



## Zastosowanie esterazy z wątroby świńskiej w syntezie organicznej

Michał Mroczkiewicz<sup>1</sup>, Anna Fryszkowska<sup>1</sup>, Ryszard Ostaszewski<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska, Warszawa

<sup>2</sup> Instytut Chemii Organicznej, Polska Akademia Nauk, Warszawa

### Application of pig liver esterase in organic synthesis

#### Summary

Pig liver esterase (PLE) is widely used as a biocatalyst in organic synthesis. The model of PLE catalytic center is discussed. Simple experimental procedure providing gram quantity of this enzyme is introduced. General aspects of PLE reactivity and selectivity are presented. The most representative chemical reactions catalyzed by PLE are shown on selected examples.

#### Key words:

pig liver esterase, biotransformation, enzymatic hydrolysis.

### 1. Wstęp

Wykorzystanie enzymów w przemyśle chemicznym było dyskutowane w wielu opracowaniach [1-3]. Tkanki zwierzęce, obok mikroorganizmów, są dogodnym źródłem pozyskiwania enzymów wykorzystywanych w syntezie organicznej, przemyśle chemicznym, kosmetycznym czy też farmaceutycznym. Zaletą tych źródeł enzymów jest relatywnie niski koszt surowców, z których łatwo jest wyodrębnić poszczególne enzymy. Enzymy pochodzenia zwierzęcego wykorzystywane w syntezie organicznej, najczęściej są wyodrębniane z narządów przewodu pokarmowego ssaków (świń, królików, koni, świnek morskich), tj. wątroby, trzustki, a także z nerek. Przykładami tych enzymów są: esteraza z wątroby świńskiej (PLE), lipaza z trzustki wieprzowej (PPL), esteraza z wątroby króliczej (RLE), dehydrogenaza alkoholowa

#### Adres do korespondencji

Ryszard Ostaszewski,  
Wydział Chemiczny,  
Politechnika Warszawska,  
ul. Noakowskiego 3,  
00-664 Warszawa.

#### biotechnologia

2 (69) 32-47 2005

z wątroby końskiej (HLADH). Celem opracowania jest podanie krótkiej charakterystyki wybranego enzymu jakim jest PLE oraz przedstawienie zastosowań tego enzymu jako taniego, ale niezwykle efektywnego, biokatalizatora szeregu ważnych reakcji chemicznych.

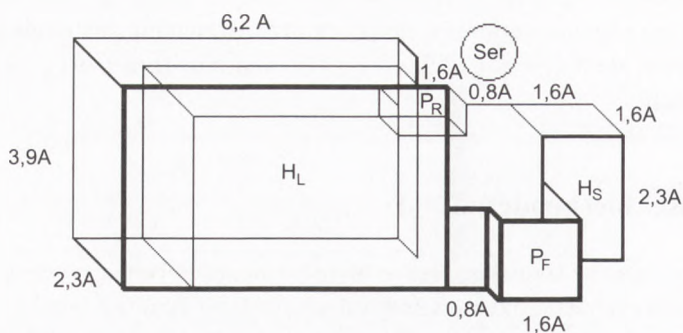
## 2. Właściwości biochemiczne PLE

Esteraza z wątroby świńskiej jest jednym z najczęściej wykorzystywanych w chemii i biotransformacjach enzymów hydrolitycznych. Enzym ten jest bardzo stabilny, akceptuje jako substraty dużą ilość różnych reagentów, a reakcje, które są przez ten enzym katalizowane, są wysoce chemo-, regio- i stereoselektywne. Wysoka enancjoselektywność tego enzymu w połączeniu z jego niskim kosztem (ok. 0,005 USD/za jednostkę) oraz brakiem potrzeby stosowania koenzymu [4] wywołała zainteresowanie wielu ośrodków naukowych i przemysłowych.

Esteraza z wątroby świńskiej (PLE – *Pig Liver Esterase, E.C. 3.1.1.1*) jest karboksyesterazą typu serynowego należąca do grupy hydrolaz. Komercyjnie dostępna PLE jest mieszkanką co najmniej sześciu izozymów (Heymann i Junge [6]), przy czym każdy z nich wykazuje bardzo podobną stereoselektywność wobec substratów, dlatego można je traktować jako jeden enzym [5]. Każdy z izozymów posiada w swej strukturze trzy podjednostki ( $\alpha$  – 58,2 kDa, C-terminalna leucyna;  $\beta$  – 59,7 kDa, C-terminalna glicyna;  $\gamma$  – 61,4 kDa, C-terminalna alanina) występujące w każdym izozymie w różnych proporcjach. Główne frakcje tworzone są przez następujące trimery:  $\gamma\gamma\gamma$ ,  $\alpha\gamma\gamma$ ,  $\alpha\alpha\gamma$ ,  $\alpha\alpha\alpha$ . Posiadają one niewielką domieszkę podjednostki  $\beta$ . Poszczególne frakcje wykazują odmienną specyficzność substratową [6].

Ze względu na problemy związane z otrzymaniem enzymu w postaci krystalicznej nie udało się określić jego struktury krystalograficznej. Opracowane zostały jednakże proste modele centrum aktywnego PLE przedstawiające znajdujące się w nim najważniejsze grupy funkcyjne [7-10]. Najbardziej dokładny jest trójwymiarowy model opracowany przez Jonesa przedstawiony na rysunku 1 [4,11-16]. Model ten powstał na podstawie porównania stereospecyficzności wielu reakcji. Stwierdzono, że w centrum aktywnym enzymu znajdują się po przeciwnych stronach dwie kieszenie hydrofobowe, duża  $H_{L(\text{arge})}$  oraz mała  $H_{S(\text{mall})}$ , oddziałujące z łańcuchami alifatycznymi lub pierścieniami aromatycznymi, lub mniej polarnymi grupami, takimi jak halogenki czy etery. W centrum znajdują się także dwie kieszenie polarne, przednia  $P_{F(\text{ront})}$  i tylna  $P_{B(\text{ack})}$ , w pobliżu której obecna jest reszta serynowa triady katalitycznej. W przypadku estrów kwasów dikarboksylowych kieszeń  $P_F$  bierze udział w wiązaniu niehydrolizowanej grupy estrowej i może przyjmować także grupy niepolarne. Natomiast kieszeń  $P_B$  wiąże się poprzez wiązanie wodorowe z grupą alkoholową lub inną grupą będącą donorem wiązania wodorowego. Kieszeń ta nie może jednak przyjmować grup niepolarnych.

