Zastosowanie cyjanobakterii w biotransformacji 2-oksopropanofosfonianu dietylu

Monika GÓRAK*, Ewa ŻYMAŃCZYK-DUDA – Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska, Wrocław

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2014, **68**, 2, 123–128

Wstęp

Asymetryczna redukcja ketonów jest jedną z najważniejszych i praktycznych reakcji stosowanych w produkcji nieracemicznych chiralnych alkoholi, które mogą być następnie transformowane podczas syntezy do ważnych przemysłowo związków chemicznych, tj. farmaceutyków czy agrochemikaliów. Redukcja ketonów może odbywać się na drodze chemicznej oraz biologicznej. Strategia oparta na metodach biologicznych polega na wykorzystaniu niefotosyntetyzujących i heterotroficznych mikroorganizmów lub wyizolowanych z nich enzymów [1].

Sinice stanowią zróżnicowaną grupę prokariotów, zasiedlających środowisko wodne na całym świecie, charakteryzują się możliwościami przystosowania do rozwoju w różnych zbiornikach wodnych [2, 3]. Są najstarszymi tlenowymi organizmami fotosyntetyzującymi, produkującymi związki organiczne, korzystając z nieorganicznego źródła węgla – CO_2, wykorzystując energię światła słonecznego w procesie reduktywnego włączania CO_2 w swoje szlaki metaboliczne.

Zainteresowanie cyjanobakteriami wzrosło ze względu na potencjalne zastosowanie w biotechnologii. Są bogatym źródłem związków biologicznie czynnych, dlatego uznaje się je za jedną z najbardziej obiecujących grup organizmów do ich produkcji [4, 5]. Metabolity wtórne sinic obejmują związki przeciwbakteryjne [6], przeciwgrzybowe [7], przeciwwirusowe [8], przeciwnowotworowe [9], immunosupresyjne [10] oraz algicydy [11].

W ostatnich latach opublikowano wiele prac na temat możliwości zastosowania autotroficznych mikroorganizmów jako biokatalizatorów w procesie redukcji aldehydów i ketonów [12]. Interesujący przykład stanowi szczep *Synechococcus* sp. wykazujący zdolność do redukcji limonenu [13], enonów [14], acetofenonu oraz jego pochodnych [15] do odpowiednich alkoholi z wysoką stereospecyficznością.

Celem przeprowadzonych badań było zbadanie, które szczepy cyjanobakterii wykazują zdolność do redukcji β-ketoalkilofosfonianu. Prezentowane badania stanowią pierwsze doniesienie o efektywnym wykorzystaniu fototroficznych mikroorganizmów jako biokatalizatorów w produkcji chiralnego estru kwasu 2-hydroksyalkilofosfonowego. Warto podkreślić, że sinice są stosunkowo rzadko stosowane w biokatalizie ze względu na trudności w ich hodowli oraz brak wiedzy na temat stereochemicznej kontroli katalizowanych reakcji.

Część eksperymentalna

Materiały i metody

Substrat – 2-oksopropanofosfonian dietylu został zsyntezowany wg procedury opisanej w [16].

Mikroorganizmy

Badane szczepy *Arthrospira maxima* (CCALA 027), *Geitlerinema* sp. (CCALA 138), *Leptolyngbya foveolarum* (CCALA 076), *Nodularia sphaerocarpa* (CCALA 114), *Nostoc cf-muscorum* (CCALA 129) oraz *Synechococcus bigranulatus* (CCALA 187) pochodziły z Kolekcji Kultur Organizmów Autotroficznych (CCALA) Instytutu Botaniki, Czeskiej Akademii Nauk.

Autor do korespondencji:
Mgr inż. Monika GÓRAK, monika.gorak@pwr.wroc.pl

Warunki hodowli

Akseniczne hodowle badanych szczepów sinic prowadzono w kolbach Erlenmayera (250 mL) zawierających 100 mL odpowiedniego podłoża. Hodowlę szczepów *Geitlerinema* sp., *Leptolyngbya foveolarum*, *Nodularia sphaerocarpa* oraz *Synechococcus bigranulatus* prowadzono na podłożu BG-11, które przygotowano wg procedury opisanej w [17], *Nostoc cf-muscorum* na podłożu BG-11 bez $NaNO_3$, zaś *Arthrospira maxima* na podłożu do hodowli rodzaju *Spirulina* przygotowanym wg procedury opisanej w [18]. Hodowle sinic inkubowano w temp. 25°C w warunkach stacjonarnych, przy ciągłym naświetlaniu, które zapewniała świetlówka fluorescencyjna (Power-Glo, 8W, Hagen). Podczas zakładania hodowli oraz prowadzenia doświadczeń zachowano sterylne warunki pracy.

