



## Enzymatyczna synteza oligosacharydów przez egzoglikozydazy

Alicja Buchowiecka, Stanisław Bielecki

Instytut Biochemii Technicznej  
Politechnika Łódzka, Łódź

### Enzymatic synthesis of oligosaccharides by exoglycosidases

#### Summary

The review is focused on recent advances in the enzymatic synthesis of oligosaccharides by exoglycosidases. Reversed hydrolysis, transglycosylation and glycosidase-mediated coupling have been discussed. Relations between catalytic properties of the enzyme used, acceptor molecular structure and their effect on the synthesis results have been highlighted. The work contains 55 references the majority of which appeared after 1996.

#### Key words:

exoglycosidases, enzymatic oligosaccharides synthesis, transglycosylation.

### 1. Wstęp

Białka, kwasy nukleinowe i polisacharydy są najważniejszymi makromolekułami świata ożywionego. Ich struktura, funkcje i synteza były od dawna w centrum zainteresowania wielu generacji chemików. Dzisiaj polipeptydy i polinukleotydy, składające się z dziesiątków monomerycznych składników, rutynowo otrzymuje się stosując automatyczne syntezytory. Tymczasem połączenie tylko trzech różnych monosacharydów dwoma różnymi wiązaniami glikozydowymi w większości przypadków jest nadal poważnym problemem syntetycznym. Ograniczenia chemicz-

#### Adres do korespondencji

Alicja Buchowiecka,  
Instytut Biochemii  
Technicznej,  
Politechnika Łódzka,  
ul. Stefanowskiego 4/10,  
90-924 Łódź.

---

#### biotechnologia

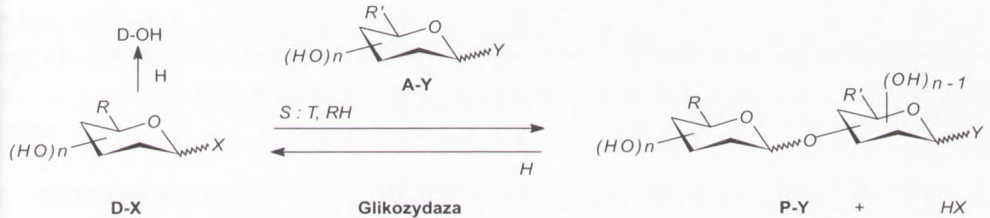
3 (50) 164-180 2000

ných metod można czasem ominąć stosując *in vitro* wybrane enzymy. Współczesne osiągnięcia enzymatycznej i chemoenzymatycznej syntezy oligosacharydów są ujęte w licznych artykułach przeglądowych (1-6).

Celem artykułu jest przedstawienie rezultatów uzyskanych w enzymatycznej syntezie oligosacharydów po roku 1996. Jest on tematycznie zawężony do najciekawszych badań, w których wykorzystano hydrolazy glikozydowe. W celu właściwego przedstawienia najnowszych dokonań zamieszczono również wybrane wyniki prac z lat wcześniejszych. Przegląd koncentruje się na problemach kontroli struktury molekularnej produktów syntezy.

## 2. Odwrotna hydroliza sacharydów

Egzoglikozydazy (7,8) pochodzące z różnych źródeł są łatwo dostępne i stosunkowo niedrogie. Zazwyczaj są to preparaty zawierające domieszki innych enzymów, rzadziej preparaty oczyszczone. W literaturze opublikowano wiele szczegółowych sposobów oczyszczania różnych glikozydaz oraz opisów ich zastosowania w badaniach lub praktyce przemysłowej. Schemat przemian jakim ulegają związki oznaczone jako donory D-X, akceptory A-Y i produkty P-Y w enzymatycznych reakcjach katalizowanych przez egzoglikozydazy jest przedstawiony na rysunku 1.



Rys. 1. Typowe przemiany sacharydów pod wpływem egzoglikozydaz.

Oznaczenia: S – synteza; T – transglikozylacja; RH – odwrotna hydroliza; H – hydroliza; D-OH – produkt hydrolizy; D-X – donory; A-Y – akceptory; P-Y – produkty syntezy

X = OH	R, R' = H	Y = OH
= Sach	= CH <sub>3</sub>	= OR''
= pNP	= CH <sub>2</sub> OH	= SR''
= F	= CH <sub>2</sub> OAc	= Sach
(i inne)	(i inne)	(i inne)

Sach : (oligo) sacharyd; pNP : p-nitrofenyloksy; Ac : acetylo; R'' : dowolna dopuszczalna grupa

Reakcja odwrotnej hydrolizy jest kontrolowana termodynamicznie i polega na odwróceniu naturalnej hydrolitycznej funkcji enzymu w kierunku tworzenia wiązań glikozydowych. Można to osiągnąć stosując substrat D-OH w wysokich stężeniach lub dodatek rozpuszczalnika organicznego mieszającego się z wodą. Zazwyczaj są to długotrwałe procesy zachodzące w podwyższonej temperaturze. Wydajności osiągane tą metodą nie przekraczają zwykle 15%, przy czym mogą powstawać liczne produkty uboczne. Z tego powodu izolowanie i oczyszczanie końcowych produktów bywa utrudnione (3). Jednakże niska cena substratów i prostota procesu powodują, że nawet 0,5% wydajność reakcji odwrotnej hydrolizy może być satysfakcjonująca, jak stwierdzono w przypadku syntezy GlcNAc $\beta$ 1-2Man (9).

Jednym z najciekawszych przykładów zastosowania odwrotnej hydrolizy jest opisana przez Suwasono i Rastalla (10) synteza oligosacharydów katalizowana przez specyficzną  $\alpha$ -1,2-mannozydazę *Aspergillus phoenicis*. Reakcję prowadzono 5 dni w temperaturze 55°C, przy 60-70% koncentracji D-mannozy i w obecności 0,055 J/ml enzymu uzyskując maksymalnie 22% wydajności disacharydu, 8% trisacharydu i 3% tetrasacharydu. Co najważniejsze, po raz pierwszy uzyskano absolutną regioselektywność w tworzeniu wiązania  $\alpha$ -1,2-mannozydowego. Zsyntetyzowane związki są składnikami ważnych wysokomannozowych oligosacharydów. Ze względu na trudności w ich chemicznej syntezie są bardzo drogie. Należy zauważyć, że spektakularny sukces opisanej reakcji odwrotnej hydrolizy wynikał ze starannego wyboru specyficznego enzymu dla  $\alpha$ -1,2-mannanu, jak również z dokonanej optymalizacji warunków reakcji. Oligomeryczny skład produktów, regioselektywność, stereoselektywność były zależne od właściwości enzymu. Wydajność reakcji w dużym stopniu, zaś oligomeryczny skład w mniejszym, były kontrolowane przez warunki reakcji, w tym zwłaszcza przez początkowe stężenie D-mannozy.

