

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **241477**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **433249**

(51) Int.Cl.  
**C12P 33/02 (2006.01)**  
**C12R 1/01 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **13.03.2020**

---

(54) **Sposób wytwarzania (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu z diosgenonu**

---

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**20.09.2021 BUP 2521**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:  
**10.10.2022 WUP 41/22**

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT KATALIZY I FIZYKOCHEMII  
POWIERZCHNI IM. JERZEGO HABERA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Kraków, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**PATRYCJA WÓJCIK, Piekary Śląskie, PL  
AGNIESZKA WOJTKIEWICZ, Kraków, PL  
MATEUSZ TATARUCH, Brzeziny, PL  
JACEK MORZYCKI, Białystok, PL  
MACIEJ SZALENIEC, Kraków, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Adam Trawczyński**

---

**PL 241477 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-onu (**o wzorze 2**) na drodze enzymatycznej selektywnej dehydrogenacji (25*R*)-spirosta-4-en-3-onu (**o wzorze 1**), mającego nazwę zwyczajową diosgenon.

Sposób, według wynalazku może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym do wytwarzania związków o potencjalnej aktywności biologicznej przeciwko zarodźcowi malarii *Plasmodium berghei* (Pabón A. i inni, *Molecules*, **2013**, 18, 3356–3378), posiadających właściwości przeciwzapalne (inhibicja produkcji INF- $\gamma$  przez limfocyty T CD4+ – Quan H.-J. i inni, *Eur. J. Med. Chem.*, **2002**, 37 (8), 659–669), czy właściwości cytotoksyczne względem linii raka jelita grubego HCT 116 (human colorectal (HCT 116) carcinoma cell) (Quan H.-J. i inni, *Eur. J. Med. Chem.*, **2002**, 37 (8), 659–669).

Konwersje enzymatyczne są ekologiczną alternatywą względem klasycznej syntezy chemicznej w uzyskiwaniu aktywnych biologicznie związków i są coraz częściej stosowane w przemyśle farmaceutycznym, zwłaszcza do produkcji leków steroidowych (Chen M.-M. i inni, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2012**, 96, 133–142). Stwierdzono, że wprowadzenie wiązania podwójnego między pierwszym i drugim atomem węgla w pierścieniu A diosgenonu (**wzór 1**) prowadzi do powstania (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-onu (**wzór 2**), który jest związkiem o podwyższonej aktywności przeciw interferonowi  $\gamma$ .

Chemiczne metody otrzymywania (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-onu są przeprowadzane jednoetapowo z diosgenonu, albo z tigogenonu albo z tigogenolu z wykorzystaniem silnych utleniaczy takich jak 2,3-dichloro-5,6-dicyjano-1,4-benzochinon czy ditlenek selenu, oraz toksycznych rozpuszczalników takich jak benzen, toluen czy dichlorometan.

Znana jest chemiczna metoda otrzymywania (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-onu w której w wyniku reakcji diosgenonu z 2,3-dichloro-5,6-dicyjano-1,4-benzochinonem, w obecności kwasu benzooesowego, otrzymywany jest (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-on z konwersją ok. 60% w przypadku procesu prowadzonego w gorącym toluenie przez 12 godzin (Pabón A. i inni, *Molecules*, **2013**, 18, 3356–3378) lub z wydajnością ok. 49% w procesie prowadzonym w absolutnym gorącym dioksanie przez 36 godzin (Quan H.-J. i inni, *Eur. J. Med. Chem.*, **2002**, 37 (8), 659–669). Produkt reakcji oczyszczany jest za pomocą chromatografii kolumnowej na złożu krzemionkowym z wykorzystaniem mieszaniny heksanu/dichlorometanu/octanu etylu (4:1:1) jako eluentu (Pabón A. i inni, *Molecules*, **2013**, 18, 3356–3378) lub po przepłukaniu dichlorometanem i wodorotlenkiem sodu za pomocą preparatywnej chromatografii cieczowej (Quan H.-J. i inni, *Eur. J. Med. Chem.*, **2002**, 37 (8), 659–669).

W pracy Carlon Nussbaum i innych (*J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 81 (19), 5230–5233) opisano metodę utleniania diosgenonu w mieszaninie alkoholu amyłowego i lodowatego kwasu octowego za pomocą ditlenku selenu. Produkty reakcji są ekstrahowane za pomocą dichlorometanu z dodatkiem wodorotlenku sodu i poddawane oczyszczaniu metodą chromatografii kolumnowej (eluent benzen-eter etylowy), a końcowa wydajność do produktu wynosi ok. 3%.

W artykule Potjamarn Bunyathaworn i innych (*Steroids*, **2010**, 74 (6) 432–444) opisano metodę syntezy (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-onu z tigogeniny ((25*R*)-5 $\alpha$ -spirostan-3 $\beta$ -olu) z wykorzystaniem kwasu meta-jodobenzoowego oraz diselenku difenyłu, ogrzewanych we wrzącym toluenie przez 7 godzin. Produkt wydzielano z toluenu dodając dichlorometan z wodą oraz oczyszczając oddzielną warstwę organiczną za pomocą chromatografii flash co pozwoliło na 70% wydajność syntezy.

Z pracy Carlon Nussbaum i innych (*J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 81 (19), 5230–5233) znana jest dwuetapowa metoda otrzymywania (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-onu z dioctanu ruskogeniny, polegająca na hydrolizie substratu, prowadzonej w mieszaninie chloroformu i metanolu z dodatkiem stężonego chlorowodoru przez 24 godziny, której produkty po zobojętnieniu i oczyszczeniu poddawane są utlenianiu Oppenauera (działaniu izopropanolanu glinu w mieszaninie wrzącego cykloheksanonu i toluenu). Wydajność całego procesu nie przekracza 20%.

Inna znana metoda syntezy (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-onu obejmuje utlenianie mieszaniny genin w toluenie za pomocą cykloheksanonu i izopropanolanu glinu (Al(0-*i*-Pr)<sub>3</sub>). Metoda ta wymaga oczyszczania produktu reakcji z wykorzystaniem toksycznych rozpuszczalników (benzenu, toluenu) oraz charakteryzuje się niską wydajnością (Burn D. i inni, *J. Chem. Soc.*, **1958**, 795–799). W artykule tym opisano również trój etapową reakcję syntezy (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-onu z tigogenonu. Według ujawnionej procedury, do roztworu tigogenonu w kwasie octowym wprowadza się roztwór bromu w kwasie octowym. Po 12 godzinach produkt wytrąca się, mieszając roztwór kwasu octowego z wodą i po rekrystalizacji w mieszaninie dichlorometanu i metanolu otrzymuje się nieoczyszczony 2,4,23-tribromo-5 $\alpha$ -25-spirostan-3-on. Następnie ogrzewa się go przez 2 godziny we wrzącej

2,4,6,-trimetylopirydynie uzyskując 23-bromo-(25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-on. Związek ten poddaje się następnie działaniu jodku sodu w kwasie octowym w atmosferze azotu na łaźni wodnej przez 30 h, po czym otrzymany (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-on izoluje się mieszaniną eteru i benzenu.