Konsekwencją takiej budowy jest odpowiednia stereoselektywność esterazy. W większości przypadków z racemicznych substratów tylko jeden z enancjomerów



Rys. 1. Model centrum aktywnego esterazy wątroby wieprzowej wg Jonesa.  $H_L$  – duża i  $H_S$  – mała kieszeń wiążąca hydrofobowo.  $P_F$  – przednia i  $P_R$  – tylna kieszeń polarna. Ser – miejsce w którym występuje reszta serynowa triady katalitycznej.

jest w stanie dopasować się w odpowiedni sposób do centrum aktywnego tak, aby akt reakcyjny, na przykład hydroliza, mógł być katalizowany przez enzym. Grupa polarna (estrowa) ulegająca hydrolizie podczas reakcji musi znajdować się w kompleksie enzym-substrat w pobliżu reszty serynowej. W związku z tym będzie wiązać się poprzez wiązanie wodorowe z małą kieszenią polarną  $P_B$ . Natomiast grupy niepolarne, tj. łańcuchy alifatyczne, pierścienie aromatyczne, muszą się znajdować w kieszeniach hydrofobowych i wypełniać je w znaczny sposób. Prowadzi to zwykle do podwyższenia stereoselektywności katalizowanej przez ten enzym reakcji.

### 3. Metody otrzymywania PLE

Esterazy wątroby świńskiej są dostępne komercyjnie jako preparaty o różnym stopniu oczyszczenia. Obecnie na rynku dostępne są preparaty o aktywności sięgającej 130 U/mg<sub>białka</sub>. Enzym ten jest także dostępny w formie immobilizowanej [17,18] o aktywności około 200 U/g<sub>preparatu</sub>. Wykazuje on wtedy 68% aktywności enzymu natywnego, ale może być używany kilkakrotnie, jeżeli przechowywany jest w temperaturze 7°C. W reakcjach prowadzonych w dużej skali PLE jest często stabilizowana poprzez dodatek taniej albuminy z serum wołowego [19].

Używane są także wstępnie oczyszczone enzymy PLE w postaci „proszku acetonowego”, których istotną zaletą jest niski koszt [20-23]. Otrzymanie tego enzymu w postaci czystego białka wymaga wykonania wieloetapowego oczyszczania. Oczyszczanie to polega na wykonaniu procesów takich jak wirowanie, wysalanie, dializa czy rozdział chromatograficzny [24]. Istotny jest fakt, że zanieczyszczenia występujące w PLE nie mają istotnego wpływu na aktywność katalityczną. Biorąc więc pod uwagę cenę tego biokatalizatora nie zawsze opłacalne jest stosowanie go w postaci wyizolowanego enzymu.

Prosta i efektywna metoda wydzielania PLE z wątroby świńskiej, dająca biokatalizator o wysokiej aktywności katalitycznej została opracowana przez nas na podstawie danych literaturowych [21].

Porcję wątroby, zamrożoną zaraz po uboju, o masie 100 g zmielono w młynku (WARING Blender 7009L o szybkości obrotów 22000 obr/min) z 300 ml acetonu, schłodzonego uprzednio do temperatury 0°C. Otrzymaną zawiesinę odsączono na lejku Büchnera. Osad poddano kolejnej homogenizacji w młynku razem ze 150 ml zimnego chlorku metylenu. Zawiesinę odsączono. Jasnobrunatny osad zebrano, rozdrobniono w moździerzu i wysuszono. Ze 100 g porcji wątroby otrzymuje się ok. 15 g preparatu enzymatycznego w postaci „proszku acetonowego”. Aktywność właściwa otrzymanego preparatu, wyznaczona na podstawie modelowej reakcji hydrolizy octanu n-butyłu, wynosi 160-250 U/g<sub>preparatu</sub>.

Tak otrzymany surowy enzym wykazuje aktywność katalityczną identyczną z enzymem komercyjnie dostępnym, przy nieporównywalnie niższej cenie [25].

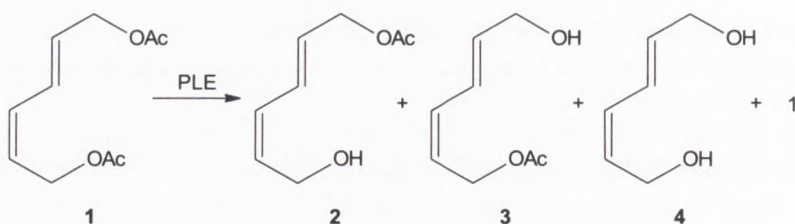
#### 4. Ogólne zasady stosowania PLE w syntezie organicznej

Wysoka aktywność katalityczna PLE wykorzystywana jest w syntezie organicznej do funkcjonalizacji alkoholi, dioli lub polioli, estrów oraz kwasów mono- i dikarboksylowych [1,2,26].

Stosując ten enzym reakcje hydrolizy należy prowadzić w buforach, najlepiej fosforanowych, przy pH zawierającym się w przedziale 6-8. W przypadku substratów, które słabo rozpuszczają się w wodzie stosuje się dodatek (do około 20% objętościowych), rozpuszczalników organicznych takich jak aceton, metanol, *tert*-butanol, dimetyloformamid lub dimetylosulfotlenek. Na ogół nie ma to wpływu zarówno na wydajność jak i enancjoselektywność poszczególnych reakcji [19,27]. Niska aktywność PLE w rozpuszczalnikach organicznych wymaga stosowania w reakcjach transestryfikacji niewielkich ilości wody, którą należy dodać do mieszaniny reakcyjnej. W większości przypadków temperatura, w której przebiega dany proces, jest na ogół temperaturą otoczenia lub nieco wyższą, zawierającą się zwykle w zakresie 20-30°C. W przypadku szeregu procesów, w których stereoselektywność w temperaturze 20°C jest bardzo niska, obniżenie temperatury do -10-0°C zdecydowanie podwyższa czystość optyczną produktu (28).

##### 4.1. Zastosowanie PLE do reakcji chemo- oraz regioselektywnych

W syntezie chemicznej trudnym zadaniem jest przeprowadzenie selektywnej funkcjonalizacji jednej z kilku identycznych lub reagujących w ten sam sposób grup funkcyjnych. PLE umożliwia przeprowadzenie regioselektywnej hydrolizy jednej z dwóch lub większej ilości grup estrowych znajdujących się w cząsteczkach substratów.



Rys. 2. Regioselektywna hydroliza estru dioli związku dienowego.

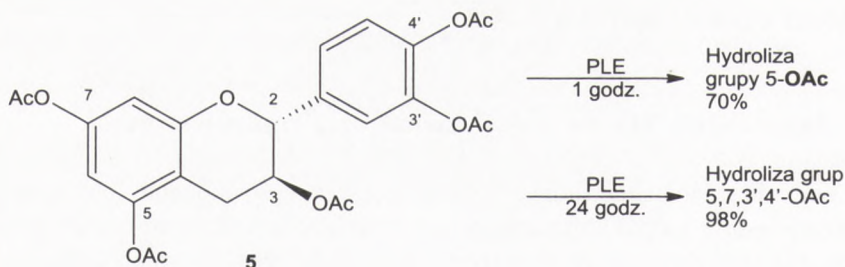
Dobry przykład pokazujący wysoką regioselektywność PLE w reakcji monohydrolizy diestrów pokazano na rysunku 2.