### 3. Transglikozylacja z udziałem aktywowanych i specyficznych donorów

Synteza oligosacharydów katalizowana przez egzoglikozydazy w warunkach kontroli kinetycznej, czyli transglikozylacja, wykorzystuje jako donory D-X albo specyficzne dla zastosowanego enzymu disacharydy bądź polisacharydy (X = Sach), lub tzw. aktywowane donory (11-15) (X = np. pNP, 3-nitro-2-pirydyl lub F). Donory te łatwo tworzą z enzymem glikozylujący kompleks (12), który reaguje z zewnętrznym nukleofilem A-Y, tworząc nowe wiązanie glikozydowe produktu P-Y.

Akceptorem A-Y może być dowolny (oligo) cukier (Y = OH) lub glikozyd, w którym aglikon Y jest najczęściej niehydrolizowalny przez enzym, natomiast glikon może mieć niektóre grupy hydroksylowe zablokowane np. R' = CH<sub>2</sub>OAc. Akceptorami mogą być również aminosacharydy (16-18) jak też związki niecukrowe, zwłaszcza niecukrowe alkohole (13).

Produkt P-Y jest disacharydem, oligosacharydem lub odpowiednim glikozydem o strukturze molekularnej kontrolowanej przez czynniki szczegółowo omówione w dalszej części artykułu.

### 3.1. Kontrola stereoselektywności reakcji transglikozylacji

Reakcje transglikozylacji są zwykle stereospecyficzne co wynika z natury procesu katalizy enzymatycznej. Dla porównania trzeba zaznaczyć, że kontrola stereoselektywności glikozylacji prowadzonej metodami klasycznej syntezy organicznej jest jednym z trudniejszych, strategicznych problemów (19,20).

### 3.2. Kontrola ubocznej reakcji hydrolizy

Wspomniano, że w reakcji transglikozylacji często używa się tzw. aktywowanych donorów, zwłaszcza nitrofenylowych glikozydów oraz fluorków glikozydowych (12). Dla takich donorów efektywność katalityczna enzymu  $k_{cat}/K_m$  jest wyższa niż w odniesieniu do produktów syntezy (21). Choć tworzenie produktu syntezy jest preferowane kinetycznie, hydroliza jest zawsze kontrolowana termodynamicznie. Reakcja musi być zatem monitorowana i zatrzymywana po zużyciu donora, aby zminimalizować enzymatyczną hydrolizę produktu końcowego P-Y. Hydrolitycznemu rozpadowi ulega również kompleks donora D-X z enzymem, co prowadzi do wydzielania D-OH, który nie wykazuje już właściwości glikozylujących (rys. 1). Wydzielający się kwas HX, zwłaszcza p-nitrofenol przy stężeniach  $> 0,15$  mola/litr całkowicie blokuje proces transglikozylacji (22). W przypadku fluorków glikozydowych trzeba mieć także na uwadze możliwość ich czysto chemicznej hydrolizy.

Selektywna hydroliza produktu końcowego może prowadzić do błędów w interpretacji wyników syntezy. Można w tym miejscu posłużyć się przykładem z pracy Ajisaki i in. (23), którzy badali  $\alpha$ -1,3-fukozylację D-glukozy i D-GlcNAc pod wpływem nowej  $\alpha$ -L-fukozydazy *Penicillium multicolor*. Stosując jako donora  $\alpha$ -L-Fuc-pNP otrzymali oni Fuca1-3Glc i Fuca1-3GlcNAc regiospecyficznie. Autorzy udowodnili, że obserwowana regiospecyficzność jest pozorną. W rzeczywistości tworzy się też produkt  $\beta$ -1,6-fukozylacji, który jednak jest szybko hydrolizowany. W mieszaninie po reakcji pozostaje wyłącznie produkt  $\alpha$ -1,3-fukozylacji ulegający hydrolizie powoli.

Przedstawiony skrótowo problem hydrolizy donora D-X i produktu transglikozylacji P-Y jest głównym powodem obniżania wydajności syntezy. Nic dziwnego, że jest to obszar wielu wysiłków naukowych zmierzających do eliminacji lub ograniczenia hydrolitycznej degradacji reagentów. Typowym, często skutecznym podejściem jest dodatek rozpuszczalnika organicznego obniżającego stężenie wody w środowisku reakcji, lub nawet prowadzenie procesu w rozpuszczalnikach organicznych nie mieszających się z wodą. Wprawdzie hydroliza ulega ograniczeniu, ale pojawiają

się problemy ze stabilnością i aktywnością enzymu w nienaturalnym dla niego środowisku (24,25).

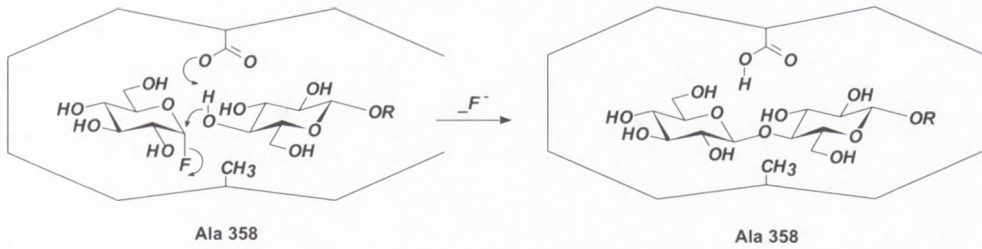
W ostatnim czasie pojawiło się kilka oryginalnych i perspektywicznych metod transglikozylacji, w których uboczną reakcją hydrolizy wyeliminowano w poważnym stopniu. W pracach Mori i Okahaty (26) oraz Mesiano i in. (27) opisano np. proces transgalaktozylacji z użyciem pokrytej warstwą lipidową  $\beta$ -galaktozydazy, który był prowadzony w środowisku nadkrytycznego  $\text{CO}_2$ . Właściwości nadkrytycznego  $\text{CO}_2$  jako rozpuszczalnika dla wprowadzonych substancji mogą być łatwo zmieniane w sposób ciągły, przez zmianę ciśnienia lub temperatury. Taki „rozpuszczalnik” jest nietoksyczny i po procesie może być łatwo usunięty przez dekompresję.

W reakcji tej użyty został p-nitrofenylo- $\beta$ -D-galaktopiranozyd jako donor, 5-fenylpentan-1-ol jako akceptor oraz pokryta warstwą lipidową  $\beta$ -D-galaktozydaza z *Bacillus circulans* – dobrze rozpuszczalna w nadkrytycznym  $\text{CO}_2$ . Po 3 godzinach (40°C, 150 atm.) uzyskano 72% wydajność produktu transglikozylacji.

Interesujące wyniki biokatalizy w środowisku nadkrytycznego  $\text{CO}_2$  opublikowali ostatnio Matsumura i in. (28). W jednoetapowym procesie transglikozylacji n-oktanolu ksylanem, otrzymali mieszaninę n-oktylowych- $\beta$ -D-glikozydów ksylotriozy, ksylobiozy i ksylozy – związków, które należą do nowej generacji substancji powierzchniowo czynnych. Biokatalizatorem były wysuszone acetonem komórki *Aureobasidium pullulans* KK415(ATCC201145) wykazujące aktywność ksylanazy i  $\beta$ -ksylozydazy (28). W badaniach stwierdzono decydujący wpływ obecności nadkrytycznego  $\text{CO}_2$  na tworzenie alkilotriozydu, który wykazuje najkorzystniejsze właściwości spośród otrzymanych produktów transglikozylacji. Wcześniej Matsumura i in. (29) opracowali sposób bezpośredniej transglikozylacji prowadzącej do otrzymania n-butylo-2-amino-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozy. Proces prowadzono w środowisku wodno-organicznym. Zastosowano polimeryczny donor chitozan oraz n-butanol. Źródłem egzo- $\beta$ -D-glukozaaminidazy katalizującej proces były komórki *Penicillium funiculosum* KY616. Po 48 godzinach inkubacji w temperaturze 30°C otrzymano produkt z wydajnością 210 mg/1g chitozanu. Alkilo-2-amino-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozydy są cennymi substratami w syntezie nowych substancji biologicznie aktywnych (29).

