



Mikroorganizmy w stereoselektywnej syntezie organicznej

Aleksandra Niemiec, Wiesław Szeja

Katedra Technologii Chemicznej Węgla i Ropy Naftowej
Politechnika Śląska, Gliwice

Microorganisms in stereoselective organic synthesis

Summary

This paper deals with the use of microorganisms for the synthesis of homochiral compounds. The influence of various factors on the efficiency of biotransformation employing whole cells is discussed. The author's attention was focused on stereochemistry of reaction since the knowledge of its rules allows to control the stereoselectivity and productivity of biotransformation. Some interesting examples of best documented bioreduction and biooxidation reactions were selected and are reported in this article.

Key words:

whole cells, microorganisms, biotransformations, bioreduction, biooxidation.

1. Wprowadzenie

Dynamiczny rozwój nauk medycznych, a zwłaszcza nauk farmaceutycznych stawia coraz trudniejsze zadania syntezy wielofunkcyjnych związków organicznych, głównie związków o zdefiniowanej konfiguracji centrów stereogenicznych. Temat ten znalazł się w centrum uwagi wielu grup prowadzących badania z zakresu syntezy organicznej. Opracowano szereg rozwiązań spełniających ostre wymogi wydajności oraz regio- i stereoselektywności reakcji (1). Jednakże otrzymanie związków chiralnych

Adres do korespondencji

Wiesław Szeja,
Katedra Technologii
Chemicznej Węgla
i Ropy Naftowej,
Politechnika Śląska,
ul. B. Krzywoustego 8,
44-101 Gliwice.

w postaci enancjomerycznie czystej jest nadal trudnym problemem syntezy organicznej (1,2). Wraz z rozwojem nauk przyrodniczych możliwa stała się pełniejsza analiza właściwości biologicznych enancjomerów. Wielokrotnie obserwowano, że właściwości farmakokinetyczne enancjomerów różnią się ilościowo i jakościowo. Znane są leki zawierające jako substancje czynne izomery zasadniczo różniące się zakresem stosowania. Przykładem może być D-sotalol, który działa arytmicznie i L-sotalol blokujący receptory beta (3). W przeprowadzonych badaniach nad efektami terapeutycznymi wielu leków stosowanych w postaci racemicznej wskazuje się, że często tylko jeden ze składników jest biologicznie aktywny. Dzieje się tak w przypadku preparatu blokującego receptory beta, stosowanego pod nazwą propranolol, którego tylko izomer o konfiguracji L jest substancją czynną leku (3). Podobne zależności mają miejsce w grupie środków ochrony roślin. Preparat o nazwie metachlor zawiera głównie enancjomer o konfiguracji S (4). Obserwowane zależności między budową przestrzenną a aktywnością biologiczną związków chemicznych wpłynęły na kierunek poszukiwań substancji biologicznie aktywnych. Dąży się do zastępowania preparatów racemicznych związkami enancjomerycznie czystymi. Wytwarzanie związków homochiralnych stało się zatem jednym z ważnych zadań przemysłu farmaceutycznego.

Opracowano szereg metod pozyskiwania związków homochiralnych, a wśród nich wydzielanie z surowców naturalnych, synteza asymetryczna, w tym z użyciem chiralnych katalizatorów chemicznych (5) itd. Poszukując prostych i efektywnych dróg otrzymywania związków chiralnych w postaci enancjomerycznie czystej sięga się do rozwiązań znanych z natury, ponieważ znakomitą większością procesów chemicznych w przyrodzie cechuje wysoka stereoselektywność. Wykorzystanie naturalnych katalizatorów-enzymów do transformacji związków organicznych, w tym także nie należących do klasy połączeń naturalnych było przedmiotem wielu prac i zostało omówione w monografiach i artykułach przeglądowych (2,6-12). Przykładem rozwiązań rozszerzających możliwości syntezy związków homochiralnych o biokatalizę jest powszechne wykorzystanie lipaz do rozdzielania racematów (2,6-8), wykorzystanie glikozydaz w syntezie glikozydów (9), czy redukcja związków karbonylowych do hydroksylowych (10-12) z udziałem oksydoreduktaz. Efektywność przemian enzymatycznych stała się inspiracją do poszukiwań nowych rozwiązań procesów biotransformacji. Jedną z obiecujących dróg jest wykorzystanie całych komórek mikroorganizmów do celów syntezy chemicznej, a zwłaszcza związków optycznie czynnych o wysokim stopniu czystości.

W pracy omawiamy nowe możliwości otrzymywania chiralnych półproduktów do syntezy związków biologicznie aktywnych. Ze względu na obszerność tematyki skoncentrowano uwagę na najlepiej udokumentowanych i najszerszej stosowanych reakcjach utleniania-redukcji.

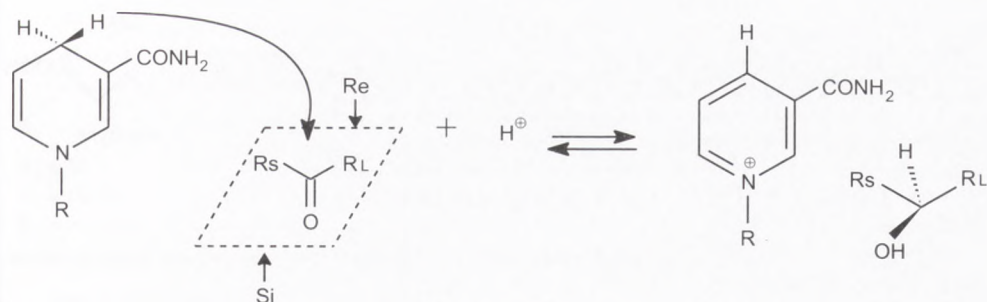
2. Otrzymywanie chiralnych syntonów ze związków karbonylowych

2.1. Generowanie centrum stereogenicznego przez redukcję achiralnych ketonów

Zainteresowanie wytwarzaniem homochiralnych substratów zawierających stereogeniczny atom węgla wiąże się z ich szerokim stosowaniem jako półproduktów w syntezie farmaceutyków (10-12). W ostatnich latach wykazano, że biotransformacja jest interesującą propozycją otrzymywania wielu bardzo ważnych enancjomerycznie czystych substratów. Do najlepiej udokumentowanych przemian należy redukcja związków karbonylowych do alkoholi. Działając enzymem z grupy dehydrogenaz na keton otrzymuje się z dobrą wydajnością i stereoselektywnością alkohol homochiralny (2,6-15). Reakcje prowadzi się w obecności koenzymów, najczęściej nukleotydów nikotynoadeninowych, takich jak dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NADH), jego fosforan (NADPH) oraz nukleotydów flawinowych (FAD), co stanowi ograniczenie w szerokim stosowaniu tych metod ponieważ preparaty te są stosunkowo mało stabilne i drogie. Znaczny postęp odnotowano gdy w procesie reduktywnej biotransformacji zastosowano mikroorganizmy wytwarzające dehydrogenazy, które w warunkach zapewnionego źródła energii same prowadzą regenerację kofaktora. Pierwsze prace, w których opisano możliwość przeprowadzenia bioredukcji ketonów do alkoholi przez fermentację z drożdżami piekarskimi *Saccharomyces cerevisiae* (11) pochodzą z roku 1918. Obecnie biotransformacja ketonów z użyciem drożdży należy do ważniejszych metod otrzymywania homochiralnych alkoholi (14,15). W cytowanych pracach przeglądowych zawarto szereg przykładów praktycznych rozwiązań syntez z użyciem całych komórek mikroorganizmów. W artykule tym omawiamy zagadnienia stereochemii opisanych reakcji.

