



## Biotransformacje z udziałem drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Ewa Białecka-Florjańczyk, Ewa Majewska

Katedra Chemii, Wydział Technologii Żywności,  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

### *Saccharomyces cerevisiae* in biotransformations

#### Summary

In the last decade, whole cells and enzymes have been used extensively in organic synthesis to obtain homochiral products in a variety of organic reactions. Baker's yeast, which has a large potential as a catalyst in organic chemistry, owing to ease of handling and broad substrate acceptability, has been widely used, mainly in the reduction of the carbonyl groups of prochiral ketones, producing alcohols with high enantiomeric purity. This review describes the most relevant recent papers not only on the reduction of carbonyl groups, but also on other aspects of utilizing baker's yeast.

#### Key words:

biotransformations, baker's yeast.

#### Adres do korespondencji

Ewa Białecka-Florjańczyk,  
Katedra Chemii,  
Wydział Technologii  
Żywności,  
Szkoła Główna  
Gospodarstwa Wiejskiego,  
ul. Nowoursynowska 159c,  
02-787 Warszawa;  
e-mail:  
ewa\_bialecka\_florjanczyk  
@sggw.pl

Biotransformacje, czyli przekształcanie związków chemicznych pod wpływem enzymów, stanowią ważną i dynamicznie rozwijającą się dziedzinę chemii organicznej, ponieważ dzięki tej technice można przeprowadzać przemiany związków organicznych z selektywnością rzadko osiąganą innymi metodami (1-5).

Biotransformacje mogą zachodzić przy udziale wolnych enzymów lub zawierających je komórek czy tkanek, które spełniają rolę biokatalizatora, a ulegać im mogą nie tylko substancje pochodzenia naturalnego, ale również związki otrzymane w wyniku syntezy chemicznej. Enzymy są w stanie katalizować reakcje

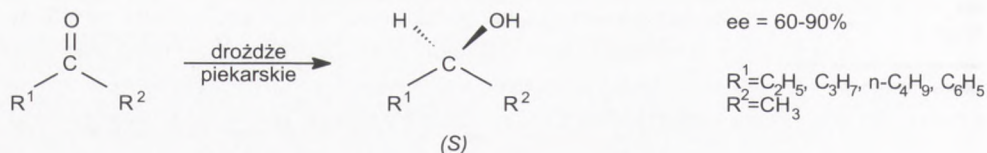
z udziałem ściśle określonych substratów, reakcja dotyczy wybranego fragmentu cząsteczki i ma dokładnie określony przebieg stereochemiczny. W związku ze złożoną przestrzenną strukturą enzymy mogą rozróżniać takie same grupy funkcyjne znajdujące się w różnym otoczeniu chemicznym – rezultatem tej właściwości jest selektywność lub specyficzność reakcji enzymatycznych. Szczególnie istotna jest enancjoselektywność reakcji katalizowanych przez enzymy, z czym wiąże się ich znaczenie w syntezie asymetrycznej, a co za tym idzie, w syntezie związków naturalnych.

Enzymy są jednak reagentami kosztownymi i trudno dostępnymi. Tańszym i wygodniejszym rozwiązaniem jest zastosowanie całych mikroorganizmów, a zwłaszcza drożdży piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*) (6,7). W przeciwieństwie do enzymów drożdże są surowcem tanim, dostępnym i łatwym w użyciu w laboratorium chemicznym nie dysponującym z reguły zapleczem mikrobiologicznym. Można je stosować w postaci prasowanej, suchej, liofilizowanej czy immobilizowanej, a reakcje z ich udziałem zachodzą zarówno w wodzie jak i w rozpuszczalnikach organicznych. Żywe komórki drożdży są w stanie syntetyzować wiele różnych enzymów (8), a także koenzymy niezbędne, np. do przebiegu reakcji utleniania i redukcji, stąd największą popularnością cieszy się ich wykorzystanie w reakcjach mikrobiologicznej redukcji związków karbonylowych (9). Ze względu na tak dużą ilość produkowanych enzymów drożdże mogą katalizować również wiele innych reakcji, np. hydrolizę estrów czy redukcję podwójnych wiązań węgiel-węgiel. Zdarza się, że reakcje te zachodzą równolegle, co prowadzi do obniżenia ich wydajności. Można jednak ingerować w przebieg reakcji za pomocą inhibitora konkretnych enzymów lub zastosowanie odpowiednich modyfikacji genetycznych.

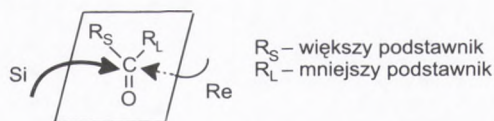
W opracowaniu omówiono wszystkie te aspekty wykorzystania drożdży. Ponieważ jednak w większości cytowanych artykułów przeglądowych główną uwagę poświęca się reakcjom redukcji związków karbonylowych (2-7,9), w znacznie większym stopniu uwagę skoncentrowano na pozostałych dziedzinach zastosowania drożdży w biotransformacjach ze szczególnym uwzględnieniem prac z ostatnich kilkunastu lat.

## 1. Redukcje związków karbonylowych

Reakcja mikrobiologicznej redukcji związków karbonylowych pozwala na otrzymanie chiralnych alkoholi, które są cennym substratem dla wielu syntez związków naturalnych czy farmaceutyków (9). W systematycznie przeprowadzanych badaniach redukcji ketonów alifatycznych (6,7) wykazano, że ketony metylowe są źródłem drugorzędowych alkoholi o konfiguracji (S).



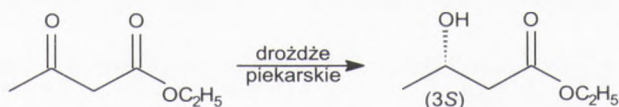
Oznacza to, że zgodnie z regułami Preloga przeniesienie anionu wodorkowego następuje od strony Re ketonu.



Przebieg reakcji w dużym stopniu zależy od budowy przestrzennej substratu. Ketony sterycznie zatłoczone nie są redukowane w obecności drożdży piekarskich, a keton butylo-etylowy daje w przewodzie enancjomer (*R*) odpowiedniego alkoholu. W redukcji 4-podstawionych aryloacetofenonów do (*S*)-1-aryloetanoli osiąga się umiarkowane wydajności i nadmiar enancjomeryczny rzędu 80-96% (10). Chociaż podstawnik w pozycji 4 nie wpływał znacząco na stereochemiczny przebieg reakcji, to obecność ugrupowania elektrodonorowego zmniejszała jej szybkość. W pewnych przypadkach udało się osiągnąć zadowalające rezultaty, np. mikrobiologiczną reakcję redukcji pochodnych (trifluoroacylo)bifenylu zastosowano w syntezie chiralnych związków ciekłokrystalicznych (11).

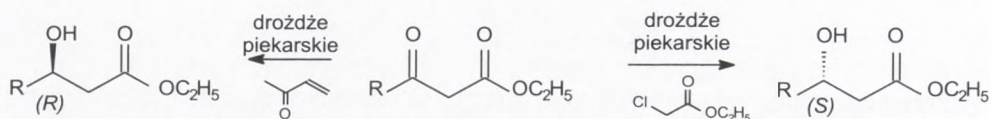


Kolejną ważną grupą związków redukowanych w sposób enancjo, a także regio-selektywny są związki dikarbonylowe – diketony i oksoestry. Najdokładniej została zbadana reakcja redukcji estrów kwasu acetylooctowego, prowadząca do hydroksybutanianów, które są chiralnymi półproduktami w syntezie farmaceutyków (np. karbapenem, daunozamina, benzotiazepina). W zależności od zastosowanych warunków reakcja ta zachodzi z wydajnością 30-80%, a nadmiar enancjomeryczny produktu (*S*) wynosi 77-98% (6,12).



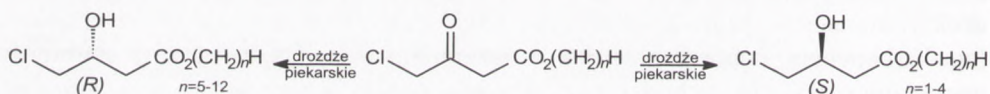
Aby wyjaśnić mechanizm redukcji Nakamura i wsp. wydzielili i scharakteryzowali cztery podstawowe oksydoreduktazy uczestniczące w tej reakcji, różniące się masą cząsteczkową, aktywnością i specyficznością działania (13). Dwie z nich katalizowały powstawanie enancjomeru (*R*), dwie pozostałe (*S*), przy czym każda z osobna dawała enancjoselektywność ponad 99%. Sumaryczne konkurencyjne działanie tych enzymów obniża stereoselektywność reakcji. Może być ona jednak zwiększona poprzez dodatek substancji inhibitujących działanie konkretnej oksydoreduktazy.

W tym przypadku dodatek chlorooctanu etylu hamuje działanie trzech enzymów; aktywność zachowuje tylko jeden enzym, który katalizuje powstawanie enancjomeru (S). Natomiast w obecności ketonu metylo-winylowego tworzy się stereoizomer (R).