W innej pracy Li i Wang (30) opisali uzyskany metodami inżynierii genetycznej zbiór dziesięciu termostabilnych glikozydaz (CLONENZYME™ Library) pochodzących z termofilnych mikroorganizmów. Enzymy te zastosowano w reakcji transglikozylacji D-GlcNAc z  $\beta$ -D-Gal-oNP jako donorem w środowisku wodnym (70°C, 30 min). W najlepszych przypadkach otrzymano 45-61% wydajności Gal $\beta$ 1-4GlcNAc, a hydroliza mierzona poziomem wydzielonej D-galaktozy zachodziła w 8-18%. Warto zaznaczyć, że dla jednego z enzymów ze zbioru CLONENZYME™ wydajność syntezy wynosiła 0%, a hydroliza aż 86%. Dla porównania wydajność tej samej reakcji z innymi  $\beta$ -galaktozydazami wynosiła 19-25%, a hydroliza 15-71%.

W jednej z ostatnich prac Mackenzie i in. (21) opisano zastosowanie specyficznie zmutowanej  $\beta$ -glukozydazy/galaktozydazy (AbgGlu358Ala) z *Agrobacterium* sp., która w połączeniu z aktywowanym donorem reszt glikozylowych o przeciwnej anome-



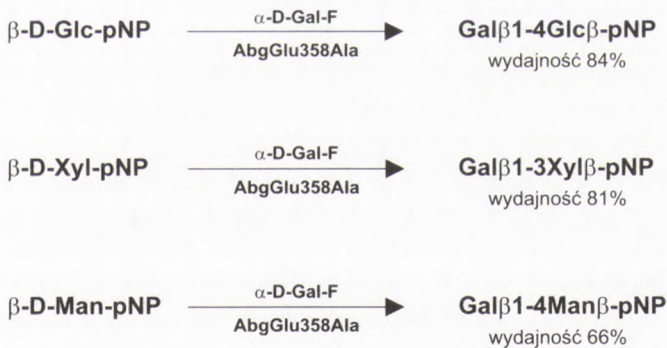
Rys. 2. Proponowany przez Mackenzie i in. (21) mechanizm działania zmutowanej  $\beta$ -glikozydazy AbgGlu358Ala.

rycznej konfiguracji niż w normalnym substracie oraz w obecności odpowiedniego akceptora może syntetyzować oligosacharydy, ale nie może ich hydrolizować. Autorzy zaproponowali, aby taką glikozydazę nazwać glikosyntazą.

W zmutowanym enzymie katalityczna grupa nukleofilowa COOH, pochodząca od Glu w położeniu 358, została zastąpiona grupą metylową nie mającą właściwości nukleofilowych poprzez wymianę Glu na Ala. W efekcie z  $\alpha$ -glikozyłowymi fluorkami zachodzi transglikozylacja, a hydroliza produktu nie jest możliwa (rys. 2). Reakcje zachodzą regiospecyficznie z nadzwyczaj wysokimi wydajnościami 70-90%.

W przypadku  $\alpha$ -D-Glc-F proces można zatrzymać na etapie monogalaktozylacji, co prezentują przykłady (rys. 3). Powstają wyłącznie produkty  $\beta$ -1,4-galaktozylacji, a jeśli akceptorem jest  $\beta$ -D-Xyl-pNP zachodzi wyłącznie  $\beta$ -1,3-galaktozylacja.

Reakcja z  $\alpha$ -D-Glc-F nie może być z wysoką wydajnością zatrzymana na etapie monoglukozylacji, gdyż utworzony disacharyd jest doskonałym akceptorem dla enzymu i transglikozylacja przebiega dalej (tab. 1). W pewnym stopniu skład oligomeryczny produktów może być kontrolowany przez stechiometrię reagentów (21).



Rys. 3. Transglikozylacja katalizowana przez glikosyntazę AbgGlu358Ala z  $\alpha$ -D-Gal-F jako donorem (wg 21, wybrane 3 przykłady z 6).

Tabela 1

Transglikozylacja katalizowana przez glikosylazę AbgGlu358A1a z  $\alpha$ -D-Gal-F jako donorem (wg 21, wybrane 3 przykłady z 12)

Akceptor	Produkty $\beta$ -1,4 glikozylacji (% wydajności)			
	disacharyd	trisacharyd	tetrasacharyd	łącznie
$\beta$ -D-Glc-pNP	38	24	10	72
$\beta$ -D-Xyl-pNP	12	51	3	66*
$\beta$ -D-Man-pNP	31	42	6	79

\* wiązanie glikozydowe  $\beta$ -1,3 z ksylozą

Przedstawiona metoda została zastosowana przez autorów do syntezy cennych odczynników sacharydowych w gramowej skali (31).

### 3.3. Kontrola oligomerycznego składu produktów

Oligomeryczny skład produktów transglikozylacji katalizowanej przez egzoglikozydazy, jest kontrolowany głównie przez właściwości akceptorowe pierwotnych produktów. Jeżeli właściwości te są drastycznie obniżone, jak ma to często miejsce w przypadku produktów  $\beta$ -galaktozylacji, reakcja zatrzymuje się na etapie monoglikozylacji. Jeśli natomiast są one zbliżone, lub korzystniejsze od cech pierwotnego akceptora, reakcja prowadzi do powstania mieszaniny oligomerów (21). Proporcje między oligomerami mogą być zmienione na skutek przebiegu równoległych procesów hydrolizy, degradacji i in. Oligomeryczny skład produktów w pewnym zakresie może być kontrolowany przez stechiometrię reagentów, a w znacznie mniejszym stopniu zależy od struktury aglikonu akceptora (21).

### 3.4. Kontrola regioselektywności reakcji transglikozylacji

Regioselektywność reakcji transglikozylacji katalizowanej przez egzoglikozydazy zależy, w ogólności, od katalitycznych cech enzymu oraz od struktury akceptora. Tylko w ograniczonym stopniu może być ona przewidywana (32). Ujmując to inaczej można powiedzieć, że:

- dla nowego enzymu trudno z dużą pewnością przewidzieć regioselektywność transglikozylacji ze znanym akceptorem,
- dla nowego akceptora trudno dokładnie przewidzieć regioselektywność reakcji katalizowanej przez znany enzym.

