych biotransformacji z użyciem dwóch najczęściej stosowanych lipaz - lipazy B z *Candida antarctica* (CAL-B) oraz lipazy z *Burkholderia cepacia* (BCL).

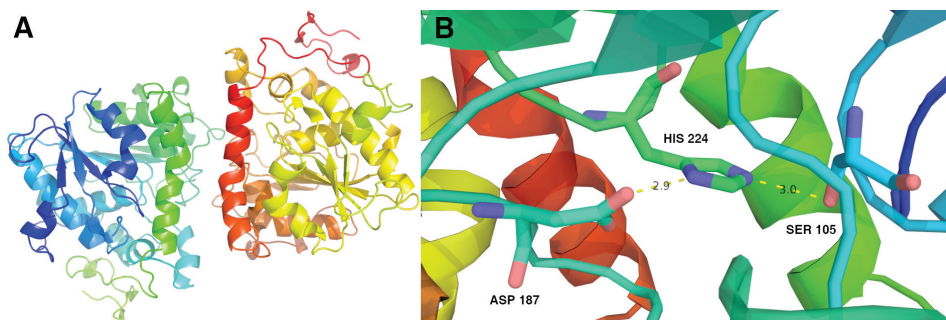
1. PROCESY KATALIZOWANE PRZEZ LIPAZĘ B Z *CANDIDA ANTARCTICA* (CAL-B)

Lipaza B izolowana z grzyba *Candida antarctica* (CAL-B), odkrytego w latach 60-tych XX w. w słonych wodach jeziora Vanda położonego w Dolinie Wrighta na Antarktydzie, jest jak do tej pory najczęściej stosowanym enzymem w procesach biokatalitycznych zarówno w skali laboratoryjnej jak również małotonażowej. Ogromna ilość pozycji książkowych, publikacji naukowych oraz patentów świadczy dobitnie o użyteczności oraz wszechstronności tego biokatalizatora szczególnie w reakcjach transestryfikacji/hydrolizy racemicznych mieszanin odpowiednio: (alkoholi i amin)/(estrów oraz amidów) [36–38]. CAL-B należy do rodziny enzymów posiadającej strukturę fałdowania α/β -hydrolaz serynowych o masie cząsteczkowej 33 kDa, punkcie izoelektrycznym pI 6,0 oraz optimum pH 7,0. W roztworach wodnych lipaza ta zachowuje pełną stabilność w szerokim zakresie pH 3,5–9,5 oraz w wysokiej temperaturze (50–60°C), utrzymując nawet 15% swej maksymalnej aktywności powyżej temperatury 70°C. Wyznaczona z wysoką roz-

dzielczością (1,55 Å) w roku 1994 przez Uppenberg i in. [39, 40] krystaliczna struktura CAL-B (Rys. 3) wykazała, iż składa się ona z 317 aminokwasów oraz posiada centrum aktywne zawierające następującą triadę katalityczną: Asp 187, His 224 oraz Ser 105. Kieszeń wiążąca substrat ma „charakter acylowy” i zbudowana jest z bardzo dużej oraz średniej przestrzeni wnękowej umożliwiającej pomieszczenie drugorzędowych alkoholi/amin z odpowiednio małym oraz bardzo dużym podstawnikiem zlokalizowanym po obu stronach centrum stereogenicznego substratu. W odróżnieniu od większości lipaz, CAL-B posiada bardzo małe „wieczko” (krótką α -helikalną strukturę), które z racji na ograniczoną możliwość przesłaniania centrum aktywnego powoduje, iż enzym ten praktycznie w ogóle nie potrzebuje aktywacji międzyfazowej by móc katalizować reakcje [41, 42], toteż doskonale nadaje się do pracy w czystych rozpuszczalnikach organicznych. Dostęp do wnętrza kieszeni aktywnej dla substratów i rozpuszczalników możliwy jest poprzez wąski kanał zbudowany z hydrofobowych aminokwasów.

Obecnie uważa się, że CAL-B jest najbardziej uniwersalnym enzymem, przejawiającym wysoką aktywność katalityczną oraz selektywność wobec zróżnicowanej strukturalnie puli substratów organicznych. W handlu lipaza B z *Candida antarctica* występuje najczęściej w postaci immobilizowanej pod odpowiednią nazwą Novozym 435, Novozyme 435 lub Novozyme SP 435 – w zależności od mikroorganizmu (*Aspergillus niger* lub *Aspergillus oryzae*), w którym przeprowadza się klonowanie oraz ekspresję białka enzymatycznego. Preparaty te, sprzedawane przez firmę *Novo Nordisk A/S* (obecnie *Novozymes A/S*) przygotowywane są na bazie CAL-B immobilizowanej w sposób fizyczny na wyprodukowanej przez firmę *Bayer* makroporowatej żywicy poli(metylo-metaakrylano-diwinyllobenzenowej) (Lewatit VP OC 1600*), posiadającej odpowiednio średnie wartości wielkości cząstek z zakresu 315–1000 μm , pola powierzchni wynoszące 130 $\text{m}^2 \times \text{g}^{-1}$ oraz średnicę porów o długości 150 Å. Tak przygotowane immobilizaty lipaz charakteryzują się bardzo dużą stabilnością w warunkach procesowych, wynikającą głównie z odporności mechanicznej wobec naprężeń ścinających w płynie towarzyszących intensywnemu mieszaniu, a także ze względu na małą wrażliwość na wysokie temperatury, zmienne pH środowiska reakcji oraz stosowane rozpuszczalniki organiczne.

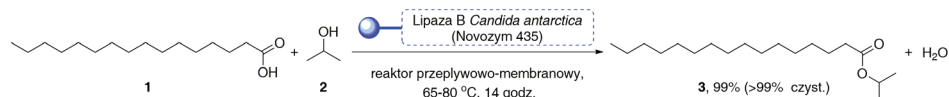
W niniejszym przeglądzie przedstawiono w skrócie jedynie kilka najważniejszych zastosowań tej lipazy jako katalizatora stosowanego w procesach otrzymywania substancji chemicznych o wysokiej wartości dodanej, których skala produkcyjna nie przekracza kilkuset kilogramów.



Rysunek 3. (A) Struktura 3D lipazy B z *Candida antarctica* (PDB ID: 1TCA). (B) Ułożenie przestrzenne reszt aminokwasowych (AK) wchodzących w skład tzw. „triady katalitycznej” (Asp 187, His 224, Ser 105) należącej do centrum aktywnego CAL-B (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 B from *Candida antarctica* (PDB ID: 1TCA). (B) The spatial orientation of the amino acid (AAs) residues in the so-called “catalytic triad” (Asp 187, His 224, Ser 105) belonging to the active-site of CAL-B (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

Holenderska *UNICHEMA Chemie BV* była pierwszą firmą, która opracowała w skali przemysłowej [3,1 M (800 g×litr⁻¹)] chemoenzymatyczną syntezę cennego surowca kosmetycznego – palmitynianu izopropylu (**3**, Schemat 1) – stosowanego w produkcji mydeł, pianek, pomadek oraz kremów do skóry [43]. Reakcją pomiędzy kwasem palmitynowym (**1**) a 2-propanolem (**2**) prowadzono w reaktorze przepływowo-membranowym o działaniu okresowym z użyciem Novozymu 435. Powstającą w trakcie reakcji wodę usuwano w postaci azeotropu (alkohol/H₂O) pod ciśnieniem 0,26 bar. W wyniku tego procesu uzyskiwano produkt **3** o czystości >99% wg GC z praktycznie ilościową wydajnością (99%) w relatywnie krótkim czasie (14 godz.).

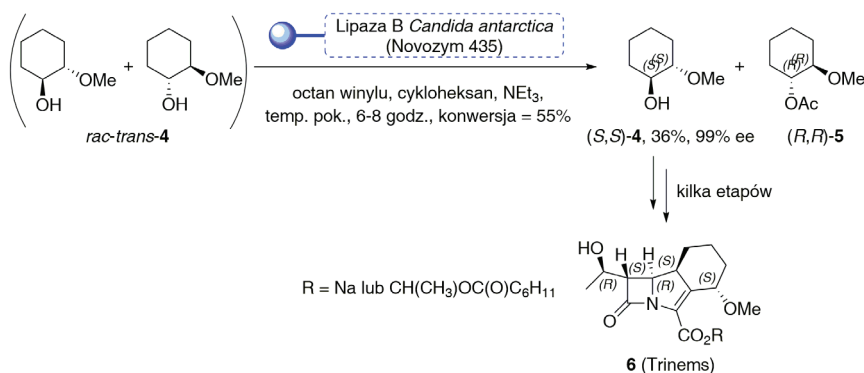


Schemat 1. Chemoenzymatyczna synteza palmitynianu izopropylu (**3**) katalizowana lipazą B z *Candida antarctica* (Novozym 435)

Scheme 1. Chemoenzymatic synthesis of isopropyl palmitate (**3**) catalyzed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435)

Bardzo wydajna procedura otrzymywania w skali przemysłowej (1*S*,2*S*)-*trans*-2-metoksycykloheksanolu [(*S,S*)-**4**] (Schemat 2) – prekursora w syntezie antybiotyków β-laktamowych **6** (Trinems) została opracowana w firmie *Glaxo Wellcome plc*. [44]. Kluczowym etapem syntezy jest rozdział kinetyczny racemicznego alkoholu *rac-trans*-**4** za pomocą octanu winylu oraz Novozymu 435 jako katalizatora z dodatkiem trietyloaminy. W tak zaprojektowanych warunkach optycznie czynny alkohol

(*S,S*)-**4** otrzymano z przeciętną wydajnością 36%, ale za to z bardzo wysoką czystością enancjomeryczną (99% ee) w czasie 6–8 godzin. Dodatkowo, wybór cykloheksanu jako rozpuszczalnika okazał się bardzo istotny, nie tylko ze względu na optymalne dopasowanie tego medium do zastosowanej lipazy, ale również z uwagi na możliwość selektywnej ekstrakcji otrzymanych produktów. Co ważne, pozwoliło to wyeliminować etap rozdzielania mieszaniny reakcyjnej za pomocą chromatografii. Stężenie racemicznego substratu *rac-trans*-**4** wynosiło 1,4 M (182 g×litr⁻¹), a użyty immobilizowany enzym wykazywał dużą stabilność procesową, zachowując ponad połowę swojej aktywności katalitycznej nawet po 9 cyklach reakcyjnych.

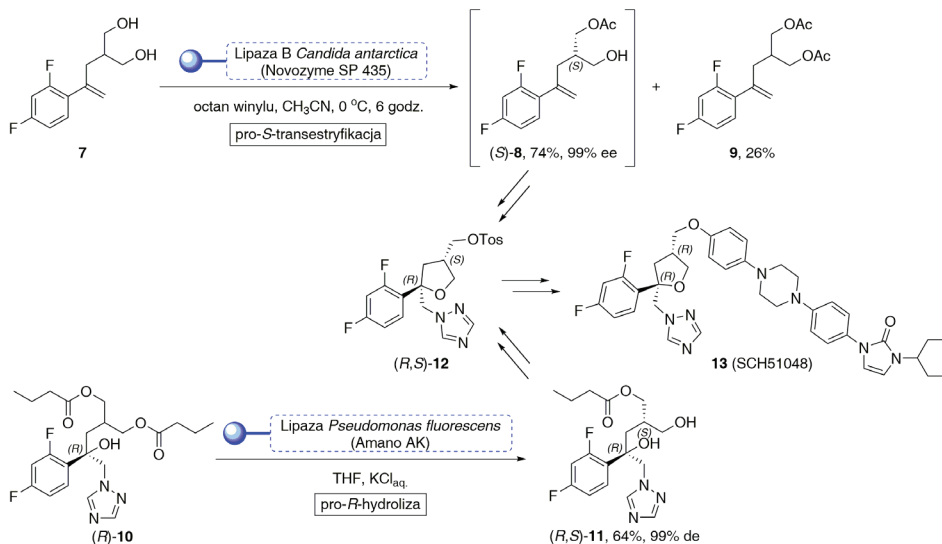


Schemat 2. Chemoenzymatyczna synteza tricyklicznych antybiotyków β -laktamowych **6** (Trinemms) katalizowana Novozymem 435

Scheme 2. Chemoenzymatic synthesis of tricyclic β -lactam antibiotics **6** (Trinemms) catalyzed by Novozym 435

Z kolei technolodzy z firmy *Schering-Plough* opracowali enzymatyczną desymetryzację prochiralnego 2-podstawionego-1,3-propanodiolu (**7**) – kluczowego półproduktu w syntezie przeciwrzybicznego preparatu **13** o handlowej nazwie SCH51048 [45, 46]. Związek **13** jest pochodną posakonazolu oraz itrakonazolu i podobnie jak one posiada udowodnioną aktywność biologiczną wykorzystywaną w leczeniu systemowych kandydoz wywołanych drożdżakami z rodzaju *Candida* oraz infekcji oddechowych wywołanych grzybami z rodzaju *Aspergillus*. Obecnie znajduje się w II fazie badań klinicznych. Na Schemacie 3 zaprezentowano dwie metody syntezy: (i) enzymatyczną desymetryzację odpowiedniej pochodnej diestrowej (*R*)-**10** oraz (ii) desymetryzację prochiralnego diolu **7**. W obu przypadkach tworzy się nieracemiczna pochodna (*R,S*)-**12**, która następnie transformowana jest w pożądaną chemoterapeutykę **13** w szeregu prostych reakcji. Desymetryzację nieracemicznego dimaślanu (*R*)-**10** przeprowadzono stosując immobilizowaną lipazę *Pseudomonas fluorescens* (lipazę Amano AK) zawieszoną w mieszaninie wodnego roztworu chlorku potasu i tetrahydrofuranu, otrzymując odpowiedni monomaślan (*R,S*)-**11** z dobrą wydajnością (64%) oraz z bardzo wysokim nadmiarem diastereoizomerycznym (99% de). Dużo szybszą i prostszą metodą okazała się ta, w której *mezo* diol **7** estryfikowano pro-*S*-selektywnie za pomocą octanu winylu i Novo-

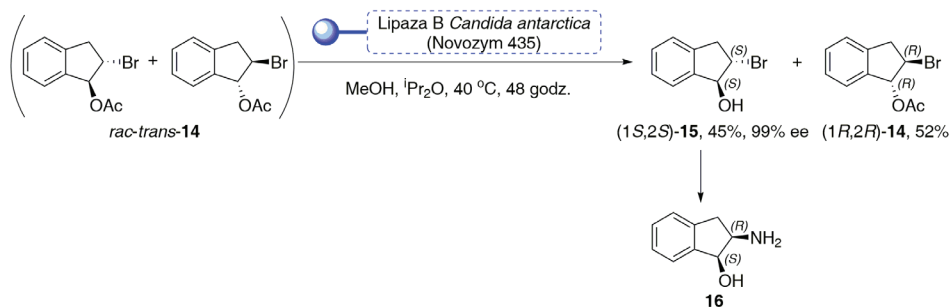
zymu 435. Wydajność otrzymanego w ten sposób monoocetanu (*S*)-**8** wyniosła 74%, a czystość enancjomeryczna 99% ee. Ponieważ kolejny etap syntezy – cyklizacja (*S*)-**8** – prowadzony był w acetonitrylu, enzymatyczną hydrolizę z udziałem lipazy CAL-B przeprowadzono w tym samym rozpuszczalniku, dzięki czemu proces mógł być kontynuowany bez wydzielania produktu pośredniego. Stężenie użytego diolu **7** wynosiło 0,876 M ($200 \text{ g} \cdot \text{litr}^{-1}$), a podana wielkość szarzy procesu: 30 kg substratu **7** w 150 litrach acetonitrylu. W tych warunkach możliwe było 6-krotne wykorzystanie biokatalizatora bez obserwowalnych spadków efektywności jego działania.



Schemat 3. Chemoenzymatyczna synteza przeciwwirycznego chemoterapeutyku **13** (SCH51048) katalizowana Novozymem 435

Scheme 3. Chemoenzymatic synthesis of antifungal agent **13** (SCH51048) catalyzed by Novozym 435

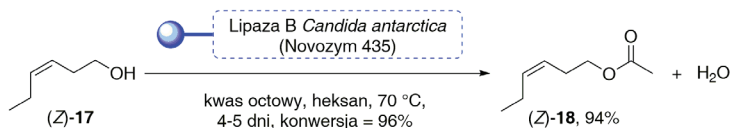
Kolejnym przykładem zastosowania lipazy B z *Candida antarctica* jest realizowana przez *Ichikawa Gosei Kagaku Co., Japan* synteza enancjomerycznie czystego (1*S*,2*S*)-*trans*-2-bromoindan-1-olu [(1*S*,2*S*)-**15**] (Schemat 4) [47]. Związek ten jest kluczowym półproduktem w syntezie *cis*-1-aminoindan-2-olu (**16**) – farmaceutycznie czynnego składnika leków antyretrowirusowych stosowanych w leczeniu wirusowego zespołu nabytego braku odporności (AIDS). Substratem w tym procesie jest racemiczny *trans*-2-bromo-1-(acetoksy)indan (*rac-trans*-**14**), który poddaje się enancjoselektywnej metanolizie katalizowanej Novozymem 435 zawieszonym w 2-propanolu. Optycznie czynny alkohol (1*S*,2*S*)-**15** o bardzo wysokiej czystości enancjomerycznej wynoszącej 99% ee otrzymywano z wydajnością 45%. Nieprzereagowany ester (1*R*,2*R*)-**14** odzyskiwano z wydajnością 52%.



Schemat 4. Rozdział kinetyczny racemicznego *trans*-2-bromo-1-(acetoksy)indanu (*rac-trans*-14) katalizowany Novozymem 435

Scheme 4. Kinetic resolution of racemic *trans*-2-bromo-1-(acetoxyl)indan (*rac-trans*-14) catalyzed by Novozym 435

Octan (*Z*)-3-heksen-1-ylu [(*Z*)-18] jest surowcem zapachowym o świeżej zielonej nucie, stosowanym jako dodatek do żywności lub w przemyśle kosmetycznym jako składnik bazy zapachowej. Opracowaniem jego przemysłowej syntezy z użyciem lipazy B z *Candida antarctica* zajął się zespół francuskich naukowców we współpracy z firmą *Naturex* (Schemat 5) [48]. Opisali oni efektywną syntezę tego surowca w skali półtechnicznej używając 5 kg (*Z*)-3-heksen-1-olu [(*Z*)-17] ($1,5 \text{ mol} \times \text{litr}^{-1}$), równomolowej ilości kwasu octowego oraz Novozymu 435 zawieszzonego w suchym *n*-heksanie. Reakcję prowadzono w temperaturze 70°C z ciągłym oddestylowywaniem tworzącej się wody, co pozwoliło otrzymać pożądaný ester (*Z*)-18 z bardzo wysoką 94% wydajnością. Użyty w tych warunkach enzym zachowywał pełną aktywność katalityczną przez 7 cykli reakcyjnych.

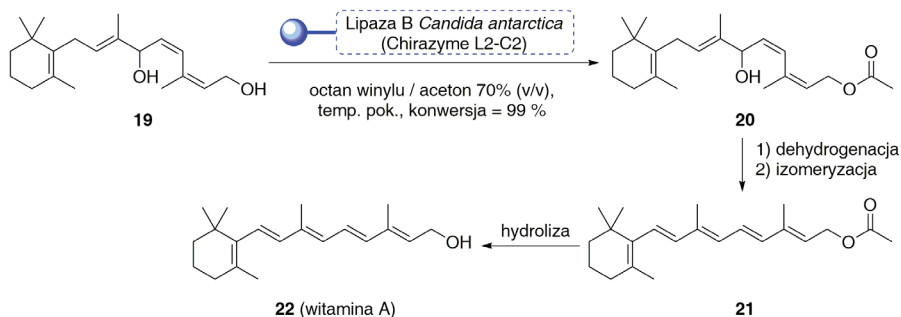


Schemat 5. Estryfikacja (*Z*)-3-heksen-1-olu [(*Z*)-17] kwasem octowym w obecności Novozymu 435

Scheme 5. Direct esterification of (*Z*)-3-hexen-1-ol [(*Z*)-17] with acetic acid in the presence of Novozym 435

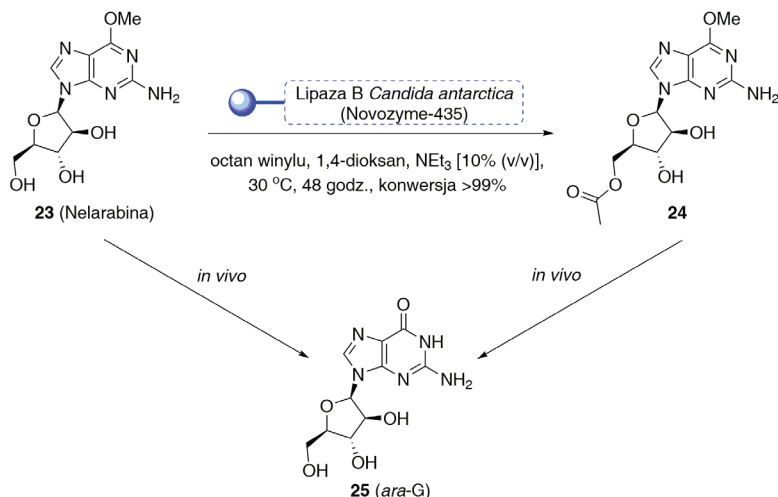
Inny immobilizowany preparat CAL-B (Chirazyme L2-C2) okazał się użytecznym katalizatorem w przemysłowej produkcji retinolu (**22**, witaminy A) realizowanej przez szwajcarską firmę *Hoffmann la Roche* od przeszło 16 lat (Schemat 6) [49, 50]. W procesie katalizowanej enzymatycznie transestryfikacji (2*Z*,4*Z*,7*E*)-3,7-dimetylo-9-(2,6,6-trimetylocykloheks-1-enylo)nona-2,4,7-trieno-1,6-diolu (**19**) stosowany jest octan winylu jako donor grupy acetylowej oraz aceton jako rozpuszczalnik. W przeciwieństwie do chemicznej estryfikacji, metoda enzymatyczna daje nie tylko bardzo wysoką selektywność (97%) acylowania **19** do odpowiedniego monoestru **20**, ale również bardzo wysoką konwersję substratu (99%). Jedyną wadą tego procesu jest mała szybkość reakcji, albowiem regioselektywna transestryfikacja

1,4 kg diolu **19** zajmuje aż 74 dni. Proces prowadzony jest w temperaturze pokojowej, co obniża koszty. Tak przygotowany półprodukt **20** (1,6 kg/szarżę) poddawany jest następnie odwodnieniu, izomeryzacji oraz hydrolizie, w rezultacie których otrzymywana jest ostatecznie witamina A (**22**).



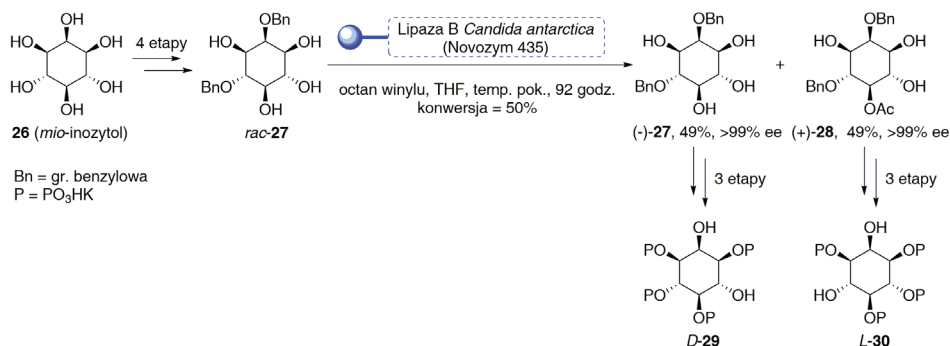
Schemat 6. Chemoenzymatyczna synteza retinolu (**22**, witaminy A) katalizowana Chirazymem L2-C2
 Scheme 6. Chemoenzymatic synthesis of retinol (**22**, vitamin A) catalyzed by Chirazymem L2-C2

Bardzo ciekawe przemysłowe zastosowanie immobilizowanej CAL-B (Novozym-435) w procesie selektywnego acetylowania leku przeciwnowotworowego – nelarabiny (**23**) – stosowanego w leczeniu niektórych odmian białaczek, opracował koncern farmaceutyczny *Glaxo Wellcome* (Schemat 7) [51]. Dzięki temu prostemu, bardzo selektywnemu oraz wydajnemu procesowi firma ta wprowadziła na rynek acetylową pochodną związku **23**, będącą znanym pro-lekiem antybiałaczkowej *ara-G* (**25**, 9- β -D-arabino-furanozylo guaniny). Za pomocą uzyskanej modyfikacji strukturalnej nelarabiny (**23**) osiągnięto znaczną poprawę jej rozpuszczalności w różnych mediach, co zwiększyło biodostępność leku oraz jego aktywność biologiczną. Dodatkowo, otrzymanie 5'-monoacetylowej pochodnej **24** przyczyniło się do lepszego poznania metabolizmu wcześniej odkrytego pro-leku **23** i co najważniejsze udowodniono dzięki temu, że zarówno nelarabina (**23**) jak również jej acetylowa pochodna **24** biotransformowane są *in vivo* do tej samej farmakologicznie aktywnej postaci leku, czyli *ara-G* (**25**). Spośród wielu przetestowanych enzymów zdecydowanie najlepszym okazał się wyżej wspomniany Novozym-435, który katalizował reakcję transestryfikacji użytej w stężeniu 50 g/litr nelarabiny (**23**) octanem winylu selektywnie w pozycji 5'-OH, z konwersjami substratu powyżej 99%. Niestety, zwiększenie stężenia **23** do 100 g/litr negatywnie wpłynęło na konwersję, obniżając jej wartość do 60–70%. Dobór optymalnych warunków katalizowanego Novozymem-435 acetylowania nelarabiny (**23**) pozwolił ograniczyć ilość zanieczyszczeń (3'-mono- oraz 5',3'-di-octanu) do mniej niż 0,5%.



Schemat 7. Regioselektywna transestryfikacja nelarabiny (**23**) octanem winylu katalizowana Novozyme-435
Scheme 7. Regioselective transesterification of nelarabin (**23**) with vinyl acetate catalyzed by Novozyme-435

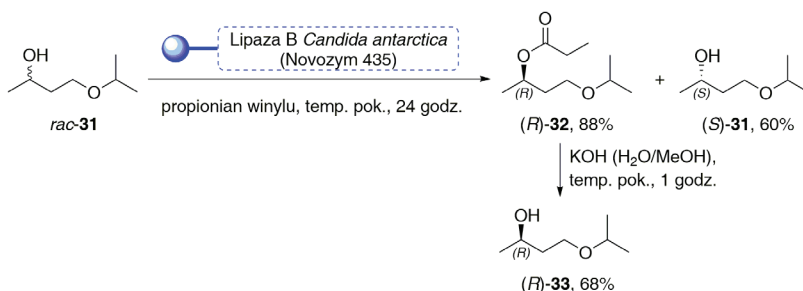
Innym przykładem użyteczności oraz wszechstronności katalizy enzymatycznej jest chemoenzymatyczny proces otrzymywania obu enancjomerów 1,3,4,5-tetrakisfosforanu *mio*-inozytolu (*D*-**29** oraz *L*-**30**) opracowany przez technologów ze szwajcarskiej firmy *Novartis Pharma AG* (Schemat 8) [52]. W kluczowym dla całego procesu etapie enzymatycznym użycie CAL-B (Novozym 435) i octanu winylu jako donora grupy acetylowej oraz tetrahydrofuranu jako rozpuszczalnika, pozwoliło uzyskać doskonały rozdział kinetyczny benzylovej pochodnej *mio*-inozytolu *rac*-**27**. Dzięki temu otrzymano odpowiedni monoester (+)-**28** oraz nieprzereagowany polialkohol (-)-**27** w postaci enancjomerycznie czystej (>99% ee) z praktycznie ilościowymi wydajnościami dla konwersji równej 50%.



