

## Streszczenie rozprawy doktorskiej

### **„Wykorzystanie sinic do otrzymywania chiralnych związków fosfonowych”**

mgr inż. Monika Górak

Redukcja ketonów oparta na strategii z zastosowaniem metod biologicznych, skupia się na wykorzystaniu niefotosyntetyzujących i heterotroficznych mikroorganizmów lub wyizolowanych i oczyszczonych z nich enzymów. Mikroorganizmy fotoautotroficzne, w tym cyjanobakterie, również zostały zidentyfikowane, jako źródło aktywności oksydoreduktaz. Jednak w porównaniu do najczęściej stosowanych biokatalizatorów – bakterii oraz grzybów, sinice stanowią słabo poznaną grupę mikroorganizmów. Z tego powodu eksploatacja potencjału biokatalitycznego sinic stanowi poważne wyzwanie badawcze. Pomimo faktu, że zastosowanie całych komórek mikroorganizmów jak i wyizolowanych z nich enzymów w procesach przemysłowych wzrasta, to praktyczne wykorzystanie biokatalizy jest często ograniczone ze względu na brak odpowiednich biokatalizatorów przeznaczonych do określonych przemian czy też trudności z przełożeniem procesu ze skali laboratoryjnej na przemysłową.

Cyjanobakterie (sinice, *Cyanophyta*, ang. blue-green algae) stanowią jedną z największych i najważniejszych grup bakterii na Ziemi. W toku ewolucji wykształciły skuteczne mechanizmy ochronne i adaptacyjne do zmiennych warunków środowiska, wobec różnych stresów abiotycznych, takich jak wysychanie, zasolenie, wysokie temperatury czy też obecności jonów metali ciężkich. Sinice przedstawiają ogromną wartość dla biotechnologii, ze względu na możliwość ich różnorodnego wykorzystania, m.in. w branży spożywczej, kosmetycznej, farmaceutycznej, paliwowej oraz ochronie środowiska.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki eksperymentów, których głównym celem było zbadanie możliwości zastosowania cyjanobakterii, jako biokatalizatora do otrzymywania chiralnych związków fosfonowych -  $\beta$ -hydroksyfosfonianów, drogą enancjoselektywnej redukcji strukturalnie różnych substratów –  $\beta$ -ketofosfonianów z alifatycznym (2-oksopropanofosfonian dietylu, 2-oksobutanofosfonian dietylu) lub aromatycznym łańcuchem bocznym (2-okso-2-fenylotetanofosfonian dietylu). W badaniach zastosowano morfologicznie różne szczepy sinic: *Arthrospira maxima*, *Leptolyngbya foveolarum*, *Geitlerinema* sp., *Nostoc cf-muscorum*, *Synechococcus bigranulatus* oraz *Nodularia sphaerocarpa*, spośród których,

jedynie komórki nitkowatych szczepów *Arthrospira maxima*, *Nodularia sphaerocarpa* oraz *Nostoc cf-muscorum* zdolne były do efektywnej redukcji ketofosfonianów w ciągu 7-dniowego procesu biotransformacji, prowadzonego w warunkach ciągłego naświetlania zarówno niebiesko-białym (Power Glo) jak i żółtym, dziennym światłem (Sun Glo).

Produkty procesów biokonwersji analizowano za pomocą spektroskopii  $^1\text{H}$  i  $^{31}\text{P}$  NMR. W celu określenia nadmiaru enancjomerycznego zastosowano dodatek chininy, jako chiralnego czynnika solwującego, który pozwala na różnicowanie enancjomerów  $\beta$ -hydroksyfosfonianów na widmie  $^{31}\text{P}$  NMR. Konfigurację absolutną na  $\beta$  atomie węgla, otrzymanych  $\beta$ -hydroksyfosfonianów, określono za pomocą metod NMR, z zastosowaniem chiralnego czynnika derywatyzującego – kwasu  $\alpha$ -metoksy- $\alpha$ -trifluorometylofenylooctowego (MTPA).