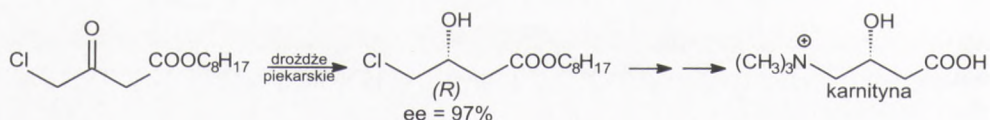


Podobnie działa inny związek nienasycony – alkohol allilowy, zwiększając wydajność (R)-hydroksyestru (14). Komórki drożdży piekarskich są w stanie produkować również inne oksydoreduktazy: Furuichi i wsp. (15) wydzielili z nich enzym katalizujący powstanie (S)-2-metylo-3-hydroksybutanianu benzylu, ale, w przeciwieństwie do enzymów scharakteryzowanych przez Nakamurę, nieaktywny w stosunku do 2-metylo-3-oksobutanianu etylu. Z kolei porównując trzy oksydoreduktazy wydzielone z drożdży piekarskich przez Shieha i wsp. (16) z enzymami opisanymi przez Nakamurę (14), tylko w jednym przypadku można stwierdzić zbieżność właściwości.

Stereochemiczny przebieg redukcji  $\beta$ -ketoestrów zależy w decydującym stopniu od długości łańcucha węglowodorowego znajdującego się w cząsteczce kwasu bądź alkoholu. Estry alkoholi o krótkim łańcuchu (do czterech atomów węgla) są redukowane do enancjomeru (S); natomiast dłuższy, hydrofobowy podstawnik sprzyja powstawaniu enancjomeru (R). Jest to zatem metoda pozwalająca na otrzymanie dowolnych estrów obu enancjomerów, ponieważ po redukcji można przeprowadzić transestryfikację nie naruszając centrum chiralności (18).



Obserwacje te zostały wykorzystane w syntezie aminokwasu L-karnityny:



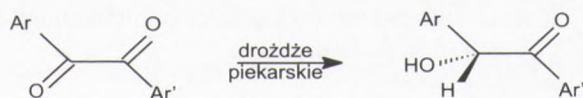
Wydłużenie łańcucha w cząsteczce kwasu także istotnie wpływa na rodzaj powstającego stereoizomeru – o ile w wyniku redukcji 3-oksobutanianu metylu powstaje enancjomer (S) to z 3-oksopentanianu metylu tworzy się w przewadze (R) hydroksyester (18). Natomiast w reakcji redukcji  $\delta$ -alkoksykarbonylo- $\beta$ -ketoestrów powstają chiralne  $\delta$ -alkoksykarbonylo- $\beta$ -hydroksyestry, w większości przypadków o konfiguracji (S) (19).



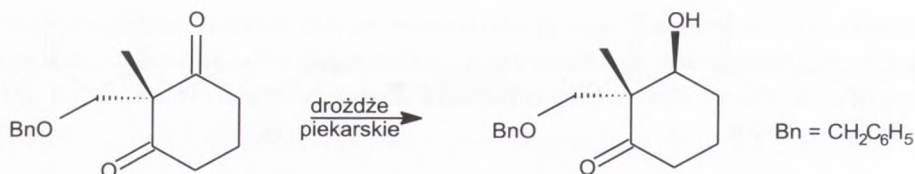
Selektywność redukcji można zwiększyć stosując jako substraty sole potasowe 3-ketokwasów. W ten sposób otrzymano kwas (*R*)-3-hydroksy-7-metylookt-6-enowy, z którego w wyniku kolejnych przekształceń uzyskano enancjomerycznie czysty (*S*)-citronellol (20). Obecność dodatkowej grupy hydroksylowej w pozycji  $\alpha$  w  $\beta$ -ketoestrach wpływa na stereochemiczny przebieg reakcji, ponieważ przyłączenie anionu wodorkowego zachodzi od bardziej dostępnej strony płaszczyzny pierścienia utworzonego z udziałem wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego i w rezultacie powstaje diastereoizomer (2*S*, 3*S*) (21).

Drożdże mogą być również skutecznym katalizatorem redukcji  $\alpha$ -oksoestrów, np. kwasu 4-fenyl-2-oksobutanowego. Produkty tej reakcji znajdują zastosowanie w syntezie inhibitorów enzymu konwertującego angiotensynę (ACE) (22). Kayser, Stewart i wsp. badając redukcję  $\alpha$ -ketoestrów otrzymali (*R*) alkohole (23), przy czym najwyższą wydajność chemiczną i enancjomeryczną uzyskano dla estrów metylowych. Reakcją tą posłużono się w jednym z etapów syntezy bocznego łańcucha w cząsteczce paklitakselu (środek przeciwnowotworowy) (23).

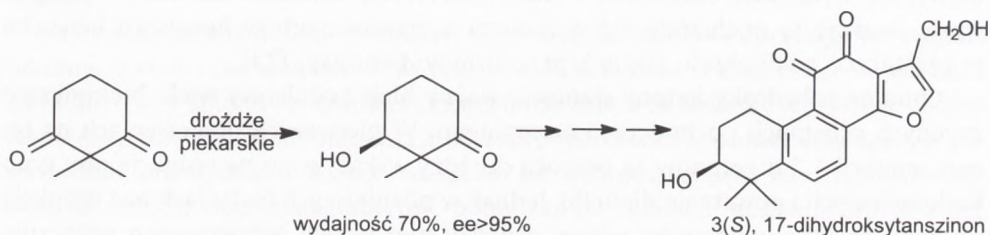
Chiralne  $\alpha$ -hydroksyketony stanowią ważny blok budulcowy wielu biologicznie czynnych substancji pochodzenia naturalnego. W pierwszych doniesieniach na temat redukcji 1,2-diketonów za pomocą drożdży wskazywano na redukcję obu grup karbonylowych i powstanie diolu (6). Jednak w późniejszych badaniach nad redukcją aromatycznych  $\alpha$ -diketonów wobec drożdży piekarskich otrzymywano wyłącznie  $\alpha$ -hydroksyketony (24). Reakcja redukcji symetrycznych  $\alpha$ -diketonów jest stereoselektywna, a dla niesymetrycznych ketonów ponadto regioselektywna. Wydajności oraz nadmiary enancjomeryczne są umiarkowane. Zastosowanie buforu fosforanowego o pH = 7 wpłynęło korzystnie na poprawę wydajności reakcji oraz czystości optycznej produktów (24).



2-Alkilocyklopentano-1,3-diony dają w wyniku reakcji mieszaninę diastereoizomerycznych  $\beta$ -hydroksyketonów o konfiguracji (*S*) nowo powstającego centrum asymetrii (6). Gorsze, pod względem stereoselektywności, wyniki otrzymano w przypadku 2-alkilocykloheksano-1,3-dionów (6). Natomiast z wysoką stereoselektywnością biegnie reakcja redukcji cykloheksano-1,3-dionu, podstawionego w pozycji drugiej grupą benzyloksymetylenową (25).

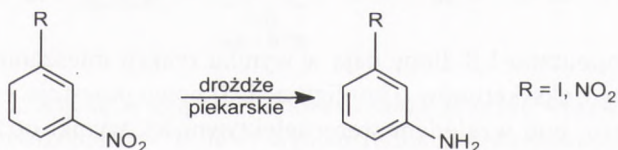


W reakcji tej nie powstaje mieszanina diastereoizomerów, lecz jeden produkt o konfiguracji (*S,S*) z wydajnością 75% i ee 99%. Otrzymany chiralny  $\beta$ -hydroksyketon stanowi substrat w syntezie związków naturalnych m.in. terpenoidów (26,27). Przebieg tej reakcji zależy w dużym stopniu od wielkości pierścienia. Analogiczny związek, lecz z pięcioma atomami węgla w pierścieniu ulega redukcji dając dwa diastereoizomery. Natomiast redukcja odpowiedniego cykloheptano-1,3-dionu i cyklooktano-1,3-dionu prowadzi do uzyskania jednego stereoizomeru z wydajnością rzędu 90% i nadmiarem enancjomerycznym >99% (27). Ostatnio redukcja 2,2-dimetylocykloheksano-1,3-dionu przez drożdże piekarskie została wykorzystana w wieloetapowej syntezie 3(*S*),17-dihydroksytanszinonu (tanshinone), preparatu wykazującego znaczną cytotoksyczność w stosunku do komórek nowotworowych (28).



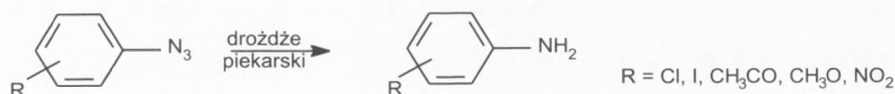
Przy użyciu drożdży piekarskich immobilizowanych w alginianie można również uwodornić podwójne wiązanie C=N (np. w *N*-benzylidenometyloaminie) pod warunkiem, że reakcja będzie przeprowadzona w warunkach bezwodnych (THF, heksan) ze względu na możliwość hydrolizy substratu (29).