Procedura biotransformacji

Do 3-tygodniowej hodowli badanego szczepu sinic, dodano 1 mM 2-oksopropanofosfonianu dietylu (20 μL). Tak przygotowany układ doświadczalny inkubowano przez 7 dni, temp. 25°C w warunkach stacjonarnych, przy ciągłym naświetlaniu hodowli. Po tym czasie zawiesinę komórek odwirowano (4500 rpm, 20 min), a uzyskany supernatant ekstrahowano dwukrotnie octanem etylu. Otrzymaną frakcję organiczną suszono bezwodnym $MgSO_4$ i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem na rotacyjnej wyparce próżniowej (IKA® RV10digital).

Eksperyment kontrolny przeprowadzono w medium hodowlanym bez komórek sinic, z dodatkiem substratu. Doświadczenie prowadzono i zakończono analogicznie jak w przypadku właściwych procesów biotransformacji z zastosowaniem komórek sinic. W tym przypadku nie obserwowano redukcji substratu.

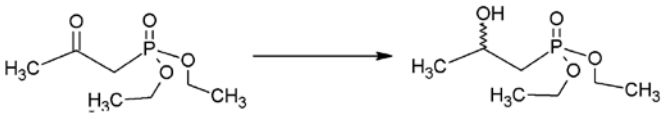
Uzyskaną mieszaninę substratu oraz produktu – 2-hydroksypropanofosfonianu dietylu analizowano za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (^{31}P NMR): 2-oksopropanofosfonian dietylu (^{31}P NMR) δ 20.34 ppm; 2-hydroksypropanofosfonian dietylu (^{31}P NMR) δ 30.60 ppm. Widma NMR zostały zarejestrowane na aparacie Bruker Avance DRX300 działającym przy 300 MHz, pomiary wykonano w $CDCl_3$ (99,5% D) w temp. 298 K.

Czystość optyczną produktu określono na podstawie widm ^{31}P NMR mieszanin poreakcyjnych z dodatkiem chininy jako chiralnego dyskryminatora [19].

Omówienie wyników

W pracy przedstawiono wstępne badania, mające na celu określenie możliwości zastosowania w produkcji β-hydroksyfosfonianów mikroorganizmów fotoautotroficznych.

Eksperymenty rozpoczęto od wykonania badań przesiewowym, których wynik pozwolił na wskazanie szczepów sinic wykazujących zdolność do redukcji ketofosfonianów.

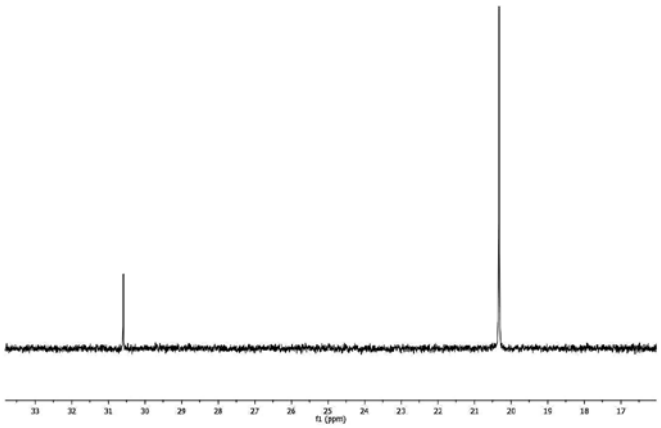


Rys. 1. Schemat redukcji 2-oksopropanofosfonianu dietylu do 2-hydroksypropanofosfonianu dietylu z zastosowaniem biokatalizatora

Ze względu na trudności w hodowli oraz utrzymaniu aksenicznośći hodowli sinic, mikroorganizmy te są stosunkowo rzadko stosowane w biokatalizie. Obecność niepożądanych organizmów może prowadzić do błędnych lub sprzecznych wyników oraz wniosków. Dlatego istotne jest przestrzeganie warunków sterylnej pracy z hodowlami cyjanobakterii. W prowadzonych badaniach wykorzystano czyste kultury sinic, co potwierdzały wykonane posiewy na zestalonym agarem podłożu BG-11.