Znane do tej pory  $\alpha$ - i  $\beta$ -glikozydazy pozwalają w reakcji transglikozylacji syntetyzować ograniczoną liczbę kombinacji rodzajów wiązań glikozydowych między dwoma różnymi cukrami. Zdecydowana większość takich kombinacji, zwłaszcza z cukrami mającymi aksjalne grupy hydroksylowe, jest nieosiągalna.

W stwierdzeniu tym definiuje się podstawową niedoskonałość enzymatycznych metod syntezy oligosacharydów katalizowanych przez glikozydazy. Dla porównania, metodami klasycznej syntezy organicznej można zsyntetyzować każdy izomer, na podstawie ciągu doskonale poznanych typów reakcji oraz istniejących strategii selektywnego blokowania wybranych grup funkcyjnych (19,33). Jednakże uciążliwość, czasochłonność i koszty organicznej syntezy oligosacharydów są, mimo jej ogólności, siłą napędową badań nad syntezą enzymatyczną.

Regioselektywność reakcji transglikozylacji katalizowana przez egzoglikozydazy zależy od:

- właściwości katalitycznych enzymu,
- struktury glikonu akceptora,
- struktury aglikonu akceptora,
- anomerycznej konfiguracji aglikonu.

#### 3.4.1. Wpływ właściwości katalitycznych enzymu na regioselektywność reakcji transglikozylacji

Montero i in. (32) badając reakcję  $\beta$ -galaktozylacji L- i D-ksylozy katalizowanej przez enzymy pochodzące z różnych źródeł stwierdzili, że jest możliwe znalezienie enzymu, który w przewodzie syntetyzowałby wybrany regioizomer np. 4-, lub 3- lub 2-O- $\beta$ -D-galaktopiranozylo-L-(D)-ksylozę. We wnioskach autorzy wyrazili przekonanie, że przeprowadzane próby z wieloma enzymami są łatwą i bezpośrednią drogą zmiany regioselektywności reakcji transglikozylacji w pożądanym kierunku. Po znalezieniu najlepszego enzymu do syntezy danego produktu, jest możliwa poprawa wydajności i regioselektywności poprzez optymalizację parametrów reakcji (32,23).

#### 3.4.2. Wpływ struktury glikonu akceptora na regioselektywność reakcji transglikozylacji

W reakcji transglikozylacji obok celowo wprowadzonego akceptora A-Y (rys. 1) i niepożądanego akceptora jakim jest woda, pojawia się produkt jako akceptor wtórny; wtórnym akceptorem może być również sam donor D-X (proces autoglikozylacji – *donor-to-donor self glycosylation* (30)). Dobre przykłady wpływu struktury glikonu na regioselektywność reakcji transglikozylacji (21,22,34,35) pochodzą z pracy Prade i in. (34). Autorzy stosowali  $\beta$ -glukozydazę [EC 3.2.1.21] *Agrobacterium* sp.



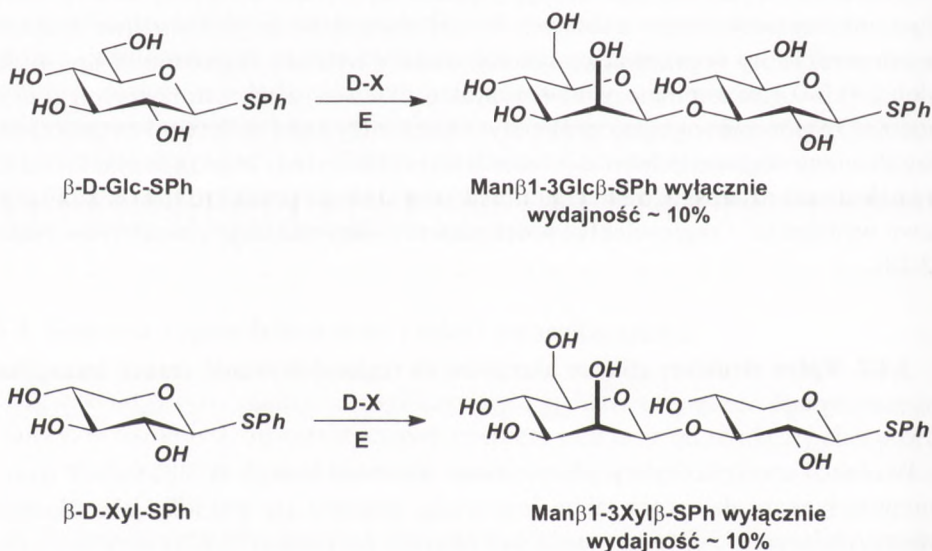
charakteryzującą się szeroką specyficznością substratową, która umożliwiała stosowanie różnorodnych donorów.

Tabela 2

Transglikozylacja katalizowana przez  $\beta$ -glukozydazę *Agrobacterium* sp. z  $\beta$ -D-Gal-pNP jako donorem (34)

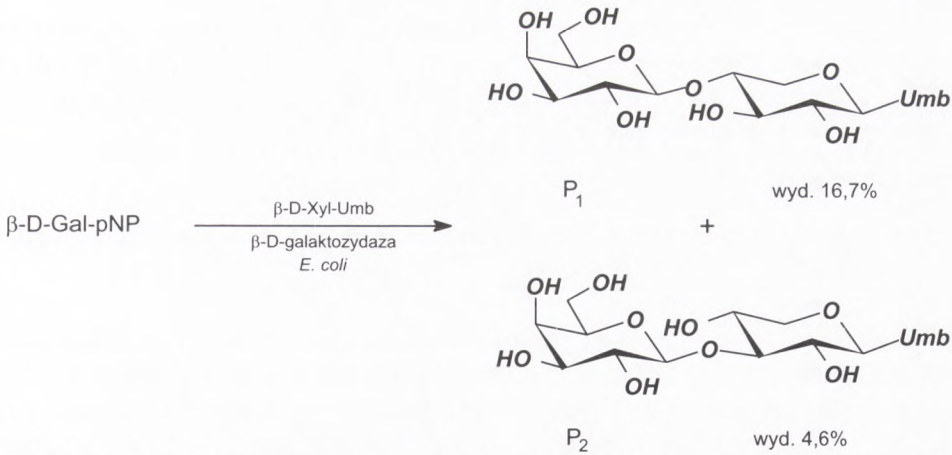
Akceptor	Produkt (% wydajności)		
	wiązanie $\beta$ -1,3	wiązanie $\beta$ -1,4	wiązanie $\beta$ -1,6
$\beta$ -D-Glc-SCH <sub>2</sub> Ph	50,5	16,5	–
$\beta$ -D-Gal-SCH <sub>2</sub> Ph	8,8	–	5,2
$\beta$ -D-Man-SCH <sub>2</sub> Ph	–	24	–

W zamieszczonych w tabeli 2 wynikach wskazuje się, że struktura glikonu ma istotny wpływ na obserwowaną regioselektywność i wydajność reakcji. Z tej samej pracy (34) pochodzi inny interesujący przykład przedstawiony na rysunku 4. W reakcji transglikozylacji tioglikozydów  $\beta$ -D-Glc-SPh z  $\beta$ -mannozylowym fluorkiem jako donorem, otrzymano z wydajnością około 10% wyłącznie produkty  $\beta$ -1,3-mannozyzacji.  $\beta$ -mannozydowe wiązanie należy do trudnych do utworzenia na drodze syntezy organicznej (36). Zważywszy dostępność donora i akceptora, uzyskana wydajność procesu jest atrakcyjna.



