

STRESZCZENIE

Postępy w biochemii pomogły zrozumieć strukturę i funkcję enzymów, co z kolei doprowadziło do zwiększenia ich stabilności, aktywności i specyficzności substratowej. Obecnie biokataliza zapewnia bardziej zrównoważone, wydajne i mniej zanieczyszczające metody produkcji wysokowartościowych chemikaliów i zaawansowanych półproduktów farmaceutycznych. W niniejszej pracy przedstawiono strukturę oraz mechanizm działania monoooksygenaz cytochromu P450 oraz ich zastosowanie w efektywnej syntezie związków biologicznie czynnych, która jest bardziej ekologiczna, mniej czasochłonna i tańsza w porównaniu z syntezą chemiczną. Przemysł farmaceutyczny powinien wykorzystać zalety postępu biochemii do pozyskiwania biokatalizatorów do produkcji wysokowartościowych chemikaliów na skalę przemysłową, poprawiając jakość produktów końcowych jednocześnie zmniejszając koszty.

WPROWADZENIE

Wraz z szybkim rozwojem uprzemysłowienia, zanieczyszczenie środowiska stało się problemem globalnym. Przemysł chemiczny i inne branże pokrewne dostarczają dużą różnorodność podstawowych produktów, od ropy naftowej po farmaceutyki. Jednak procesy produkcyjne prowadzą również do wytworzenia i gromadzenia milionów ton odpadów, które mogą być szkodliwe dla środowiska, zdrowia ludzkiego oraz wszystkich żywych organizmów [1]. Zielona chemia stała się ogólnościowym podejściem, które prowadzi do projektowania i wytwarzania konkurencyjnych cenowo produktów i procesów chemicznych w celu ograniczenia lub wyeliminowania stosowania i wytwarzania substancji niebezpiecznych dla zdrowia ludzkiego i środowiska [2]. Enzymy mogą zastąpić reakcje chemiczne, umożliwiając powstawanie nowych szlaków syntetycznych, które mogą być krótsze, wydajniejsze i bardziej zrównoważone. Ponadto połączenie chemo- i biokatalizy stwarza możliwości projektowania nowych szlaków syntetycznych [3-5]. Ze względu na ich zdolność do katalizowania istotnych reakcji chemicznych w łagodnych warunkach w porównaniu z katalizatorami chemicznymi, które wymagają podwyższonych parametrów, takich jak wysoka temperatura i ciśnienie, enzymy stały się ważnymi narzędziami w przemysłowej syntezie chemikaliów farmaceutycznych, kosmetycznych, czy spożywczych. Co więcej, enzymy ulegają biodegradacji i mają nietoksyczny charakter, co czyni je dobrą alternatywą dla niebezpiecznych zanieczyszczeń chemicznych, powstających podczas klasycznej syntezy chemicznej [6,7].

Liczba zastosowań enzymów w przemyśle jest ograniczona ze względu na dostępność biokatalizatorów oraz ich stabilność operacyjną. Niedawne, przełomowe odkrycia naukowe w genomice, ukierunkowanej ewolucji białek i postępach technologicznych, powinny pomóc przełamać te ograniczenia. Wyzwaniem dla chemików na całym świecie jest opracowanie metodologii syntezy i „zielonych” procesów przynoszących korzyści środowiskowe i ekonomiczne, które są obecnie wymagane w postaci: redukcji materiało- i energochłonności procesów chemicznych i produktów ubocznych [6,8,9]. Ze względu na unikalne właściwości enzymów, takie jak wysoka regio-, chemo- i stereoselektywność, szybkie działanie oraz ich przyjazny dla środowiska charakter, enzymy znajdują zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu. W zależności od rodzaju katalizowanej reakcji, enzymy można podzielić na siedem typów (Ryc. 1).

Transformacje z użyciem różnych klas biokatalizatorów zostały wykorzystane w przemyśle i medycynie w celu opracowania nowych dróg produkcji wysokowartościowych chemikaliów, składników i prekursorów farmaceutycznych oraz agrochemikaliów. Rycina 2 podsumowuje kilka zastosowań enzymów w różnych sektorach przemysłu. Ze względu na tę wszechstronność zastosowań, enzymy można uznać za potężne narzędzie dla gospodarki opartej na biotechnologii [10].

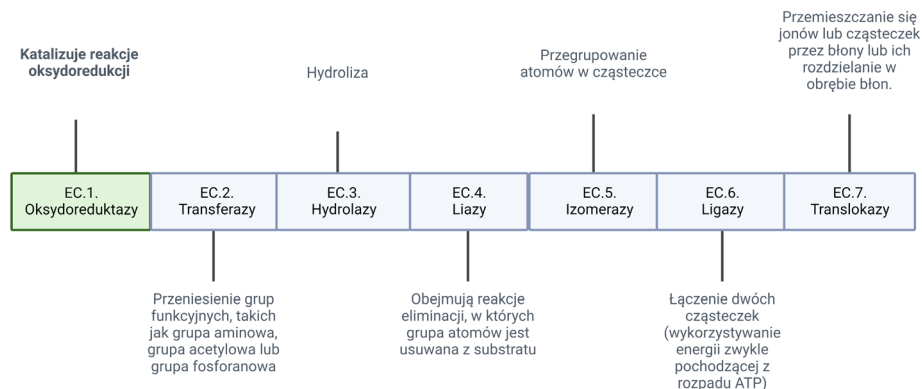
dr Agata Wszolek^{1,2}✉

¹Instytut Biologii, Uniwersytet Szczeciński
²Centrum Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Instytut Biologii, Uniwersytet Szczeciński

https://doi.org/10.18388/pb.2021_464

✉ autor korespondujący: agata.wszolek@usz.edu.pl

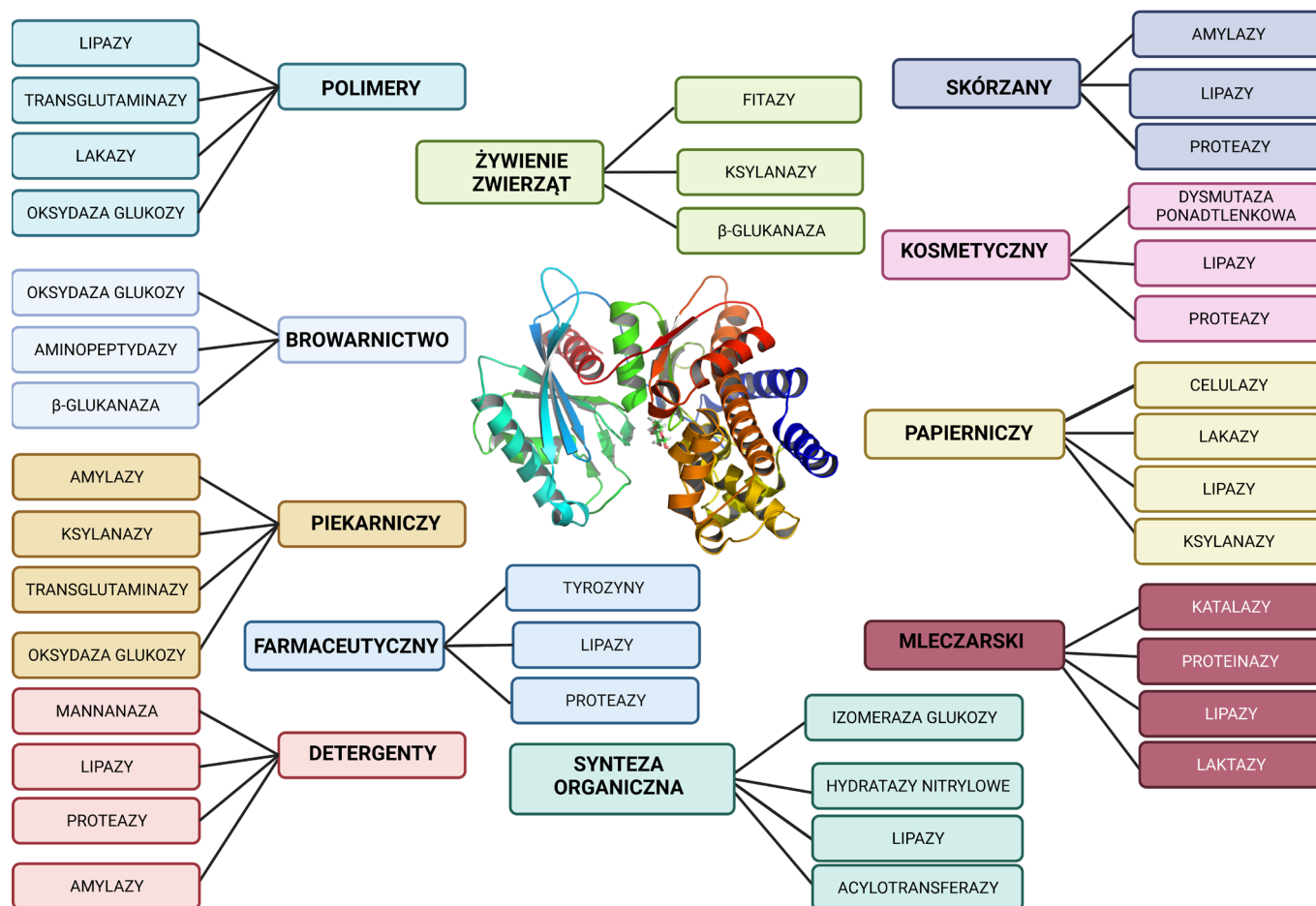
Słowa kluczowe: P450 monoooksygenazy, biotechnologia, biokataliza, regio- selektywna hydroksylacja, stereo-selektywna hydroksylacja, hydroksylacja kwasów żółciowych, hydroksylacja kwasów tłuszczowych



