

BIOTECHNOLÓGIE BAEYEROVÝCH-VILLIGEROVÝCH OXIDÁCIÍ

ANDREA SCHENKMAYEROVÁ, MAREK BUČKO a PETER GEMEINER

Slovenská akadémia vied, Chemický ústav, Oddelenie glykobiotechnológie, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava
andrea.schenk Mayerova@savba.sk,
marek.bucko@savba.sk, peter.gemeiner@savba.sk

Došlo 25.8.11, prepracované 16.11.11, prijaté 4.1.12.

Kľúčové slová: biooxidácie, imobilizácie, Baeyerove-Villigerove monoxygenázy

Obsah

1. Úvod
2. Mechanizmus BVMO
3. Syntetické aplikácie
4. Enzymová selektivita
5. Problémy BV oxidácií a „scale-up“ procesu
6. Výber biokatalyzátora
 - 6.1. Izolované enzýmy
 - 6.2. Celobunkové systémy
 - 6.3. Rekombinantné bunky

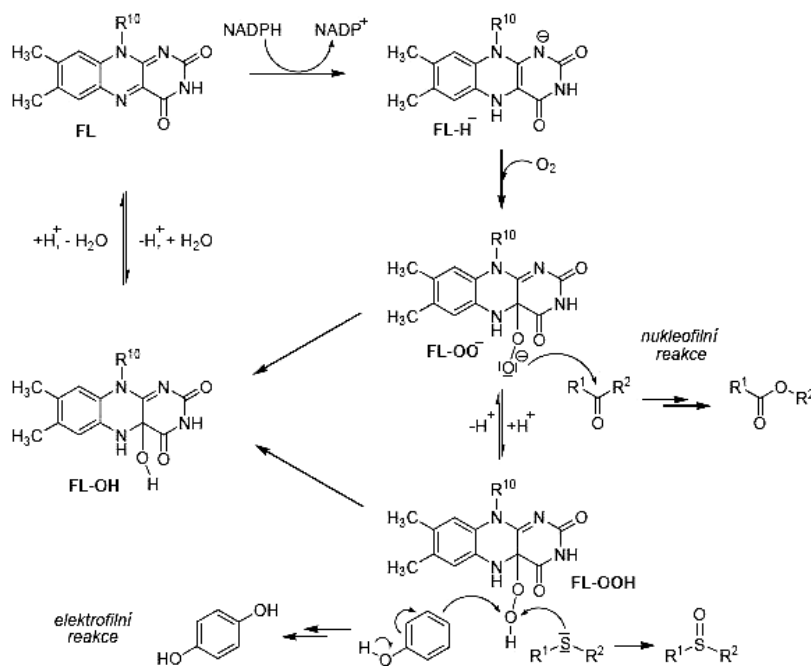
7. Imobilizácia

7.1. Imobilizácia a Baeyerove-Villigerove oxidácie

8. Záver

1. Úvod

Baeyerove-Villigerove (BV) oxidácie predstavujú silnú metodiku organickej syntézy na vloženie kyslíka medzi dva atómy uhlíka spojené väzbou. Typickými reagentmi sú peroxy kyseliny či peroxid vodíka. Od objavu reakcie A. Baeyerom a V. Villigerom v roku 1899 (cit.¹) sa dosiahol pokrok v pochopení mechanizmu aj pri predpovedaní migračných preferencií. BV oxidácia cyklických ketónov umožňuje syntézu asymetrických laktónov, cenných medziproduktov v organickej syntéze. Aj keď prístupy s využitím organokovových činidiel², či environmentálne prijateľná oxidácia v kvapalnej fáze použitím chemicky modifikovaného silikagélú³ sa zlepšujú, efektívna príprava tejto triedy zlúčenín sa stáva doménou biokatalytických metód. Bioekvivalentom chemických katalyzátorov sú enzýmy monoxygenázy (MO). Patria do podtriedy rodiny oxygenáz. MO sú schopné vložiť jeden atóm molekulárneho kyslíka do organického substrátu. Druhý atóm je redukovaný za tvorby vody. MO urýchľujú hydroxylácie alifatických a aromatických alkoholov, epoxidácie alkenov, heteroatómové oxidácie, ako aj BV transformácie. Baeye-



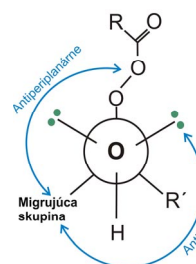
Obr. 1. Vznik a pôsobenie flavín-4a-hydroperoxidu vo flavoenzýmoch¹²

rove-Villigerove monoxygenázy (BVMO) hrajú dôležitú úlohu v metabolických dráhach. Katalyzujú krok v degradácii acetónu⁴, cyklických alifatických ketónov⁵, lineárnych ketónov⁶. Podieľajú sa na konverziách steroidov⁷, biosyntéze seskviterpenoidov⁸, aflatoxínov⁹. Našli sa aj MO schopné oxidovať širokú škálu syntetických substrátov. Niektoré z týchto enzýmov sú enantiokomplementárne¹⁰. S rozvojom génového inžinierstva sa otvorila cesta pre konštrukciu geneticky modifikovaných mikroorganizmov s nadexpresiou génov kódujúcich potrebné enzýmy.

2. Mechanizmus BVMO

Všeobecne prijímaný mechanizmus enzymatickej BV oxidácie sa opiera o výsledky získané pre cyklohexanónmonoxygenázu (CHMO), izolovanú z *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871 (cit.¹¹). Enzým má FAD ako prostetickú skupinu. Jeho substrátmi sú NADPH a kyslík. Biokatalytický proces je spúšťaný redukciou flavínadenindinukleotidu FAD (obr. 1). Nasleduje oxidácia kyslíka za vzniku flavínperoxidového aniónu. Ten je oxidačným nukleofilným činidlom v BV reakcii. Útočí na karbonylovú skupinu substrátu, vzniká tetraédrický Criegeeho intermediát¹². Preskupením vzniká laktón a 4a-hydroxyflavín. Katalytický cyklus je uzavretý odstránením vody za tvorby FAD, uvoľnením produktu a kofaktora. Bolo dokázané, že pre migráciu alkylu a odstránenie karboxylovej kyseliny: *i*) migrujúca CC väzba musí byť v antiperiplánarnej pozícii voči peroxy väzbe a *ii*) uvoľnenie elektrónu z atómu kyslíka na pôvodne pripojený migrujúci subjekt má zásadný význam pre zmenu alkylu a vyžaduje voľný pár v anti-polohe na atóme kyslíka¹³ (obr. 2). Izotopovo značené substráty potvrdili, že fragmentácia tetraédrického intermediátu pri oxidáciách katalyzovaných BVMO prebieha so zachovanou konfiguráciou na migrujúcom centre, podobne ako pri chemickej oxidácii¹⁴. Z tohto dôvodu je možné, aby CHMO katalyzovali regio- a enantioselektívne oxidácie tým, že povolia len jednu CC väzbu v antiperiplánarnej usporiadaní k OO väzbe v Criegeeho intermediáte. Vzhľadom k tomu, že FAD je pevne viazaný na enzým, interakcie substrátu s aminokyselinami v aktívnom mieste ovplyvňujú toto usporiadanie a výber migračnej skupiny.