Badano hydrolizę związku 1, posiadającego w swej strukturze dwie grupy estrowe przy wiązaniach podwójnych o izomerii Z oraz E. W wyniku reakcji otrzymano 87% mieszaniny monoestrów 2/3 w proporcji 80/20, 2% produktu całkowitej hydrolizy 4 oraz odzyskano 11% substratu 1. Całkowita wydajność reakcji wyniosła 70% [29]. Enzym faworyzuje reakcję na grupie estrowej znajdującej się przy wiązaniu podwójnym o izomerii Z.

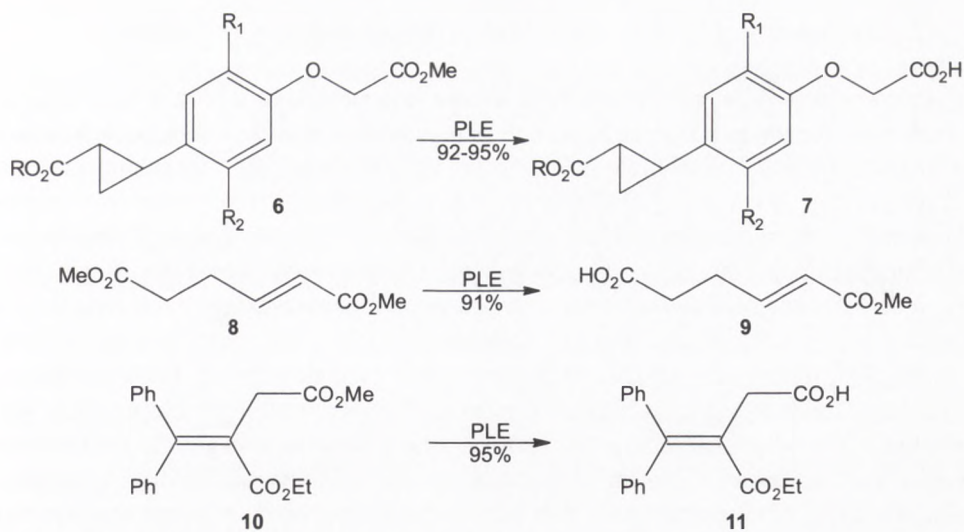
Przykład regioselektywnej reakcji hydrolizy estrów fenoli przedstawiono na rysunku 3.

Reakcja hydrolizy pentaacetylokatechiny 5 katalizowana PLE przebiega etapowo i można wydzielić odpowiednie produkty pośrednie przerywając reakcję we właściwym momencie. Przerywając reakcję po 1 godzinie można otrzymać z wydajnością 70% produkt monohydrolizy w pozycji 5-OAc. Wydłużenie czasu reakcji do 24 godzin prowadzi do hydrolizy wszystkich czterech fenylowych grup estrowych z wydajnością 98%. Grupa acetylowa znajdująca się przy alifatycznym atomie węgla nie ulega hydrolizie [30].

Uzyskanie wysokiej regioselektywności w reakcjach hydrolizy różnych diestrów możliwe jest, gdy zastosuje się PLE jako katalizator, co przedstawiono na rysunku 4.



Rys. 3. Regioselektywna hydroliza peracetylokatechiny.

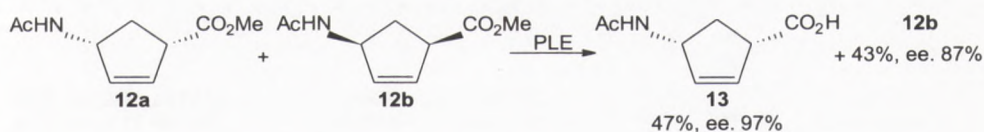


Rys. 4. Regioselektywna hydroliza estrów dioli.

W przypadku diestru **6** ( $R_1, R_2 =$  alkil, halogen) reakcji hydrolizy ulega tylko grupa estrowa znajdująca się koło drugorzędowego atomu węgla. Analogicznie jest w przypadku diestrow **8** i **10**, w których hydrolizie ulega także grupa estrowa związana z drugorzędowym atomem węgla z wydajnościami odpowiednio 91 i 95% [31].

Przykład demonstrujący wysoką chemoselektywność jaką można uzyskać w reakcjach katalizowanych PLE przedstawiono na rysunku 5. W wyniku chemoselektywnej hydrolizy mieszaniny racemicznej estrów **12**, reakcji ilościowej katalizowanej przez PLE ulega tylko grupa estrowa, natomiast grupa amidowa nie reaguje [32].

Znamiennym jest, że w tym przypadku reakcja jest także wysoce enancjoselektywna i odpowiedni kwas **13** uzyskiwany jest z wysokim nadmiarem enancjomerycznym.



Rys. 5. Chemoselektywna hydroliza estrów.

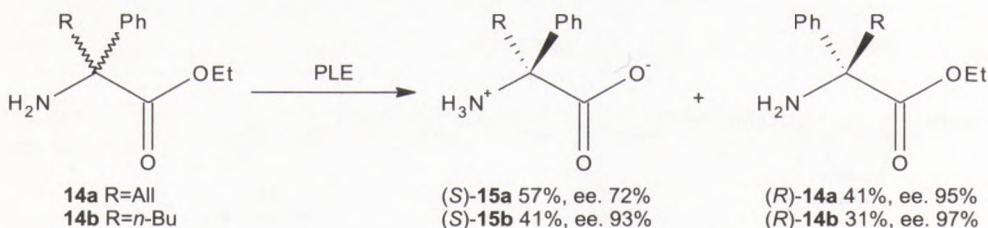
## 4.2. Zastosowanie PLE do reakcji kinetycznego rozdziału racematów

Uzyskiwanie optycznie czystych związków jest niezwykle ważne w syntezie organicznej ze względu na to, że są to chiralne substraty (chirony) w syntezach szeregu leków oraz związków biologicznie czynnych. Powszechnie stosowaną metodą otrzymywania takich związków jest poddanie racemicznych substratów enzymatycznemu rozdziałowi kinetycznemu na enancjomery. W wyniku reakcji katalizowanej chiralnym katalizatorem, takim jak enzym, transformacji chemicznej ulega szybciej jeden z enancjomerów substratu. Dzięki temu możliwy jest rozdział związku na poszczególne enancjomery. Niestety, maksymalna wydajność takiej metody syntezy wynosi 50%, nawet gdy uzyska się poszczególne enancjomery ze 100% czystością optyczną. Utrata 50% substratu jest ekonomicznie nieuzasadniona. Dlatego też, aby nie tracić 50% substratu, można zastosować inne podejście. Polega ono na zastosowaniu jako substratu związku posiadającego dwie identyczne grupy funkcyjne, związku *mezo*. W tym przypadku pod katalitycznym wpływem enzymu selektywnej reakcji może ulec tylko jedna z dwóch identycznych grup funkcyjnych i reakcję można przeprowadzić ze 100% wydajnością chemiczną. Warunkiem koniecznym do otrzymania produktu z wysokim nadmiarem enancjomerycznym, bliskim 100%, co jest niezbędne w przypadku syntez szeregu leków, jest uzyskanie enancjoselektywności danego procesu przekraczającej  $E > 100$  [33].