W badaniach mechanizmów reakcji asymetrycznych bierze się pod uwagę oddziaływanie steryczne substratu z reagentem w stanie przejściowym. Zasady takiego podejścia przedstawił Prelog badając addycję do grupy karbonylowej w estrach 2-ketokwasów, pochodnych optycznie czynnych alkoholi (16). Rozszerzając zakres swych doświadczeń Prelog przedstawił model, w którym opisuje redukcję ketonów w obecności dehydrogenazy alkoholowej z wątroby końskiej (HLADH). Zagadnienia te przedstawiono na rysunku 1 (6). Prelog wykazał, że stereochemia tej reakcji również zależy od objętości grup związanych z karbonylowym atomem węgla. W stanie przejściowym preferowana jest taka orientacja NADH i substratu, w której mniejszy podstawnik R_s jest skierowany w stronę pierścienia heterocyklicznego, a atak jonu wodorkowego następuje od strony „Re” ketonu.

Systematyczne badania stereochemii redukcji ketonów prowadzonej z udziałem drożdży podjął Mosher (17). Stosując jako związki modelowe proste alifatyczne i aromatyczne ketony, przy odpowiednim zróżnicowaniu podstawników uzyskał homochiralne alkohole z wysokim nadmiarem enancjomerycznym. Budowa produktów



R = adenosynodifosforan β -D-rybofuranozylowy

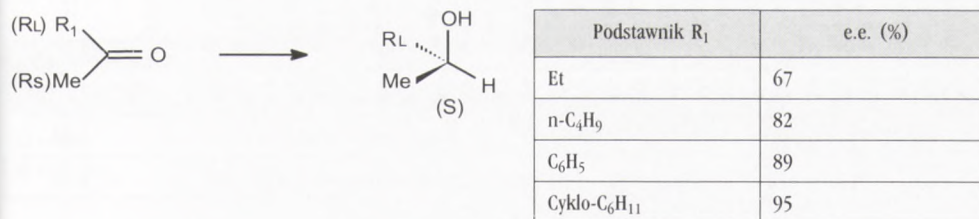
R_S – mniejszy podstawnik

R_L – większy podstawnik

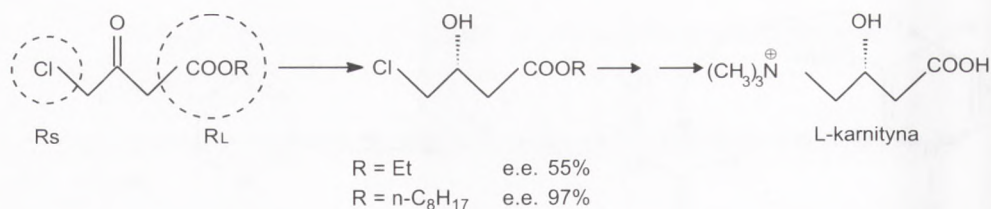
Rys. 1. Model Preloga ilustrujący rolę czynników sterycznych w reakcji asymetrycznej redukcji ketonów.

powstałych w wyniku redukcji ketonów metyloalkilowych i metyloarylowych wskazuje, że addycja wodoru odbywa się od strony „Re” i powstają alkohole o konfiguracji absolutnej (S). Najwyższą enancjoselektywność uzyskano, gdy podstawniki znacznie różniły się objętością (rys. 2).

Różnicowanie wielkości podstawników przy prochiralnym atomie węgla jest jednym z często stosowanych sposobów poprawy stereoselektywności reakcji. W kolejnych przykładach udokumentowano skuteczność takiego postępowania. Badając przebieg redukcji chloroketoestrów, półproduktów do otrzymywania ważnego aminokwasu L-karnityny, stwierdzono, że dogodnymi substratami pozwalającymi na uzyskanie czystych homochiralnych hydroksyestrów są pochodne wyższych alkoholi (18). Przeniesienie wodoru jest zgodne z regułą Preloga (16), zatem addycja wodoru do wiązania karbonylowego następuje od strony „Re” płaszczyzny, zaś selektywność reakcji zależy od relatywnej wielkości podstawników (rys. 3). Redukcja acetyloctanów alkilowych, zwłaszcza etylowego, jest dobrze udokumentowanym sposobem otrzymywania homochiralnych 3-hydroksymaślanów (14,15). Absolutna konfi-



Rys. 2. Enancjoselektywna redukcja ketonów z udziałem drożdży piekarskich.



Rys. 3. Schemat ilustrujący wpływ wielkości grupy estrowej na stereoselektywność redukcji chloro-ketoestrów z użyciem drożdży piekarskich.

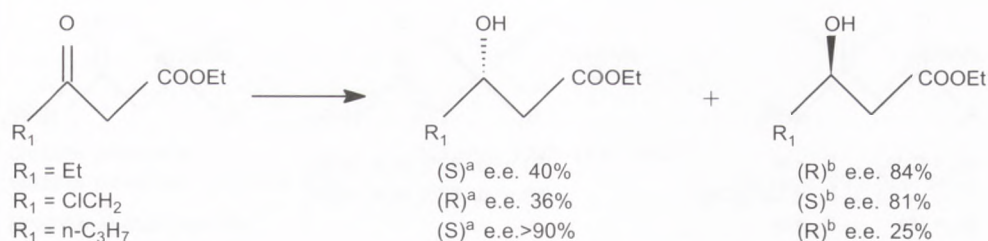
guracja utworzonego stereogenicznego centrum może być określona na podstawie reguły Preloga (16). Podobnie, jak w przypadku ketonów produktem fermentacji z udziałem drożdży jest 3-(S)-hydroksymaślan etylowy, ważny substrat w syntezie wielu związków biologicznie aktywnych.

W komórkach drożdży piekarskich znajduje się szereg dehydrogenaz różniących się aktywnością i enancjoselektywnością (21). Zmieniając warunki fermentacji można wpływać na aktywność enzymów, a przez to na czystość optyczną produktów. Przykładowo, znaczne zmniejszenie stężenia acetylooctanu etylowego pozwala na wydzielenie hydroksyestru z bardzo dobrą czystością optyczną (19). Również zmiana warunków przygotowania biokatalizatora przez immobilizację drożdży w alginianie (20,22) (rys. 4), czy dodatek specyficznych inhibitorów dehydrogenazy (14,15) wpływa korzystnie na enancjoselektywność redukcji. Często natura stosowanych mikroorganizmów decyduje o enancjoselektywności reakcji. Wskazuje się na to w pracach Buissona i wsp., którzy prowadząc redukcję acetylooctanu etylowego działaniem grzybów z gatunku *Geotrichum candidum* otrzymali izomer (3R) z wydajnością 75% (e.e. 98%) (23). Seebach i wsp. (24) prowadzili redukcję ketoestrów przy użyciu drożdży i bakterii termofilnych. Na podstawie uzyskanych wyników wskazuje się, że stereoselektywność reakcji zależy w dużym stopniu od rodzaju biokatalizatora i struktury substratu (rys. 5). W procesie redukcji chloroacetylooctanu etylowego bakteriami termofilnymi otrzymuje się z dobrą wydajnością i stereoselektywnością izomer (S). Redukcja prowadzona przy użyciu drożdży cechuje się niską (R) selek-



Biokatalizator	Wydajność (%)	e.e. (%)
Liofilizowane drożdże (11)	76	85
Immobilizowane drożdże (22)	75	98

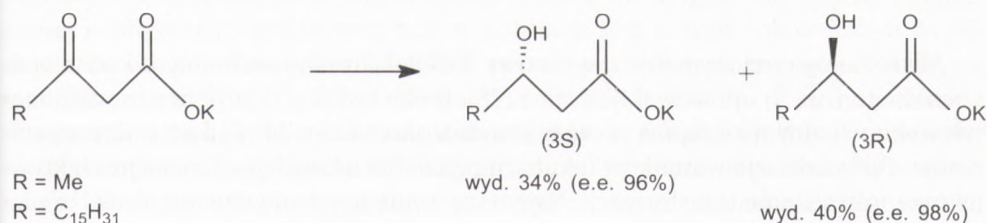
Rys. 4. Wpływ warunków przygotowania biokatalizatora na enancjoselektywność redukcji acetylooctanu etylowego.