Tento mechanizmus slúži ako vzor pre ostatné BVMO; NADH ako aj NADPH sa vyskytujú ako kofaktory pre MO a prostetická skupina FAD môže byť nahradená flavínmononukleotidom FMN¹⁰. Na základe kryštálovej štruktúry fenylacetónmonoxygenázy (PAMO) sa zistilo, že aktívne miesto obsahuje konzervovaný arginín (R337). Ten bol navrhnutý ako stabilizačný agens peroxyflavínu¹⁵. Zistenie BVMO štruktúr prinieslo svetlo v mnohých otázkach fungovania týchto enzýmov, ale detaily jednotlivých katalytických krokov ostávajú neobjasnené: Ako BVMO stabilizujú peroxyflavínový medziprodukt? Aké konformačné zmeny nastávajú v enzýme počas celého katalytického cyklu?



Obr. 2. Stereoelektrónové nároky pre migráciu¹¹

3. Syntetické aplikácie

Vysoká selektivita, minimálny negatívny efekt na životné prostredie a fakt, že *E. coli*/BVMO môžu byť ľahko nakultivované, ich činí hodnotnými nástrojmi v rukách chemikov. S počtom BVMO nadexpresných systémov rastie škála enantiočistých laktónov a esterov pripravených cestami biotransformácie. Mnoho laktónov je kľúčových v syntéze bioaktívnych látok, a preto sú vysoko žiadanými chemikáliami¹⁶.

Bicyklické laktóny sú dôležité v syntéze prostaglandínov¹⁷ zodpovedných za kontrakciu a relaxáciu hladkého svalstva, sťahy a dilatáciu ciev, kontrolu krvného tlaku, moduláciu zápalových reakcií. Používajú sa aj pri príprave cyklosarkomycínu s protinádorovými účinkami¹⁸. Dnes sa niektoré bicyklické laktóny dajú pripraviť biooxidáciou racemického substrátu v kilogramových množstvách niekoľkými dostupnými BVMO¹⁹. Celobunkové rekombinantné *E. coli* s CHMO boli použité v 55 litrovom reaktore v prevádzke firmy Sigma-Aldrich²⁰.

γ -Butyrolaktóny zohrávajú úlohu v syntéze terapeutických látok²¹. Baklofén, agonista kyseliny γ -aminomaslovej, bol syntetizovaný z prochirálného 3-*p*-chlorofenyl-cyklobutanónu. Požadovaná chiralita sa dosiahla BV oxidáciou uskutočnenou vláknitou hubou *Cunninghamella echinulata*²². Z γ -butyrolaktónu môžu byť syntetizované β -aminokyseliny²³. γ -Butyrolaktóny sú medziproductami pri syntéze lignánov známych pre svoje antileukemické, antivirálne, antifungálne a antineoplastické účinky²⁴; pri syntéze inhibítora RNA polymerázy²⁵, tirandamycínu²⁶; pri syntéze inhibítora fosfatázy serínu/treonínu, kalykulínu A (cit.²⁷). γ -Butyrolaktóny vznikajú spontánnym preskupením kaprolaktónov, ktoré sú produktami oxidácie 4-hydroxycyklohexanónov.

Heterobicyklické laktóny sa využívajú pri výrobe antibiotika (+)-showdomycínu, halogénovaného sekundárneho metabolitu červených rias (+)-*trans*-kumazínu alebo analógov goniofufurónu, ktoré sú cytotoxické pre ľudské rakovinové bunky²⁸.

δ -Valerolaktóny sú dôležitými stavebnými článkami syntéz. Sú využívané v syntéze leukotriénu B5 (cit.²⁹), konstanolaktónu³⁰ a feromónu komára³¹. Substituované laktóny, rovnako ako ich ketónové prekurzory, sú často

spojené s príjemnými vôňami a sú používané v parfémoch a arómach.

Mnoho nedávno objavených BVMO potrebuje rozsiahlejší testovanie na identifikáciu plného rozsahu ich substrátovej základne a selektivity. S komplexnejšími profilmi týchto enzýmov a ich mutantov sa objavia nové biokatalytické cesty k iným dôležitým stavebným článkom organickej syntézy¹⁶.

Kyslíku ako substrátu BV biooxidácie sa nevenuje dostatočná pozornosť. Jeho rozpustnosť v roztokoch je nízka, preto sa predpokladá, že jeho koncentrácia v médiu môže byť limitujúcim faktorom rýchlosti bioreakcie. Okrem technickej náročnosti merania aj toto je dôvodom, prečo doteraz nebolo namerané K_m BVMO pre kyslík. Tento fakt obmedzuje kinetické modelovanie biotechnologického procesu len na empirickú rovinu. Koimobilizácia biokatalyzátora s kyslíkovými nosičmi, ktorá pomohla glukóza oxidáze zvýšiť aktivitu takmer dvojnásobne³², by

mohla slúžiť ako predloha pre BVMO.

4. Enzýmová selektivita

BVMO sú unikátne vo svojej vysokej stereospecificite, a zároveň majú širokú substrátovú základňu. Tá je popri prírodných obohatená o veľa syntetických substrátov (tab. I). Zvláštnu selektivitu BVMO spočiatku pomáhalo vysvetliť modelovanie aktívneho centra enzýmov. Boli vytvorené viaceré modely, ktoré sa snažili predpovedať selektivitu či už na základe priestorového usporiadania (napr. cubic space model⁶²) alebo mechanizmu reakcie⁶³. Od roku 2004 je známa prvá kryštalová štruktúra BVMO, a to termostabilnej PAMO (cit.⁶⁴). Neskôr sa podarilo kryštalizovať aj CHMO⁶⁵, ale kryštalová štruktúra väčšiny BVMO je naďalej neznáma.