Rys. 4. Transglikozylacja katalizowana przez  $\beta$ -glukozydazę *Agrobacterium* sp. z  $\beta$ -D-Man-F jako donorem (wg 34).

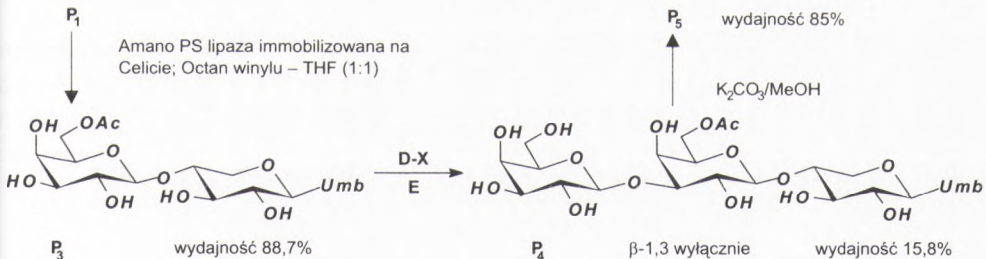
Oznaczenia: D-X donór:  $\beta$ -D-Man-F; E enzym:  $\beta$ -glukozydaza *Agrobacterium* sp.



Rys. 5. Transglikozylacja katalizowana przez  $\beta$ -galaktozydazę *E. coli* z  $\beta$ -D-Gal-pNP jako donorem (22). Oznaczenia: Umb: 4-metyloumbelliferyl

Do doskonałym sposobem wpływania na regioselektywność transglikozylacji mogą być proste zmiany struktury glikonu poprzez enzymatyczne blokowanie wybranych grup funkcyjnych (22,37). Interesujący przykład takiej strategii pochodzi z pracy Yasukochi i in. (22).

Badali oni galaktozylację ksylozydu  $\beta$ -D-Xyl-Umb z  $\beta$ -D-Gal-pNP jako donorem katalizowaną przez  $\beta$ -galaktozydazę *E. coli* (rys. 5). Donor został tu użyty w 4-krotnym nadmiarze, co podnosiło wydajność produktu  $P_1$  (z 15,6% dla 3 moli donora do 20,9% dla 10 moli donora), a także zwiększało rozpuszczalność akceptora z hydrofobowym aglikonem 4-metylo-umbelliferylowym Umb. Regioselektywność reakcji transglikozylacji pozostawała stała w całym przedziale stężeń donora i wynosiła  $P_1:P_2 = 3,1-3,3$ . Dalsza galaktozylacja produktu  $P_1$  jest niemożliwa, gdyż  $P_1$  jest dobrym donorem dla użytej  $\beta$ -galaktozydazy. Można by zatem oczekiwać, że nastąpi jego hydroliza, a ewentualna glikozylacja zachodzić będzie raczej przy C-6. Wobec tego wykonano enzymatyczną acetylację grupy hydroksylowej przy C-6 otrzymując zmodyfikowany w części glikonowej produkt  $P_3$  (rys. 6).



Rys. 6. Transglikozylacja katalizowana przez  $\beta$ -galaktozydazę *E. coli* z  $\beta$ -D-Gal-pNP jako donorem (22). Oznaczenia: D-X donor:  $\beta$ -D-Gal-pNP; E enzym:  $\beta$ -D-galaktozydaza *E. coli*

Enzymatyczna  $\beta$ -D-galaktozylacja tego produktu przy 5-krotnym nadmiarze donora prowadzi wyłącznie do  $\beta$ -1,3-glikozylacji z wydajnością 15,8% (produkt P<sub>4</sub>). Hydroliza grupy acetylowej w P<sub>4</sub> daje produkt P<sub>5</sub> niemożliwy do otrzymania przez bezpośrednią  $\beta$ -1,3-galaktozylację P<sub>1</sub>.

### 3.4.3. Wpływ struktury aglikonu akceptora na regioselektywność reakcji transglikozylacji

Jeżeli zmiennym elementem struktury badanego akceptora A-Y w reakcji enzymatycznej transglikozylacji jest aglikon Y, to można pokusić się o znalezienie relacji między strukturą molekularną Y (np. strukturą przestrzenną lub elektronową), a regioselektywnością reakcji. Interesujące przykłady wyraźnego wpływu struktury elektronowej aglikonu na regioselektywność enzymatycznych reakcji transglikozylacji są zawarte w pracy Vetere i in. (18) i we wcześniejszych publikacjach Nilssona (38,39). Z kolei Lopez i Fernandez-Mayoralas (40) opisali reakcje glikozylacji różnych  $\beta$ -D-ksylopiranozydów używając  $\beta$ -D-Gal-oNP oraz  $\beta$ -D-galaktozydazy z *E. coli* (rys. 7). Wyniki ilościowe zebrane są w tabeli 3.

Tabela 3

Wpływ struktury aglikonu R w  $\beta$ -D-Xyl-R na wydajność i regioselektywność transglikozylacji katalizowanej przez  $\beta$ -D-galaktozydazę *E. coli* (wg 40)

Aglikon R akceptora	Wydajność [%] $\beta$ -1,3 + $\beta$ -1,4	Regioselektywność $\beta$ -1,3 : $\beta$ -1,4
OCH <sub>3</sub>	6	0 : 1,0
O(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	8	b.d.
OCH <sub>2</sub> Ph	30	1 : 0,4
OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph	25	1 : 1,2
Oph	23	1 : 1,4
SPh	19	1 : 2,9
CH <sub>2</sub> Ph	15	1 : 5,0
OPh-4-NO <sub>2</sub> *	18	1 : 5,5
OPh-4-OMe	20	1 : 1,6

b.d. brak danych; \* elektronoakceptorowy aglikon



Rys. 7. Transglikozylacja katalizowana przez  $\beta$ -galaktozydazę *E. coli* z  $\beta$ -D-Gal-oNP jako donorem (40).

Tylko w przypadku metylowego glikozydu obserwuje się specyficzne powstawanie produktu  $\beta$ -1,4-galaktozylacji. W pozostałych przypadkach powstają obydwa regioizomery, choć w proporcjach znacznie zależnych od struktury aglikonu. Zaobserwowane różnice w regioselektywności i wydajności są, według autorów, zależne od elektronowego charakteru aglikonów, który wynika z obecności atomów O, S lub C przy C-1, oraz od hydrofobowej struktury aglikonów. Istotna jest zwłaszcza długość łańcucha łączącego pierścień fenyłowy z centrum anomerycznym.