Z dostępnej literatury znane są sposoby izolacji preparatu enzymatycznego o aktywności  $\Delta^1$ -dehydrogenazy 3-ketosteroidowej (KTSD) ze *Sterolibacterium denitrificans* (Chiang Y.-R. i inni, *Appl. Environ. Microb.*, **2008**, 74 (1), 107–113) o skrócie AcMB (Anaerobic cholesterol metabolism enzyme B). Opisana jest również metoda transformacji genetycznej *Escherichia coli* w celu otrzymania rekombinowanego enzymu AcMB (K. Sofińska i inni, *BBA – Gen. Subjects*, **2019**, 1863 (6), 1027–1039).

W literaturze przedstawione są liczne inne przykłady metod pozyskiwania enzymów typu KTSD, charakteryzujących się jednak spektrum substratowym ograniczonym tylko do 3-ketosteroidów (np. Knol J. i inni, *Biochem J.*, **2008**, 410 (2), 339–346; Itagaki E. i inni, *J. Biochem.*, **1990**, 108, 122–127; Cho K.-P. i inni, *J. Biochem.*, **1995**, 117 (5), 1043–1049; Penasse, L. i inni, *Steroids*, **1968**, 12 (4), 525–544; Plesiat P. i inni, *J. Bacteriol.*, **1991**, 173 (22), 7219–7227).

Znane są również z literatury przykłady zastosowania enzymu AcMB ze *Sterolibacterium denitrificans* do przeprowadzenia reakcji odwodornienia w pozycji C1-C2 dla szeregu standardowych, czteropierścieniowych 3-ketosteroidów (analogów progesteronu) oraz substratów nietypowych dla enzymów z tej klasy dehydrogenaz 3-ketosteroidowych (KTSD), takich jak cholest-4-en-3-on czy cholest-5-en-3-on. W szczególności w artykule Chiang Y.-R. i innych (*Appl. Environ. Microb.*, **2008**, 74 (1), 107–113) ujawniono zdolność preparatu enzymatycznego AcMB do biokatalitycznej transformacji progesteronu, testosteronu, 19-nortestosteronu, androst-4-en-3,17-dionu, jak również cholest-4-en-3-onu i cholest-5-en-3-onu z wykorzystaniem 2,6-dichloroindofenolu jako reutleniacza w pH 6,5.

Z kolei w opisach patentowych PL 228070, PL 228071 i PL 228517 (A. Rugor i inni) ujawniono sposób wytwarzania propionianu androsta-1,4-dien-17 $\beta$ -ol-3-onu, androsta-1,4,6-trien-17 $\beta$ -ol-3-onu i 17 $\alpha$ -metyloandrosta-1,4-dien-17 $\beta$ -ol-3-onu z wykorzystaniem  $K_3[Fe(CN)_6]$  jako reutleniacza.

Jednak jak dotąd w literaturze nie ujawniono faktu zdolności enzymu AcMB do konwertowania związków zbudowanych z więcej niż 4 pierścieni, w tym w szczególności sześciopierścieniowych związków zawierających ugrupowania typu spiro, jak w diosgenonie.

Znane z literatury są doniesienia o aktywności enzymów KSTD, pochodzących z różnych organizmów w reakcji dehydrogenacji przy C1-C2 czteropierścieniowych 3-ketosteroidów (np. Itagaki E. i inni, *Biochim. Biophys. Acta*, **1990**, 1038 (1), 60–67; Mao S. i inni, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2019**, 94, 309–316), w tym dehydrogenaz ketosteroidowych z bakterii *Rhodococcus erythropolis* wykazujących aktywność w stosunku do 4-androsten-3,17-dionu, testosteronu, metylotestosteronu, hydroksykortyzonu, progesteronu, czy octanu kortyzonu, z wykorzystaniem 2,6-dichloroindofenolu jako reutleniacza w pH 8,0.

Wg doniesień literaturowych enzymy klasy KSTD, z wyjątkiem AcMB, nie wykazują aktywności w stosunku do 3-ketosteroidów, takich jak cholest-4-en-3-on o niezdegradowanym łańcuchu alifatycznym przy C17. Co więcej, w dostępnej literaturze nie znaleziono żadnej metody enzymatycznego uzyskiwania (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-onu z diosgenonu, tj. aktywności enzymatycznej dla sześciopierścieniowych 3-ketosaponin.

Istota wynalazku polega na enzymatycznej regioselektywnej  $\Delta^1$ -dehydrogenacji (tj. wprowadzeniu podwójnego wiązania pomiędzy atomy C1 i C2) w substracie, którym jest diosgenon ((25*R*)-spirost-4-en-3-on) o **wzorze 1**, co prowadzi do otrzymania (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-onu (**o wzorze 2**). Reakcję prowadzi się według **schematu 1** przedstawionego na załączonym rysunku, przy zastosowaniu enzymu o aktywności KSTD, zwłaszcza pochodzącego ze *Sterolibacterium denitrificans* albo *Rhodococcus erythropolis*. Reakcję może katalizować dowolny enzym z klasy KSTD o sekwencji podobnej, tj. nie różniący się o więcej niż 30% aminokwasów, od zaprezentowanych na załączonym rysunku **sekwencji 1**, tj. KSTD ze *Sterolibacterium denitrificans* Chol-1S (DSM: 13999), albo **sekwencji 2**, tj. KSTD z *Rhodococcus erythropolis* SQ1.

Wspomniany enzym wprowadza się do środowiska reakcji w postaci preparatu enzymatycznego pochodzącego z natywnej bakterii lub w postaci enzymu rekombinowanego, powstałego w procesie nadekspresji genu zmodyfikowanej bakterii, zwłaszcza *Escherichia coli*.

Możliwe jest również przeprowadzenie procesu z zastosowaniem komórek *Escherichia coli* zawierających enzym bez potrzeby wcześniejszej izolacji preparatu enzymatycznego.

Produkt reakcji korzystnie oczyszcza się metodą ekstrakcji do fazy stałej i otrzymuje (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-on (wzór 2) z wydajnością 52,6%, przy konwersji substratu, ustalonego według chromatografii cieczowej, powyżej 87%.

Korzystne jest, gdy proces prowadzi się w środowisku wodno-organicznym w temperaturze od 20 do 45°C, w pH 6,5–9,0 z zastosowaniem jako utleniacza 2,6-dichlorofenoloindofenolu, metylo-siarczanu fenazyny lub mieszaniny 2,6-dichlorofenoloindofenolu i metosiarczanu fenazyny w obecności 2-hydroksypropylo-β-cyklodekstryny jako solubilizatora substratu. Dodanie rozpuszczalnika organicznego (np. 2-metoksyetanolu, izopropanolu lub dioksanu) umożliwia łatwiejsze rozpuszczenie substratu i ma korzystny wpływ na konwersję.

Zasadniczymi zaletami wynalazku jest otrzymanie (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-on, jako jedyne go produktu reakcji z konwersją nawet do 100%, z wydajnością izolowaną co najmniej 52,6%, w temperaturze pokojowej, bez zastosowania toksycznych rozpuszczalników oraz silnych utleniaczy.

Przedmiot wynalazku ilustrują przedstawione poniżej przykłady realizacji.