Ważną reakcją katalizowaną przez drożdże jest redukcja aromatycznych związków nitrowych (7). Jest to dogodna metoda syntezy *m*-nitroaniliny z *m*-dinitrobenzenu czy *m*-jodoaniliny z *m*-jodonitrobenzenu.

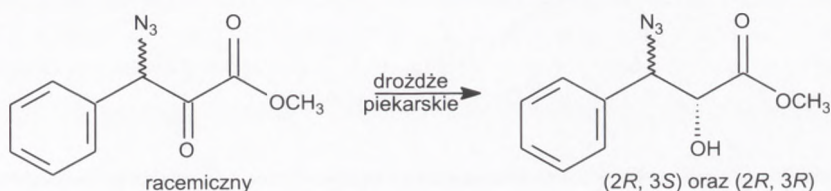


W tym ostatnim przypadku zastosowanie metody mikrobiologicznej pozwala na uniknięcie reakcji ubocznej, zachodzącej często podczas chemicznie katalizowanych przemian jodoarenów. Możliwa również jest jednoczesna redukcja grupy ni-

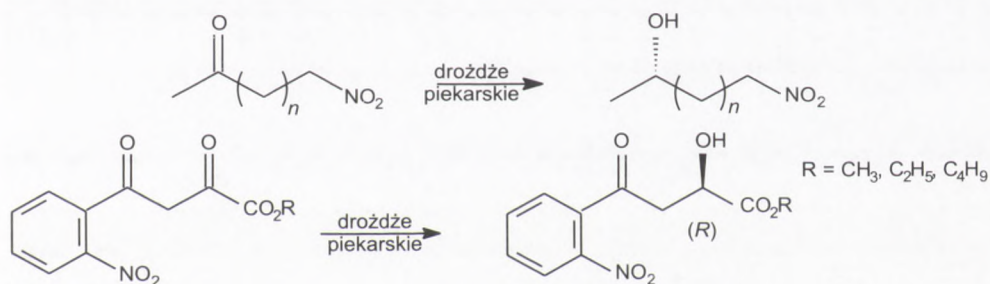
trowej i karbonylowej, np. w nitroacetofenonach (30). Także azydoareny ulegają redukcji pod wpływem drożdży do amin aromatycznych.



Reakcja przebiega z dużą wydajnością (80-90%) w łagodnych warunkach, w rozpuszczalnikach organicznych (metanol, eter naftowy) i wykazuje selektywność, jakiej nie obserwuje się w przypadku wielu metod chemicznych: przy jednoczesnej obecności grupy azydkowej oraz nitrowej, redukowany jest tylko fragment azydkowy (31). Natomiast w  $\beta$ -azydo- $\alpha$ -ketoestrach reakcja zachodzi wybiórczo w grupie karbonylowej nie naruszając azydkowej (23,32).



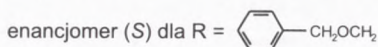
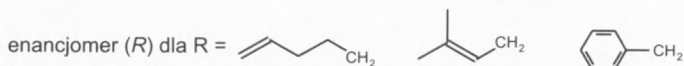
Podobnie w alifatycznych metyloketonach (33) czy fenylodieksoestrach (34) zawierających podstawnik nitrowy zaobserwowano preferencyjną redukcję grup karbonylowych:



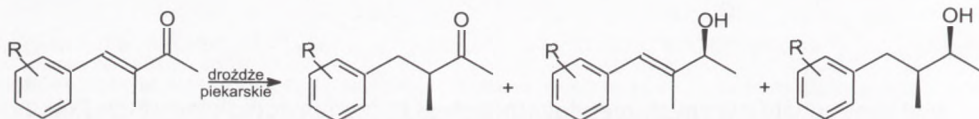
Przytoczone przykłady są dowodem znacznej specyficzności substratowej oksydoreduktaz wydzielanych przez drożdże piekarskie.

## 2. Redukcja wiązania węgiel-węgiel

Pod działaniem drożdży jest również możliwa redukcja wiązań podwójnych węgiel-węgiel. W ten sposób mogą być selektywnie redukowane wiązania podwójne w pozycji alilowej w nienasyconych alkoholach (35,36).



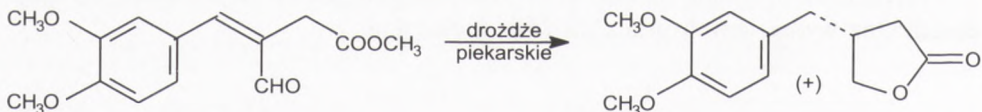
Jest to dogodna metoda otrzymywania optycznie czynnych alkoholi podstawionych w pozycji 2 grupą metylową. Jeżeli w cząsteczce znajduje się zarówno wiązanie podwójne C=C jak i grupa karbonylowa, to możemy mieć do czynienia z przebiegiem obu redukcji, np. w przypadku  $\alpha,\beta$ -nienasyconych ketonów otrzymuje się głównie produkt redukcji wiązania C=C wobec niewielkich ilości alkoholi allilowego i nasyconego (37), przy czym przebieg reakcji zależy od obecności podstawników w pozycjach *ortho*- i *meta*- pierścienia fenylowego.



Analogicznie zachodzi asymetryczna redukcja aldehydu cynamonowego podstawionego w pozycji  $\alpha$  bromem lub grupą azydkową (38). Równoczesna reakcja redukcji grupy karbonylowej i sprzężonego z nią podwójnego wiązania węgiel-węgiel została wykorzystana w syntezie fitolu (36).



Także powstawanie  $\beta$ -benzylo- $\gamma$ -butyrolaktonu w poniższej reakcji jest wynikiem jednoczesnej redukcji podwójnego wiązania C=C i grupy karbonylowej, a następnie wewnątrzcząsteczkowej transestryfikacji (39).



Natomiast w enancjoselektywnej reakcji redukcji 4-oksoizoforonu wybiórczo reaguje wiązanie C=C i jako jedyny produkt powstaje (6R)-2,2,6-trimetylocykloheksano-1,4-dion, użyteczny chiralny półprodukt w syntezie karotenoidów (2).

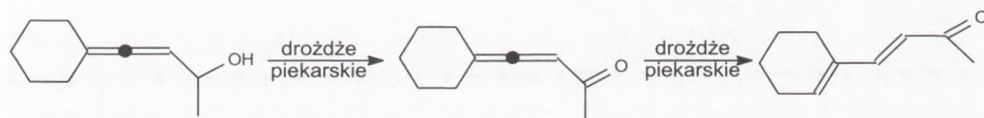




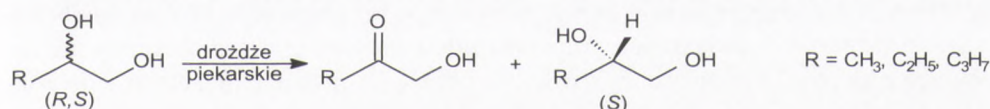
### 3. Reakcje utleniania

Reakcja mikrobiologicznego utleniania alkoholi – czyli reakcja odwrotna do omawianej poprzednio redukcji – nie stała się przedmiotem większej uwagi chemików, ponieważ jej przebieg nie jest z reguły związany z powstawaniem nowego centrum asymetrii. W poszczególnych przypadkach ma ona jednak pewne implikacje stereochemiczne. Tak na przykład poddając reakcji utleniania katalizowanej przez drożdże piekarskie mieszaninę 6-egzo- i 6-endo-bicyklohepten-6-olu stwierdzono, że w reakcję wstępuje wyłącznie izomer *endo* i uzyskano (1*S*,5*R*)-bicykloheptenon – związek wykorzystywany w syntezie prostaglandyn – z wydajnością optyczną 85% (6).

Drożdże piekarskie zastosowano również w reakcji utleniania, a następnie przegrupowania alkoholu allenowego (40).



Enancjoselektywne utlenianie umożliwia rozdzielanie racemicznych alkanodioli:



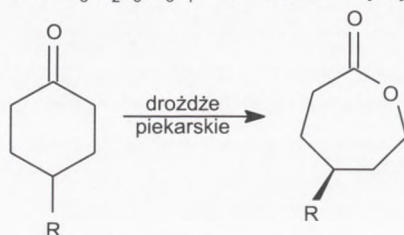
Reakcja utleniania, której selektywnie ulega enancjomer (*R*), jest źródłem (*S*)-alkano-1,2-diolu; enancjomer (*R*) można odzyskać w wyniku mikrobiologicznej redukcji tworzącego się równoległe  $\alpha$ -hydroksyketonu (41).

Najbardziej interesującą reakcją utleniania, w której zastosowano drożdże piekarskie jest reakcja Baeyera-Villigera.