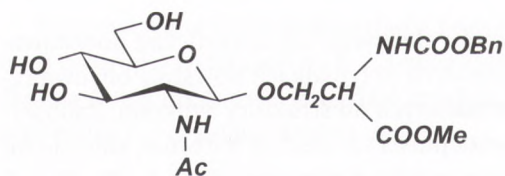
#### 3.4.4. Wpływ anomerycznej konfiguracji aglikonu akceptora na regioselektywność reakcji transglikozylacji

Anomeryczna konfiguracja aglikonu Y w akceptorze A-Y może mieć znaczny wpływ na regioselektywność enzymatycznie katalizowanych reakcji transglikozylacji (32,34,38,41). Jedną z nielicznych ostatnio opublikowanych prac zajmujących się tym problemem jest artykuł Singha i in. (41). Autorzy badali  $\beta$ -glikozylację tioetylowych glikozydów dwucukrów  $\text{Glc}\alpha$ 1-4 $\text{Glc}\beta$ -SEt,  $\text{Glc}\beta$ 1-4 $\text{Glc}\beta$ -SEt,  $\text{Glc}\beta$ 1-6 $\text{Glc}\beta$ -SEt za pomocą  $\beta$ -N-acetyloheksozoaminidazy z *Aspergillus oryzae*, stosując jako donora p-nitrofenylo- $\beta$ -O-N-acetylogalaktozoaminid (pNP- $\beta$ -GalNAc). W przypadku, gdy cukry były połączone aksjalnym wiązaniem  $\alpha$ -1,4 powstawał wyłącznie produkt  $\beta$ -1,4-galaktozylacji z wydajnością 29%. Natomiast, gdy cukry były połączone ekwatorialnym wiązaniem  $\beta$ -1,4 powstawała mieszanina produktów  $\beta$ -1,4- i  $\beta$ -1,3-galaktozylacji w stosunku 3:2 z wydajnością 48%.

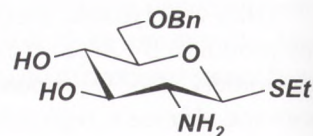
### 3.5. Podsumowanie

Rezultaty enzymatycznej syntezy w postaci określonego produktu reakcji są wynikiem współdziałania wielu czynników, które pokrótce omówiono. Właściwa kombinacja donora, akceptora, enzymu i warunków reakcji może dać w efekcie jeden oczekiwany produkt. Takie podejście do enzymatycznej syntezy związków o wysokiej użyteczności (35,42,9) ilustrują przykłady przedstawione na rysunku 8.

Coraz większa znajomość mechanizmów reakcji enzymatycznych oraz rozwój metod inżynierii genetycznej pozwalają już na modyfikację strukturalną narzędzi jakie oferuje natura w postaci enzymów. Zmodyfikowane enzymy wykazują szereg unikatowych cech. Rosnące zapotrzebowanie zarówno nauki jak i przemysłu na takie enzymy uzasadnia ciągle rozwój inżynierii enzymowej.



Specyficzna  $\beta$ -1,4-galaktozylacja  
Wydajność ~ 25%  
 $\beta$ -galaktozydaza firmy Glycorex AB



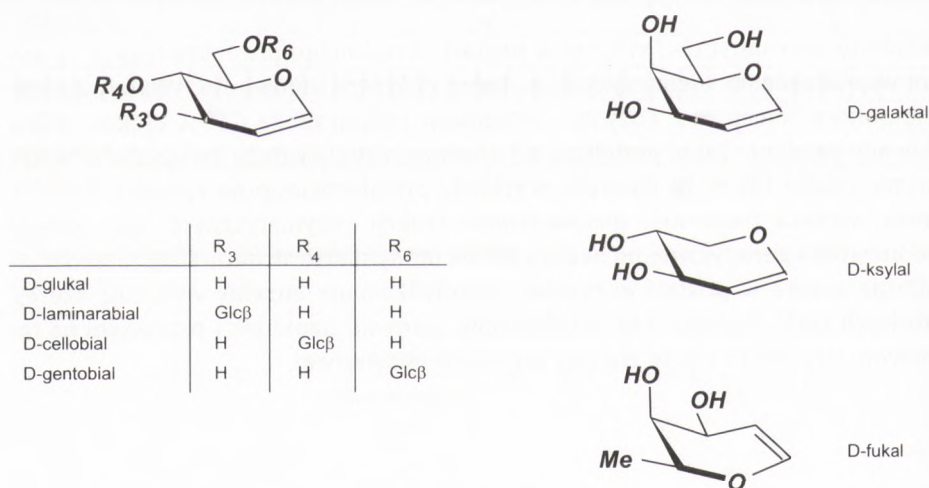
a) Specyficzna  $\beta$ -1,3-galaktozylacja  
Wydajność ~ 30%  
 $\beta$ -galaktozydaza *Bullera singularis*  
b) Specyficzna  $\alpha$ -1,4-fukozylacja  
Wydajność ~ 50%  
 $\alpha$ -L-fukozydaza z płuc wołowych

Rys. 8. Przykłady regiospecyficznych glikozylacji wybranych akceptorów cukrowych (wg 35,43).

#### 4. Addycyjna glikozylacja glikalami i ich transglikozylacja

W omówionej już reakcji transglikozylacji, następuje podstawienie aglikonu X w cząsteczce donora D-X na nowy aglikon, którym jest akceptor A-Y. Jest to reakcja stereochemicznie kontrolowana przez użyty enzym. Powstają dwa produkty – produkt transglikozylacji oznaczony na rysunku 1 jako P-Y oraz sprzężony kwas HX grupy odchodzącej.

Istnieje interesująca grupa donorów nie opisywanych ogólnym wzorem D-X, które w połączeniu z odpowiednią glikozydazą tworzą kompleks o właściwościach glikozylujących, przy czym mechanizm glikozylacji jest zasadniczo odmienny od do-



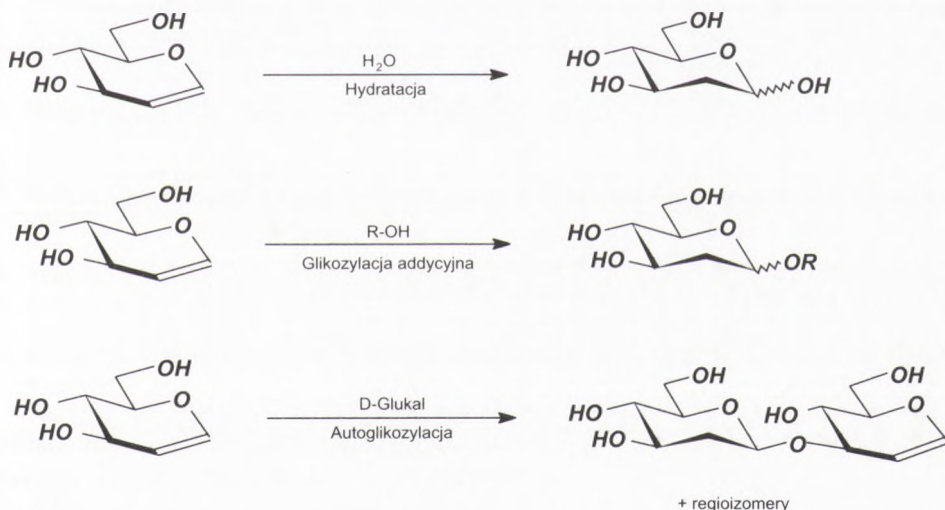
Rys. 9. Przykładowe wzory strukturalne związków z grupy glikali.

brze poznanego mechanizmu z użyciem aktywowanych donorów (12). Związki te strukturalnie wywodzą się z sacharydów i są znane pod ogólną nazwą – glikale. Kilka z nich jest pokazanych na rysunku 9.