#### **Przykład 1**

##### **Przygotowanie preparatu enzymatycznego o aktywności KSTD z natywnej bakterii *Sterolibacterium denitrificans***

Procedura przygotowania preparatu enzymatycznego poprzedzona jest dwoma etapami, prowadzącymi do pozyskania natywnego preparatu enzymatycznego z aktywnością Acmb: hodowlą bakteryjną oraz izolowaniem z masy bakteryjnej preparatu enzymatycznego o aktywności Acmb. Hodowlę bakterii *Sterolibacterium denitrificans* Chol-1S (DSM: 13999) prowadzi się w środowisku beztlenowym według procedury opisanej w literaturze (Chiang Y.-R. i inni, *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282 (18), 13240–13249). Preparat enzymatyczny o aktywności Acmb pozyskuje się w warunkach tlenowych w formie homogenatu bakteryjnego (preparat enzymatyczny „homogenat” stanowiący białka rozpuszczalne i solubilizowane), pozyskiwanego w wyniku rozbicia komórek, solubilizacji białek z błony i ultrawierowania celem odseparowania frakcji błonowej lub jako preparat podczyszczony w formie przebiccia kolumny na złożu DEAE-Sepharose (preparat enzymatyczny „po oczyszczeniu”), jak opisano w artykule Dermer J. i inni (*J. Biol. Chem.*, **2012**, 287 (44), 36905–36916).

#### **Przykład 2**

##### **Przygotowanie preparatu enzymatycznego o aktywności KSTD ze *Sterolibacterium denitrificans* w nadekspresji w *Escherichia coli***

Gen kodujący KSTD z *S. denitrificans* (Acmb) został wklonowany do wektora pMCSG7 zgodnie z procedurą opisaną w pracy Sofińskiej K. i innych (*BBA – Gen. Subjects*, **2019**, 1863 (6), 1027–1039). Uzyskany konstrukt genetyczny został transformowany do komórek *E. coli*, potraktowanych chlorkiem wapnia w celu nabycia kompetencji. Następnie założono pre-kulturę tak zmodyfikowanych komórek bakteryjnych na pożywce płynnej 2% Lennox Broth (LB) z dodatkiem ampicyliny i kanamycyny tak by końcowe stężenie antybiotyków wynosiło odpowiednio 100 i 50 µg/ml, którą prowadzono w inkubatorze z wytrząsaniem (180 rpm, 37°C, 12 h). Uzyskana kultura została rozcieńczona 100-krotnie w medium LB zawierającym ampicylinę i kanamycynę w takich samych stężeniach jak wyżej, a hodowla była kontynuowana aż do osiągnięcia gęstości optycznej OD<sub>600</sub> o wartości 0,6. Po osiągnięciu opisanej wartości OD<sub>600</sub> obniżono temperaturę w inkubatorze do 16°C i zaindukowano nadekspresję enzymu przez dodatek 0,25 mM β-D-1-tiogalaktopiranozydu izopropylowego (IPTG). Po kolejnych 24 h hodowli komórki zostały oddzielone od pożywki hodowlanej poprzez wirowanie przy 4500 g (1 h, 4°C). Zawiesina komórek została poddana lizie metodą sonikacji (Sonies Vibra-Cell VCX500, cykl przerywany, 5 min, amplituda 40%, energia 150 000 J), a pozostałości komórkowe oddzielono metodą ultrawierowania przy przyspieszeniu kątowym 40 000 g przez 1 godzinę w temperaturze 4°C. Następnie ekstrakt komórkowy zaaplikowano na kolumnę HisTrap HP (5 ml\_ GE Healthcare), by po przepłukaniu buforem podstawowym (50 mM chlorowodorek (tris(hydroksymetylo)amino)metanowy (Tris-HCl) pH 8,5, 150 mM chlorek sodu, 10% (w/v) glicerol i 0,5% (w/v) Triton-X 100) z dodatkiem 15 mM imidazolu, wmyć enzym w gradiencie imidazolu od 15 mM do 300 mM. Enzym odsolono z wykorzystaniem kolumny Econo-Pac 10DG (BioRad) i zamrożono w -20°C. Stężenie aktywnego enzymu oznaczono spektrofotometrycznie wykorzystując charakterystyczne widmo FAD przy 450 nm ( $\epsilon_{450} = 13\ 100\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ).

#### **Przykład 3**

##### **Przygotowanie preparatu enzymatycznego o aktywności KSTD z *Rhodococcus erythropolis* SQ1 w nadekspresji w *Escherichia coli***

Gen kodujący KSTD z *R. erythropolis* SQ1 został wklonowany do wektora pET15b (Rohman A. i inni, *Acta. Crystallogr. F*, **2012**, 68, 551–556) i transformowany do komórek *E. coli*, potraktowanych chlorkiem wapnia w celu nabycia kompetencji. Następnie założono pre-kulturę bakteryjną w płynnej pożywce 2% LB zawierającej z dodatkiem ampicyliny i kanamycyny tak by końcowe stężenie antybiotyków wynosiło odpowiednio 100 i 50  $\mu\text{g/ml}$ . Hodowla była prowadzona przez 12 h w inkubatorze z wytrząsaniem ( $37^\circ\text{C}$ , 180 rpm). Właściwą hodowlę komórkową założono poprzez 100-krotne rozcieńczenie pre-kultury w analogicznym medium i kontynuowano, aż do osiągnięcia przez komórki bakteryjne gęstości optycznej  $\text{OD}_{600}$  równej 0,6. Następnie temperatura hodowli została obniżona do  $16^\circ\text{C}$ , a nadekspresja enzymu zaindukowana przez dodatek 0,1 mM IPTG. Po 48 godzinach prowadzenia hodowli komórki zostały oddzielone od pożywki hodowlanej poprzez wirowanie przy 4500 g (1 h,  $4^\circ\text{C}$ ) i poddane sonikacji (Sonies Vibra-Cell VCX500, cykl przerywany, 5 min, amplituda 40%, energia 150 000 J). Dalej lizat komórkowy poddano ultrawirowaniu przy 40 000 g,  $4^\circ\text{C}$  przez 1 godzinę. Uzyskany ekstrakt komórkowy zaaplikowano na kolumnę HisTrap HP (5 mL GE Healthcare), a enzym eluowano przy użyciu buforu podstawowego (50 mM Tris-HCl pH 8,5, 100 mM chlorek sodu, 10% (w/v) glicerol, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol (BME)) w gradiencie imidazolu od 10 mM do 300 mM. Enzym odsolono z wykorzystaniem kolumny Econo-Pac 10DG (BioRad) i zamrożono w  $-20^\circ\text{C}$ . Stężenie enzymu oznaczono spektrofotometrycznie wykorzystując charakterystyczne widmo FAD przy 450 nm ( $\epsilon_{450} = 13\ 100\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ).

#### Przykład 4

**Otrzymywanie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu za pomocą oczyszczonego rekombinowanego enzymu KSTD ze *Sterolibacterium denitrificans* oraz 2,6-dichloroindofenolu jako reutleniaacza w pH 6,5, w temperaturze  $30^\circ\text{C}$**

Do minireaktora o pojemności 1 ml, zawierającego 100 mM potasowy bufor ortofosforanowy o pH 6,5, wprowadzono 2,6-dichloroindofenol (DCPIP) otrzymując końcowe stężenie DCPIP 0,15 mM, 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstrynę dającą końcowe stężenie 2% (w/v), 20  $\mu\text{l}$  5 mM roztworu diosgenonu w dioksanie, tak by finalne stężenie diosgenonu w środowisku wyniosło 0,1 mM (a tym samym stężenie dioksanu wynosiło 2% (v/v)) oraz 5  $\mu\text{g}$  rekombinowanego KSTD z *S. denitrificans*. Reakcję prowadzono w warunkach tlenowych, w temperaturze  $30^\circ\text{C}$ , przy ciągłym wstrząsaniu przez 20 minut. Mieszaninę reakcyjną analizowano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) stosując do rozdzielania fazę mobilną acetonitryl/woda (55% ACN przez 1 min, gradient do 98% przez 0,5 min, 98% ACN przez 4 min, przepływ 0,4 ml/min, T rozdzielania  $40^\circ\text{C}$ ) na kolumnie AMT HALO 90 Å RP-Amide, 2,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 75 mm. W takich warunkach następuje separacja reagentów, czas retencji produktu to 4,78 min a diosgenonu 5,15 min. Dla takich warunków uzyskano 95% konwersji substratu po 20 minutach reakcji i stężenie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu wynoszące 0,095 mM.