Przeprowadzone procesy biotransformacji pozwoliły wyznaczyć optymalne warunki dla poszczególnych procesów bio redukcji z zastosowaniem komórek *A. maxima*, *Nostoc cf-muscorum* oraz *N. sphaerocarpa*. W przypadku szczepów *Arthrospira maxima* oraz *Nostoc cf-muscorum* otrzymane wyniki badań wskazują na istotną korelację pomiędzy składnikami odżywczymi (podłoże hodowlane, obecność glukozy) i czynnikami fizycznymi (naświetlanie, fotoperiod) w ich oddziaływaniu na aktywność katalityczną cyjanobakterii.

Natomiast, komórki szczepu *Nodularia sphaerocarpa* były najefektywniejszym źródłem aktywności katalitycznej, niezależnie od zastosowanych warunków procesu (źródła oświetlenia, fotoperiodu, podłoża hodowlanego, mieszania), zarówno w stosunku do aromatycznego, jak i alifatycznych substratów. Zastosowanie szczepu *N. sphaerocarpa* pozwoliło po raz pierwszy otrzymać aromatyczny  $\beta$ -hydroksyfosfonian w biokatalityczny sposób – w procesie redukcji 2-okso-2-fenylotetanofosfonianu dietylu otrzymano odpowiedni (*S*)-2-hydroksy-2-fenylotetanofosfonian dietylu z 99% stopniem przereagowania substratu oraz 93% czystością optyczną. Wynik ten jest szczególnie interesujący, ze względu na wcześniejsze badania z zastosowaniem komórek grzybów, w tym drożdży piekarniczych, które zakończyły się niepowodzeniem.

Istotnym czynnikiem wpływającym na efektywność procesu bio redukcji, nie tylko w przypadku szczepu *N. sphaerocarpa*, ale również komórek *Arthrospira maxima* czy też *Nostoc cf-muscorum* jest struktura substratu. Komórki szczepu *Nostoc cf-muscorum* wykazywały aktywność katalityczną jedynie w kierunku redukcji aromatycznego substratu – 2-okso-2-fenylotetanofosfonianu dietylu, podczas gdy nitkowaty szczep *Arthrospira maxima* wobec alifatycznego 2-oksopropanofosfonianu dietylu. W obu przypadkach, procesy

biokonwersji niezależnie od zastosowanych warunków hodowli czy też biotransformacji, prowadziły do otrzymania produktu (*S*)-hydroksyfosfonianu z ponad 99% czystością optyczną, ale z umiarkowaną, zależną od warunków wydajnością.

Określono wpływ stężenia substratu - 2-okso-2-fenylloetanofosfonianu dietylu, na efektywność procesu bioredukcji oraz żywotność komórek cyjanobakterii *Nodularia sphaerocarpa* w warunkach procesu. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły ocenić wrażliwość komórek *N. sphaerocarpa* na obecność ksenobiotyku w medium. W optymalizacji procesu biotransformacji istotne jest uwzględnienie zjawiska inaktywacji biokatalizatora, które jest procesem złożonym, zależnym nie tylko warunków procesu, ale również od struktury i zastosowanego stężenia substratu.

Uzyskane wyniki potwierdziły niezwyklej potencjał hodowli *N. sphaerocarpa* w bioredukcji 2-okso-2-fenylloetanofosfonianu dietylu. Istotną obserwacją jest fakt, że dwukrotny wzrost stężenia substratu (2 mM, 51 mg) nie wpływa znacząco na efektywność procesu (94%, 91% *e.e.*). Stopień przereagowania substratu nieznacznie maleje wraz ze wzrostem jego stężenia, jednak czystość optyczna produktu jak i również przeżywalność komórek biokatalizatora pozostają prawie na tym samym poziomie, co potwierdziły badania z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Fakt ten sugeruje zaangażowanie w przemianę ksenobiotyków enzymów metabolizmu wtórnego.