Schemat 8. Chemoenzymatyczna synteza *D*-1,3,4,5-tetrakisfosforanu *mio*-inozytolu (*D*-**29**) oraz *L*-1,3,4,5-tetrakisfosforanu *mio*-inozytolu (*L*-**30**) z wykorzystaniem Novozymu 435

Scheme 8. Chemoenzymatic synthesis of *D*-*myo*-inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate (*D*-**29**) and *L*-*myo*-inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate (*L*-**30**) by using Novozym 435

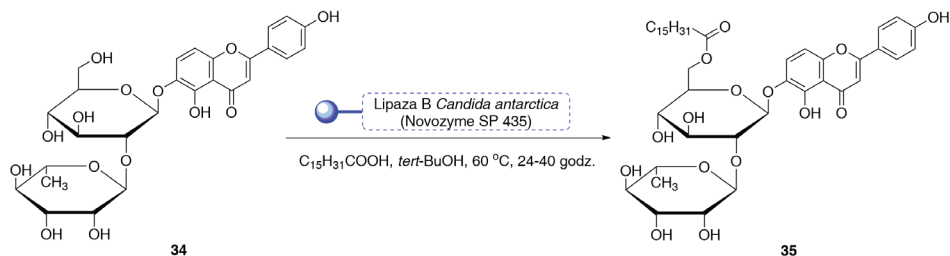
Kolejnym przykładem wykorzystania CAL-B (Novozym 435) jest przemysłowa metoda otrzymywania optycznie czynnego (2*R*)-4-(propan-2-yloksy)butan-2-olu [(*R*)-**33**] (Schemat 9) [53]. Jego synteza wykorzystująca rozdział kinetyczny racemicznego alkoholu *rac*-**31** z użyciem propionianu winylu opracowana została przez japońską firmę *Mitsubishi Gas Chemical Company*, a otrzymywany dzięki niej enancjomer (*R*)-**33** wykorzystywany jest do produkcji optycznie czynnych ciekłych kryształów.



Schemat 9. Rozdział kinetyczny racemicznego 4-(propan-2-yloksy)butan-2-olu (*rac*-**31**) katalizowany Novozymem 435

Scheme 9. Kinetic resolution of racemic 4-(propan-2-yloxy)butan-2-ol (*rac*-**31**) catalyzed by Novozym 435

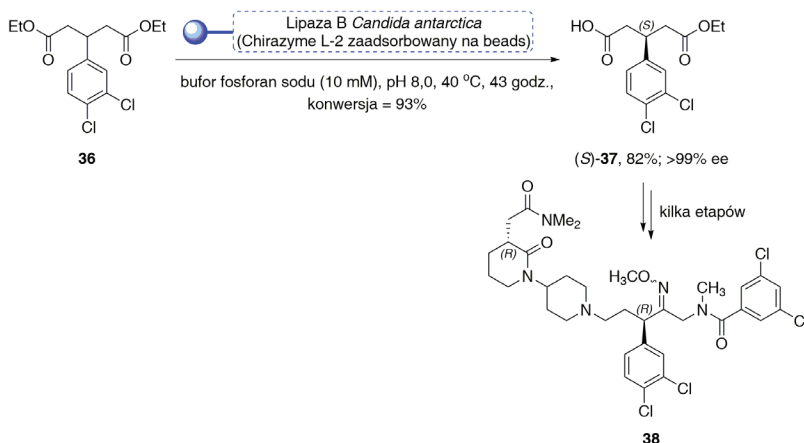
Inny preparat immobilizowanej CAL-B (Novozym SP 435) został zastosowany przez firmę *Henkel* do regioselektywnej estryfikacji glikozydu izoflawonu **34** kwasami tłuszczowymi (Schemat 10) [54]. Glikozyd **34** ze względu na swoje silne właściwości anty-utleniające, chroniące żywe komórki przed działaniem m.in. wolnych rodników, jest bardzo często stosowany w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym oraz jako dodatek do żywności. Niestety przenikanie glikozydu izoflawonolowego **34** przez błony biologiczne jest ograniczone, toteż funkcjonalizacja jego struktury celem zwiększenia lipofilowości cząsteczki jest jak najbardziej pożądana. Opracowana chemoenzymatyczna metoda syntezy jego estru z kwasem heksadekanowym (palmitynowym) **35** nie tylko poprawiła biodostępność wyjściowego związku **34**, ale dodatkowo pozwoliła wykazać, że pochodna **35** posiada potencjalne właściwości hamujące aktywność proteaz serynowych występujących w skórze właściwej oraz pozytywnie wpływa na produkcję kolagenu. To sprawia, że produkowany ester **35** stanowi doskonały surowiec kosmetyczny o działaniu zapobiegającym powstawaniu zmarszczek mimicznych oraz wiotczeniu skóry. Ponadto warty uwagi jest fakt, iż mimo że węglowodany nie należą do naturalnych substratów hydrolaz triacylogliceroli, to lipaza CAL-B okazała się bardzo efektywnym katalizatorem reakcji bezpośredniej estryfikacji glikozydu **34** kwasem heksadekanowym, gwarantując przy tym wysoce regioselektywne przekształcenie pierwszorzędowej grupy hydroksylowej w biotransformowanej cząsteczce substratu.



Schemat 10. Regioselektywna estryfikacja glikozydu izoflawonolowego **34** za pomocą kwasu palmitynowego katalizowana Novozyme SP 435

Scheme 10. Regioselective esterification of isoflavone glycoside **34** with palmitic acid catalyzed by Novozyme SP 435

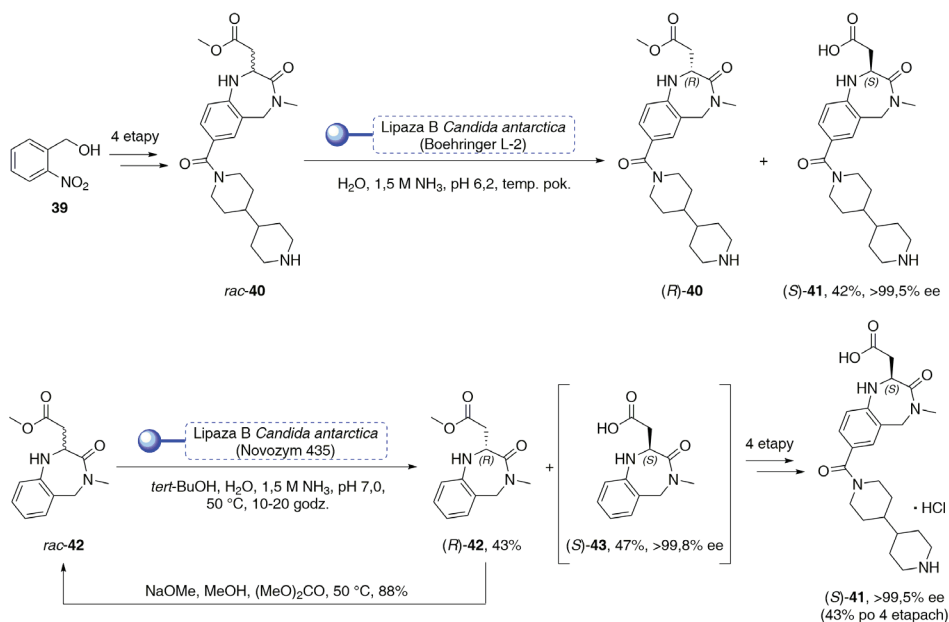
Walory CAL-B immobilizowanej na makroporowatej żywicy (tzw. *beads*) o zastrzeżonym składzie, sprzedawanej pod handlową nazwą Chirazyme L-2 przez firmę *Boehringer Mannheim*, dostrzeżono w firmie *Schering-Plough* (Schemat 11) [55]. Opracowana przez nich przemysłowa procedura desymetryzacji diestru etylowego kwasu 3-(3',4'-dichlorofenylo)glutarowego (**36**) w warunkach enzymatycznej hydrolizy w wodnym roztworze buforowym pozwoliła otrzymać enancjomerycznie czysty monoester (*S*)-**37** (>99% ee) z bardzo wysoką 82% wydajnością w relatywnie łagodnych warunkach (40°C). Synteza tego związku prowadzona była w skali 50 kg użytego substratu **36** przy jego stężeniu 100 g/litr. W jednej szarży trwającej 43 godziny otrzymywano 75,2 kg (*S*)-**37**, a w ciągu trzech szarż średnio 200 kg. Otrzymywany w ten sposób nieracemiczny produkt pośredni (*S*)-**37** służy do dalszej syntezy chiralnego związku **38** o charakterze dualnego antagonisty ludzkich receptorów tachikininowych (neurokinin NK1/NK2). Dzięki tej właściwości związek **38**, znajdujący się obecnie w fazie badań klinicznych, może być potencjalnie stosowany w leczeniu przewlekłych schorzeń, m.in. astmy, obturacyjnych skurczy oskrzeli, artretyzmu, a także migreny.



Schemat 11. Chemoenzymatyczna synteza dualnego antagonisty **38** ludzkich neurokinin (NK1/NK2) katalizowana Chirazymem L-2

Scheme 11. Chemoenzymatic synthesis of dual human neurokinin (NK1/NK2) antagonist **38** catalyzed by Chirazyme L-2

W międzynarodowym koncernie *GlaxoSmithKline Pharmaceuticals* opracowano chemoenzymatyczną syntezę chlorowodoru lotrafibanu [(*S*)-**41**] – aktywnego doustnie antagonisty receptora fibrynogenu GPIIb/IIIa stosowanego w profilaktyce i leczeniu żylnych chorób zakrzepowo-zatorowych (Schemat 12) [56–58]. Bezpośrednim powodem opracowania enzymatycznej metody syntezy tego leku była chęć wyeliminowania newralgicznego etapu chemicznego, podczas którego dochodziło do znacznej utraty czystości enancjomerycznej kluczowego chiralnego 1,4-benzodiazepinowego półproduktu, następującej w wyniku racemizacji katalizowanej przez tworzący się *in situ* wolny jon fluorkowy. O ile w skali laboratoryjnej było w pełni możliwe selektywne zaadsorbowanie wydzielającego się fluorowodoru przez sita molekularne 3 Å i zapobieganie tym samym racemizacji, o tyle w skali pilotażowej (>50 kg) nie zdołano rozwiązać tego problemu. Ponadto, zastosowanie sit molekularnych w skali laboratoryjnej powodowało znaczne straty wydajności, gdyż w zeolicie zostawało za dużo uwięzionego produktu. Alternatywne próby doczyszczenia tego związku przez wielokrotną krystalizację nie przyniosły oczekiwanych rezultatów.



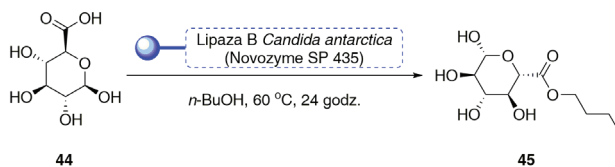
Schemat 12. Chemoenzymatyczna synteza optycznie czynnego lotrafibanu [(S)-41] katalizowana przez Novozym 435

Scheme 12. Chemoenzymatic synthesis of optically active lotrafiban [(S)-41] catalyzed by Novozym 435

Dopiero zastosowanie katalizy enzymatycznej z udziałem CAL-B w postaci dwóch różnych handlowo dostępnych immobilizatów (Boehringer L-2 oraz Novozym 435) i dwóch różnych metod (Schemat 12), zakończyło się sukcesem. W pierwszej metodzie, wychodząc z alkoholu 2-nitrobenzylowego **39**, otrzymano w 4-etapowej syntezie racemiczny ester *rac*-**40**, który następnie poddawano hydrolytycznemu rozdziałowi kinetycznemu katalizowanego lipazą Boehringer L-2 w ciełym amoniaku. Pomimo, iż czystość enancjomeryczna uzyskanego w ten sposób lotrafibanu [(S)-**41**] w postaci wolnej aminy była bardzo wysoka (>99,5% ee), a łagodne warunki reakcji umożliwiały ponad 100-krotne użycie enzymu, to jednak całkowita wydajność procesu była niesatysfakcjonująca. Pełny sukces komercyjny stał się możliwy dzięki zastosowaniu enzymatycznego rozdziału kinetycznego na wcześniejszym etapie syntezy wraz z jednoczesnym powtórnym wykorzystaniem nieprzereagowanego estru (R)-**42**. W wyniku zastosowania katalizowanej przez Novozym 435 enancjoselektywnej hydrolizy 246 kg racemicznego estru *rac*-**42** otrzymano enancjomerycznie czysty kwas (S)-**43** (>99,8% ee) z wydajnością 47% oraz nieprzereagowany ester (R)-**42** z wydajnością 43%. Traktując odpadowy ester (R)-**42** metanolanem sodu racemizowano go do wyjściowego *rac*-**42** z wysoką 88% wydajnością. W dalszych etapach syntezy prowadzono szereg typowych reakcji chemicznych, w tym między innymi regioselektywne jodowanie (61%), aminokarbonylowanie katalizowane palladem (86%), redukcję wodorem na palladzie (87%) oraz chlorowodorowanie

(94%), w wyniku których otrzymywano farmaceutycznie czynny nieracemiczny produkt (S)-**41** w postaci chlorowodoru z całkowitą wydajnością 20%.

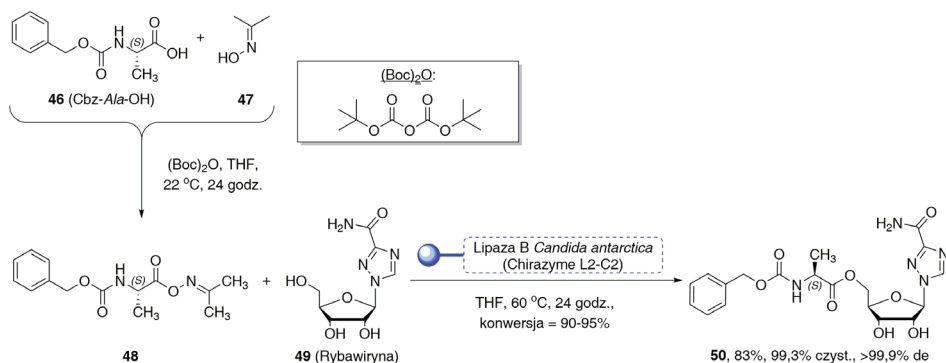
Immobilizowaną CAL-B (Novozyme SP 435) zastosowano również podczas przemysłowej produkcji estrów pochodnych kwasu uronowego (Schemat 13) [59]. Patent firmy *Cognis Deutschland GmbH & Co* przedstawia prosty proces estryfikacji kwasu *D*-(-)-galakturonowego (**44**) *n*-butanolem katalizowany CAL-B w temperaturze 60°C. Otrzymywany w ciągu 24 godzin ester butylowy kwasu (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5,6-tetrahydroksyoksano-2-karboksylowego (**45**) posiada właściwości powierzchniowo czynne i przeciwbakteryjne oraz stosowany jest jako surfaktant i/lub emulsyfikator przy produkcji kosmetyków.



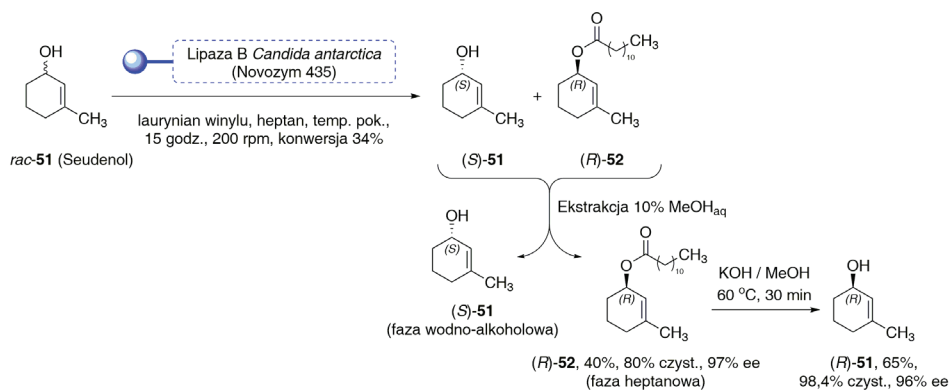
Schemat 13. Estryfikacja kwasu *D*-(-)-galakturonowego (**44**) *n*-butanolem w obecności Novozyme SP 435

Scheme 13. Esterification of *D*-(-)-galacturonic acid (**44**) with *n*-butanol in the presence of Novozyme SP 435

Kolejnym doskonałym przykładem przemysłowego wykorzystania CAL-B jest regioselektywne acylowanie rybawiryny (**49**) – leku przeciwwirusowego stosowanego w ciężkich zakażeniach wirusem RSV oraz wirusem HCV (Schemat 14) [60]. Koncern *Schering-Plough* jako pierwszy zdecydował się na zastosowanie procesu biokatalitycznego celem otrzymania odpowiedniej diastereizomerycznej pochodnej o charakterze pro-leku rybawiryny (**50**). Związek ten produkowany jest obecnie w ilości 82 kg w czterech szarżach ze średnią wydajnością każdej z nich wynoszącą 83%. Użycie lipazy Chirazyme L2-C2 zawieszanej w bezwodnym tetrahydrofuranie pozwala na regioselektywne acylowanie wyłącznie grupy 5'-OH rybawiryny (**49**) *O*-(*N*-benzyloksykarbonylo-*L*-alanylo)acetoksymem (**48**). Proces ten prowadzony w 60°C przez 24 godziny pozwala na uzyskanie 90–95% przereagowania substratu **49** w produkt **50** o nadmiarze diastereoizomerycznym >99,9%.

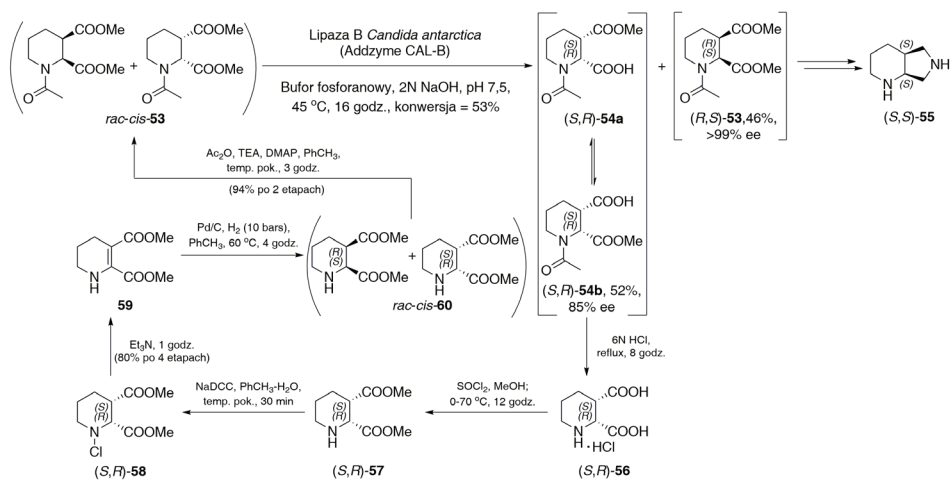
Schemat 14. Regioselektywne acylowanie rybawiryny (**49**) katalizowane lipazą Chirazyme L2-C2Scheme 14. Regioselective acylation of ribavirin (**49**) catalyzed by lipase Chirazyme L2-C2

Z kolei francuska firma *Organon S.A.* opracowała bardzo praktyczną i ekonomicznie opłacalną enzymatyczną metodę otrzymywania enancjomerycznie wzbogaconego (*R*)-seudenolu [(*R*)-**51**] – feromonu agregacyjnego kornikowatego chrząszcza *Dendroctonus pseudotsugae* (Schemat 15) [61]. Zastosowanie immobilizowanej CAL-B (Novozym 435) w reakcji transestryfikacji racemicznego alkoholu *rac*-**51** laurynianem winylu, nie tylko pozwoliło na enancjoselektywne rozdzielenie stereoizomerów *rac*-**51** w warunkach kontroli kinetycznej, ale również na skuteczne wydzielenie czystych produktów za pomocą zwykłej ekstrakcji z zastosowaniem 10% wodnego roztworu metanolu. Dzięki wyeliminowaniu procedury oczyszczania przy użyciu technik chromatograficznych, proces mógł być z powodzeniem powiększony do skali siedmiokilogramowej.

Schemat 15. Chemoenzymatyczna synteza (*R*)-seudenolu [(*R*)-**51**] katalizowana przez Novozym 435Scheme 15. Chemoenzymatic synthesis of (*R*)-seudenol [(*R*)-**51**] catalyzed by Novozym 435

Innym przykładem zastosowania lipazy B z *Candida antarctica* (Addzyme CAL-B) jest synteza (4*aS*,7*aS*)-oktahydro-1*H*-pirolo[3,4-*b*]pirydyny [(*S,S*)-**55**] – związku wykorzystywanego do produkcji moksyflokscyny (Schemat 16) – chemo-

terapeutyku z grupy fluorochinolonów, zaburzających replikację DNA bakterii [62]. Kluczowy w syntezie tego leku ester dimetylowy kwasu (2*S*,3*R*)-acetylopiperidyno-2,3-dikarboksylowego [(*R,S*)-**53**] otrzymywany jest z wydajnością 46% w postaci enancjomerycznie czystej (>99% ee) na drodze kinetycznego rozdzielania racemicznego diestru *rac-cis*-**53** katalizowanego przez Addzyme CAL-B rozpuszczonego w mieszaninie buforu fosforanowego oraz wodorotlenku sodu. Proces prowadzony jest w skali 80 gramowej użytego substratu *rac-cis*-**53** w 45°C przez 16 godz. do momentu osiągnięcia 53% konwersji. Pomimo, iż odzysk zastosowanej lipazy jest nie możliwy, to i tak biorąc pod uwagę 8-krotną oszczędność czasu (16 godz. zamiast 140 godz.) oraz koszt jej zakupu w porównaniu z immobilizowanym preparatem CAL-B, przewaga zaprojektowanej wielkolaboratoryjnej syntezy jest dość znaczna. Dodatkowo, zbędny rotamer (*S,R*)-**54a**/*(S,R)*-**54b** izolowany z wydajnością 52% oraz 85% ee przekształcany jest w 6-etapowej procedurze z użyciem tanich odczynników ponownie do *rac-cis*-**53** z łączną wydajnością wynoszącą 75%.

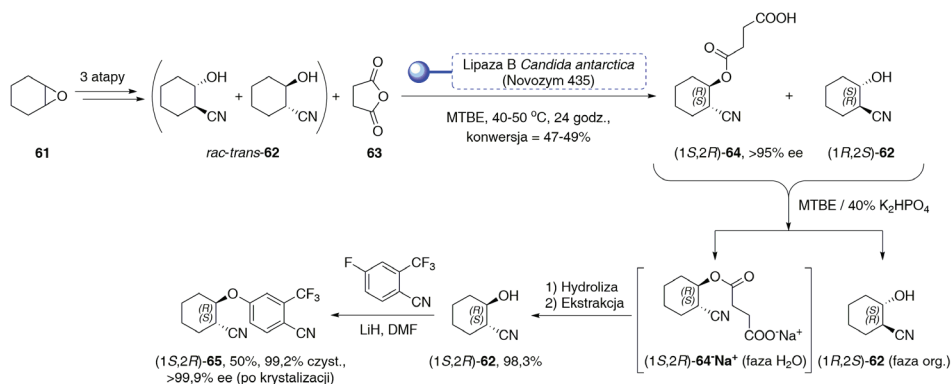


Schemat 16. Chemoenzymatyczna synteza (4*aS*,7*aS*)-oktahydro-1*H*-pirolo[3,4-*b*]pirydyny [(*S,S*)-**55**] katalizowana przez Addzyme CAL-B

Scheme 16. Chemoenzymatic synthesis of (4*aS*,7*aS*)-octahydro-1*H*-pyrolo[3,4-*b*]pyridine [(*S,S*)-**55**] catalyzed by Addzyme CAL-B

Lipaza CAL-B znalazła również zastosowanie w przemysłowej produkcji 4-[(1*R*,2*S*)-2-cyjanocykloheksyloksy]-2-(trifluorometylo)benzonitrylu [(1*S*,2*R*)-**65**] (Schemat 17) – antagonisty receptora androgenowego stosowanego w profilaktyce i leczeniu łysienia typu męskiego oraz tzw. łysienia plackowatego [63]. Firma *Pfizer Inc.* zastosowała jako substrat racemiczny *trans*-2-hydroksycykloheksanokarbonitryl (*rac-trans*-**62**) otrzymywany z tlenku cykloheksenu (**61**) na drodze prostej trzy etapowej syntezy. Rozdział kinetyczny kluczowej cyjanohydryny *rac-trans*-**62** z użyciem bezwodnika kwasu bursztynowego (dihydrofurano-2,5-dionu) (**63**) katalizowany Novozymem 435 pozwolił na selektywne otrzymanie hemibursztynianu

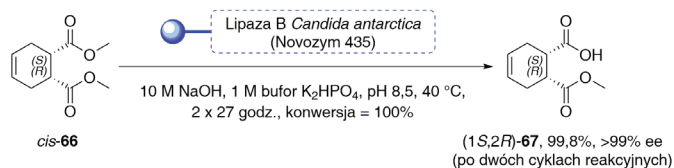
(1*S*,2*R*)-**64** o bardzo wysokim nadmiarze enancjomerycznym (>95% ee). Co więcej, związek ten (1*S*,2*R*)-**64** wydzielano w praktyczny i efektywny sposób za pomocą prostej ekstrakcji z użyciem zasadowego 40% wodnego roztworu wodorofosforanu(V) dipotasu. Następnie, po doprowadzeniu pH roztworu do odczynu kwaśnego, izolowany półprodukt (1*S*,2*R*)-**64** poddawano hydrolizie oraz ekstrakcji rozcieńczonym kwasem solnym, otrzymując (1*S*,2*R*)-**62** z bardzo wysoką wydajnością (>98%), by wykorzystać go w kolejnym etapie jako czynnik nukleofilowy w reakcji substytucji 4-fluoro-2-(trifluorometylo)benzonitrylu. Finalny produkt (1*S*,2*R*)-**65** krystalizowano kilkakrotnie, uzyskując związek enancjomerycznie czysty (>99,9% ee) z wydajnością 50% oraz czystością sięgającą 99,2% według GC.



Schemat 17. Chemoenzymatyczna synteza antagonisty receptora androgenowego (1*S*,2*R*)-**65** z użyciem Novozymu 435

Scheme 17. Chemoenzymatic synthesis of androgen receptor antagonist (1*S*,2*R*)-**65** catalyzed by Novozym 435

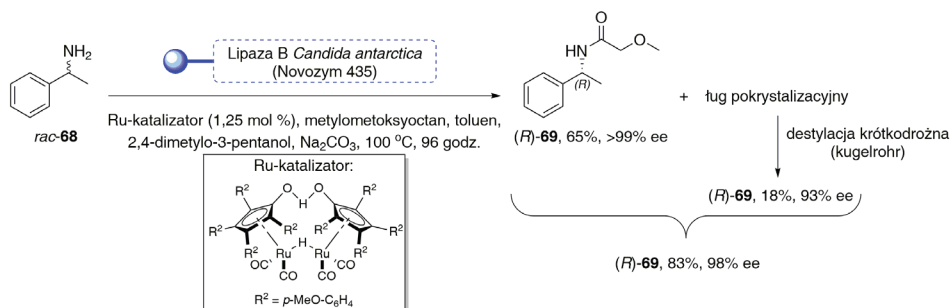
Immobilizowana CAL-B (Novozym 435) została wykorzystana przez *Bristol-Myers Squibb* w przemysłowej metodzie otrzymywania chiralnego nieracemicznego monoestru kwasu (1*S*,2*R*)-2-(metoksykarbonylo)cykloheks-4-en-1-karboksylowego [(1*S*,2*R*)-**67**] – półproduktu w syntezie potencjalnego leku – modulatora receptora chemokinowego (Schemat 18) [64]. Stereoselektywną desymetryzację komercyjnie dostępnego diestru *cis*-**66** przeprowadzono za pomocą 10 M wodnego roztworu wodorotlenku sodu w 1 M roztworze buforu (wodorofosforanu dipotowego) w obecności wyżej wymienionej lipazy. Zoptymalizowana biokatalityczna procedura pozwoliła praktycznie w sposób ilościowy (99,8%) z 3,42 kg diestru *cis*-**66** otrzymać 3,15 kg enancjomerycznie czysty monoester (1*S*,2*R*)-**67** (>99% ee).



