

ENZYMOVÁ REVERZNÍ GLYKOSYLACE

LENKA WEIGNEROVÁ,
EVA RAJNOCHOVÁ-HERKOMMEROVÁ
a VLADIMÍR KŘEN

Laboratoř biotransformací, Mikrobiologický ústav, Akademie
věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, e-mail:
weigner@biomed.cas.cz

Došlo dne 8.XII. 1998

Klíčová slova: glykosidasy, reverzní glykosylace

Obsah

1. Úvod
2. Glykosyltransferasy versus glykosidasy
3. Obecná strategie reverzní glykosylace a následné izolace oligosacharidů
4. Glykosidasy v praxi
 - 4.1. Mannosidasy
 - 4.2. Hexosaminidasy
 - 4.3. Galaktosidasy a glukosidasy
5. Reverzní glykosylace v dvoufázových systémech
6. Závěr

1. Úvod

Glykosylace je významnou modifikací biologicky aktivních látek. Umožňuje konverzi lipofilních látek na hydrofilní, mění nejen jejich farmakokinetické vlastnosti (rozpuštnost, transport), ale i farmakodynamické účinky. Získaná nová látka pak může být též efektivnější prodrogou.

Zvláště v posledních 10 letech, kdy se rozvinulo poznání účinků některých sacharidů na molekulární úrovni^{1,2}, nabyly větší důležitosti speciální syntetické metody v chemii sacharidů. Chemická glykosylace vyžaduje většinou použití několikastupňové syntézy, což vede k nižším konečným výtěžkům. Proto se využití enzymových metod v této oblasti, stejně jako v celé organické syntéze, stává již běžně užívanou technikou. Rozšiřují se nejen nástroje - tj. použitelná škála enzymů, stále častěji dostupných komerčně, ale rozvíjejí se i nové techniky, které často popírají ortodoxní biochemické postupy.

Enzymatická glykosylace nachází praktické použití především při syntéze termodynamicky nepreferovaných glykosidických vazeb, jako jsou např. α -galaktopyranosidy nebo P-mannopyranosidy, dále u substrátů, které jsou citlivé k reakčním chemickým podmínkám, a tam, kde chemická glykosylace nedává žádané produkty - např. místo glykosidů se tvoří glykosylorthoestery.

2. Glykosyltransferasy versus glykosidasy

Pro enzymovou glykosylaci lze použít dva základní typy enzymů: glykosyltransferasy (EC 2.4.) a glykosidasy³ (EC 3.2.).

Glykosyltransferasy jsou enzymy, které syntetizují glykosidickou vazbu za fyziologických podmínek. Tyto enzymy (většinou membránově vázané) využívají jako substráty cukerné nukleosidy. Glykosyltransferasy vykazují (i za podmínek *in vitro*) striktní anomerní selektivitu (tvorba α - nebo β -glykosidické vazby) a též striktní regioselektivitu. Akceptorem jsou většinou již existující glykosidy a enzymy rozpoznávají na akceptoru jednu až dvě sacharidické jednotky a typ vazby mezi nimi. Právě tento fakt představuje největší omezení v syntéze, neboť škála použitelných substrátů je dána touto selektivitou. Kromě toho jsou glykosyltransferasy v přírodních zdrojích obsaženy v relativně malém množství a jsou poměrně nestabilní. V poslední době se stále častěji využívá klonovaných glykosyltransferas a potřeba drahých nukleotidů je řešena *in situ* generací multienzymovými systémy^{2,4}.

Glykosidasy jsou enzymy, které za fyziologických podmínek glykosidickou vazbu štěpí. Úpravou reakčních podmínek *in vitro* je však možné je použít k syntéze nové glykosidické vazby. Glykosidasy jsou selektivní vůči typu štěpené vazby, tj. rozlišují α a β anomery. Ne zcela striktní selektivitu projevují, v některých případech, k typu hydrolyzovaného cukru (např. v případě hexosaminidasy, může být odštěpovaným cukrem N-acetylglukosamin nebo N-acetylgalaktosamin). Nejmenší selektivitu mají glykosidasy k části sloučeniny, na kterou je cukerný zbytek navázán (oligosacharid, aglykon apod.). Glykosidy stejného typu, ale s různými aglykony, se liší většinou hodnotou K_m .