W celu określenia czy zmiana formy biokatalizatora wpłynie na efektywność procesu biokonwersji ksenobiotyków oraz w celu ograniczenia negatywnego oddziaływania substratów na aktywność biokatalizatora, komórki sinic poddano procesowi unieruchomienia w matrycy polimeru – alginianie sodu (2% lub 4%, w/v). Immobilizowane komórki sinic wykazywały niższą aktywność katalityczną, w porównaniu do wolnych komórek sinic inkubowanych w warunkach wytrząsanych. W przypadku immobilizowanej biomasy szczepu *N. sphaerocarpa* obserwowano niewielki spadek efektywności procesu bioredukcji  $\beta$ -ketofosfonianów, jednak w przypadku szczepu *A. maxima* odnotowano znaczącą redukcję aktywności katalitycznej (wydajność poniżej 5%). Istotną zależność zaobserwowano w przypadku szczepu *Nostoc cf-muscorum*, którego unieruchomione komórki zdolne były do efektywniejszej redukcji 2-okso-2-fenylloetanofosfonianu dietylu, w porównaniu do wolnych komórek, hodowanych w warunkach stacjonarnych.

Szczep *N. sphaerocarpa* wydawał się szczególnie interesujący, ze względu na wysoką efektywność procesu biokatalizy z jego udziałem, ale również ze względu na niewielki wpływ

czynników fizyko-chemicznych (oświetlenie, fotoperiod, podłoże hodowlane, glukoza) na jego aktywność katalityczną, w przypadku redukcji 2-okso-2-fenylloetanofosfonianu dietylu. Uzyskane wyniki stanowiły podstawę do kontynuacji badań i podjęcia próby zwiększenia skali najefektywniejszego procesu bioredukcji - redukcji 2-okso-2-fenylloetanofosfonianu dietylu z zastosowaniem komórek *N. sphaerocarpa*.

W opracowaniu efektywnego procesu biotransformacji na skalę preparatywną, wykorzystano trzy różniące się formą biokatalizatora, aparaturą oraz warunkami procesu podejścia. W procedurze zwiększania skali procesu, stopniowo powiększono objętość bioreaktorów oraz stężenie substratu. Badania rozpoczęto od wykorzystania 200 ml hodowli *N. sphaerocarpa* prowadzonej w wentylowanych butelkach płaskościennych, w transformacji 1.3 mM substratu - 2-okso-2-fenylloetanofosfonianu dietylu. W kolejnym podejściu, objętość hodowli *N. sphaerocarpa* zwiększono do 500 ml (kolba Erlenmeyer'a), zaś stężenie badanego substratu wynosiło 1 oraz 5 mM. Ostatni model charakteryzował się zastosowaniem unieruchomionych w alginianie wapnia (1%, w/v) komórek *N. sphaerocarpa*, które stanowiły wypełnienie szklanej lub plastikowej kolumny, przez którą w obiegu zamkniętym przepływało medium biotransformacji, zawierające substrat (2-okso-2-fenylloetanofosfonian dietylu, 10 mM, 384 mg).

Spośród zastosowanych metod zwiększenia skali procesu bioredukcji 2-okso-2-fenylloetanofosfonianu dietylu, najefektywniejszym rozwiązaniem było zastosowanie bioreaktora okresowego w postaci kolby Erlenmeyer'a (2000 ml) w warunkach wytrząsanych, gdyż tylko takie podejście gwarantowało efektywną transformację substratu 2-okso-2-fenylloetanofosfonianu dietylu oraz otrzymanie produktu z wysoką czystością optyczną.

Przeprowadzone eksperymenty potwierdzają możliwość zastosowania mikroorganizmów fotosyntetyzujących – cyjanobakterii, jako biokatalizatorów do otrzymywania chiralnych związków fosfonowych -  $\beta$ -hydroksyfosfonianów, drogą enancjoselektywnej redukcji strukturalnie różnych substratów – ketofosfonianów z alifatycznym lub aromatycznym łańcuchem bocznym. Wskazują również na możliwość zwiększenia skali procesu biotransformacji ksenobiotyków z zastosowaniem zarówno wolnych jak i immobilizowanych komórek szczepu *N. sphaerocarpa*.