Niektóre związki z grupy glikali jak np. D-glukal (43-45), D-galaktal (44,46) są – zazwyczaj słabymi – inhibitorami niektórych glikozydaz (47) służąc jako narzędzie badania mechanizmów ich działania (45,46). Endocykliczne wiązanie podwójne glikalu odpowiada za jego półkrzesłową konformację ( $^4H_5$ ,  $^5H_4$ ) i geometryczne podobieństwo związku do stanu przejściowego reakcji enzymatycznej hydrolizy oligosacharydów. Kompleksy glikozylujące z glikalami tworzą się przez enzymatyczne protonowanie endocyklicznego wiązania podwójnego zachodzące na węglu C-2. W efekcie, reakcja z zewnętrznym nukleofilem ( $H_2O$  lub A-Y) jest klasyczną reakcją elektrofilowej addycji. Stąd taka glikozylacja może być nazwana *glikozylacją addycyjną* co odpowiada terminowi *enzyme-catalysed addition* (49). Na rysunku 10 przedstawiono przykłady reakcji enzymatycznych, w których D-glukal uczestniczy jako donor.

Reakcja hydratacji glikali zachodzi łatwo i jest katalizowana zarówno przez niektóre  $\alpha$ -glikozydazy (50) jak i  $\beta$ -glikozydazy (49). Produktem hydratacji D-glukalu jest 2-deoksy-D-glukoza, która może być również łatwo otrzymana w wyniku chemicznej hydratacji w 2N wodnym roztworze  $H_2SO_4$  w temperaturze 10-15°C (51). Cenniejsze, z praktycznego punktu widzenia, są reakcje 2-deoksy-glikozylacji innych cukrów (34,49) lub autoglikozylacja (49,52), w której glikal pełni rolę donora i akceptora.

Pierwsze udane reakcje transglikozylacji z udziałem glikali jako akceptorów zostały opisane przez Looka i Wonga dopiero w roku 1992 (37) i przez Looka i in. (48).



Rys. 10. Niektóre typy enzymatycznych przemian D-glukalu.

Na rysunku 11 przedstawiono reakcję  $\beta$ -galaktozylacji D-glukalu i 6-O-acetylo-D-glukalu katalizowaną przez enzym z *E. coli* (37). Po 19-26 godzinach reakcję przerywano, a surową mieszaninę produktów acetylowano w celu ułatwienia ich wyodrębnienia i identyfikacji. Okazało się, że D-glukal ulega  $\beta$ -1,3-galaktozylacji, a ubocznie powstaje regioizomer  $\beta$ -1,6 ( $\beta$ -1,3: $\beta$ -1,6=2,3:1, wydajność 50%). 6-O-acetylo-D-glukal ulega  $\beta$ -1,3-galaktozylacji regiospecyficznie (wydajność 42% po acetylacji). Autorzy cytowanej pracy wykonali szereg innych eksperymentów stosując różne donory, akceptory i enzymy (tab. 4).

Próba zastosowania D-laktozy jako tańszego donora reszt galaktozylowych (tab. 4, reakcja 5) zakończyła się niepowodzeniem. Powstaje złożona mieszanina, z której interesujących produktów Gal $\beta$ 1-3Glukal i Gal $\beta$ 1-6Glukal nie można łatwo wyodrębnić. Obserwowano ponadto inhibicję enzymu tymi produktami ( $IC_{50}$ ~17 mM). Zupełnym niepowodzeniem zakończyły się reakcje  $\beta$ -glukozytacji (reakcje 6,7,8) i  $\beta$ -N-acetyloglukozoaminidylacji (reakcje 9,10).

Tabela 4

## Przykłady enzymatycznych glikozylacji glikali (wg 37,48)

Reakcja	Donor	Akceptor	Peracetylowane produkty (wydajność (%))
1 <sup>a</sup>	$\beta$ -D-Gal-pNP	D-glukal	Gal $\beta$ 1-3Glukal (35%), Gal $\beta$ 1-6Glukal (15%)
2 <sup>a</sup>	$\beta$ -D-Gal-pNP	D-galaktal	brak reakcji
3 <sup>a</sup>	$\beta$ -D-Gal-pNP	L-fukal	hydroliza donora
4 <sup>a</sup>	$\beta$ -D-Gal-pNP	6-O-Ac-D-glukal	Gal $\beta$ 1-3-(6O-Ac)-Glukal (92%)
5 <sup>a</sup>	D-laktoza	D-glukal	Gal $\beta$ 1-3Glukal (niska) Gal $\beta$ 1-6Glukal (niska)
6 <sup>b</sup>	$\beta$ -D-Glc-pNP	D-galaktal	hydroliza donora
7 <sup>b</sup>	$\beta$ -D-Glc-pNP	D-glukal	brak reakcji
8 <sup>b</sup>	$\beta$ -D-Glc-pNP	L-fukal	hydroliza donora
9 <sup>c</sup>	$\beta$ -D-GlcNAc-pNP	D-glukal	hydroliza donora
10 <sup>d</sup>	$\beta$ -D-GlcNAc-pNP	D-galaktal	hydroliza donora

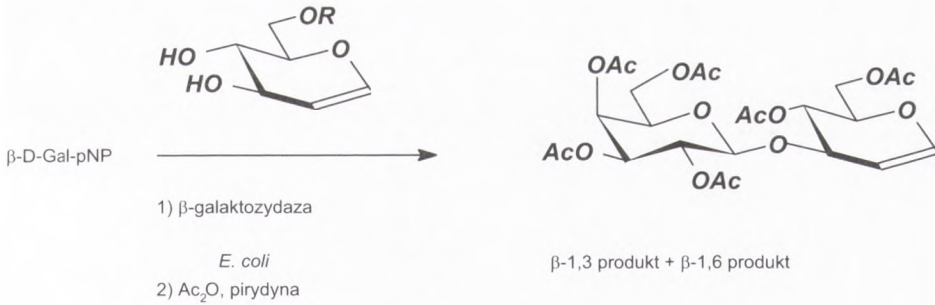
<sup>a</sup> reakcja katalizowana przez  $\beta$ -galaktozydazę *E. coli*,

<sup>b</sup> reakcja katalizowana przez  $\beta$ -glukozydazę z orzechów,

<sup>c</sup> reakcja katalizowana przez  $\beta$ -N-acetyloglukozoaminidazę,

<sup>d</sup> reakcja katalizowana przez  $\beta$ -N-acetyloglukozoaminidazę z fasoli.

Produkty otrzymane przez  $\beta$ -galaktozylację D-glukalu, zwłaszcza zaś Gal $\beta$ 1-3Glukal, są niezwykle użyteczne w chemicznej syntezie skomplikowanych oligosacharydów (48). Można nawet uznać, że glikale to obecnie najważniejsze substraty w organicznej syntezie tej klasy związków (53-55).