Schemat 18. Stereoselektywna desymetryzacja dimetylo cykloheks-4-en-*cis*-1,2-dikarboksylanu (*cis*-**66**) katalizowana Novozymem 435

Scheme 18. Stereoselective desymmetrization of dimethyl cyclohex-4-en-*cis*-1,2-dicarboxylate (*cis*-**66**) catalyzed by Novozym 435

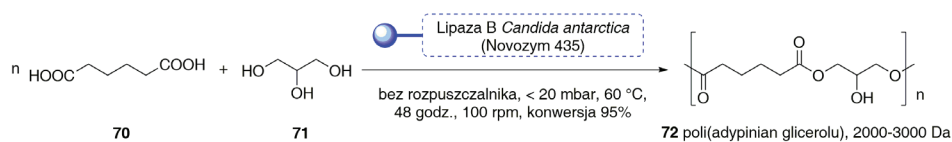
Z kolei, Bäckvall i współpracownicy z Uniwersytetu Sztokholmskiego opracowali procedurę dynamicznego rozdzielania kinetycznego (DKR) racemicznej 1-fenyletyloaminy (*rac*-**68**) – chiralnego bloku budulcowego popularnie stosowanego w syntezie organicznej (Schemat 19) [65]. Istotą tego procesu jest zastosowanie podwójnego systemu katalizatorów: (i) CAL-B celem enancjoselektywnej transestryfikacji racemicznej aminy *rac*-**68** estrem metylowym kwasu metylometoksyoctowego oraz (ii) katalizatora metaloorganicznego zawierającego ruten [tzw. kompleksu Shvo; $\{[(\eta^5\text{-Ph}_4\text{C}_4\text{CO})_2\text{H}]\text{Ru}_2(\text{CO})_4(\mu\text{-H})\}$] celem wtórnej racemizacji *in situ* wolniej reagującej (*S*)-aminy. Proces prowadzony w temperaturze 100°C w toluenie z dodatkiem 2,4-dimetylo-3-pentanolu jako donora wodoru, w środowisku zasadowym, pozwala w sposób niezmiernie efektywny otrzymać enancjomerycznie czysty (*R*)-2-metoksy-*N*-(1-fenyletylo)acetamid [(*R*)-**69**] (>99% ee) z wydajnością 65% po krystalizacji. Dodatkową ilość amidu (*R*)-**69** odzyskano z ługów pokryształizacyjnych, poddając je destylacji krótkodrożnej z zastosowaniem tzw. Kugelrohr. Po połączeniu obu frakcji zawierających amid otrzymano pożądany produkt (*R*)-**69** o nadmiarze enancjomerycznym wynoszącym 98% oraz całkowitej wydajności 83%. Ze względu na bardzo dużą efektywność opracowanej metody, wydaje się wielce prawdopodobne, że jej komercjalizacja jest tylko kwestią czasu.



Schemat 19. Dynamiczny rozdział kinetyczny racemicznej 1-fenyletyloaminy (*rac*-**68**) katalizowany Novozymem 435 oraz tzw. kompleksem Shvo

Scheme 19. Dynamic kinetic resolution of racemic 1-phenylethylamine (*rac*-**68**) catalyzed by Novozym 435 and so-called Shvo's complex

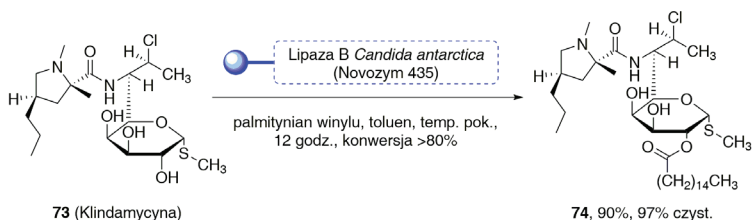
Wiele jest informacji dotyczących typowych procesów chemicznych z udziałem lipaz, natomiast zastosowanie tych enzymów w przemysłowej polimeryzacji i polikondensacji notuje się stosunkowo rzadko, chociaż wiadomo, że polimery naturalne wytwarzane są *in vivo* właśnie z udziałem enzymów. Hilterhaus i współpracownicy z Politechniki Hamburgskiej wraz z inżynierami z firmy *Bayer MaterialScience AG* opracowali w skali 0,5 kg syntezę poli(adypinianu glicerolu) (**72**) z kwasu adypinowego (**70**) oraz glicerolu (**71**, Schemat 20) [66]. Procesy estryfikacji i polimeryzacji katalizowane Novozymem 435 w warunkach bezrozpuszczalnikowych w temperaturze 60°C oraz pod ciśnieniem <20 mbar pozwalają otrzymać pożądany polimer **72** o średniej masie cząsteczkowej 2000–3000 Da z bardzo wysoką 95% konwersją osiąganą w relatywnie krótkim czasie (48 godz.).



Schemat 20. Chemoenzymatyczna synteza poli(adypinianu glicerolu) (**72**) katalizowana Novozymem 435

Scheme 20. Chemoenzymatic synthesis of poly(glycerol adipate) (**72**) catalyzed by Novozym 435

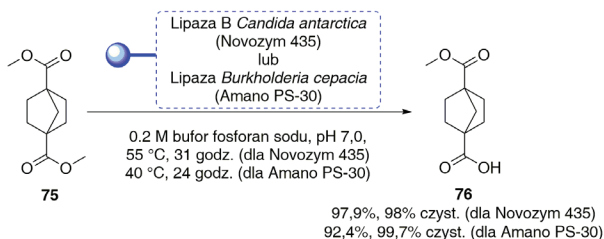
Palmitynian klindamycyny (**74**) jest pro-lekiem znanego półsyntetycznego antybiotyku z grupy linkozamidów o udowodnionej efektywności w działaniu przeciwko bakteriom Gram-(+) oraz beztlenowym bakteriom Gram(-). Ponadto stosowany jest jako antybiotyk pierwszego rzutu w zwalczaniu zakażeń gronkowcem złocistym opornym na metycylinę (MRSA). Chemiczna synteza palmitynianu klindamycyny (**74**) jest bardzo nieefektywna (łączna wydajność nie przekracza 50%) oraz wymaga dużego nakładu czasu ze względu na konieczność stosowania szeregu procedur polegających na selektywnym zabezpieczeniu i odbezpieczeniu grup funkcyjnych antybiotyku **73** celem monoacylowania tylko jego grupy 2'-hydroksylowej. Zaproponowana przez chińskich naukowców jednoetapowa regioselektywna transestryfikacja klindamycyny (**73**) palmitynianem winylu katalizowana Novozymem 435 zawieszonym w toluenie pozwoliła osiągnąć konwersję 90% w zaledwie 12 godzin, a dodatkowym jej atutem jest to, iż prowadzona jest w bardzo łagodnych warunkach w temperaturze pokojowej (Schemat 21) [67]. Czystość otrzymanego monoestru **74** potwierdzona za pomocą chromatografii gazowej wynosiła 97% i jest w pełni zgodna z farmakopealnymi wymogami dla tego leku.



Schemat 21. Regioselektywna transestryfikacja klindamycyny (73) katalizowana Novozymem 435

Scheme 21. Regioselective transesterification of clindamycin (73) catalyzed by Novozym 435

Lipaza B z *Candida antarctica* okazała się również bardzo użytecznym katalizatorem regioselektywnej hydrolizy estru dimetylowego kwasu bicyklo[2.2.1]heptano-1,4-dikarboksyowego (75) opracowanej przez *Bristol-Myers Squibb* (Schemat 22) [68]. Początkowo jako katalizator tej reakcji stosowano immobilizowaną lipazę izolowaną z *Burkholderia cepacia* (Amano PS-30), która hydrolizowała diester 75 do odpowiedniego monoestru metylowego 76 z wydajnością >92%. Jednakże po zastąpieniu jej Novozymem 435, monoester 76 otrzymano z jeszcze lepszą wydajnością 98%. W stosowanej skali produkcyjnej otrzymuje się 100 kg monoestru 76 o czystości 98% z wydajnością 98%. Reakcja ta przebiega z taką selektywnością, że na dzień dzisiejszy nie posiada ona konkurencji ze strony metod chemicznych.

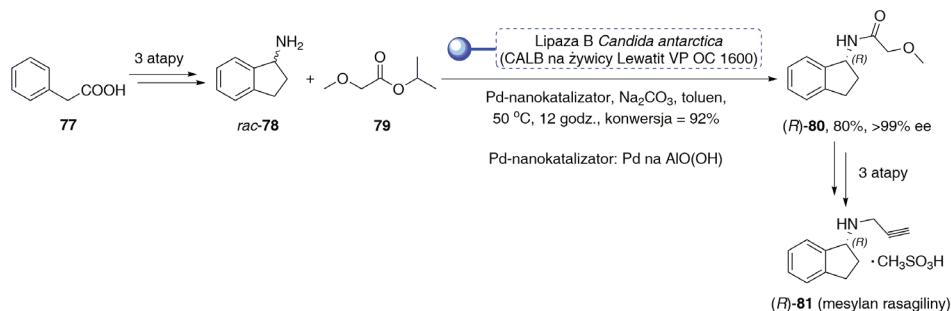


Schemat 22. Regioselektywna hydroliza estru dimetylowego kwasu bicyklo[2.2.1]heptano-1,4-dikarboksyowego (75) katalizowana Novozymem 435

Scheme 22. Regioselective hydrolysis of dimethyl bicyclo[2.2.1]heptane-1,4-dicarboxylate (75) catalyzed by Novozym 435

Kolejnym przykładem zastosowania CAL-B jako katalizatora przekształceń stereoselektywnych jest chemoenzymatyczna synteza enancjomerycznie czystego mesylanu rasagiliny [(*R*)-81] – leku stosowanego w terapii choroby Parkinsona (Schemat 23) [69]. Opracowana przez chińskich naukowców z Szanghajskiego Uniwersytetu Farmaceutycznego metoda syntezy bazuje na dynamicznym rozdziale kinetycznym (DKR) enancjomerów racemicznej 2,3-dihydro-1-indanoaminy (*rac*-78) – otrzymywanej w prosty sposób z handlowo dostępnego kwasu fenylooctowego (77). Kluczowy etap polega na zastosowaniu CAL-B immobilizowanej na żywicy Lewatit VP OC 1600, katalizującej rozdział kinetyczny aminy *rac*-78 polegający na enancjoselektywnym jej acylowaniu metoksyoctanem *izo*-propylu w obecności nanokatalizatora palladowego odpowiedzialnego za racemizację *in situ*

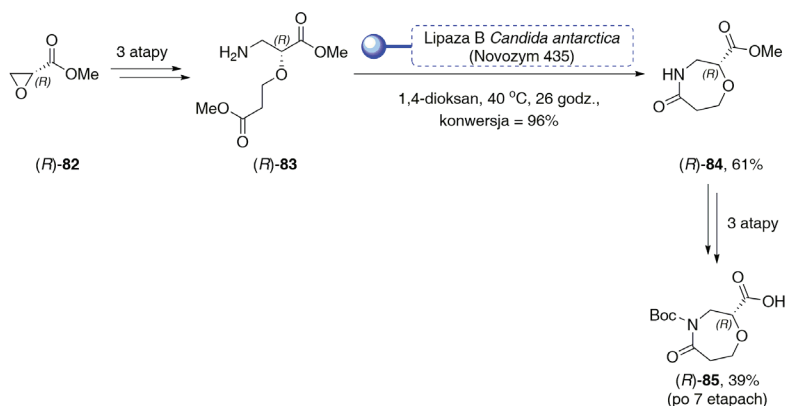
nieprzereagowanego (*S*)-enancjomeru **78**. Chiralny nieracemiczny półprodukt – (*R*)-*N*-(2,3-dihydro-1*H*-inden-1-yl)-2-metoksyacetamid [(*R*)-**80**] – otrzymywano z doskonałym nadmiarem enancjomerycznym (>99% ee) oraz bardzo wysoką wydajnością (80%). Technologia produkcji optycznie czynnego mesylanu rasagiliny [(*R*)-**81**] została opracowana w skali 73 g (200 g/litr) i po 7 etapach syntezy uzyskiwano czysty enancjomerycznie produkt (99,9% ee) z całkowitą wydajnością 25%.



Schemat 23. Chemoenzymatyczna synteza mesylanu rasagiliny [(*R*)-**81**] katalizowana CAL-B immobilizowaną na żywicy Lewatit VP OC 1600

Scheme 23. Chemoenzymatic synthesis of rasagiline mesylate [(*R*)-**81**] catalyzed by CAL-B immobilized on Lewatit VP OC 1600 resin

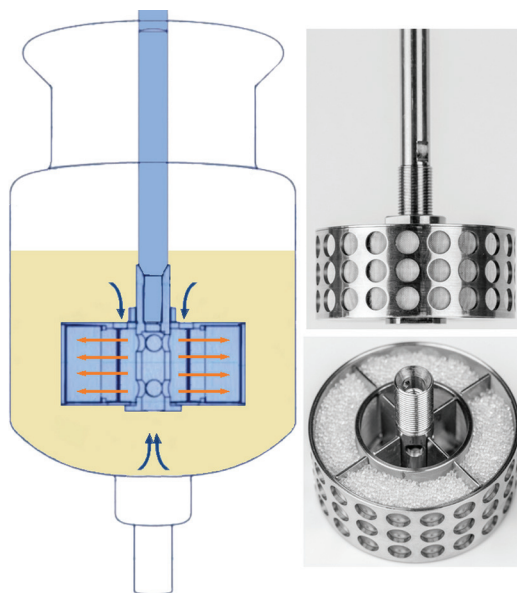
Natomiast szwedzcy naukowcy z firmy farmaceutycznej *AstraZeneca R&D* opracowali wielogramową 7-etapową wydajną syntezę kwasu (2*R*)-4-(*tert*-butoxycarbonylo)-1,4-oksazepano-2-karboksylowego [(*R*)-**85**] – popularnego syntonu używanego przy projektowaniu oraz produkcji nowych leków (Schemat 24) [70].



Schemat 24. Regioselektywna laktonizacja estru metylowego kwasu (2*R*)-3-amino-2-(3-metoksy-3-oksopropoxy)propanowego [(*R*)-**83**] katalizowana Novozymem 435

Scheme 24. Regioselective lactamization of methyl (2*R*)-3-amino-2-(3-methoxy-3-oxopropoxy)-propanoate [(*R*)-**83**] catalyzed by Novozym 435

Substratem w tym procesie był handlowo dostępny ester metylowy kwasu (2*R*)-glicydowego [(*R*)-**82**], a całkowita wydajność syntezy (*R*)-**85** wynosiła 39%. Kluczowym etapem procesu jest regioselektywna laktonizacja optycznie czynnego estru metylowego kwasu (2*R*)-3-amino-2-(3-metoksy-3-oksopropoksy)propanowego [(*R*)-**83**]. Amino diester (*R*)-**83** poddawano wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji w 6-członowy laktam (*R*)-**84** z wydajnością 61%, konwersją 96% w ciągu 26 godzin, używając do tego celu lekko ogrzewanej (40°C) zawiesiny 40% (w/w) Novozymu 435 w 1,4-dioksanie. Warte podkreślenia jest zastosowanie unikatowego systemu mieszającego – tzw. *SpinChem rotating flow cell technology* (Rys. 4) – który co prawda nie przyspieszył znacznie reakcji, ale pozwolił zachować dużo większą stabilność użytego katalizatora.

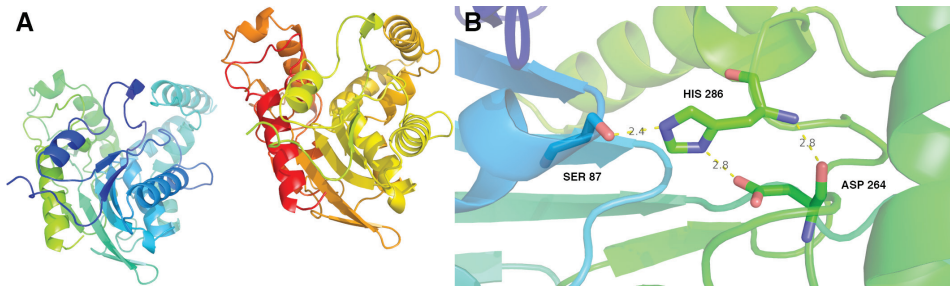


Rysunek 4. System mieszania typu *SpinChem rotating flow cell technology*
Figure 4. *SpinChem rotating flow cell technology* – stirring system type

2. PROCESY KATALIZOWANE PRZEZ LIPAZĘ Z *BURKHOLDERIA CEPACIA* (BCL)

Enzymem obecnie drugim co do częstości stosowania w małotonazowych produkcjach przemysłowych, głównie preparatów specjalnych oraz farmaceutycznych, jest lipaza izolowana z nieprzetrwalnikującej Gram(-) bakterii *Burkholderia cepacia* (BCL) (niegdyś *Pseudomonas cepacia*, PCL). Lipaza ta jest wykorzystywana jako biokatalizator do wysoce enancjoselektywnych przekształceń w szczególności chiralnych drugorzędowych alkoholi [71, 72]. Wykazywana przez nią stereopre-

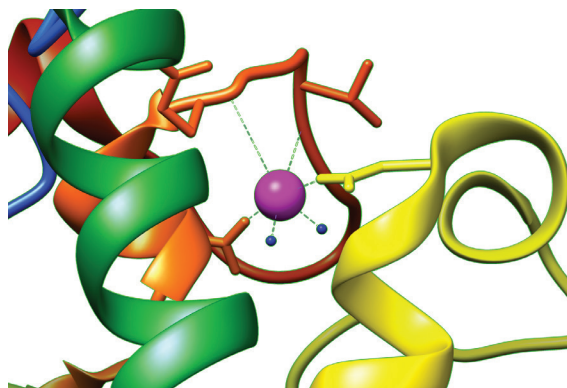
ferencja determinowana jest przez budowę substratu, podczas gdy jej stereoselektywność zależy wyłącznie od interakcji pomiędzy atomami centrum aktywnego oraz substratu [73, 74]. Trójwymiarowa struktura tego białka (PDB ID: 1OIL oraz 2LIP) została wyznaczona oraz opublikowana po raz pierwszy w roku 1997 przez dwie niezależnie pracujące grupy badawcze [75, 76]. Obecnie większość badań nad mechanizmem działania BCL odbywa się z wykorzystaniem struktury rentgenograficznej o otwartej konformacji oraz najlepszej uzyskanej jak dotąd dla lipaz rozdzielczości kryształu (1,10 Å) (PDB ID: 1YS1) opublikowanej przez zespół Profesora Kazlauskas'a (Rys. 5) [77]. Lipaza z *Burkholderia cepacia* jest białkiem o masie cząsteczkowej 33 kDa składającym się z 320 reszt aminokwasowych zawierającym jedną dużą C-domenę oraz dwie mniejsze domeny U1 oraz U2. Domena C posiada charakterystyczną topologię dla klasycznych α/β -hydrolaz z centralnie położoną β -kartką uformowaną z sześciu równoległe ułożonych pasm oflankowanych przez dwie α -helisy z jednej strony oraz cztery α -helisy z drugiej strony. Z kolei, domena U1 zawiera trzy α -helisy, a domena U2 dwie położone anty-równoległe względem siebie β -pasma oraz dwie α -helisy. Triada katalityczna składająca się z Asp 264, His 286 oraz Ser 87 ulokowana jest w C-terminalnym końcu centralnej β -kartki.



Rysunek 5. (A) Struktura 3D lipazy z *Burkholderia cepacia* (PDB ID: 1YS1). (B) Ułożenie przestrzenne reszt aminokwasowych (AK) wchodzących w skład tzw. „triady katalitycznej” (Asp 264, His 286, Ser 87) należącej do centrum aktywnego BCL (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 5. (A) The 3D structure of lipase from *Burkholderia cepacia* (PDB ID: 1YS1). (B) The spatial orientation of the amino acid residues (AAs) in the so-called “catalytic triad” (Asp 264, His 286, Ser 87) belonging to the active-site of BCL (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

Charakterystyczną cechą tej lipazy jest obecność kationu Ca^{2+} , który stabilizuje jej strukturę IV-rzędową poprzez oddziaływania z czterema atomami tlenu grup karbonylowych należących do Gln 292 i Val 296 oraz z tlenami grup bocznych reszt aminokwasowych Asp 242 i Asp 288, a także z dwoma cząsteczkami strukturalnej wody (Rys. 6).

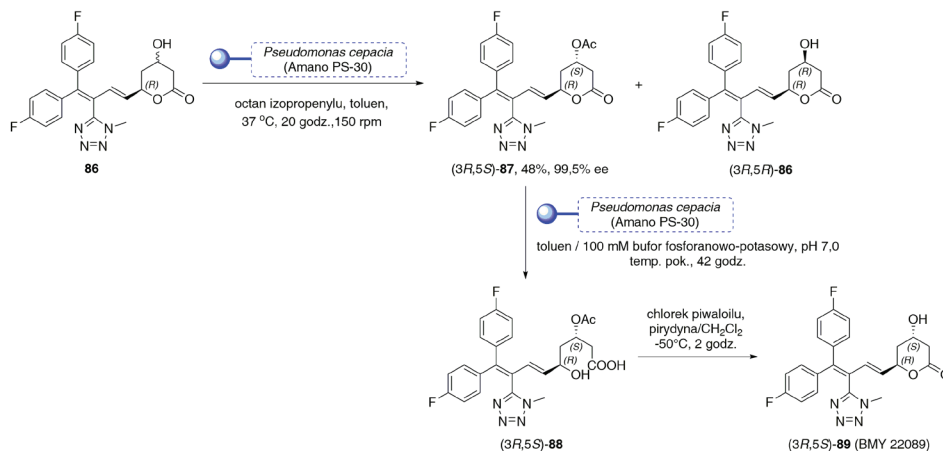


Rysunek 6. Oddziaływanie kationu Ca^{2+} (różowa, duża kula) z resztami aminokwasowymi Gln 292, Val 296, Asp 242, Asp288 lipazy z *Burkholderia cepacia* oraz dwoma cząsteczkami wody strukturalnej (niebieskie, małe kulki). Rysunek utworzony został za pomocą programu UCSF Chimera vs 1.9

Figure 6. The interaction between the Ca^{2+} cation (pink, big ball) and amino acid residues Gln 292, Val 296, Asp 242, Asp288 of lipase from *Burkholderia cepacia* and two molecules of structural water (blue, small balls). High-resolution graphic was generated with UCSF Chimera vs 1.9

Poniżej zaprezentowano kilka przykładów, gdzie BCL odgrywa kluczową rolę w otrzymywaniu niezwykle cennych substancji organicznych, których skala produkcyjna nie przekracza kilkudziesięciu kilogramów.

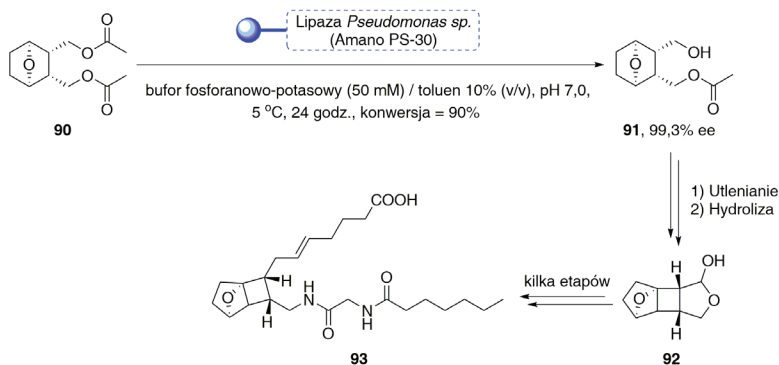
Lipaza z *Pseudomonas cepacia* immobilizowana na polipropylenowych perełkach Accurel PP (Amano PS-30) jest katalizatorem w opracowanej przez firmę *Bristol-Meyers Squibb* przemysłowej produkcji inhibitora reduktazy 3-hydrokso-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMG-CoA) – [(3*R*,5*S*)-**89**] (BMY 22089) (Schemat 25) [78] – posiadającego udowodnione działanie redukujące stężenia frakcji tzw. „złego” cholesterolu (LDL) w osoczu krwi [79]. Przeprowadzona w skali 2,56 kg (9 mM, $4 \text{ g} \times \text{litr}^{-1}$) katalizowana enzymatycznie enancjoselektywna transestryfikacja laktonu **86** octanem izopropenyłu w warunkach kontroli kinetycznej w toluenie, umożliwiła otrzymanie odpowiedniego enancjomerycznie czystego octanu (3*R*,5*S*)-**87** (99,5% ee) z wydajnością 48% oraz czystością 99,4% wg GC. Stwierdzono doświadczalnie, że enzym użyty w tym procesie zachowywał pełną aktywność katalityczną podczas pięciu kolejnych cykli reakcyjnych. Wyizolowany chromatograficznie octan (3*R*,5*S*)-**87** hydrolizowany był w układzie dwufazowym bufor/toluen przy użyciu tego samego katalizatora (Amano PS-30), a powstały związek (3*R*,5*S*)-**88** poddano reakcji z chlorkiem piwaloilu w obecności pirydyny otrzymując ostatecznie pożądaną inhibitor (3*R*,5*S*)-**89**.



Schemat 25. Chemoenzymatyczna synteza inhibitora reduktazy HMG-CoA [(3R,5S)-89] z użyciem lipazy Amano PS-30

Scheme 25. Chemoenzymatic synthesis of HMG-CoA reductase inhibitor [(3R,5S)-89] by using Amano PS-30 lipase

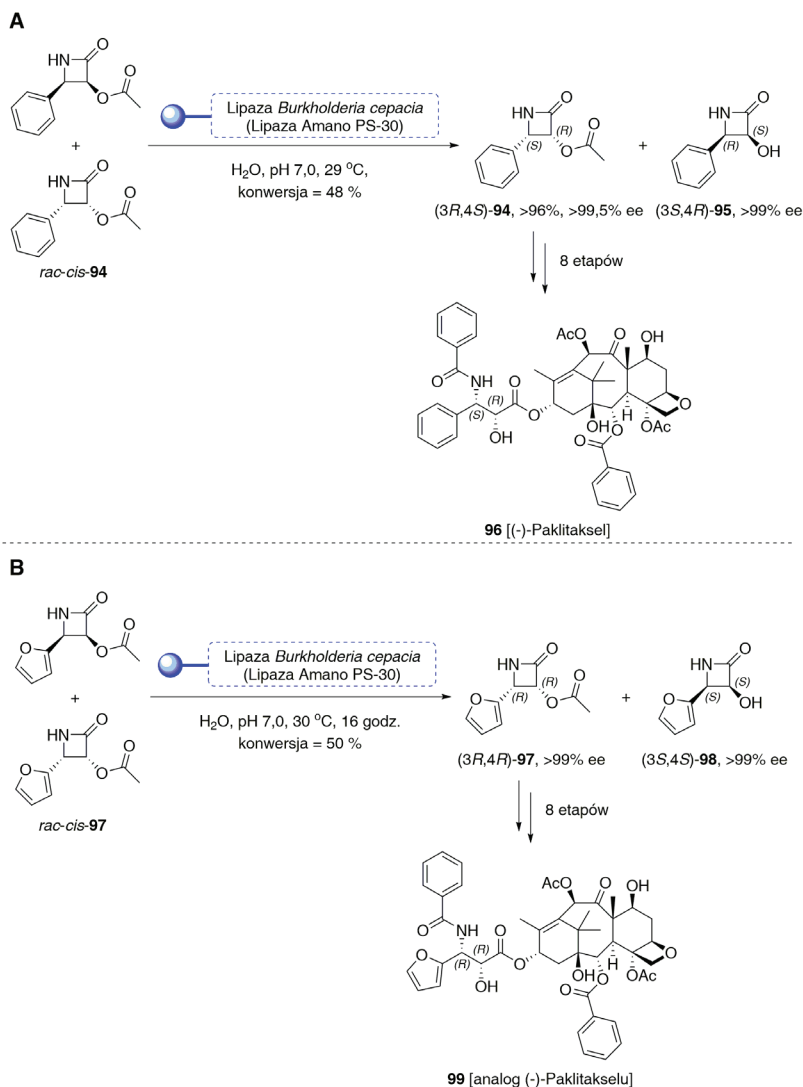
Koncern *Bristol-Myers Squibb* wykorzystuje także inny proces przemysłowy, w którym kluczową rolę odgrywa immobilizowana lipaza Amano PS-30. Jest nim stereoselektywna hydroliza dioctanu (**90**, Schemat 26) – półproduktu w syntezie **93** – skutecznego antagonisty tromboksanu A2, będącego środkiem silnie obkurczającym naczynia krwionośne [80]. Lipaza Amano PS-30 użyta w schłodzonym do 5°C układzie dwufazowym bufor/toluen katalizowała hydrolizę dioctanu **90** wysoce stereoselektywnie, pozwalając otrzymać monoocetan **91** o nadmiarze enancjometrycznym wynoszącym 99,3% z wydajnością rzędu 80%. Proces ten zoptymalizowano w skali 80 litrowej, używając 400 g substratu **90** (0,02 M, 5 g×litr⁻¹), a stosowany enzym nadawał się do powtórnego użytku w co najmniej pięciu kolejnych cyklach reakcyjnych. Pożądaný monoocetan **91** utleniono do odpowiedniego aldehydu, który następnie zhydrolizowano chemicznie otrzymując laktol **92**, a ten z kolei przekształcono w ostateczny produkt farmaceutyczny **93** w wyniku zastosowania kilku prostych reakcji chemicznych.