#### Przykład 5

**Otrzymywanie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu za pomocą oczyszczonego rekombinowanego enzymu KSTD z *Rhodococcus erythropolis* oraz 2,6-dichloroindofenolu jako reutleniaacza w pH 8,0, w temperaturze  $30^\circ\text{C}$**

Do minireaktora o pojemności 1 ml zawierającego 50 mM Tris-HCl o pH 8,0 wprowadzono DCPIP otrzymując końcowe stężenie 0,15 mM, 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstrynę dającą końcowe stężenie DCPIP 2% (w/v), 20  $\mu\text{l}$  5 mM roztworu diosgenonu w dioksanie, tak by finalne stężenie diosgenonu w środowisku wyniosło 0,1 mM (a tym samym stężenie dioksanu wynosiło 2% (v/v)) oraz 5,3  $\mu\text{g}$  rekombinowanego KSTD z *R. erythropolis*. Reakcję prowadzono w warunkach tlenowych, w temperaturze  $30^\circ\text{C}$ , przy ciągłym wstrząsaniu przez 20 minut. Mieszaninę reakcyjną analizowano za pomocą HPLC stosując do rozdzielania fazę mobilną acetonitryl/woda (55% ACN przez 1 min, gradient do 98% przez 0,5 min, 98% ACN przez 4 min, przepływ 0,4 ml/min, T rozdzielania  $40^\circ\text{C}$ ) na kolumnie AMT HALO 90 Å RP-Amide, 2,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 75 mm. W takich warunkach następuje separacja reagentów, czas retencji produktu to 4,78 min a diosgenonu 5,15 min. Dla takich warunków uzyskano 97% konwersji substratu po 20 minutach reakcji i stężenie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu wynoszące 0,097 mM.

#### Przykład 6

**Otrzymywanie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu za pomocą oczyszczonego rekombinowanego enzymu KSTD ze *Sterolibacterium denitrificans* oraz mieszaniny metosiarczanu fenazy i 2,6-dichloroindofenolu jako reutleniaacza w pH 9,0, w temperaturze  $30^\circ\text{C}$**

Do minireaktora o pojemności 1 ml zawierającego 100 mM bufor glicyna – wodorotlenek sodu o pH 9,0 wprowadzono DCPIP otrzymując jego końcowe stężenie 0,15 mM, 0,8 mM metosiarczanu

fenazyny (PMS), 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstrynę dającą końcowe stężenie 2% (w/v), 20  $\mu$ l 5 mM roztworu diosgenonu w dioksanie, tak by finalne stężenie diosgenonu w reaktorze wyniosło 0,1 mM (a tym samym stężenie dioksanu wynosiło 2% (v/v)), oraz 5  $\mu$ g rekombinowanego KSTD z *S. denitrificans*. Reakcję prowadzono w warunkach tlenowych, w temperaturze 30°C, przy ciągłym wstrząsaniu przez 20 minut. Mieszaninę reakcyjną analizowano za pomocą HPLC stosując do rozdzielania fazę mobilną acetonitryl/woda (55% ACN przez 1 min, gradient do 98% przez 0,5 min, 98% ACN przez 4 min, przepływ 0,4 ml/min, T rozdzielania 40°C) na kolumnie AMT HALO 90 Å RP-Amide, 2,7  $\mu$ m, 2,1 x 75 mm. W takich warunkach następuje separacja reagentów, czas retencji produktu to 4,78 min a diosgenonu 5,15 min. Dla takich warunków uzyskano 97% konwersji substratu po 20 minutach reakcji i stężenie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu wynoszące 0,097 mM.

#### **Przykład 7**

**Otrzymywanie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu za pomocą rekombinowanego enzymu KSTD ze *Sterolibacterium denitrificans* oraz metosiarczanu fenazyny jako reutleniaacza w pH 8,0, w temperaturze 30°C**

Do reaktora o pojemności 80 ml, zawierającego 100 mM potasowy bufor ortofosforanowy o pH 8,0 wprowadzono PMS w ilości dającej końcowe stężenie PMS 4 mM, 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstrynę dającą końcowe stężenie 3,2% (w/v), 1,6 ml 30 mM diosgenonu roztworu w 2-metoksyetanolu (EGME), tak by finalne stężenie diosgenonu w środowisku wyniosło 0,6 mM (a tym samym stężenie 2-metoksyetanolu wynosiło 2% (v/v)) oraz 4 mg rekombinowanego enzymu KSTD z *S. denitrificans*. Reakcję prowadzono w warunkach tlenowych, w temperaturze 30°C, przy ciągłym wstrząsaniu przez 15 minut. Mieszaninę reakcyjną analizowano za pomocą HPLC stosując do rozdzielania fazę mobilną acetonitryl/woda (55% ACN przez 1 min, gradient do 98% przez 0,5 min, 98% ACN przez 4 min, przepływ 0,4 ml/min, T rozdzielania 40°C) na kolumnie AMT HALO 90 Å RP-Amide, 2,7  $\mu$ m, 2,1 x 75 mm. W takich warunkach następuje separacja reagentów, czas retencji produktu to 4,78 min a diosgenonu 5,15 min. Dla takich warunków uzyskano 100% konwersji substratu po 15 minutach reakcji i stężenie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu wynoszące 0,6 mM.

#### **Przykład 8**

**Otrzymywanie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu za pomocą komórek *Escherichia coli* zawierających rekombinowany enzym KSTD ze *Sterolibacterium denitrificans* oraz 2,6-dichloroindofenolu jako reutleniaacza w pH 6,5, w temperaturze 30°C**

Do minireaktora o pojemności 1 ml, zawierającego 100 mM potasowy bufor ortofosforanowy o pH 6,5 wprowadzono DCPIP otrzymując końcowe stężenie DCPIP 0,15 mM, 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstrynę dającą końcowe stężenie 2% (w/v) oraz 20  $\mu$ l 5 mM roztworu diosgenonu w dioksanie, tak by finalne stężenie diosgenonu w środowisku wyniosło 0,1 mM (a tym samym stężenie dioksanu wynosiło 2% (v/v)) oraz 27,2 mg komórek *E. coli* zawieszonych w 34  $\mu$ l potasowego buforu ortofosforanowego o pH 8,0, zawierających rekombinowaną KSTD z *S. denitrificans*. Reakcję prowadzono w warunkach tlenowych, w temperaturze 30°C, przy ciągłym wstrząsaniu przez 20 minut. Mieszaninę reakcyjną analizowano za pomocą HPLC stosując do rozdzielania fazę mobilną acetonitryl/woda (55% ACN przez 1 min, gradient do 98% przez 0,5 min, 98% ACN przez 4 min, przepływ 0,4 ml/min, T rozdzielania 40°C) na kolumnie AMT HALO 90 Å RP-Amide, 2,7  $\mu$ m, 2,1 x 75 mm. W takich warunkach następuje separacja reagentów, czas retencji produktu to 4,78 min a diosgenonu 5,15 min. Dla takich warunków uzyskano 98% konwersji substratu po 20 minutach reakcji i stężenie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu wynosiło 0,098 mM.