Rycina 1. Nazwa systematyczna podana zgodnie z reakcją katalizowaną przez każdą z siedmiu klas enzymów.

Prawie 75% wszystkich enzymów przemysłowych to enzymy hydrolityczne. Na rynku enzymów dominują dehydrogenazy alkoholowe, amylazy, celulazy, lipazy, ketoreduktazy, proteazy i ksyłanazy, które stanowią ponad 70% całej sprzedaży enzymów [3,6,11,12]. W ciągu ostatnich dziesięcioleci oksydoreduktazy były częściej brane pod uwagę przy projektowaniu nowych procesów produkcyjnych. Dehydrogenazy alkoholowe, BVMO (ang. *Baeyer-Villiger Monoxygenase*), ketoreduktazy, lakazy, peroksydazy, zostały wprowadzone na rynek, ale nie zostały jeszcze wystarczająco rozwinięte, aby znaleźć szerokie zastosowanie

w produkcji [3,12-19]. Różne gałęzie przemysłu domagają się odkrywania i zastosowania nowych enzymów. Obecnie postęp w technikach inżynierii genomu drobnoustrojów umożliwia łatwą modyfikację genów na szlaku biosyntezy, aby zmaksymalizować produkcję cząsteczek o wysokiej wartości w komórkach gospodarza. W szczególności związki hydroksylowane mają dużą wartość, ale selektywna hydroksylacja cząsteczek organicznych stanowi wyzwanie w klasycznej chemii organicznej. Dlatego bardzo potrzebne są enzymy, które katalizują selektywną hydroksylację. Ponieważ oksydoreduktazy, w szczególności monooksyge-



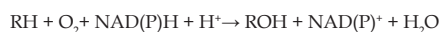
Rycina 2. Przemysłowe zastosowania enzymów drobnoustrojowych [6].

nazy cytochromu P450, mogą przeprowadzać selektywną hydroksylację nieaktywowanych węgli, stanowią one klasę enzymów o potencjale w produkcji różnorodnych wysoko-wartościowych chemikaliów i farmaceutyków [20].

OKSYDOREDUKTAZY: MONOOKSYGENAZY CYTOCHROMU P450

Oksydoreduktazy to szeroka klasa enzymów, które katalizują biologiczne procesy utleniania/redukcji. Głównym powodem zainteresowania oksydoreduktazami i ich przemysłowym zastosowaniem jest ich zdolność do katalizowania reakcji regio-, chemo- i stereoselektywnych, w których często zawodzą katalizatory chemiczne. Dlatego oksydoreduktazy są często uważane za doskonałe narzędzie w zielonej chemii i mają już kilka zastosowań w przemyśle (np. synteza takich produktów jak cis-dihydrodiol, katechole, epoksydy) [20-24]. Oksygenazy należą do klasy oksydoreduktaz, które wprowadzają jeden (monooksygenazy, np. P450, BVMO) lub dwa (dioksygenazy, np. dioksygenaza toluenowa, dioksygenaza naftalenowa) atomy tlenu do ich substratów. Zazwyczaj NADH lub NADPH służą jako ekwiwalenty redukcji poprzez białka przenoszące elektrony (takie jak reduktaza) [25,26].

Monooksygenazy cytochromów P450 stanowią dużą rodzinę enzymów cysteino-hemowych. We wszystkich tych biokatalizatorach grupa prostetyczna składa się z protoporfiryny IX żelaza (II) kowalencyjnie połączonej z białkiem przez atom siarki proksymalnego ligandu cysteinowego [27,28]. Są to hemoproteiny typu b, a swoją nazwę zawdzięczają intensywnej absorpcji światła przy 450 nm (wykazują typową absorpcję przy maksymalnie 450 nm zredukowanego kompleksu hemu związanego z CO). Odgrywają kluczową rolę w oksydacyjnej przemianie cząsteczek endogennych i egzogennych. Jako środek utleniania monooksygenazy cytochromu P450 wykorzystują tlen cząsteczkowy, wprowadzając jeden atom tlenu do substratu, redukując drugi atom tlenu do cząsteczki wody, wykorzystując dwa elektrony pochodzące z kofaktorów NADH lub NADPH i przenosząc je na żelazo hemowe P450 (Równanie 1) [29-31].