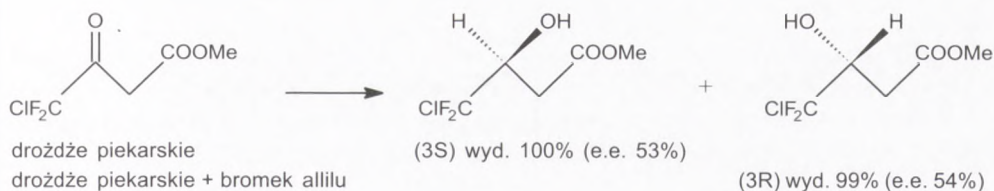
Rys. 5. Wpływ rodzaju mikroorganizmu na enancjoselektywność redukcji pochodnych 3-ketoestrów z użyciem: a) drożdży piekarskich; b) *Thermoanaerobium brockii*.

tywnością. Najwyższą selektywność reakcji obserwuje się, gdy substratem jest ester etylowy kwasu 3-ketoheksanowego, a fermentację prowadzi się przy użyciu drożdży. Wyższą niż dla estrów selektywność redukcji obserwuje się stosując jako substraty sole potasowe 3-ketokwasów. Również w tym przypadku poprzez dobór podstawnika przy karbonylowym atomie węgla można wpływać na enancjoselektywność redukcji (25). Zagadnienie to zilustrowano na rysunku 6. Gotor i wsp. (26) wskazali, że inkubacja 3-oksoamidów z udziałem grzybów *Mortierella isabellina* jest efektywnym narzędziem otrzymywania enancjomerycznie czystych pochodnych 3-hydroksylowych, stosowanych w syntezie leków antydepresyjnych takich jak Fluoxetine, Tomoxetine, Nisoxetine (rys. 7).

Redukcję związków dikarbonylowych można przeprowadzić stereoselektywnie, gdy jedna z grup karbonylowych jest zabezpieczona w postaci acetalu. Wskazuje się na to w pracy Besse i wsp. (27). Autorzy po przetestowaniu wielu mikroorganizmów opracowali warunki syntezy chiralnych hydroksyketonów. Dobór odpowiednich mikroorganizmów pozwolił im na otrzymanie z dobrą wydajnością i znakomitą selektywnością obu enancjomerów (rys. 8). Otrzymane związki przekształcono w kilkuetapowej syntezie w homochiralne aminoketony, substraty w syntezie wielu leków.



Rys. 6. Wpływ wielkości podstawnika na enancjoselektywność redukcji soli potasowych 3-ketoestrów przy udziale drożdży piekarskich.



Rys. 10. Porównanie przebiegu redukcji 4-chloro-4,4-difluoroacetylooctanu metylowego w obecności: a) drożdży piekarskich; b) drożdży piekarskich oraz bromku allilu, inhibitora najaktywniejszej dehydrogenazy.

biologicznych – działają na centralny układ nerwowy, inhibują prostaglandynę F_{2a} , wykazują właściwości przeciwzakrzepowe.

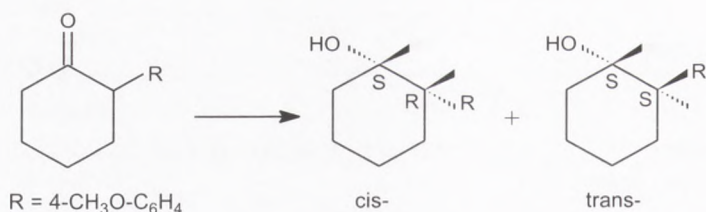
Optycznie aktywne związki fluoroorganiczne znajdują szerokie zastosowanie jako syntony przy otrzymywaniu substancji biologicznie aktywnych. Antolini i wsp. (29) wykazali, że mikrobiologiczna redukcja 4-chloro-4,4-difluoroacetylooctanu metylowego jest dogodnym sposobem otrzymywania homochiralnych alkoholi (rys. 10). W obecności drożdży piekarskich otrzymuje się alkohole o konfiguracji (3S). Dodatek bromku allilu, inhibitora dehydrogenazy katalizującej addycję od strony „Re”, zmienia stereochemię redukcji i otrzymuje się izomeryczny alkohol o konfiguracji (3R).

W omówionych dotychczas przykładach wskazuje się, że zakres stosowania mikrobiologicznej redukcji grup karbonylowych jest bardzo szeroki. Niejednokrotnie redukcję prowadzono wydajnie i stereoselektywnie w obecności bardzo różnych grup funkcyjnych, grup ochronnych i podstawników. Dobór odpowiednich mikroorganizmów, optymalizacja warunków hodowli oraz struktury substratu pozwoliła na uzyskanie ze związków prochiralnych enancjomery o wysokiej czystości optycznej.

2.2. Otrzymywanie związków zawierających kilka centrów stereogenicznych

Jednym z najtrudniejszych zadań w syntezie organicznej jest otrzymywanie związków wielofunkcyjnych zawierających kilka centrów stereogenicznych o ściśle określonej konfiguracji. Reduktywna biotransformacja jest nowym, obiecującym narzędziem do otrzymywania również takich związków. W literaturze wskazuje się, że w biosyntezach asymetrycznych stosuje się najczęściej substraty, w których chiralny atom węgla znajduje się w pobliżu prochiralnej grupy funkcyjnej. Wysoką selektywność przemiany zapewnia chiralny biokatalizator. Przedstawione reakcje otrzymywania związków wielofunkcyjnych charakteryzują się zazwyczaj nie tylko wysoką stereoselektywnością, ale i dobrą wydajnością.

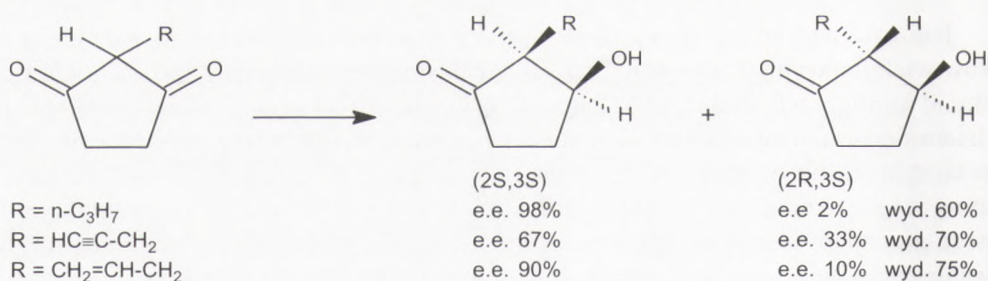
Do najlepiej udokumentowanych metod multiplikacji chiralności należy redukcja racemicznych ketonów. Jednym z pierwszych doświadczeń była redukcja pochod-



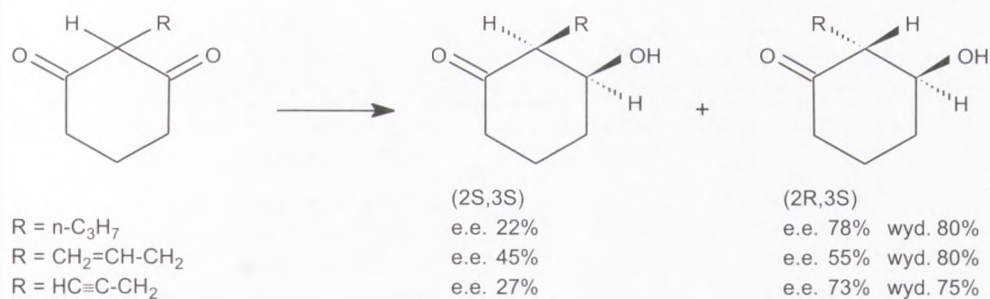
Rys. 11. Asymetryczna synteza alkoholi w wyniku stereoselektywnej redukcji mieszaniny racemicznej pochodnych cykloheksanonu z udziałem drożdży piekarskich.

nych cykloheksanonu działaniem drożdży piekarskich (30), w wyniku której otrzymano równomolową mieszaninę cis- i trans-cykloheksanoli (rys. 11). Reakcja jest enancjoselektywna i prowadzi do otrzymania produktu o konfiguracji (S) nowo utworzonego centrum stereogenicznego. Wysoką selektywność można osiągnąć przeprowadzając redukcję cyklicznych 1,3-diketonów. Przykładem może być redukcja cyklopentandionów (31,32) w wyniku której również otrzymuje się mieszaninę dwóch diastereoizomerów o konfiguracji (S) tworzącego się centrum stereogenicznego (rys. 12). Stereoselektywność w dużym stopniu zależy od budowy podstawnika w sąsiedztwie grupy redukowanej. Dla pochodnych allilowych zarówno wydajność reakcji jak i selektywność jest zadowalająca. Otrzymane izomery można rozdzielić uzyskując homochiralne hydroksyketony, wartościowe substraty w syntezie biologicznie aktywnych związków naturalnych.