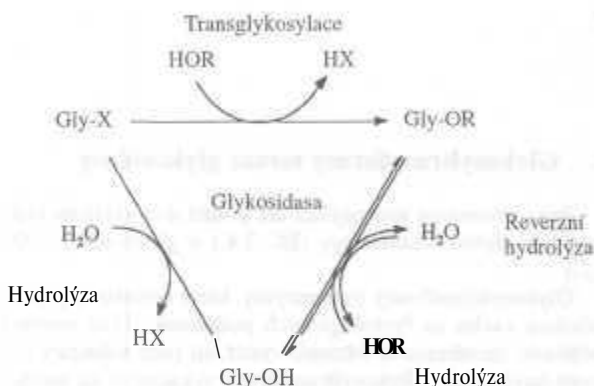
Hlavní nevýhodou při syntéze glykosidů pomocí glykosidas jsou malé výtěžky a nízká regioselektivita⁴. Existují však možnosti, jak posunout reakční rovnováhu ve prospěch syntézy a dosáhnout tak vyšších výtěžků (přídavek organického rozpouštědla⁵ nebo anorganických solí⁶).

Glykosidasy mohou katalyzovat syntetické reakce buď jednoduchou reverzní hydrolýzou nebo přenosem glykosylového zbytku z již existujícího glykosidu-donoru - na akceptor (transglykosylace), viz obr. 1.

Tyto schopnosti, tj. možnost reverze hydrolytické aktivity, byly popsány i u jiných enzymů, např. u lipas nebo proteas^{7,8}.

Transglykosylace, při které glykosidas přenáší glykosidický zbytek z existujícího glykosidu (substrátu) na cukerný nebo necukerný akceptor, je řízena kineticky a probíhá relativně rychle. Výtěžek je dán, kromě reakčních podmínek, i reakční dobou, přičemž její prodlužování většinou vede ke snížení výtěžku (následnou hydrolýzou produktu, který je zároveň substrátem pro enzym). Jako glykosyl-donory se většinou používají aktivované glykosidy, často nitrofenylglykosidy, které jsou však na rozdíl od příslušných monosacharidů dosti drahé (p-nitrofenyl- β -D-mannopyranosid 150 US \$/g).

V tomto přehledu se soustředíme pouze na enzymově katalyzovanou reverzní glykosylaci, tedy reakci, kdy zdrojem glykosylu je volný monosacharid.

Obr. 1. Schéma reakcí katalyzovaných glykosidasami⁴

3. Obecná strategie reverzní glykosylace a následné izolace oligosacharidů

Pro přípravu oligosacharidů reverzní glykosylací lze s výhodou využít kontinuální reakční systém, tedy kolonu s imobilizovaným enzymem a kolonu s aktivním uhlím zapojené v sérii. Princip spočívá v silnější adsorpci oligosacharidů než monosacharidů na aktivní uhlí. Ze systému jsou tedy kontinuálně odstraňovány produkty reakce, což vede k posunu reakční rovnováhy ve prospěch syntézy. Po ukončení reakce jsou vyšší oligosacharidy eluovány z kolony s aktivním uhlím stoupajícím gradientem ethanolu ve vodě. Zbylé monosacharidy, které se na kolonu neváží, je možno znovu použít^{9,10}.

Výtěžky jednotlivých regioizomerů lze ovlivnit reakčními podmínkami a metodou reakce. Ve vsádkovém uspořádání jsou konečné výtěžky kombinací reverzní a transglykosylačních reakcí. U kolonového uspořádání, kde jsou disacharidy ihned adsorbovány na aktivní uhlí a transglykosylace je prakticky eliminována, jsou produkty výsledkem pouze reverzní hydrolyzy. Reakčním uspořádáním lze tedy ovlivnit tvorbu určitého disacharidu (určitého typu vazby¹¹), tab. I.

Tabulka I

Výtěžky α -D-glukosyl-D-fruktosy získané enzymovou kondenzací D-glukosy a D-fruktosy užitím α -glukosidasy (*Saccharomyces sp.*) v závislosti na reakčním systému¹¹

Uspořádání	Výtěžky [%]	Typ vazby			
		α -(1→1)	α -(1→4)	α -(1→5)	α -(1→6)
Vsádkové	50,3	53	28	9	10
Kolonové	9,6	28	52	15	4

4. Glykosidas v praxi

Většina hydrolas není při použití pro syntézu regioselektivní. Enzymy někdy upřednostňují syntézu vazby stejného typu jaký má její přirozený substrát.

