

Beata Szmigiel-Merena

Zastosowanie biotransformacji do syntezy antyoksydantów

Streszczenie

Procesy biotransformacji, oparte o zastosowanie mikroorganizmów jako biokatalizatorów reakcji, stanowią alternatywę dla chemicznej syntezy użytecznych związków. Metody z zastosowaniem biokatalizatorów cało-komórkowych, ze względu na niski koszt pozyskania i większą stabilność enzymatyczną, w przeciwieństwie do izolowanych enzymów, są powszechnie wykorzystywane zarówno w procesach pozyskiwania dóbr drogą fermentacji, jak i do biotransformacji. Potencjał katalityczny mikroorganizmów, stosowanych

w biokonwersji ksenobiotyków, sprawia, że biokataliza jest konkurencyjnym narzędziem w syntezie związków chemicznych o znaczeniu praktycznym.

Wiedza na temat niekorzystnego wpływu wolnych rodników na żywy organizm, skłania do poszukiwania substancji, hamujących ich szkodliwe działanie. Takimi związkami są antyoksydanty, stosowane w profilaktyce i leczeniu wielu chorób. Skłania to do ciągłego poszukiwania nowych związków o tej aktywności oraz nowych metod ich otrzymywania - alternatywnych do procesów obciążających środowisko. Celem prezentowanej pracy było wykorzystanie grzybów do syntezy związków polifenolowych o aktywności antyoksydacyjnej drogą hydroksylacji taniego substratu - fenyloetanolu.

W prezentowanej pracy zastosowano następujące grzyby strzępkowe: *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Beauveria brongniartii* i *Beauveria bassiana*. Biotransformacje 2-fenyloetanolu z udziałem *Aspergillus niger* KKP 2301, *Rhizopus oryzae* DSM 1185, *Beauveria bassiana* DSM 875, prowadziły do syntezy antyoksydantów: hydroksytyrozolu, tyrozolu i kwasu 4-hydroksyfenylooctowego oraz wartościowego chiralnego produktu

o znaczeniu farmaceutycznym: 1-fenyletan-1,2-diolu (w przypadku *A. niger* w postaci czystego izomeru (*S*)). Zastosowanie *Beauveria brongniartii* (DSM 6651) skutkowało degradacją ksenobiotyku (2-fenyletanolu), co wskazuje, że mikroorganizm ten po dalszych potwierdzających badaniach mógłby być wykorzystany w procesach bioremediacji. Eksperymenty różniły się rodzajem i formą biokatalizatora (wolne i immobilizowane mycelium, zawiesina zarodników), warunkami procesu oraz rodzajem reaktora (kolba 250 mL, modelowy bioreaktor przepływowy, bioreaktor okresowy typu Batch- New Brunswick Scientific BioFlo). W zależności od podejścia uzyskano różną efektywność procesu i produkty (mieszalinę lub pojedynczy produkt).

Badania z *A. niger* rozpoczęto od zastosowania jego formy spoczynkowej- zawiesiny zarodników. Wyniki wskazały na syntezę jednego z antyoksydantów- hydroksytyrozolu. W celu dobrania warunków dla efektywnej biokonwersji, manipulowano medium biotransformacyjnym, stężeniem substratu, czasem procesu, a także podjęto próby modyfikacji aktywności zarodników (szok temperaturowy, preinkubacja bez substratu). Procedura polegająca na uzupełnieniu medium reakcyjnego glukozą (13 mM) okazała się najefektywniejsza w syntezie hydroksytyrozolu (1,4 mg/50 mL z 15 mg/50 mL substratu, wydajność 7,4%), porównując do biotransformacji prowadzonych jedynie w wodzie (0,27 mg/50 mL z 30 mg/50 mL substratu, 0,7%) lub w medium o niższym stężeniu glukozy (4 mM) (0,9 mg/50 mL z 15 mg/50 mL substratu, 4,7%) lub w podłożu mineralnym Czapek-Dox (0,7 mg/50 mL z 30 mg/50 mL substratu, 1,8%). Z kolei przeprowadzone modyfikacje zarodników, w celu zainicjowania procesu ich kiełkowania i stymulacji aktywności enzymatycznej, polegające m.in. na inkubacji zarodników w warunkach szoku termicznego (0,5 mg/50 mL hydroksytyrozolu z 30 mg/50 mL substratu, wydajność 1,3%), czy też preinkubacji w medium pozbawionym substratu (1,2 mg/50 mL hydroksytyrozolu z 15 mg/50 mL substratu, 6,2%) nie polepszyły biokonwersji.