Redukcja cykloheksano-1,3-dionów prowadzi także do otrzymania alkoholu o konfiguracji (3S), jednak stereoselektywność jest znacznie gorsza niż w omawianym poprzednio doświadczeniu (33) (rys. 13). Z dobrą wydajnością przebiega redukcja podstawionych acyklicznych 1,3-dionów do hydroksyketonów (34), jednakże produktem jest zwykle mieszanina diastereoizomerycznych hydroksyketonów. O przebie-



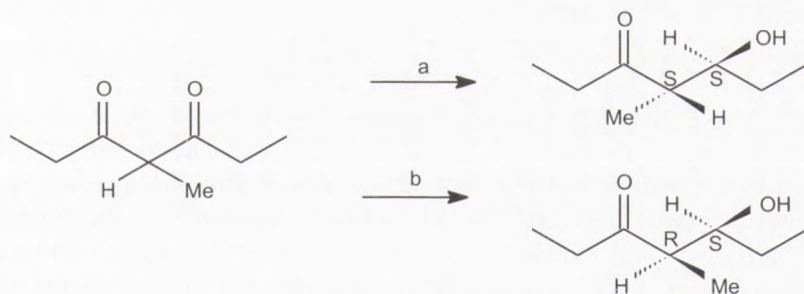
Rys. 12. Wpływ budowy podstawnika na stereoselektywność redukcji racemicznych pochodnych cyklopentan-1,3-dionu przy udziale drożdży piekarskich.



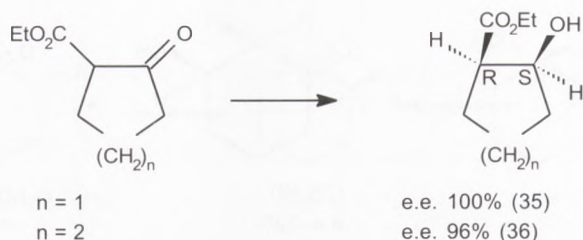
Rys. 13. Wpływ budowy podstawnika na stereoselektywność redukcji racemicznych pochodnych cykloheksan-1,3-dionu przy udziale drożdży piekarskich.

gu reakcji decydują warunki prowadzenia fermentacji. Redukcja racemicznych 4-metyloheptan-3,5-dionów działaniem grzybów *Geotrichum candidum* w warunkach anaerobowych prowadzi do hydroksyketonów o konfiguracji (4R,5S), podczas gdy przy dostępie powietrza otrzymuje się izomer o konfiguracji (4S,5S) (rys. 14).

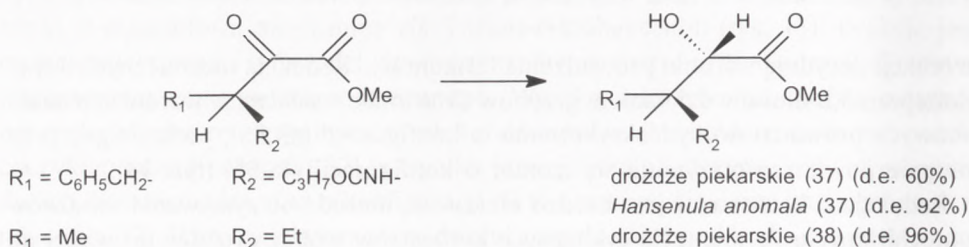
Redukcja α -ketoestrów jest bardzo efektywną metodą otrzymywania związków homochiralnych. Fermentacja cyklicznych ketoestrów wobec drożdży prowadzi do uzyskania dobrych wydajności cis-2-hydroksyestrów, a utworzone centrum stereogeniczne posiada konfigurację absolutną (S) (35,36) (rys. 15). Acykliczne α -ketoestry reagują w obecności drożdży bądź bakterii *Hansenula anomala* dając produkty o konfiguracji (S) nowego centrum stereogenicznego (37,38) (rys. 16). Redukcja α -hydroksy- β -ketoestrów wobec drożdży prowadzi do otrzymania izomeru o konfiguracji (2S,3S) (39). W warunkach reakcji przyłączenie jonu wodorkowego zachodzi od strony sterycznie bardziej dostępnej płaszczyzny pierścienia utworzonego z udziałem wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego (rys. 17). W wyniku redukcji racemicznych estrów pochodnych 2-alkilo-3-ketokwasów wobec drożdży piekarskich uzyskuje się mieszaninę diastereoizomerycznych hydroksyestrów (rys. 18). Skład



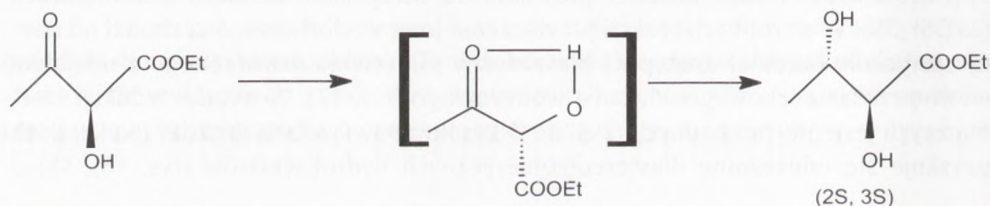
Rys. 14. Stereoselektywna redukcja racemicznego 4-metyloheptan-3,5-dionu przy udziale *Geotrichum candidum* w warunkach: a) aerobowych; b) anaerobowych.



Rys. 15. Stereoselektywna redukcja racemicznych pochodnych cyklicznych α -ketoestrów przy udziale drożdży piekarskich.



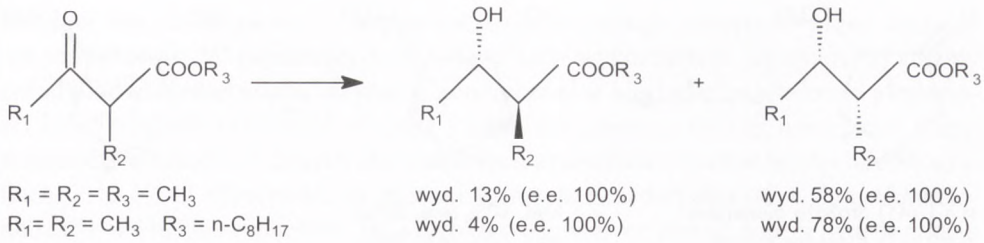
Rys. 16. Wpływ budowy podstawnika na stereoselektywność mikrobiologicznej redukcji pochodnych acyklicznych α -ketoestrów.



Rys. 17. Wpływ wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego na diastereoselektywność mikrobiologicznej redukcji α -hydroksy- β -oksomałanu etylowego.