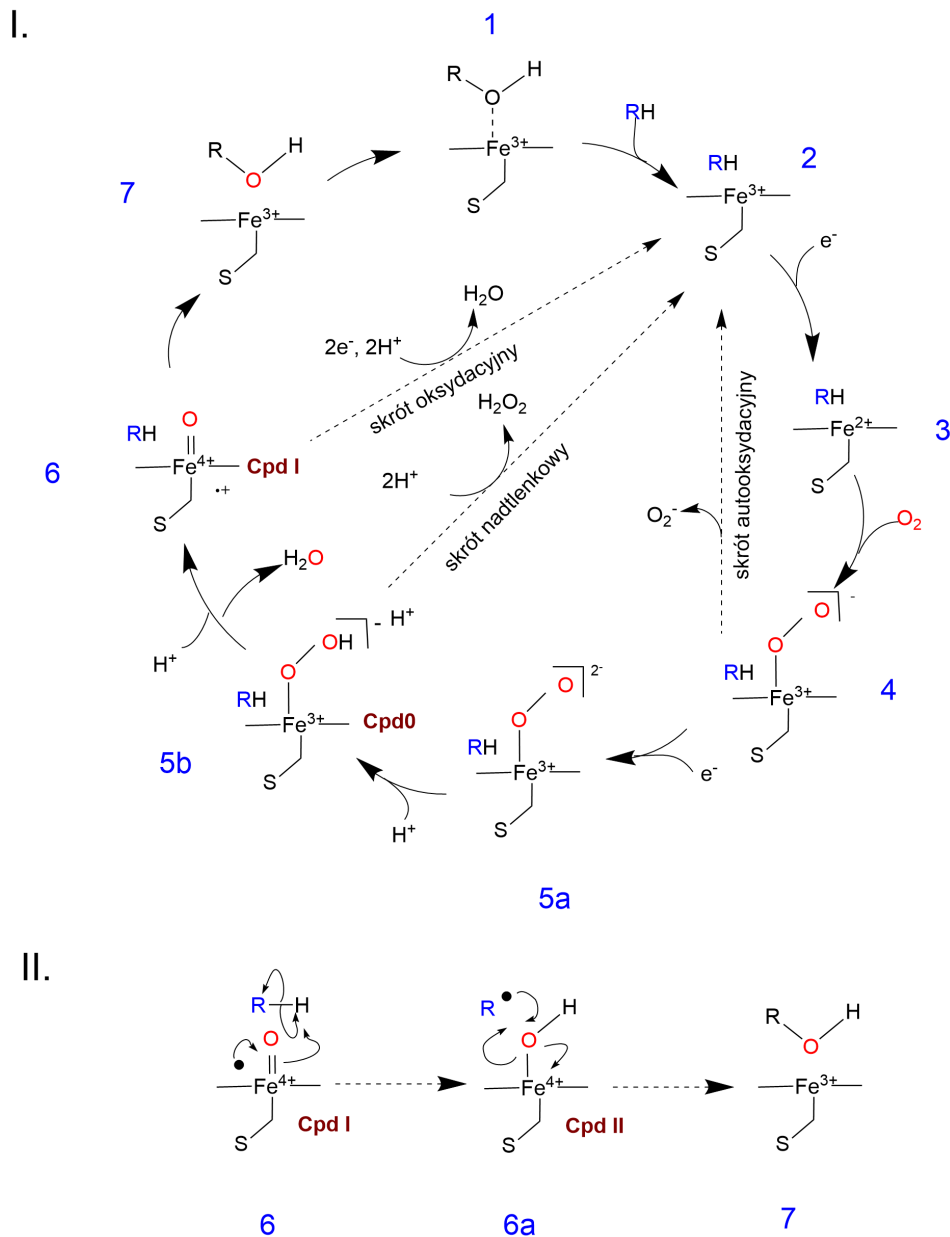


Równanie 1. Cytochrom P450 katalizuje reakcję hydroksylowania przebiegającą zgodnie z sumarycznym wzorem.

CYKL KATALITYCZNY ENZYMOW CYTOCHROMU P450

Cykl katalityczny typowego cytochromu P450 przedstawiono na rycinie 3.I. Cykl katalityczny monooksygenaz cytochromu P450 rozpoczyna się od hemu w postaci spoczynkowej (1) i pokazuje kolejne zdarzenia wiązania substratu (RH) (2). Wiązanie substratu indukuje przeniesienie elektronów z NAD(P)H przez reduktazę cytochromu P450 lub inną powiązaną reduktazę (3). Tlen cząsteczkowy wiąże się z centrum hemu żelaza, tworząc stan perokso żelaza (4); następnie drugi elektron jest przenoszony z reduktazy cytochromu P450, ferredoksyn lub cytochromu b₅, redukując addukt Fe-O₂, dając krótkotrwały stan perokso (5a). Grupa perokso jest szybko protonowana z wytworzeniem przejściowego związku 0 (hydroperokso żelazowego Cpd0 (5b)). Dalsze protonowanie tego związku pośredniego prowadzi do uwolnienia jednej cząsteczki wody i utworzenia wysoce reaktywnej formy określanej jako związek I P450

(CpdI), będący katalizatorem do wprowadzania tlenu (6) w celu wytworzenia produktu ROH (7). Ostatnim etapem jest dysocjacja utlenionego substratu od miejsca aktywnego CYP, w której enzym powraca do swojego początkowego stanu żelazowego (Fe³⁺) i jest w ten sposób przygotowany do ponownej reakcji. Mechanizm odbicia tlenu (tworzenie i uwalnianie produktu hydroksylowanego) pokazano na rycinie 3.II (w cyklu katalitycznym P450). Pobieranie wodoru z substratu odbywa się przez związek I (6) z wytworzeniem związku II (6a), przed powrotem hydroksylu do rodnika substratu z wytworzeniem produktu hydroksylowanego [28,32-34]. Normalny mechanizm reakcji cytochromu P450 działa poprzez wykorzystanie dwóch równoważników redukujących do zubożenia atmosferycznego tlenu, wytwarzając jedną cząsteczkę wody i natleniony produkt w ogólnej stechiometrii 2 elektrony: 1 ditlen:1 produkt [35]. Często elektrony generowane przez partnera redoks nie są skutecznie przenoszone. Dlatego cykl katalityczny może być w niektórych przypadkach utrudniony przez trzy tak zwane ścieżki „odsprężania” (przedstawione liniami przerywanymi na rycinie 3), dając nadtlenek wodoru lub anion ponadtlenkowy bez metabolizmu substratu. Pierwszy to szlak „skrót oksydacyjny”, w którym Związek I (6) jest protonowany i redukowany w celu wytworzenia cząsteczki wody. Alternatywną drogą monooksygenacji jest „skrót nadtlenkowy”, interakcja z donorami pojedynczego tlenu, takimi jak H₂O₂ lub pokrewnymi donorami tlenu prowadzi do powstania związku pośredniego żelazo-okso (związek Cpd0 (5b)), z żelazowego substratu- postać związana (2). Co ciekawe, wykazano, że istnieje kilka przykładów P450 (peroksygenaz P450), które są w stanie wykorzystać nadtlenek wodoru na swoją korzyść i napędzać reakcję odwrotną, generując związek 0 (5b) bezpośrednio ze związku pośredniego związanego z substratem (2) [36]. Trzecią ścieżką rozprężania jest ścieżka „skrót autooksydacyjny”, w której kompleks nadtlenkowy żelaza (4) wytwarza anion ponadtlenkowy, a enzym powraca do stanu spoczynkowego (2). Powstawanie reaktywnych form tlenu (rozprężanie) jest niekorzystną reakcją uboczną [37]. Wydajność sprzężenia jest miarą liczby elektronów oddanych z NAD(P)H, które są z powodzeniem wykorzystywane do katalizy związanego substratu organicznego [38]. Podczas gdy rozprężanie może prowadzić do inaktywacji enzymu, wydajność sprzężenia P450 jest ważnym wyznacznikiem szybkości katalizy enzymów. Wydajność sprzężenia jest miarą liczby elektronów oddanych z NAD(P)H, które są z powodzeniem wykorzystywane do katalizy związanego substratu organicznego [39]. W przeszłości wykazano, że bakteryjne monooksygenazy cytochromu P450 mają wyższą skuteczność sprzężenia dla natywnych substratów w porównaniu ze ssaczymi [38]. Co więcej, w przypadku samowystarczalnych systemów, takich jak cytochrom P450 BM3, skuteczność sprzężenia może wynosić 100% [40], podczas gdy w przypadku innych systemów wieloskładnikowych P450 sprawność sprzężenia może być bardzo niska (0,5-3%) [41]. Na przykład BM3, która działa jak oksygenaza kwasów tłuszczowych wykazując wysoką aktywność (>1000 obrotów/min), ma sprawność sprzężenia prawie 100%, co oznacza, że wszystkie elektrony oddane z kofaktora nikotynamidu są wykorzystywane do katalizy. Co więcej, różne mutanty P450 BM3 mają sku-