Schemat 26. Chemoenzymatyczna synteza chiralnego antagonisty tromboksanu A2 **93** katalizowana lipazą Amano PS-30

Scheme 26. Chemoenzymatic synthesis of thromboxane A2 antagonist **93** catalyzed by Amano PS-30 lipase

Kolejnym godnym uwagi procesem biokatalitycznym prowadzonym w *Bristol-Meyers Squibb*, wykorzystującym lipazę Amano PS-30, jest synteza popularnego cytostatyku o doskonałych właściwościach przeciwnowotworowych – (–)-paklitakselu (**96**, Schemat 27A) [81] oraz jego furanowego analogu **99** (Schemat 27B) [82]. Przedstawione poniżej syntezy opierają się w głównej mierze na enancjoselektywnej hydrolizie racemicznego octanu *cis*-azetydynonu (*rac-cis*-**94** lub *rac-cis*-**97**) katalizowanej immobilizowaną lipazą z *Burkholderia cepacia*. Oba rozdzielone kinetycznie diastereoizomery w postaci nieprzereagowanego (*R*)-octanu oraz powstałego (*S*)-alkoholu uzyskiwane są z doskonałymi nadmiarami enancjomerycznymi bliskimi 100% [nadmiary diastereizomeryczne (*de*) nie zostały dla tych związków podane]. Technologia syntezy (–)-paklitakselu (**96**) zaprojektowana została dla 150-litrowego reaktora, w którym enzymatycznej hydrolizie poddaje się racemiczny substrat *rac-cis*-**94** użyty w ilości 1,2 kg na szarżę (0,049 M, 10 g×litr⁻¹) ze stałą szybkością reakcji wynoszącą 0,12 g×litr⁻¹×godz.⁻¹. Dodatkową zaletą opracowanej technologii jest możliwość selektywnego wytrącania chiralnego półproduktu (3*R*,4*S*)-**94** za pomocą procedury stopniowego ochładzania mieszaniny reakcyjnej do temperatury 5°C. Stwierdzono, że zastosowanie względnie łagodnych warunków reakcji (H₂O; pH 7,0; 29–30°C) pozwala na użycie katalizatora w kolejnych 10 cyklach produkcyjnych bez jakichkolwiek widocznych spadków aktywności enzymu oraz czystości enancjomerycznej i wydajności otrzymywanego chiralnego związku (3*R*,4*S*)-**94**. Dalsza chemiczna hydroliza (*R*)-octanu (3*R*,4*S*)-**94** oraz kolejne 7 reakcji prowadzi do otrzymania odpowiednio (–)-paklitakselu (**96**) oraz jego analogu **99**.

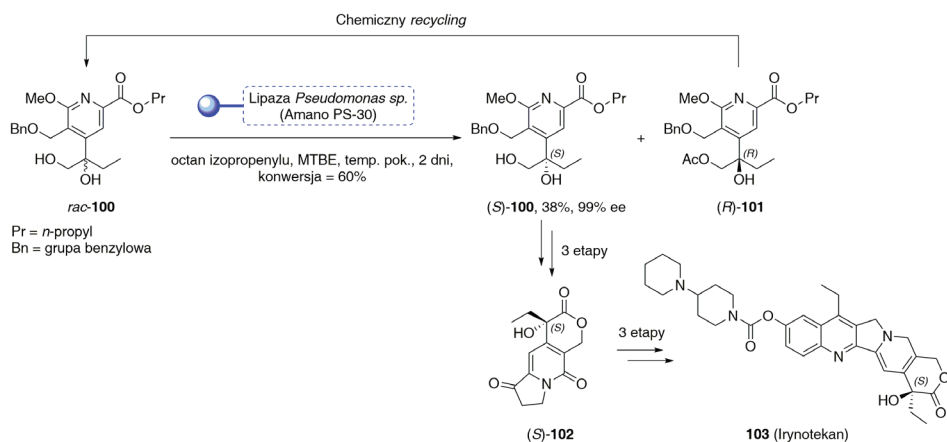


Schemat 27. Chemoenzymatyczna synteza (-)-paklitakselu (**96**) oraz jego analogu **99** z zastosowaniem lipazy Amano PS-30

Scheme 27. Chemoenzymatic synthesis of (-)-paclitaxel (**96**) and its analog **99** by using Amano PS-30 lipase

Innym przykładem komercyjnie realizowanego procesu wykorzystującego etap biokatalityczny z udziałem lipazy Amano PS-30 jest opracowana przez koncern *Yakult Pharmaceuticals* chemoenzymatyczna synteza irynotekanu (**103**, Schemat 28) [83]. Lek ten będący półsyntetyczną pochodną kamptotecyny jest powszechnie stosowany w terapiach agresywnych nowotworów jajnika oraz jelita grubego. Obecnie licencję na produkcję oraz jego sprzedaż odkupił amerykański koncern *Pharmacia and Upjohn Company*. Strategicznie ważny chiralny tricykliczny lakton (*S*)-**102**

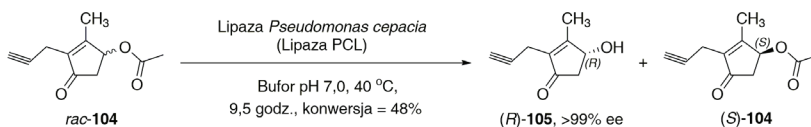
otrzymywany jest w trzy etapowej syntezie, w której diol (*S*)-**100** pełni rolę kluczowego półproduktu. Diol ten (*S*)-**100** otrzymywany jest w wyniku rozdziału kinetycznego racemicznego substratu *rac*-**100** za pomocą regio- oraz enancjo-selektywnej transestryfikacji z użyciem octanu izopropenyłu w obecności lipazy Amano PS-30. Warto dodać, że preparat enzymatyczny Amano PS-30, choć już sam w sobie jest immobilizowaną lipazą, to dodatkowo jeszcze został osadzony na Celicie 521. Reakcja enzymatyczna prowadzona była w eterze *tert*-butyloowo-metylowym (MTBE) w temperaturze pokojowej, a otrzymywany po dwóch dniach praktycznie enancjomerycznie czysty diol (*S*)-**100** (99% ee) z wydajnością 38% dla konwersji równej 60% nadawał się do dalszej funkcjonalizacji. Dla zbędnego enancjomeru (*R*)-**101** opracowano chemiczną metodę wtórnej racemizacji, co dodatkowo zwiększyło produktywność całego procesu. Przedstawiona niżej synteza została dostosowana do skali pilotażowej, a ilość produkowanego chiralnego diolu (*S*)-**100** wynosiła 35 kg z jednej szarży.



Schemat 28. Chemoenzymatyczna synteza irinotekanu (**103**) katalizowana lipazą Amano PS-30

Scheme 28. Chemoenzymatic synthesis of irinotecan (**103**) catalyzed by Amano PS-30 lipase

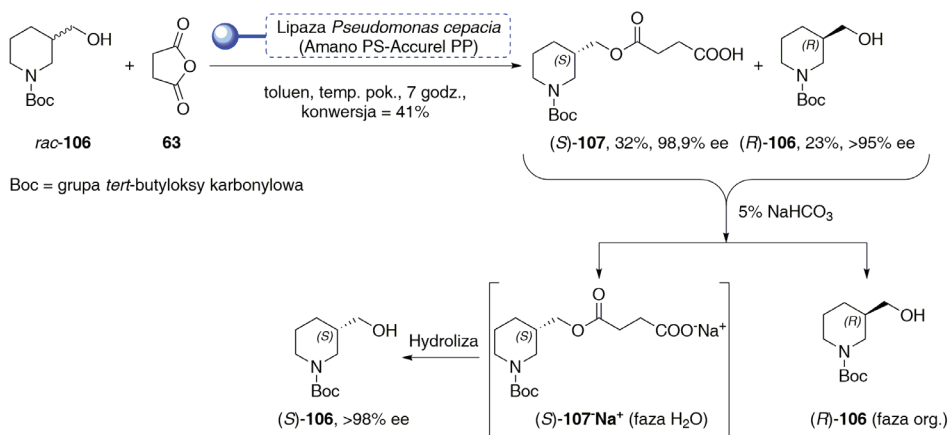
Jednym z nielicznych procesów przemysłowych, w którym stosuje się natywną lipazę z *Burkholderia cepacia* jest procedura opisana przez japońskich naukowców z Uniwersytetu Prefektury Shiga oraz inżynierów firmy *Sumitomo Chemical Co.* (Schemat 29) [84]. W tym przypadku współpraca na styku nauka-przemysł zaowocowała opracowaniem wydajnej asymetrycznej syntezy enancjomerycznie czystego (4*R*)-4-hydroksy-3-metylo-2-(prop-2-yn-1-yl)cyklopent-2-en-1-onu [(*R*)-**105**] prowadzonej w oparciu o rozdział kinetyczny racemicznego estru *rac*-**104** w reakcji enancjoselektywnej hydrolizy. Chiralny nieracemiczny alkohol (*R*)-**105** otrzymywany w bardzo łagodnych warunkach [roztwór buforowy pH 7,0; 40°C] oraz w relatywnie krótkim czasie (9,5 godzin) wykorzystywany jest następnie jako półprodukt w syntezie analogów hormonów jwenilnych – pyretroidów o doskonałych właściwościach owadobójczych oraz niskiej toksyczności wobec ssaków.



Schemat 29. Rozdział kinetyczny octanu 2-metylo-4-okso-3-propargilcyklopent-2-en-1-olu (*rac*-**104**) katalizowany natywną lipazą z *Burkholderia cepacia*

Scheme 29. Kinetic resolution of 2-methyl-4-oxo-3-propargylcyclopent-2-en-1-ol acetate (*rac*-**104**) catalyzed by native lipase from *Burkholderia cepacia*

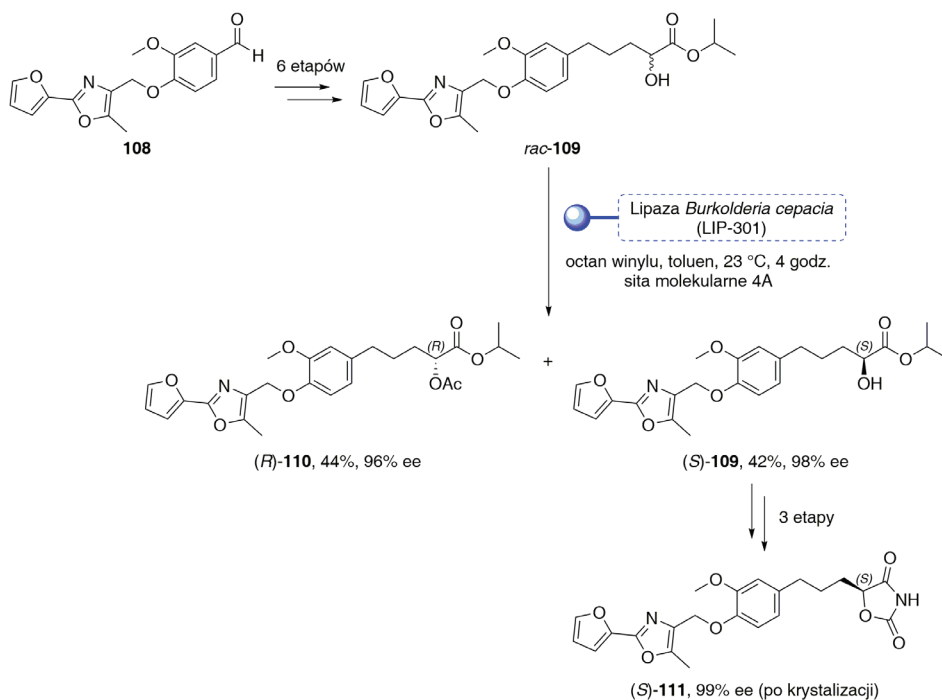
Opracowaniem technologii otrzymania (*R*)-*N*-(*tert*-butoksykarbonylo)-3-hydroksymetylopiperidyny [(*R*)-**106**] – ważnego półproduktu w syntezie inhibitora tryptazy jako potencjalnego leku w terapii mastocytozy oraz innych chorób alergicznych, zajmowano się w laboratoriach koncernu *Hoffmann la Roche*. Jednakże stosowanie klasycznych technik krystalizacyjnych z użyciem benzyłowych pochodnych kwasów winowych lub katalizy enzymatycznej za pomocą lipazy izolowanej z *Pseudomonas fluorescens* nie przyniosło pożądanych efektów. Straty ponoszone podczas krystalizacji diastereoizomerycznych soli kwasu winowego (wymagane min. 5 cykli) oraz w trakcie chromatografii w przypadku procesu biokatalitycznego, nie pozwoliły początkowo na komercjalizację tego procesu. Dopiero opracowana przez naukowców z *Bristol-Myers Squibb* procedura rozdziału kinetycznego racemicznej *N*-(*tert*-butoksykarbonylo)-3-hydroksymetylopiperidyny (*rac*-**106**) z użyciem bezwodnika kwasu bursztynowego (**63**) wobec lipazy Amano PS immobilizowanej na Accurel PP, zawieszanej w toluenie, umożliwiła nie tylko otrzymanie obu form stereoizomerycznych wyjściowego alkoholu o wysokiej czystości enancjomerycznej (*S*)-**107** (98,9% ee) oraz (*R*)-**106** (>95% ee), ale także prostą ich izolację z mieszaniny poreakcyjnej za pomocą ekstrakcji z użyciem 5% wodnego roztworu NaHCO_3 (Schemat 30) [85]. Oddzieloną sól sodową hemibursztynianu (*S*)-**107** Na^+ przeprowadzono w kwas, który następnie poddawano hydrolizie, aby otrzymać ostateczny produkt (*S*)-**106** o bardzo wysokim enancjomerycznym wzbogaceniu (>98% ee). Zaprojektowana technologia jest bardzo wydajna i prowadzona w 3 litrowym reaktorze mieszalnikowym pozwala na użycie 255 g substratu *rac*-**106** (0,46 M, 99 $\text{g} \times \text{litr}^{-1}$).



Schemat 30. Enzymatyczny rozdział kinetyczny *N*-(*tert*-butoksykarbonylo)-3-hydroksymetylopiperydyny (*rac*-**106**) katalizowany lipazą Amano PS immobilizowaną na Accurel PP

Scheme 30. Enzymatic kinetic resolution of *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-3-hydroxymethyl piperidine (*rac*-**106**) catalyzed by Amano PS lipase immobilized on Accurel PP

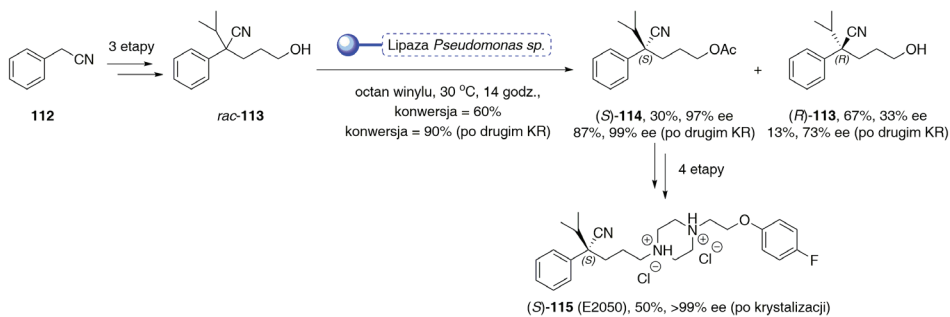
Z kolei na Schemacie 31 przedstawiono proces z udziałem immobilizowanej lipazy z *Burkholderia cepacia* (LIP-301 – *Toyobo Corporation*). Jest to opracowana przez japońską firmę *Takeda Chemical Industries, Ltd.* technologia otrzymywania optycznie czynnej pochodnej 2,4-oksazolidynodionu (*S*)-**111** – związku obniżającego poziom glukozy we krwi [86]. Asymetryczne *O*-acetylowanie racemicznego alkoholu *rac*-**109** prowadzone w temperaturze 23°C za pomocą octanu winylu katalizowane lipazą LIP-301 w obecności sit molekularnych 4 Å zawieszonych w toluenie pozwoliło w ciągu zaledwie 4 godzin otrzymać alkohol (*S*)-**109** oraz octan (*R*)-**110** o bardzo wysokim nadmiarze enancjomerycznym rzędu 96–98% oraz izolowanej wydajności z zakresu 42–44%. Wydzielony chromatograficznie alkohol (*S*)-**109** poddano następnie prostym przekształceniom chemicznym, w wyniku których po krystalizacji z mieszaniny aceton/2-propanol otrzymano niemal czysty enancjomerycznie produkt (*S*)-**111** (99% ee). Kluczowy etap enzymatycznego rozdziału kinetycznego *rac*-**109** przeprowadzony był dla skali 33 gramowej.



Schemat 31. Chemoenzymatyczna synteza nieracemicznej pochodnej 2,4-oksazolidynodionu (S)-111 katalizowana lipazą LIP-301

Scheme 31. Chemoenzymatic synthesis of non-racemic 2,4-oxazolidinedione derivative (S)-111 catalyzed by LIP-301 lipase

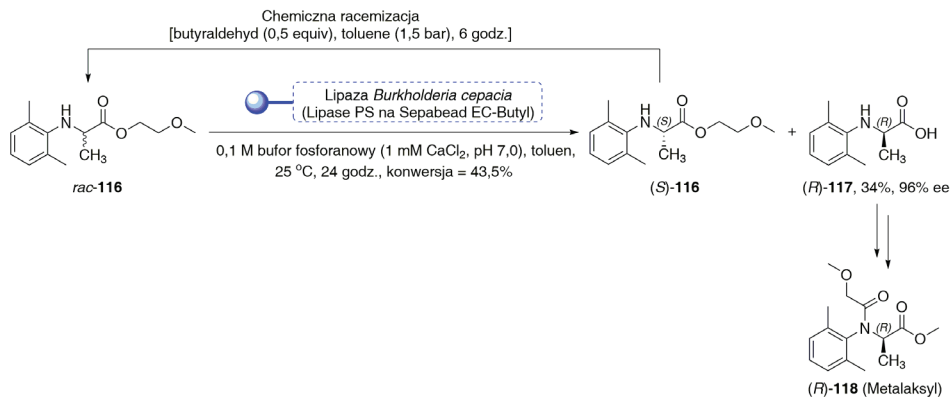
Firma *Eisai Co., Ltd.* jest twórcą technologii produkcji dichlorowodoru pochodnej piperazyny [(S)-155] (E2050) – selektywnego antagonisty kanału wapniowego – leku stosowanego w terapiach chorób układu krążenia (Schemat 32) [87]. Z pośród wielu przetestowanych lipaz w procesie rozdziału kinetycznego racemicznego 4-cyjano-5-metylo-4-fenylheksanolu (*rac*-113) najbardziej efektywnym pod względem enancjoselektywności oraz szybkości konwersji substratu okazał się immobilizowany preparat enzymatyczny firmy *Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Japan)* z *Pseudomonas* sp. Lipaza ta katalizowała przekształcenie 18 g *rac*-113 w taki sposób, że optycznie czynny nieprzereagowany alkohol (R)-113 otrzymywano z przeciętnym nadmiarem enancjomerycznym (33%), a powstały octan (S)-114 z 97% ee dla konwersji równej 60%. Z powodu mało satysfakcjonujących wyników postanowiono usprawnić proces biotransformacji, stosując podwójny rozdział kinetyczny. Dzięki tej operacji uzyskiwano praktycznie enancjomerycznie czysty ester (S)-114 (99% ee) z bardzo dobrą wydajnością rzędu 87%. Dalsze chemiczne transformacje chiralnego octanu (S)-114 przeprowadzono w sposób wydajny (pierwsze trzy z czterech etapów wykonano w jednym reaktorze, w tzw. procedurze „one-pot”), otrzymując enancjomerycznie czysty produkt (S)-115 (>99% ee) po krystalizacji z łączną wydajnością 50%.



Schemat 32. Chemoenzymatyczna synteza selektywnego antagonisty kanału wapniowego (S)-115 (E2050) z użyciem immobilizowanej lipazy z *Pseudomonas* sp.

Scheme 32. Chemoenzymatic synthesis of the neuron-selective Ca^{2+} channel blocker (S)-115 (E2050) by using immobilized lipase from *Pseudomonas* sp.

Kolejnym przykładem użycia BCL jako efektywnego katalizatora przekształceń asymetrycznych jest chemoenzymatyczna technologia produkcji znanego fungicydu – metalaksylu [(R)-118] (Schemat 33) [88]. Bezpośrednim powodem opracowania enzymatycznej ścieżki syntezy tego związku była chęć zastąpienia metody bazującej na chiralnych chemicznych katalizatorach, która nie nadawała się do procedury powiększenia skali, a do tego optycznie czynny produkt (R)-118 uzyskiwany tą drogą był niewystarczająco czysty enancjomerycznie (95% ee). Zadania zmodernizowania technologii jego produkcji podjęli się naukowcy z koncernu *LG Chem, Ltd.*, którzy zastosowali rozdział kinetyczny racemicznego estru 2-metoksyetylowego *N*-(2,6-dimetylofenylo)alaniny (*rac*-116) w reakcji enancjoselektywnej hydrolizy w układzie dwufazowym bufor/toluen katalizowanej immobilizowanym preparatem enzymatycznym Lipase PS na Sepabead EC-Butyl. Niewątpliwą zaletą zaprojektowanej technologii jest możliwość nieskomplikowanej izolacji z mieszaniny poreakcyjnej powstającego enancjomerycznie wzbogaconego kwasu (R)-117 (96% ee) za pomocą ekstrakcji z użyciem 30% NaOH. Otrzymywany z wydajnością 34% kwas (R)-117 przekształcany jest następnie w finalny produkt (R)-118, a nieprzereagowany ester (S)-116, po racemizacji za pomocą aldehydu masłowego (tworzy z grupą aminową zasadę Schiffa ulegającą dynamicznej tautomerizacji z migracją atomu wodoru przy centrum stereogenicznym) wykorzystywany jest powtórnie w tym procesie. Szarża zoptymalizowana została dla skali 20 litrowej, w której używa się 4 kg substratu *rac*-116, a enzym stosowany w tym procesie zachowuje swoją pełną funkcjonalność katalityczną nawet po 20 cyklach reakcyjnych.



Schemat 33. Chemoenzymatyczna synteza metalaksylu (*R*)-118 katalizowana lipazą z *Burkholderia cepacia* immobilizowaną na Sepabead EC-Butyl

Scheme 33. Chemoenzymatic synthesis of metalaxyl (*R*)-118 catalyzed by lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized on Sepabead EC-Butyl

UWAGI KOŃCOWE

Chociaż kataliza enzymatyczna z udziałem lipaz swoje początki datuje na lata 30-te XX w. za sprawą aktywności naukowej Aleksandra Syma, to prawdziwa eksplozja zastosowań metod biokatalitycznych w przemysłowej syntezie organicznej nastąpiła dopiero kilka dekad później. Większość procesów przemysłowych, w których stosowane są obecnie lipazy, to procesy wielkolaboratoryjne lub rzadziej niskotonażowe, w tym m.in. produkcje cennych półproduktów farmaceutyków, terapeutyków oraz agrochemikaliów, a także chemoenzymatyczne syntezy witamin, substancji zapachowych i surowców kosmetycznych. Wśród technologii biochemicznych syntezy związków o wysokiej wartości dodanej najchętniej wykorzystywanymi biokatalizatorami są: lipaza B z *Candida antarctica* (CAL-B) oraz lipaza z *Burkholderia cepacia* (BCL). Niniejsza część szerszego przeglądu literaturowego przedstawia 33 przykłady przemysłowych zastosowań tych dwóch lipaz, ze szczególnym uwzględnieniem ich potencjału katalitycznego w enancjoselektywnych reakcjach estryfikacji lub hydrolizy odpowiednio chiralnych pochodnych drugorzędowych alkoholi lub estrów. Trzeba w tym miejscu wyraźnie zaznaczyć, iż wiele z wymienionych w niniejszym przeglądzie procesów nigdy nie doczekałoby się realizacji w takim wymiarze gdyby nie fenomen katalityczny lipaz. Wymiana procesów chemicznych na biotechnologiczne w wielu wypadkach nie tylko spowodowała redukcję ilości odpadów i obniżenie całościowych kosztów produkcji, ale niejednokrotnie pozwoliła na przeprowadzenie w kluczowych etapach syntez nietypowych oraz nieosiągalnych dla tradycyjnej chemii reakcji zachodzących z zachowaniem bardzo wysokiej selektywności oraz czystości. Zaprezentowane w tym przeglądzie przykłady biotechnologii przemysłowych dobitnie wskazują, że wszędzie tam gdzie fundamentalną oraz pożądaną zdolnością jest prowadzenie selektywnych reakcji związków o złożo-

nej strukturze chemicznej [w tym skomplikowanych mieszanin (stereo)izomerów i/lub substancji posiadających w swej budowie cząsteczkowej liczne grupy funkcyjne o różnorodnej reaktywności], tam nie ma praktycznie żadnej alternatywy wobec biokatalizy enzymatycznej. Toteż jeśli zależy nam na zwiększeniu konkurencyjności oraz innowacyjności naszej gospodarki, rozwój badań nad możliwością zastosowania metod biokatalitycznych w zaawansowanych technologiach otrzymywania związków o wysokiej wartości dodanej oraz system kształcenia w tym zakresie powinny być zdecydowanie progresywne.

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] A. Ghanem, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 1721.
- [2] R.J. Hickey, R.H. Vaughn, *Industrial fermentation: Chapter 17-Acetic acid (vinegar)*, Vol 1. New York: Chemical Publishing Co., Inc. 1954, str. 498.
- [3] P.-L. Show, T.-C. Ling, J.C.-W. Lan, B.-T. Tey, R.N. Ramanan, S.-T. Yong, C.-W. Ooi, *Curr. Org. Chem.*, 2015, **19**, 19.
- [4] G. Yang, Y. Ding, *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, **22**, 5604.
- [5] L. Bora, D. Gohain, R. Das, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2013, **88**, 1959.
- [6] M.T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 12480.
- [7] M. Marciello, M. Filice, J.M. Palomo, *Catal. Sci. Technol.*, 2012, **2**, 1531.
- [8] K.-E. Jaeger, T. Eggert, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, **13**, 390.
- [9] C. Schmidt-Dannert, *Bioorg. Med. Chem.*, 1999, **7**, 2123.
- [10] J.R. Green, *Proc. Roy. Soc.*, 1890, **48**, 370.
- [11] C. Eijkman, *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene*, 1901, **29**, 841.
- [12] S. Thakur, *Int. J. Sci. Eng. Res.*, 2012, **3**, 1.
- [13] R. Sharma, Y. Chisti, U. C. Banerjee, *Biotechnol. Adv.*, 2001, **19**, 627.
- [14] K.-E. Jaeger, B.W. Dijkstra, M.T. Reetz, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1999, **53**, 315.
- [15] R.D. Schmid, Verger, R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, **37**, 1608.
- [16] *Prof. Dr. Ernest A. Sym (1893-1950)*, *Biul. Państw. Inst. Med. Morsk. Trop. J. w Gdańsku*, 1952, **4**, 3.
- [17] E. Mikulaszek, *Gruźl.*, 1951, **4**, 430.
- [18] S. Nyrek, *Med. Wet.*, 1954, 40.
- [19] W. Mozołowski, *Pol. Tyg. Lek.*, 1950, **5**, 1633.
- [20] E. Mikulaszek, *Rocz. Tow. Nauk. Warsz.*, 1950, **R.43**, 216.
- [21] E.A. Sym, *Biochem. J.*, 1936, **30**, 609.