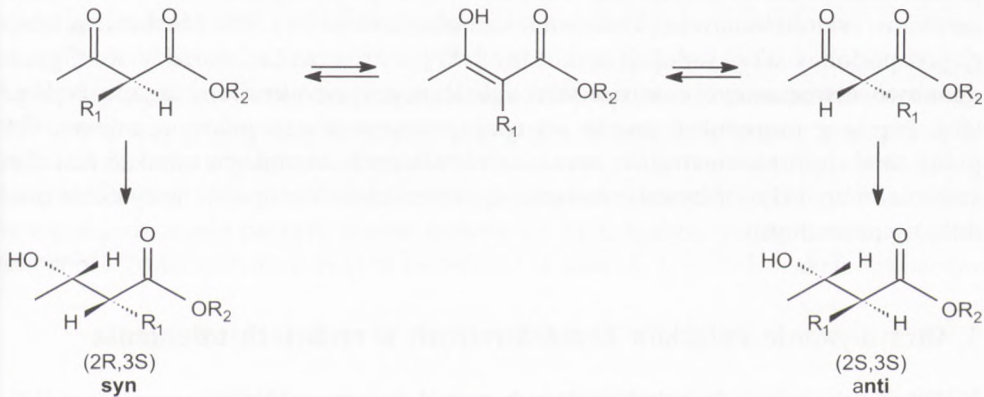
produktów zależy od wielkości podstawników. Optymalizując strukturę substratu można otrzymać jeden z diastereoizomerów w przeważających ilościach (40).

Kolejnym interesującym przykładem jest redukcja grupy karbonylowej racemicznych 2-podstawionych 3-ketoestrów. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń, obejmujących pochodne acetylooctanu etylowego stwierdzono, że redukcja grupy karbonylowej jest wysoce enancjoselektywna i prowadzi do otrzymania alkoholu o konfiguracji absolutnej (S), niezależnie od konfiguracji atomu węgla C₂. Produktem reakcji powinna zatem być równomolowa mieszanina dwóch diastereoizome-



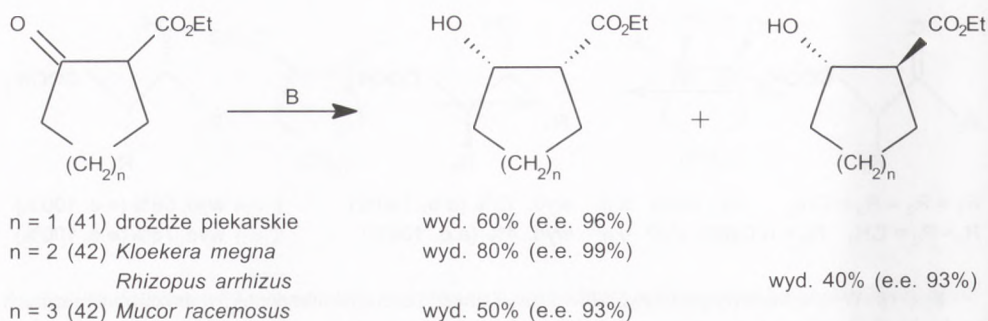
Rys. 18. Wpływ budowy podstawników na wydajność i stereoselektywność redukcji racemicznych pochodnych 2-alkilo-3-ketoestrów przy udziale drożdży piekarskich.

rycznych hydroksykwasów. Tymczasem wielokrotnie obserwowano tworzenie jednego diastereoizomeru w nadmiarze (14,15). Analiza mechanizmu redukcji prowadzi do wniosku, że w warunkach inkubacji następuje izomeryzacja enancjomerycznych β -ketoestrów poprzez formę enolową, przy czym szybkość izomeryzacji jest znacznie wyższa niż szybkość redukcji. Zgodnie z tym, w trakcie fermentacji stężenie obu enancjomerów jest równe. Wykazujące wysoką enancjoselektywność dehydrogenazy redukują znacznie szybciej jeden z ketoestrów, co tłumaczy przewagę



R_1	R_2	stosunek diastereoizomerów syn:anti
CH ₃	n-Oktyl	95:5
CH ₃	C ₂ H ₅	83:17
PhCH ₂	C ₂ H ₅	25:75

Rys. 19. Schemat redukcji racemicznych 2-podstawionych acetylooctanów alkilowych, przebiegającej w warunkach umożliwiających izomeryzację substratu poprzez formę enolową. Wpływ wielkości podstawników na stereoselektywność reakcji.



Rys. 20. Wpływ wielkości pierścienia na stereoselektywność redukcji racemicznych cyklicznych ketoestrów.

w mieszaninie reakcyjnej jednego ze stereoisomerów (14,15). Przedstawiono to na rysunku 19. Stosunek stereoisomerów syn/anti zależy od wielkości rodników R_1 i R_2 . W przypadku gdy R_1 jest większy od R_2 dominuje produkt redukcji o konfiguracji anti, natomiast gdy R_2 jest dużym podstawnikiem w przewodzie powstaje produkt syn. Godne zauważenia są prace Azereda i wsp. (36,41), którzy efektywnie przeprowadzili stereoselektywną redukcję estrów pochodnych kwasu 2-ketocyklopentano-, cykloheksano- i cykloheptanokarboksylowego (rys. 20). Mechanizm reakcji jest podobny jak w redukcji acyklicznych ketoestrów wobec drożdży. Konfiguracja nowo utworzonego centrum stereogenicznego jest określona regułą Preloga (16). Przebieg bioredukcji zależy od rodzaju stosowanego mikroorganizmu. Poprzez selekcję drobnoustrojów można w określonych warunkach uzyskać oba diastereoizomery (41). Otrzymane związki są powszechnie stosowane w syntezie produktów naturalnych.

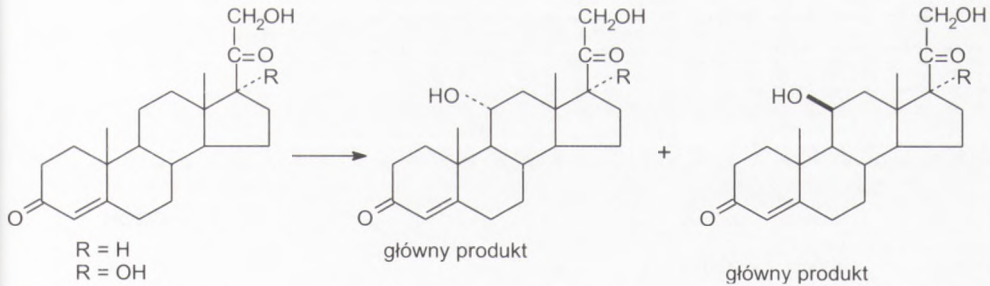
3. Otrzymywanie związków homochiralnych w reakcjach utleniania

Utlenianie należy do najważniejszych metod syntezy w chemii organicznej (63). W odróżnieniu od większości metod chemicznych, biotransformacja oksydacyjna, prowadzona w obecności enzymów i mikroorganizmów jako katalizatorów, jest regio- i enancjoselektywna. Wydajności, zwłaszcza przy użyciu mikroorganizmów, na ogół nie przekraczają 50%, lecz czystość optyczna produktów jest zwykle wysoka (e.e. powyżej 95%) (2,10,12). Utlenianie przez inkubację z mikroorganizmami prowadzone jest w łagodnych warunkach, zwykle w temperaturze 37°C, w bardzo rozcieńczonych roztworach. Przemiany zachodzą dość wolno, zatem osiągnięcie wysokiego stopnia konwersji substratu może trwać kilka dni. Produkty utleniania ulegają dalszym przemianom metabolicznym zatem należy je stale usuwać z mieszaniny re-

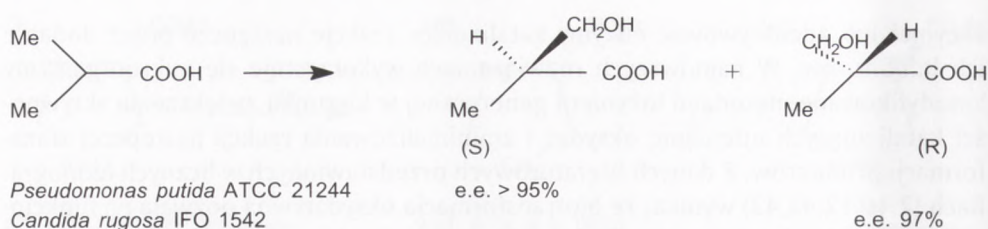
akcyjnej lub zdeaktywować enzymy katalizujące reakcje następcze przez dodanie ich inhibitorów. W najnowszych rozwiązaniach wykorzystuje się mikroorganizmy zmodyfikowane metodami inżynierii genetycznej w kierunku zwiększenia aktywności katalizujących utlenianie oksydaz i zminimalizowania reakcji następczej transformacji produktów. Z danych literaturowych przedstawionych w licznych monografiach (2,10,12,42,43) wynika, że biotransformacja oksydacyjna pozwala na funkcjonalizację wielu klas związków. Do szeroko stosowanych metod należy hydroksylacja grup metylowych, metylenowych oraz metinowych, synteza kwasów karboksylowych i związków karbonylowych, otrzymywanie dioli i epoksydów z alkenów, utlenianie amin I-rzędowych do nitrozwiązków, otrzymywanie optycznie aktywnych sulfotlenków z siarczków itd.