### 4.2.1. Zastosowanie PLE do reakcji hydrolizy estrów kwasów karboksylowych

Synteza optycznie czystych, nienaturalnych, pochodnych aminokwasów posiadających dwa podstawniki na węglu alfa jest dużym problemem syntetycznym. Związki tego typu znajdują szerokie zastosowanie jako syntetyczne analogi aminokwasów w chemii leków. Zamiana naturalnego aminokwasu w danym leku na jego analog posiadający dodatkowy podstawnik na węglu alfa, zwykle nie zmienia zasadniczo aktywności związku, zwiększając znacznie jego odporność na degradację przez enzymy proteolityczne.

Przykład zastosowania PLE do syntezy  $\alpha,\alpha$ -dipodstawionych aminokwasów **15** i **14** przedstawiony jest na rysunku 6.



Rys. 6. Rozdział kinetyczny  $\alpha,\alpha$ -dipodstawionych estrów aminokwasów.

W reakcji estru etylowego związku **14** katalizowanej przez PLE hydrolizie ulegają szybciej enancjomery o konfiguracji absolutnej (*S*). W wyniku tego procesu otrzymuje się aminokwasy **15** z nadmiarem enancjomerycznym 72 i 93%, o konfiguracji absolutnej (*S*). Nieprzereagowane estry **14** pozostające w mieszaninie reakcyjnej otrzymane zostały z mniejszą wydajnością, ale wyższymi nadmiarami enancjomerycznymi [34].

Przykład zastosowania PLE do rozdzielania mieszaniny racemicznej enancjomerów o konfiguracji *cis* związku **16** został przedstawiony na rysunku 7. W wyniku hydrolizy katalizowanej PLE otrzymano diastereoizomer (*1R,2S*) kwasu **17** z bardzo dobrą wydajnością chemiczną oraz czystością optyczną [12].

Interesujący przykład wykorzystania reakcji spontanicznej, której ulega produkt reakcji enzymatycznej, ułatwiającej znacznie oczyszczanie produktu został przedstawiony na rysunku 8.

Enzymatyczna hydroliza jednego z enancjomerów racemicznego  $\beta$ -ketoestru **18** prowadzi do odpowiedniego kwasu, który spontanicznie ulega dekarboksylacji do 2-metylocykloheksanonu **19**. W mieszaninie reakcyjnej pozostaje enancjomer (*S*) substratu **18a** o bardzo wysokiej czystości optycznej. Związek ten można bez problemu oddzielić od ketonu **19**, co znacznie upraszcza cały proces [35].

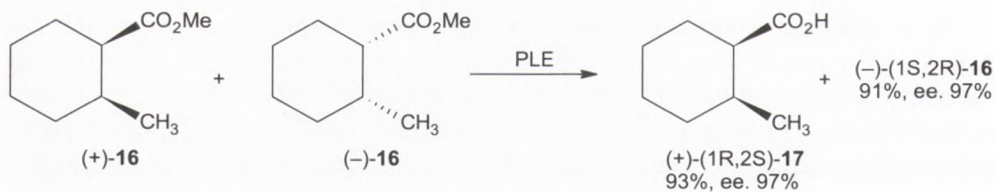
Odpowiednia budowa centrum aktywnego PLE umożliwia zastosowanie tego enzymu do selektywnej funkcjonalizacji pochodnych estrów kwasów allenowych **20** posiadających chiralność osiową, co przedstawiono na rysunku 9.

W reakcji katalizowanej PLE reaguje enancjomer *R* substratu. Chiralny kwas **21** został otrzymany z wysoką wydajnością chemiczną, a także wysokim nadmiarem enancjomerycznym, wynoszącym 90% [36].

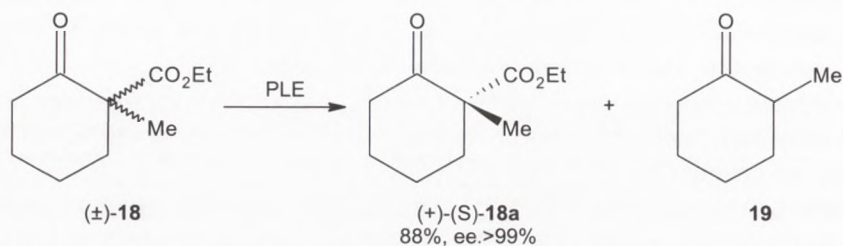
Zastosowanie jako substratu związku *mezo* umożliwia syntezę enancjomerycznie czystego produktu z wydajnością przekraczającą 50%. W wyniku enzymatycznej hydrolizy pochodnej kwasu malonowego **22**, przedstawionej na rysunku 10, otrzymano chiralny (*S*)-monoester **23** z nadmiarem enancjomerycznym równym 96% i wydajnością 97%. Związek ten jest głównym produktem pośrednim w syntezie agonistów receptora  $\beta_3$  wykorzystywanych do leczenia otyłości [37].

W systematycznie prowadzonych badaniach nad wpływem podstawników na przebieg reakcji desymetryzacji katalizowanej PLE na dialkylowych diestrach kwasów malonowych typu **22** pokazano, że zwiększanie długości łańcucha alifatycznego zmienia enancjoselektywność enzymu [38]. Estry dimetylowe z podstawnikami, którymi są grupy alifatyczne posiadające od jednego do trzech atomów węgla ulegają hydrolizie dając odpowiednie produkty o konfiguracji *S*. W przypadku dłuższych łańcuchów alifatycznych powstają produkty o konfiguracji *R*. Wynika to z odpowiedniego dopasowania hydrofobowego łańcucha alifatycznego do małej  $H_S$  (dla  $n = 1, 2, 3$ ) i dużej  $H_L$  (dla  $n = 4, 5, 6$ ) kieszeni hydrofobowej w centrum aktywnym enzymu. Produkty hydrolizy estrów etylowych ( $R = Et$ ) otrzymywane są ze zdecydowanie niższymi nadmiarami enancjomerycznymi, nie przekraczającymi 25% [38].