- [22] E.A. Sym, *Enzymologia*, 1936, **1**, 156.
- [23] E.A. Sym, *Biochem. Z.*, 1933, **258**, 304.
- [24] E.A. Sym, *Biochem. Z.*, 1931, **230**, 19.
- [25] E.A. Sym, *Biochem. J.*, 1930, **24**, 1265.
- [26] E.A. Sym, *Biologia Lekarska*, 1936, **R.15 nr 6**, 245.
- [27] M.H. Coleman, A.R. Macrae, *Fat process and composition*, 1980, GB 1577933.
- [28] M. Takaharu, S. Norio, H. Yukio, H. Wataru, *Method for enzymatic interesterification of lipid and enzyme used therein*, 1981, EP 0035883.
- [29] A. Zaks, A.M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1985, **82**, 3192.
- [30] M. Masayoshi, K. Tadashi, *Optically active 4-hydroxy-2-cyclopentenones, and their production*, 1988, US 4729953.
- [31] M.A. Robin, P.F. Bolton, C.I. Christopher, *Transesterification*, 1990, EP 0417823.
- [32] J. Whittall, P. Sutton, *Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations 2*, John Wiley & Sons 2012.
- [33] A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Second Edition, Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland 2006.
- [34] C.T. Hou, *Handbook of Industrial Biocatalysis*, CRS Press, Taylor & Francis Group, LCC 2005.
- [35] N. End, K.U. Schoning, *Immobilized Biocatalysts in Industrial Research and Production w Topics in Current Chemistry*, 2004, 242, 273, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2004.
- [36] A. Idris, A. Bukhari, *Biotechnol. Adv.*, 2012, **30**, 550.
- [37] O. Kirk, M.W. Christensen, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2002, **6**, 446.
- [38] E.M. Anderson, K.M. Larsson, O. Kirk, *Biocatal. Biotransfor.*, 1998, **16**, 181.
- [39] J. Uppenberg, M.T. Hansen, S. Patkar, T.A. Jones, *Structure*, 1994, **2**, 293.
- [40] J. Uppenberg, S. Patkar, T. Bergfors, T.A. Jones, *J. Mol. Biol.*, 1994, **235**, 790.
- [41] P. Trodler, J. Pleiss, *BMC Struct. Biol.*, 2008, **8**, 9.
- [42] M. Martinelle, M. Holmquist, K. Hult, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism*, 1995, **1258**, 272.
- [43] R.A. Kemp, A.R. Macrae, *Esterification process*, 1992, Unichema Chemie BV, EP0506159.
- [44] P. Stead, H. Marley, M. Mahmoudian, G. Webb, D. Noble, Y.T. Ip, E. Piga, T. Rossi, S. Roberts, M.J. Dawson, *Tetrahedron: Asymm.*, 1996, **7**, 2247.
- [45] B. Morgan, D.R. Dodds, A. Zaks, D.R. Andrews, R. Klesse, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 7736.
- [46] A.K. Saksena, V.M. Girijavallabhan, R.G. Lovey, R.E. Pike, H. Wang, A.K. Ganguly, B. Morgan, A. Zaks, M.S. Puar, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 1787.
- [47] N. Igarashi, S. Otsutomo, M. Harata, S. Nakano, *Production of optically active trans-2-bromoidan-1-ol*, 1998, Jpn Kokai Tokkyo Koho JP10014593.
- [48] S. Bourq-Garros, N. Razafindramboa, A.A. Pavia, *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, **59**, 495.
- [49] B. Orsat, P. Spurr, B. Wirz, *Enzymatic acylation of a retinol derivative*, 1997, Eur. Pat. Appl. EP802261.
- [50] B. Orsat, B. Wirz, S. Bischof, *CHIMIA Int. J. for Chem.*, 1999, **53**, 579.
- [51] M. Mahmoudian, J. Eaddy, M. Dawson, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1999, **29**, 229.
- [52] K. Laumen, O. Ghisalba, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1999, **63**, 1374.
- [53] T. Mine, T. Yui, *Optically active secondary alcohol and process for the production thereof*, 2000, Eur. Pat. Appl. EP980860.
- [54] R. Otto, B. Geers, A. Weiss, D. Petersohn, K. Schlotmann, K.R. Schroeder, *Novel flavone glycoside derivatives for use in cosmetics, pharmaceuticals and nutrition*, 2001, PCT Int. Appl., WO0179245.
- [55] M.J. Homann, R. Vail, B. Morgan, V. Sabesan, C. Levy, D.R. Dodds, A. Zaks, *Adv. Synth. Catal.* 2001, **343**, 744.

- [56] R.J. Atkins, A. Banks, R.K. Bellingham, G.F. Breen, J.S. Carey, S.K. Etridge, J.F. Hayes, N. Hussain, D.O. Morgan, P. Oxley, S.C. Passey, T.C. Walsgrove, A.S. Wells, *Org. Process Res. Dev.*, 2003, **7**, 663.
- [57] T.C. Walsgrove, L. Powell, A. Wells, *Org. Process Res. Dev.*, 2002, **6**, 488.
- [58] A.S. Wells, *Enzymatic resolution of benzodiazepine-acetic acid esters with a lipase*, 1998, PCT Int. Appl., WO9829561.
- [59] W. Albrecht, R. Otto, *Esters of uronic acids*, 2003, Eur. Pat. Appl., EP1306443.
- [60] M. Tamarez, B. Morgan, G.S.K. Wong, W. Tong, F. Bennett, R. Lovey, J.L. McCormick, A. Zaks, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2003, **7**, 951.
- [61] R. ter Halle, Y. Bernet, S. Billard, C. Bufferne, P. Carlier, C. Delaitre, C. Flouzat, G. Humblot, J.C. Laigle, F. Lombard, S. Wilmouth, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2004, **8**, 283.
- [62] P. Ramesh, T. Harini, N.W. Fadnavis, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2015, **19**, 296.
- [63] R. Vaidyanathan, L. Hesmondhalgh, S. Hu, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2007, **11**, 903.
- [64] A. Goswami, T.P. Kissick, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2009, **13**, 483.
- [65] L.K. Thalén, J.E. Bäckvall, Beilstein J. Org. Chem., 2010, **6**, 823.
- [66] C. Korupp, R. Weberskirch, J.J. Muller, A. Liese, L. Hilterhaus, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2010, **14**, 1118.
- [67] Z. Li, Y. Zhang, M. Lin, P. Ouyang, J. Ge, Z. Liu, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2013, **17**, 1179.
- [68] Z. Guo, M.K.Y. Wong, M.R. Hickey, B.P. Patel, X. Qian, A. Goswami, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2014, **18**, 774.
- [69] G. Ma, Z. Xu, P. Zhang, J. Liu, X. Hao, J. Ouyang, P. Liang, S. You, X. Jia, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2014, **18**, 1169.
- [70] C.-J. Aurell, S. Karlsson, F. Pontén, S.M. Andersen, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2014, **18**, 1116.
- [71] C. Kim, J. Lee, J. Cho, Y. Oh, Y.K. Choi, E. Choi, J. Park, M.-J. Kim, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 2571.
- [72] A. Ghanem, H.Y. Aboul-Enein, *Chirality*, 2005, **17**, 1.
- [73] T. Schulz, J. Pleiss, R.D. Schmid, *Protein Sci.*, 2000, **9**, 1053.
- [74] D.A. Lang, M.L.M. Manesse, G.H. De Haas, H.M. Verheij, B.W. Dijkstra, *Eur. J. Biochem.*, 1998, **254**, 333.
- [75] K.K. Kim, H.K. Song, D.H. Shin, K.Y. Hwang, S.W. Suh, *Structure*, 1997, **5**, 173.
- [76] J.D. Schrag, Y. Li, M. Cygler, D. Lang, T. Burgdorf, H.-J. Hecht, R. Schmid, D. Schomburg, T.J. Rydel, J.D. Oliver, L.C. Strickland, C.M. Dunaway, S.B. Larson, J. Day, A. McPherson, *Structure*, 1997, **5**, 187.
- [77] A. Mezzetti, J.D. Schrag, C.S. Cheong, R.J. Kazlauskas, *Chem. Biol.*, 2005, **12**, 427.
- [78] R. Patel, C. McNamee, L. Szarka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992, **38**, 56.
- [79] R.A. Parker, R.W. Clark, S.Y. Sit, T.L. Lanier, R.A. Grosso, J.J. Wright, *J. Lipid Res.*, 1990, **31**, 1271.
- [80] R. Patel, M. Liu, A. Banerjee, L. Szarka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1992, **37**, 180.
- [81] R.N. Patel, A. Banerjee, R.Y. Ko, J.M. Howell, W.S. Li, F.T. Comezoglu, R.A. Partyka, F.T. Szarka, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1994, **20**, 23.
- [82] R.N. Patel, *Enzymatic processes for the resolution of enantiomeric mixtures of compounds useful as intermediates in the preparation of taxanes*, 1995, Eur. Pat. Appl., EP634492.
- [83] J.C. Sih, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, **73**, 1377.
- [84] H. Hirohara, M. Nishizawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1998, **62**, 1.
- [85] A. Goswami, J.M. Howell, E.Y. Hua, K.D. Mirfakhrae, M.C. Soumeillant, S. Swaminathan, X. Qian, F.A. Quiroz, T.C. Vu, X. Wang, B. Zheng, D.R. Kronenthal, R.N. Patel, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2001, **5**, 415.
- [86] Y. Momose, T. Maekawa, T. Yamano, M. Kawada, H. Odaka, H. Ikeda, T. Sohda, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 1518.
- [87] Y. Norimine, N. Yamamoto, Y. Suzuki, T. Kimura, K. Kawano, K. Ito, S. Nagato, Y. Iimura, M. Yonaga, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2002, **13**, 1493.
- [88] O.-J. Park, S.-H. Lee, T.-Y. Park, W.-G. Chung, S.-W. Lee, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2006, **10**, 588.

**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

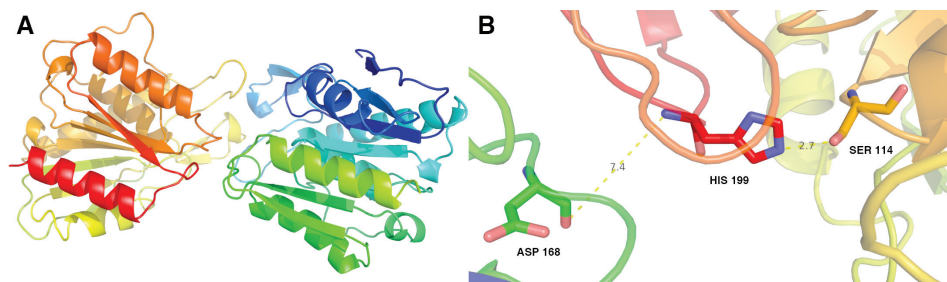
Biotechnologia jest uważana za jedną z dziedzin, która może decydować o prawidłowym rozwoju gospodarki w XXI wieku i co za tym idzie o postępie cywilizacyjnym oraz technicznym. Bardzo ważną rolę w rozwoju tej dziedziny odgrywa kataliza enzymatyczna, wchodząca w skład tzw. „białej biotechnologii”. Zaletą 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)

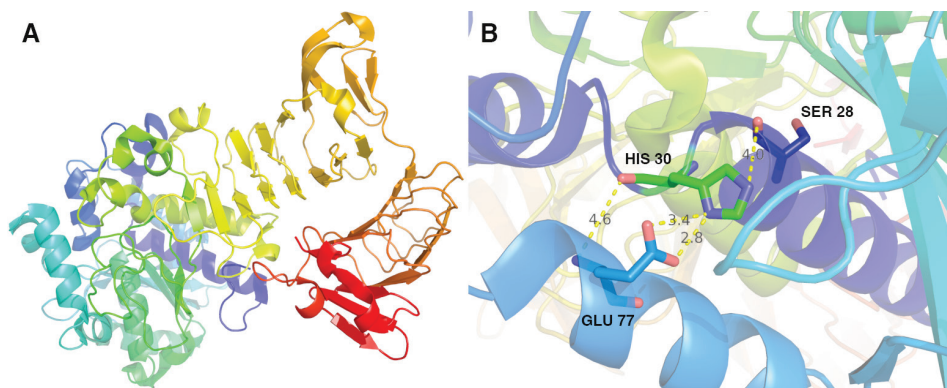
Lipaza izolowana z bakterii tlenowej *Pseudomonas fluorescens* (PFL) jest obok lipazy B z *Candida antarctica* oraz lipazy z *Burkholderia cepacia* najczęściej stosowanym enzymem w kinetycznych rozdzielach mieszanin racemicznych. PFL jest jednak zdecydowanie rzadziej używana w procesach przemysłowych 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].



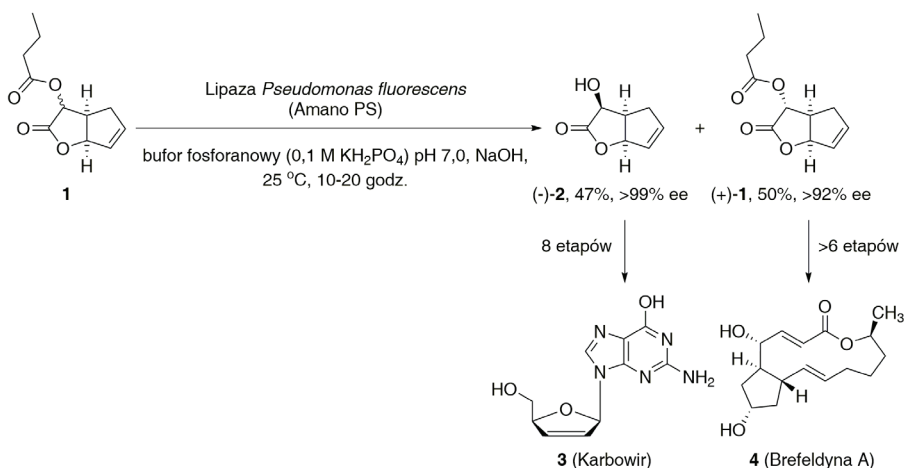
Rysunek 2. (A) Struktura 3D lipazy z *Pseudomonas sp.* MIS38 (PDB ID: 2Z8X). (B) Ułożenie przestrzenne reszt aminokwasowych (AK) wchodzących w skład tzw. „triady katalitycznej” (Glu 77, His 30, Ser 28) należącej do centrum aktywnego [wzajemne odległości między AK podane zostały w Angstrmach]. Struktura 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-

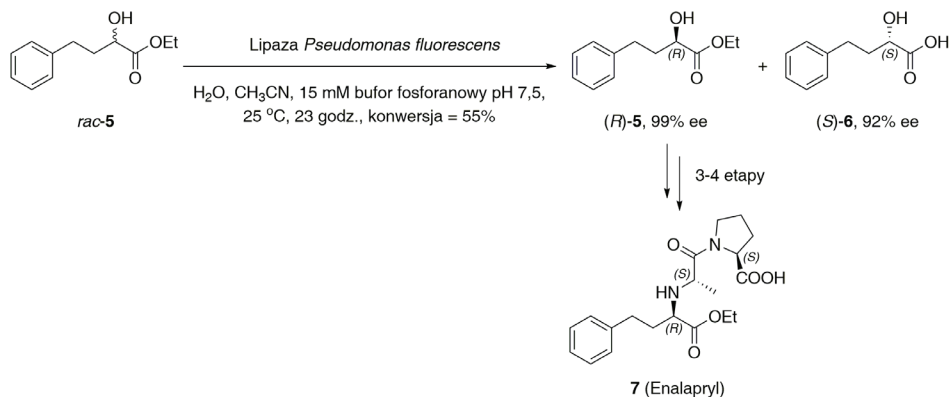
cowany w skali 2,4 kg użytego substratu **1** przez angielską firmę *Celltech Group plc*, a rozdzielone w ten sposób enancjomery wydzielone chromatograficznie w postaci powstałego alkoholu (-)-**2** (>99% ee) oraz nieprzereagowanego estru (+)-**1** (92% ee) posłużyły odpowiednio do syntezy bardzo skutecznego 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)

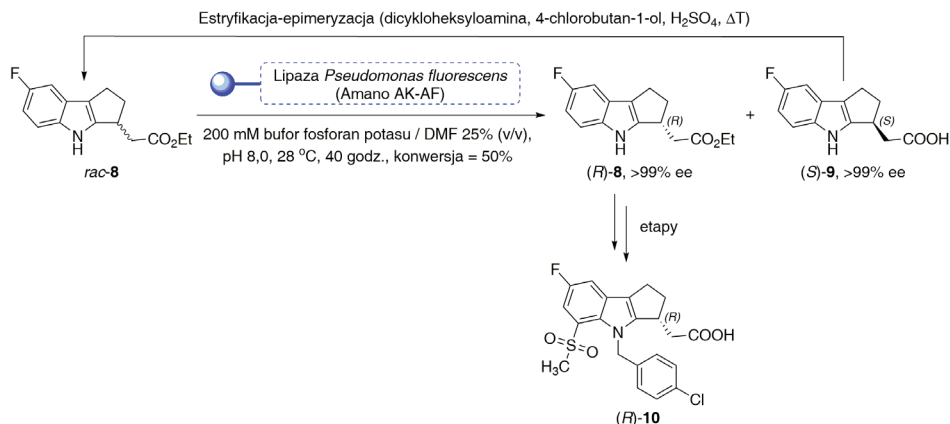
Zastosowanie przez hiszpańską firmę *Vita-Invest S.A.* natywnej lipazy z *Pseudomonas fluorescens* w procedurze hydrolitycznego rozdziału kinetycznego 2-hydroksy-4-fenyllobutanianu etylu (*rac*-**5**) przyczyniło się do opracowania wydajnej technologii produkcji enalaprylu (**7**) – leku należącego do 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.



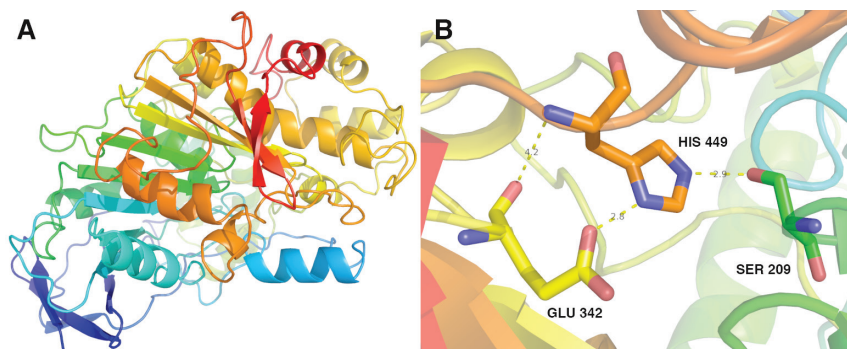
Schemat 3. Chemoenzymatyczna synteza antagonisty receptora prostaglandyn D2 (DP) [(R)-10] katalizowana lipazą Amano AK-AF

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 przeobrażenia licznej grupy ksenobiotyków, włącznie z tymi o bardzo rozbudowanych

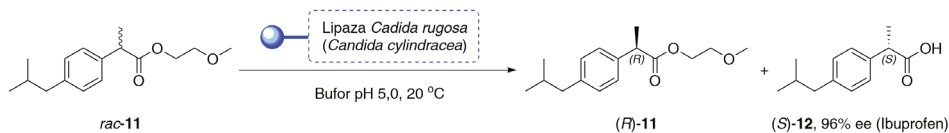
strukturach, które nie są w stanie dyfundować do centrów katalitycznych innych lipaz o węższych kieszeniach. Niestety, wielkość tej kieszeni, w której znajduje się centrum aktywne, stanowi dodatkowo też wadę, gdyż uniemożliwia w wielu przypadkach zachowanie pożądanej selektywności wobec biotransformowanych 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

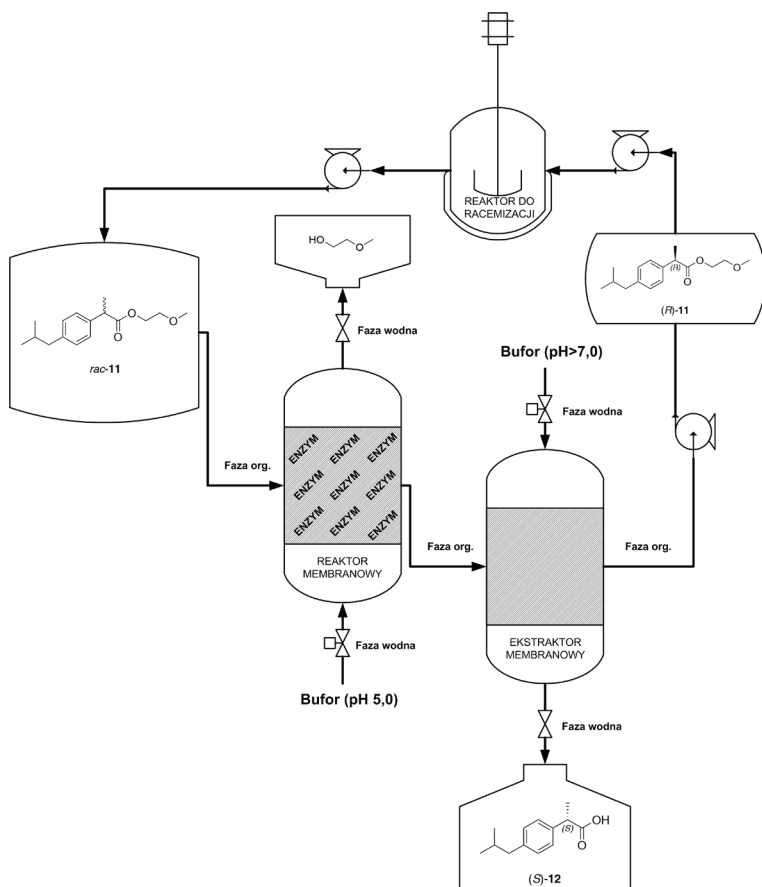
Historycznie pierwszym, w pełni komercyjnym procesem biokatalitycznym z udziałem lipazy z *Candida rugosa* (*cylindracea*) jest opracowana przez międzynarodowy koncern *Pfizer Inc.* przemysłowa metoda syntezy farmakologicznie czynnego (S)-(+)-enancjomeru ibuprofenu [(S)-**12**] (deksibuprofenu) – jednego 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 doprowadzano odpowiednio do odczynu kwaśnego. Natomiast w fazie organicznej pozostaje wówczas nieprzereagowany chiralny ester (R)-11, który poddany racemizacji może być ponownie wykorzystywany.

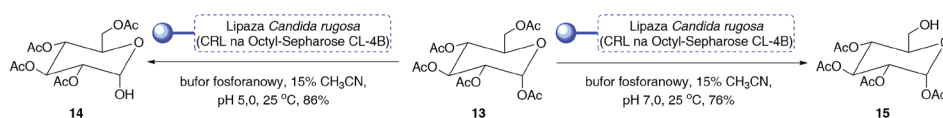


Schemat 5. Schemat technologiczny produkcji deksibuprofenu [(S)-12]

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

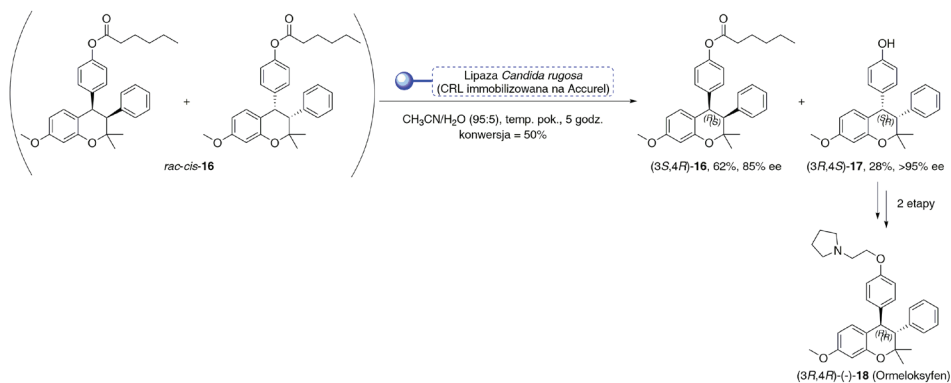
acetonitrylu, w temperaturze 25°C). Dodatkowym atutem procesu jest zastosowanie lipazy z *Candida rugosa* immobilizowanej na oktylo-sefarozie (Octyl-Sepharose CL-4B), co pozwoliło zwiększyć jej aktywność hydrolityczną prawie 100-krotnie w porównaniu z natywnym enzymem oraz powtórnie zastosować ją w co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

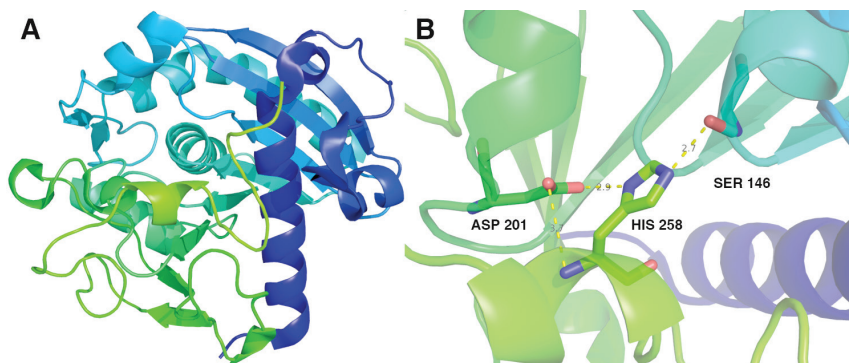


Schemat 7. Chemoenzymatyczna synteza enancjomerycznie wzbogaconego (-)-ormeloksyfenu [(3R,4R)-(-)-**18**] z zastosowaniem lipazy z *Candida rugosa* immobilizowanej na Accurel®

Scheme 7. Chemoenzymatic synthesis of enantiomerically enriched (-)-ormeloxifene [(3R,4R)-(-)-**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 Å × 45 Å × 50 Å 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 alkalofilów”, 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.

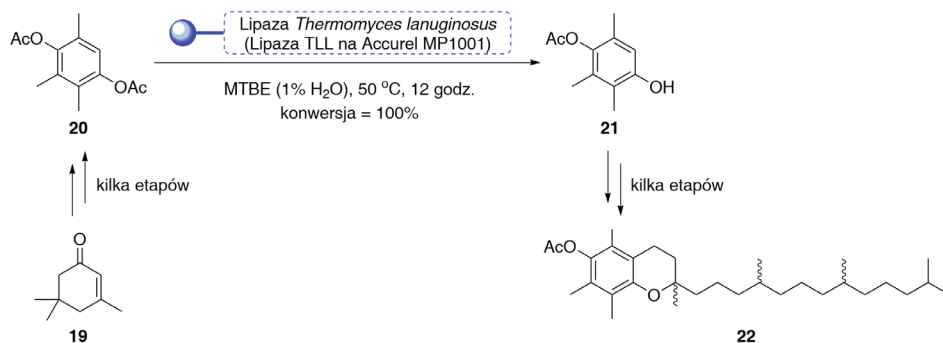


Rysunek 4. (A) Struktura 3D lipazy z *Thermomyces lanuginosus* (PDB ID: 1DTE). (B) Ułożenie przestrzenne reszt aminokwasowych (AK) wchodzących w skład tzw. „triady katalitycznej” (Asp 201, His 258, Ser 146) należącej do centrum aktywnego TLL (wzajemne odległości między AK podane zostały w Angstrmach). 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 diocetan 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 diocetanu **20**, której nie sposób przeprowadzić wyłącznie za pomocą metod chemicznych, ale również całkowite zastąpienie dotychczas stosowanego w przemyśle nevalgicznego 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-

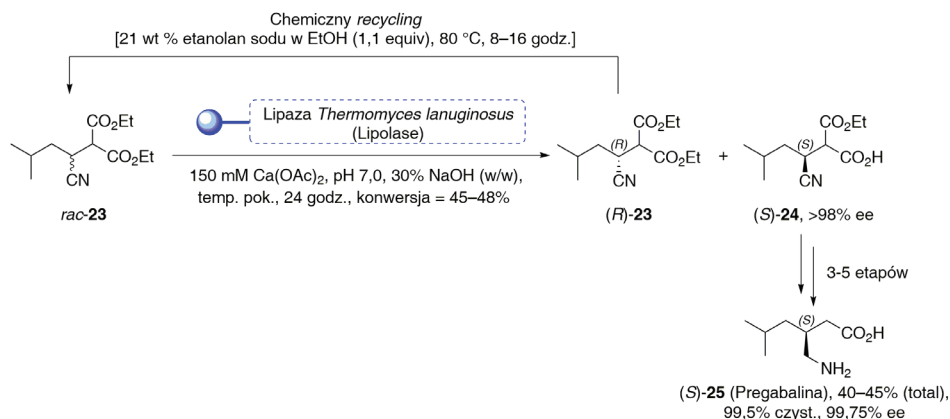
wania UV co powoduje, że jest on chętniej wykorzystywany jako przeciwutleniacz w produktach spożywczych i/lub jako surowiec kosmetyczny wchodzący w skład kremów, ze względu na możliwość dłuższego ich przechowywania.



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 otrzymania tego leku polega na enzymatycznej hydrolizie racemicznego estru etylowego kwasu 2-karboksyetylo-3-cyano-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-cyano-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**.