#### **Przykład 9**

**Otrzymywanie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu za pomocą oczyszczonego rekombinowanego enzymu KSTD ze *Sterolibacterium denitrificans* oraz 2,6-dichloroindofenolu jako reutleniaacza w pH 6,5, w temperaturze 20°C**

Do minireaktora o pojemności 1 ml, zawierającego 100 mM potasowy bufor ortofosforanowy o pH 6,5, wprowadzono DCPIP otrzymując końcowe stężenie DCPIP 0,15 mM, 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstrynę dającą końcowe stężenie 2% (w/v), 20  $\mu$ l 5 mM roztworu diosgenonu w 2-metoksyetanolu, tak by finalne stężenie diosgenonu w środowisku wyniosło 0,1 mM (a tym samym stężenie 2-metoksyetanolu wynosiło 2% (v/v)), oraz 10  $\mu$ g rekombinowanego KSTD z *S. denitrificans*. Reakcję prowadzono w warunkach tlenowych, w temperaturze 20°C, przy ciągłym wstrząsaniu przez 20 minut. Mieszaninę reakcyjną analizowano za pomocą HPLC stosując do rozdzielania fazę mobilną acetonitryl/woda (55% ACN przez 1 min, gradient do 98% przez 0,5 min, 98% ACN przez 4 min, przepływ 0,4 ml/min, T rozdzielania 40°C) na kolumnie AMT HALO 90 Å

RP-Amide, 2,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 75 mm. W takich warunkach następuje separacja reagentów, czas retencji produktu to 4,78 min a diosgenonu 5,15 min. Dla takich warunków uzyskano 87% konwersji substratu po 20 minutach reakcji i stężenie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu wynoszące 0,087 mM.

#### **Przykład 10**

**Otrzymywanie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu za pomocą oczyszczonego rekombinowanego enzymu KSTD ze *Sterolibacterium denitrificans* oraz 2,6-dichloroindofenolu jako reutleniaacza w pH 6,5, w temperaturze 45°C**

Do minireaktora o pojemności 1 ml, zawierającego 100 mM potasowy bufor ortofosforanowy o pH 6,5, wprowadzono DCPIP otrzymując końcowe stężenie DCPIP 0,15 mM, 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstrynę dającą końcowe stężenie 2% (w/v), 20  $\mu\text{l}$  5 mM roztworu diosgenonu w 2-metoksyetanolu, tak by finalne stężenie diosgenonu w środowisku wyniosło 0,1 mM (a tym samym stężenie 2-metoksyetanolu wyniosło 2% (v/v)), oraz 5  $\mu\text{g}$  rekombinowanego KSTD z *S. denitrificans*. Reakcje prowadzono w warunkach tlenowych, w temperaturze 45°C, przy ciągłym wstrząsaniu przez 20 minut. Mieszaninę reakcyjną analizowano za pomocą HPLC stosując do rozdzielania fazę mobilną acetonitryl/woda (55% ACN przez 1 min, gradient do 98% przez 0,5 min, 98% ACN przez 4 min, przepływ 0,4 ml/min, T rozdzielania 40°C) na kolumnie AMT HALO 90 Å RP-Amide, 2,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 75 mm. W takich warunkach następuje separacja reagentów, czas retencji produktu to 4,78 min a diosgenonu 5,15 min. Dla takich warunków uzyskano 98% konwersji substratu po 20 minutach reakcji i stężenie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu wynoszące 0,098 mM.

#### **Przykład 11**

**Otrzymywanie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu za pomocą oczyszczonego rekombinowanego enzymu KSTD z *Rhodococcus erythropolis* oraz 2,6-dichloroindofenolu jako reutleniaacza w pH 8,0, w temperaturze 20°C**

Do minireaktora o pojemności 1 ml zawierającego 50 mM Tris-HCl o pH 8,0 wprowadzono DCPIP otrzymując końcowe stężenie DCPIP 0,15 mM, 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstrynę dającą końcowe stężenie 2% (w/v), 20  $\mu\text{l}$  5 mM roztworu diosgenonu w 2-metoksyetanolu, tak by finalne stężenie diosgenonu w środowisku wyniosło 0,1 mM (a tym samym stężenie 2-metoksyetanolu wyniosło 2% (v/v)), oraz 5,3  $\mu\text{g}$  rekombinowanego KSTD z *R. erythropolis*. Reakcję prowadzono w warunkach tlenowych, w temperaturze 20°C, przy ciągłym wstrząsaniu przez 20 minut. Mieszaninę reakcyjną analizowano za pomocą HPLC stosując do rozdzielania fazę mobilną acetonitryl/woda (55% ACN przez 1 min, gradient do 98% przez 0,5 min, 98% ACN przez 4 min, przepływ 0,4 ml/min, T rozdzielania 40°C) na kolumnie AMT HALO 90 Å RP-Amide, 2,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 75 mm. W takich warunkach następuje separacja reagentów, czas retencji produktu to 4,78 min a diosgenonu 5,15 min. Dla takich warunków uzyskano 100% konwersji substratu po 20 minutach reakcji i stężenie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu wynoszące 0,1 mM.

#### **Przykład 12**

**Otrzymywanie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu za pomocą oczyszczonego rekombinowanego enzymu KSTD z *Rhodococcus erythropolis* oraz 2,6-dichloroindofenolu jako reutleniaacza w pH 8,0, w temperaturze 45°C**

Do minireaktora o pojemności 1 ml zawierającego 50 mM Tris-HCl o pH 8,0 wprowadzono DCPIP otrzymując końcowe stężenie DCPIP 0,15 mM, 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstrynę dającą końcowe stężenie 2% (w/v), 20  $\mu\text{l}$  5 mM roztworu diosgenonu w 2-metoksyetanolu, tak by finalne stężenie diosgenonu w środowisku wyniosło 0,1 mM (a tym samym stężenie 2-metoksyetanolu wyniosło 2% (v/v)), oraz 5,3  $\mu\text{g}$  rekombinowanego KSTD z *R. erythropolis*. Reakcję prowadzono w warunkach tlenowych, w temperaturze 45°C, przy ciągłym wstrząsaniu przez 20 minut. Mieszaninę reakcyjną analizowano za pomocą HPLC stosując do rozdzielania fazę mobilną acetonitryl/woda (55% ACN przez 1 min, gradient do 98% przez 0,5 min, 98% ACN przez 4 min, przepływ 0,4 ml/min, T rozdzielania 40°C) na kolumnie AMT HALO 90 Å RP-Amide, 2,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 75 mm. W takich warunkach następuje separacja reagentów, czas retencji produktu to 4,78 min a diosgenonu 5,15 min. Dla takich warunków uzyskano 93% konwersji substratu po 20 minutach reakcji i stężenie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu wynoszące 0,093 mM.