Tabuľka I

Prehľad BVMO s EC číslom a mikroorganizmom, z ktorého pochádzajú a substrátmi, ktoré dokážu oxidovať

Enzým	EC číslo	Skr.	Mikroorganizmus	Substrátová základňa
Cyklopentanón monoxygenáza ³³	EC 1.14.13.16	CPMO	<i>Comamonas sp.</i> ³³ (pôvodne <i>Pseudomonas sp.</i> ³⁹)	aromatické ketóny ³³ konjugované ketóny ⁵⁴
Cyclohexanón monoxygenáza ³⁴	EC 1.14.13.22	CHMO	<i>Acinetobacter sp.</i> ³⁴ <i>Arthrobacter sp.</i> ⁴⁰ <i>Brachymonas sp.</i> ⁴¹ <i>Brevibacterium</i> ⁴² <i>Exophiala jeanselmei</i> ⁴³ <i>Nocardia sp.</i> ¹⁰ <i>Rhodococcus sp.</i> ⁴⁰ <i>Xanthobacter sp.</i> ⁴⁴	cyklické, bicyklické, tricyklické, heterocyklické ketóny ⁵⁵ sulfidy ³⁶ ditiény, ditiolány ⁵⁷ terciárne, sekundárne a hydroxylamíny ⁵⁸ epoxidácie dimetyl a dietyl vinyl fosfátu ⁵⁹
(Keto)steroidná monoxygenáza ³⁵	EC 1.14.13.54	(K)SMO	<i>Cylindrocarpon radiclecola</i> ⁴⁵ <i>Rhodococcus rhodochrous</i> ³⁵ <i>Aspergillus tamarit</i> ⁴⁶ <i>Penicillium sp.</i> ⁴⁷	zlúčeniny príbuzné steroidom zapojené do metabolických dráh ³⁵
4-Hydroxyacetofenón monoxygenáza ³⁶	EC 1.14.13.84	HAPMO	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ³⁶ <i>Pseudomonas putida</i> ⁴⁸	aryl ketóny, alifatické, aromatické a heteroaromatické ketóny, sulfidy ⁶⁰
Fenylacetón monoxygenáza ³⁷	EC 1.14.13.92	PAMO	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ⁴⁹ <i>Thermobifida fusca</i> ³⁷	aromatické, alifatické ketóny a sulfidy ⁶¹
Monocyklická monoterpén ketón monoxygenáza ³⁸	EC 1.14.13.105	MMKMO	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ³⁸	monocyklické monoterpénové ketóny a substituované cyklohexanóny ³⁸
Alifatická ketón monoxygenáza ¹⁶	–	AKMO	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ⁵⁰ <i>Pseudomonas fluorescens</i> ⁵¹ <i>Pseudomonas putida</i> ⁵²	alifatické ketóny s krátkym otvoreným reťazcom ⁵¹
Cyklododekanón monoxygenáza ¹⁶	–	CDMO	<i>Rhodococcus ruber</i> ⁵³	dlhoreťazcové cyklické ketóny ⁵³
Cyklopentadekanón monoxygenáza ¹⁶	–	CPDMO	<i>Pseudomonas sp.</i> ⁵	dlhé (C15) a krátke (C5, C6) cyklické a bicyklické ketóny ⁵

Vďaka zisteniu kryštálovej štruktúry PAMO sa podarilo ozrejmiť jej stereošpecificitu napr. pre kinetické rozlíšenie lineárnych *N*-chránených β -aminoketónov. Vysvetľuje sa stérickými obmedzeniami v aktívnom mieste enzýmu v dôsledku predĺženej slučky z aminokyselinových zvyškov 440–446 v blízkosti reaktívnej peroxy-skupiny FAD (cit.⁶⁶). Naopak CHMO z *Rhodococcus sp.* predĺženú slučku nemá, vzniká väčšie „vrecko“, doň sa môže viazať tak (*S*)-, ako aj (*R*)-enantiomér a dochádza k neselektívnej konverzii.

Aj napriek zisteniu kryštálovej štruktúry niektorých BVMO, dôvody reštrikcie mnohých substrátov enzýmami nie sú známe. Napríklad porovnaním kryštálovej štruktúry PAMO a modelu SMO sa nepodarilo zistiť, ktoré zvyšky v PAMO bránia konverzii steroidov⁶⁷.

5. Problémy BV biooxidácií a „scale-up“ procesu

Tak ako všetky procesy v biotechnológii, aj BV oxidácie sa potýkajú s prekážkami, ktoré treba eliminovať, aby sa navrhoval ekonomicky výhodný systém. V prípade BV reakcií sa okrem tradičnej bilancie, čo najlacnejších substrátov a čo najčistejšieho a trhovo úspešného produktu, pridávajú aj iné problémy.

Jedným je hľadanie vhodného biokatalyzátora. Mnoho mikroorganizmov má v genóme kódované BVMO. Väčšinou majú nízku aktivitu. Preto sa pristúpilo k dizajnovaniu rekombinantných buniek s nadexpresiou príslušnej MO. Pre BV oxidácie je rekombinantný celobunkový systém výhodný z hľadiska regenerácie kofaktora hosťiteľskou bunkou. Využitie izolovaných BVMO je z pohľadu lability a purifikácie zatiaľ málo efektívne. Zvýšiť stabilitu biokatalyzátora by mala pomôcť imobilizácia.

Ďalším problémom je toxicita niektorých substrátov reakcie. *In situ* SFPR (dodávanie substrátu a odobranie produktu = z angl. Substrate Feeding Product Removal) tento problém, zdá sa, dokáže riešiť. Biokatalytický proces využívajúci adsorpčnú živicu prekonáva limitácie inhibície substrátom a produktom. Tento proces bol aplikovaný na preparatívnu oxidáciu (–)-(1*S*, 5*R*)-bicyklo[3.2.0.]hept-2-én-6-ónu (cit.⁶⁸).

Pri optimalizácii procesu nemožno zabudnúť na kyslík. Do systému sa môže dodávať prevzdušňovaním (vzduchom či priamo kyslíkom), čo môže na druhej strane spôsobiť prchanie volatilných substrátov. Zásobovanie kyslíkom a kontrola parametrov bioprocesu sú rozhodujúce. Vzťah medzi hustotou biomasy a dodávaním kyslíka v *in situ* SFPR celobunkovej BV oxidácii bol preštudovaný⁶⁹.

BV oxidácia bola uskutočnená v kilogramovom merítku. Racemický substrát bicyklo[3.2.0.]hept-2-én-6-ón bol premenený s takmer 100% enantiomérou čistotou. Bola použitá kombinácia *in situ* SFPR, kontrola prítokovania glycerolu a vylepšenie okysličovania⁷⁰. Z hľadiska dosiahnutých výťažkov aj separácie produktu bol úspešný scale-up biooxidácie z laboratória do poloprevádzky (200 dm³)⁷¹.

6. Výber biokatalyzátora

BVMO sú závislé na kofaktoroch, čo komplikuje ich využívanie. Flavín je pevne viazaný na enzým a regeneruje sa v katalytickom cykle. NAD(P)H však musí byť dodávané v ekvimolárnom pomere. Vzhľadom k jeho cene by mal byť *in situ* recyklovaný (*i*) v druhej enzymatickej reakcii alebo (*ii*) v metabolizme bunky¹⁰. Konvenčný prístup regenerácie BVMO cez NADPH bol porovnaný so zjednodušeným modelom využívajúcim svetlo a flavín⁷². Flavín môže byť fotochemicky redukovaný elektrónovým donorm (EDTA). Tento prístup je atraktívny, ale zatiaľ málo efektívny.