W badaniach przesiewowych zostały wykorzystane akseniczne, morfologicznie różne szczepy sinic: jednokomórkowy fotoautotroficzny szczep *Synechococcus bigranulatus*, fotoheterotroficzny szczep produkujący heterocysty – *Nostoc cf-muscorum* oraz nitkowate szczepy *Nodularia sphaerocarpa*, *Arthrospira maxima, Leptolyngbya foveolarum, Geitlerinema* sp. Wśród badanych sinic znalazły się szczepy z rodzaju *Synechococcus* oraz *Nostoc,* których zdolność do redukcji prostych ketonów potwierdzają dane literaturowe [15, 20].

Procesy metaboliczne sinic zależą m.in. od natężenia światła słonecznego. Podczas hodowli oraz biotransformacji zastosowano ciągłe naświetlanie hodowli, ponieważ redukcja egzogennie dodanych ketonów w hodowli sinic zależy od fotosyntetycznej aktywności szczepu [21]. Dane literaturowe wskazują, że sinicowe enzymy zaangażowane w reakcję redukcji są zależne od koenzymu – fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADP). NADPH, czyli zredukowana forma tego koenzymu pochodząca z fotosyntezy, może zostać wykorzystana do redukcji egzogennego ketonu i produkcji odpowiedniego alkoholu [21].



Rys. 2. Widma ^{31}P NMR mieszaniny poreakcyjnej (z dodatkiem chininy; δ 20.34 ppm 2-oksopropanofosfonian dietylu oraz δ 30.60 ppm 2-hydroksypropanofosfonian dietylu) otrzymanej w procesie biotransformacji z zastosowaniem szczepu *Nodularia sphaerocarpa* jako biokatalizatora

Badania przesiewowe wykazały, że tylko dwa, spośród sześciu szczepów zdolne są do redukcji dodanego związku. 7-dniowa inkubacja 2-oksopropanofosfonianu dietylu w hodowli *Arthrospira maxima* oraz *Nodularia sphaerocarpa* skutkowała otrzymaniem odpowiedniego 2- hydroksypropanofosfonianu dietylu**.** Stopień przereagowania substratu (określony na podstawie widm ^{31}P NMR) wyniósł odpowiednio 26,4% oraz 12,9%, zaś czystość optyczna produktu wyniosła ponad 99%. W przypadku pozostałych szczepów sinic nie obserwowano pożądanego produktu, co może być spowodowane słabą aktywnością fotosyntetyczną danego szczepu w ustalonych warunkach doświadczenia. Ponadto szczepy *Leptolyngbya foveolarum* oraz *Geitlerinema sp.* wykazują wzrost w postaci warstwy biomasy, która osiada na dnie, co może dodatkowo wpływać na ograniczony kontakt substratu z komórkami sinic w warunkach stacjonarnych.

Podsumowanie i wnioski

Wykonane badania przesiewowe wskazują, iż spośród analizowanych morfologicznie różnych szczepów cyjanobakterii, tylko nitkowate szczepy *Arthrospira maxima* oraz *Nodularia sphaerocarpa* są obiecującymi biokatalizatorami w reakcji redukcji substratu. Zastosowane warunki hodowli i biokonwersji pozwoliły w przypadku hodowli szczepu *Arthrospira maxima* na otrzymanie pożądanego produktu – stopień przereagowania substratu wyniósł 26,4% Niższą wartość stopnia przereagowania substratu – 12,9% otrzymano w przypadku zastosowania hodowli szczepu *Nodularia sphaerocarpa*. Zarówno szczepy z rodzaju *Nodularia* jak i *Arthrospira* są mikroorganizmami zasiedlającymi różne środowiska. Podobnie jak inne szczepy sinic, powszechnie występujące w świecie, mają rozwinięty mechanizm przetrwania w warunkach ograniczonej dostępności składników odżywczych.