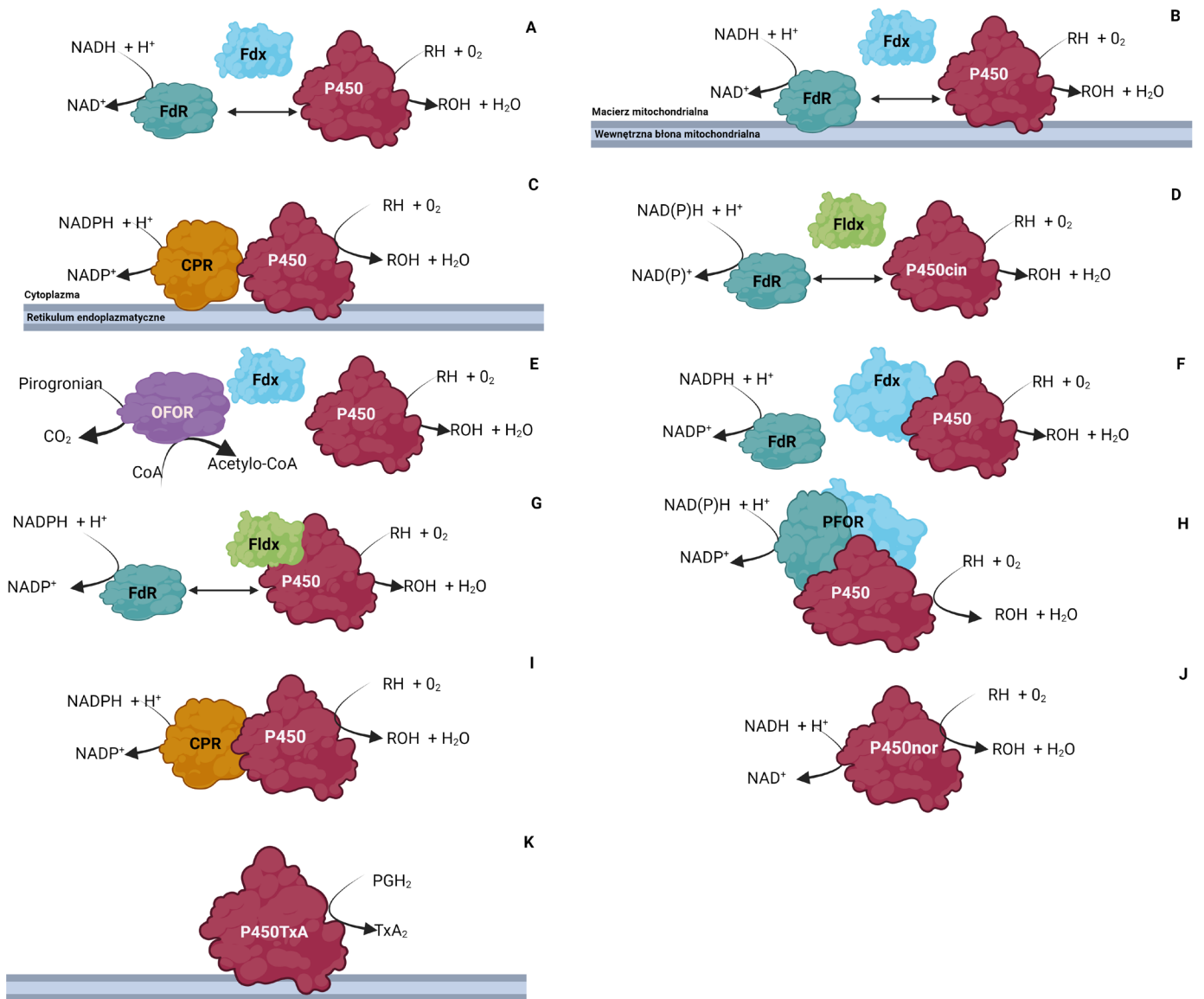
Rycina 3.I. Schemat cyklu katalicznego monoooksygenazy cytochromu P450. „Ścieżki rozprzęgnięcia” są pokazane liniami przerywanymi. **3.II.** Schemat mechanizmu „odbicia tlenu”. Związek pośredni ferrylo-okso (CpdI) jest uważany za aktywny utleniacz, który usuwa wodór z substratu (R-H), po czym następuje szybka rekombinacja rodników i uwalnianie utlenionego (często hydroksylowanego) produktu (R-OH). Zaadaptowane z Munro i in. (2013) [28].

teczność sprzężenia z testosteronem w zakresie od 13,5% do 83,5% [40].

KLASYFIKACJA ENZYMÓW CYTOCHROMU P450

W zależności od cech strukturalnych i rodzaju partnerów redoks monoooksygenazy cytochromu P450 można sklasyfikować według liczby układów składowych: układy jedno-, dwu- lub trzybiałkowe. Prokariotyczne P450 to zazwyczaj układy trójskładnikowe, podczas gdy eukariotyczne P450, takie jak wątrobowy P450 i wiele roślinnych oraz grzybowych P450, działa jako układy dwuskładnikowe. Istnieją również samowystarczalne izozymy, w których dochodzi do fuzji domen hemu i reduktazy. Według Hannemanna i wsp., w zależności od reduktazy, układy cytochromu P450 można podzielić na co najmniej dziesięć różnych klas (Ryc. 4) [42].

Klasa I zawiera większość znanych bakteryjnych P450, a także pewną liczbę eukariotycznych systemów mitochondrialnych (odpowiednio rycina 4A i B). Wszystkie te systemy składają się z trzech oddzielnych białek: zależnej od FAD reduktazy ferredoksyny (FdR), która przenosi elektrony z NADH lub NADPH do ferredoksyny (Fdx- zawierającej klastery żelazo-siarka), która zapewnia redukujące odpowiedniki dla P450 domena hemu. W systemach bakteryjnych wszystkie trzy białka są rozpuszczalne (Ryc. 4A). Jednak u eukariotów tylko ferredoksyna jest białkiem cytoplazmatycznym, podczas gdy reduktaza jest związana z błoną, a cytochrom P450 jest włączony do błony mitochondrialnej (Ryc. 4B). Przykładami P450 klasy I są P450cam z *Pseudomonas putida* (układ bakteryjny) i CYP11A1 (P450_{sc}, mitochondrialny układ eukariotyczny) [42].



Rycina 4. Schemat przedstawiający różne klasy cytochromu P450, szerzej opisany w sekcji 1.1.2 Na podstawie Hannemann et al. (2007) [42].

Układ klasy II, najczęściej spotykany u eukariontów, zawiera dwa integralne białka błonowe (Ryc. 4C): cytochrom P450 i NADPH-reduktazę cytochromu P450 (CPR). CPR zawiera grupy protetyczne FAD i FMN, które przenoszą oba wymagane równoważniki redoks z NADPH do jednej z izoform cytochromu P450.

System klasy III został po raz pierwszy zgłoszony przez Hawkesa i innych w 2002 r. [43]. Ta klasa jest podobna do bakteryjnej Klasy I (Ryc. 4D), jeśli chodzi o składanie się z trzech oddzielnych białek, zależnej od FAD reduktazy ferredoksyny, małego pośredniego białka redoks (Fldx) i P450. Różnica polega jednak na tym, że systemy klasy III wykorzystują zależne od FMN białko redoks zwane flawodoksyną (Fldx), a nie klaster żelazowo-siarkowy zawierający ferredoksynę typu I (Fdx) [39]. Przykładem P450 klasy III jest P450cin z *Citrobacter braakii*.

Klasa IV jest jedyną klasą P450, która, jak wykazano, wykorzystuje partnerów redoks specyficznych dla donora elektronów innego niż NAD(P)H. Mianowicie, system reduktazy pozyskuje elektrony z kwasu pirogronowego, a nie z NAD(P)H (Ryc. 4E). Przykład klasy IV został zidentyfikowany przez zbadanie pierwszego termofilnego CYP119 z ekstremalnie kwaśno-termofilnego archeona *Sulfolobus solfataricus* [42,44].

W klasie V, w przeciwieństwie do klasycznego trójskładnikowego układu klasy I, P450 zawiera dwa składniki: reduktazę zależną od NAD(P)H (Fdr) i domenę P450 związaną z C-końcówką ferredoksyną (Fdx) przez alaninę stanowiącą bogaty region łącznikowy, który działa jak elastyczny zawias umożliwiający interakcje między dwiema domenami (Ryc 4F). Członka tej klasy opisali po raz pierwszy Jacson i in. w 2002 [45].

System klasy VI (Ryc. 4G) jest podobny do klasy V, ale ferredoksynę związaną z końcem C (Fdx) zastępuje się flavodoksyną związaną z końcem N (Fldx) [39].

Klasa VII P450 (Ryc. 4H) przedstawia całkowicie nową architekturę domeny: domena P450 jest związana na końcu C z domeną reduktazy dioksygenazy ftalowej (PFOR). Ma trzy odrębne domeny: domenę wiążącą NADH, domenę wiążącą FMN i domenę Fdx zawierającą klaster żelazo-siarka. Członka klasy VII opisano po raz pierwszy przez Roberts i in. w 2002 rok i nazwano P450RhF [46].

Jako monoooksygenazy, członkowie klasy VIII są katalitycznie samowystarczalni. Oznacza to, że domena P450 jest połączona z eukariotycznym partnerem reduktazy diflawiny – reduktazą cytochromu P450 (CPR) – w pojedynczym łańcuchu polipeptydowym (Ryc. 4I) [39]. Najintensywniej badanym przedstawicielem tej klasy jest BM3 (CYP102A1) z *Bacillus megaterium* [47].