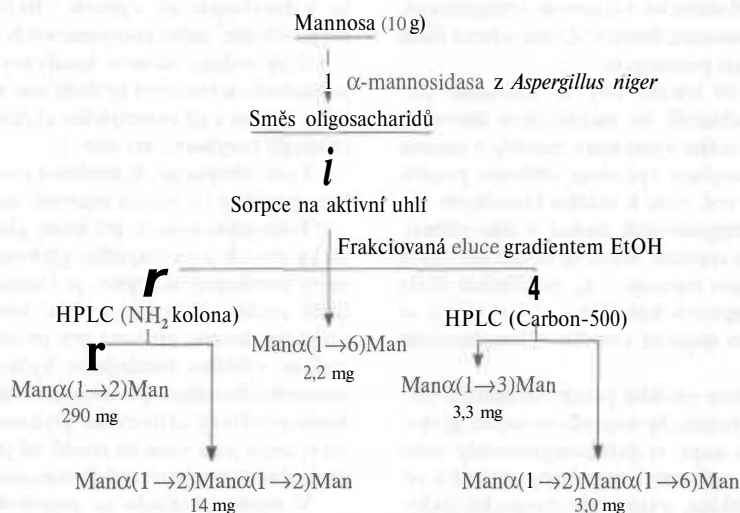
V tabulce II uvádíme přehled konkrétních aplikací glykosidas využitých v modu „reverzní glykosylace“.

4.1. Mannosidas

Použití α -mannosidas pro reverzní glykosylaci vyžaduje vysokou koncentraci volné mannose (5 M) a vyšší teplotu (50 °C) (α -mannosidas jsou většinou termostabilní, takže aktivita zůstává zachována až několik dnů).

Řada mannooligosacharidů byla připravena působením α -mannosidas z *Aspergillus niger*¹², obr. 2. Jejich chemická příprava by zahrnovala mnoho kroků (blokaci a deblokaci reaktivních skupin). Jednoduché použití α -(1→2)mannosyltransferas dává sice vysoké výtěžky, ale pouze jeden typ produktu. Při volbě metody přípravy žádané látky je nutné uvažovat i složitost izolace v případě vzniku regioizomerů.

Mezi α -mannosidasami lze však nalézt i enzymy s vysokou regioselektivitou. Specifická (1→2) α -mannosidasa byla izolována z *Aspergillus phoenicis*¹³ a byla použita pro syntézu α -(1→2) mannobiosy a mannotriosy. Změna preference synte-

Obr. 2. Schéma izolací mannooligomerů¹²

tizované vazby ($\alpha(1\rightarrow6)$) byla však zjištěna po imobilizaci α -mannosidasy¹⁴.

Schopnost reverzní glykosylace byla nalezena i u α -mannosidas rostlinného původu: např. enzym z *Canavalia ensiformis* byl použit pro přípravu mannobiosy (vznikaly všechny typy regioizomerů), pro kondenzaci mannosy s jinými mono-, di- případně trisacharidy¹⁵ a také reverzní glykosylaci a glykonů; alkaloidů - elymoklavinu, chanoklavinu a ergometrinu¹⁶ a pyridoxinu¹⁷. Rovněž α -mannosidasu z *Vigna umbellata* lze použít pro přípravu mannobios typu $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}$, $\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)\text{Man}$ a $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$, výtěžek jednotlivých regioizomerů je závislý na době trvání reakce (s prodlužující se dobou reakce roste podíl $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$)¹⁸.

Syntetická příprava P-mannopyranosidů je značně obtížná, a proto je enzymová alternativa výhodou. Zde vyniknou přednosti reverzní glykosylace, protože aktivovaný donor (3-*p*NP-Man pro transglykosylaci je velmi drahý.

Regioselektivní (3-mannosidas z plísně *Rhizopus niveus* byla použita pro reverzní glykosylaci za vzniku disacharidu $\text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{Man}$ a $\text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{Man}\beta(1\rightarrow4)\text{Man}$ bez vedlejších produktů¹⁹.

4.2. Hexosaminidasy

Chemická syntéza glykosidů obsahující aminocukry není jednoduchá a vyžaduje mj. chránění aminoskupiny pro zajištění anomerní selektivity. Jednou z nezbytných podmínek pro úspěšnou reverzní glykosylaci je vysoká koncentrace reaktantů. V případě β -*N*-acetylhexosaminidasy je však enzym

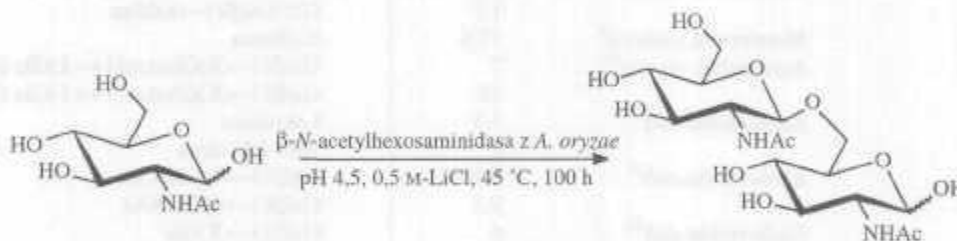
silně inhibován *N*-acetylglukosaminem ($K_i = 1,6 \text{ mM}$) tak, že kondenzační reakce za běžně používaných podmínek^{3,20} je prakticky nemožná (výtěžky < 1 %).