6.1. Izolované enzýmy

NAD(P)⁺, kofaktor BVMO, sa môže ďalším enzýmom redukovať na úkor pridaného podporného substrátu ako donora. Dvojenzymový systém musí byť uskutočnený *in situ* a reakčné podmienky musia byť pre oba enzýmy kompatibilné. To komplikuje použitie týchto systémov pre syntetickú chémiu¹⁰. Najpoužívanejšia metóda na recykláciu NADH využíva formát dehydrogenázu (FDH), ktorá katalyzuje oxidáciu formátu⁷³ na CO₂. Pomocný substrát ani vedľajší produkt nespôsobujú inaktiváciu či inhibíciu a môžu byť ľahko odstránené z reakčnej zmesi. Rovnováha sa posúva v prospech tvorby prchavého CO₂, teda reakcia prebieha v požadovanom smere. FDH je komerčne dostupná a môže byť imobilizovaná.

Až donedávna sa ako najefektívnejšia metóda regenerácie NADPH používal systém glukóza-6-fosfát (G6P)/glukóza-6-fosfát dehydrogenáza (G6PDH). G6PDH z *Leuconostoc mesenteroides* je lacná, stabilná a prijíma NAD⁺ aj NADP⁺ (cit.⁷⁴). Nevýhodou je vysoká cena G6P. Vylepšenie priniesla mutantná formát dehydrogenáza z *Pseudomonas sp.*, ktorej aktívne miesto bolo zmenené viacbodovou riadenou mutagenézou⁷⁵ tak, aby spĺňalo priestorové požiadavky pre NADP⁺. Tento systém bol úspešne použitý pre biotransformácie izolovanými CHMO (cit.⁷⁶).

Riešenie problému regenerácie kofaktorov BV oxidácií je tzv. „closed-loop“ systém. BVMO bola spojená s alkoholdehydrogenázou (ADH) z *Thermoanaerobium brockii*. Dehydrogenáza premení alkoholový substrát na ketón, zatiaľ čo sa NADP⁺ redukuje. V následnom enzymatickom kroku BVMO premení ketón na laktón a regeneruje NADP⁺. Táto metóda bola optimalizovaná použitím makromolekulového koenzýmu polyetylénglykol-NADPH v membránovom reaktore⁷⁷. Miesto hydroxy-prekursora môžu byť na recykláciu kofaktora použité aj iné alkoholy, napr. 2-propanol. Takéto systémy boli navrhnuté pre veľkokapacitné fermentácie⁷⁸.

Roku 2008 bol pripravený fúzny proteín z BVMO a fosfit dehydrogenázy. Tento enzým efektívne uskutočnil BV oxidácie použitím bezbunkového systému⁷⁹.

Okrem enzymatickej regenerácie kofaktora sa testuje aj elektrochemická a fotochemická regenerácia. Napríklad použitím oxidu cínitého na elektróde sa môže dosiahnuť vysokoefektívna elektrochemická regenerácia nikotínami-

dových kofaktorov bez mediátora⁸⁰. Fotochemickou regeneráciou NADH využívajúcou viditeľné svetlo absorbované TiO₂ obsahujúcim uhlík a [Cp*Rh(bpy)(H₂O)]²⁺ ako katalyzátor, sa pri optimálnych podmienkach dosiahla takmer 64% konverzia⁸¹.

6.2. Celobunkové systémy

Mikroorganizmy poskytujú prírodné systémy recyklácie pre kofaktory. Proces čistenia bielkovín a potenciál zníženia stability enzýmu je eliminovaný. V mnohých prípadoch sú bunky ľahko kultivované a uskladnené, preto predstavujú výhodný zdroj katalytickej aktivity¹⁰. Použitie celobunkových katalyzátorov zahŕňa eventualitu nežiadúcich vedľajších reakcií, pretože substrát aj produkt môžu byť premenené inými enzýmami prítomnými v bunke. Takéto konkurenčné procesy znižujú výťažok požadovanej reakcie. Dá sa s tým stretnúť pri celobunkových konverziách s pôvodnými kmeňmi, keďže ďalší krok v metabolizme je hydrolýza laktónu. Obísť túto prekážku je možné pridaním inhibítora enzýmu, napríklad tetraetylpyrofosforečnan⁸².

Rekombinantná baktéria *Corynebacterium glutamicum* exprimujúca CHMO (cit.⁸³) sa ukázala ako lepšia alternatíva než *E. coli*. Je stabilná v prítomnosti organických zlúčenín vďaka charakteristickým obalovým štruktúram. Čo je dôležitejšie, metabolizmus baktérie umožňuje vysokú regeneráciu NADPH. V prítokovanom systéme sa dosiahlo niekoľkonásobné zlepšenie špecifickej aj objemovej produktivity.

6.3. Rekombinantné bunky ako biokatalyzátory BV oxidácií

Druhým prístupom na elimináciu nežiadúcich vedľajších reakcií je využitie rekombinantných kmeňov. Nadprodukcia žiadaných enzýmov môže byť dosiahnutá pomocou silného promotora. V dôsledku toho je množstvo rekombinantného enzýmu podstatne zvýšené oproti ostatným enzýmom v bunke a reakcia, ktorú katalyzuje, sa stáva v organizme dominantnou. Tento prístup bol potvrdený pre CHMO z *Acinetobacter* v kmeňoch *S. cerevisiae*⁸⁴ a *E. coli*⁸⁵.

Nutnou podmienkou použitia plazmidov v rekombinantných DNA technológiách je ich zadržanie v bunkách⁸⁶. Väčšina klonovacích vektorov nesie antibiotické markery kvôli selekcii rekombinantných buniek. Problémom v priemyselných aplikáciách ostáva stabilita plazmidov v neprítomnosti selektívneho antibiotika, ktoré kvôli zvýšeniu nákladov a neželanému „znečisteniu“ produktu v produkčnom médiu absentuje.

Pre bakteriálne plazmidy s nízkym počtom kópií bola identifikovaná a charakterizovaná genetická funkcia (ozn. *par* z angl. partitioning znamenajúceho segmentáciu) nutná na udržanie plazmidu v exponenciálne rastúcej populácii buniek. Tá uskutočňuje aktívnu distribúciu molekúl plazmidovej DNA do dcérskych buniek⁸⁷. Plazmidy s vysokým počtom kópií nie sú v neprítomnosti antibiotika

stabilné. Imobilizácia ich stabilitu zvyšuje. Stabilizácia plazmidu pTG201 v imobilizovaných bunkách *E. coli* nie je zapríčinená transferom plazmidov medzi bunkami ani zvýšením množstva kópií plazmidu. Bunky neobsahujúce plazmid imobilizované a kultivované s bunkami obsahujúcimi plazmid nemôžu túto kultúru prerásť⁸⁶.