#### **Przykład 13**

**Otrzymywanie (25R)-spirosta-1,4-dien-3-onu za pomocą oczyszczonego rekombinowanego enzymu KSTD ze *Sterolibacterium denitrificans* w reaktorze zasilanym substratem przy 3,2% (w/v) 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstrynie, w temperaturze 30°C**

Do reaktora o pojemności 80 ml, zawierającego 100 mM potasowy bufor ortofosforanowy o pH 8,0 wprowadzono PMS w ilości dającej końcowe stężenie PMS 4 mM, 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstrynę dającą końcowe stężenie 3,2% (w/v), 1,6 ml 30 mM diosgenonu rozpuszczonego w 2-metoksyetanolu (EGME), tak by finalne stężenie diosgenonu w środowisku wyniosło 0,6 mM (a tym samym stężenie 2-metoksyetanolu wynosiło 2% (v/v)), oraz 4 mg rekombinowanego enzymu KSTD z *S. denitrificans*. Reakcję prowadzono w warunkach tlenowych, w temperaturze 30°C, przy ciągłym wstrząsaniu przez 15 minut. Po tym czasie do mieszaniny dodano 1,6 ml 30 mM diosgenonu rozpuszczonego w 2-metoksyetanolu, tak by finalne stężenie 2-metoksyetanolu w reaktorze wyniosło 4% (v/v). Reakcję prowadzono przez kolejne 4 godziny i 15 minut. Mieszaninę reakcyjną analizowano za pomocą HPLC stosując do rozdzielania fazę mobilną acetonitryl/woda (55% ACN przez 1 min, gradient do 98% przez 0,5 min, 98% ACN przez 4 min, przepływ 0,4 ml/min, T rozdzielania 40°C) na kolumnie AMT HALO 90 Å RP-Amide, 2,7  $\mu$ m, 2,1 x 75 mm. W takich warunkach następuje separacja reagentów, czas retencji produktu to 4,78 min a diosgenonu 5,15 min. Dla takich warunków uzyskano 87% konwersji substratu po 4,5 godziny reakcji i stężenie (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-onu równe 1,044 mM.

#### **Przykład 14**

**Otrzymywanie (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-onu za pomocą oczyszczonego rekombinowanego enzymu KSTD ze *Sterolibacterium denitrificans* w reaktorze zasilanym substratem przy 8% (w/v) 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstrynie, w temperaturze 30°C**

Do reaktora o pojemności 80 ml zawierającego 100 mM potasowy bufor ortofosforanowy o pH 8,0 wprowadzono PMS w ilości dającej końcowe stężenie PMS 3 mM, 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstrynę dającą końcowe stężenie 8% (w/v) oraz 1,6 ml 30 mM diosgenonu rozpuszczonego w 2-metoksyetanolu (EGME), tak by finalne stężenie w reaktorze diosgenonu wyniosło 0,6 mM, (a tym samym stężenie 2-metoksyetanolu wynosiło 2% (v/v)), oraz 4 mg rekombinowanego enzymu KSTD z *S. denitrificans*. Transformację prowadzono w warunkach tlenowych, w temperaturze 30°C, przy ciągłym wstrząsaniu przez 45 minut. Po tym czasie do mieszaniny dodano 1,6 ml 30 mM diosgenonu rozpuszczonego w 2-metoksyetanolu, tak by finalne stężenie 2-metoksyetanolu w reaktorze wyniosło 4% (v/v). Reakcję prowadzono przez kolejne 4 godziny i 45 minut. Mieszaninę reakcyjną analizowano za pomocą HPLC stosując do rozdzielania fazę mobilną acetonitryl/woda (55% ACN przez 1 min, gradient do 98% przez 0,5 min, 98% ACN przez 4 min, przepływ 0,4 ml/min, T rozdzielania 40°C) na kolumnie AMT HALO 90 Å RP-Amide, 2,7  $\mu$ m, 2,1 x 75 mm. W takich warunkach następuje separacja reagentów, czas retencji produktu to 4,78 min a diosgenonu 5,15 min. Dla takich warunków uzyskano 69% konwersji substratu po 5,5 godziny reakcji i stężenie (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-onu równe 0,816 mM. Po tym czasie dodano 3,66 mg enzymu prowadząc dalej reakcję przez kolejne 1,5 godziny i uzyskując 100 % konwersję substratu oraz końcowe stężenie (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-onu wynoszące 1,2 mM.

Na tej drodze otrzymano 20,8 mg czystego produktu, (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-onu, (wydajność oczyszczania 52,6%, stopień konwersji 100%). Produkt oczyszczono metodą ekstrakcji ciecz-ciało stale stosując kolumnienki C18 PolarPlus® (J.M. Baker®), oddzielając PMS za pomocą 40% roztworu izopropanolu w wodzie, a produkt reakcji eluując za pomocą 100% izopropanolu.

Uzyskany produkt scharakteryzowano danymi spektralnymi, zmierzonymi za pomocą spektrometru NMR Bruker 400 MHz w deuterowanym chloroformie (CDCl<sub>3</sub>) i pokazanymi na załączonym rysunku, na którym widmo protonowe produktu <sup>1</sup>H NMR przedstawiono na fig. 1, a widmo węglowe <sup>13</sup>C-NMR przedstawiono na fig. 2.

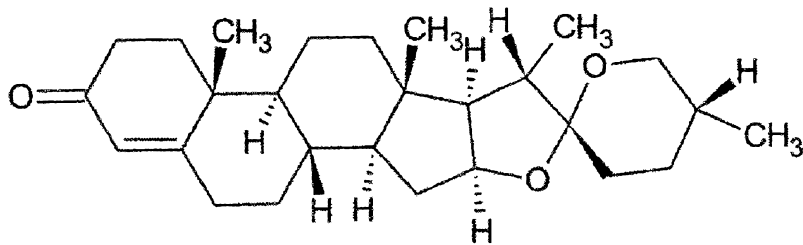
### **Zastrzeżenia patentowe**

1. Sposób wytwarzania (25*R*)-spirosta-1,4-dien-3-onu o wzorze 2 na drodze enzymatycznej selektywnej dehydrogenacji diosgenonu o wzorze 1, **znamienny tym**, że prowadzi się enzymatyczną regioselektywną dehydrogenację diosgenonu genetycznie zmodyfikowanymi komórkami *Escherichia coli* wykazujące ekspresję enzymu KSTD ze *Sterolibacterium denitrificans* Chol-1S (DSM: 13999), albo preparatem enzymatycznym o aktywności KSTD, uzyskanym ze szczepu bakterii *Sterolibacterium denitrificans* Chol-1S (DSM: 13999), o sekwencji identycznej do Sekwencji 1 lub podobnej do Sekwencji 1 przy identyczność sekwencji aminokwasowej nie mniejszej niż 70%, albo genetycznie zmodyfikowanymi ko-