3.1. Wprowadzanie grupy wodorotlenowej przez utlenienie wiązań C-H

Metody stereoselektywnej hydroksylacji grup metylowych, metylenowych i metinowych katalizowane przez hydrogenazy lub mikroorganizmy są szczególnie atrakcyjnym narzędziem syntezy organicznej do otrzymywania homochiralnych związków wielofunkcyjnych. Ich wartość w otrzymywaniu złożonych syntonów polega m.in. na tym, że w zasobie syntetycznych metod chemicznych nie ma alternatywnych rozwiązań. Badania tych reakcji rozwijano intensywnie w latach czterdziestych, prowadząc prace nad funkcjonalizacją steroidów. Zaowocowały one rozwiązaniami pozwalającymi na regioselektywną i stereoselektywną hydroksylację wszystkich pozycji szkieletu steroidowego (10,46). Ich przydatność została potwierdzona wdrożeniem w praktyce przemysłowej. Regio- i stereoselektywność reakcji zależy m.in. od gatunku użytego szczepu mikroorganizmu, struktury substratu i warunków biotransformacji. Dla przykładu, kortekson (11-deoksykorteksteron) utleniany jest w wyniku działania bakterii *Absida orchidis* do 11- α -hydroksykorteksonu (rys. 21). Obecność grupy hydroksylowej w pozycji 17- α zmienia kierunek reakcji i głównym



Rys. 21. Wpływ podstawników w procesie regio- i stereoselektywnej biooksydacji szkieletu steroidowego z udziałem *Absida orchidis*.

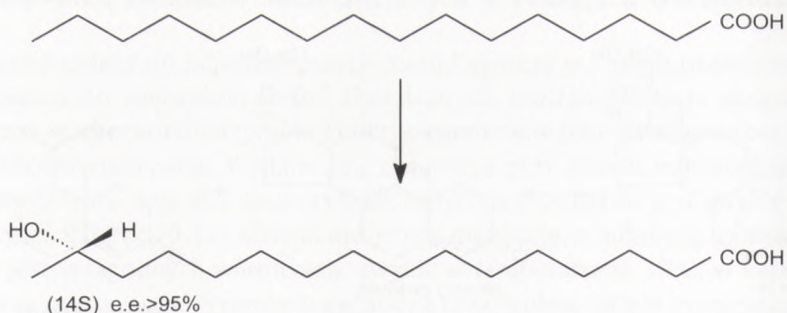


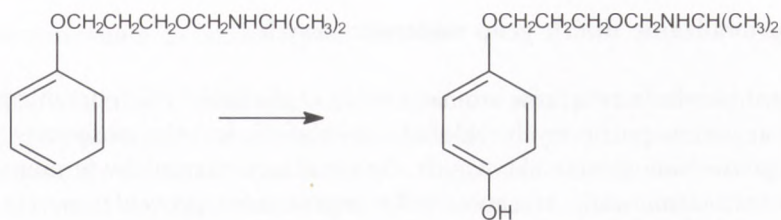
Rys. 22. Wpływ rodzaju mikroorganizmu na enancjoselektywność hydroksylacji kwasu izomasłowego.

produktem utlenienia korteksolonu (17- α -hydroksy-11-deoksykortykosteronu) jest kortyzol (11- β ,17- α -dihydroksykortekson). Opracowana metodyka została z powodzeniem przeniesiona na inne klasy związków.

Sposób otrzymywania optycznie aktywnego kwasu 2-hydroksymetylopropionowego, substratu w syntezie witaminy E (β -tokoferol), polega na hydroksylacji kwasu izomasłowego przez inkubację z drożdżami *Candida* lub bakteriami *Pseudomonas* (35) (rys. 22). Reakcja zachodzi wysoce stereoselektywnie, dając homochiralne hydroksykwasu o wysokiej czystości optycznej.

Innym ciekawym przykładem jest biokatalityczny proces otrzymywania enancjomerycznie czystych kwasów 12-, 13- i 14-hydroksypentadekanokarboksyłowych (47) (rys. 23). Jako katalizator zastosowano rekombinowany szczep *E. coli* K 27 (pCYP 102, pGEc 47), zawierający gen pCYP 102, kodujący wytwarzanie monooksygenazy cytochromu P450 oraz gen pGEc 47, który ułatwia transformację substratu. Fermentację z udziałem kwasu pentadekanowego prowadzono kontrolując ilość tlenu, dzięki czemu zmniejszono udział następczych reakcji utleniania grup wodorotlenowych do karbonyłowych. Reakcja ta jest regioselektywna i wysoce stereoselektywna. Metodyka biotransformacji z użyciem rekombinowanych mikroorganizmów pozwoli, zdaniem autorów (48), na precyzyjną, regioselektywną hydroksylację łańcu-

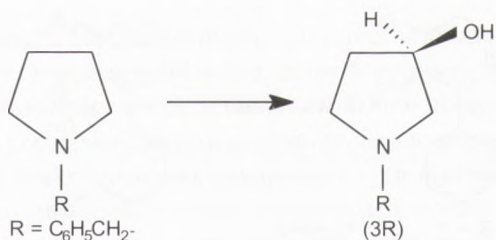
Rys. 23. Regio- i enancjoselektywna hydroksylacja kwasu pentadekanokarboksyłowego z udziałem *E. coli* K 27.



Rys. 24. Regioselektywna hydroksylacja w pierścieniu benzenowym z udziałem bakterii *Cunninghamella uchinulata*.

cha wyższych kwasów tłuszczowych i uzyskanie cennych chironów do syntezy związków biologicznie czynnych. Homochiralne związki zawierające pierścienie karbocykliczne różnej wielkości, będące ważnymi półproduktami w syntezie związków naturalnych i biologicznie aktywnych (2,6-12,46), z powodzeniem mogą być otrzymywane przez regioselektywną biohydroksylację związków aromatycznych i heteroaromatycznych (50). Reakcja monopodstawionych pochodnych benzenu z tlenem, katalizowana przez monoooksygenazy, prowadzi do otrzymania orto- i para-podstawionych fenoli (2). Hydroksylacja pochodnych benzenu w obecności bakterii *Cunninghamella uchinulata* (51) jest dogodnym sposobem otrzymywania leku o nazwie prenalterol stosowanego jako β -bloker (rys. 24).

Mikroorganizmy wykorzystujące alkanę jako źródło węgla są często zdolne do przeprowadzenia regio- i stereoselektywnej hydroksylacji związków alicyklicznych (52). Li i wsp. (53) wykorzystali tę zdolność bakterii i otrzymali optycznie czyste N-benzylowe pochodne 3-hydroksypirolidyny, półprodukty w syntezie wielu ważnych substancji biologicznie czynnych, takich jak antagonisty wapnia, antybiotyki karbapenemowe, agonista receptora k, agonista receptora 5-HT_{1Da}. Odpowiednie szczepy bakterii wyselekcjonowano prowadząc hodowlę w obecności n-oktanu, po czym dodano substrat uzyskując po kilku dniach hydroksylową pochodną o konfiguracji (3R) (rys. 25).



Rys. 25. Regio- i stereoselektywna hydroksylacja N-benzylowych pochodnych pirolidyny.

