

Streszczenie

Biomasa mikrobiologiczna w procesach modyfikacji 2-feniloetanolu i odzysku metali ziem rzadkich

Mgr inż. Agnieszka Raczyńska

W rozprawie doktorskiej przedstawiono wyniki badań dotyczących oceny potencjału biokatalitycznego wyselekcjonowanych szczepów grzybów z rodzaju *Beauveria* (*B. bassiana* DSM 1344 i *B. brongniartii* DSM 6651) oraz *Cunninghamella* (*C. echinulata* DSM 1905, *C. blakesleeana* DSM 1906 i *C. elegans* DSM 1908) stosowanych do biotransformacji łatwo dostępnego i taniego substratu – 2-feniloetanolu. W pierwszej kolejności eksperymenty zostały przeprowadzone w skali laboratoryjnej, a następnie wyselekcjonowane procesy w skali pół-preparatywnej. Zaobserwowano, że w większości badanych procesów, 2-feniloetanol ulegał procesowi degradacji, ale w zależności od zastosowanego typu biokatalizatora proces ten przebiegał z różną szybkością i z wykorzystaniem innych ścieżek biokatalitycznych. W przypadku szczepu *C. elegans* DSM 1908 jako jedyny produkt pośredni reakcji otrzymano (*S*)-1-feniloetano-1,2-diol. Optymalne stężenie w mieszaninie reakcyjnej tej pochodnej w skali laboratoryjnej osiągnięto po 3 dniach procesu biotransformacji uzyskując produkt ($18,91 \mu\text{g mL}^{-1}$) o nadmiarze enancjomerycznym (ee) równym 84,77%, równocześnie obserwując stopień przereagowania substratu powyżej 99%. W skali pół-preparatywnej optymalna synteza (*S*)-1-feniloetano-1,2-diol następowała po 4 dniach procesu ($45,16 \mu\text{g mL}^{-1}$) jednak produkt charakteryzował się niższą czystością optyczną (ee 67,26%). Zastosowanie kolejnego szczepu mikroorganizmu – *B. bassiana* DSM 1344 pozwoliło z kolei na uzyskanie drugiego z enancjomerów wspomnianego związku, ale tym razem w postaci czystej optycznie. (*R*)-1-Feniloetano-1,2-diol ($7,51 \mu\text{g mL}^{-1}$, ee >99,9%) uzyskano po trwającej 3 dni reakcji zarówno w skali laboratoryjnej – stopień przereagowania substratu równy 99,91%, jak i pół-preparatywnej ($47,99 \mu\text{g mL}^{-1}$, ee >99,9%) przy stopniu przereagowania substratu równym 86,88%. Natomiast zmiana postaci biokatalizatora poprzez immobilizację biomasy *B. bassiana* DSM 1344 w agar-agarze skutkowało otrzymaniem 1-feniloetano-1,2-diolu w postaci mieszaniny racemicznej. Kolejną ścieżką przemian zaobserwowaną podczas procesów biotransformacji 2-feniloetanolu była modyfikacja pierścienia aromatycznego substratu, co prowadziło w przypadku szczepu *C. blakesleeana* DSM 1906 do otrzymania już po 1 dniu

biotransformacji tyrozolu – związku o silnym działaniu antyoksydacyjnym, zarówno w skali laboratoryjnej jak i pół-preparatywnej. Stwierdzono, że wszystkie otrzymane produkty biotransformacji były wynikiem pośrednim procesów degradacyjnych 2-fenyletanolu w komórkach zastosowanych biokatalizatorów. Niemniej jednak, przy odpowiedniej optymalizacji czasu reakcji istnieje szansa na uzyskanie tych pochodnych w większej ilości. Do tej pory nie opisano w literaturze zastosowania badanych szczepów do otrzymywania wyżej wspomnianych związków. W przeciwieństwie do wcześniej opisanych szczepów, zastosowanie *B. brongniartii* DSM 6651 i *C. echinulata* DSM 1905 skutkowało szybko postępującą biodegradacją 2-fenyletanolu, uniemożliwiającą izolację i identyfikację produktów pośrednich biotransformacji. W przypadku szczepu *C. echinulata* DSM 1905 dochodziło do niemal całkowitej biodegradacji substratu już po 1 dniu trwania reakcji (stopień przereagowania substratu >99%), niezależnie od skali procesu. Podobnie przebiegający proces z udziałem szczepu *B. brongniartii* DSM 6651 postanowiono dodatkowo zoptymalizować pod kątem potencjalnych zastosowań w bioremediacji ekosystemów wodnych. W tym celu biomasę mikroorganizmu poddano procesowi immobilizacji w alginianie wapnia i zastosowano w systemie okresowym oraz przepływowym (skala pół-preparatywna), gdzie w ciągu 2 dni dochodziło do niemal całkowitej biodegradacji 2-fenyletanolu (stopień przereagowania substratu >99%). Uzyskane wyniki dają możliwość, po dalszej optymalizacji, na uzyskanie skutecznego i ekologicznego narzędzia do zastosowania w bioremediacji zarówno w warunkach wody stojącej jak i płynącej.

Kolejny etap badań obejmował weryfikację potencjału enzymatycznego biokatalizatora odmiennego pochodzenia. W miejsce grzybów zastosowano biomasę mikroalgi – *G. sulphuraria* ACUF 002 wcześniej niewykorzystywaną w procesach biotransformacji. Zaprojektowano dwuetapowy proces kaskadowy polegający na biotransformacji 2-fenyletanolu i następującym po niej odzysku pierwiastków ziem rzadkich (REE) z grupy lantanowców (lantanu, ceru, neodymu i gadolinu). Tak zaprojektowany proces z jednej strony miał na celu określenie przydatności wybranego fotobiokatalizatora do procesów modyfikacji 2-fenyletanolu, a z drugiej strony miał być sposobem na ograniczenie ilości odpadów poprocesowych, zgodnie z zasadą gospodarki o obiegu zamkniętym. Wprawdzie badana biomasa *G. sulphuraria* wykazała aktywność biokatalityczną wobec zastosowanego substratu, ale ustalenie struktury chemicznej powstającego produktu wymaga dalszych badań. Zauważono jednak, że biomasa (po narażeniu na 2-fenyletanol) zastosowana do odzysku REE, wykazała się lepszą efektywnością w odzysku REE w odniesieniu do biomasy bez wcześniejszego narażenia na kontakt z substratem (próba kontrolna – 2,5; 2,1; 3,8; 9,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ DM odpowiednio dla La, Ce, Nd i Gd). Lepsze wyniki uzyskano zarówno

w przypadku wcześniejszego stosowania niższego stężeniu substratu ($0,12 \text{ mg mL}^{-1}$) (Nd: 7,2; Gd: 18,4; La: 4,7 i Ce: $4,0 \mu\text{g g}^{-1} \text{ DM}$) oraz przy wyższym stężeniu substratu ($0,6 \text{ mg mL}^{-1}$) (Nd: 7,9; Gd: 18,7; La: 4,5 i Ce: $3,7 \mu\text{g g}^{-1} \text{ DM}$) w procesie biotransformacji. Przeprowadzone analizy wskazują, że za wyżej wymienione procesy może odpowiadać zarówno biosorpcja jak i bioakumulacja jonów metali. W celu dokładniejszego poznania mechanizmu ewentualnego transportu jonów metali do wnętrza komórek mikroorganizmu, zlecono badania dotyczące określenia rodzaju genów kodujących transporter transbłonowy odpowiedzialny za wychwyt REE.