Informácie o stabilite plazmidov v rekombinantných kvasinkách *S. cerevisiae* boli zhrnuté z hľadiska molekulárnej, bunkovej, inžinierskej a environmentálnej roviny⁸⁸. Stabilita plazmidov môže byť zvýšená manipuláciou v zložení plazmidu a jeho štruktúry, modifikáciou genetických a fyziologických vlastností hostiteľa a kontrolou prostredia kultivácie. Na molekulárnej úrovni sa zlepšenie v stabilite plazmidových konštruktov dosahuje inzerciou špecifických DNA sekvencií vplyvajúcich na replikáciu a segmentáciu, rovnako ako na modifikáciu genotypu hostiteľa. Biochemickí inžinieri sa primárne koncentrujú na environmentálne manipulácie zahŕňajúce zloženie média, selekčný tlak, množstvo rozpusteného kyslíka, teplotu, pH, režimy kultivácie. Z množstva stratégií zatiaľ uspeli iba selektívne pôdy a autotrofné kmene. Vysoko definované média sú ekonomicky náročné pre komerčné aplikácie. Preto sa hľadajú iné premenné, ktoré by zabezpečili stabilitu plazmidov aj v neselektívnych pôdach.

Imobilizácia zabezpečuje vysoké koncentrácie buniek a produktivitu produktu génu, tak ako stabilitu plazmidu na dlhší čas v porovnaní s kultúrou voľných buniek. Preto je pravdepodobné, že táto technika bude preferovaná pre rekombinantné bunky v neselektívnom médiu. Nie je však veľa informácií o imobilizovaných rekombinantných kvasinkách, najmä o mechanizme zvyšujúcom stabilitu plazmidov⁸⁸.

7. Imobilizácia

Imobilizácia je definovaná ako lokalizácia buniek, jej častí alebo enzýmov do definovaného miesta v priestore so zachovaním katalytickej aktivity. Techniky imobilizácie môžu byť rozdelené do 5 skupín podľa fyzikálnych mechanizmov spôsobujúcich imobilizáciu. Adsorpcia/adhézia, kovalentné uchytenie, sieťovanie, entrapment, enkapsulácia.

7.1. Imobilizácia a Baeyerove-Villigerove oxidácie

Keď je biotransformácia uskutočnená pomocou enzýmu, reaktant a produkt sú v roztoku, separácia produktu je zložitá a enzým je zničený. Naproti tomu, imobilizovaný enzým môže byť rýchlo odfiltrovaný z reakčného média, znovupoužitý a produkt nie je enzýmom kontaminovaný. Zlepšenie konverzie záleží od enzýmu, imobilizačnej matrice (enzýmy viazané na anorganické materiály sú väčšinou stabilnejšie ako tie viazané na organické polyméry) a reakčných podmienok¹⁶. Čiastočne purifikovaná CHMO z rekombinantnej *E. coli* bola imobilizovaná na Eupergit C spolu s 2-propanolom a ADH (*Thermoanaerobium brockii*), ako systémom na regeneráciu NADPH (obr. 3A). Imo-

Tabuľka II

Prehľad imobilizovaných systémov Baeyerových-Villigerových biooxidácií

Biokatalyzátor	Imobilizačná technika	Imobilizačná matrica	Testovanie stability	Výtťažok	Substrát	Reakčný objem
CHMO ^a (cit. ⁸⁹)	kovalentné uchytenie	EupergitC	20 cyklov (Ú24 hod)	100% do 16. cyklu	tioanizol	2 ml
			13 cyklov (Ú24 hod)	100% do 3. cyklu	rac-bicyklo[3.2.0] hept-2-én-6-ón	2 ml
CHMO (cit. ⁹⁰)	entrapment	polyakrylamid	1 cyklus (5 dní)	81%	2-norbornanón	1,0 l
			1 cyklus (8 dní)	76%	L-fenchón	
			1 cyklus (10 dní)	79%	D-fenchón	
			1 cyklus (10 dní)	89%	(+)-gáfor	
			1 cyklus (10 dní)	75%	(+)-dihydrokarvón	
CHMO (cit. ⁹¹)	fyzisorpcia	modifikovaná agaróza	15 cyklov (Ú24 hod)	67–59% do 5. cyklu	2-oxocyklohexyloctová kyselina	50 ml
<i>Geotrichum candidum</i> (cit. ⁹²)	entrapment	polyakrylamid agar z <i>Pterocladia</i>	1 cyklus (72 hodín)	99%	cyklohexanón	20 ml
				92%	neselektívna reakcia ^b	
<i>E. coli</i> /CPMO (cit. ⁹⁵)	enkapsulácia	alginát sodný, sulfát celulózy a poly(metyléno-guanidín)	3 cykly (Ú48 hod)	91%	8-oxabicyklo[3.2.1] okt-6-én-3-ón	20 ml
<i>E. coli</i> /CHMO (cit. ⁹⁶)	enkapsulácia	alginát sodný, sulfát celulózy a poly(metyléno-guanidín)	14 cyklov (91 dní)	75–100%	rac-bicyklo[3.2.0] hept-2-én-6-ón	100 ml
<i>E. coli</i> /CPMO (cit. ⁹⁷)	enkapsulácia	alginát sodný, sulfát celulózy a poly(metyléno-guanidín)	2 cykly (22 hodín)	100%	4-metylcyklohexanón	50 ml

^a Koimobilizovaná s ADH z *Thermoanaerobium brockii* na regeneráciu, ^b prebieha monooxygenácia aj redukcia

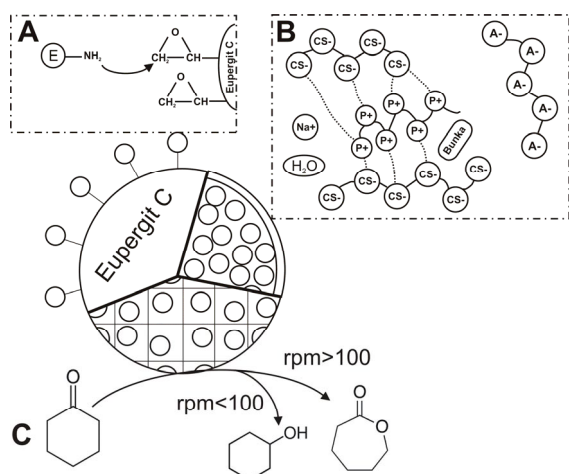
bilizácia stabilizovala enzým a umožnila jeho opätovné použitie⁸⁹ (tab. II).

Už v roku 1989 bola publikovaná práca⁹⁰ o BV oxidácii ketónov imobilizovanou CHMO. Ako imobilizačná matrica bol použitý polyakrylamidový gél a NADPH bolo regenerované *in situ* pomocou G6PDH z *Leuconostoc mesenteroides*. Niekoľko laktónov bolo, za použitia tohto systému, úspešne syntetizovaných s vysokým výtťažkom.