P. oleovorans GPo 1 wyd. 62% (e.e. 62%)
HXN - 1100 wyd. 67% (e.e. 70%)

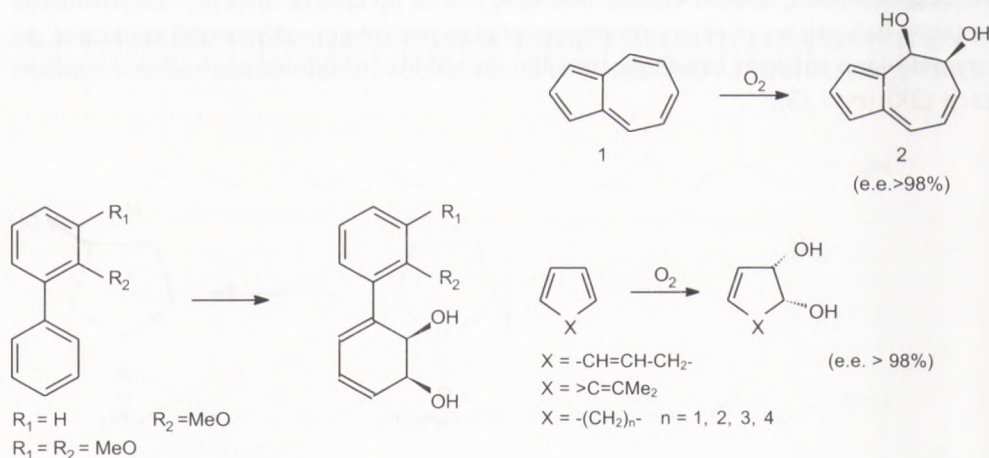
3.2. Wprowadzanie dwóch grup wodorotlenowych

Biodihydroksylacja związków aromatycznych w obecności mikroorganizmów prowadzi do uzyskania pochodnych cykloheksadienodioli, szeroko stosowanych w syntezie związków biologicznie aktywnych. Optymalizacja warunków fermentacji, wymagająca testowania wielu szczepów mikroorganizmów, prowadzi zwykle do uzyskania dioli z dobrą wydajnością i znakomitą stereoselektywnością (e.e. 98%).

Prace Gibsona i wsp. (54,55) nad utlenianiem toluenu i naftalenu zapoczątkowały badania nad syntezą wielofunkcyjnych chironów przez dihydroksylację pierścienia aromatycznego. W kolejnych publikacjach wykazano, że jako substraty można stosować szereg pochodnych benzenu i naftalenu. Metoda ta została wykorzystana do funkcjonalizacji kwasów aromatycznych takich jak kwas benzoowy (56,57) i naftoesowy (58), a otrzymane produkty znalazły zastosowanie w syntezie wielu związków naturalnych (49).

Hudlicky i wsp. (59) przedstawili interesującą drogę otrzymywania enancjomerycznie czystych pochodnych bifenyli w obecności zmienionego genetycznie szczepu *E. coli* JM109 (pDTG 601), zawierającego informację o enzymie pod nazwą dioksygenaza toluenowa z *Pseudomonas* (rys. 26).

W ostatnio opublikowanych pracach Boyd i wsp. (60) rozszerzyli wariant *cis*-dihydroksylacji wiązań podwójnych w pierścieniu aromatycznym na układy polienów. Zgodnie z tym azulen [1] ulega regio- i stereoselektywnej biotransformacji w pierścieniu cykloheptatrienowym, w wyniku której uzyskuje się *cis*-diol [2] (rys. 27). Podobnie zachodzi utlenienie innych polienowych układów cyklicznych. Obserwuje się planarną selektywność (tzw. facjalne różnicowanie) prowadzącą do otrzymania jedynie *cis*-dioli. Czystość izolowanych produktów świadczy o wysokiej stereoselektywności reakcji.



Rys. 26. Regio- i stereoselektywna dihydroksylacja pochodnych bifenylu z użyciem *E. coli* JM109.

Rys. 27. Regio- i stereoselektywna dihydroksylacja cyklicznych polienów.

3.3. Otrzymywanie związków epoksydowych

Chiralne oksirany, z uwagi na reaktywność w reakcjach substytucji nukleofilowej, należą do powszechnie stosowanych syntonów w preparatyce związków biologicznie czynnych i związków naturalnych. Zasadniczą drogą chemicznej syntezy enancjomerycznie czystych pochodnych oksiranów jest epoksydacja alkoholi alilowych metodą Sharplessa (61). Biotransformacja z udziałem mikroorganizmów pozwala rozszerzyć zakres epoksydacji na praktycznie wszystkie pochodne alkenów. W procesie epoksydacji alkenów najczęściej stosuje się bakterie wykorzystujące alkeny i alkeny jako źródło węgla. Właściwym katalizatorem reakcji są enzymy z grupy monoooksygenaz. Największa trudność efektywnej realizacji tej reakcji to toksyczne działanie epoksydów w odniesieniu do mikroorganizmu. Ponieważ w przyrodzie oksirany zwykle przetwarzane są w następnych etapach na diole wiele uwagi poświęcono dobraniu warunków pozwalających na usuwanie pierwotnych produktów utlenienia alkenów. Jedną z metod polega na prowadzeniu procesu w układzie dwufazowym woda-niepolarny rozpuszczalnik organiczny, tak aby powstający epoksyd przechodząc do warstwy organicznej opuszczał środowisko reakcji. Szereg bakterii z gatunku: *Pseudomonas oleovorans*, *Coryne bacterium equi*, *Mycobacterium* sp., *Xanthobacter*, *Nocardia* sp. katalizuje hydroksylację wiązań podwójnych. Jeżeli jako substrat zastosuje się terminalne alkeny produktami reakcji są epoksydy o konfiguracji (R) centrum stereogenicznego. Metodyka ta została z powodzeniem wykorzystana w syntezie homochiralnych alkilo- i aryloglicydyłowych eterów (62) (rys. 28). Są one substratami w syntezie blokerów receptorów β -adrenergicznych.



Rys. 28. Mikrobiologiczna synteza eterów glicydyłowych.

4. Podsumowanie

Opracowanie zawiera przegląd wybranych biotransformacji z użyciem mikroorganizmów stosowanych w syntezie organicznej. Spośród wielu znanych propozycji wybrano procesy utleniania i redukcji, prowadzące do otrzymania związków homochiralnych z wykorzystaniem dostępnych szczepów mikroorganizmów. Skoncentrowano uwagę na omówieniu stereochemii reakcji ponieważ znajomość tych mechanizmów pozwala planować drogi otrzymywania wielu ważnych chiralnych syntonów. Wskazano, jak zmieniając strukturę substratu poprzez wprowadzenie określonych grup funkcyjnych czy grup ochronnych oraz zróżnicowanie wielkości podstawników można zwiększyć wydajność i stereoselektywność biotransformacji. Analiza danych

literaturowych prowadzi do wniosku, że końcowy wynik przemiany nie zależy tylko od struktury substratu. Optymalizacja warunków biotransformacji wymaga w pierwszym rzędzie wybrania odpowiednich szczepów poprzez selekcję dostępnych naturalnych mikroorganizmów. Nowym kierunkiem poszukiwań jest projektowanie właściwości mikroorganizmów poprzez wykorzystanie metod inżynierii genetycznej. Sterowanie przebiegiem reakcji jest także możliwe poprzez dobór warunków fermentacji. Dobre wyniki uzyskuje się stosując techniki immobilizacji mikroorganizmów, zmieniając warunki hodowli czy kontrolując aktywność enzymów uczestniczących w przemianach poprzez dodatek do środowiska reakcji kofaktorów lub inhibitorów.

Pomimo szerokiej wiedzy na temat biotransformacji nie można z góry określić najkorzystniejszych warunków reakcji. Z tego powodu regułą jest prowadzenie cykli doświadczeń, w których dąży się do określenia wpływu wymienionych czynników na wydajność i stereoselektywność procesu. Złożoność problemu narzuca ścisłą współpracę chemików, mikrobiologów i genetyków w zakresie tej tematyki. Biorąc pod uwagę potrzeby przemysłu, stymulujące dynamiczny rozwój badań, można oczekiwać nowych rozwiązań rozszerzających możliwości syntezy złożonych związków biologicznie aktywnych.