Reakcja Baeyera-Villigera, czyli w klasycznej wersji reakcja utleniania ketonów nadkwasami jest dogodną metodą syntezy estrów lub laktonów. Można ją także przeprowadzić w warunkach mikrobiologicznych, przy czym aktywnym enzymem jest monoooksygenaza cykloheksanonowa (E.C.1.14.13.22). Stewart i Kayser dokonali ekspresji monoooksygenazy cykloheksanonowej w komórkach drożdży piekarskich, a następnie zastosowali tak zmodyfikowany szczep drożdży do reakcji utleniania podstawionych cykloheksanonów i cyklopentanonów (42-44). W wyniku tej modyfikacji została także zminimalizowana uboczna reakcja redukcji grupy karbonylowej. W przypadku 2- i 3-podstawionych cyklopentanonów osiągnięto nieco gorsze rezultaty.

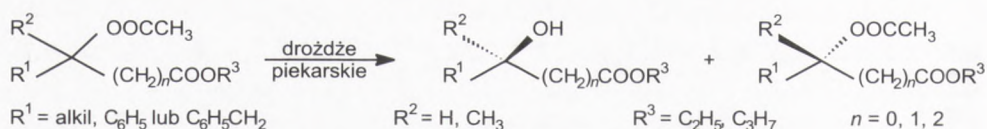
R = CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> ee = 92-98% wydajność = 60-80%



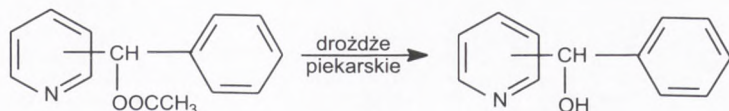
#### 4. Reakcje hydrolizy

Regio- i stereoselektywne reakcje hydrolizy estrów należą do najczęściej stosowanych biotransformacji w chemii organicznej (1). Oprócz wyizolowanych białek enzymatycznych wykorzystuje się w nich żywe komórki zarówno bakterii, grzybów jak i drożdży, które są źródłem esteraz. Hydrolityczne rozszczepianie wiązań estrowych przez drożdże piekarskie zaobserwowano po raz pierwszy jako reakcję uboczną podczas redukcji związków z grupy steroidów (6). Dalsze prace dotyczyły już celowego wykorzystania hydrolizy estrów w obecności drożdży piekarskich do rozdziału enancjomerów w syntezie związków biologicznie czynnych, głównie leczniczych (45,46).

Najczęściej hydrolizowaną grupą związków są estry kwasu octowego i racemicznych alkoholi – selektywnej reakcji hydrolizy ulega tylko jeden z enancjomerów. Dość dokładnie zbadano tę reakcję prowadząc hydrolizę octanów różnych hydroksyestrów (5):



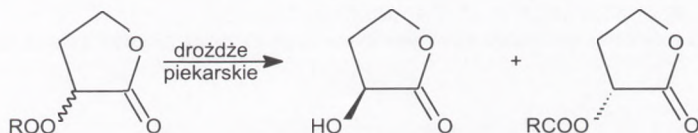
Dobre rezultaty (ee = 80-90%) otrzymano, gdy jeden podstawnik miał charakter aromatyczny np. dla  $R^1 = C_6H_5$  lub  $C_6H_5CH_2$ , a  $R^2 = H$  i  $R^3 = C_2H_5$ . Natomiast obecność dwóch podstawników aromatycznych, jak stwierdzono na przykładzie acylowanych pochodnych fenylpirydylokarbinoli, nie sprzyja różnicowaniu enancjomerów w czasie hydrolizy (47).



ee max. 50% wyd. max. 30%

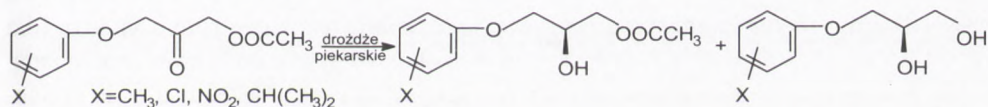
Z wyższą wydajnością enancjomeryczną można otrzymać takie same chiralne fenylpirydylo-metanoły w reakcjach redukcji benzoilpirydyn przeprowadzonych w obecności drożdży (47).

Również reakcje hydrolizy acylolaktonów (46) i diacetylowanych cyklopentadienoli (48) charakteryzują się regio- i stereoselektywnością.

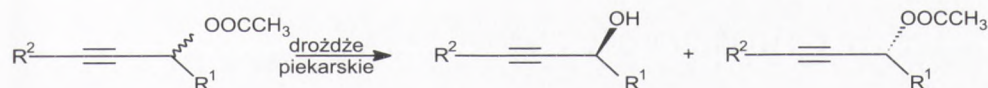


W tym ostatnim przypadku stwierdzono, że jako reakcja uboczna zachodzi w pewnym stopniu redukcja podwójnego wiązania C=C.

Reakcja hydrolizy może również zachodzić równoległe z redukcją grupy karbonylowej jak, np. w 1-acetoksy-3-aryloksypropan-2-onach (49).



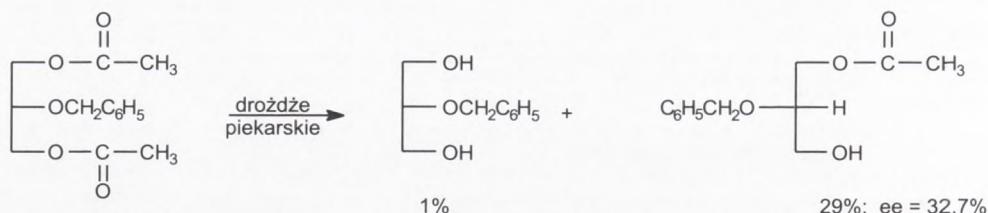
Dokładnie zbadana została reakcja hydrolizy octanów 1-alkin-3-oli (50) ze względu na ich zastosowanie w syntezie m. in. alkaloidów, prostaglandyn, pyretroidów i steroidów.



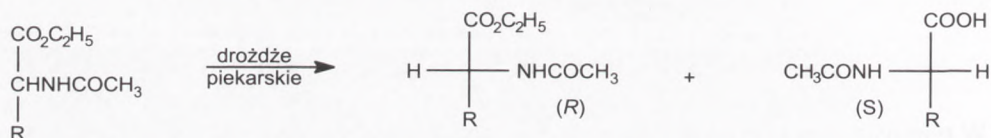
Przebieg reakcji hydrolizy estrów kwasu octowego, katalizowanej przez komórki drożdży, w decydującym stopniu zależy od rodzaju alkoholu, np. o ile w przypadku octanu *dl*-mentylu powstaje preferencyjnie *l*-mentol, to octan izomentylu nie ulega hydrolizie, a z octanu cytronellolu otrzymuje się optycznie nieczynny cytronellol

(6). Istotna jest także budowa cząsteczki kwasu karboksylowego tworzącego ester – drożdże piekarskie katalizują hydrolizę estrów kwasów alifatycznych, ale nie są skuteczne w odniesieniu do benzoesanów (51).

W reakcji hydrolizy acylogliceroli drożdże piekarskie wykazują niewielką enancjoselektywność (52).



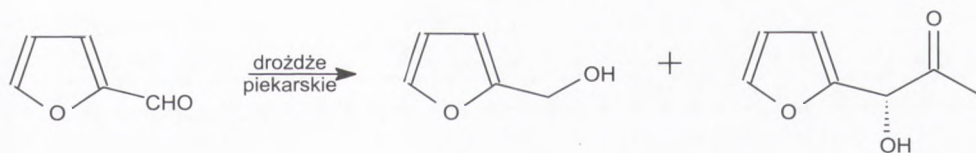
Enancjoselektywne działanie drożdży piekarskich znalazło zastosowanie w syntezie enancjomerycznie czystych aminokwasów (6). Reakcja hydrolizy racemicznych estrów *N*-acetylowanych  $\alpha$ -aminokwasów przebiega selektywnie w grupie estrowej, przy czym ulegają jej tylko pochodne naturalnych (*S*)-aminokwasów; enancjomer (*R*) można odzyskać w postaci *N*-acetyloaminoestru (53).



Dla większości prostych aminokwasów ( $\text{R} = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5, (\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3, \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ) uzyskano nadmiary enancjomeryczne powyżej 90% i nie stwierdzono znacniejszego stopnia hydrolizy wiązania amidowego. Na przebieg reakcji wpływa niekorzystnie rozgałęzienie na atomie węgla sąsiadującym z centrum asymetrii (dla  $\text{R} = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , ee ok. 13%). Hydroliza zachodzi tylko, wtedy gdy podstawnik acetyloaminowy znajduje się w pozycji  $\alpha$  w stosunku do grupy estrowej – jeżeli mamy do czynienia z dwoma różnymi podstawnikami estrowymi (estry kwasu glutaminowego czy asparaginowego) reakcja dotyczy wyłącznie grupy estrowej sąsiadującej z acyloaminową. Zdaniem autorów (53) enzymem uczestniczącym w tych reakcjach jest proteinaza.

