

Biotransformacje związków fosforoorganicznych z zastosowaniem biokatalizatorów  
o właściwościach hydrolitycznych

Streszczenie

Obecna tendencja do udoskonalania procesów przemysłowych, redukcji kosztów, a także podnoszenie wymagań jakościowych, środowiskowych oraz bezpieczeństwa przemysłowych transformacji chemicznych, wzmocniła i zintensyfikowała prace nad transferem wyników badań biokatalitycznych do przemysłu [1]. Procesy enzymatyczne zostały w ostatnich dekadach zaimplementowane w wielu gałęziach przemysłu chemicznego, spożywczego i farmaceutycznego ze względu na wysoką specyficzność, szybkość działania enzymów, a także na oszczędność surowców, energii, odczynników i/lub wody w porównaniu do konwencjonalnych procesów. [2] Biokataliza stała się istotnym narzędziem umożliwiającym sprostać rosnącym wymaganiom zielonej i zrównoważonej produkcji chemicznej, szczególnie w przemyśle farmaceutycznym, gdzie aktywność biologiczna związków ma tak duże znaczenie.

Jedną z istotnych, z uwagi na szerokie spektrum właściwości biologicznych, grup związków wykorzystywanych w przemyśle chemicznym są chiralne hydroksy- i aminofosfoniany. Wykazują one właściwości antybakteryjne, antynowotworowe oraz antywirusowe, a także znalazły zastosowanie jako inhibitory enzymów oraz pestycydy [3-5]. Stanowią też syntetyczną platformę do otrzymywania różnorodnych czynników terapeutycznych. Chemiczna synteza ich optycznych izomerów jest kosztowna, pochłania dużo czasu i nie jest przyjazna dla środowiska, dlatego też biotransformacje stają się coraz atrakcyjniejszą metodą otrzymywania tych związków. Ze względu na silną zależność aktywności związków fosfonowych od ich konfiguracji absolutnej, synteza optycznie czystych enancjomerów tych związków jest ważna.

Substratami wykorzystywanymi w badaniach opisanych w niniejszej pracy były pochodna hydroksyfosfinianu – kwas 2-butyryloksy-2-(etoksyfenylofosfinylo)octowy, oraz pochodne  $\alpha$ -aminofosfonianów – kwas *N*-acetylo-1-aminoetanofosfonowy ( $\text{Ala}^{\text{P}}\text{-Ac}$ ), kwas *N*-acetylo-1-amino-2-metylopropanofosfonowy ( $\text{Val}^{\text{P}}\text{-Ac}$ ) i kwas *N*-acetylo-1-amino-1-fenylometanofosfonowy ( $\text{Phg}^{\text{P}}\text{-Ac}$ ).

Kwas 2-butyryloksy-2-(etoksyfenylofosfinylo)octowy jak i produkt jego hydrolizy posiadają w swojej budowie dwa centra stereogeniczne, co skutkuje występowaniem każdego z tych związków w postaci 4 izomerów. Dla uproszczenia procesu biotransformacji na początku prowadzonych badań podjęto próby chromatograficznego rozdzielania diastereoizomerów. Miało to na celu otrzymanie jednej pary enancjomerów kwasu 2-butyryloksy-2-(etoksyfenylofosfinylo)octowego, która byłaby wykorzystana w reakcjach biotransformacji prowadzących do uzyskania enancjomerycznie czystych produktów. Przeprowadzone badania nie pozwoliły jednak na znalezienie wydajnej metody rozdzielania diastereoizomerów kwasu 2-butyryloksy-2-(etoksyfenylofosfinylo)octowego. Uzyskano jedynie mieszaniny wzbogacone o jedną z par enancjomerów. Stosując metodę z wykorzystaniem jako eluentu mieszaniny: octan etylu/n-heksan/2-propanol (5:4:1 v/v) otrzymano niewielką ilość butyryloksypochodnej z molowym stosunkiem diastereoizomerów 1:0,042.

Kolejnym etapem prac był skrining mikroorganizmów zdolnych do hydrolizy testowanych związków. Jako biokatalizatory zastosowano kilka szczepów grzybów strzępkowych, drożdży, bakterii właściwych oraz cyjanobakterii, a w przypadku  $\alpha$ -aminofosfonianów także preparaty enzymatyczne.

Wśród testowanych biokatalizatorów nie udało się znaleźć takiego, który hydrolizowałby wiązanie amidowe w badanych *N*-acylowych pochodnych kwasów  $\alpha$ -aminofosfonowych. Mimo, że lipazy nie są powszechnie stosowane w hydrolizie wiązania amidowego, posiadają one w centrum aktywnym triadę katalityczną złożoną z Ser-His-Asp/Glu, podobną do triady proteaz serynowych, posiadających zdolność do hydrolizy wiązania amidowego. Lipazy o aktywności amidazowej są poszukiwane ze względu na ich większą, w porównaniu do proteaz, aktywność oraz stabilność w trudnych warunkach procesowych.