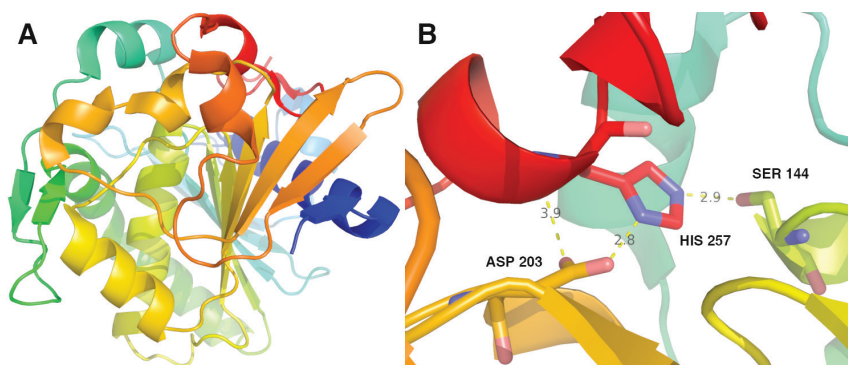


Schemat 9. Chemoenzymatyczna synteza pregabaliny [(*S*)-25] katalizowana lipazą z *Thermomyces lanuginosus* w formie usieciowanego agregatu (Lipolase*)

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).



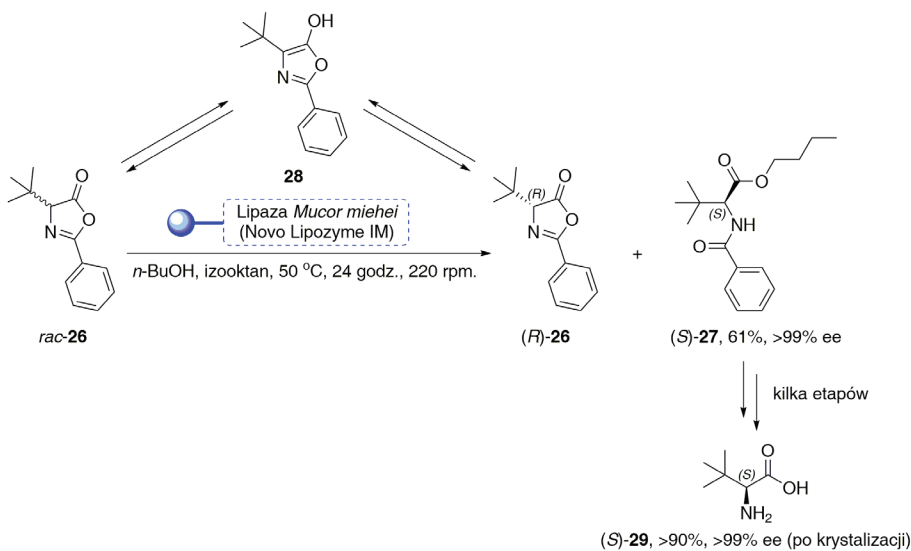
Rysunek 5. (A) Struktura 3D lipazy z *Mucor miehei* (PDB ID: 3TGL). (B) Ułożenie przestrzenne reszt aminokwasowych (AK) wchodzących w skład tzw. „triady katalitycznej” (Asp 203, His 257, Ser 144) należącej do centrum aktywnego RML (wzajemne odległości między AK podane zostały w Angstromach). Struktura 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-

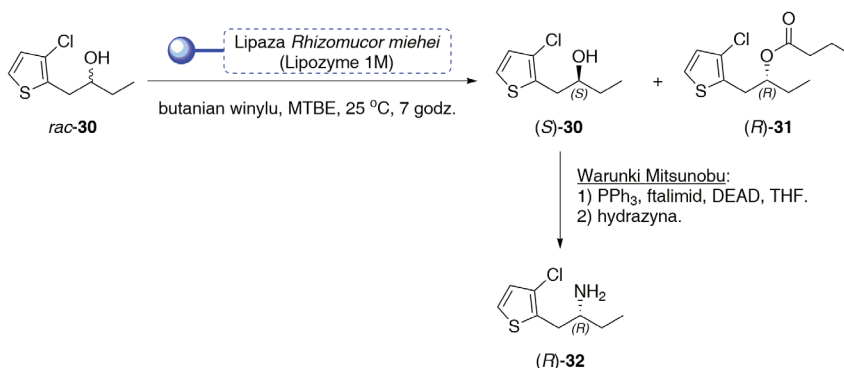
giczne *Celltech Group plc* produkcja syntetycznego aminokwasu – (*S*)-*tert*-leucyny [(*S*)-**29**] (Schemat 10) [155]. Związek ten, ze względu na swoje właściwości głównie związane ze sterycznie rozbudowaną grupą *tert*-butylową, jest niezmiernie cennym blokiem budulcowym dla wielu chiralnych pomocników, 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 azalaktonu *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 azalaktonu 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 hydroliza wiązania amidowego w warunkach kwasowych powodowałaby spontaniczną re-cyklizację z odtworzeniem stereochemicznie labilnego azalaktonu 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.



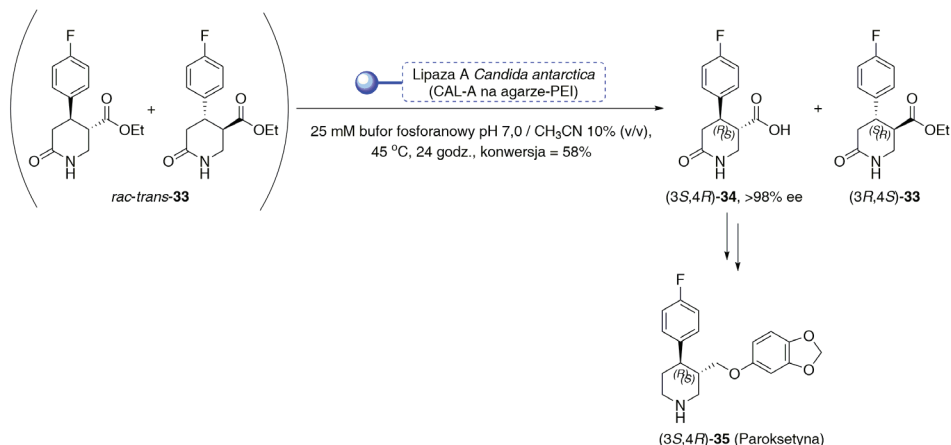
Schemat 11. Chemoenzymatyczna synteza (*R*)-2-(2-aminobutyl)-3-chlorotiofenu [(*R*)-32] z zastosowaniem immobilizowanej lipazy z *Rhizomucor miehei* (Lipozyme 1M)

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 trzustkowa (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.

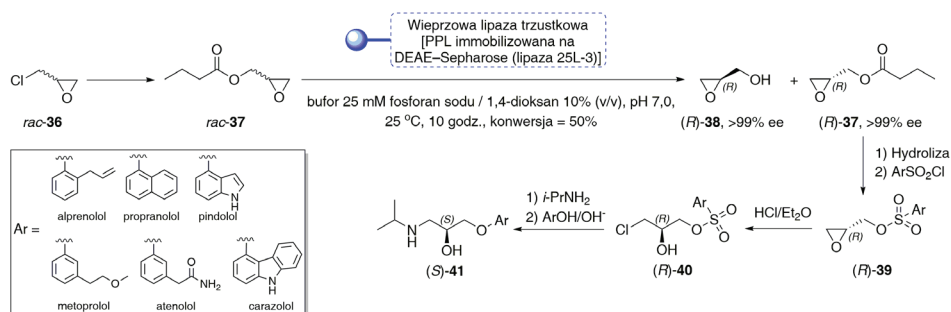


Schemat 12. Chemoenzymatyczna synteza paroksetyny [(3S,4R)-35] z zastosowaniem lipazy A z *Candida antarctica* immobilizowanej na agarze-PEI

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 otrzymywanych (*S*)- β -blokerów są minimalne.

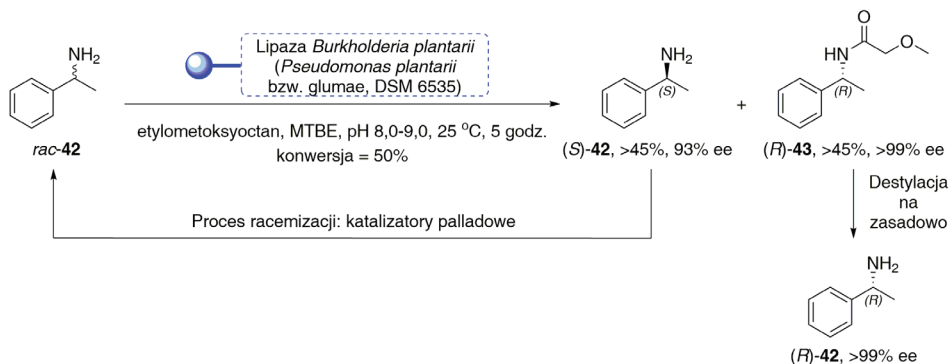


Schemat 13. Chemoenzymatyczna synteza optycznie czynnych (*S*)- β -blokerów otrzymanych w oparciu o rozdział kinetyczny butanianu glicydotu (*rac*-37) katalizowanego ekstraktem (wyciągiem) lipazy z trzustki wieprzowej (PPL) immobilizowanym na modyfikowanej agarozie (DEAE–Sepharese)

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) otrzymywano 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

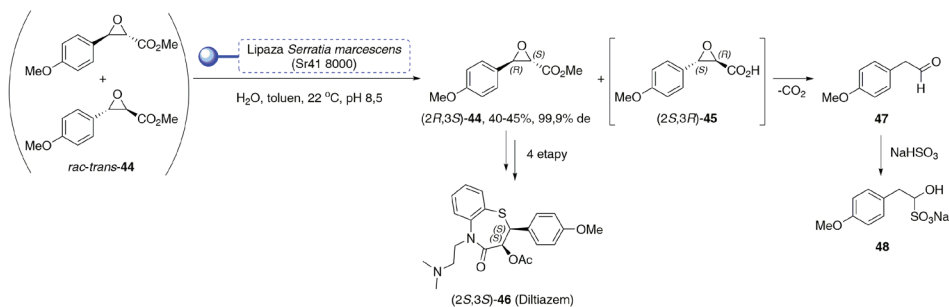
50%. Proces prowadzony jest w systemie przepływowym w sposób półciągły w skali 1,65 M (200 g×litr⁻¹) użytego substratu *rac*-**42**.



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 wapienowy typu L), stosowanego w leczeniu nadciśnienia tętniczego oraz choroby niedokrwiennej serca (Schemat 15) [163, 164].

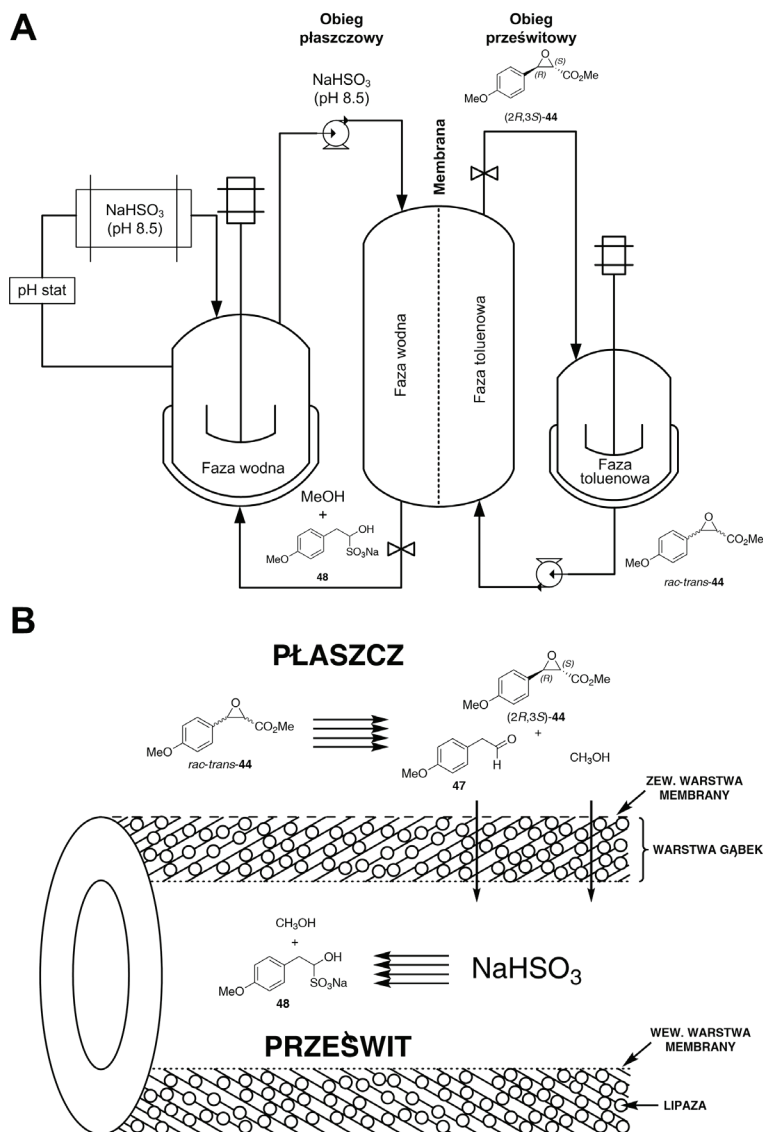


Schemat 15. Chemoenzymatyczna synteza diltiazemu [(2*S*,3*S*)-**46**] katalizowana rekombinowaną lipazą z *Serratia marcescens* (Sr41 8000)

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-metoksyfenylo)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.

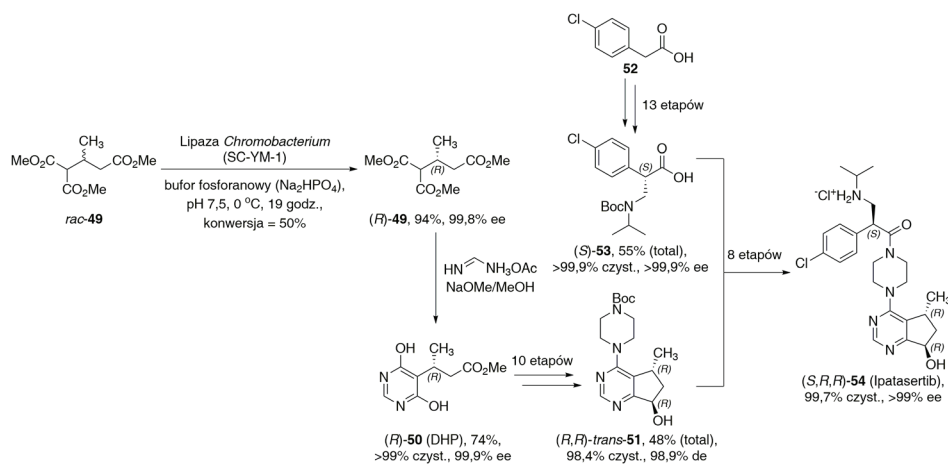


Schemat 16. (A) Schemat technologiczny syntezy diltiazemu [(2*S*,3*S*)-**46**] w przepływowym reaktorze membranowym; (B) Budowa oraz mechanizm działania membrany

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 monochlorowodorku 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 monochlorowodorku 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. Whittall, 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. Org. 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. Steunenberg, 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-oxabicyclo[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. Niemyer, *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.

**BIOCHEMICZNA REWOLUCJA, CZYLI RZECZ
O LEONIE MARCHLEWSKIM I MARCELIM NENCKIM**

**BIOCHEMICAL REVOLUTION – SOME
REMARKS ABOUT LEON MARCHLEWSKI’S
AND MARCELI NENCKI’S ACHIEVEMENTS**

Ryszard W. Gryglewski

*Katedra Historii Medycyny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków
e-mail: wgryglew@cm-uj.krakow.pl*

*Poniższy artykuł jest rozwinięciem treści i tez zawartych w wystąpieniu referatowym
o tym samym tytule podczas X Ogólnopolskiego Sympozjum Chemii Organicznej
– OSCO X. Łódź, 16–18 kwietnia 2015 r.*

Abstract

Wprowadzenie

1. Pomiędzy filozofią i alchemią
2. Narodziny chemii organicznej i biochemii
3. Marceli Nencki i jego badania nad hemoglobina
4. Leon Marchlewski i jego zainteresowanie chlorofilem
5. Wspólne badania Marchlewskiego i Nenckiego

Zakończenie

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. Ryszard W. Gryglewski, prof. UJ urodził się w 1966 roku. Studia historyczne odbył na Uniwersytecie Jagiellońskim. Od 2000 r. związany z Katedrą Historii Medycyny Collegium Medicum UJ.

ABSTRACT

Understanding of the fundamental law and mechanisms governing the phenomenon of life is an inherent feature of human civilization. With the birth of philosophy comes first speculation about the physical conditions of life processes, which consequently will lead to the formation of the first scientific theories. Among them an important role plays the Hippocratic humoral theory. This scientific rout will be taken by the next generations of researchers seeking for the most appropriate methods and precise language of science. A significant breakthrough came in the 16th century, when Paracelsus coined his philosophical and alchemical doctrine which gives such attention to perpetual changes in living organisms, then described on the basis of transmutation. Nearly three centuries later, in the early nineteenth century the polish physician and chemist Jędrzej Śniadecki introduced the concept of metabolism, based on the principles that are present in compounds and chemical reactions. Just a dozen years later, in 1828, Wöhler's synthesis of urea gives birth to organic chemistry. Language of chemistry has become a tool for the description of biological phenomena, slowly building up physiological chemistry which shortly was turned to biochemistry. For a young science one of the first challenges was the level of the rudimental for the living organisms dyes, which rightly appeared as essential for the understanding of the chemical nature of the phenomena of life. From that point the studies on chlorophyll (Pelletier, Caventou, Shunck, Hoppe-Seyler) and hemoglobin (Hünefeld, Funke, Hoppe-Seyler) become crucial topic. In this pioneering studies significant, and sometimes decisive role was to be played by Polish scientists (Teichmann, Marchlewski, Nencki, Zaleski). Especially a few years' time and very intense cooperation of Leon Marchlewski and Marcel Nencki would bring momentous decision. Marchlewski's bold hypothesis about the chemical unity on the level of the basic dyes in plant and animal worlds was fully confirmed in the experimental procedure and the results achieved by Nencki brought the solution to the problem of the chemical structure of hemin. Joint research of Polish scientists became the foundation of modern biochemistry and had changed the biological and medical sciences so deeply, that we can talk about "biochemical revolution". The following paper is an evaluation of the speech held by me during X National Organic Chemistry Symposium – OSCO X, Lodz, April 16–18, 2015.

Keywords: biochemistry, organic chemistry, chlorophyll, haemoglobin, Marchlewski, Nencki

Słowa kluczowe: biochemia, chemia organiczna, chlorofil, hemoglobina, Marchlewski, Nencki

WPROWADZENIE

Nauka w najogólniejszym ujęciu jest opisem świata, dzięki któremu możemy zrozumieć otaczające nas zjawiska. Nie trzeba przekonywać, że to co decyduje o jakości tego opisu w głównej mierze zależy od języka jakim się posługujemy. Z niego bowiem i w oparciu o niego budujemy nasze drogi poznania, na nim wspiera się gmach metodyki badawczej. Rozumiał to już Platon, który w dialogu *Kratylos* snuł rozważania o naturze nazw dawanych przedmiotom i zjawiskom. Odtąd problem języka jest stale obecny w rozważaniach filozofów, później zaś podejmowany był wielokrotnie przez teoretyków i historyków nauki.

Fascynacja zjawiskiem życia jest jednym z fundamentów ludzkiej kultury. To na jej gruncie od najdawniejszych czasów zyskiwało swoje wyjaśnienie, zajmując w równym stopniu mędrców, kapłanów i artystów. Nieuchronnie stawało się przedmiotem zainteresowania tych, którym powierzano opiekę nad zdrowiem. Chcąc zrozumieć czym w istocie jest choroba i pragnąc znaleźć skuteczne remedia odwoływali się, co rozumiały, do wyobrażeń ukształtowanych w rytuałach i podaniach religijnych. Nie ulega dziś wątpliwości, że u swego zarania język medycyny był w istocie językiem magii – nie bez przyczyny słowa *medicus* i *magicus* brzmią dla naszego ucha tak podobnie, a supranaturalizm przenikał niemal każdą, choćby najzwyczajszą czynność uzdrowiciela. I nawet jeśli z czasem do głosu zaczyna dochodzić filozoficzna spekulacja, która stara się porządkować obraz świata wedle ściślejszych, powiedzielibyśmy matematyczno-fizycznych reguł, to nie jest ona w stanie przewyciężyć tej pierwotnej, zakorzenionej w prehistorii wiary w niematerialną przyczynę wszelkich zjawisk. Dopiero schyłek epoki średniowiecza, wraz z rodzącym się odrodzeniem, miał przynieść ze sobą głębsze zmiany. Jednym z heroldów nowego języka nauki stał się Paracelsus, którego postać nawet wobec upływu czasu nie przestaje intrygować historyków.

1. POMIĘDZY FILOZOFIĄ I ALCHEMIĄ

Żywot Phillippusa Aureolusa Theophrastusa Bombastusa von Hohenheima (1493/4–1541), znanego powszechnie pod przydomkiem Paracelsus jest, pomimo gruntownych dociekań wielu już pokoleń badaczy, pełen niejasności, a fakty mieszają się z plotką, nierzadko pomówieniem [1, 2]. Ten oskarżany o awanturnictwo i niemoralność, wagabunda i wieczny wędrowiec, balansujący na granicy prawa i zresztą często tę granicę przekraczając, był jednym z najoryginalniejszych i błyskotliwych umysłów swojej epoki. Wychodząc z mistycznej i magicznej tradycji alchemików, której wszak nigdy nie porzucił, dostrzegał w mechanizmie transmutacji i poszukiwaniach kamienia filozoficznego ideę mogącą dopomóc w zrozumieniu fenomenu życia. Nie chodziło jednak tym razem o filozoficzne spekulacje ubrane w astronomiczną symbolikę, jak to wcześniej często bywało. Paracelsus dążył do wykazania, że istotą życia jest ciągły proces przemian zachodzących w organizmie

i że ów proces należy opisać za pomocą praw fizykalno-chemicznych [3]. Stąd też jego nauka o leku opierała się na możliwie gruntownym badaniu różnych substancji chemicznych i próbach ich dopasowania do terapii konkretnych schorzeń. Tym samym jego wykład stanął u podstaw kierunku jatrochemicznego, szukającego wyjaśnienia zjawisk biologicznych, w tym również przyczyny schorzeń, w substancjach i reakcjach chemicznych. Najwybitniejszym przedstawicielem jatrochemii będzie działający w XVII stuleciu flamandzki uczoney Jan Baptista van Helmont [3, 4]. Tak oto język chemii po raz pierwszy zaczął służyć medycynie, jakkolwiek było jeszcze za wcześnie by mógł odegrać decydującą rolę. Na przeszkodzie stały tak względy natury technicznej, jak i ówczesny stan wiedzy, co nader często kierowało uczonych na stary szlak spekulacji.

Dopiero oświecenie, które przyniosło ze sobą fizykę Izaaka Newtona i chemię Antoine Lavoisiera, a także narodziny kliniki lekarskiej i fizjologii doświadczalnej, otworzyło nowy rozdział w dziejach nauk przyrodniczych. Znaczący wpływ, w tym również na medycynę, wywarł kantyzm, inicjując na nowo dyskusję wokół natury i granic ludzkiego poznania [5]. I to właśnie z doświadczeń tej epoki wyrastał Jędrzej Śniadecki (1768–1838), twórca podstaw nowoczesnej chemii na ziemiach polskich, który na kartach znakomitego traktatu filozoficzno-przyrodniczego *Teoria jestestw organicznych* sformułował zasadę przemiany materii. Dzieło Śniadeckiego było jedną z pierwszych tak dojrzałych teorii biologicznych mających źródło w chemicznym ujęciu zjawisk życiowych [6, 7]. Tym samym idea wyrażona blisko trzy stulecia wcześniej przez Paracelsusa znalazła teraz swój pełny wyraz. Jak się miało okazać moment narodzin chemii organicznej był już bardzo bliski.

2. NARODZINY CHEMII ORGANICZNEJ I BIOCHEMII

W 1818 roku dwóch francuskich przyrodników Pierre Joseph Pelletier (1788–1842) and Jean Bienaime Caventou (1795–1887), stosując już metodykę chemiczną w badaniu alkaloidów, zdołało wyizolować podstawowy barwnik światła roślinnego, który zyskał nazwę chlorofilu [8]. Dla wielu nie ulegało wówczas wątpliwości, że to właśnie na poziomie barwnikowym należy poszukiwać odpowiedzi na fundamentalne pytania o istotny charakter funkcji życiowych organizmów. Badania nad chlorofilem utknęły jednak na wiele lat w martwym punkcie, co wiązało się z brakiem skutecznej metodyki uzyskiwania trwałych pochodnych w krystalicznej postaci. Ten problem udało się rozwiązać znacznie później dwóm rosyjskim badaczom Borodinowi i Monteverdemu.

Tymczasem w 1828 roku niemiecki chemik Friedrich Wöhler (1800–1882) przeprowadził udaną syntezę mocznika z cyjanianu amonu [9]. Stało się to przypadkiem podczas próby otrzymania soli amonowej kwasu cyjanowego (tj. izocyjanianu amonu, NH_4NCO). Tym samym związek organiczny – mocznik został zsyntetyzowany z substancji nieorganicznej. Było to praktycznym potwierdzeniem

hipotezy stawianej przez Śniadeckiego, że związki nieorganiczne w toku przemiany mogą przechodzić w związki organiczne. Eksperyment Wöhlera jest uznawany za faktyczny początek chemii organicznej.

Tak jak zielony barwnik świata roślinnego, tak czerwona barwa krwi przykuwała uwagę coraz liczniejszego grona badaczy. W 1840 roku niemiecki lekarz i chemik Friedrich Ludwig Hünefeld (1799–1882) jako pierwszy opisał hemoglobinę [10, 11]. Wykorzystał w tym celu krew dżdżownicy, którą uchwycił pomiędzy dwie szklane płytki i pozwolił wyschnąć. Wówczas dostrzegł charakterystyczne kryształki, które pod mikroskopem miały wyraźnie wyrażone ostre krawędzie i jasnoczerwoną barwę. Niebawem inni uczeni w pełni potwierdzili wyniki uzyskane przez Hünefelda, wykazując że podobne krystaliczne struktury można dostrzec w krwi innych gatunków zwierząt. W 1851 roku niemiecki fizjolog Otto Funke (1828–1879) zdołał opracować sposób pozyskiwania krystalicznej postaci hemoglobiny – „Hämoglobinkristalle”, otwierając tym samym drogę do dalszych badań nad chemiczną strukturą barwnika krwi [12]. W dwa lata później, wówczas student III roku medycyny, później zaś profesor Uniwersytetu Jagiellońskiego, jeden z najzdolniejszych preparatorów drugiej połowy XIX wieku, któremu zawdzięczamy pierwszy w świecie pełny opis układu chłonnego, Ludwik Karol Teichmann (1823–1895) opracował prostą i skuteczną metodę pozyskiwania krystalicznej postaci barwnika krwi, czyli heminy [13, 14]. Używając lodowego kwasu octowego w obecności soli poddawał próbki krwi działaniu podwyższonej temperatury. Po wystudzeniu otrzymywał charakterystyczne kryształy, czyli chlorheminę, zwaną też heminą Teichmanna. Popularnie zaczęto je określać mianem „kryształków Teichmanna”. Ta prosta metoda znalazła swoje praktyczne zastosowanie w kryminalistyce oraz miała decydujący wpływ na postęp badań nad barwnikiem krwi i jego pochodnymi.

Dysponujący doskonałą techniką badawczą niemiecki fizjolog i chemik Ernst Felix Immanuel Hoppe-Seyler (1825–1895) jako pierwszy prowadził wielokierunkowe badania nad płynami ustrojowymi, tworząc podstawy współczesnej biochemii [15]. Był pierwszym, który w 1862 roku opisał charakter widma absorpcyjnego barwnika krwi. Udowodnił, że w warunkach bez dostępu tlenu hemoglobina daje hemochromogen, który w obecności tlenu daje hematynę. Jemu też należy przypisać wskazanie na istotną rolę hemoglobiny w wiązaniu w erytrocytach tlenu. Zaobserwował również charakterystyczne cechy chemiczne i fizyczne jednej z pochodnych heminy – hematoporfiryny, jak również zdołał uzyskać jedną z pochodnych chlorofilu, której purpurowa barwa tak bardzo przypominała hematoporfirynę, że ze względu na to podobieństwo nazwano ją filoporfiryną.