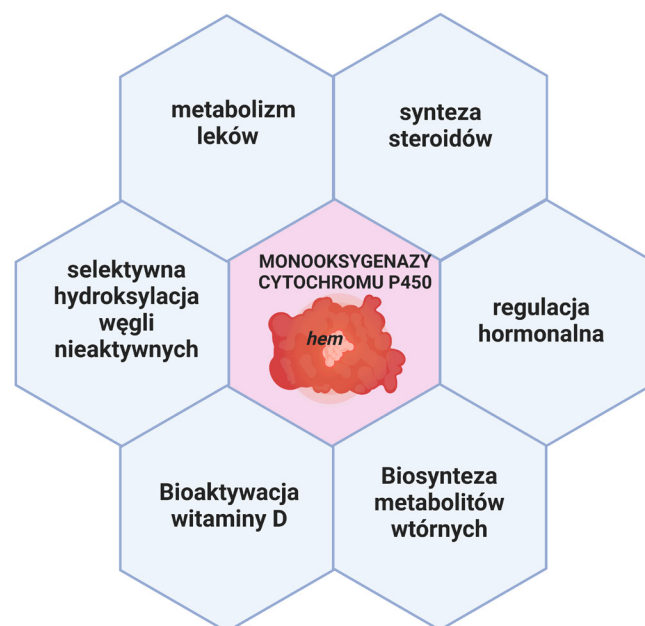
Systemy klasy IX (Ryc. 4J) są wyjątkowe, ponieważ nie wymagają partnerów białkowych redoks do przenoszenia elektronów z NAD(P)H i składają się wyłącznie z reduktaz tlenu azotu (NO). Członka tej klasy opisano po raz pierwszy w grzybie strzępkowym *Fusarium oxysporum* [48].

Klasa X składa się z enzymów cytochromu P450, które nie wymagają transportu elektronów przez białka redoks, ale zamiast tego wykorzystują różne systemy transferu wewnątrzcząsteczkowego (nie wymagają ani O_2 , ani NAD(P)H) (Ryc. 3K). Członkowie klasy X P450 wykorzystują grupy wodoronadtlenku acylu swoich substratów jako donory tlenu, aby utworzyć nowe wiązanie węgiel-tlen [39,42].

BIOTECHNOLOGICZNE ZASTOSOWANIE MONOKSYGENAZ CYTOCHROMU P450

Monoooksygenazy cytochromu P450 stanowią potężny system detoksykacji, biorą udział w metabolizmie wielu szkodliwych substratów, takich jak toksyny oraz leki. Konwertując je do postaci łatwiej do ekskrecji (wiele substratów jest rozpuszczalnych w tłuszczach- hydroksylacja zwiększa rozpuszczalność). Tym samym stanowią pierwszą linię obrony przed toksynami. Dodatkowo są ważne w syntezie wielu korzystnych substratów, takich jak hormony steroidowe (takie jak estrogen i testosteron), kwasy tłuszczowe i sterole (takie jak cholesterol i kwasy żółciowe), witamin A i D. Biologiczne funkcje monoooksygenaz cytochromu P450 zostały graficznie przedstawione na rycinie 5.

Monoooksygenazy cytochromu P450 katalizują hydroksylację lub epoksydację nieaktywnych atomów węgla z wysoką selektywnością. Działają na szeroką gamę chemicznie zróżnicowanych substratów, takich jak kwasy tłuszczowe, alkany, monoterpény, witaminy, steroidy, antybiotyki, leki oraz ksenobiotyki. Ponadto wykazały ogromny potencjał w bioremediacji, co czyni je obiecującymi kandydatami w zastosowaniach biotechnologicznych (Ryc. 6) [49-51].

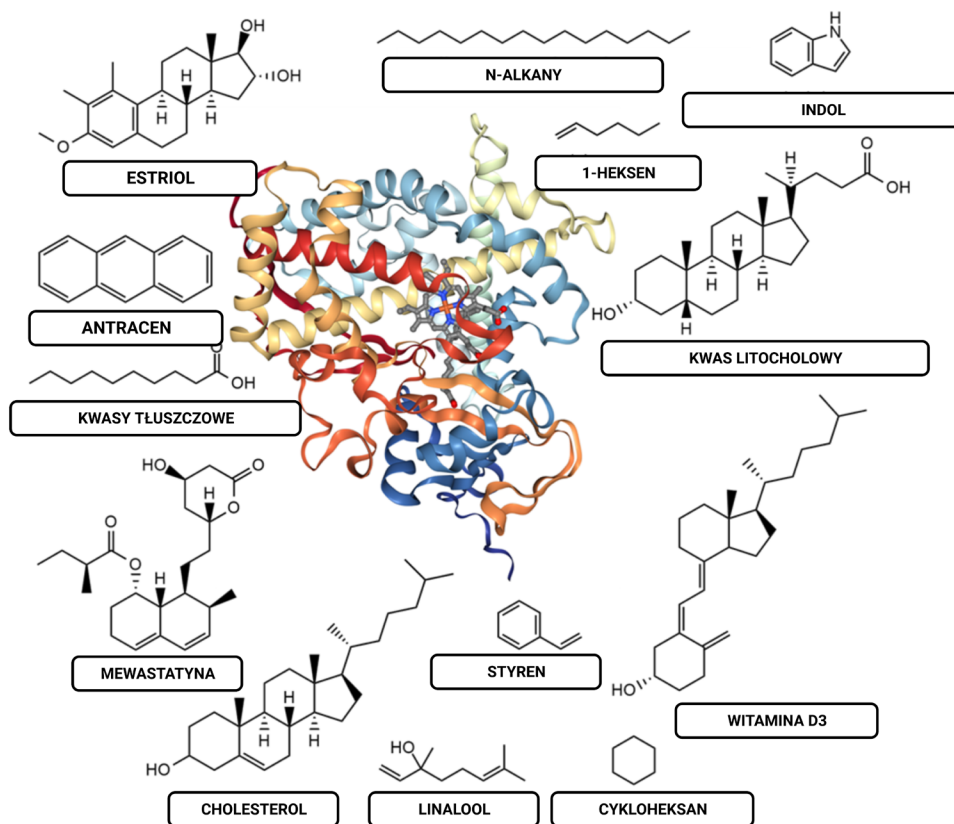


Rycina 5. Funkcje biologiczne monoooksygenaz cytochromu P450.

Wykazano, że CYP2B6 katalizuje utlenianie łańcucha bocznego styrenu, natomiast przedstawiciele rodzin monoooksygenaz P450: CYP3, CYP7, CYP8, CYP27, CYP39 i CYP46 CYP7A1, CYP7B1 i CYP39A1 są zaangażowane w syntezę kwasów żółciowych z cholesterolu [52]. Monoooksygenaza P450 CYP505 (BM3) utlenia indiol oraz katalizuje hydroksylację kwasów tłuszczowych [53-55]. CYP105A1 katalizuje trój etapową hydroksylację witaminy D3 [56]. BM3 mutant (zawierający 11 mutacji), katalizuje hydroksylację szeregu alkanów od oktanu do propanu, w tym cykloheksanu [57]. Nowy członek podrodziny CYP116B – P450LaMO utlenia linalol [58]. Członkowie CYP *P. placenta* (CYP5150, CYP5027 i CYP5350) biorące udział w utlenianiu szeregu policyklicznych węglowodorów aromatycznych, takich jak antracen, karbazol, fenantren i piren wykazują również aktywność katalityczną wobec mewastatyny [59]. CYP3A4 katalizuje hydroksylację LCA [60]. Natomiast mutant BM3 wykazuje aktywność z pochodną steroidową: trimetyloestriolem [61].

Przemysł farmaceutyczny wymaga nowych dróg syntetycznych, które są przyjazne dla środowiska. Niezbędna staje się biokataliza, która wykorzystuje izolowane enzymy lub katalizatory pełnokomórkowe. Ponadto enzymy są doskonałym narzędziem do badań biologii chemicznej oraz analizy złożonych mechanizmów biologicznych.