Užitím β -*N*-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* byl připraven kondenzací *N*-acetylglukosaminu (1,5 M) 2-acetamido-6-*O*-(2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-deoxy-D-glucopyranosid (obr. 3). Aktivita vody zde byla snížena přidávkem vyšší koncentrace anorganické soli (LiCl nebo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,4-0,7 M), což vedlo k posunu rovnováhy ve prospěch tvorby produktu (výtěžek 14 %). Kromě toho přidávky anorganických solí, především $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, stabilizují enzymovou aktivitu⁶.

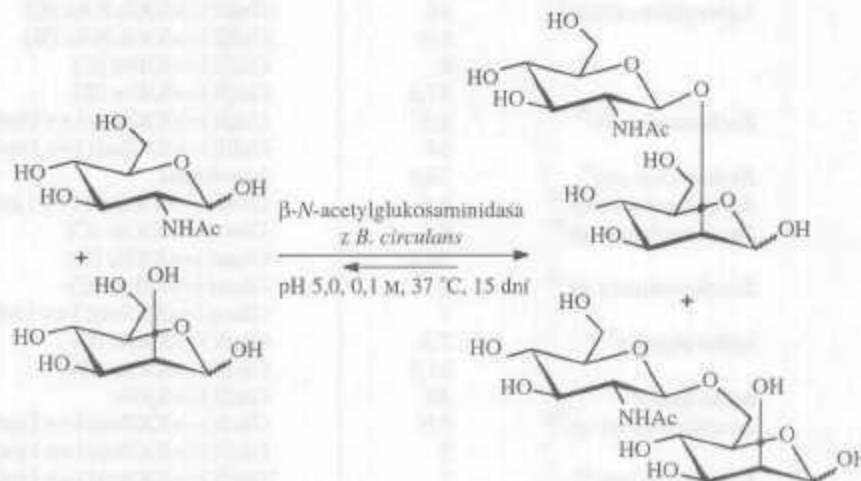
Zajímavým příkladem je kondenzace dvou různých sacharidů, 2-deoxy-2-*N*-acetylglukosaminu (2 M) a mannosy (9 M), katalyzované β -*N*-acetylhexosaminidasou z *Canavalia ensiformis* nebo *Bacillus circulans*. S relativně malými výtěžky byly tak připraveny disacharidy $\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow2)\text{Man}$ (0,23 %) a $\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow6)\text{Man}$ (1,7 %)²¹.

4.3. Galaktosidasy a glukosidasy

Rada homo- a hetero- disacharidů nebo oligosacharidů, jejichž chemická syntéza by vyžadovala více kroků (blokáce, deblokace, izolační mezikroky), byla připravena užitím α a β -glukosidas, a α a β -galaktosidas a glukoamylas z různých zdrojů v systému reverzní glykolysy (tab. II). Společným znakem těchto jednostupňových reakcí je vysoká koncentrace volného cukru (3-5 M), vyšší reakční teplota (-50 °C).



Obr. 3. Enzymově katalyzovaná kondenzace 2-acetamido-6-*O*-(2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl)-2-deoxy-D-glucopyranosid⁶