3. MARCELI NENCKI I JEGO BADANIA NAD HEMOGLOBINĄ

Postacią która miała odegrać kluczową rolę w dalszych badaniach nad chemiczną strukturą hemoglobiny był polski lekarz i chemik Marceლი Nencki (1847–1901) [16–18]. Powstaniec styczniowy, zmuszony do emigracji, zaczynał studia od historii

i filologii klasycznej, z których jednak ostatecznie zrezygnował na rzecz medycyny. Absolwent wydziału lekarskiego znakomitego uniwersytetu w Berlinie, zdobywający pierwsze szlify badawcze w laboratorium Augusta Bayera, znalazł dla siebie miejsce w szwajcarskim Bernie, gdzie w 1877 roku specjalnie dla niego utworzono katedrę chemii fizjologicznej wraz z przysługującą mu profesurą. Nencki miał wówczas ledwie 30 lat. W niedługim czasie Berno zyskało sobie sławę znakomitego, przyciągającego młodych badaczy ze wszystkich krajów Europy ośrodka badań biochemicznych, a nazwisko polskiego biochemika stało się znane w świecie nauki. Nie dziwi zatem propozycja, jaką złożył mu książę Aleksander Piotrowicz Oldenburski, kurator powołanego do życia Instytutu Medycyny Doświadczalnej w Petersburgu. Tworzony wedle najlepszych wzorców miał stać się najnowocześniejszą placówką dla nauk eksperymentalnych w rosyjskim imperium. Księciu Oldenburskiemu oświadczenie zależało, by Nencki zechciał objąć kierownictwo Zakładu Chemii. Nie tylko puszczono w niepamięć jego udział w powstaniu przeciw carowi, lecz przeznaczono duże środki finansowe wraz z wolną ręką w zakupie potrzebnego wyposażenia laboratoriów i doborze współpracowników. Mimo tak korzystnych warunków Nencki długo się wahał. Ostatecznie jednak przystał na propozycję i w 1891 roku przeniósł się do miasta nad Newą. Wraz z nim przybyła grupa uczniów i współpracowników dając początek nowej, rosyjskiej szkole biochemicznej. Miał tutaj przepracować kolejnych dziesięć lat aż do swojej przedwczesnej śmierci w 1901 roku [19].

Nencki ma swoje stałe miejsce w historii nauki. Był bez wątpienia jednym z twórców biochemii, która stopniowo stawała się podstawą nowoczesnego opisu w naukach przyrodniczych, w tym medycyny. Ten erudyta – znał biegle osiem języków – dysponujący wręcz fenomenalną pamięcią imponował współczesnym rozległością swojej wiedzy. Młodzieńcza fascynacja historią i filozofią nadawała jego ścisłym rozważaniom swoistej „humanistycznej” oprawy, a lingwistyczne zdolności przekładały się na postrzeganie chemii jako języka opisu procesów zachodzących w organizmach żywych. Nadawały też spójności różnym, często biegnącym równoległe kierunkom badawczym, które niczym rozdziały w księdze tworzą wspólnie opowieść. Dlatego też śledząc dorobek naukowy polskiego uczonego odnajdujemy cykle prac, które można uznać za przynależne chemii organicznej, w tym w szczególności chemii barwników, biochemii bakterii, epidemiologii i farmakologii.

Przebywając jeszcze w Bernie Nencki zainteresował się strukturą chemiczną barwnika krwi, które to zagadnienie było jednym z centralnych dla rozważań rodzącej się wówczas chemii fizjologicznej czyli biochemii. W latach 1880. wraz ze współpracownikami, w tym w szczególności z Nadiną Sieber (1854–1916), przeprowadził cykl badań eksperymentalnych, których wyniki w istotny sposób miały wpłynąć na rozwój nauki [20, 21]. Opracowano wówczas nową metodę pozyskiwania heminy bezpośrednio z hemoglobiny na drodze wielostopniowego procesu z zastosowaniem zwykłej soli kuchennej oraz alkoholu amyłowego, która pozwalała na uzyskanie czystszej jej postaci niż osiągnęli to wcześniej Teichmann i Hoppe-Seyler. Odkryto też skuteczną metodę pozyskiwania pochodnej heminy, z której usunięto żelazo –

hematoporfiryny, a którą otrzymywano bezpośrednio z hematyny. Jednocześnie udało się ustalić budowę chemiczną hematoporfiryny oraz podać jej wzór [22–26]. Jak się miało w niedalekiej przyszłości okazać będzie to miało kluczowe znaczenie dla dalszych postępów w pracach nad chemią krwi. To także duetowi Nencki-Sieber można przypisać jedną z pierwszych udanych krystalizacji oksyhemoglobiny z krwi żyłnej [27]. Było to zadanie niezwykle trudne ze względu na nietrwałość łączenia tlenu z hemoglobina. Istotnym, gdyż wskazującym na bliskie chemiczne pokrewieństwo w obrębie struktur barwników, było udowodnienie takiej właśnie zależności pomiędzy heminą a barwnikiem żółciowym urobiliną [28, 29]. Wszystko to prowadziło w konsekwencji do stworzenia podstaw dla jednego z przełomowych w historii nauk przyrodniczych cyklu badań.

W pierwszej połowie lat 1890. Nencki koncentrował się na innych problemach badawczych, wśród których dominowały zagadnienia bakteriologiczne i epidemiologiczne. Prowadził też program eksperymentalny poświęcony chemii soków żołądkowych. Na ten czas przypada bliższa współpraca ze znakomitym fizjologiem i późniejszym odkrywcą odruchów warunkowych Iwanem Pawłowem. Już pierwsze wyniki doświadczeń były na tyle obiecujące, że w 1894 r. Nencki otrzymał specjalne stypendium fundowane przez nikogo innego jak Alfreda Nobla! Na marginesie należy zapisać, że Nencki wydatnie pomógł Pawłowowi w przygotowaniu niemieckiej edycji jego „Wykładów o czynności głównych gruczołów trawiennych” (1897) – „Die Arbeit der Verdauungsdrüsen” (1898) [30]. To dzięki tej pracy nazwisko rosyjskiego badacza stało się znane szerszemu gronu uczonych europejskich.

4. LEON MARCHLEWSKI I JEGO ZAINTERESOWANIE CHLOROFIEM

Tymczasem w odległej od Petersburga Anglii dwaj uczeni, Edward Schunck (1820–1903) i Leon Marchlewski (1869–1946) prowadzili intensywne badania nad podstawowym barwnikiem świata roślinnego – chlorofilem [31]. Ten pierwszy prowadził wzorowo zorganizowane laboratorium w Kersal pod Manchesterem, gdzie wykonywał szereg prac dla potrzeb przemysłu, a zarobione w ten sposób pieniądze obracał na potrzeby badań naukowych. Uczeń Justusa von Liebiga (1803–1873), jednego z największych chemików XIX stulecia, doskonale sprawdzał się zarówno w teorii, jak i w chemii praktycznej. Leon Marchlewski zaczynał swoją przygodę z chemią w warszawskim Towarzystwie kursów Naukowych przy Muzeum Przemysłu i Rolnictwa pod okiem znakomitego nauczyciela Napoleona Milcera (1842–1905), u którego pierwsze kroki w nauce stawiała Maria Skłodowska-Curie. Później młody Marchlewski zdecydował się studiować na sławnej w Europie Politechnice w Zurychu. Ukończył ją w 1890 r., zyskując prywatną asystenturę u prof. Jerzego Lungego by już w dwa lata później otrzymać tytuł doktora filozofii. Żywo zainteresowany chemią organiczną w 1892 r. przeniósł się do laboratorium Schuncka, u którego był asystentem do 1896 r. Później, przez krótki czas, kierował laboratorium przy fabryce Claus & Rée w Clayton, a także wykładał chemię organiczną w Instytucie

Technologicznym w Manchesterze. W 1900 r. powrócił na ziemię polskie, przyjmując stanowisko inspektora w Państwowym Zakładzie Badania Środków Spożywczych w Krakowie. W tym też roku habilitował się na podstawie monografii *Die Chemie des Chlorophylls* na Wydziale Filozoficznym UJ. W trzy lata później został profesorem nadzwyczajnym tytularnym, a w 1906 profesorem rzeczywistym chemii lekarskiej oraz kierownikiem Zakładu Chemii Lekarskiej UJ. Takie były początki znakomitej krakowskiej szkoły biochemicznej [32, 33].

Marchlewski jeszcze w Zurychu zainteresował się bliżej chemią barwników, upatrując w nich klucza do poznania reguł rządzących światem żywych istot. Stąd wybór laboratorium Schuncka nie był przypadkowy. Obaj uczeni szybko odnaleźli wspólny język koncentrując swój wysiłek badawczy, o czym już była wyżej mowa, wokół poznania chemicznej budowy podstawowego, zielonego barwnika roślin. Schunck zdołał uzyskać szereg pochodnych chlorofilu, z których jedna zwróciła jego szczególną uwagę, a to z racji czerwonej, przechodzącej w purpurę, barwy. Była to już wzmiankowana filoporfiryna. Zewnętrzne cechy fizyczne substancji czyniły ją wręcz identyczną z odkrytą wcześniej przez Nenckiego hematoporfiryną. Schunck, podobnie zresztą jak Hoppe-Seyler, nie wyciągnął z tego dalej idących wniosków. Natomiast to właśnie filoporfiryna zwróciła uwagę Marchlewskiego, który postanowił podążać dalej tą drogą, którą inni badacze zbyt pochopnie porzucili. Polski badacz wysunął bowiem śmiałe przypuszczenie, że w istocie hemato- i filoporfiryna są nie tylko podobne pod względem cech fizycznych, lecz również dane jest im bliskie pokrewieństwo na poziomie chemicznym. Rozmyślaniom i kreśleniom planów sprzyjał – o ironio! – zły stan zdrowia Marchlewskiego, który wpierw zmusił go do przerwania pracy w laboratorium, a później skazał na rekonwalescencję w Szwajcarii. W małej miejscowości uzdrowskiej odcięty praktycznie od dostępu do literatury fachowej zdobył podręcznik chemii organicznej, w którym odnalazł krótkie omówienie wyników badań nad hematoporfiryną Nenckiego. Ku swemu zaskoczeniu dostrzegł wręcz uderzającą zbieżność pomiędzy metodą postępowania eksperymentalnego i osiągniętymi wynikami swoich z Schunckiem doświadczeń oraz tym co streszczone zostało w podręczniku [16, 31, 32]. Natychmiast po powrocie do Kersal zaproponował Schunckowi nowe badania, które pozwoliłyby na ostateczne potwierdzenie lub wykluczenie zarysowanej już teraz wyraźnie hipotezy. Marchlewski wykonał szereg pomiarów spektrofotometrycznych a uzyskane widma absorpcyjne hemato- i filoporfiryny poddał gruntownej analizie, z której wynikało że są one niemal identyczne. Wzory sumaryczne obu struktur potwierdzały, że filoporfiryna jest „uboższa” tylko o jeden atom tlenu w stosunku do hematoporfiryny [32]. Nie ulegało wątpliwości, że było to wręcz przełomowe odkrycie w historii nauk przyrodniczych. Wykorzystując metodykę i język opisu chemii dostarczono istotnego dowodu, na wspólne pochodzenie podstawowych elementów życia roślinnego i zwierzęcego. Przeczyło to tym samym sztywnemu rozdziałowi świata roślin i zwierząt, który od czasów Linneusza przyjmowano za pewnik. Wnosiło także wiele do dyskusji toczonej wokół teorii ewolucji Karola Darwina. Było wreszcie ukoro-

nowaniem myśli, którą przed wiekami, wiedziony bardziej przecuciem niż wiedzą sformułował Paracelsus, myśli, którą przyoblekł w kształt teorii naukowej Jędrzej Śniadecki, a której pełny i przejrzysty obraz dały prace uczonych posługujących się nowym i precyzyjnym narzędziem jakim stały się chemia organiczna i jej nieco młodsza siostra, biochemia. I chociaż niewielu to wówczas dostrzegało i rozumiało, była to prawdziwa rewolucja, przejście na zupełnie inny poziom dyskusji o niespotykanym dotąd poziomie precyzji. Był początek roku 1896.

5. WSPÓLNE BADANIA MARCHLEWSKIEGO I NENCKIEGO

Jednak sam Marchlewski, mimo zdawałoby się tak niepodważalnego dowodu, nie był do końca pewien swego sukcesu. Szukając razem z Schunckiem ostatecznego potwierdzenia, iż istotnie racja leży po ich stronie, polski badacz postanowił zwrócić się do swojego rodaka w Petersburgu. Pozycji w świecie naukowym i osiągnięciach Nenckiego był rzecz jasna świadom, chociaż jego samego nigdy nie spotkał. Nieśmiały i pełen obaw, przesłał list wraz z odbitką publikacji wyników [34]. Nencki odpowiedział wprost entuzjastycznie, uznając osiągnięcia Marchlewskiego i Schuncka za wielce interesujące i obiecujące. Jednocześnie był żądny dalszych informacji i prosił o próbkę filoporfiryny, którą chciał samodzielnie zbadać. Taki był początek paroletniej intensywnej współpracy pomiędzy dwoma polskimi badaczami, współpracy którą gwałtownie przerwała śmierć Nenckiego. Jednocześnie był to początek ożywionej korespondencji, która szczęśliwie w znaczącym stopniu zachowała się do dnia dzisiejszego. Stanowi ona nie tylko cenne źródło poznania dróg postępowania badawczego, hipotez i dyskusji wokół problemów naukowych, lecz jest też przykładem elegancji i szczerości intencji obu uczonych, którzy tylko raz spotkali się osobiście. Stało się to w 1900 r., roku jubileuszu Uniwersytetu Jagiellońskiego. Decyzją senatu akademickiego, na wniosek rady wydziału filozoficznego i lekarskiego, nadano Nenckiemu doktorat honoris causa. Jednocześnie, gdy po dłuższej przerwie organizowano X Zjazd Przyrodników i Lekarzy Polskich w Krakowie, nadarzała się wyśmienita okazja by zaprosić znakomitego uczonego do podwawelskiego grodu. Nencki zaproszenie z radością przyjął [16, 32, 33].

Marchlewski osmielony pismem Nenckiego przesłał mu próbkę filoporfiryny, wraz z kolejnymi, nowymi wynikami badań, które tylko potwierdzały wcześniejsze ustalenia. Już we wrześniu 1896 r., podczas obrad sekcji chemicznej na Towarzystwie Lekarskim Warszawskim, zaproszony nań Marcei Nencki dał prelekcję zatytułowaną *O stosunku biologicznym barwnika liści do barwnika krwi*, w trakcie której mówił: „Wyniki prac Schunck’a i Marchlewskiego mają dla chemii biologicznej wielkie znaczenie, rzucają bowiem światło na najdawniejsze okresy historii rozwoju świata ustrojowego, a zarazem wskazują na wspólność pochodzenia państwa zwierzęcego i roślinnego” [35]. Prace Marchlewskiego miały i ten efekt, że ponownie skierowały uwagę Nenckiego na problemy związane z hemoglobina i jej pochodnymi. Zaowocowało to programem intensywnych prac eksperymentalnych, które

przyniosły bogaty i zróżnicowany materiał badawczy, niejednokrotnie o kapitalnym dla rozwoju biochemii znaczeniu.

Nencki wraz ze swoim uczniem i współpracownikiem Janem Zaleskim, który już w niepodległej Polsce zostanie mianowany profesorem chemii farmaceutycznej Uniwersytetu Warszawskiego, szukał ostatecznej odpowiedzi na pytanie o istotę budowy heminy. Wiedząc już, że hemina zawiera żelazo i mając już spore doświadczenie z jej pochodną – hematorporfiryną, uczeni opracowali prostą i skuteczną metodę rozkładu tejże, uzyskawszy w końcu mieszaninę prostych połączeń pirolu, czyli hemopirołu. Wykazano też, że uzyskany z heminy na drodze redukcji jodowodorem hemopiroł na wolnym powietrzu szybko przekształca się w urobilinę [36, 37]. Tymczasem Marchlewski, który badał pochodne chlorofilu, pozyskał z filoporfiryny nowy związek – filocjaninę. Podejrzewając, że ta substancja może mieć ścisłe pokrewieństwo z hemopirolem postanowił podzielić się swoim odkryciem i przypuszczeniami z Nenckim. Wraz z listem posłał do Petersburga próbkę filocjaniny [31]. Ten zaś niemal natychmiast poddał filocjaninę redukcji w kwaśnym roztworze lodowego kwasu octowego, by w efekcie takiego postępowania uzyskać hemopiroł! Był to kolejny, można powiedzieć przesądający sprawę dowód na chemiczne pokrewieństwo zwierząt i roślin w jednej z najbardziej podstawowych i powszechnych struktur świata ożywionego jakim są barwniki. Wyniki ich wspólnych poszukiwań opublikowano w 1901 r. na łamach *Rozpraw Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego AU* oraz w prestiżowym *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* [38, 39].

ZAKOŃCZENIE

Niestety śmierć Nenckiego w październiku tego samego roku przerwała nagle tę znakomitą współpracę. Badania nad hemoglobina kontynuował w Petersburgu Zaleski, w Krakowie zaś Marchlewski w swoich badaniach nad chemią chlorofilu nieustannie odnosił swoje wyniki do światowych badań nad innymi barwnikami, w tym rzecz jasna w szczególności do tych wiążących się z hemoglobina i jej pochodnymi. Gdy niemiecki chemik Friedrich Wilhelm Küster, utleniając heminę otrzymał grupę substancji będących pochodnymi pirolu, które zyskały nazwę kwasów hematytowych, Marchlewski postanowił wykorzystać metodę niemieckiego badacza zastosowawszy ją w swoich badaniach nad filoporfiryną. W wyniku utleniania otrzymał szereg pochodnych, z których jedna miała budowę tożsamą z jednym z kwasów hematytowych. Następnie z kału krów, które wcześniej skarmiano wyłącznie zieloną paszą, wyodrębnił nowy związek, który zyskał nazwę filoerytryny. Poszukując jego analogu w organizmie zdołał go wykryształizować z żółci bydłowej. To z kolei nasunęło mu pomysł przeprowadzenia cyklu eksperymentów na baranach z przetoką żółciową, w trakcie których mógł wykazać, że filoerytryna powstaje w wyniku przemiany chlorofilu i jest wydzielana wraz z żółcią. W 1903 r. Marchlewski opublikował monografię – *Die Chemie des Chlorophylls*, którą można uznać za najwnikliwsze i najnowocześniejsze opracowanie poświęcone chemii chlorofilu jakie

było wówczas dostępne. Drugie, rozszerzone wydanie wyszło drukiem w sześć lat później [32].

Jak się miało okazać przed Marchlewskim i jego współpracownikami były jeszcze całe lata badań nad chlorofilem, lata wypełnione szeregiem sukcesów, które czyniły z ośrodka krakowskiego jeden z wiodących w biochemii i to nie tylko na ziemiach polskich. Jego początki leżały w odważnej, postawionej wbrew wydawało by się rozsądkowi hipotezie, świetnemu przygotowaniu metodycznemu, szerokiej wiedzy i nade wszystko swobodnej wyobraźni, a także bliskiej i szczerzej współpracy polskich uczonych. Marchlewski i Nencki nadali bowiem na przestrzeni ledwie paru lat niezwykle przyspieszenia na polu badań, zmieniając nasze zrozumienie elementarnych podstaw życia organicznego i wytyczając nowy szlak, którym przyszło podążać całym pokoleniom uczonych. Jak bowiem mówił w Krakowie w 1900 roku Marceli Nencki: „Zadań czekających na rozwiązanie jest nieskończona ilość i pojedynczy badacz, przepracowawszy całe swe życie nie może powtórzyć słów Seneki, *si quis totam diem currens pervenit ad vesperum, satis est*¹, gdyż widzi jak jedne pokolenia po drugich dalej kroczyć i pracować muszą, a końca badań nie ujrzą. Za to wiedza nasza będzie coraz obszerniejsza i głębsza, a korzyść praktyczna, mianowicie w medycynie coraz większa” [40].

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] F. Hartmann, *The life of Philippus Theophrastus Bombast of Hohenheim: known by the name of Paracelsus: and the substance of his teachings concerning cosmology, anthropology, pneumatology, ...*, London 1896.
- [2] W. Pagel, *Paracelsus: An Introduction to Philosophical Medicine in the Era of the Renaissance*, Karger Medical and Scientific Publishers, Basel 1982.
- [3] H. Tajadod, *Basic Sci. Med.*, 2014, **3** (3), 60. DOI: 10.5923/j.medicine.20140303.03
- [4] E. Ostachowski, *Arch. Hist. Filo. Med.*, 1929, **9** (2), 157.
- [5] U. Wiesing, *Med. Health Care Philos.*, 2008, **11**, 221.
- [6] A. Wrzosek, *Jędrzeja Śniadeckiego Teorya jestestw organicznych*, Nakładem „Nowin Lekarskich”, Poznań 1905.
- [7] A. Wrzosek, *Jędrzej Śniadecki. Życiorys i rozbiór pism*, Akademia Umiejętności, Kraków 1910 (tom I-II).
- [8] M. Ellen Bowden, A. Beth Crow, T. Sullivan, *Chemical Heritage Foundation*, 2005, 3-5.
- [9] R. Keen, *The Life and Work of Friedrich Wohler (1800-1882)*, Verlag Traugott Bautz GmbH, Nordhausen 2005.
- [10] F.L. Hünefeld, *Die Chemismus in der thierischen Organisation*, Leipzig 1840.
- [11] R. Walther: *BioSpectrum*, 2015, **21**, 114. <http://www.biospektrum.de>
- [12] O. Funke, *Über das Milzvenenblut*, *Z. Rat. Med.*, 1851, **1**, 172-218.
- [13] L.K. Teichmann, *Zeitsch f rationale Med. (neue Folge)*, 1853, **3**, 573.

1 Jeśli ktoś jest w biegu przez cały dzień, temu wieczorem już wystarczy.

- [14] S. Kohmann, *Ludwik Teichmann (1823–1895)* [w:] *Sześćsetlecie medycyny krakowskiej*, Kraków 1963, t. 1, 139-156.
- [15] A.P. Mathews, *Pop. Scien. Mon.*, 1898, **53**, 542. <http://en.wikisource.org>
- [16] A. Sz wajcerowa, *Marceli Nencki*, Wydawnictwo Interpress, Warszawa 1977.
- [17] K. Sarnecki, *PSB*, 1977, **22**, 671.
- [18] M.H. Bickel, *Marceli Nencki (1847–1901)*, Bern-Stuttgart-Wien 1972.
- [19] A. Sz wajcerowa, *Arch Hist. Filo. Med.*, 1975, **28** (2), 206.
- [20] M. Mast yńska, *Arch. Hist. Filo. Med.*, 1948, **19**, 152.
- [21] W. Leppert, *Chem. Pol.*, 1901, **1** (31), 730.
- [22] M. Nencki, *Gaz Lek.*, 1884, **19** (35-37), 655, 675, 697.
- [23] M. Nencki, N. Sieber, *Berich. Dtsch. Chem. Ges.*, 1886, **19**, 128.
- [24] M. Nencki, N. Sieber, *Arch. f. exp. Path. Pharm.*, 1885, **20** (5-6), 325.
- [25] M. Nencki, N. Sieber, *Arch. f. exp. Path. Pharm.*, 1887, **24** (6), 430.
- [26] M. Nencki, *Gaz. Lek.*, 1888, **23** (16-17), 319, 344.
- [27] M. Nencki, N. Sieber, *Ber. Deuts. Chem. Gesellschaft*, 1886, **19**, 410.
- [28] M. Nencki, *Wszechświat*, 1888, **7** (15), 225.
- [29] W. Trzciński, *Gaz. Lek.*, 1897, **32** (8-9 i 11-13), 199, 235, 295, 326, 351.
- [30] A.P. Thodes, *Pavlov's Physiology Factory: Experiment, Interpretation, Laboratory Enterprise*, The Johns Hopkins University Press 2002, 306.
- [31] B. Skarżyński, *Życie Nauki*, 1951, **6** (3), 252.
- [32] B. Skarżyński, *Leon Marchlewski (1869–1946)* [w:] *Sześćsetlecie medycyny krakowskiej*, Kraków 1963, t. 1, 313.
- [33] M. Sarnecka-Keller, J. Hulewicz, *PSB* 1974, **19**, 542.
- [34] E. Schunck, L. Marchlewski, *Contributions to the chemistry of chlorophyll. No. VII. Phylloporphyrin and haematoporphyrin: a comparison*, London 1896.
- [35] M. Nencki, *Gaz. Lek.*, 1897, **32** (23), 608.
- [36] M. Nencki, J. Zaleski, *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, 1900, **30** (3-5), 384.
- [37] M. Nencki, J. Zaleski, *O produktach odlenienia heminy za pomocą jodowodoru i jodku fosforu oraz o budowie heminy i jej pochodnych*, *Rozp. Wydz. Matem-Przyrod. AU*, 1901, **1 A**, Seria III, 317.
- [38] L. Marchlewski, M. Nencki, *Przemiana filocyjaniny w hemopyrrol i urolobinę*. *Rozp. Wydz. Matem-Przyrod. AU*, 1901, **1 A**, Seria III, 333.
- [39] M. Nencki, L. Marchlewski, *Ber. Dtsch. Chem Ges.*, 1901, **34** (2), 1687.
- [40] M. Nencki, *Przeg. Lek.*, 1900, **39** (31), 465.

Praca wpłynęła o Redakcji 27 kwietnia 2015

NOWE WYDAWNICTWA



Zbigniew Koczorowski, Zbigniew A. Figaszewski, Aneta D. Petelska, *Elektrochemia cieczowych granic fazowych*, Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa 2011, Wydanie I, 140 stron, miękka oprawa.

W książce Zbigniewa Koczorowskiego, Zbigniewa Figaszewskiego, Anety Petelskiej *Elektrochemia cieczowych granic fazowych*, w bardzo zwięzły sposób przedstawiono zagadnienia związane z elektrochemią granicy faz nie mieszających się cieczy. Akronimem tytułu książki jest skrót ITIES (ang. *Interface between Two Immiscible Electrolyte Solutions*) Całość książki została podzielna, na trzy rozdziały: właściwości równowagowe, procesy międzyfazowe i zastosowanie ITIES, oraz cieczowe ogniwa voltaiczne. Rozdziały te odnoszą się w sumie do dwudziestu jeden różnych zagadnień; począwszy od aspektów podstawowych poprzez metody aż do zastosowań. Niektóre z tych problemów to: cieczowe ogniwa galwaniczne, elektryzacja ciekłych granic fazowych i ich potencjał elektryczny, metody pomiarowe stosowane w ITIES, cieczowa mikrogranica faz, reakcje przejścia jonów przez granicę faz, elektroosadzanie na cieczowych granicach, ITIES w elektroanalizie, ITIES w farmacji oraz ogniwa voltaiczne z ITIES. Z metod badawczych omówiono techniki elektrochemiczne w takim zakresie, który jest niezbędny do zrozumienia całości opisywanych zagadnień. Przedstawienie prezentowanych zagadnień jest ściśle naukowe oraz dobrze przedstawione, z dokładnym indeksowaniem wzorów i licznymi ilustracjami. Książka może stanowić znakomite uzupełnienie wykładu z chemii fizycznej w szczególności z elektrochemii. Dla zainteresowanych pracą naukową w dziedzinach powiązanych z ITIES, książka ta jest niezbędna, nie tylko ze względów merytorycznych, ale także dzięki obszernemu i aktualnemu zbiorowi danych literaturowych, w których znaczący udział stanowią prace autorów.

Kazimierz Gatner
Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego

Bogdan Burczyk, *Zielona Chemia. Zarys*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2014, Wydanie II, 356 stron, miękka oprawa.

Zielona chemia rozumiana jako filozofia posługiwania się związkami chemicznymi w taki sposób, aby jak najlepiej chronić środowisko naturalne, znalazła już trwałe miejsce w świadomości chemików, zarówno badaczy jak i technologów. Rozumienie zasad zielonej chemii jest inspiracją do poszukiwania nowych rozwiązań technologicznych opartych na nietoksycznych surowcach, najlepiej odnawialnych, w środowisku nieszkodliwych rozpuszczalników i przy wykorzystaniu niekonwencjonalnych źródeł energii. Monografia napisana przez B. Burczyka znakomicie przybliży czytelnikowi najważniejsze zagadnienia zielonej chemii i wskazuje kierunki, w których ta dziedzina się rozwija. Zauważalny wzrost liczby publikacji naukowych dotyczących zielonej chemii najlepiej świadczy o dynamicznym rozwoju tej dziedziny. W tym kontekście jest jak najbardziej uzasadnione przedstawienie przez B. Burczyka drugiego wydania książki „Zielona Chemia. Zarys.”, znacznie poszerzonego w stosunku do wydania pierwszego, które ukazało się w 2006 r..

Pięć głównych rozdziałów książki omawia kolejno genezę i filozofię zielonej chemii, przetwarzanie surowców odnawialnych, nowe reakcje i alternatywne reagenty stosowane zamiast toksycznych i szkodliwych substratów, niekonwencjonalne sposoby prowadzenia reakcji chemicznych z wykorzystaniem alternatywnych źródeł energii oraz nowe media reakcyjne, takie jak ciecze jonowe i płyny nadkrytyczne.