Literatura

1. Nicolaou K. C., Sorensen E., (1995), *Classics in Total Synthesis*, VCH.
2. Faber K., (1997), *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin-Heiderbelg.
3. Czarniecki A., Maciejczyk A., Kosek M., Mazurek A. P., (1993), *Acta Poloniae Pharmaceutica. Drug Research*, 50, 5-11.
4. Drekker A., (1998), *Chem. Eng.*, 105, 61-65.
5. Achmatowicz O., Grynkiewicz G., (1993), *Acta Poloniae Pharmaceutica. Drug Research*, 50, 13-74.
6. Dranz K., Waldmann H., (1995), *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Verlag Chemie, Weinheim.
7. Wooley P., Petersen S. B., (1994), *Lipases, Their Structure, Biochemistry*, Cambridge University Press, Cambridge.
8. Theil F., (1995), *Chem. Rev.*, 95, 2203-2227.
9. Wong C-H., Halcomb R. L., Ichikawa Y., Kajimoto T., (1995), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34, 521-546.
10. Davies H. G., Green R. H., Kelly D. R., Roberts S. M., (1989), *Biotransformation in Preparative Organic Chemistry*, Academic Press, London.
11. Roberts S. M., (1997), *Preparative Biotransformations*, Wiley, New York.
12. Collins A. N., Sheldrake G. N., Crosby J., (1992), *Chirality in Industry*, Wiley, New York.
13. Midland M. M., (1989), *Chem. Rev.*, 89, 1553-1561.
14. Serri S., (1990), *Synthesis*, 1-25.
15. Csuk R., Gläncser B. I., (1991), *Chem. Rev.*, 91, 49-97.
16. Prelog V., (1964), *Pure Appl. Chem.*, 9, 119-130.
17. Maclead R., Prosser H., Fikentschem L., Lanyi J., Mosher H. S., (1964), *Biochemistry*, 3, 838-847.
18. Zhou B., Goplen A. S., van Middlesworth F., Shieh W-R, Sih C. J., (1983), *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 5925-5926.
19. D'Arrigo P., Fantoni G. P., Servi S., Strini A., (1997), *Tetrahedron: Asymm.*, 8, 2375-2379.
20. Nakamura K., Higaki M., Ushio K., Oka S., Ohno A., (1985), *Tetrahedron Lett.*, 26, 4213-4216.
21. Nakamura K., Kawai Y., Nakajima N., Ohno A., (1991), *J. Org. Chem.*, 56, 4778-4783.

22. Nakamura K., Inoue K., Ushio K., Oka A., (1988), *J. Org. Chem.*, 53, 2589-2593.
23. Buisson D., Azerad R., Sanner L., Larcheveque M., (1992), *Biocatalysis*, 5, 249-265.
24. Seebach, D., Züger M. F., Giovannini F., Sonnleitner B., Fiechter A., (1984), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 23, 151-152.
25. Hiramama M., Shimizu M., Iwashita M., (1983), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 599-600.
26. Quiros M., Rebolledo F., Liz R., Gotor V., (1997), *Tetrahedron: Asymm.*, 8, 3035-3038.
27. Besse P., Ciblat S., Canet J-L, Troin Y., Verschambre H., (1999), *Tetrahedron: Asymm.*, 10, 2213-2224.
28. Kitayama T., (1997), *Tetrahedron: Asymm.*, 8, 3765-3774.
29. Antolini L., Forni A., Moretti I., Prati F., Torre G., (1995), *Gazetta Chim. Italiana*, 125, 549-553.
30. Wimmer Z., Budesinsky M., Macek T., Svatos A., Samon D., Vasickova S., Romanuk M., (1987), *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 52, 2326-2337.
31. Brooks D. W., Grothaus P. G., Irwin W. L., (1982), *J. Org. Chem.*, 47, 2820-2821.
32. Brooks D. W., Mazdiyasi H., Chakraborti S., (1984), *Tetrahedron Lett.*, 25, 1241-1244.
33. Brooks D. W., Mazdiyasi H., Grothaus P. G., (1987), *J. Org. Chem.*, 52, 3223-3232.
34. Faure A., Verschambre H., (1987), *Tetrahedron Lett.*, 28, 5037-5040.
35. Deol B. S., Ridley D. D., Simpson G. W., (1976), *Austr. J. Chem.*, 29, 2459-2467.
36. Buisson D., Azerad R., (1986), *Tetrahedron Lett.*, 27, 2631-2634.
37. Raddatz P., Radunz H-E, Schneider G., Schwartz H., (1988), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 27, 426-427.
38. Hiramama H., Nakamine T., Ito S., (1986), *Tetrahedron Lett.*, 27, 5281-5284.
39. Sato T., Tsurumaki M., Fujisawa T., (1986), *Chem. Lett.*, 1367-1379.
40. Nakamura K., Miyai T., Nozaki K., Ushio K., Oka S., Ohno A., (1986), *Tetrahedron Lett.*, 27, 3155-3156.
41. Danchet S., Bigot C., Buisson D., Azerad R., (1997), *Tetrahedron: Asymm.*, 8, 1735-1739.
42. Fonken G. S., Johnson R. A., (1972), *Chemical Oxidations with Microorganisms*, Dekker, New York.
43. Johnson R. A., (1978), *Oxygenations with Micro-Organisms – Oxidation In Organic Synthesis*, p. C, Ed. Trahanovsky W. S., Academic Press, New York.
44. Perlman D., Titius E., Fried J., (1952), *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 2126.
45. Druckhammer D. G., Riddle V. W., Wong C-H., (1985), *J. Org. Chem.*, 50, 5387-5389.
46. Chmiel A., (1991), *Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*, PWN, Warszawa.
47. Cohen N., Eichel W. F., Lopersti R. J., Neukom C., Saucy G., (1976), *J. Org. Chem.*, 41, 3505-3511.
48. Schneider S., Wubbolts A., Sanglard D., Witholt B., (1998), *Tetrahedron: Asymm.*, 9, 2833-2844.
49. Hudlicky T., (1996), *Chem Rev.*, 96, 3-27.
50. Vigne B., Archelas A., Furstoss R., (1991), *Tetrahedron*, 47, 1447-1458.
51. Pasutto F. M., Singh N. N., Jamali F., Coutts R. T., Abuzar S., (1987), *J. Pharm. Sci.*, 76, 177-179.
52. van Beilen J. B., Kingma J., Witholt B., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 904-911.
53. Li Z., Fiten H-J, van Beilen J. B., Duetz W., Witholt B., (1993), *Tetrahedron: Asymm.*, 10, 1323-1333.
54. Kobal V. M., Gibson D. T., Davis R. E., Garza A., (1973), *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 4420-4421.
55. Ziffer H., Kabuto K., Gibson D. T., Kobal V. M., Jerina D. M., (1977), *Tetrahedron*, 33, 2491-2496.
56. Reineke W., Otting W., Knackmuss H. J., (1978), *Tetrahedron*, 34, 1707-1714.
57. Jenkins G. N., Ribbons D. W., Widdowson D. A., Slawin A. M. Z., Williams D. J., (1995), *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1, 2647-2655.
58. Morawski B., Griengl H., Ribbons D. W., Williams D. J., (1997), *Tetrahedron: Asymm.*, 8, 845-848.
59. Gonzales D., Schapiro V., Seoanne G., Hudlicky T., (1997), *Tetrahedron: Asymm.*, 8, 975-977.
60. Bowers N. I., Boyd D. R., Sharma N. D., Kennedy M. A., Sheldrake G. N., Dalton H., (1998), *Tetrahedron: Asymm.*, 9, 1831-1834.
61. Katsuki T., Sharpless K. B., (1980), *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 5974-5976.
62. Fu H., Shen G-J, Wong C-H, (1991), *Red. Trav. Chim. Pays-Bes*, 110, 167-170.
63. Hudlicky M., (1990), *Oxidations in Organic Chemistry*, ACS Monograph 186, Washington.