Rys. 11.  $\beta$ -Galaktozylacja D-glukalu i 6-O-acetylo-D-glukalu katalizowana przez  $\beta$ -galaktozydazę *E. coli* z  $\beta$ -D-Gal-pNP jako donorem (37).

Oznaczenia: R = H  $\beta$ -1,3 produkt:  $\beta$ -1,6 produkt = 2,3 : 1 (wyd. 50%), R = Ac  $\beta$ -1,3 produkt wyłącznie (wyd. 42%)

## Literatura

1. Wong C-H., Halcomb R. L., Ichikawa Y., Kajimoto T., (1995), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34, 412-432.
2. Wong C-H., Halcomb R. L., Ichikawa Y., Kajimoto T., (1995), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34, 521-546.
3. Gijzen H. J. M., Qiao L., Fitz W., Wong C-H., (1996), *Chem. Rev.*, 96, 443-473.
4. Watt G. M., Lowden P. A. S., Flitsch S. L., (1997), *Current Opinion In Structural Biology*, 7, 652-660.
5. Cront D. H. G., Vic G., (1998), *Current Opinion in Chemical Biology*, 2, 98-111.
6. Kobayashi S., (1999), *J. Polym. Sci., (A) 37(16)*, 3041-3056.
7. Nilsson K. G. I., (1988), *Tibtech.*, 6, 256-264.
8. Monsan P., Paul F., Remaud M., Lopez A., (1989), *Food. Biotechn.*, 3, 11-29.
9. Matsuo I., Isomura M., Ajisaka K., (1999), *Tetrah. Lett.*, 40, 5047-5050.
10. Suwasono S., Rastall R. A., (1996), *Biotechnol. Lett.*, 18(7), 851-856.
11. Shimizu M., Togo H., Yokoyama M., (1998), *Synthesis*, 799-822.
12. Sinnott M. L., (1990), *Chem. Rev.*, 90, 1171-1202.
13. Akita H., Kurashima K., Nakamura T., Kato K., (1999), *Tetrah. Asym.*, 10, 2429-2439.
14. MacManus D. A., Grabowska U., Biggadike K., Bird M. I., Davies S., Vulfson E. N., Gallagher T., (1998), *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1, 295-305.
15. Yasukochi T., Inaba Ch., Fukase K., Kusumoto S., (1999), *Tetrah. Lett.*, 40, 6585-6589.
16. Fang J., Chen X., Zhang W., Wang J., Andreana P. R., Wang P. G., (1999), *J. Org. Chem.*, 64, 4089-4094.
17. Priya K., Longanathan D., (1999), *Tetrahedron*, 55, 1119-1128.
18. Vetere A., Novelli L., Paoletti S., (1999), *J. Carbohydr. Chem.*, 18(5), 515-521.
19. Boons G-J., (1996), *Tetrahedron*, 52, 1095-1121.
20. Taylor C. M., (1998), *Tetrahedron*, 54, 11317-11362.
21. Mackenzie L. F., Wang Q., Warren R. A. J., Withers S. G., (1998), *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 5583-5584.
22. Yasukochi T., Fukase K., Suda Y., Takagaki K., Endo M., Kusumoto S., (1997), *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 70, 2719-2725.
23. Ajisaka K., Fujimoto H., Miyasato M., (1998), *Carbohydr. Res.*, 309, 125-129.
24. Laroute V., Willemot R-M., (1992), *Enzyme. Microb. Technol.*, 14, 528-534.
25. Halling P. J., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 178-206.
26. Mori T., Okahata Y., (1998), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 2215-2216.
27. Mesiano A. J., Beckman E. J., Russel A. J., (1999), *Chem. Rev.*, 99(2), 623-633.



28. Matsumura S., Nakamura T., Yao E., Toshima K., (1999), *Chem. Lett.*, 581-582.
29. Matsumura S., Yao E., Sakiyama K., Toshima K., (1999), *Chem. Lett.*, 373-374.
30. Li J., Wang P. G., (1996), *Tetrah. Lett.*, 38, 7967-7970.
31. Whithers S. G., Mackenzie L., Wang Q., PCT. Int. Appl. WO 97/21822, 19 Jun. 1997, US Appl. 08/571, 175, 12 Dec. 1995.
32. Montero E., Alonso J., Canada F. J., Fernandez-Mayoralas A., Martin-Lomas M., (1998), *Carbohydr. Res.*, 305, 383-391.
33. Schelhaas M., Waldmann H., (1996), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 35, 2056-2083.
34. Prade H., Mackenzie L. F., Withers S. G., (1998), *Carbohydr. Res.*, 305, 371-381.
35. Nilsson K. G. I., Eliasson A., Larsson-Lorek U., (1995), *Biotechnol. Lett.*, 17(7), 717-722.
36. Crich D., Sun S., (1998), *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 435-436.
37. Look G. C., Wong C-H., (1992), *Tetrah. Lett.*, 33, 4253-4256.
38. Nilsson K. G. I., (1987), *Carbohydr. Res.*, 167, 95-103.
39. Nilsson K. G. I., (1988), *Carbohydr. Res.*, 180, 53-59.
40. Lopez R., Fernandez-Mayoralas A., (1994), *J. Org. Chem.*, 59,737-745.
41. Singh S., Scigelova M., Critchley P., Cront D. H. G., (1998), *Carbohydr. Res.*, 305, 363-370.
42. Nilsson K. G. I., (1996), *Biotechnol. Lett.*, 18(7) 791-794.
43. Heightman T. D., Locatelli M., Vasella A., (1996), *Helv. Chim. Acta*, 79, 2190-2200.
44. Lai E. C., Morris S. A., Street I. P., Whithers S. G., (1996), *Bioorg. Med. Chem.*, 11, 1929-1937.
45. Mega T., Matsushima Y., (1983), *J. Biochem.*, (Tokyo), 5, 1637-1647.
46. Lee Y. C., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35, 161-163.
47. Hiraizumi S., Spohr U., Spiro R. G., (1993), *J. Biol. Chem.*, 268(13), 9927-9935.
48. Look G. C., Ichikawa Y., Shen G. J., Cheng P. W., Wong C-H., (1993), *J. Org. Chem.*, 58, 4326-4330.
49. Petit I. M., Paguet F., Beau J. M., (1991), *Tetrah. Lett.*, 32(43), 6125-6128.
50. Huang X., Tanaka K. S. E., Bennet A. J., (1997), *J. Am. Chem. Soc.*, 119(46), 11147-11154.
51. Bergman M. W., Schotte H., Lechinsky W., (1922), *Ber.*, 55, 158-172.
52. Bay S., Canteauzene D., (1992), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2(5), 423-426.
53. Seeberger P. H., Danishefsky S. J., (1998), *Acc. Chem. Res.*, 31, 685-695.
54. Wong C-H., Look G. C., Enzymatic synthesis of galactosyl- $\beta$ -1,3-Glycals. PCT Int. Appl. WO 9402, 624, 03Feb. 1994, US Appl. 915465, 16 Jul. 1992, *Chem. Abstr.*,121, 7456d.
55. Danishefsky S. J., Bilodeau M. T., (1996), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 35, 1381-1419.