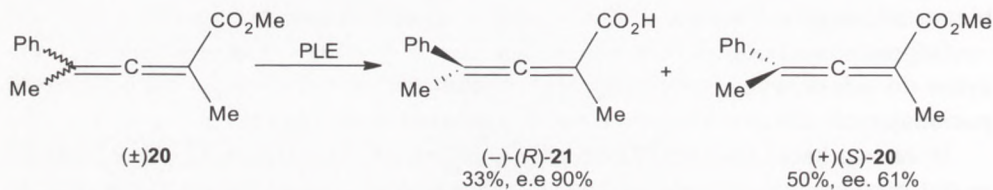




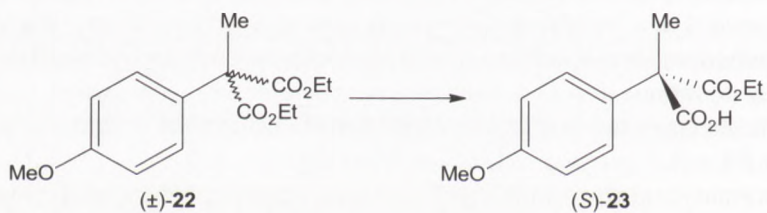
Rys. 7. Rozdział kinetyczny enancjomerów o konfiguracji *cis*.



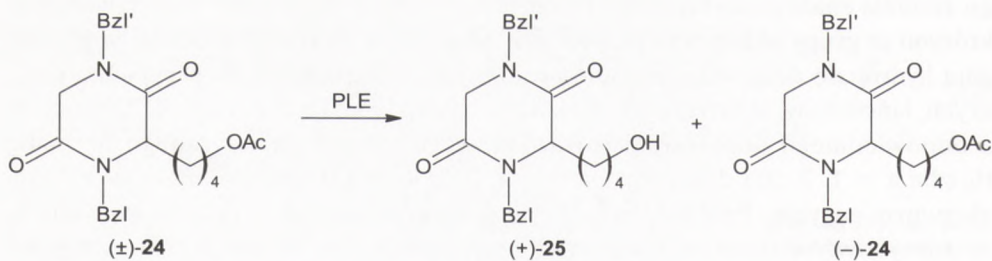
Rys. 8. Selektywna hydroliza  $\beta$ -ketoestru ze spontaniczną dekarboksylacją kwasu karboksylowego.



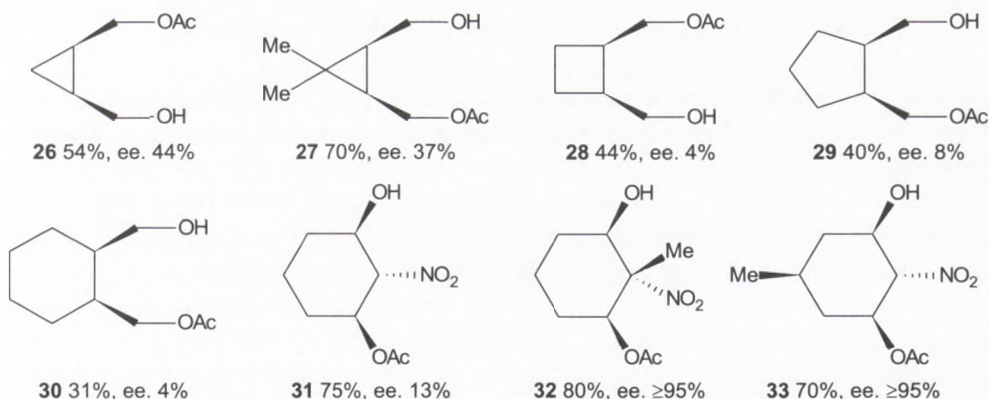
Rys. 9. Selektywna hydroliza kwasów allenowych.



Rys. 10. Hydroliza prochiralnej pochodnej kwasu malonowego.



Rys. 11. Selektywna hydroliza estrowych pochodnych diketopiperazyn.



Rys. 12. Selektywna hydroliza estrów dioli.

Rozdzielenie mieszanin racemicznych na enancjomery możliwe jest nie tylko na drodze hydrolizy enzymatycznej. Jednak oddalanie centrum reakcji od asymetrycznego atomu węgla prowadzi zawsze do obniżenia enancjoselektywności takich reakcji. Zastosowanie katalizy enzymatycznej pozwala w szeregu przypadkach uzyskać znakomite wyniki.

W reakcji katalizowanej przez PLE otrzymano optycznie czynny alkohol (+)-**25** oraz ester (-)-**24** zgodnie z rysunkiem 11. Należy zwrócić uwagę na fakt, że centrum asymetrii oddalone jest aż o 5 wiązań od miejsca hydrolizy [39]. Uzyskane optycznie czynne diketopiperazyny **25** i **24** są prekursorami licznych związków biologicznie czynnych [40,41], między innymi bicyklomycyny, antybiotyku wyizolowanego ze szczepu *Streptomyces* [42].

Selektywna funkcjonalizacja tylko jednej z grup acylowych diestrów *mezo* dioli może prowadzić w procesie desymetryzacji do odpowiednich alkoholi z wydajnościami sięgającymi 100%. Wykonano badania nad wpływem, jaki ma budowa diestrów na przebieg reakcji hydrolizy katalizowanej przez PLE. Struktury uzyskanych produktów, wydajności reakcji wraz z uzyskanymi nadmiarami enancjomerycznymi zostały zebrane na rysunku 12.

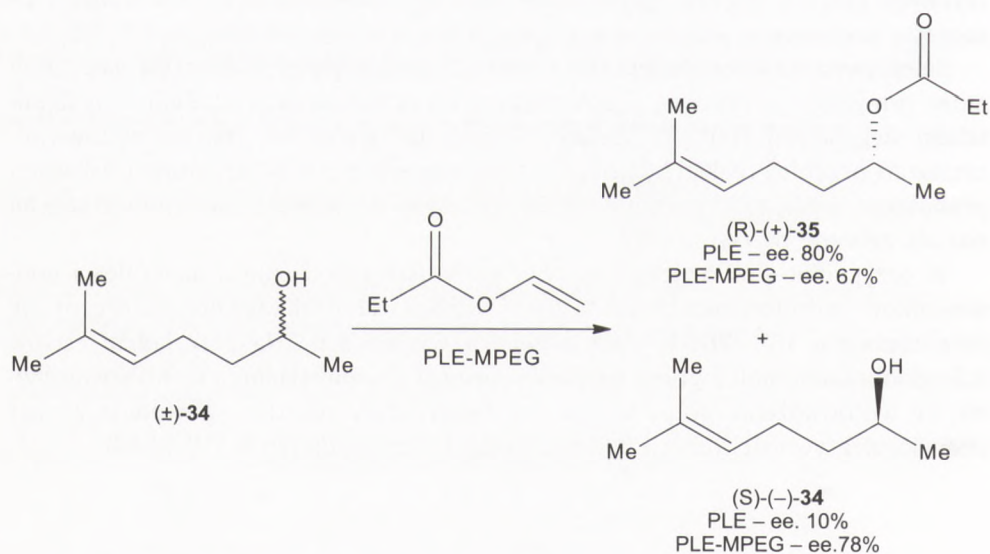
W przypadku dioli mających w swej strukturze pierścienie o małej ilości podstawników hydroliza przebiega na ogół z niską stereoselektywnością, często nie przekraczającą 15% (**28-31**) oraz niewielką wydajnością. Na przykładzie estrów 1,3-cykloheksanodiolu z grupą nitrową w pozycji 2 w pierścieniu (**31-33**) stwierdzono, że wprowadzenie grupy metylowej do struktury substratu powoduje wzrost enancjoselektywności reakcji hydrolizy odpowiednich diestrów [19,43,44].