Koimobilizácia CHMO a G6PDH bola vylepšená kovalentnou modifikáciou povrchových aldehydových skupín poróznej agarózy aminovými skupinami polyetylénilimínu⁹¹. Po optimalizácii faktorov ovplyvňujúcich aktivitu koimobilizovaného enzýmu sa zachovalo 87,2 % aktivity a bolo zaznamenané zvýšenie efektivity (V_{max}/K_m) voči voľnému enzýmu.

V súčasnosti sú biotransformácie celými bunkami dostupnejšie a chemikmi prijateľnejšie ako biotransformácie izolovanými enzýmami¹⁶. *Geotrichum candidum*, katalyzujúca monooxygenáciu a/alebo redukciu cyklohexanónu, bola imobilizovaná metódou entrapmentu do šiestich polymérnych matric: polyakrylamid, alginát vápenatý, agar, κ -karagénan, PVA a chitózan (tab. II). Bunky imobilizované v 2,5% PAA špecificky produkujú z cyklohexanónu ϵ -kaprolaktón. Ak je matricou agar z *Pterocladia*, systém môže uskutočňovať redukciu substrátu aj BV reakciu (obr. 3C) v závislosti na prístupe kyslíka⁹².

S ohľadom na „zelené“ technológie boli vyvinuté polyelektrolytové kapsule (PEK) tvorené na báze alginátu sodného, sulfátu celulózy a poly(metyléno-guanidínu) (obr. 3B). Tieto kapsule sa ukazujú ako univerzálny ná-



Obr. 3. (A) Kovalentné uchytenie enzýmu ($E-NH_2$) na Eupergit C cez epoxid, vzniká $-CH_2-NH-$ väzba; (B) Detail štruktúry membrány polyelektrolytových kapsúl, A^- alginát sodný, CS^- sulfát celulózy a P^+ poly(metylén-co-guanidín); (C) Entrapment v agare z *Pterocladia*, rozdiel v prístupe kyslíka pri rôznom miešaní spôsobuje prepínanie medzi redukciou a oxidáciou cyklohexanónu

stroj imobilizácie. Ich použitím sa dosiahla stabilizácia glukóza oxidázy⁹³ a možnosť opakovaného použitia buniek *Nocardia tartaricans* pri hydrolyze *cis*-epoxysukcinátu⁹⁴. Pozitívny dopad enkapsulácie bol pozorovaný pri imobilizácii rekombinantnej *E. coli*/CPMO (tab. II). Konverzia 8-oxabicyklo[3.2.1]okt-6-én-3-ónu voľnými bunkami *E. coli*/CPMO prebiehala rýchlejšie ako imobilizovanými, ale percento konverzie po 48 h bolo porovnateľné. Zlepšenie bolo zaznamenané pri skladovacej stabilite katalyzátora⁹⁵. Rovnaký enkapsulačný protokol bol použitý aj pri testovaní kontinuálneho systému BV biooxidácie v minireaktore⁹⁶ a pri sledovaní viability *E. coli*/CPMO počas biotransformácie 4-metylcyklohexanónu⁹⁷ (tab. II). Úspešná priemyselná aplikácia kapsúl bude vyžadovať optimalizáciu konfigurácie reaktora, ekonomickú vyváženosť procesu a vývoj technológie pre ich produkciu v priemyselnom meradle. Už teraz sa PEK vyrábajú v laboratóriu kontinuálne a reprodukovateľne. Použitím priemyselného enkapsulátora od firmy EncapBiosystems sa jeho výkonnosť dá oproti laboratórnemu prototypu zvýšiť z rádo do desiatok gramov za hodinu na stovky gramov za hodinu. Momentálne sa veľkokapacitne v kilogramových množstvách vyrábajú metódou entrapmentu imobilizáty LentiKats® (MEGA a.s., www.mega.cz), vďaka ktorým sa dosiahli excelentné výsledky napr. pri fermentačnej príprave etanolu⁹⁸.

8. Záver

Keďže produkty BV reakcií sú dôležitými intermediátmi syntéz farmaceuticky významných látok, optimalizácia, s cieľom zníženia ekonomickej náročnosti procesu a zvýšenia selektivity či produktivity, je vysoko žiadaná. Biotechnológie sa ukázali ako veľmi efektívna posila organickým chemikom, keďže BVMO, ako bioalternatíva k chemickým katalyzátorom, dokázu selektívne oxidovať neskutočne širokú paletu syntetických substrátov. Pomocnú ruku podali aj genetickí inžinieri, ktorí vedú pripraviť geneticky modifikované mikroorganizmy s nadprodukciou želaných biokatalyzátorov. Zatiaľ sa však zdá, že imobilizácia, ako technológia umožňujúca mnohonásobné dlhodobé využitie biokatalyzátora, je v oblasti BV oxidácií nedocenená. Jej atraktivita spočíva v možnosti zvýšiť počiatočnú koncentráciu substrátu⁹⁹, ochrániť biokatalyzátor pred negatívnym účinkom organických rozpúšťadiel¹⁰⁰ používaných na solubilizáciu BV substrátov, stabilizovať izolovaný enzým¹⁰¹ či zlepšiť genetickú stabilitu mutantov¹⁰², čo by mohlo výrazne pomôcť aj v oblasti BV oxidácií.

Táto publikácia bola vytvorená v rámci projektu VEGA 1/0229/12.

LITERATÚRA

- Baeyer A., Villiger V.: Ber. Dtsch. Chem. Ges. 32, 3625 (1899).
- Bolm C., Beckmann O., Kühn T., Palazzi C., Adam W., Rao P. B., Saha-Möller C. R.: Tetrahedron: Asymmetry 12, 2441 (2001).
- Chisem I. C., Chisem J., Rafelt J. S., Macquarrie D. J., Clark J. H., Utting K. A.: J. Chem. Technol. Biotechnol. 74, 923 (1999).
- Kotani T., Yurimoto H., Kato N., Sakai Y.: J. Bacteriol. 189, 886 (2007).
- Iwaki H., Wang S., Grosse S., Bergeron H., Nagahashi A., Lertvorachon J., Yang J., Konishi Y., Hasegawa Y., Lau P. C. K.: Appl. Environ. Microbiol. 72, 2707 (2006).
- Völker A., Kirschner A., Bornscheuer U. T., Altenbuchner J.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 77, 1251 (2008).
- Beneventi E., Ottolina G., Carrea G., Panzeri W., Fronza G., Lau P. C. K.: J. Mol. Catal. B: Enzym. 58, 164 (2009).
- Jiang J., Tetzlaff C. N., Takamatsu S., Iwatsuki M., Komatsu M., Ikeda H., Cane D. E.: Biochemistry 48, 6431 (2009).
- Wen Y., Hatabayashi H., Arai H., Kitamoto H. K., Yabe K.: Appl. Environ. Microbiol. 71, 3192 (2005).
- Mihovilovic M. D., Müller B., Stanetty P.: Eur. J. Org. Chem. 2002, 3711, 2002.
- Donoghue N. A., Norris D. B., Trudgill P. W.: Eur. J. Biochem. 63, 175 (1976).
- Cibulka R.: Chem. Listy 104, 326 (2010).