Obr. 4. Enzymová kondenzace 2-deoxy-2-*N*-acetylglukosaminu a mannosy²¹

Tabulka II
Glykosidy připravené enzymaticky reverzní hydrolyzou

Enzym	Zdroj	Výtěžek [%]	Produkt
a-Mannosidasa	<i>Aspergillus niger</i> ¹²	3	Man α (1 $\rightarrow$ 2)Man
		<0,1	Man α (1 $\rightarrow$ 3)Man
		<0,2	Man α (1 $\rightarrow$ 2)Man α (1 $\rightarrow$ 2)Man
		<0,1	Man α (1 $\rightarrow$ 2)Man α (1 $\rightarrow$ 6)Man
		<0,1	Man α (1 $\rightarrow$ 6)Man
	<i>Aspergillus phoenicis</i> ¹³	22	Man α (1 $\rightarrow$ 2)Man
		8	Man α (1 $\rightarrow$ 2)Man α (1 $\rightarrow$ 2)Man
		2,7	Man α (1 $\rightarrow$ 2)Man α (1 $\rightarrow$ 2)Man α (1 $\rightarrow$ 2)Man
	<i>Aspergillus phoenicis</i> ¹⁴	2-88	Man α (1 $\rightarrow$ X)Man
			Man α (1 $\rightarrow$ 2)Man
			Man α (1 $\rightarrow$ 3)Man
		0-38	Man α (1 $\rightarrow$ 6)Man
			řada heterodisacharidů obsahující mannosu
	<i>Canavalia ensiformis</i> ¹⁷	2,3	Pyridoxin α -mannopyranosidasy
	<i>Canavalia ensiformis</i> ¹⁶	11	Chanoklavin α -mannopyranosidasy
		18	Elymoklavin α -mannopyranosidasy
	<i>Vigna unguiculata</i> ¹⁸	13	Ergometrin α -mannopyranosidasy
			Man α (1 $\rightarrow$ 2)Man
		2-20	Man α (1 $\rightarrow$ 3)Man
P-Mannosidasa	<i>Rhizopus niveus</i> ¹⁹	0,5	Man β (1 $\rightarrow$ 4)Man
		0,2	Man β (1 $\rightarrow$ 4)Man β (1 $\rightarrow$ 4)Man
β -N-Acetylhexosaminidasa	<i>Aspergillus oryzae</i> ⁶	14	GlcNAc β (1 $\rightarrow$ 6)GlcNAc
	<i>Bacillus circulans</i> ¹⁹	0,23	GlcNAc β (1 $\rightarrow$ 2)Man
		1,7	GlcNAc β (1 $\rightarrow$ 6)Man
α -Galaktosidasa	<i>Mortierella vinacea</i> ⁹	17,6	Rafinosa
β -Galaktosidasa	<i>Aspergillus oryzae</i> ¹⁰	7	Gal β (1 $\rightarrow$ X)Glc α , α (1 $\leftrightarrow$ 1)Glc (C) ^{a,c}
		18	Gal β (1 $\rightarrow$ X)Glc α , α (1 $\leftrightarrow$ 1)Glc (B) ^b
		3,3	Laktulosa
	<i>Escherichia coli</i> ³¹	8	Allo-laktulosa
	<i>Escherichia coli</i> ³¹	0,9	Gal β (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc
		9,1	Gal β (1 $\rightarrow$ 6)GlcNAc
	<i>Escherichia coli</i> ³²	6	Gal β (1 $\rightarrow$ X)Glc
		16	Gal β (1 $\rightarrow$ X)GlcNAc
		11,3	Gal β (1 $\rightarrow$ X)Fru (C)
	<i>Aspergillus oryzae</i> ³²	55	Gal β (1 $\rightarrow$ X)Fru (B)
		14	Gal β (1 $\rightarrow$ X)GlcNAc (C)
		8,9	Gal β (1 $\rightarrow$ X)GlcNAc (B)
		8	Gal β (1 $\rightarrow$ X)Fru (C)
		57,6	Gal β (1 $\rightarrow$ X)Fru (B)
	<i>Escherichia coli</i> ¹⁰	4,5	Gal β (1 $\rightarrow$ X)Glc α (1 $\leftrightarrow$ 1)aGlc (C)
		14	Gal β (1 $\rightarrow$ X)Glc α (1 $\leftrightarrow$ 1)aGlc (B)
	<i>Escherichia coli</i> ⁹	10,6	Isorafinosa
α -Glukosidasa	<i>Saccharomyces sp.</i> ¹¹	9,6	Glu α (1 $\rightarrow$ X)Glc α (1 $\leftrightarrow$ 1)aGlc (C)
		5,6	Glu α (1 $\rightarrow$ X)Glc (C)
	<i>Saccharomyces sp.</i> ⁹	30,4	Glu α (1 $\rightarrow$ X)Glc (B)
		2	Glu α (1 $\rightarrow$ X)Fru (C)
	<i>Saccharomyces sp.</i> ¹⁰	7	Glu α (1 $\rightarrow$ X)Glc α (1 $\leftrightarrow$ 1)aGlc (B)
β -Glukosidasa	hořké mandle ³³	7,8	Glc β (1 $\rightarrow$ X)Glc (C)
		31,3	Glc β (1 $\rightarrow$ X)Glc (B)
	hořké madle ²⁰	40	Glc β (1 $\rightarrow$ X)Glc
	<i>Saccharomyces sp.</i> ¹⁰	0,9	Glc β (1 $\rightarrow$ X)Glc α (1 $\leftrightarrow$ 1)aGlc (C)
		5	Glc β (1 $\rightarrow$ X)Glc α (1 $\leftrightarrow$ 1)aGlc (B)
	<i>Rhizopus niveus</i> ¹⁰	7	Glc β (1 $\rightarrow$ X)Glc α (1 $\leftrightarrow$ 1)aGlc (C)