Pomimo ogromnego potencjału monoooksygenaz cytochromu P450, przemysłowe zastosowanie tych enzymów jest często ograniczane przez powszechnie uznane wąskie gardła techniczne. Brak stabilności, niska aktywność, wąska specyficzność substratowa, wymagania dotyczące kosztownych kofaktorów, tolerancja na rozpuszczalniki i ograniczenia w przenoszeniu elektronów i dostarczaniu elektronów to niektóre z głównych powodów, dla których przemysłowe zastosowanie tego układu enzymatycznego jest trudne. Alternatywnie, zastosowanie systemu całokomórkowego



Rycina 6. Przykłady substratów dla monooksygenaz cytochromu P450.

pozwala przezwyciężyć niektóre z tych ograniczeń, zapewniając system regeneracji kofaktorów (koekspresja partnerów redoks) i chronione środowisko w celu zwiększenia stabilności biokatalizatora [62-64].

MONOKSYGENAZY CYTOCHROMU P450 W SYNTYZIE ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE CZYNNYCH, TAKICH JAK HYDROKSYLOWANE KWASY ŻÓLCIOWE

Kwasy żółciowe mogą pełnić w organizmie różne role, m.in. mogą działać jako emulgatory agregatów lipidowych, transportery lipidów, działać jako hormony w biosyntezie cholesterolu czy wspomagać regenerację wątroby. Ponieważ monooksygenazy P450 biorą udział w szlaku katabolicznym cholesterolu, są kluczowymi biokatalizatorami do tworzenia różnych kwasów żółciowych, pochodnych witaminy D i hormonów steroidowych. U ssaków cholesterol dostarcza niezbędnych elementów budulcowych do syntezy witaminy D i hormonów steroidowych, jednak większość cholesterolu jest przekształcana w kwasy żółciowe. Kwasy żółciowe i hormony steroidowe wyższych kręgowców silnie różnią się kształtem struktur pierścieniowych. Podczas gdy kwasy żółciowe mają wspólną strukturę 5 β -steroidową, znaną również jako rusztowanie 5 β -cholanowe, hormony steroidowe mają strukturę 5 α -steroidową, dzięki czemu układ pierścieniowy 5 α -steroidów jest bardziej płaski niż 5 β -steroidów [65,66,]. Jednak podejrzewa się również, że kwasy żółciowe działają jako potencjalne czynniki rakotwórcze i są powiązane z rakiem wątroby. Szczególnie wtórne kwasy żółciowe, które powstają w wyniku biotransformacji bakteryjnych

w okrężnicy, są związane z nowotworami przewodu pokarmowego [66-69]. Dlatego kwasy żółciowe stały się atrakcyjnymi celami terapeutycznymi dla zaburzeń metabolicznych [70-72]. Znanych jest wiele bakteryjnych P450, które mogą przekształcać hormony steroidowe regio- i stereoselektywnie. Jednak wiedza na temat bakteryjnych P450, które mogą selektywnie przekształcać kwasy żółciowe, jest niewielka [73]. Hydroksylacja kwasów żółciowych w pozycjach 6- α , 6- β i 7- β przez różne izoformy cytochromu (CYP) jest głównym szlakiem detoksykacji kwasów żółciowych, prowadzącym do tworzenia hydroksylowanych kwasów żółciowych, takich jak kwas hiocholowy (HCA), kwas muricholowy (MCA) i kwas ursodeoksycholowy (UDCA) [74]. UDCA jest obecnie jedynym lekiem zatwierdzonym przez FDA do leczenia pierwotnego stwardniającego zapalenia dróg żółciowych i medycznego, niechirurgicznego rozpuszczania kamieni żółciowych. Obecnie UDCA jest wytwarzany na skalę przemysłową z kwasu cholowego zgodnie z siedmiostopniową procedurą chemiczną z całkowitą wydajnością <30% [28]. W celu zmniejszenia liczby etapów produkcji kwasu ursodeoksycholowego z powodzeniem zastosowano biotransformację. Monooksygenaza CYP107D1 (OleP), pierwotnie opisana jako epoksydaza w szlaku biosyntezy oleandomycyny akceptująca również substraty makrolaktonowe, hydroksylując testosteron w pozycjach 6 β , 7 β , 12 β i 15 β . Doniesiono, że kwasy żółciowe, takie jak LCA są hydroksylowane wyłącznie w pozycji 6 β [75]. Grobe i inni w oparciu o podejście półracjonalnej ukierunkowanej ewolucji skonstruowali potrójnego mutantu OleP (F84Q/S240A/V291G) o niemal doskonałej regioselektywności dla pozycji

7β. Używając systemu całych komórek jako biokatalizatora opartego na *Escherichia coli* do regio- i stereoselektywnej hydroksylacji LCA w pozycji 7β z wytworzeniem UDCA tworząc alternatywę dla czasochłonnych metod produkcji UDCA [76].

Nowatorskie biotransformacje enzymatyczne wolnych nasyconych kwasów żółciowych są potrzebne do uzyskania związków o znaczeniu farmaceutycznym. Doskonałymi narzędziami do otrzymywania hydroksylowanych kwasów żółciowych są monooksygenazy cytochromu P450 (P450), które mogą katalizować regio- i stereospecyficzne utlenianie nieaktywowanych węglowodorów w łagodnych warunkach, co stanowi wyzwanie dla katalizatorów chemicznych [30].

MONOKSYGENAZY CYTOCHROMU P450 W SYNTEZIE ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE CZYNNYCH, TAKICH JAK HYDROKSYLOWANE KWASY TŁUSZCZOWE

Kwasy tłuszczowe zawierające grupę hydroksylową wykazują pewne szczególne właściwości, takie jak wyższa lepkość i reaktywność w porównaniu z niepodstawionymi kwasami tłuszczowymi. W związku z tym hydroksykwasy tłuszczowe stały się ważnymi elementami budulcowymi dla biodegradowalnych materiałów polimerowych oraz dla przemysłu kosmetycznego, chemicznego, farmaceutycznego i spożywczego [77]. Jednak większość z nich nie jest dostępna na rynku, ponieważ trudno je zsyntetyzować drogami chemicznymi. W przeciwieństwie do tego, wiele mikroorganizmów jest zdolnych do wytwarzania hydroksylowanych kwasów tłuszczowych z kwasów tłuszczowych lub olejów roślinnych. Produkcja hydroksykwasów tłuszczowych poprzez biotransformację z użyciem mikroorganizmów jest wysoce specyficzną i zmniejsza koszty produkcji w porównaniu z drogami syntezy chemicznej [77, 78]. Dlatego niezbędna jest identyfikacja nowych enzymów do produkcji hydroksykwasów tłuszczowych. Monooksygenazy cytochromu P450 (P450) biorą udział w stereospecyficznej i regiospecyficznej hydroksylacji nieaktywowanych hydroksywęgli, w tym kwasów tłuszczowych, w łagodnych warunkach [79].

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Definicja zielonej chemii została sformułowana po raz pierwszy na początku lat 90'tych- 30 lat temu i brzmi następująco: „projektowanie produktów i procesów chemicznych w celu ograniczenia lub wyeliminowania stosowania i wytwarzania substancji niebezpiecznych” [80]. Biokataliza jest jednym z przykładów „zielonej” chemii, ponieważ opiera się na naturalnych lub zmodyfikowanych enzymach. Obecnie biokataliza jest standardową technologią produkcji chemikaliów [81]. Enzymy P450 odgrywają kluczową rolę w metabolizmie oksydacyjnym wielu różnych związków, w tym syntezie endogennych substratów, takich jak steroidy i kwasy tłuszczowe. Ponadto P450 katalizują hydroksylację nieaktywowanych atomów węgla w sposób regio- i stereospecyficzny, unikając stosowania grup zabezpieczających i kilku czasochłonnych etapów chemicznych.

Ostatnie postępy w dziedzinie badań naukowych pomogły zrozumieć strukturę i czynności funkcjonalne enzymów, co z kolei doprowadziło do zwiększenia ich stabilności, aktywności i specyficzności substratowej. Obecnie biokataliza zapewnia bardziej zrównoważone, wydajne i mniej zanieczyszczające metody produkcji wysokowartościowych chemikaliów i zaawansowanych półproduktów farmaceutycznych. W niniejszej pracy biokatalizatory przedstawiono jako technologię efektywnej syntezy związków biologicznie czynnych, która jest bardziej ekologiczna, zmniejsza zanieczyszczenia i koszty w porównaniu z syntezą chemiczną.