13. Noyori R., Sato T., Kobayashi H.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **56**, 2661 (1983).
14. Mislow K., Brenner J.: *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 2318 (1953).
15. Malito E., Alfieri A., Fraaije M. W., Mattevi A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 13157 (2004).
16. Kayser M. M.: *Tetrahedron* **65**, 947 (2009).
17. Newton R. F., Roberts S. M.: *Tetrahedron* **36**, 2163 (1980).
18. Andrau L., Lebreton J., Viazzo P., Alphand V., Furstoss R.: *Tetrahedron Lett.* **38**, 825 (1997).
19. Hilker I., Alphand V., Wohlgemuth R., Furstoss R.: *Adv. Synth. Catal.* **346**, 203 (2004).
20. Liese A., Seelbach K., Buchholz A., Haberland J., v knihe: *Processes: Industrial biotransformations* (Liese A., Seelbach K., Wandrey C., ed.), str. 147, Wiley, Weinheim 2006.
21. Canan Koch S. S., Chamberlin A. R.: *J. Org. Chem.* **58**, 2725 (1993).
22. Mazzini C., Lebreton J., Alphand V., Furstoss R.: *Tetrahedron Lett.* **38**, 1195 (1997).
23. Mazzini C., Lebreton J., Alphand V., Furstoss R.: *J. Org. Chem.* **62**, 5215 (1997).
24. Honda T., Kimura N., Sato S., Kato D., Tominaga H.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 1043.
25. Reusser F.: *Infect. Immun.* **2**, 77 (1970).
26. Taschner M. J., Aminbhavi A. S.: *Tetrahedron Lett.* **30**, 1029 (1989).
27. Smith III A. B., Friestad G. K., Barbosa J., Bertouneque E., Hull K. G., Iwashima M., Qiu Y., Salvatore B. A., Spoons P. G., Duan J. J. W.: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 10468 (1999).
28. Mihovilovic M. D.: *Curr. Opin. Chem.* **10**, 1265 (2006).
29. Corey E. J., Pyne S. G., Su W. G.: *Tetrahedron Lett.* **24**, 4883 (1983).
30. White J. D., Jensen M. S.: *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6224 (1995).
31. Prasad K. R., Pazhamalai A.: *Tetrahedron: Asymmetry* **18**, 2479 (2007).
32. Bučko M., Gemeiner P., Vikartovská A., Mislovičová D., Lacík I., Tkáč J.: *Artif. Cells, Blood Substitutes, Biotechnol.* **38**, 90 (2010).
33. Iwaki H., Hasegawa Y., Wang S., Kayser M. M., Lau P. C. K.: *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5671 (2002).
34. Chen Y. C. J., Peoples O. P., Walsh C. T.: *J. Bacteriol.* **170**, 781 (1988).
35. Morii S., Sawamoto S., Yamauchi Y., Miyamoto M., Iwami M., Itagaki E.: *J. Biochem. (Tokyo)* **126**, 624 (1999).
36. Kamerbeek N. M., Moonen M. J. H., van der Ven J. G. M., van Berkel W. J. H., Fraaije M. W., Janssen D. B.: *Eur. J. Biochem.* **268**, 2547 (2001).
37. Fraaije M. W., Wu J., Heuts D. P. H. M., van Hellemond E. W., Lutje Spelberg J. H., Janssen D. B.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 393 (2005).
38. van der Werf M. J.: *Biochem. J.* **347**, 693 (2000).
39. Griffin M., Trudgill P. W.: *Eur. J. Biochem.* **63**, 199 (1976).
40. Brzostowicz P. C., Walters D. M., Thomas S. M., Nagarajan V., Rouvière P. E.: *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 334 (2003).
41. Bramucci M. G., Brzostowicz P. C., Kostichka K., Nagarajan V., Rouvière P. E., Thomas S. M.: PCT Int. Appl. WO 2003020890
42. Brzostowicz P. C., Gibson K. L., Thomas S. M., Blasko M. S., Rouvière P. E.: *J. Bacteriol.* **182**, 4241 (2000).
43. Hasegawa Y., Nakai Y., Tokuyama T., Iwaki H.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 2696 (2000).
44. van Beilen J. B., Seeger J. B. F. M. A., Kovac J., Li J. Z., Smit T. H. M., Fritsche U., Witholt B.: *Environ. Microbiol.* **5**, 174 (2003).
45. Itagaki E.: *J. Biochem. (Tokyo)* **99**, 815 (1986).
46. Hunter A. C., Collins C., Dodd H. T., Dedi C., Kousoroplis S. J.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **122**, 352 (2010).
47. Huang L.-H., Li J., Xu G., Zhang X.-H., Wang Y.-G., Yin Y.-L., Liu H.-M.: *Steroids* **75**, 1039 (2010).
48. Rehdorf J., Zimmer C. L., Bornscheuer U. T.: *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 3106 (2009).
49. Fraaije M. W., Kamerbeek N. M., Heidekamp A. J., Fortin R., Janssen D. B.: *J. Biol. Chem.* **279**, 3354 (2004).
50. Bonsor D., Butz S. F., Solomons J., Grant S. C., Fairlamb I. J. S., Fogg M. J., Grogan G.: *Org. Biomol. Chem.* **4**, 1252 (2006).
51. Kirschner A., Altenbuchner J., Bornscheuer U. T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 1065 (2007).
52. Rehdorf J., Kirschner A., Bornscheuer U. T.: *Biotechnol. Lett.* **29**, 1393 (2007).
53. Kostichka K., Thomas S. M., Gibson K. J., Nagarajan V., Cheng Q.: *J. Bacteriol.* **183**, 6478 (2001).
54. Bes M. T., Villa R., Roberts S. M., Wan P. W. H., Willetts A.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1**, 127 (1996).
55. Stewart J. D.: *Curr. Org. Chem.* **2**, 195 (1998).
56. Ottolina G., Pasta P., Carrea G., Colonna S., Dallavalle S., Holland H. L.: *Tetrahedron: Asymmetry* **6**, 1375 (1995).
57. Kayser M. M., Zhao H., Chen G., Feicht A.: *ARKIVOC* **12**, 47 (2002).
58. Colonna S., Pironi V., Pasta P., Zambianchi F.: *Tetrahedron Lett.* **44**, 869 (2003).
59. Colonna S., Gaggero N., Carrea G., Ottolina G., Pasta P., Zambianchi F.: *Tetrahedron Lett.* **43**, 1797 (2002).
60. Kamerbeek N. M., Olsthoorn A. J. J., Fraaije M. W., Janssen D. B.: *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 419 (2003).
61. de Gonzalo G., Torres Pazmiño D. E., Ottolina G., Fraaije M. W., Carrea G.: *Tetrahedron: Asymmetry* **16**, 3077 (2005).
62. Jones J. B., Jakovac I. J.: *Can. J. Chem.* **60**, 19 (1982).
63. Kelly D. P.: *Tetrahedron: Asymmetry* **6**, 1375