Tabulka II – pokračování

Enzym	Zdroj	Výtěžek [%]	Produkt
Glukoamylasa	<i>Penicillium funiculosum</i> ³³	14	Glcβ(1→X)Glcα(1↔1)αGlc (B)
		2,1	Glcβ(1→X)Glc (C)
		30,5	Glcβ(1→X)Glc (B)
	<i>Aspergillus niger</i> ³⁴	0-6,5	řada heterodisacharidů obsahující glukosu
	<i>Rhizopus niveus</i> ¹⁰	2	Glcα(1→X)Glcα(1↔1)αGlc (C)
	<i>Rhizopus sp.</i> ³³	14	Glcα(1→X)Glcα(1↔1)αGlc (B)
		2,3	Glcα(1→X)Glc (C)
		3,1	Glcα(1→X)Glc (B)

^a C - kolonové uspořádání (column), ^b B - vsádkové uspořádání (batch), ^c 1→X = směs regioizomerů

Tabulka III

Alkyl- a aryl-glykosidy připravené enzymaticky reverzní hydrolyzou

Enzym	Zdroj	Výtěžek [%]	Produkt
β-Glukosidasa	hořké mandle ²⁴	4-12	řada alkyl a aryl glukosidů
		61	Glcβ-D-(CH ₂) ₆ OH
		7	Glcβ-D-(CH ₂) ₆ NHCOCF ₃
	hořké mandle ²⁵	17	Glcβ-D-S(CH ₂) ₃ SH
		62	Allyl-β-D-Glc
		40	Benzyl-β-D-Glc
	hořké mandle ²⁶	15	Allyl-β-D-Gal
		61	Glcβ-D-(CH ₂) ₆ OH
		50	Glcβ-D-(CH ₂) ₃ CH=CH ₂
	hořké mandle ²⁷	1 1	Glcβ-D-(CH ₂) ₂ Si(CH ₃) ₃
		17	2-Hydroxybenzyl-β-D-Glc
		8	n-Octyl-β-D-Glc
	hořké mandle ²⁹	0,6-1,6	β-D-glukosidy primárních alkoholů (C = 5-12)
	hořké mandle ²⁸	6-60	β-D-glukosidy mono-alkanolů (C = 3-6)
	hořké mandle ³⁰	42-65	P-D-glukosidy diolů (C4 a C5)
		44	n-Butyl-β-D-Glc
		30-70	n-Alkyl-β-D-Glc (C = 6-12)
β-N-Acetylhexosaminidasa	<i>Aspergillus oryzae</i> ⁶	8	n-Octyl-β-D-Glc
	<i>Rhizopus oryzae</i> ²⁸	40	But-3-en-2-yl-glukosid
Glukoamylasa	<i>Aspergillus oryzae</i> ⁶	4-6	Benzyl-β-D-GlcNAc
	<i>Rhizopus oryzae</i> ²⁸	0-5,6	P-D-glukosidy mono-alkanolů (C = 3-6)
β-Mannosidasa	<i>Helix pomatia</i> ⁵	2-51	P-D-glukosidy diolů (C4 a C5)
	<i>Aspergillus niger</i> ⁵	12	Man-β-D-(CH ₂) ₆ OH
α-Galaktosidasa	<i>Aspergillus niger</i> ⁵	47	Galα-D-(CH ₂) ₆ OH
	<i>Aspergillus niger</i> ⁵	37	Galα-D-(CH ₂) ₃ CH=CH ₂
β-Galaktosidasa	<i>Aspergillus oryzae</i> ⁵	48	Galβ-D-(CH ₂) ₆ OH
	<i>Aspergillus oryzae</i> ⁵	22	Galβ-D-(CH ₂) ₃ CH=CH ₂

5. Reverzní glykosylace v dvoufázových systémech

Zvláštním způsobem je využití reverzní glykosylace při přípravě alkyl a aryl glykosidů. Alkohol v reakční směsi má jednak funkci akceptoru glykosylu a jednak upravuje reakční podmínky, tj. snižuje termodynamickou aktivitu vody v reakci (pro účinek enzymu je nezbytně nutné minimální množství vody v reakci), a posouvá tak průběh reakce směrem k synté-

ze^{5,6,22,23}. U vyšších alkoholů probíhá reakce ve dvoufázovém systému. V některých případech dochází ke kontinuální extraci vznikajícího glykosidu do organické fáze, reakční rovnováha se posouvá ve prospěch syntézy a zjednodušuje se i následná izolace produktu.