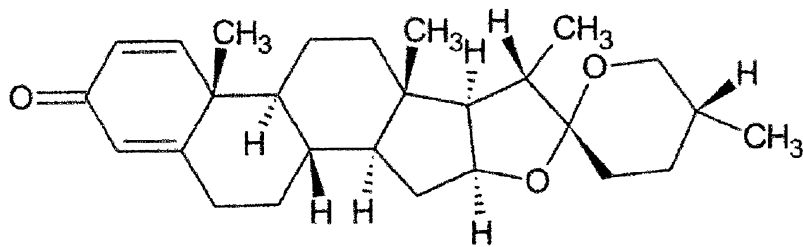
mórkami *Escherichia coli* wykazującymi ekspresję KSTD ze *Rhodococcus erythropolis* SQ1, albo preparatem enzymatycznym o aktywności KSTD uzyskanym ze szczepu bakterii *Rhodococcus erythropolis* SQ1, o sekwencji identycznej do Sekwencji 2 lub podobnej do Sekwencji 2 przy identyczności sekwencji nie mniejszej niż 70%, w środowisku wodno-organicznym, w obecności reutleniacza, którym jest 2,6-dichloroindofenol, metosiarczan fenazyny lub mieszanina 2,6-dichloroindofenolu i metosiarczanu fenazyny, w temperaturze od 20 do 45°C, a najlepiej w 30°C, w mieszaninie reakcyjnej, która zawiera:

- bufor zapewniający pH w zakresie 6,5–9,0, wybrany spośród potasowego buforu ortofosforanowego, buforu glicyna – wodorotlenek sodu lub buforu chlorowodoru tris(hydroksymetylo)aminometanowego,
  - wodny roztwór solubilizatora, którym jest 2-hydroksypropyl- $\beta$ -cyklodekstryna w ilości 0–10% (w/v),
  - rozpuszczalnik organiczny, którym jest 2-metoksyetanol, dioksan lub izopropanol w ilości 1–4% (v/v),
  - utrzymując biokatalityczną aktywność preparatu enzymatycznego o aktywności KSTD przez okres do 24 godzin, który to proces regioselektywnej dehydrogenacji diosgenonu ma następujący przebieg: do reaktora mieszalnikowego wprowadza się bufor, solubilizator rozpuszczony w wodzie, reutleniacz i diosgenon rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym, po czym inicjuje się reakcję dodając biokatalizator o aktywności KSTD, a po jej zakończeniu wydziela się uzyskany produkt metodą ekstrakcji albo chromatografii.
2. Sposób, wg zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako akceptor elektronowy enzymu wykorzystuje się 2,6-dichloroindofenol o stężeniu w środowisku reakcji przynajmniej 0,15 mM, przy pH 6,5 z zastosowaniem enzymu KSTD ze *Sterolibacterium denitrificans*.
  3. Sposób, wg zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako akceptor elektronowy enzymu wykorzystuje się metosiarczan fenazyny w zakresie stężeń w środowisku reakcji od 0,8 do 4 mM, przy pH 8,0 z zastosowaniem enzymu KSTD ze *Sterolibacterium denitrificans*.
  4. Sposób, wg zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako akceptor elektronowy enzymu wykorzystuje się mieszaninę 2,6-dichloroindofenolu i metosiarczanu fenazyny o stężeniach w mieszaninie reakcyjnej równych odpowiednio 0,15 i 0,8 mM, przy pH 9,0 z zastosowaniem enzymu KSTD ze *Sterolibacterium denitrificans*.
  5. Sposób, wg zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako akceptor elektronowy enzymu wykorzystuje się 2,6-dichloroindofenol o stężeniu w środowisku reakcji przynajmniej 0,15 mM, przy pH 8,0 z zastosowaniem enzymu KSTD z *Rhodococcus erythropolis*.
  6. Sposób, wg zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako akceptor elektronowy enzymu wykorzystuje się metosiarczan fenazyny o zakresie stężeń w środowisku reakcji 0,8 do 4 mM, przy pH 8,0 z zastosowaniem enzymu KSTD z *Rhodococcus erythropolis*.
  7. Sposób, wg zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako akceptor elektronowy enzymu wykorzystuje się mieszaninę 2,6-dichloroindofenolu i metosiarczanu fenazyny o stężeniach w mieszaninie reakcyjnej równych odpowiednio 0,15 i 0,8 mM, przy pH 9,0 z zastosowaniem enzymu KSTD z *Rhodococcus erythropolis*.
  8. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stężenie 2-hydroksypropyl- $\beta$ -cyklodekstryny w środowisku reakcji wynosi od 0 do 10% (v/w), a najlepiej 3–8% (v/w).

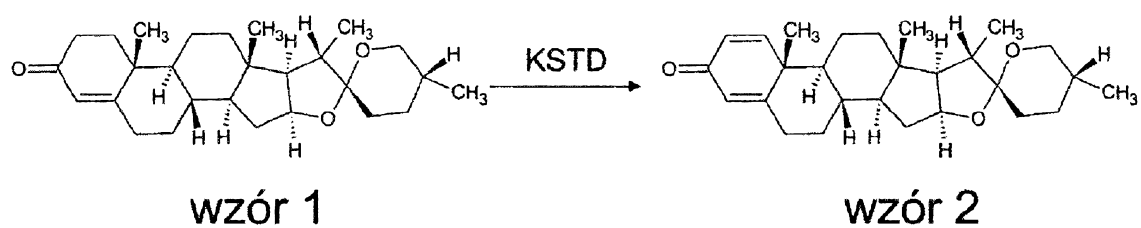
## Rysunki



wzór 1



wzór 2

**Schemat 1**

**Sekwencja 1 - Sekwencja aminokwasowa KSTD ze *Stereolibacterium denitrificans* Chol-1S (DSM: 13999)**

MSIETNTYDVIVVGGAGAMLAAARAHDLGLSVLVVEKSDKYGGTSAVSGGAVWIPNNSQMQIKDSFDEALTYLKA  
ATQGLVAEDRLLAYLESAPQMVEYINANMTLQYFPCHRYPDYYQHLPGAKPGGRTMEPMLFDAALLGDEFANLRM  
AYTGTLIMGKASMTATEAHVMLAKEPGWMLQVKSGLRYYLDLPWRLLKSRHDRKRGGLGNAMAAGLRHALLERKVP  
LWLNTPFESLITEGAENKRVTGIVVKRNGQTLQLTARRGVVLGAGGFERNQQMREQYLPKPTNAAWSATPPHNTG  
DTIRAAMDIGARAEELMDWAWWWVPSIHVPGEEAAQTGLFAERNLPGCIVVNGKQRFINEASPYLEFGAAMYENHARS  
GSAVPAWLIFDGKFRYNYPMGPLMPGQIQPDRKAWLKGKYYWRDDTLEGLAKQIGVDAAGLKQSVELNNQYAQDG  
KDREFDKGNNVFDRIYGYDYNVKNPCLAPIGKPPYYAMRVDAGDIGTKGGLLTDKDARVLDESRRPIEGLYCIGNN  
SASVMGKAYPGAGGTLGPAMTFGFRAANHIAASK

**Sekwencja 2 - Sekwencja aminokwasowa KSTD z *Rhodococcus erythropolis* SQ1**

MQDWTSECDVLVGSGGGALTGAYTAAQGLTTIVLEKTDTRFGGTSAYSGASIWLPGTQVQERAGLPDSTENART  
YLRALLGDAESERQDAYVETAPAVVALLEQNPNIIEFFRAFPDYKAEGRMDTGRSINPLDLDPADIGDLAGKVRPE  
LDQDRGTGDHAPGPMIGGRALIGRLLAAVQSTGKAELRTESVLTSLIVEDGRVVGAEVESGGETQRIKANRGLVMA  
AGGIEGNAEMREQAGTPGKAIWSMGPFGANTGDAISAGIAVGGATALLDQAWFCPGVEQPDGSAAFMVGVRGGL  
VVDSAGERYLNEQLPYDQFGRAMDAHDDNGSAVPSFMIFDSREGGGLPAICIPNTAPAKHLEAGTWVGADTLEELA  
AKTGLPADALRSTVEKFNDAKLVDEEFHRGEDPYDAFFCPPNGGANAALTAIENGPFFYAARIVLSDLGTKGGLVT  
DVNGRVLRADGSAIDGLYAAGNTSASLSGRFYPGPGVPLGTAMVFSYRAAQDMAK