PODZIĘKOWANIA

Ryciny wykonano przy użyciu programu BioRender.com

PIŚMIENNICTWO

1. Clark JH (2001) Catalysis for green chemistry. *Pure Appl Chem* 73(1): 103-111
2. Sheldon RA (2012) Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. *Chem Soc Rev* 41(4): 1437-1451
3. Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, Lutz S, Moore JC, Robins K (2012) Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 485(7397): 185-194
4. Choi JM, Han SS, Kim HS (2015) Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnol Adv* 33(7): 1443-1454
5. Truppo MD (2017) Biocatalysis in the pharmaceutical industry: the need for speed. *ACS Med Chem Lett* 8(5): 476-480
6. Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK (2016) Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech* 6(2): 1-15
7. Timson DJ (2019) Four challenges for better biocatalysts. *Ferment* 5(2): 39
8. Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409(6817): 258-268
9. Thomas SM, DiCosimo R, Nagarajan V (2002) Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. *Trends Biotechnol* 20(6): 238-242
10. Wohlgemuth R (2009) The locks and keys to industrial biotechnology. *N Biotechnol* 25(4): 204-213
11. Li S, Yang X, Yang S, Zhu M, Wang X (2012) Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Comput Struct Biotechnol J* 2(3): e201209017
12. Blamey JM, Fischer F, Meyer HP, Sarmiento F, Zinn M (2017) Enzymatic biocatalysis in chemical transformations: a promising and emerging field in green chemistry practice, W: Brahmachari G (red) *Biotechnology of microbial enzymes*. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 347-403
13. Galante YM, Formantici C (2003) Enzyme applications in detergency and in manufacturing industries. *Curr Org Chem* 7(13): 1399-1422
14. Kirschner A, Bornscheuer UT (2008) Directed evolution of a Baeyer-Villiger monooxygenase to enhance enantioselectivity. *Appl Microbiol Biotechnol* 81(3): 465-472
15. Madhav S, Ahamad A, Singh P, Mishra PK (2018) A review of textile industry: Wet processing, environmental impacts, and effluent treatment methods. *Environ Qual Manag* 27(3): 31-41
16. Staudt S, Bornscheuer UT, Menyes U, Hummel W, Gröger H (2013) Direct biocatalytic one-pot-transformation of cyclohexanol with molecular oxygen into ϵ -caprolactone. *Enzyme Microb Technol* 53(4): 288-292
17. Patel AK, Singhanian RR, Pandey A (2016) Novel enzymatic processes applied to the food industry. *Curr Op Food Sci* 7: 64-72

18. Zhao Y, Yuan Y, Zhang X, Li Y, Li Q, Zhou Y, Gao J (2018) Screening of a novel polysaccharide lyase family 10 pectate lyase from *Paenibacillus polymyxa* KF-1: cloning, expression and characterization. *Molecules* 23(11): 2774
19. Atalla SM, Gamal NGE, Awad HM, Ali NF (2019) Production of pectin lyase from agricultural wastes by isolated marine *Penicillium expansum* RSW_SEP1 as dye wool fiber. *Heliyon* 5(8): e02302
20. Martínez AT, Ruiz-Dueñas FJ, Camarero S, Serrano A, Linde D, Lund H, Alcalde M (2017) Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnol Adv* 35(6): 815-831
21. May SW (1999) Applications of oxidoreductases. *Curr Opin Biotechnol* 10(4): 370-375
22. May SW, Padgett SR (1983) Oxidoreductase enzymes in biotechnology: current status and future potential. *Nat Biotechnol* 1: 677-686
23. Xu F (2005) Applications of oxidoreductases: recent progress. *Ind Biotechnol* 1(1): 38-50
24. Nolan LC, O'Connor KE (2008) Dioxygenase- and monooxygenase-catalysed synthesis of cis-dihydrodiols, catechols, epoxides and other oxygenated products. *Biotechnol Lett* 30(11): 1879-1891
25. Williams MG, Olson PE, Tautvydas KJ, Bitner RM, Mader RA, Wackett LP (1990) The application of toluene dioxygenase in the synthesis of acetylene-terminated resins. *Appl Microbiol Biotechnol* 34(3): 316-321
26. de Souza RO, Miranda LS, Bornscheuer UT (2017) A retrosynthesis approach for biocatalysis in organic synthesis. *Chem Eur J* 23(50): 12040-12063
27. Guengerich FP, Munro AW (2013) Unusual cytochrome P450 enzymes and reactions. *J Biol Chem* 288(24): 17065-17073
28. Munro AW, Girvan HM, Mason AE, Dunford AJ, McLean KJ (2013) What makes a P450 tick? *Trends Biochem Sci* 38(3): 140-150
29. Meunier B, De Visser SP, Shaik S (2004) Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem Rev* 104(9): 3947-3980
30. Urlacher VB, Girhard M (2012) Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol* 30(1): 26-36
31. Erdogan H (2019) One small step for cytochrome P450 in its catalytic cycle, one giant leap for enzymology. *J Porphyr Phthalocyanines* 23(04n05): 358-366
32. Werck-Reichhart D, Feyereisen R (2000) Cytochromes P450: a success story. *Gen Biol* 1(6): 1-9
33. Isin EM, Guengerich FP (2008) Substrate binding to cytochromes P450. *Anal Bioanal Chem* 392(6): 1019-1030
34. Dubey KD, Shaik S (2019) Cytochrome P450—the wonderful nanomachine revealed through dynamic simulations of the catalytic cycle. *Acc Chem Res* 52(2): 389-399
35. Grinkova YV, Denisov IG, McLean MA, Sligar SG (2013) Oxidase uncoupling in heme monooxygenases: human cytochrome P450 CYP3A4 in Nanodiscs. *Biochem Biophys Res Commun* 430(4): 1223-1227
36. Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I (2005) Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem Rev* 105(6): 2253-77
37. Morlock LK, Böttcher D, Bornscheuer UT (2018) Simultaneous detection of NADPH consumption and H₂O₂ production using the Ampliflu™ Red assay for screening of P450 activities and uncoupling. *Appl Microbiol Biotechnol* 02(2): 985-994
38. Albertolle ME, Guengerich FP (2018) The relationships between cytochromes P450 and H₂O₂: Production, reaction, and inhibition. *J Inorg Biochem* 186: 228-234
39. Cook DJ, Finnigan JD, Cook K, Black GW, Charnock SJ (2016) Cytochromes P450: history, classes, catalytic mechanism, and industrial application. *Adv Protein Chem Struct Biol* 105: 105-126
40. Ciaramella A, Minerdi D, Gilardi G (2017) Catalytically self-sufficient cytochromes P450 for green production of fine chemicals. *Rend Lincei* 28(1): 169-181
41. Gruenke LD, Konopka K, Cadieu M, Waskell L (1995) The stoichiometry of the cytochrome P-450-catalyzed metabolism of methoxyfluorane and benzphetamine in the presence and absence of cytochrome b5. *J Biol Chem* 270(42): 24707-24718
42. Hannemann F, Bichet A, Ewen KM, Bernhardt R (2007) Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1770(3): 330-344
43. Hawkes DB, Adams GW, Burlingame AL, de Montellano PRO, De Voss JJ (2002) Cytochrome P450cin (CYP176A), isolation, expression, and characterization. *J Biol Chem* 277(31): 27725-27732
44. Park SY, Yamane K, Adachi SI, Shiro Y, Weiss KE, Maves SA, Sligar SG (2002) Thermophilic cytochrome P450 (CYP119) from *Sulfolobus solfataricus*: high resolution structure and functional properties. *J Inorg* 91(4): 491-501
45. Jackson CJ, Lamb DC, Marczylo TH, Warrilow AG., Manning NJ, Lowe DJ, Kelly SL (2002) A Novel Sterol 14 α -Demethylase/Ferredoxin Fusion Protein (MCCYP51FX) from *Methylococcus capsulatus* Represents a New Class of the Cytochrome P450 Superfamily. *J Biol Chem* 277(49): 46959-46965
46. Roberts GA, Grogan G, Greter A, Flitsch SL, Turner NJ (2002) Identification of a new class of cytochrome P450 from a *Rhodococcus* sp. *J Bacteriol* 184(14): 3898-3908
47. Miura Y, Fulco AJ (1975) ω -1, ω -2 and ω -3 hydroxylation of long-chain fatty acids, amides and alcohols by a soluble enzyme system from *Bacillus megaterium*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 388(3): 305-317
48. Kizawa H, Tomura D, Oda M, Fukamizu A, Hoshino T, Gotoh O, Shoun H (1991) Nucleotide sequence of the unique nitrate/nitrite-inducible cytochrome P-450 cDNA from *Fusarium oxysporum*. *J Biol Chem* 266(16): 10632-10637
49. Bernhardt R (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J Microbiol* 124(1): 128-145
50. Bhattacharya S, Yadav J (2018) Microbial P450 enzymes in bioremediation and drug discovery: emerging potentials and challenges. *Curr Protein Pept Sci* 19(1): 75-86
51. Urlacher VB, Girhard M (2019) Cytochrome P450 monooxygenases in biotechnology and synthetic biology. *Trends Biotechnol* 37(8): 882-897
52. Nebert DW, Russell DW (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 360(9340): 1155-1162
53. Li QS, Ogawa J, Schmid RD, Shimizu S (2005) Indole hydroxylation by bacterial cytochrome P450 BM-3 and modulation of activity by cumene hydroperoxide. *Biosci Biotechnol Biochem* 69(2): 293-300
54. Boddupalli SS, Pramanik BC, Slaughter CA, Estabrook RW, Peterson JA (1992) Fatty acid monooxygenation by P450BM-3: product identification and proposed mechanisms for the sequential hydroxylation reactions. *Arch Biochem* 292(1): 20-28
55. Kitazume T, Tanaka A, Takaya N, Nakamura A, Matsuyama S, Suzuki T, Shoun H (2002) Kinetic analysis of hydroxylation of saturated fatty acids by recombinant P450foxy produced by an *Escherichia coli* expression system. *Eur J Biochem* 269(8): 2075-2082
56. Hayashi K, Yasuda K, Sugimoto H, Ikushiro S, Kamakura M, Kittaka, Sakaki T (2010) Three step hydroxylation of vitamin D3 by a genetically engineered CYP105A1: Enzymes and catalysis. *FEBS J* 277(19): 3999-4009
57. Butler CF, Peet C, Mason AE, Voice MW, Leys D, Munro AW (2013) Key mutations alter the cytochrome P450 BM3 conformational landscape and remove inherent substrate bias. *J Biol Chem* 288(35): 25387-25399
58. Yin YC, Yu HL, Luan ZJ, Li RJ, Ouyang PF, Liu J, Xu JH (2014) Unusually broad substrate profile of self-sufficient cytochrome P450 monooxygenase CYP116B4 from *Labrenzia aggregata*. *Chembiochem* 15(16): 2443-2449
59. Millhim M, Putkaradze N, Abdulmughni A, Kern F, Hartz P, Bernhardt R (2016) Identification of a new plasmid-encoded cytochrome P450 CYP107DY1 from *Bacillus megaterium* with a catalytic activity towards mevastatin. *J Biotechnol* 240: 68-75
60. Araya Z, Wikvall K (1999) 6 α -Hydroxylation of taurochenodeoxycholic acid and lithocholic acid by CYP3A4 in human liver microsomes. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1438(1): 47-54