Dobrých výsledků při kondenzaci alkoholů a glukosy bylo dosaženo použitím β-glukosidasy z hořkých mandlí (tab. III). Tento enzym je stabilní v přítomnosti organických rozpouštědel, a to i za vyšších teplot (~60 °C). Reakce probíhá velmi dobře s aromatickými sloučeninami. Maximální stability

a současně optimální syntetické aktivity bylo dosaženo v 90 % vodném roztoku acetonitrilu, *tert*-butanolu nebo acetonu. Se zvýšením obsahu vody se rychlost reakce sice zvýší, ale výťažky se snižují^{24,25}.

Bylo prokázáno, že kondenzací glukosy a alkoholů (C_2-C_{12}) za katalýzy β -glukosidasou z hořkých mandlí vznikají alkyl glukosidy, a to jak v případě alkoholů primárních, sekundárních β -alkoholů a s malými výťažky i sekundárních γ -alkoholů²⁶⁻³⁰. Výťažky reakcí jsou nejvyšší (70 % vztaženo na glukosu) u 1-alkylglukosidů a klesají s prodlužujícím se řetězcem alkoholů²⁷. Tyto enzymové glykosylace se v současnosti využívají průmyslově při výrobě neionických detergentů.

6. Závěr

Aplikace enzymů v syntézách efektivně doplňují a dokonce i nahrazují složité organické syntézy sloučenin s důležitými biologickými funkcemi. Významné jsou enzymové syntézy heterooligosacharidů, jejichž biologická využitelnost stále roste¹.

Reverzní glykosylace je relativně jednoduchou metodou přípravy oligosacharidů. Jedná se o jednostupňovou reakci, která je zvláště výhodná pro glykosylaci substrátů s jednou OH-skupinou, kdy je eliminována tvorba regioizomerů. Při přípravě homo oligomerů jsou tyto reakce vhodné pro *scale-up*. Tvorba různých regioizomerů je většinou dána typem (původem) enzymu, takže při vhodném výběru enzymu se typy produktů dají vhodně kontrolovat. Rozvoj nových technik - použití dvoufázových soustav, přídavky organických solí a kosolventů - které se objevují v poslední době, umožňují využití glykosidas, u kterých reverzní glykosylace nebyla prakticky použitelná.

Nižší cena donorů (volné sacharidy) a výhoda jednostupňové reakce představuje efektivní možnost průmyslového využití reverzní hydrolýzy. Některé oligosacharidy, např. oligomannosidy jsou např. potenciálně využitelné jako potravinářská aditiva (tzv. „nutraceuticals“).

Seznam zkratk

Fru	Fruktofuranosa
Gal	Galaktopyranosa
Glc	Glukopyranosa
GlcNAc	2-Deoxy-2-iV-acetylglukosamin
Man	Mannopyranosa
pNP- β Man	p-Nitrofenyl- β -D-mannopyranosid

Práce autorů v jejich laboratoři byla podpořena granty AV ČR č. A 6020605 a GA ČR č. 203/96/1267.

LITERATURA

1. Bezouška K., Yuen Ch.T., O'Brien J., Childs R. A., Chai W., Lawson A. M., Drbal K., Fišerová A., Pospíšil M., Feizi T.: *Nature* 372, 150 (1994).
2. Wong C., Halcomb R. A., Ichikawa Y., Kajimoto T.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 34, 521 (1995).
3. Monsan P., Paul F.: *FEMS Microbiol. Rev.* 16, 187 (1995).