W badaniach przesiewowych dotyczących hydrolizy kwasu 2-butyryloksy-2-(etoksyfenylofosfinylo)octowego spośród testowanych biokatalizatorów aktywne okazały się grzyby strzępkowe oraz cyjanobakterie. Sinice jednak, nie hydrolizowały testowanego związku enancjoselektywnie. Butyryloksyfosfinian okazał się toksyczny względem szczepów *Nostoc cf. muscorum* oraz *Nodularia sphaerocarpa* już w niskich stężeniach (3,2 mM) substratu. Najlepsze wyniki, pod względem zarówno stopnia przereagowania jak i nadmiarów enancjomerycznych uzyskano dla całych komórek grzybów *T. purpurogenus* KKP 2512, *P. commune*, *F. oxysporum*, *A. fumigatus* oraz *T. purpurogenus* KKP 2511. Grzyby *M. circinelloides*, *P. purpurogenum*, *P. crustosum*, *P. lipolityczne* oraz *P. funiculosum*

również wykazywały zdolność do konwersji testowanego związku, lecz z dużo niższą enancjoselektywnością.

Produkty biotransformacji badano z wykorzystaniem  $^1\text{H}$  oraz  $^{31}\text{P}$  NMR. W celu rozdzielenia sygnałów pochodzących od enancjomerów zastosowano chiralne odczynniki solwujące – chininę w przypadku hydroksyfosfinianów oraz cyklodekstrynę do oznaczania nadmiarów enancjomerycznych aminofosfonianów.

Dalsze badania dotyczące kwasu 2-butyryloksy-2-(etoksyfenylofosfinylo)octowego skupiały się na optymalizacji warunków procesowych reakcji biotransformacji oraz powiększaniu skali tego procesu. Produkcję lipaz można zwiększyć na etapie fermentacji. Sekrecja tych enzymów uwarunkowana jest przez chemiczne warunki wzrostu takie jak skład medium hodowlanego, typ i stężenie źródeł węgla oraz azotu, a także przez parametry fizyczne takie jak pH, temperatura czy zawartość rozpuszczonego tlenu. Dodatkowo lipazy mikrobiologiczne to w większości indukowane enzymy zewnątrzkomórkowe, których produkcja wzrasta w obecności lipidowego źródła węgla. Dlatego też zbadano wpływ parametrów hodowli tj. źródło węgla i azotu, dodatek induktorów syntezy lipaz oraz suplementacja SDS, DMSO oraz Tween na aktywność wybranego biokatalizatora - *P. commune*. Zastosowanie DMSO oraz olejów roślinnych pozwoliło uzyskać biokatalizatory o najkorzystniejszych parametrach. Suplementacja (1 lub 2%) DMSO skutkowała wzrostem zarówno wydajności jak i enancjoselektywności procesu – dla podłoża zawierającego 1% DMSO stopień przereagowania wynosił 48%, a *e.e.* mieściło się w zakresie 43-75%. Pozytywny wpływ na czystość enancjomeryczną otrzymanych produktów miał również dodatek do medium hodowlanego niektórych olejów takich jak oliwa z oliwek, olej słonecznikowy, lniany oraz winogronowy.

Przeprowadzono również badania mające na celu określenie wpływu różnych podłoży hodowlanych na aktywność grzybów *P. commune* w procesie biotransformacji kwasu 2-butyryloksy-2-(etoksyfenylofosfinylo)octowego. Spośród badanych podłoży najbardziej efektywne okazały się media H1 oraz medium lipazowe (YEP) – stopień przereagowania w reakcji hydrolizy z wykorzystaniem biomasy hodowanej na tych podłożach wynosił odpowiednio 45% i 54%. Biomasa hodowana na pozostałych podłożach wykazywała niską aktywność – konwersja substratu nie przekraczała 21%. Biokatalizator hodowany na wszystkich testowanych podłożach charakteryzował się niską enancjoselektywnością – wartości *e.e.* dla otrzymanych produktów nie przekraczały 39%. Zaobserwowano również, że aktywność lipolityczna badanych szczepów (pomiar szybkości hydrolizy palmitynianu *p*-

nitrofenolu), która była uwarunkowana składem podłoża, nie wpływa na efektywność procesu biotransformacji kwasu 2-butyryloksy-2-(etoksyfenylofosfinylo)octowego.

Kolejnym badanym parametrem była preinkubacja biokatalizatora, w warunkach deficytu substancji odżywczych, przed etapem właściwej biotransformacji. W przypadku *P. commune* zaobserwowano znaczący wzrost enancjoselektywności reakcji (*e.e.* sięgające 90% oraz enancjoselektywność E 52,8) w porównaniu do reakcji z wykorzystaniem biokatalizatora przygotowanego bez etapu głodzenia (*e.e.* oraz E sięgające odpowiednio 54% oraz 3,5).

Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na opracowanie procesu charakteryzującego się wysoką wydajnością i enancjoselektywnością. Wykorzystanie biomasy *P. commune* hodowanej na podłożu H1 z dodatkiem oleju słonecznikowego i z zastosowaniem preinkubacji biokatalizatora w warunkach deficytu substancji odżywczych przed etapem biotransformacji skutkowało 49% stopniem przereagowania substratu oraz nadmiarami enancjomerycznymi w zakresie od 82-90%.

Do tej pory biokonwersję fosfonianów prowadzono jedynie na skalę laboratoryjną, a powiększanie skali eksperymentu było utrudnione, głównie ze względu na naturę substratów. Związki te działają jako inhibitory enzymów, co powoduje, że biokonwersja fosfonianów jest trudna do przeprowadzenia.

Na etapie powiększania skali procesu zastosowano biokatalizatory w formie wolnych oraz immobilizowanych komórek, a także dwa okresowe systemy operacyjne – reaktor z ciągłym wytrząsaniem oraz reaktor kolumnowy z recyrkulacją medium biotransformacyjnego. Dla szczepów *T. purpurogenus* KKP 2512, *F. oxysporum*, *P. commune* opracowano protokoły efektywnej immobilizacji na piankach poliuretanowych. Natomiast immobilizacja *P. commune* w alginianie wapnia okazała się nieefektywna - zamknięcie biokatalizatora w żelowej kapsułce utrudniło jego kontakt z substratem i skutkowało obniżeniem wydajności procesu biotransformacji.

Eksperymenty prowadzone na skalę laboratoryjną z zastosowaniem 3,2 mM (50 mg) substratu, pozwoliły na wyselekcjonowanie najbardziej aktywnych biokatalizatorów: *P. commune*, *T. purpurogenus* KKP 2511, *F. oxysporum* oraz *T. purpurogenus* KKP 2512. Następnie wykorzystano te szczepy w formie wolnych komórek w procesie z dwukrotnie wyższym stężeniem substratu (6,4 mM – 100 mg). W tych warunkach procesowych wszystkie biokatalizatory wykazywały wysoką aktywność i enancjoselektywność, jednak dalsze powiększanie skali procesu do 32 mM stężenia substratu (500 mg) okazało się nieefektywne.

Spadek aktywności wolnych komórek mógł być spowodowany toksycznym działaniem substratu.

W celu przezwyciężenia spadku aktywności biokatalizatora, całe komórki grzybów zostały zimmobilizowane na piankach poliuretanowych. Testowane szczepy *F. oxysporum* i *T. purpurogenus* KKP 2511 wykazywały niższą aktywność niż wolne komórki. Natomiast szczepy *P. commune* i *T. purpurogenus* KKP 2512 charakteryzowały się zadowalającą aktywnością i stabilnością przy stężeniu substratu 3,2 mM (stopień przereagowania oraz nadmiary enancjomeryczny były zbliżone do procesów z wolnymi komórkami) jak i 6,4 mM. Jednak dalsze powiększanie skali procesu okazało się nieefektywne.

W celu zwiększenia stopnia przereagowania dla procesów z wysokimi stężeniami substratu, zimmobilizowany biokatalizator (*T. purpurogenus* KKP 2512 oraz *P. commune*) zastosowano jako wypełnienie kolumny z ciągłą recyrkulacją medium reakcyjnego. Taki system wymuszał przepływ medium przez pianki, co skutkowało lepszym kontaktem biokatalizatora z substratem. Proces w reaktorze ze złożem upakowanym z recyrkulacją medium reakcyjnego z zastosowaniem jako wypełnienia immobilizowanych komórek *P. commune*, pozwolił na zhydrolizowanie testowanego związku przy użytym stężeniu 10,6 mM (500 mg) ze stopniem przereagowania równym 56% oraz nadmiarami enancjomerycznymi w przedziale 82-91%.

1. R. Wohlgemuth, Biocatalysis - key to sustainable industrial chemistry, *Current Opinion in Biotechnology* 2010, 21, 713-724.
2. R. H. Nielsen, K. R. Jegannathan, Environmental assessment of enzyme use in industrial production - a literature review, *Journal of Cleaner Production* 2013, 42, 228-240.
3. O. I. Kolodiazhnyi, Chiral hydroxy phosphonates: synthesis, configuration and biological properties, *Russian Chemical Reviews* 2006, 75, 3, 227-253.
4. B. Lejczak, P. Kafarski, Biological activity of aminophosphonic acids and their short peptides, *Topics in Heterocyclic Chemistry* 2009, 20, 31, 31-63.
5. M. Collinsova, J. Jiracek, Phosphinic acid compounds in biochemistry, biology and medicine, *Current Medical Chemistry* 2000, 7, 6, 629-647.