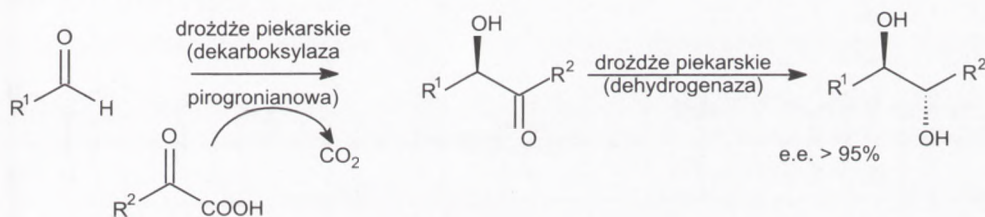
## 5. Tworzenie wiązań pomiędzy atomami węgla

Drożdże piekarskie efektywnie katalizują reakcję kondensacji acyloinowej, cyklizację steroli oraz reakcję Michaela. Kondensację acyloinową zaobserwowano po raz pierwszy na początku XX w., gdy podczas reakcji furfuralu w obecności drożdży piekarskich oprócz oczekiwanego alkoholu furylowego tworzył się także produkt reakcji z aldehydem octowym (1,7).

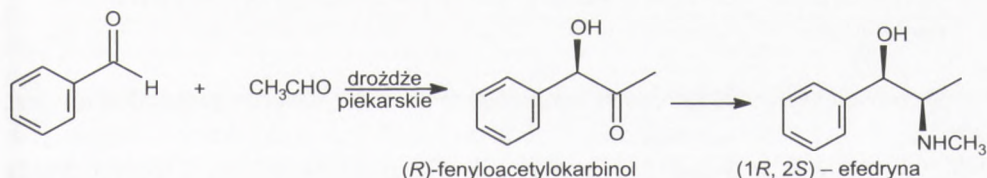


W reakcję mogą wstępować rozmaite aldehydy aromatyczne, również  $\alpha,\beta$ -nienasycone, co pozwala na jej wykorzystanie w syntezie związków heterocyklicznych (dihydro- i tetrahydropirazyne) (54) i naturalnych np. (-)-frontalina (55). Pozytywny wynik reakcji stwierdzono również dla akroleiny, mimo że jest ona znanym inhibitorem procesów enzymatycznych (56). Natomiast w przypadku pochodnych aldehydu krotonowego może również nastąpić przyłączenie wody do wiązania podwójnego (57).

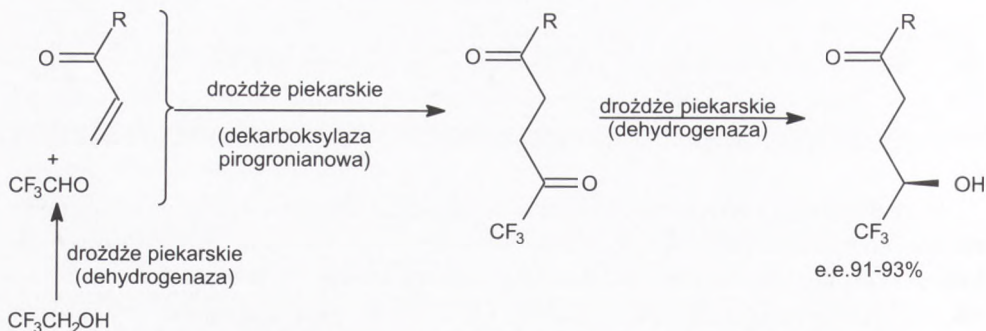
W kondensacji acyloinowej uczestniczy fragment dwuwęglowy, który pochodzi z dekarboksylacji kwasu pirogronowego i jest przenoszony za pomocą dekarboksylazy pirogronianowej (PDC) na stronę Si aldehydu tak, że tworzy się (*R*)- $\alpha$ -hydroksyketon (58). W reakcji bierze również udział koenzym – pirofosforan tiaminy (59). Acyloina powstająca przy udziale dehydrogenazy może być dalej redukowana i końcowym produktem jest wówczas erytrodiol o czystości optycznej powyżej 90%. Taką sekwencję reakcji wykorzystano praktycznie w syntezie  $\alpha$ -tokoferolu (60). Reakcja kondensacji w połączeniu z dalszą redukcją daje wydajności rzędu 35%.



Powstające w tej reakcji  $\alpha$ -hydroksyketony (acyloiny) są ważnymi półproduktami w syntezie, np. chiralnym prekursorem efedryny jest (*R*)-fenyloacetylokarbinol (7):



Reakcja Michaela stanowi wariant kondensacji acyloinowej – stwierdzono, że ulegają jej winyloketony w obecności trifluoroetanolu (61). Pierwszym etapem reakcji jest utlenianie trifluoroetanolu do aldehydu, który prawdopodobnie tworzy addukt z pirofosforanem tiaminy (1); następnie ma miejsce addycja do wiązania  $C=C$ , w wyniku czego powstaje trifluorometyloketon, który z kolei przy współudziale dehydrogenazy ulega redukcji do trifluoroetylokarbinolu.



W reakcji tej sam substrat może również ulegać redukcji tworząc odpowiedni alkohol allilowy  $RCH(OH)CH=CH_2$ , lub alkohol nasycony  $RCH(OH)CH_2CH_3$ .

Z powstawaniem wiązania węgiel-węgiel mamy do czynienia w reakcji cyklizacji epoksydowanego skwalenu, z którego pod działaniem drożdży (aktywny enzym cykloaza sterolowa) może powstać lanosterol (62,63).

Oprócz reakcji tworzenia wiązań węgiel-węgiel drożdże mogą katalizować ich rozpad, np. dekarboksylację podstawionych w pierścieniu aromatycznym pochodnych kwasu (*E*) – cynamonowego. Reakcja ta zachodzi z retencją konfiguracji wiązania podwójnego, przy czym niezbędna jest obecność co najmniej jednego podstawnika w pierścieniu aromatycznym (64).

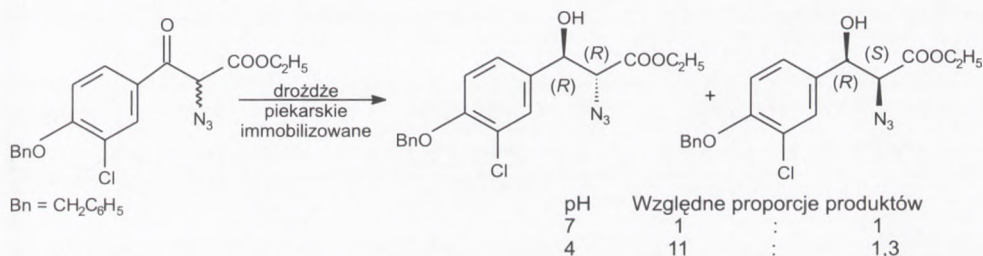


## 6. Optymalizacja warunków reakcji katalizowanych przez drożdże piekarskie

Stereoselektywność przemian katalizowanych przez drożdże piekarskie nie jest z reguły całkowita. Może to wynikać z braku specyficzności aktywnego enzymu, jednak zazwyczaj w reakcjach uczestniczy kilka różnych enzymów, z których każdy charakteryzuje się inną selektywnością (13-15). Obniżenie wydajności enancjometrycznej wynika wówczas ze współzawodniczenia enzymów o przeciwnych selektywnościach (13). Optymalizacja warunków reakcji sprowadza się zatem m.in. do znalezienia reagentów, które zahamują lub zintensyfikują działanie poszczególnych enzymów. Ponieważ reakcje z udziałem drożdży przeprowadza się zazwyczaj w warunkach fermentacyjnych w środowisku wodnym, można to osiągnąć poprzez zmianę temperatury reakcji, stężeń substratów, rodzaju i stężenia składników pożywki

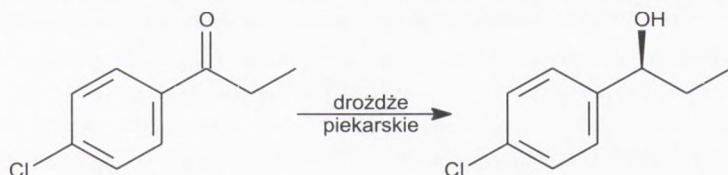
(najczęściej glukoza lub sacharoza) dla drożdży, pH środowiska reakcji, dodatku rozpuszczalników organicznych i różnych związków chemicznych. Przebieg reakcji zależy ponadto w sposób oczywisty od budowy substratu (np. wydajność enancjomeryczna 4-chloro-3-hydroksybutanianu etylu powstającego w wyniku redukcji odpowiedniego  $\beta$ -ketoestru zależy w decydującym stopniu od rodzaju podstawnika w grupie estrowej (17)), a także od postaci, w jakiej drożdże (prasowane, suszone, liofilizowane czy immobilizowane) zostały użyte do reakcji. Wpływ warunków reakcji na wydajność enancjomeryczną był najczęściej badany na przykładzie reakcji redukcji ketonów lub  $\beta$ -ketoestrów. Często w jednej pracy omawiane są wpływy kilku z wymienionych czynników, jak np. dla cytowanej już reakcji redukcji 1-acetoksy-3-fenoksypropan-2-onu do (*S*)-1-acetoksy-3-fenoksypropan-2-olu (49). Najlepsze rezultaty (największy nadmiar enancjomeryczny) zaobserwowano przy zastosowaniu drożdży prasowanych w środowisku buforu fosforanowego, jak również z dodatkiem alkoholu allilowego lub  $MgSO_4$ .