Poprzednie wydanie książki było godne polecenia jako unikatowe źródło wiedzy o różnych aspektach zielonej chemii prezentowanych w powiązaniu z zaawansowaną wiedzą chemiczną. W tym wydaniu treści zostały uaktualnione i wzbogacone o nowe zagadnienia, co odzwierciedla dynamiczny rozwój zielonej chemii. Nowe fragmenty zostały dodane w rozdziale dotyczącym surowców odnawialnych, gdzie znalazło się obszernie omówienie procesów przetwórstwa gliceryny, która pojawiła się na rynku w nadmiarze jako uboczny produkt przy wytwarzaniu biopaliw. Zagospodarowanie gliceryny jest dużym wyzwaniem dla technologii chemicznej i warto zapoznać się z aktualnym stanem wiedzy w tym obszarze, bardzo kompetentnie przedstawionym przez B. Burczyka. Związkiem trudnym do przetworzenia jest także ditlenek węgla, uciążliwe zanieczyszczenie atmosfery i równocześnie atrakcyjny surowiec. Wybrane przez Autora przykłady procesów, w których ditlenek węgla jest wykorzystany w syntezie wartościowych związków pozwalają zrozumieć, w których procesach uzyskano już znaczący postęp.

W rozdziale poświęconym rozpuszczalnikom przedstawiono możliwości wykorzystania wody jako środowiska reakcji organicznych i nieorganicznych, użycia płynów nadkrytycznych, biorozpuszczalników i cieczy jonowych. Warto w tym miejscu zauważyć, że w monografii B. Burczyka znajdujemy fragment prezentujący reakcje przebiegające „na wodzie”, które odróżnia się już w najnowszej literaturze od reakcji prowadzonych w wodzie mimo, że mechanizm zachodzących zjawisk nie jest jeszcze w pełni poznany. W rozdziale dotyczącym cieczy jonowych omówione są przykłady związków chiralnych a także niezwykle aktualne zagadnienia związane z toksycznością i biodegradacją tych związków. Warto także zwrócić uwagę na bardzo przemyślany dobór treści w rozdziale zatytułowanym „Niekonwencjonalne sposoby prowadzenia reakcji chemicznych”, gdzie B. Burczyk omówił wykorzystanie metod elektrochemicznych, fotochemicznych a także użycie mikrofal i ultradźwięków do syntezy związków chemicznych. W kompleksowym ujęciu przedstawił tutaj zarówno podstawy tych metod jak i możliwości ich wykorzystania w praktyce. Ta bardzo aktualna i ważna tematyka nie znajduje się jeszcze w innych podręcznikach, dlatego warto sięgnąć po monografię B. Burczyka.

Wielką wartością tej książki jest układ treści i przybliżenie czytelnikowi najnowszych zagadnień i problemów z obszaru dynamicznie rozwijającej się zielonej chemii. Co ważne, wszystkie zagadnienia są

omawiane w oparciu o rzetelną wiedzę chemiczną i ilustrowane bardzo starannie dobranymi schematami i rysunkami. Monografia przedstawia wysoki poziom naukowy, a równocześnie tekst napisany jest przystępnie i z przyjemnością przeczyta go zarówno student jak i chemik pracujący w przemyśle. Korzystając z obszernej listy cytowanych publikacji, w większości oryginalnych artykułów naukowych wydanych w czasopismach z listy filadelfijskiej, można szybko poszerzyć wiedzę w wybranym temacie.

Z pełnym przekonaniem polecam książkę B. Burczyka studentom chemii a także chemikom, których interesuje rozwijanie chemii i technologii chemicznej w sposób niezagrażający środowisku naturalnemu.

Anna Trzeciak

Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego

INFORMACJE

ERRATA

Poniżej podajemy informacje o błędzie w spisie treści na okładce zeszytu 3-4/2015 „Wiadomości Chemicznych”:

jest:

Urszula GUZIK, Katarzyna HUPERT-KOCUREK, Agnieszka NIEĆ, Danuta WOJCIESZYŃSKA:
Słonecznik bulwiasty źródłem cennych surowców dla przemysłu, szczególnie spożywczego, kosmetycznego i farmaceutycznego

powinno być:

Urszula GUZIK, Katarzyna HUPERT-KOCUREK, Agnieszka NIEĆ, Danuta WOJCIESZYŃSKA:
Areny jako proleki

INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

CENY PRENUMERATY NA ROK 2015

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2015 r. będzie wynosiła **220 zł + 5% VAT** dla instytucji i niezrzeszonych prenumeratorów indywidualnych. Dla członków PTChem **20 zł**. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

Bank PEKAO SA
Oddział we Wrocławiu
pl. Powstańców Śl. 9, 50-950 Wrocław
Redakcja „Wiadomości Chemiczne”
NRB 48 1240 6670 1111 0000 5649 8781

Prenumerata „Wiadomości Chemicznych” dla członków PTCh, połączona z opłatą składek członkowskich, jest znacznie niższa i przedstawia się następująco:

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2014 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi **70 zł** (składka – 50 zł, prenumerata – 20 zł);
- emeryci, doktoranci oraz studenci płacą **35 zł** (składka – 15 zł, prenumerata – 20 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą **40 zł** (składka – 20 zł, prenumerata – 20 zł).

Członkowie PTCh, którzy zechcą zaprenumerować „Wiadomości Chemiczne” na podanych tu warunkach, proszeni są o wnoszenie opłat na konto:

PTCh Warszawa, ul. Freta 16
Bank BGŻ
54 2030 0045 1110 0000 0261 6290

WYRÓŻNIONE PRACE DOKTORSKIE LUB HABILITACYJNE

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” w porozumieniu z Radą Redakcyjną podjęła decyzję o utworzeniu nowego działu, zatytułowanego „Wyróżnione prace doktorskie i habilitacyjne”. Redakcja przyjmuje do publikacji artykuły oparte na pracach doktorskich lub habilitacyjnych, które zostały wyróżnione przez Rady Wydziałów, przed którymi toczyły się odpowiednie procesy.

Objętość prac nie powinna przekraczać piętnastu stron maszynopisu. Artykuły powinny zawierać: przedstawienie doniosłości podjętej tematyki badawczej, cel rozprawy doktorskiej lub habilitacyjnej oraz w miarę zwięzły opis uzyskanych wyników przedstawiony w możliwie przystępny sposób a także wnioski końcowe.

W notce biograficznej autora poza standardowymi informacjami powinny zostać zamieszczone następujące dane: termin obrony pracy doktorskiej lub kolokwium habilitacyjnego, Rada Wydziału, przed którą toczył się przewód, nazwisko promotora (dotyczy rozpraw doktorskich) oraz nazwiska recenzentów.

Serdecznie zapraszamy doktorów habilitowanych oraz doktorów, których prace zostały wyróżnione w ciągu ostatniego roku do nadsyłania swoich prac.



INNOWACYJNA GOSPODARKA
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



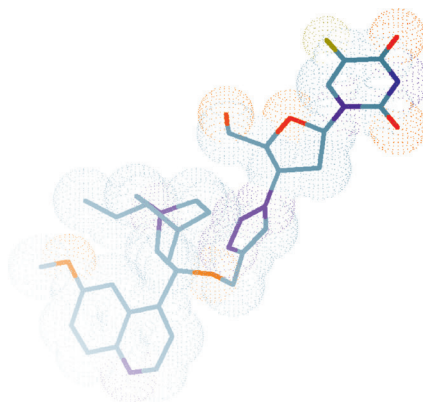
UNIWERSYTET
IM. ADAMA MICKIEWICZA
W POZNANIU

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Opracowanie nowych leków przeciwrakowych jest kluczowym obszarem badań chemii medycznej. Na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu otrzymano szereg wysoce aktywnych związków cytotoksycznych o wysokim potencjale komercyjnym.

Dzięki projektowi **UDA-POIG.01.03.02-30-067/12**,
„Ochrona patentowa pochodnych azydonukleozydów o działaniu przeciwrakowym”
zarejestrowano 4 zgłoszenia patentowe w Europie (PCT), USA, Kanadzie, Japonii oraz Chinach, które oczekują na udzielenie patentów w w/w krajach.



Projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” informuje, że są u nas do nabycia następujące pozycje „Biblioteki Wiadomości Chemicznych”:

Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990, red. Z. Stasicka, cena 25 zł
Podstawowa terminologia stereochemii oraz Słownik podstawowych terminów w nauce o polimerach. Zalecenia 1996, red. O. Achmatowicz, B. Szechner i P. Kubisa, cena 12 zł

Nomenklatura węglowodanów. Zalecenia 1996, tłum. i red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 18 zł

I.Z. Siemion, *Bronisław Radziszewski i lwowska szkoła chemii organicznej*, cena 18 zł

K. Maruszewski, *Fizykochemia molekuł zamkniętych w zeolitach i zol-żelach*, cena 18 zł

Praca zbiorowa, *Uporządkowane materiały mezoporowate*, red. B. Burczyk, cena 18 zł

Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywiduali chemicznych. Zalecenia 1993, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł

I.Z. Siemion, *Lutum sapientiae, czyli Notatek chaotycznych część pierwsza*, cena 18 zł

M. Zabłocka-Malicka, *Ruchliwość jonów w podwójnych układach stopionych soli*,
cena 8 zł.

Praca zbiorowa, *Nanomateriały*, red. D. Hreniak, W. Łojkowski, W. Stręć, M. Suszyńska, cena 25 zł.

Praca zbiorowa, *Ogniwa paliwowe – nowe kierunki rozwoju*, red. H. Drulis, J. Hanuza, D. Hreniak, M. Miller, G. Paściak, W. Stręć, cena 20 zł

Glosariusz nazw klas związków organicznych i reaktywnych produktów pośrednich oparty na strukturze (Zalecenia IUPAC 1994), red. i tłum. F. Kaźmierczak i J. Gawroński, cena 16 zł.

Od substacji prostych do życia. Świat RNA – początki życia na Ziemi, Zdzisław Chilmonczyk – NAKŁAD WYCZERPANY.

Profesor Bogusława Jeżowska-Trzebiatowska. 1908–1991 w setną rocznicę urodzin, cena 12,00 zł.

Chemia koordynacyjna w Polsce. Część I, cena 17,50 zł.

Chemia koordynacyjna w Polsce. Część II, cena 17,50 zł.

Chemosensory optyczne oraz materiały rozpoznawcze dla jonów metali w roztworach, Krzysztof Kledzik, cena 22,00 zł.

Obliczenia teoretyczne stałej ekranowania magnetycznego i stałych strzężeń spinowo-spinowych. Teobald Kupka cena 20,00 zł.

Książki wysyłamy na koszt zamawiającego. Zamówienia prosimy kierować pod adresem: Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław. Opłaty należy wносить na konto: Bank PEKAO SA O/Wrocław, Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, NRB 48 1240 6670 1111 0000 5649 8781.

REGULAMIN I INFORMACJE DLA AUTORÓW PUBLIKUJĄCYCH W CZASOPIŚMIE „WIADOMOŚCI CHEMICZNE”

1. Informacje ogólne

„Wiadomości Chemiczne” są recenzowanym czasopismem naukowym Polskiego Towarzystwa Chemicznego, które publikuje przede wszystkim artykuły przeglądowe. Ponadto publikowane są tutaj inne **wartościowe** materiały o charakterze edukacyjno-informacyjnym takie jak: artykuły oparte na pracach doktorskich lub habilitacyjnych, które zostały wyróżnione przez Rady Wydziałów, przed którymi toczyły się odpowiednie procesy; materiały informacyjne na temat uczonych oraz jednostek naukowych/firm chemicznych lub pokrewnych chemii; materiały o aktualnych osiągnięciach w szeroko pojętych naukach chemicznych.

Dodatkową ofertę Wydawnictwa stanowią dwie odrębne serie, „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz seria „Habilitacje”. W serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” publikowane są dłuższe artykuły przeglądowe lub monografie poświęcone ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii, w ramach serii wydawniczej pod nazwą „Habilitacje” mogą być publikowane prace habilitacyjne z obszaru chemii. Zważywszy, że zgodnie z ustawą, dopuszczalne jest przedstawianie rozpraw habilitacyjnych albo w formie monografii, albo w formie pliku powiązanych publikacji, poprzedzonych omówieniem w języku polskim (tzw. autoreferatem), Redakcja przewiduje drukowanie obydwu tych wariantów. Autorzy, którzy chcieliby takie prace napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją, a następnie przesłać wstępnie przygotowaną publikację (redagowaną na wzór artykułów w czasopiśmie „Wiadomości Chemicznych”) lub informację na temat przygotowywanej pracy – tytuł przygotowywanej publikacji, przybliżoną liczbę stron, tabel, rysunków. W chwili obecnej Redakcja nie posiada środków na finansowanie prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz serii „Habilitacje”. W zależności od sytuacji finansowej Wydawnictwa, Redakcja zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

„Wiadomości Chemiczne” znajdują się na liście czasopism punktowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Zawartość czasopisma dostępna jest zarówno w formie drukowanej jak i elektronicznej. Elektroniczny dostęp do pełnych tekstów prac jest możliwy poprzez stronę Dolnośląskiej Biblioteki Cyfrowej, <http://www.dbc.wroc.pl/>.

Anglojęzyczne streszczenia wszystkich opublikowanych prac są dostępne na stronie internetowej „Wiadomościach Chemicznych”, <http://old.pages.wchuwr.pl/wiadchem.html>.

Czasopismo od wielu lat jest indeksowane/abstraktowane w dwóch bazach danych (Chemical Abstracts oraz AGRO), a od roku 2012 zostały umieszczone w bazie Polskiej Bibliografii Naukowej, <https://pbn.nauka.gov.pl/journals/24384>.

2. Informacje dla autorów na temat wymagań i zasad publikowania prac

- Prace nie były wcześniej publikowane, ani nie są złożone w redakcji innego czasopisma.
- Autorzy prac stosują się do wymagań praw autorskich tzn. w przypadku zamieszczania rysunków, tabel itp., pochodzących z opracowań opublikowanych w innych czasopismach lub publikacjach zwartych, posiadają pisemną zgodę na ich przedruk.
- Opublikowana raz praca bez zgody Redakcji, nie może być wydawana gdzie indziej.
- Autorzy przysyłający prace po raz pierwszy powinni podać swój numer telefonu oraz adresy poczty tradycyjnej i elektronicznej. Jest to niezbędny warunek sprawnego przebiegu opracowania redakcyjnego tekstu.
- Autorzy zobowiązani są do wykonania korekty tekstu. W pracach przyjętych do druku Redakcja ma prawo dokonywania niezbędnej korekty.
- Jeżeli autorzy nie zastrzegą inaczej w momencie zgłoszenia pracy, wydawca nabywa ogólnych praw autorskich do wydrukowanych prac (w tym prawo wydawania na nośnikach elektronicznych oraz w Internecie). Tytułem powyższego wykorzystania utworów autorom nie są wypłacane honoraria.
- Wszystkie nadsyłane prace są poddawane wstępnej ocenie, która określa czy odpowiadają randze i profilowi „Wiadomości Chemicznych” oraz czy zostały przygotowane zgodnie z formalnymi wymogami MNiSW oraz Redakcji.
- Po uzyskaniu pozytywnej wstępnej oceny wszystkie prace są recenzowane przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów, zgodnie ze wskazówkami zawartymi w broszurze informacyjnej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user_upload/ministerstwo/Publikacje/201110216_MNISW_broszura_210x210.pdf.
- O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny.
- Prace, które Komitet Redakcyjny na podstawie uzyskanych recenzji stwierdził, że nie należy przyjąć do druku w czasopiśmie, po uwzględnieniu sugestii recenzentów mogą być powtórnie przesłane do czaso-

pisma. W takim przypadku praca traktowana jest jako nowy tekst i ponownie przechodzi pełną procedurę recenzowania.

- Ponadto Komitet Redakcyjny informuje, że tzw. „ghostwiting” (ktoś wniósł znaczący wkład w powstanie publikacji, a nie został przedstawiony jako współautor lub też nie został wymieniony w podziękowaniu zamieszczonym w publikacji) lub „guest authorship” (udział autora jest znikomy lub też w ogóle nie miał miejsca, a mimo to jest współautorem publikacji) są przejawem nierzetelności naukowej. Wszelkie przejawy nierzetelności naukowej, łamanie i naruszanie zasad etyki obowiązującej w nauce będą ujawniane, włącznie z powiadomieniem jednostek zatrudniających autorów.
- Autorzy mają prawo do zaproponowania co najmniej trzech niezależnych recenzentów, jednak ostateczny wybór anonimowych recenzentów dokonuje Redakcja.

3. Koszty

Autorzy czasami mogą ponosić częściowe koszty wydania swoich artykułów. Tak jest w przypadku tzw. **stron nadliczbowych** tj. powyżej 25 stron. Za każdą rozpoczętą nadliczbową stroną jest naliczana opłata w wysokości około 50 zł. Najczęściej kwota ta pokrywana jest z funduszy pozyskiwanych przez Autorów lub przez Wydziały które wspomagają wydawanie „Wiadomości Chemicznych”. Niezależnie od rodzaju pracy opłata pobierana jest również za **kolorowe rysunki i wykresy** (zgodnie z faktycznym kosztem druku).

Redakcja zastrzega sobie możliwość zmiany wysokości opłat, w zależności od wielkości dofinansowania z MNiSW oraz wypracowanych środków własnych. Faktura wystawiana jest po ukazaniu się pracy.

W przypadku prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz „Habilitatione”, Redakcja nie posiada środków na finansowanie i zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

4. Informacje szczegółowe dotyczące przygotowania maszynopisu do druku

4.1. Wymagania merytoryczne

Tekst należy napisać zwięźle, prostym stylem, według zasad pisowni polskiej, z zachowaniem poprawnego i obowiązującego nazewnictwa fachowego. Nie należy zamieszczać nadmiaru szczegółów odsyłając Czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego, które to powinno uwzględniać najnowsze informacje, dotyczące napisanej pracy. Literaturę należy cytować ze źródeł oryginalnych.

4.2. Wymagania techniczne składu tekstu

- W przypadku prac współfinansowanych przez autorów, liczba stron oraz forma kolorystyczna manuskryptu nie jest ograniczona (wymagane jest wcześniejsze uzgodnienie z Redakcją).
- Maszynopisy prac autorów którzy nie chcą ponosić dodatkowych kosztów, nie powinny przekraczać 25 stron całej pracy (po wydruku w czasopiśmie) oraz drukowane będą w wersji czarno białej.
- Główny tekst nadsyłanych prac powinien być napisany w edytorze Word, czcionką Times New Roman, 12p z zachowaniem interlinii 1,5 oraz z 5 cm marginesem z prawej strony. Przy podziale tekstu należy stosować numerację cyfrową wielorzędową. Numerujemy tylko tytuły rozdziałów, **nie numerujemy działów**: Abstract, Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Uwagi końcowe, Podziękowanie, Piśmiennictwo cytowane. Jednolity sposób numeracji konsekwentnie stosuje się wewnątrz tekstu (w całym tekście tj. zarówno przy numerowaniu rozdziałów, przy przytaczaniu piśmiennictwa cytowanego oraz odwoływaniu się do tabel rysunków itp., **nie należy stosować odsyłaczy hipertekstowych**).
- Tekst powinien być napisany poprawnym językiem, wszystkie skróty muszą być wyjaśnione, oznaczenia i jednostki miar należy podawać według układu SI, pozycje cytowanej literatury należy oznaczać numerami umieszczonymi w nawiasach kwadratowych, w kolejności cytowania wg wzorów [1, 5, 7] (dla prac 1, 5 i 7) lub [1-5, 7] (dla prac od 1 do 5 oraz pracy 7).
- Jeśli w artykułach znajdują się przedruki rysunków, czy innych elementów prac cudzych, w opisach (polskich i angielskich) należy zamieścić stosowną informację.
- Zaleca się umieszczać w tekście pracy rysunki, tabele oraz podpisy (jeśli są przygotowane w edytorze Word), jednak w przypadku plików o bardzo dużych rozmiarach należy zaznaczyć miejsca na ich umieszczenie (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji).
- **Pierwsza strona pracy powinna zawierać kolejno:**
 - tytuł pracy w języku polskim (Times New Roman, 14 p, pogrubiony, WERSALIKI), i angielskim (Times New Roman, 14 p, WERSALIKI),
 - pełne imię i nazwisko autora (autorów) pracy (Times New Roman, 15p, pogrubione),
 - pełne nazwy ośrodków przypisane do autorów pracy (wraz z adresem ośrodka i adresem e-mail autora korespondującego (Times New Roman, 10,5, kursywa),
 - spis treści pracy z zastosowaniem następującego podziału:

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Tytuł rozdziału

1.1. Tytuł podrozdziału itp.

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

• **Kolejne strony pracy powinny zawierać:**

- **notki o autorach** pracy wraz z tytułami naukowymi (można dołączyć osobno pliki z fotografiami autorów (zob. **Pliki jakie należy przekazać do Redakcji**),
- **obszerne streszczenie pracy w języku angielskim** (od 1800 do 2700 znaków ze spacjami) z uwzględnieniem cytowanego piśmiennictwa oraz odsyłaczami do tabel, rysunków zamieszczonych w tekście (Rys. 1, Tab. 1-2, Schemat 1) oraz **słowa kluczowe** – nie więcej niż 6, uzyskane najlepiej z bazy hasel przedmiotowych podawane w języku angielskim i polskim,
- **wykaz stosowanych skrótów** – w przypadku niewielkiej liczby skrótów lub akronimów nie jest konieczne zamieszczanie tej pozycji, wówczas, skróty wyjaśniamy w tekście przy pierwszym użyciu. Angielskie skróty należy podać i wyjaśnić wg poniżej podanego wzoru lub w oparciu o inne prace zamieszczone w „Wiadomościach Chemicznych”. Przykład: dla skrótu SSRI – selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny (ang. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*),
- **dalszy tekst pracy zgodny z podawanym wcześniej spisem treści.**

• **Tabele, rysunki, fotografie**

Jeżeli tabele i rysunki zostały wykonane w edytorze Word, zaleca się, aby były zamieszczone w tekście artykułu, w innym przypadku wymagane jest dołączenie oryginalnych plików.

Tabele i rysunki powinny być przejrzyste, zawierać informacje niezbędne do zrozumienia treści, bez konieczności poszukiwania objaśnień w tekście pracy, należy je numerować cyframi arabskimi oraz podać tytuł (polski/angielski, nad tabelą, pod rysunkiem, Times New Roman, 10 p).

Wszystkie fotografie – należy przesłać w postaci plików zapisanych w formacie tif, jpg lub podobnym, każdą zapisać w oddzielnym pliku o rozdzielczości co najmniej 300 dpi.

• **Piśmiennictwo cytowane**

Piśmiennictwo należy zestawić numerycznie według kolejności cytowania w tekście, należy cytować wyłącznie pozycje istotne dla treści pracy w sposób precyzyjny.

W przypadku **artykułów z czasopism tradycyjnych**, opis powinien zawierać kolejno następujące elementy: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, **numer wolumenu zaznaczony pogrubioną czcionką**, numer pierwszej strony cytowanej pracy, np.

[1] J. Kowalski, Wiad.Chem., 2007, **61**, 473.

[2] W. Kowalski, A. Nowak, Przem. Spoż. 2010, **51**, 3.

W przypadku **książek** najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł książki, nazwę wydawcy, miejsce wydania, rok wydania, np.

[1] J. Malinowski, Tytuł książki, PWN, Warszawa, 2004.

[2] W. Kowalski, Tytuł książki, Volumed, Wrocław, 1999

W przypadku zasobów Internetowych najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł (artykułu) dokumentu online, [dostęp], wydawca, [data dostępu]. Warunki dostępu, np.

[7] J. Kowalski, Tytuł artykułu. [online], wydawca, [dostęp: 2010-05-20]. Dostępny w Internecie: <http://www.....>

4.3. Materiały jakie należy przygotować w celu przesłania pracy do Redakcji

Przed podjęciem decyzji o zakwalifikowaniu pracy do druku w celu oceny merytorycznej należy przesłać **jeden** plik kompletnej pracy zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji.

Po uzyskaniu pozytywnej recenzji i po ustosunkowaniu się do uwag Recenzenta oraz Redakcji należy przesłać ostateczną wersję pracy w następującej postaci:

- 1 plik tekstu zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji;
- 1 plik zawierający krótkie notki biograficzne o autorach nadesłanej pracy (każda notka do 150 wyrazów powinna zawierać: tytuł naukowy, miejsce pracy oraz inne ważne informacje o autorze);

- pliki zawierające zdjęcia portretowe autorów, w nazwie powinny wskazywać autora, którego zdjęcie dotyczy (dobrowolne, przesłanie plików jest jednoznaczne ze zgodą na jego opublikowanie);
- 1 plik zawierający: stronę tytułową, streszczenie (abstrakt), słowa kluczowe, podpisy pod rysunki, tabele, schematy (wszystko w obu wersjach językowych); jeśli zachodzi potrzeba to również oddzielne pliki z rysunkami, schematami, tabelami (zob. Tabele, rysunki, fotografie).

Prace nie odpowiadające wyżej wymienionym wymaganiom nie będą przyjmowane do druku. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania poprawek stylistycznych i skrótów. Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty artykułu i jego zwrotu do Redakcji w ciągu kilku dni od otrzymania.

Na etapie przygotowania szczytki, w przypadku przesyłania prac z kolorowymi stronami prosimy o zaznaczenie, stron które w formie druku mają być czarno-białe. Brak tej czynności może **skutkować wystawieniem faktury za wydruk kolorowych stron**. W przypadku zmian kolorowych rysunków na czarno białe prosimy również o zasygnalizowanie, że w postaci elektronicznej, życzą sobie Państwo wersję w kolorze.

Autor wskazany w liście przewodnim jako osoba kontaktowa otrzymuje drogą elektroniczną plik opublikowanej pracy w formacie pdf.

Prace prosimy przysyłać pocztą elektroniczną na adres: *beata.swiatek-tran@chem.uni.wroc.pl* lub *wchem@chem.uni.wroc.pl*, zaś dokumenty wymagające podpisów autorów (np. list intencyjny, oświadczenia autorów, kopie zgody na przedruk potwierdzone za zgodność z oryginałem) pocztą tradycyjną na adres Redakcji.

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

SPIS TREŚCI

Łukasz GÓRSKI, Robert ZIÓŁKOWSKI, Agnieszka BAŁA, Marta JARCZEWSKA, Elżbieta MALINOWSKA: Oligonukleotydy DNA jako warstwy receptorowe sensorów elektrochemicznych	325
Anna PANEK, Natalia MILECKA-TRONINA, Alina ŚWIZDOR: Enzymatyczne reakcje rozszczepienia wiązania C-C. Zastosowanie w syntezie związków zapachowych, farmaceutyków oraz w bioremediacji	337
Magdalena ŁYSAKOWSKA, Dorota G. PIOTROWSKA: Reakcja Niementowskiego	369
Paweł BOROWIECKI: Przemysłowe zastosowania lipaz w syntezie związków o wysokiej wartości dodanej – 85 lat katalizy enzymatycznej lipazami. Część I	391
Paweł BOROWIECKI: Przemysłowe zastosowania lipaz w syntezie związków o wysokiej wartości dodanej – 85 lat katalizy enzymatycznej lipazami. Część II	431
Ryszard W. GRYGLEWSKI: Biochemiczna rewolucja, czyli rzecz o Leonie Marchlewskim i Marcelim Nenckim	465
Nowe wydawnictwa	479
Informacje	482

W NASTĘPNYCH ZESZYTACH UKAŻĄ SIĘ:

Iwona UFNALSKA, Magdalena Zofia WIŁOCH, Małgorzata WESOŁY, Paweł ĆWIK, Marcin ZABADAJ, Patrycja CIOSEK, Urszula Elżbieta WAWRZYŃIAK, Wojciech WRÓBLEWSKI: Zastosowanie metod elektrochemicznych w bioanalizie – wybrane zagadnienia

Ewelina TOMECKA, Katarzyna TOKARSKA, Elżbieta JASTRZĘBSKA, Michał CHUDY, Zbigniew BRZÓZKA: Inżynieria komórkowa w systemach *lab-on-a-chip*

Prace wyróżnione

Krzysztof BARTYZEL: Przełączniki molekularne: rodzaje i zastosowania

Sofia LENDOR: Charakterystyka zażyciowych i pośmiertnych przemian karbamazepiny oraz wybranych rodzajów alternatywnego materiału biologicznego na potrzeby analiz toksykologiczno-sądowych