W kolejnych eksperymentach badano aktywność katalityczną formy wegetatywnej *A. niger* (mycelium). Eksperymenty z zastosowaniem grzybni *A. niger* pozwoliły uzyskać mieszaninę dwóch przeciwutleniaczy: kwasu 4-hydroksyfenylooctowego i hydroksytyrozolu. Początkowe badania z zastosowaniem wolnej grzybni *A. niger* pozwoliły uzyskać 0,7 mg/50 mL mieszaniny kwasu 4-hydroksyfenylooctowego i hydroksytyrozolu z 15 mg/50 mL substratu (wydajność 3,7%). Badano wrażliwość komórek na działanie ksenobiotyku (2-fenyloetanolu) i dwukrotne zwiększenie jego stężenia (30 mg/50 mL) spowodowało spadek ogólnej wydajności syntezy produktów (0,35 mg/50 mL, wydajność 0,9%). Przeprowadzono modyfikację polegającą na hodowli mikroorganizmu z substratem (2-fenyloetanol), w celu zwiększenia syntezy/aktywności enzymów, zaangażowanych w procesy utlenienia i to pozwoliło uzyskać pojedynczy związek: kwas 4-hydroksyfenylooctowy (7 mg/50 mL z 30 mg/50 mL substratu, **wydajność 18%**). W celu zwiększenia stabilności biokatalizatora i efektywności procesu biokonwersji, w dalszych badaniach zastosowano unieruchomioną (pianki poliuretanowe) grzybnię *A. niger*. Takie podejście zwiększyło syntezę antyoksydantów w porównaniu do komórek wolnych (0,35 mg/50 mL, wydajność 0,9%) w tych samych warunkach reakcji (30 mg/50 mL substratu): 1,3 mg/50 mL mieszaniny kwasu 4-hydroksyfenylooctowego i hydroksytyrozolu (wydajność 3,5%). Wyniki pokazały, że biokatalizator immobilizowany jest stabilniejszy wobec czynników zewnętrznych tj. warunki procesu, ksenobiotyki, które mogą powodować utratę aktywności biokatalizatora, i to stanowi wartość tych eksperymentów. W celu powiększenia skali procesu postanowiono zastosować dwa reaktory: zaprojektowany bioreaktor przepływowy oraz bioreaktor okresowy (New Brunswick Scientific, BioFlo Model C32, 1,3 L). Badania prowadzone w bioreaktorze przepływowym, upakowanym unieruchomioną grzybnią *A. niger* (pianki poliuretanowe 1060-1600 μm), pozwoliły zwiększyć syntezę produktów i uzyskano 11,4 mg/150 mL mieszaniny

antyoksydantów (kwasu 4-hydroksyfenylooctowego i hydroksytyrozolu) z 90 mg/150 mL substratu (**wydajność 10%**). Z kolei proces biokonwersji 2-fenyloetanolu prowadzony przez wolną grzybnię *A. niger* w napowietrzonym bioreaktorze okresowym (New Brunswick Scientific, BioFlo Model C32) prowadził do syntezy zupełnie innego produktu niż w pozostałych eksperymentach- (*S*)-1-fenyloetan-1,2-diolu (335 mg/750 mL z 458 mg/750 mL substratu, **wydajność 65%**)- związku stosowanego w syntezie leków (fluoksetyny i norfluoksetyny). Pół-preparatywna procedura otrzymywania tego związku została objęta zgłoszeniem patentowym: „*Sposób otrzymywania (S)-1-fenyloetan-1,2-diolu*” nr P.429923 z dnia 15.05.2019r.

Kolejnym stosowanym biokatalizatorem do transformacji 2-fenyloetanolu był *Rhizopus oryzae*. Przeprowadzone procesy biotransformacji prowadziły do syntezy tyrozolu oraz głównie chiralnego (nieokreślona konfiguracja) 1-fenyloetan-1,2-diolu. W zależności od zastosowanych warunków procesu, otrzymywano mieszaninę produktów o różnym stężeniu. Początkowo badano wpływ stężenia substratu na efektywność procesu biokonwersji. W przypadku zastosowania wolnego mycelium *R. oryzae*, po dwukrotnym zwiększeniu ilości substratu do 30 mg/50 mL, uzyskano większą ilość mieszaniny produktów (1,2 mg/50 mL tyrozolu i 1-fenyloetan-1,2-diolu, wydajność 3,5%), utrzymując wydajność procesu na nieco niższym poziomie, jak przy zastosowaniu mniejszej ilości substratu (15 mg/50 mL) (0,7 mg/50 mL produktów, wydajność 4%). Dalsze zwiększenie wyjściowej ilości substratu do 60 mg/50 mL skutkowało otrzymaniem zdecydowanie większej ilości produktów, ale obniżyło wydajność procesu (1,8 mg/50 mL produktów, wydajność 2,6%), co mogło być spowodowane hamowaniem aktywności enzymatycznej przez zbyt wysokie stężenie substratu. Wprowadzono również modyfikację, polegającą na preinkubacji komórek *R. oryzae* w warunkach deficytu składników pokarmowych przez 24 godziny, aby ukierunkować przemiany metaboliczne

na wykorzystanie substratu, gdy dostępność składników odżywczych jest ograniczona, jednak w tej sytuacji zaobserwowano jedynie powstawanie śladowych ilości produktów i dużą ilość nieprzereagowanego substratu. Także w przypadku tego biokatalizatora, w celu zwiększenia jego stabilności i efektywności procesu biokonwersji, w dalszych badaniach zastosowano jego unieruchomioną (pianki poliuretanowe) grzybnię. Takie podejście pozwoliło na efektywniejszą biokonwersję substratu do tyrozolu i 1-fenyletan-1,2-diolu (1,9 mg/50 mL mieszaniny produktów z 30 mg/50 mL substratu, wydajność 5,5%), w porównaniu do wolnej postaci tego mikroorganizmu. Również w tych badaniach, w celu powiększenia skali procesu postanowiono zastosować bioreaktor z systemem przepływowym, niestety próba ta zakończyła się niepowodzeniem i dalszych badań z tym biokatalizatorem zaniechano.

Procesy biotransformacji 2-fenyletanolu katalizowane przez kolejny biokatalizator-*Beauveria bassiana*, prowadziły do syntezy jedynie śladowych ilości tyrozolu oraz 1-fenyletan-1,2-diolu, z tego względu po wstępnych badaniach zaniechano dalszych eksperymentów.

Z kolei, zastosowanie *Beauveria brongniartii* jako biokatalizatora prowadziło do degradacji substratu (2-fenyletanolu). Substrat inkubowany z grzybem ulegał stopniowej biodegradacji. Całkowitą mineralizację związku uzyskano już po jednym dniu biokonwersji. Jednak po godzinie utracono prawie połowę 2-fenyletanolu, a po 5 godzinach pozostało tylko 16,5% związku.