pH środowiska reakcji odgrywa istotną rolę także w przebiegu redukcji  $\alpha$ -azydo- $\beta$ -ketoestru przez drożdże immobilizowane w alginianie (32). Przy pH = 4 reakcja redukcji grupy karbonylowej biegnie z wysoką enancjoselektywnością (>99%) i diastereoselektywnością (79%) – w przewodzie powstaje produkt o konfiguracji 2(*R*),3(*R*). W pH = 7 enancjoselektywność jest zachowana, natomiast diastereoselektywność gwałtownie się zmniejsza



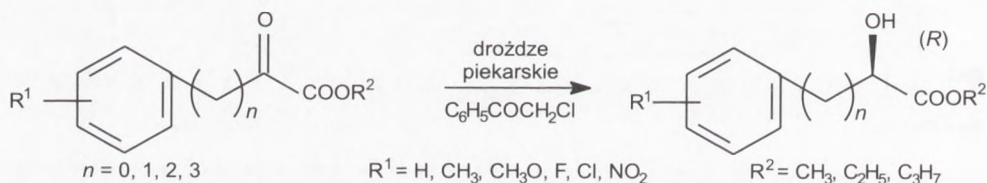
Dodatek chlorku magnezu przy pH = 4 powoduje utratę diastereoselektywności. Przebieg reakcji autorzy (32) wyjaśniają decydującym wpływem enolizacji substratu przy niższym pH. Natomiast w obecności  $MgCl_2$  powstaje kompleks pomiędzy dwiema grupami karbonylowymi i jonami  $Mg^{2+}$ , czego następstwem jest zahamowanie enolizacji i utrata diastereoselektywności.

Zmiana stężenia substratu oraz stężenia glukozy ma również wpływ na przebieg redukcji katalizowanej drożdżami. Przykładem mogą być badania redukcji chloroprofionów (65) do chlorofenylopropanolu (hamuje rozwój grzybów patogennych),



w których stwierdzono, że ze wzrostem stężenia substratu zwiększa się w pewnym stopniu wydajność enancjomeryczna stereoisomeru (*S*), co wynika z różnego wpływu stężenia na kinetykę reakcji katalizowanych przez poszczególne enzymy; jednak równocześnie stopień przereagowania substratu ulega zmniejszeniu. Natomiast zwiększenie stężenia glukozy, w tym samym przypadku, dawało wzrost stopnia przereagowania substratu, aczkolwiek zaobserwowano spadek enancjoselektywności przemiany. Istotny wzrost enancjoselektywności redukcji chloropropiofenonów spowodował dopiero dodatek alkoholu allilowego – wybiórczego inhibitora niektórych enzymów. Również w reakcji redukcji 3-oksopentanianu metylu dodatek alkoholu allilowego zwiększał nadmiar enancjomeryczny produktu (*R*) z 59 do 96% przy niezmienionej wydajności sumarycznej (14,66). Natomiast produkt składający się w znakomitej większości z enancjomeru (*S*) (80-90%) można w tej samej reakcji otrzymać w obecności  $MgCl_2$  stosując drożdże immobilizowane w alginianie. Użycie prasowanych drożdży i chlorku potasu lub chlorku sodu dawało niższe wydajności zarówno enancjomeryczne jak i chemiczne. W obecności bromku potasu tworzył się enancjomer (*R*) (67), a dodatek chlorooctanu etylu sprzyjał powstawaniu enancjomeru (*S*) (68).

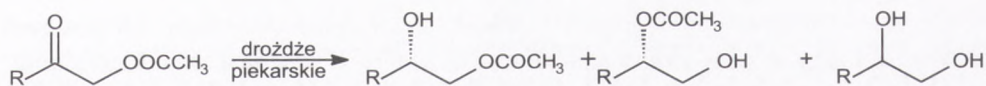
Innym związkiem pozwalającym na kontrolę stereochemii reakcji jest chlorek fenacylu. W jego obecności, w przypadku  $\alpha$ -oksoestrów, powstają stereoisomery  $\alpha$ -hydroksyestrów o konfiguracji (*R*). Ponieważ jednocześnie zmniejsza się szybkość redukcji, autorzy sugerują, że dodatek chlorku fenacylu powoduje inhibicję enzymów odpowiedzialnych za powstanie enancjomeru (*S*) (69).



Zaobserwowano również istotny wpływ czasu inkubacji drożdży piekarskich wraz z chlorkiem fenacylu przed dodaniem substratu. Najlepsze wyniki w większości przypadków otrzymano, gdy czas inkubacji wynosił 6 h. Pozytywny wpływ wstępnej inkubacji drożdży w podwyższonej temperaturze (40-50°C) na przebieg reakcji redukcji prawdopodobnie był związany z częściową denaturacją określonych enzymów i dlatego w redukcji 4-chloro-3-oksobutanianu etylu przeprowadzonej w tych warunkach można otrzymać hydroksyester o konfiguracji (*R*) (70), w przeciwieństwie do cytowanej uprzednio syntezy enancjomeru (*S*) (12).

Znaczny wzrost enancjoselektywności w reakcji redukcji acetylowanych  $\alpha$ -hydroksyketonów osiągnięto dodając związki, w skład których wchodzi siarka, takie jak L-cysteina, sulfid dimetylowy czy sulfid fenyłowowinylowy. Równolegle zwiększyła się szybkość redukcji, a migracja oraz hydroliza grupy acetylowej zostały w dużym stopniu zahamowane (71).





R=C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>			wydajność (ee)	
1b	–	64 (90)	: 33 (>99)	: 3
1b	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S	68 (87)	; 29 (>99)	; 3
1b	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> SCH=CH <sub>2</sub>	63 (94)	: 34 (>99)	: 3
1b	L-cysteina	75 (98)	: 25 (>99)	: –

Wzrost enancjoselektywności redukcji w obecności związków siarki zaobserwowano również dla  $\beta$ -ketoestrów. Autorzy (72) sugerują, że w badanych przez nich reakcjach wpływ związków siarki nie może polegać na inhibicji nieselektywnych reduktaz, ponieważ wzrasta sumaryczna szybkość reakcji. Związki, w skład których wchodzi grupa sulfhydrylowa (takie jak cysteina) mogą natomiast uczestniczyć w regeneracji NADPH w procesie redukcji lub zmieniać reaktywność grupy karbonylowej substratu, przekształcając ją w hemioacetal.

Również dodatek  $\beta$ -cyklodekstryny wpływał korzystnie na enancjoselektywność reakcji redukcji katalizowanej przez drożdże (73). Autorzy przypuszczają, że cyklodekstryny oddziałując z substratem zmniejszają jego stężenie i w ten sposób wpływają na przebieg reakcji. Zmiana warunków przygotowania biokatalizatora przez immobilizację drożdży, np. w alginianie ułatwia przeróbkę mieszaniny poreakcyjnej i z reguły zwiększa enancjoselektywność redukcji, np. z 85 do 98% dla 3-oksobutanianu etylu (74). W przypadku użycia drożdży immobilizowanych wydajność reakcji zależy w znacznej mierze od rodzaju polimerowej matrycy, w której je unieruchomiono (18). W reakcji redukcji  $\alpha$ -diketonu otrzymano lepsze wyniki stosując drożdże mikrokapsułkowane w matrycy poliamidowej niż immobilizowane w alginianie (75). Ciekawym sposobem zwiększenia enancjoselektywności redukcji ketonów jest zastosowanie żywicy absorbującej, która działa najprawdopodobniej przez obniżenie stężenia substratu w mieszaninie reakcyjnej: badając redukcję 3-oksobutanianu etylu stwierdzono, że przy stężeniu substratu równym 3 g/dm<sup>3</sup> nadmiar enancjomeryczny (S)-hydroksyestru wynosił 82%, a przy stężeniu 6 g/dm<sup>3</sup> zmniejszał się do 70% (76). Dodatek żywicy (Amberlite XAD1180) do mieszaniny o stężeniu substratu 6 g/dm<sup>3</sup> powodował spadek stężenia substratu do 3,8 g/dm<sup>3</sup> przy jednoczesnym wzroście nadmiaru enancjomerycznego do 94%.