4. Křen V., Thiem J.: *Chem. Soc. Rev.* 26, 463 (1997).
5. Vic G., Hastings J. J., Crout D. H. G.: *Tetrahedron: Asymmetry* 7, 1973 (1996).
6. Rajnochová E., Dvořáková J., Huňková Z., Křen V.: *Biotechnol. Lett.* 19, 869 (1997).
7. Björklin F., Godtfredsen S.E., Kirk O.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1989, 934.
8. Crout D. H. G., Gaudet V. S. B., Hallinan K. O.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* 1993, 805.
9. Ajisaka K., Fujimoto H.: *Carbohydr. Res.* 185, 139 (1989).
10. Ajisaka K., Fujimoto H.: *Carbohydr. Res.* 199, 227 (1990).
11. Fujimoto H., Ajisaka K.: *Biotechnol. Lett.* 10, 107 (1988).
12. Ajisaka K., Matsuo I., Isomura M., Fujimoto H., Shirakabe M., Okawa M.: *Carbohydr. Res.* 270, 123 (1995).
13. Suwasono S., Rastall R. A.: *Biotechnol. Lett.* 18, 851 (1996).
14. Suwasono S., Rastall R. A.: *Biotechnol. Lett.* 20, 1517 (1998).
15. Rastall R. A., Rees N. H., Wait R., Adlard M. W., Bucke C.: *Enzyme Microb. Technol.* 14, 53 (1992).
16. Ščigelová M., Křen V., Nilsson K. G. I.: *Biotechnol. Lett.* 16, 683 (1994).
17. Weignerová L., Suzuki Y., Huňková Z., Sedmera P., Havlíček V., Marek R., Křen V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 64, 1325 (1999).
18. Wongvithoonyporn P., Bucke C.H., Svasti J.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 62, 613 (1998).
19. Fujimoto H., Isomura M., Ajisaka K.: *Biosci., Biotech., Biochem.* 61, 164 (1997).
20. Ajisaka K., Nishida H., Fujimoto H.: *Biotechnol. Lett.* 9, 243 (1987).
21. Fujimoto H., Isomura M., Miyazaki T., Matsuo I., Walton R., Sakakibara T., Ajisaka K.: *Glycoconjugate J.* 17, 75 (1997).
22. Vic G., Thomas D., Crout D. H. G.: *Enzyme Microb. Technol.* 20, 597 (1997).
23. Vic G., Biton J., Beller D., Michel J. M., Thomas D.: *Biotechnol. Bioeng.* 46, 109 (1994).
24. Vic G., Thomas D.: *Tetrahedron Lett.* 33, 4567 (1992).
25. Vic G., Crout D. H. G.: *Tetrahedron: Asymmetry* 5, 2513 (1994).
26. Panintrarux C., Adachi S., Adachi S., Araki Y., Kimura Y., Matsuno R.: *Enzyme Microb. Technol.* 17, 32 (1995).
27. Panintrarux C., Adachi S., Matsuno R.: *Biotechnol. Lett.* 19, 899 (1997).
28. Laroute V., Willemot R. M.: *Biotechnol. Lett.* 14, 169 (1992).
29. Vulfson E. N., Patel R., Law B. A.: *Biotechnol. Lett.* 12, 397 (1990).
30. Ismail A., Ghoul M.: *Biotechnol. Lett.* 18, 1199 (1996).
31. Ajisaka K., Nishida H., Fujimoto H.: *Biotechnol. Lett.* 9, 387 (1987).
32. Ajisaka K., Fujimoto H., Nishida H.: *Carbohydr. Res.* 180, 35 (1988).
33. Fujimoto H., Nishida H., Ajisaka K.: *Agric. Biol. Chem.* 52, 1345 (1988).
34. Rastall R. A., Adlard M. W., Bucke C.: *Biotechnol. Lett.* 13, 501 (1991).
35. Vic G., Crout D. H. G.: *Carbohydr. Res.* 279, 315 (1995).

36. Otto R. T., Bornscheuer U. T., Syldatk C, Schmid R.: *Biotechnol. Lett.* 20, 437 (1998).
37. Gibson R. R., Dickinson R. P., Geert-Jan Boons: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1997, 3357.

L. Weignerová, E. Rajnochová-Herkommerová, and V. Křen (*Institute of Microbiology, Laboratory of Biotransformation, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Enzymatic Reverse Glycosylation**

Biological significance of oligosaccharides is growing rapidly and necessitates development of efficient methods

of their synthesis. Enzymatic glycosylations, in comparison with the chemical methods, are especially useful in the glycosylation of complex biologically active substances, where drastic conditions or the use of toxic (heavy) metal catalysts are generally undesirable. A key advantage of enzymatic methods is their stereo- and regioselectivity. Two types of enzymes can be used to obtain oligosaccharides: hydrolytic enzymes, which catalyze thermodynamically controlled hydrolysis or kinetically controlled transglycosylation and transferases. In this paper, preparation of oligosaccharides using reverse glycosylation is summarized.