#### 4.2.2. Zastosowanie PLE w stereoselektywnych reakcjach estryfikacji

Reakcje estryfikacji katalizowane przez PLE przebiegają powoli i z niewielką stereoselektywnością, co wynika z niskiej aktywności enzymu w rozpuszczalnikach organicznych.

Możliwe jest jednak przeprowadzenie tego typu reakcji w obecności odpowiednio modyfikowanego enzymu lub poprzez dodawanie substancji pomocniczych do mieszanin reakcyjnych. Modyfikacja PLE polegająca na utworzeniu wiązań kowalencyjnych między enzymem a albuminą serum wołowego (PLE-BSA) lub metoksypolietylowanymi glikolami (PLE-MPEG) zwiększa aktywność tego biokatalizatora. Badano reakcję enzymatycznej estryfikacji alkoholu **34** propionianem winylu zgodnie z rysunkiem 13. Zastosowanie do reakcji modyfikowanego enzymu PLE-MPEG daje zdecydowany wzrost stopnia konwersji z 11 do 54% w porównaniu do natywnego enzymu, a także zwiększa czystość optyczną nieprzereagowanego alkoholu **34**. Jednakże produkt reakcji, ester **35**, otrzymany był z niższym nadmiarem enancjomerycznym [45,46].

Stwierdzono, że w reakcjach estryfikacji alkoholi posiadających w swej strukturze pierścienie aromatyczne w obecności PLE-MPEG lub PLE-BSA enancjoselektywność przekracza  $E > 100$  [45]. Reakcje estryfikacji można prowadzić w rozpuszczalnikach organicznych. Należy jednak dodać do mieszaniny reakcyjnej wodę w ilości 0,2-1,4% [47].



Rys. 13. Stereoselektywna transestryfikacja alkoholu drugorzędowego.

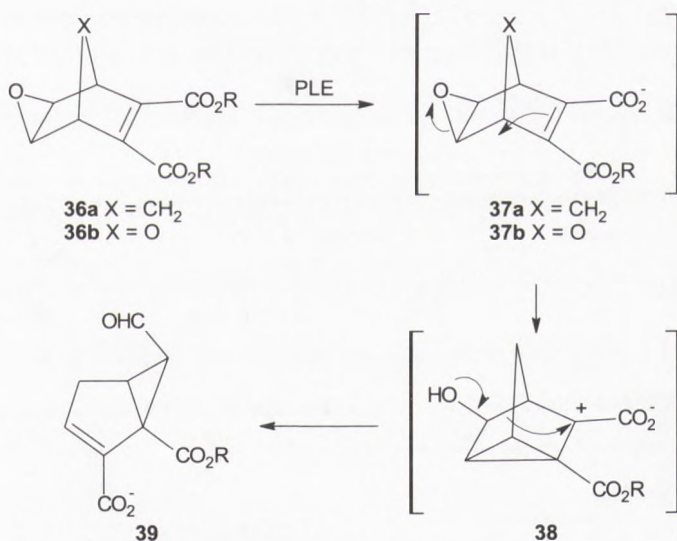
### 4.3. Reakcje domino katalizowane przez PLE

Reakcja typu domino jest procesem, w którym pierwszy etap jest inicjowany czynnikiem zewnętrznym, np. enzymem. Kolejne przemiany zachodzą samorzutnie i nie wymagają dodatkowych czynników inicjujących. Kolejne etapy reakcji domino są wynikiem utworzenia reaktywnej grupy funkcyjnej poprzedniego etapu. Nie można zatrzymać reakcji domino na wybranym etapie, a produktów pośrednich nie można wydzielić [46,48].

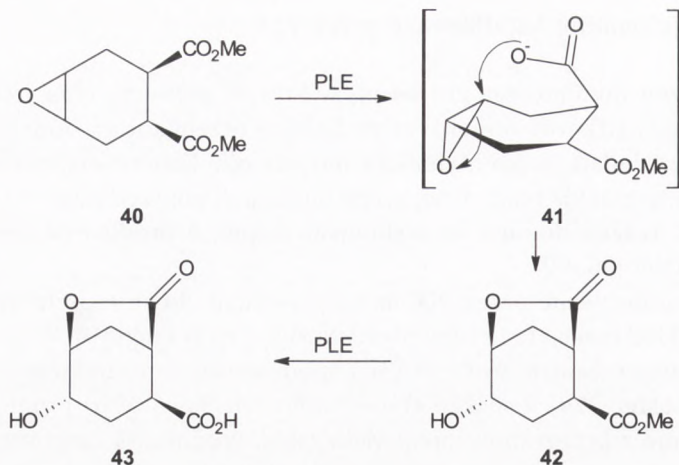
Reakcje katalizowane przez PLE mogą prowadzić do stereoselektywnej reakcji domino. Przykład reakcji tego typu przedstawiono na rysunku 14. W reakcji hydroлізу symetrycznego diestru **36** ( $X = \text{CH}_2$ ) spodziewanym produktem był optycznie czynny monoester **37a**, jednakże stwierdzono obecność tylko produktu **39** powstałego zgodnie z przegrupowaniem Meinwalda. Produkt **39** otrzymano z nadmiarem enancjomerycznym równym 48% [49]. W przypadku gdy heteroatom  $X$  był atomem tlenu końcowym produktem był chiralny monoester **37b** [49,50].

Enzymatyczna hydroliza diestru **40** katalizowana PLE prowadzi do kwasu **43** zgodnie z mechanizmem pokazanym na rysunku 15. Po hydrolizie jednej z grup estrowych zachodzi wewnątrzcząsteczkowy atak nukleofilowy na pierścień epoksydowy z utworzeniem  $\gamma$ -laktonu **42**, który w kolejnej reakcji hydrolizy enzymatycznej daje kwas **43** z nadmiarem enancjomerycznym równym 96% [51].