61. Lewis JC, Mantovani SM, Fu Y, Snow CD, Komor RS, Wong CH, Arnold FH (2010) Combinatorial alanine substitution enables rapid optimization of cytochrome P450BM3 for selective hydroxylation of large substrates. *Chembiochem* 11(18): 2502-2505
62. Urlacher VB, Girhard M (2012) Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol* 30(1): 26-36
63. Bracco P, Janssen DB, Schallmeyer A (2013) Selective steroid oxyfunctionalisation by CYP154C5, a bacterial cytochrome P450. *Microb Cell Fact* 12(1): 1-11
64. Lundemo MT, Woodley JM (2015) Guidelines for development and implementation of biocatalytic P450 processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(6): 2465-2483
65. Russell DW (2009) Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J Lipid Res* 50: S120-S125
66. Wang X, Fu X, Van Ness C, Meng Z, Ma X, Huang W (2013) Bile acid receptors and liver cancer. *Curr Pathobiol Rep* 1(1): 29-35.
67. Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, Dvorakova K, Garewal H (2005) Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat Res - Rev Mutat Res* 589(1): 47-65
68. Ajouz H, Mukherji D, Shamseddine A (2014) Secondary bile acids: an underrecognized cause of colon cancer. *World J Surg Oncol* 2(1): 1-5
69. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB, Bajaj JS (2014) Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol* 30(3): 332
70. Trauner M, Claudel T, Fickert P, Moustafa T, Wagner M (2010) Bile acids as regulators of hepatic lipid and glucose metabolism. *Dig Dis* 28(1): 220-224
71. Li T, Apte U (2015) Bile acid metabolism and signaling in cholestasis, inflammation, and cancer. *Adv Pharmacol* 74: 263-302
72. Takahashi S, Fukami T, Masuo Y, Brocker CN, Xie C, Krausz W, Gonzalez FJ (2016) Cyp2c70 is responsible for the species difference in bile acid metabolism between mice and humans. *J Lipid Res* 57(12): 2130-2137
73. Anzenbacher P, Anzenbacherova E (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 58(5): 737-747
74. Zhou J, Ma YH, Zhou Z, Chen Y, Wang Y, Gao X (2015) Intestinal absorption and metabolism of epimedium flavonoids in osteoporosis rats. *Drug Metab Dispos* 43(10): 1590-1600
75. Grobe S, Wszolek A, Brundiek H, Fekete M, Bornscheuer UT (2020) Highly selective bile acid hydroxylation by the multifunctional bacterial P450 monooxygenase CYP107D1 (OleP). *Biotechnol Lett* 42(5): 819-824
76. Grobe S, Badenhorst CP, Bayer T, Hamnevik E, Wu S, Grathwol CW, Bornscheuer UT (2021) Engineering Regioselectivity of a P450 Monooxygenase Enables the Synthesis of Ursodeoxycholic Acid via 7 β Hydroxylation of Lithocholic Acid. *Angew Chem Int Ed* 60(2): 753-757
77. Cao Y, Zhang X (2013) Production of long-chain hydroxy fatty acids by microbial conversion. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(8): 3323-3331
78. Kim KR, Oh DK (2013) Production of hydroxy fatty acids by microbial fatty acid-hydroxylation enzymes. *Biotechnol. Adv.* 31(8): 1473-1485
79. Bernhardt R, Urlacher VB (2014) Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol* 98(14): 6185-6203
80. Poliakov M, Fitzpatrick JM, Farren TR, Anastas PT (2002) Green chemistry: science and politics of change. *Science* 297(5582): 807-810
81. Straathof AJ, Panke S, Schmid A (2002) The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol* 13(6): 548-556

Cytochrome P450 monooxygenases – versatile biocatalysts

Agata Wszolek^{1,2}✉

¹Institute of Biology, University of Szczecin

²Molecular Biology and Biotechnology Center, Institute of Biology, University of Szczecin

✉correspondence: agata.wszolek@usz.edu.pl

Keywords: P450 monooxygenases, biotechnology, biocatalysis, regio- selective hydroxylation, stereo-selective hydroxylation, bile acid hydroxylation, fatty acid hydroxylation

ABSTRACT

Advances in biochemistry have helped to understand the structure and function of enzymes, which in turn has led to an increase in their stability, activity and substrate specificity. Today, biocatalysis provides more sustainable, efficient and less polluting methods for the production of fine chemicals and advanced pharmaceutical intermediates. This paper presents the structure and the mechanism of action of cytochrome P450 monooxygenases and their use in the effective synthesis of biologically active compounds, which is more ecological, less time-consuming and cheaper compared to chemical synthesis. The pharmaceutical industry should take advantage of the advances in biochemistry to obtain biocatalysts for the production of fine chemicals on an industrial scale, improving the quality of end products while saving costs.