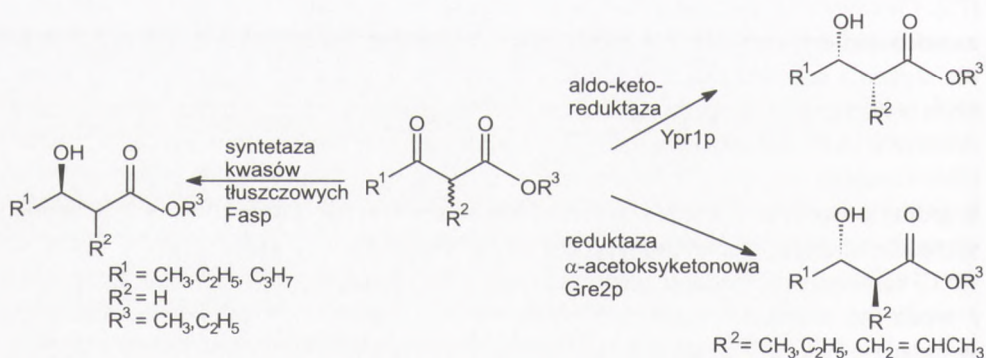
Ci sami autorzy badając wpływ układu dwufazowego rozpuszczalnik organiczny / woda na redukcję 3-oksobutanianu etylu zauważyli, że reakcja prowadzona w układzie heksan / woda w stosunku 2:1 daje najlepsze rezultaty (ee 94,8%). Przeprowadzając tę reakcję w eterze naftowym i dobierając odpowiedni podstawnik w grupie estrowej można osiągnąć ee rzędu 99% (dla 2-oksobutanianu butylu) (77). Obecność rozpuszczalnika organicznego nie tylko wpływa na wydajność enancjomeryczną, lecz także może zmienić stereochemiczny przebieg reakcji co zaobserwowano na przykładzie  $\alpha$ -oksoestrów (78): podczas redukcji przeprowadzonej

w benzenie tworzył się głównie enancjomer (*S*) natomiast w roztworach wodnych powstawał przede wszystkim enancjomer (*R*). Obecność rozpuszczalnika organicznego ułatwia dodatkowo wydzielenie produktów reakcji. Procedurę taką zastosowano w redukcji *N*-(2-oksopropoksy)ftalimidu: reakcję prowadzono w obecności suchonych drożdży w eterze *tert*-butylowo-metylowym, przy czym dodatek niewielkiej ilości wody (4-5%) wpływał korzystnie na jej szybkość (79).

Jako rozpuszczalnik do reakcji redukcji ketonów katalizowanych przez drożdże została także użyta ciecz jonowa (heksafluorofosforan 1-butylo-3-metyloimidazolio-*wy*) (80), jednak uzyskane wydajności były porównywalne lub tylko nieco lepsze od osiągniętych w konwencjonalnych układach.

Połączony wpływ dodatku rozpuszczalnika organicznego, inhibitora i wstępnej obróbki termicznej drożdży został zastosowany w reakcjach  $\alpha$ -ketoestrów i  $\beta$ -diketonów (78,81). Mechanizm działania rozpuszczalnika organicznego sprowadza się najczęściej do lepszego zdypergowania ketonu w fazie wodnej, czego wynikiem jest zwiększenie stężenia substratu, ale niewykluczone, że pewne rozpuszczalniki mogą również działać jako inhibitory, powodując denaturację określonych enzymów (82).

Ostatnio coraz częściej do redukcji związków karbonylowych używa się drożdży modyfikowanych genetycznie, które zazwyczaj pozbawione są genu konkretnej reduktazy. W ten sposób jeden z enzymów nie bierze udziału w reakcji, co zwiększa jej stereoselektywność. Uzyskuje się również szczepy drożdży wytwarzające w nadmiarze pożądany enzym. Rodriguez, Kayser i Stewart (83) otrzymali szczepy drożdży różniące się stopniem ekspresji trzech enzymów odgrywających ważne role w reakcjach redukcji, a mianowicie: syntetazy kwasów tłuszczowych, aldo-keto reduktazy i reduktazy  $\alpha$ -acetoksyketonowej. O ile redukcja  $\beta$ -ketoestrów w obecności czystych enzymów prowadzi do różnych stereoizomerów:



to w obecności drożdży zmodyfikowanych genetycznie rezultaty redukcji  $\beta$ -ketoestrów różniły się, w zależności od struktury substratu. W większości sytuacji zaobserwowano wzrost stereoselektywności reakcji; w przypadku redukcji katalizowanej szczepem z wyeliminowaną syntetazą kwasów tłuszczowych otrzymano izomery

o konfiguracji (3S) z wysokim nadmiarem enancjomerycznym. Z kolei reakcje redukcji katalizowane przez szczepy pozbawione aldo-ketoreduktazy oraz reduktazy  $\alpha$ -acetoksyketonowej nie przyniosły widocznych zmian w stereoselektywności przemiany. Dobre wyniki uzyskano dla reakcji z udziałem drożdży wytwarzających w nadmiarze aldo-ketoreduktazę (powstawał głównie produkt *syn*) i reduktazę  $\alpha$ -acetoksyketonową (powstawał tylko produkt *anti*).

Innym przykładem wykorzystania modyfikacji genetycznych drożdży może być omówione już wcześniej zastosowanie zmodyfikowanego szczepu wytwarzającego monoooksygenazę cykloheksanonową w reakcji Baeyera-Villigera (42-44).

W drożdżach piekarskich dokonano także ekspresji  $\beta$ -(1-4)-galaktozylotransferazy I, która ułatwiła przeprowadzenie glikozylacji związków naturalnych (84), a także lipazy CaLIP4 (z *Candida albicans*) aktywnej w stosunku do triglicerydów (85).

## 7. Uwagi końcowe

Biotransformacje z udziałem drożdży piekarskich stosowane są coraz szerzej na skalę przemysłową, z uwagi na ich konkurencyjność w stosunku do metod chemicznych pod względem ekonomicznym, a ponadto spełniają one wszelkie wymagania ekologiczne. Procesy z ich zastosowaniem stanowią klasyczny przykład tzw. „zielonej chemii”, ponieważ wykorzystuje się w nich surowce odnawialne (drożdże oraz glukozę lub sacharozę jako źródła węgla), zachodzą w środowisku wodnym i w temperaturze pokojowej oraz nie wytwarzają toksycznych odpadów. Ujemną stroną biotransformacji z udziałem drożdży jest, z technologicznego punktu widzenia, dość długi czas reakcji i konieczność wydzielania (najczęściej żmudnego) produktów z dużej objętości mieszaniny reakcyjnej. Ten ostatni problem można rozwiązać poprzez immobilizację drożdży.

Jednym ze związków otrzymywanych na dużą skalę metodą biotransformacji jest (*S*)-2-hydroksybutanian etylu – chiralny prekursor stosowany w przemyśle farmaceutycznym. Proces biokatalityczny jest przyjazny dla środowiska (redukcja katalizowana chemicznie wymaga zastosowania toksycznych kompleksów metali przejściowych np. Ru-BINAP) i mniej kosztochłonny (86). Również biotechnologiczna metoda otrzymywania (2*S*,5*S*)-heksanodiolu (chiralny prekursor pięcioczłonowych heterocykli) w wyniku redukcji odpowiedniego związku dikarbonyłowego przez drożdże piekarskie jest najlepszym wariantem produkcji tego związku z prawie 100% wydajnością (86). Na skalę przemysłową zastosowano też drożdże piekarskie w selektywnej reakcji redukcji jednej z trzech grup karbonyłowych w wieloetapowej syntezie trimegestonu (progesteronomimetyk) (87).

Przytoczone przykłady dobrze dokumentują użyteczność drożdży jako katalizatorów w syntezie chemicznej. Obecny rozwój biotechnologii, a w szczególności metod inżynierii genetycznej, stwarza dobre perspektywy dla rozszerzenia zarówno zakresu jak i wydajności enancjomerycznych reakcji katalizowanych przez drożdże.