Enzymatyczne reakcje domino będą, jak się wydaje, przedmiotem intensywnych badań z uwagi na fakt, że prowadzą one do bardzo złożonych produktów, które tworzone są z wysokimi wydajnościami, bez konieczności wydzielenia produktów poszczególnych reakcji.



Rys. 14. Reakcja domino z przegrupowaniem Meinwalda.

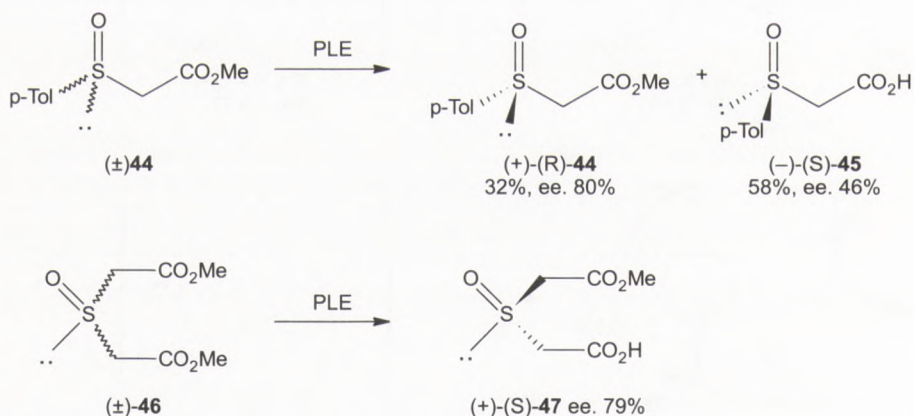


Rys. 15. Reakcja domino z utworzeniem  $\gamma$ -laktonu.

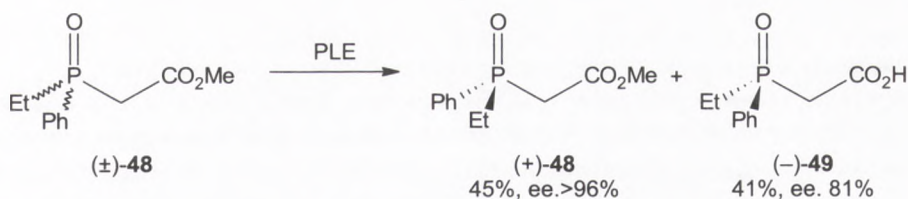
#### 4.4. Zastosowanie PLE do funkcjonalizacji związków posiadających heteroatomy

Otrzymanie związków posiadających w swojej strukturze asymetryczne heteroatomy jest procesem bardzo trudnym. Trudno jest uzyskać odpowiednie produkty z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi oraz dobrymi wydajnościami chemicznymi.

Zastosowanie PLE jako katalizatora do reakcji hydrolizy racemicznego estru 44, pokazanego na rysunku 16, dało odpowiedni kwas 45 z wydajnością 58% i dobrym nadmiarem enancjomerycznym. Uzyskano także znaczne wzbogacenie substratu w drugi z enancjomerów [52]. Lepszy wynik uzyskano, gdy jako substrat do analo-



Rys. 16. Stereoselektywna hydroliza sulfinyloctanów.



Rys. 17. Stereoselektywna hydroliza fosfinylooctanów.

gicznej reakcji użyto diester **46**. Enzymatyczna desymetryzacja, katalizowana PLE, dała tylko jeden produkt, kwas **47** z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 79% [52].

Inny przykład zastosowania PLE do różnicowania fosfinylooctanów przedstawiony jest na rysunku 17. Odpowiedni kwas **49** otrzymano z wydajnością 41 i 81% nadmiarem enancjomerycznym [37]. Warto podkreślić, że enzym efektywnie katalizuje hydrolizę tylko jednego z enancjomerów substratu, co prowadzi do ilościowego wzbogacenia substratu w przeciwny enancjomer. Optycznie czynne fosfinylooctany są używane jako chiralne ligandy w syntezie katalizatorów mających w swej strukturze atomy metali przejściowych.

## 5. Podsumowanie

Zgodnie z zaleceniami sformułowanymi dla procesów realizowanych zgodnie z procedurami zielonej chemii reakcje chemiczne realizowane w przemyśle oraz laboratoriach badawczych powinny być prowadzone tak, by maksymalnie obniżyć ich negatywny wpływ na środowisko naturalne [54]. Dlatego też szczególnie procesy powinny być realizowane w temperaturze pokojowej, pod ciśnieniem atmosferycznym oraz stosując odpowiednie katalizatory. Zalecane jest także stosowanie reagentów i katalizatorów biodegradowalnych [55]. Reakcje chemiczne katalizowane przez enzymy znakomicie spełniają te wymagania. Esteraza z wątroby świńskiej jest bardzo dogodnym biokatalizatorem. Surowy enzym może być otrzymany praktycznie w każdym laboratorium chemicznym czy biochemicznym, w dowolnych ilościach. Zanieczyszczenia występujące w tak uzyskanym biokatalizatorze praktycznie nie mają wpływu na jego aktywność katalityczną. Enzym ten znajduje zastosowanie jako biokatalizator w szeregu reakcji chemo-, regio-, enancjo- i diastereoselektywnych. W większości przypadków odpowiednie produkty uzyskiwane są z dobrymi i bardzo dobrymi wydajnościami oraz wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi. Reakcje katalizowane przez PLE prowadzone są, w większości przypadków, w temperaturze pokojowej lub lekko podwyższonej, w buforach wodnych, wodzie albo rozpuszczalnikach organicznych. Budowa centrum aktywnego tego enzymu umożliwia stosowanie szerokiej gamy różnych związków jako substratów. Opracowano

dogodne modele, opierające się na danych eksperymentalnych, umożliwiające przewidywanie kierunków katalizowanych przez PLE reakcji chemicznych.

Poszukiwanie nowych zastosowań PLE do prowadzenia reakcji ważnych w przemyśle lub syntezie organicznej będzie, jak się wydaje, miało dalej miejsce. Szczególnie interesujące będzie zastosowanie PLE jako katalizatora inicjującego reakcje domino lub do funkcjonalizacji substratów posiadające asymetryczne heteroatomy typu siarka lub fosfor.

Praca była finansowana z grantu Rektora Politechniki Warszawskiej 503/R1020/0012, oraz projektu KBN nr PBZ – MIN-007/P04/2003.