- (1995).
64. Malito E., Alfieri A., Fraaije M. W., Mattevi A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 13157 (2004).
 65. Mirza I. A., Yachnin B. J., Wang S., Grosse S., Bergeron H., Imura A., Iwaki H., Hasegawa Y., Lau P. C. K., Berghuis A. M.: *J. Am. Chem. Soc.* *131*, 8848 (2009).
 66. Rehdorf J., Mihovilovic M. D., Fraaije M. W., Bornscheuer U. T.: *Chem. Eur. J.* *16*, 9525 (2010).
 67. Torres Pazmiño D. E., Dudek H. M., Fraaije M. W.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* *14*, 138 (2010).
 68. Hilker I., Gutiérrez M. C., Furstoss R., Ward J., Wohlgemuth R., Alphand V.: *Nat. Protoc.* *3*, 546 (2008).
 69. Hilker I., Baldwin C., Alphand V., Furstoss R., Woodley J., Wohlgemuth R.: *Biotechnol. Bioeng.* *93*, 1138 (2006).
 70. Hilker I., Wohlgemuth R., Alphand V., Furstoss R.: *Biotechnol. Bioeng.* *92*, 702 (2005).
 71. Baldwin C. V. F., Wohlgemuth R., Woodley J.M.: *Org. Process Res. Dev.* *12*, 660 (2008).
 72. Hollmann F., Taglieber A., Schulz F., Reetz M. T.: *Angew. Chem., Int. Ed.* *46*, 2903 (2007).
 73. Wichmann R., Wandrey C., Bückmann A. F., Kula M. R.: *Biotechnol. Bioeng.* *23*, 2789 (1981).
 74. Wong C. H., Whitesides G. M.: *J. Am. Chem. Soc.* *103*, 4890 (1981).
 75. Seelbach K., Riebel B., Hummel W., Kula M. R., Tishkov V. I., Egorov H. M., Wandrey C., Kragl U.: *Tetrahedron Lett.* *37*, 1377 (1996).
 76. Schwarz-Linek U., Krödel A., Ludwig F. A., Schulze A., Rissom S., Kragl U., Tishkov V. I., Vogel M.: *Synthesis* *2001*, 947.
 77. Secundo F., Carrea G., Riva S., Battistel E., Bianchi D.: *Biotechnol. Lett.* *15*, 865 (1993).
 78. Hogan M. C., Woodley J. M.: *Chem. Eng. Sci.* *55*, 2001 (2000).
 79. Torres Pazmiño D. E., Snajdrova R., Baas B. J., Ghobrial M., Mihovilovic M. D., Fraaije M. W.: *Angew. Chem., Int. Ed.* *47*, 2275 (2008).
 80. Kim Y.H., Yoo. Y.J.: *Enzyme Microb. Technol.* *44*, 129 (2009).
 81. Jiang Z., Lü Ch., Wu H.: *Ind. Eng. Chem. Res.* *44*, 4165 (2005).
 82. Alphand V., Archelas A., Furstoss R.: *J. Org. Chem.* *55*, 347 (1990).
 83. Doo E. H., Lee W. H., Seo H. S., Seo J. H., Park J. B.: *J. Biotechnol.* *142*, 164 (2009).
 84. Kayser M. M., Chen G., Stewart J.: *ChemInform* *30*: no. doi: 10.1002/chin.199916303
 85. Chen G., Kayser M. M., Mihovilovic M. D., Mrstik M. E., Martinez C. A., Stewart J. D.: *New J. Chem.* *23*, 827 (1999).
 86. Nasri M., Sayadi S., Barbotin J. N., Dhulster P., Thomas D.: *Appl. Environ. Microbiol.* *53*, 740 (1987).
 87. Meacock P. A., Cohen, S. N.: *Cell* *20*, 529 (1980).
 88. Zhang Z., Moo-Young M., Chisti Y.: *Biotechnol. Adv.* *14*, 401 (1996).
 89. Zambianchi F., Pasta P., Carrea G., Colonna S., Gaggero N., Woodley J. M.: *Biotechnol. Bioeng.* *78*, 489 (2002).
 90. Abril O., Ryerson C. C., Walsh C., Whitesides G. M.: *Bioorg. Chem.* *17*, 41 (1989).
 91. Atia K. S.: *Radiat. Phys. Chem.* *73*, 91 (2005).
 92. Carballeira J. D., Álvarez E., Sinisterra J. V.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* *28*, 25 (2004).
 93. Vikartovská A., Bučko M., Mislovičová D., Pätoprstý V., Lacík I., Gemeiner P.: *Enzyme Microb. Technol.* *41*, 748 (2007).
 94. Bučko M., Vikartovská A., Gemeiner P., Lacík I., Kolláriková G., Marison I.W.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* *81*, 500 (2006).
 95. Hucík M., Bučko M., Gemeiner P., Štefuca V., Vikartovská A., Mihovilovič M. D., Rudroff F., Iqbal N., Chorvát Jr. D., Lacík I.: *Biotechnol. Lett.* *32*, 675 (2010).
 96. Bučko M., Schenk Mayerová A., Gemeiner P., Vikartovská A., Mihovilovic M. D., Lacík I.: *Enzyme Microb. Technol.* *49*, 284 (2011).
 97. Schenk Mayerová A., Bučko M., Gemeiner P., Chorvát D. Jr., Lacík I.: *Biotechnol. Lett.* *34*, 309 (2012).
 98. Rebroš M., Rosenberg M., Krištofiková L.: *Chem. Listy* *99*, s224 (2005).
 99. Li Y., Le H. B.: *Huanjing Kexue/Env. Science* *30*, 3007 (2009).
 100. Kanda T., Miyata N., Fukui T., Kawamoto T., Tanaka A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *49*, 377 (1998).
 101. Grulich M., Maršálek J., Kyslík P., Štěpánek V., Kotik M.: *Proc. Biochem.* *46*, 526 (2011).
 102. Kilonzo P. M., Margaritis A., Bergougnou M. A.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *37*, 773 (2010).

A. Schenk Mayerová, M. Bučko, and P. Gemeiner
(Department of Glycobiotechnology, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava): Biotechnologies Using Baeyer-Villiger Oxidations

Baeyer-Villiger (B-V) biooxidations catalyzed by B-V monooxygenases have been studied because their products are precursors of important pharmaceuticals including antiviral, antifungal, antileukemic or anticancer drugs. Some improvement of biotransformation yields at lowest costs are investigated including immobilized B-V biocatalysts. This review contains the relevant information.