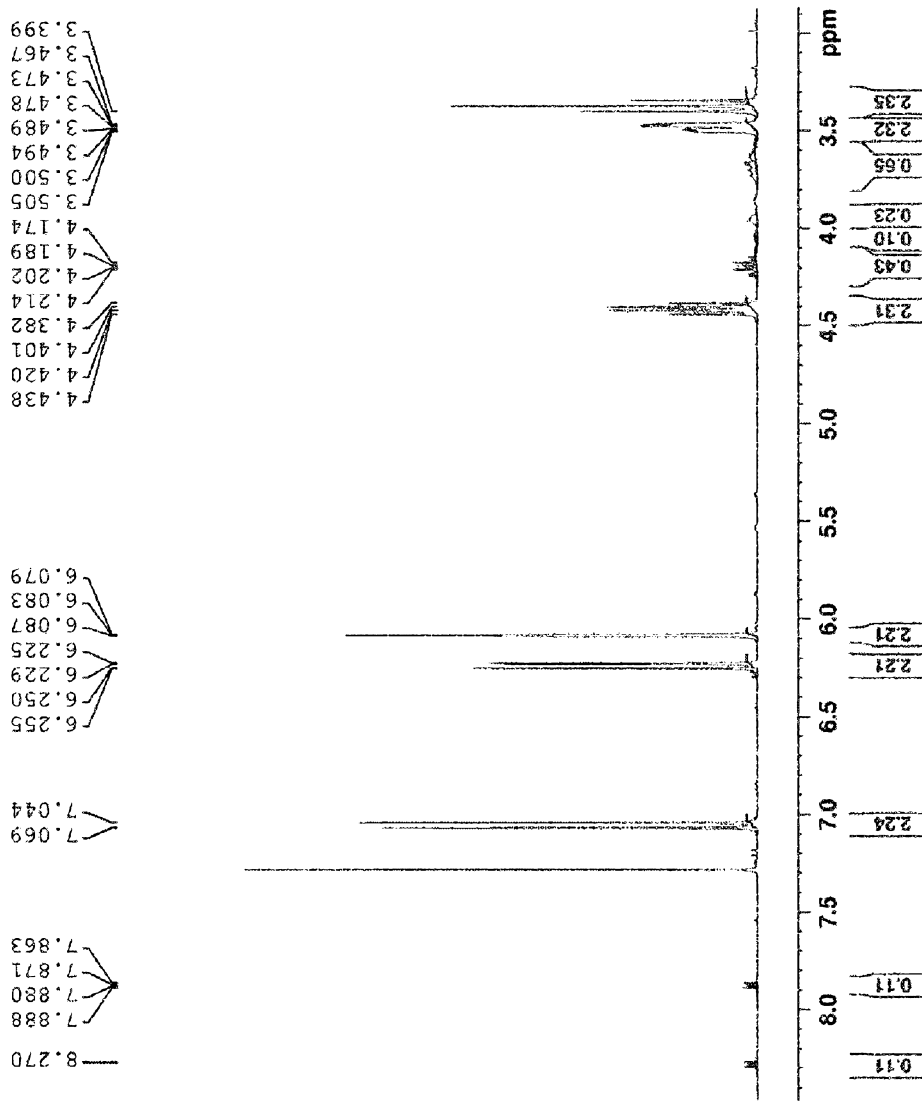


Fig. 1.

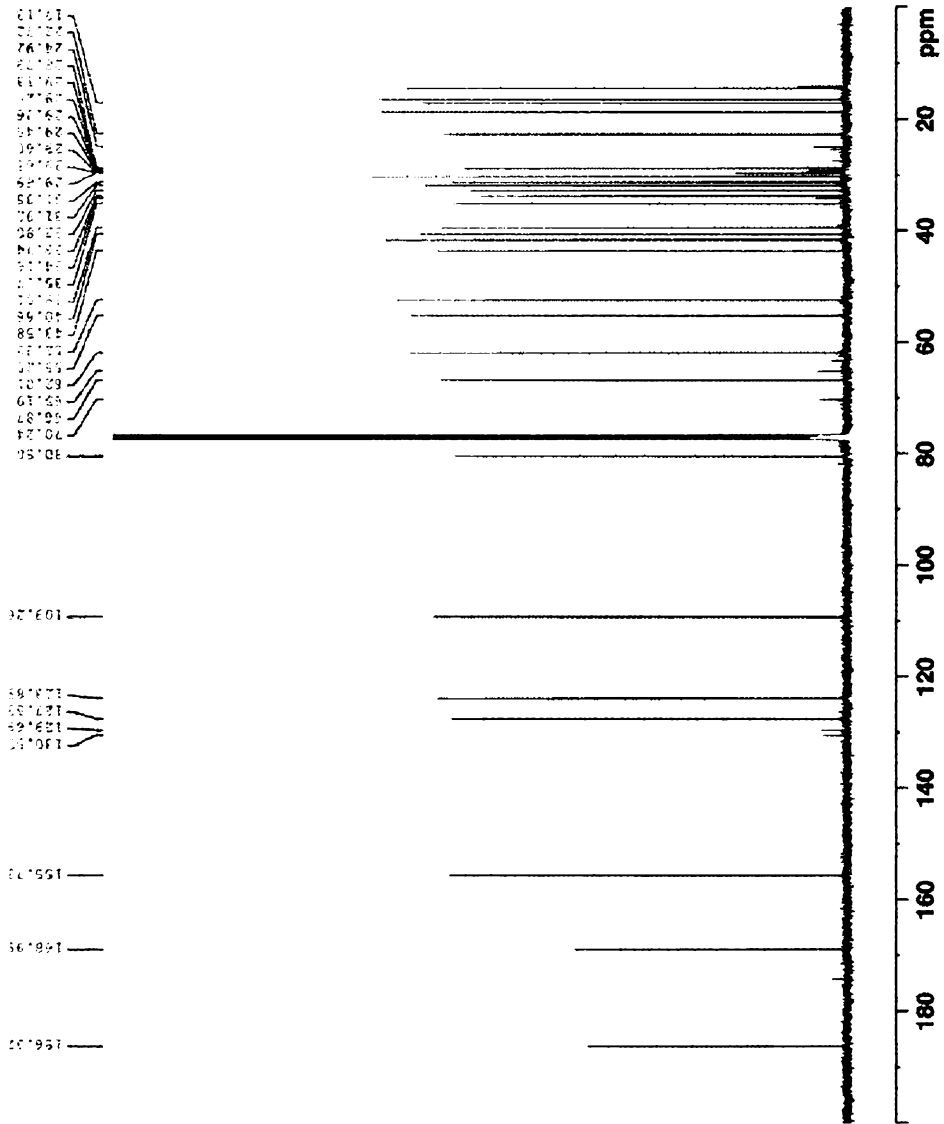


Fig. 2