## Literatura

1. Drauz K., Waldman H., (1995), *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Weinheim: Wiley-VCH.
2. Bornscheuer U. T., Kazlauskas R. J., (1999), *Hydrolases in Organic Chemistry*, Weinheim: Wiley-VCH.
3. Roberts S. M., Wiggins K., Casy G., Phythian S., Todd C., (1996), *Preparative Biotransformations Whole Cell and Isolated Enzymes in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons.
4. Walser P., Renold P., N'Goka V., Hosseinzadeh F., Tamm C., (1991), *Helv. Chim. Acta*, 74, 1941-1952.
5. Lam L. K. P., Brown C. M., de Jeso B., Lym L., Toone E. J., Jones J. B., (1988), *J. Am. Chem. Soc.*, 10, 4409-4411.
6. Heymann E., Junge W., (1979), *Eur. J. Biochem.*, 95, 509-518.
7. Zemlicka J., Craine L. E., Heeg M.-J., Oliver J. P., (1988), *J. Org. Chem.*, 53, 937-942.
8. Lam L. K. P., Raymond A., Hui F., Jones J. B., (1986), *J. Org. Chem.*, 51, 2047-2050.
9. Mohr P., Waespe-Sarcevic N., Tamm C., Gawrońska K., Gawroński J. K., (1983), *Helv. Chim. Acta*, 66, 2501-2511.
10. Sabbioni G., Jones B. J., (1987), *J. Org. Chem*, 52, 4565-4570.
11. Provencher L., Wynn H., Jones J. B., Krawczyk A. R., (1993), *Tetrahedron Asymm.*, 4, 2025-2040.
12. Toone E. J., Jones B. J., (1991), *Tetrahedron Asymm.*, 2, 207-222.
13. Toone E. J., Jones B. J., (1991), *Tetrahedron Asymm.*, 2, 1041-1052.
14. Toone E. J., Werth M. J., Jones B. J., (1990), *J. Am. Chem. Soc.*, 12, 4946-4952.
15. Provencher L., Jones J. B., (1994), *J. Org. Chem.*, 59, 2729-2732.
16. Kielbasiński P., (2000), *Tetrahedron Asymm.*, 11, 911-915.
17. Laumen K., (1985), *Tetrahedron Lett.*, 26, 407.
18. Sousa H. A., Rodrigues C., Klein E., Afonso C. A. M., Crespo J.G., (2001), *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 625-634.
19. Guanti G., Banfi L., Narisano E., Riva R., Thea S., (1986), *Tetrahedron Lett.*, 27, 4639-4642.
20. Dachi K., Kobayashi S., Ohno M., (1986), *Chimia*, 40, 311.
21. Seebach P., Eberle M., (1986), *Chimia*, 40, 317.
22. Peirce G., (1913), *J. Biol. Chem.*, 16, 1.
23. Connors W. M., Pihl A., Dounce A. L., Stotz E., (1950), *J. Biol. Chem.*, 184, 29.
24. Ohno M., Otsuka M., (1989), *Organic Reactions*, 37, 1-55.
25. Mroczkiewicz M., Fryszkowska A., Ostaszewski R., (2005), dane nie publikowane.
26. Adler A. J., Kistiakowsky G. B., (1961), *J. Biol. Chem.*, 12, 3240-3245.
27. Caron G., Kazlauskas R. J., (1991), *J. Org. Chem.*, 56, 1991.
28. Naemura K., Fukuda R., Takahashi N., Konishi M., Hirose Y., Tobe Y., (1993), *Tetrahedron Asymm.*, 4, 911-918.
29. Pichon C., Martin-Gourdel M.-E., Chauvat D., Alexandre C., Huet F., (2004), *J. Mol. Catal. B: Enz.*, 27, 65-68.

30. Basak A., Mandal S., Bandyopadhyay S., (2003), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13, 1083-1085.
31. Basak A., Bhattacharya G., Palit S. K., (1997), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 70, 2509-2513.
32. Sicsic S., Igbal M., Le Goffic F., (1987), *Tetrahedron Lett.*, 28, 1887.
33. Stecher H., Faber K., (1997), *Synthesis*, 1-16.
34. Kaptein B., Boesten W. H. J., Broxterman Q. B., Peters P. J. H., Schoemaker H. E., Kamphuis J., (1993), *Tetrahedron Asymm.*, 4, 1113-1116.
35. Westermann B., Scharmann H. G., Kortmann I., (1993), *Tetrahedron Asymm.*, 4, 2119-2122.
36. Ramaswamy S., Hui R. A. H. F., Jones B. J., (1986), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1545.
37. Patel R. N., Banerjee A., Chu L., Brzozowski D., Nanduri V., Szarka L. J., (1998), *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 75, 1473-1482.
38. Bjorkling F., Boutelje J., Gatenbeck S., Hult S., Norin T., (1985), *Tetrahedron*, 41, 1985.
39. Fryszkowska A., Mroczkiewicz M., Ostaszewski R., (2004), dane nie publikowane.
40. Fukuyama T., Nunes J., (1988), *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 5196-5198.
41. Sato N., Obara Y., Azumaya M., Kubo A., (1992), *Chem. Pharm. Bull.*, 40, 2620-2626.
42. Williams R. M., Dung J., Josey J., Armstrong R. W., Meyers H., (1983), *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 3214-3226.
43. Laumen K., Schneider M., (1985), *Tetrahedron Lett.*, 26, 2073.
44. Eberle M., Egli M., Seebach D., (1988), *Helv. Chim. Acta*, 71, 1.
45. Jungen M., Gais H.-J., (1997), *Tetrahedron Asymm.*, 8, 3657-3664.
46. Jungen M., Gais H.-J., (1999), *Tetrahedron Asymm.*, 10, 3747-3758.
47. Gais H.-J., Jungen M., Jadhav V., (2001), *J. Org. Chem.*, 66, 3384-3396.
48. Tieze L. F., (1996), *Chem. Rev.*, 96, 115-136.
49. Niwayama S., Kobayashi S., Ohno M., (1988), *Tetrahedron Lett.*, 29, 6313-6316.
50. Ohno M., Ito Y., Arita M., Shibata T., Adachi K., Sawai H., (1984), *Tetrahedron*, 40, 145-152.
51. Kuhn T., Tamm C., (1989), *Tetrahedron Lett.*, 30, 693.
52. Kielbasiński P., (2000), *Tetrahedron Asymm.*, 11, 911-915.
53. Kielbasiński P., Żurawski R., Pietrusiewicz K. M., Zabłocka M., Mikołajczyk M., (1994), *Tetrahedron Lett.*, 35, 7081-7084.
54. Poliakov M., Fitzpatrick J. M., Farren T. R., Anastas P. T., (2002), *Science*, 297, 907-909.
55. Simmons M. S., (1996), *Green Chemistry: Designing Chemistry for the Environment*, Eds. Anastas P.T., Williamson T. C., (1996), 121, *American Chemical Society*, Washington, DC.