

# Ocena właściwości katalitycznych sinic

## Streszczenie

Mgr inż. Agnieszka Ślizewska

Cyjanobakterie jako niezwykle zróżnicowana grupa mikroorganizmów stanowią interesujący obiekt badawczy. Mnogość form morfologicznych, występowanie w niemalże każdych warunkach oraz na całym globie powoduje, że ich potencjał nie jest w pełni odkryty. Holistyczne i kompleksowe badania aktywności wybranych fotobiokatalizatorów wobec modelowych substratów pozwoliły na uzyskanie przydatnej wiedzy do zastosowania tych biokatalizatorów w obszarze zrównoważonej biotechnologii. Biotransformacje prowadzone z wykorzystaniem cyjanobakterii stanowią alternatywę dla syntezy chemicznej, nie tylko ze względu na to, że są to procesy przyjazne dla środowiska, ale są również opłacalne ekonomicznie. W pracy skupiono się na opracowaniu skutecznych metod pozwalających na ocenę aktywności hydrolitycznej fotobiokatalizatorów oraz podjęto próby sprawdzenia, czy są zdolne do prowadzenia reakcji typu redoks. Badania prowadzono na siedmiu szczepach należących do różnych grup taksonomicznych i różniących się budową morfologiczną. Zastosowano trzy modelowe substraty, w tym mieszaniny racemiczne chiralnych: octanu 1-fenyletylu oraz epoksystyrenu w celu zbadania aktywności hydrolitycznej oraz styren, aby sprawdzić zdolność cyjanobakterii do prowadzenia reakcji redoks (uwodornienia, hydroksylacji, czy epoksydacji). Udowodniono, że aparat enzymatyczny sinic jest aktywny wobec wiązania estrowego stosowanego ksenobiotyku, co może wynikać z aktywności hydrolaz estrów karboksylowych – (CEHs, EC 3.1.1). Zaproponowano nowy sposób otrzymywania chiralnego alkoholu, acetofenonu i enancjomeru nieprzereagowanego substratu. Wskazano szczepy które posiadają największą aktywność biokatalityczną: *Nostoc cf-muscorum* CCALA 129, *Leptolyngbya foveolarum* CCALA 76, *Synechococcus bigranulatus* CCALA 187 oraz *Limnospira indica* PCC8005. Badania zmienności morfologii dostarczyły nieopisaną dotąd w literaturze (w przypadku szczepów innych niż z rodzaju *Spirulina*) informacji na temat zmienności morfologii – skręcalności trychomów w obrębie tego samego szczepu na przestrzeni lat (dymorfizm), co związane jest z hodowlą tych organizmów w warunkach niefizjologicznych – laboratoryjnych. W przypadku szczepu *Nostoc cf-muscorum* CCALA 129 trychomy pochodzące z nowej hodowli są zdecydowanie bardziej skręcone i krótsze. Można zaobserwować z upływem czasu rozprostowanie się trychomów oraz ich wydłużenie. W przypadku dłużej pasażowanego szczepu widoczne są niezwiązane z filamentami (trychomami) liczne heterocysty, które nie są widoczne w takich dużych ilościach w przypadku tego samego szczepu pasażowanego krótszy czas. Różnice w morfologii rzutowały na wyniki procesów biotransformacji w różnorodny sposób w zależności od szczepu – przyspieszały bądź spowalniały proces biotransformacji, co również miało odzwierciedlenie w wynikach biotransformacji. W przypadku szczepu *Kamptonema animale* nowa wersja szczepu prowadzi reakcje biotransformacji z wyższą enancjoselektywnością ( $E = 5,2$ ) niż szczep stary ( $E = 2,0$ ) dla stopnia przereagowania ok. 50%. Dla wszystkich prowadzonych procesów obliczono

parametr  $E$ , który jest niezwykle istotny w przypadku rozdziału kinetycznego. Wykazano, że parametry takie jak: czas trwania biotransformacji, stężenie substratu, czy sposób hodowli mają znaczący wpływ na jego wartość. W przypadku szczepu *Nostoc cf-muscorum* CCALA 129 uzyskano czysty alkohol: 1-(*R*)-fenyloetanol o doskonałym nadmiarze enancjomerycznym do  $ee > 99\%$  dla następujących stężeń substratu: 2mM, 4mM do 6mM z wysoką enancjoselektywnością, ( $E = 275$ ). Wyniki te są obiecujące pod względem powiększenia skali procesu i zastosowania tego szczepu do produkcji chiralnych alkoholi. Dzięki zbadaniu przebiegu reakcji rozdziału kinetycznego poniżej i powyżej wartości 50% stopnia przereagowania, zaobserwowano, że niektóre szczepy również utleniają produkt hydrolizy wiązania estrowego – fenyloetanol, do acetofenonu. Szczep *Limnospira indica* PCC8005 najefektywniej utleniał alkohol do acetofenonu – współczynnik konwersji po 72 godzinach prowadzenia procesu wynosił 29%, natomiast w przypadku szczepu *Nostoc cf-muscorum* CCALA 129 stopień konwersji po tym samym czasie trwania procesu wynosił 2%. Jest to niezwykle ważna obserwacja i może świadczyć o tym, że w określonych warunkach reakcji alkohol pojawiający się w środowisku hodowli wydaje się być zewnętrznym źródłem protonów i elektronów, co pozwalało na utrzymanie ważnej dla fotobiokatalizatorów równowagi redoks. Szybkość procesu utleniania była różna, co wskazuje, że dla każdego szczepu trzeba prowadzić oddzielne badania, by prześledzić powstawanie produktów ubocznych biotransformacji. Zbadano również przeżywalność biokatalizatora w warunkach biotransformacji w szerokim zakresie stężeń (1 mM – 50 mM). Badania z wykorzystaniem cytometrii przepływowej wykazały bardzo wysoki zakres tolerancji badanego biokatalizatora wobec substratu, co jest obiecujące nie tylko dla zwiększenia skali procesu, ale również dla wykorzystania cyjanobakterii w procesach ciągłych. Przeprowadzono badania sprawdzające szybkość procesu biotransformacji w odniesieniu do powierzchni światła padającego na hodowlę – badania te skorelowane były również z powiększaniem skali procesu poprzez zwiększanie stężenia substratu do 50 mM maksymalnie. Jest to element krytyczny planowania procesu biotransformacji ze względu na to, że efekt ten różni się dla poszczególnych biokatalizatorów i powinien być każdorazowo sprawdzany dla każdego szczepu. W przypadku zastosowanych szczepów różnice te były istotne dla szczepu *Synechococcus bigranulatus* CCALA 187 i zdecydowanie przyspieszały proces – po 3 godzinach stopień konwersji procesu prowadzonego w butelce hodowlanej był o 19% wyższy. Powyżej opisane podejście badawcze pozwoliło na zrealizowanie celu badań poprzez odpowiedni dobór warunków hodowli i opracowanie protokołów biotransformacji dla poszczególnych szczepów.