## Literatura

1. Faber K., (2000), *Biotransformations in organic chemistry*, Springer Verlag, Berlin.
2. Leuenberger H. G. W., (1990), *Pure and Appl. Chem.*, 62, 753-768.
3. Davis B. G., Bayer V., (2001), *Nat. Prod. Rep.*, 18, 618-640.
4. Niemiec A., Szeja W., (2001), *Biotechnologia*, 3, 104-122.
5. Roberts S. M., (1998), *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 157-169; (1999), *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1-21, (2000), *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 611-633.
6. Csuk R., Glanzer B. I., (1991), *Chem. Rev.*, 49-97.
7. Servi S., (1990), *Synthesis*, 1-25.
8. Walker G. M., (1998), *Yeast-physiology and biotechnology*, J. Wiley, New York.
9. Nakamura K., Yamanaka R., Matsuda T., Harada T., (2003), *Tetrahedron Asym.*, 14, 2659-2681.
10. Eichberger G., Faber K., (1985), *Monatsh. Chem.*, 116, 1233-1237.
11. Fujisawa T., Onogawa Y., Sato A., Mitsuya T., Shimizu N., (1998), *Tetrahedron*, 54, 4267-4276.
12. Seebach D., Sutter M. A., Weber R. H., Zuger M. F., (1984), *Org. Synth.*, 63, 1-9.
13. Nakamura K., Kawai Y., Nakajima N., Ohno A., (1991), *J. Org. Chem.*, 56, 4778-4783.
14. Nakamura K., Inoue K., Ushio K., Oka S., Ohno A., (1987), *Chem. Lett.*, 16, 679-682.
15. Furuichi A., Akita H., Matsukura H., Oishi T., Horikoshi K., (1985), *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2563-2570.
16. Shieh W. R., Gopalan A. S., Sih C. J., (1985), *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 2993-2994.
17. Sih C. J., Chen C. S., (1984), *Angew. Chem.*, 96, 556-565 (*Int. Ed.* 38, 570-578).
18. Nakamura K., Higaki M., Ushio K., Oka S., Ohno A., (1985), *Tetrahedron Lett.*, 26, 4213-4216.
19. Nowacki J., Szychowski J., Czarnocki Z., (2002), *Heterocycles*, 57, 705-714.
20. Hirama M., Noda T., Ito S., (1985), *J. Org. Chem.*, 50, 127-129.
21. Sato T., Tsurumaki M., Fujisawa T., (1986), *Chem. Lett.*, 1367-1379.
22. Dao D. H., Okamura M., Akasaka T., Kawai Y., Hida K., Ohno A., (1998), *Tetrahedron Asym.*, 9, 2725-2737.
23. Kayser M. M., Mihovilovic M. D., Kearns J., Stewart J. D., (1999), *J. Org. Chem.*, 64, 6603-6608.
24. Mahmoodi N. O., Mohammadi H. G., (2003), *Monatsh. Chemie*, 134, 1283-1288.
25. Iwamoto M., Kawada H., Tanaka T., Nakada M., (2003), *Tetrahedron Lett.*, 44, 7239-7243.
26. Fuhshuku K., Tomita M., Sugai T., (2004), *Tetrahedron Lett.*, 45, 1763-1767.
27. Watanabe H., Iwamoto M., Nakada M., (2005), *J. Org. Chem.*, 70, 4652-4658.
28. Zhang J., Duan W., Cai J., (2004), *Tetrahedron*, 60, 1665-1669.
29. Chimni S. S., Singh R. J., (1998), *World J. Microb. Biot.*, 14, 247-250.
30. Eichberger G., Faber K., Griengl H., (1985), *Monatsh. Chem.*, 116, 1233.
31. Baruah M., Boruah A., Prajapati A., Sandhu J. S., (1996), *Synlett.*, 1193-1194.
32. Fadnavis N. W., Vadivel S. K., Bhalarao U. T., (1997), *Tetrahedron Asym.*, 8(24), 4003-4006.
33. Nakamura K., Inoue Y., Shibahara J., Oka S., Ohno A., (1988), *Tetrahedron Lett.*, 29, 4769-4770.
34. Chang Ch.-Y., Yang T.-K., (2003), *Tetrahedron Asym.*, 14, 2239-2245.
35. Ferraboschi P., Santaniello E., (1994), *Tetrahedron Asym.*, 5, 19-20.
36. Ferraboschi P., Elahi S. R., Verza E., Rivoita R. M., Santaniello E., (1996), *Synlett*, 1176-1178.
37. Kawai Y., Saitou K., Hida K., Dao D. H., Ohno A., (1996), *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 69, 2633-2638.
38. Fardelone L. C., Augusto J., Rodrigues R., Moran P. J. S., (2004), *J. Mol. Cat. B*, 29, 41-45.
39. Koul S., Singh B., Taneja S. C., Qazi G. N., (2003), *Tetrahedron*, 59, 3487-3491.
40. Gil G., Ferre E., Barre M., le Petit J., (1988), *Tetrahedron Lett.*, 29, 3797-3798.
41. Kometani T., Morita Y., Yoshii H., Kiyama Y., Matsuno R., (1995), *J. Ferm. and Bioeng.*, 80, 180-184.
42. Kayser M. M., Chen G., Stewart J. D., (1999), *Synlett.*, 1, 153-158.
43. Stewart J. D. W., Reed K., Kayser M. M., (1996), *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1, 755-757.
44. Stewart J. D., Reed K. W., Martinez C. A., Zhu J., Chen G., Kayser M. M., (1998), *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 3541-3548.
45. Sih C. J., Salomon R. G., Price P., Sood R., Peruzzotti G., (1975), *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 857-865.
46. Glanzer B. I., Faber K., Griengl H., (1988), *Enzyme Mikrob. Technol.*, 10, 689.
47. Takemoto M., Achiwa K., (1994), *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 802-805.

48. Tanaka T., Kurozumi S., Toru T., Miura S., Kobayashi M., Ishimoto S., (1976), *Tetrahedron*, 32, 1713-1718.
49. Egri G., Kolbert A., Balliut J., Fogassy E., Novak L., Poppe L., (1998), *Tetrahedron Assym.*, 9, 271-283.
50. Glanzer B. I., Faber K., Griengl H., (1987), *Tetrahedron*, 43, 5791-5796.
51. Białęcka-Florjańczyk E., Majewska E., dane nie publikowane.
52. Suemune H., Mizuhara Y., Akita H., Sakai K., (1986), *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 3440-3444.
53. Glanzer B. I., Faber K., Griengl H., (1986), *Tetrahedron Letters*, 27, 4293-4294; (1987), *Tetrahedron*, 43, 771-778.
54. Kurniadi T., Bel Rhlid R., Fay L-B., Jullerat M-A., Berger A. G., (2003), *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3103-3107.
55. Fuganti C., Grasselli P., Servi S., (1983), *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 241-244.
56. Kurniadi T. H., Rhlid R. B., Juillerat M. A., Schuler M., Berger R. G., (2003), *Tetrahedron Asymm.*, 14, 363-366.
57. Fronza G., Fuganti C., Grasselli P., Poli G., Servi S., (1988), *J. Org. Chem.*, 53, 6153-6154.
58. Crout D. H. G., Dalton H., Hutchinson D. W., Miyagoshi M., (1991), *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1329-1334.
59. Sprenger G. A., Pohl M., (1999), *J. Mol. Cat. B.*, 6, 145-152.
60. Fuganti C., Graselli P., (1982), *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 205-206.
61. Kitazume T., Ishikawa N., (1984), *Chem. Letters*, 1815-1818.
62. Bujons J., Guajardo R., Kyler K. S., (1988), *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 604-606.
63. Medina J. C., Guajardo R., Kyler K. S., (1989), *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 2310-2311.
64. Manitto P., Gramatica P., Ranzi B. M., (1975), *Chem. Comm.*, 442-443.
65. Bustillo A. J., Aleu J., Hernandez-Galan R., Collado I. G., (2002), *Tetrahedron Asymm.*, 13, 1681-1686.
66. Nakamura K., Inoue K., Ushio K., Oka S., Ohno A., (1988), *J. Org. Chem.*, 53, 2589-2593.
67. Nakamura K., Kawai Y., Oka S., Ohno A., (1989), *Tetrahedron Lett.*, 30, 2245-2246.
68. Nakamura K., Kawai Y., Ohno A., (1990), *Tetraherdon Lett.*, 31, 267-270.
69. Dao D. H., Okamura M., Akasaka T., Kawai Y., (1998), *Tetrahedron Assym.*, 9, 2725-2737.
70. Dahl, C., Fjeldberg M. J., Madsen Ø., (1999), *Tetrahedron Asymm.*, 10, 551-559.
71. Hayakawa R., Shimizu M., Fujisawa T., (1997), *Tetrahedron Assym.*, 8(19), 3201-3204.
72. Hayakawa R., Shimizu M., Fujisawa T., (1998), *Tetrahedron Lett.*, 39, 67-70.
73. Nakamura K., Kondo S-i., Kawai Y., Ohno A., (1993), *Tetrahedron Asymm.*, 4, 1253-1254.
74. Sakai T., Nakamura T., Fukuda K., Amano E., Utaka M., Takeda A., (1986), *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 59, 3185-3188.
75. Green K. D., Gill I. S., Khan J. A., Vulfson E. N., (1996), *Biotech. Bioeng.*, 49, 535-543.
76. D'Arrigo P., Fantoni G. P., Servi S., Strini A., (1997), *Tetrahedron Asymm.*, 8, 2375-2379.
77. Medson C., Smallridge A. J., Trehwella M. A., (1997), *Tetrahedron Asymm.*, 8, 1049-1054.
78. Nakamura K., Kondo S., Nakajama N., Ohno A., (1995), *Tetrahedron*, 51, 687-694.
79. Buchalska E., Madura I., Okrasa K., Plenkiewicz J., Zachara J., (2000), *Tetrahedron Asymm.*, 11, 1781-1788.
80. Howarth J., James P., Dai J., (2000), *Tetrahedron Lett.*, 42, 7517-7519.
81. Cui J-N., Teraoma R., Ema T., Sakai T., Utaka M., (1997), *Tetrahedron Lett.*, 38, 3021-3024.
82. Cui J-N., Ema T., Sakai T., Utaka M., (1998), *Tetrahedron Asymm.*, 9, 2681-2692.
83. Rodriguez S., Kayser M. M., Stewart J. D., (2001), *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 1547-1555.
84. Wohlgemuth R., (2005), *Chimia*, 59, 735-740.
85. Roustan J. L., Rascon Chu A., Moulin G., Bigey F., (2005), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68, 203-212.
86. Bertau M., Bürlil M., (2000), *Chimia*, 54, 503-507.
87. Crocq V., Mason C., Winter J., Richard C., Lemaitre G., Lenay J., Vivat M., Buendia J., Prat D., (1997), *Org. Proc. Res. Dev.*, 1, 2-13.