Zastosowanie w procesie biotransformacji szczepów *Leptolyngbya foveolarum* oraz *Geitlerinema sp.*, czyli szczepów charakteryzujących się wzrostem w postaci warstwy komórek osiadającej na dnie, nie pozwoliło na uzyskanie pożądanego produktu.

Przeprowadzone badania przesiewowe pozwoliły wskazać szczepy cyjanobakterii zdolne do redukcji prostego β- ketoalkilofosfonianu dietylu. Ponadto zastosowanie organizmów fotosyntezujących jako biokatalizatora wzbogaciło wiedzę dotyczącą możliwości zastosowania tej grupy mikroorganizmów w procesie otrzymywania β-hydroksyalkilofosfonianów.

Praca finansowana w ramach Projektu „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym" nr POIG.01.03.01–00–158/09–07, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007–2013.

Literatura

1. Nakamura K., Yamanaka R., Matsuda T., Harada T.: *Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts*. Tetrahedron: Asymmetry 2003, **14**, 2659.
2. Papke R.T., Ramsing N.B., Bateson M.M., Ward DM.: *Geographical isolation in hot spring cyanobacteria*. Environmental Microbiology 2003, **5**, 650.
3. Jungblut A.D., Lovejoy C., Vincent W.F.: *Global distribution of cyanobacterial ecotypes in the cold biosphere*. The ISME Journal 2010, **4**, 191.
4. Bhadury P., Wright P.C.: *Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications*. Planta 2004, **219**, 561.
5. Abed R.M.M., Dobretsov S., Sudesh K.: *Applications of cyanobacteria in biotechnology*. Journal of Applied Microbiology 2009, **106**, 1.
6. Jaki B., Heilmann J., Sticher O.: *New antibacterial metabolites from the cyanobacterium Nostoc commune (EAWAG 122b)*. Journal of Natural Products 2000, **63**, 1283.
7. Kajiyama S., Kanazaki H., Kawazu K., Kobayashi A.: *Nostifungicidine, an antifungal lipopeptide from the field-grown terrestrial blue-green algae Nostoc commune*. Tetrahedron Letters 1998, **39**, 3737.
8. Patterson G.M.L., Larsen L.K., Moore R.E.: *Bioactive natural products from blue-green algae*. Journal of Applied Phycology 1994, **6**, 151.
9. Gerwick W.H., Roberts M.A., Proteau P.J., Chen J.L.: *Screening cultured marine microalgae for anticancer – type activity*. Journal of Applied Phycology 1994, **6**, 143.
10. Koehn F.E., Lomgley R.E.: Reed J.K.: *Microcolins A and B, new immunosuppressive peptide from the blue-green algae Lyngbya majuscule.* Journal of Natural Products 1992, **55**, 613.
11. Papke U., Gross E.M., Francke W.: *Isolation, identification and determination of the absolute configuration of Fischerellin B. A new algicide from the freshwater cyanobacterium Fischerella muscicola (Thuret)*. Tetrahedron Letters 1997, **38**, 379.
12. Jiittner F., Hans R.: *The reducing capacities of cyanobacteria for aldehydes and ketones*. Applied Microbiology and Biotechnology 1986, **25**, 52.
13. Hamada H., Kondo Y., Ishihara K., Nakajima N., Hamada H., Kurihara R., Hirata T.: *Stereoselective biotransformation of limonene and limonene oxide by cyanobacterium, Synechococcus sp. PCC 7942*. Journal of Bioscience and Bioengineering 2003, **96**, 581.
14. Shimoda K., Kubota N., Hamada H., Kajib M., Hirata T.: *Asymmetric reduction of enones with Synechococcus sp. PCC 7942*. Tetrahedron: Asymmetry 2004, **15**, 1677.

15. Nakamura K., Yamanaka R., Tohi K., Hamada H.: *2000 Cyanobacterium – catalyzed asymmetric reduction of ketones*. Tetrahedron Letters 2000, **41**, 6799.
16. Ryglowski A., Kafarski P.: *Preparation of 1-aminoalkylphosphonic acids and 2-aminoalkylphosphonic acids by reductive amination of oxoalkylphosphonates*. Tetrahedron 1996, **52**, 10685.
17. Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stainer R.Y.: *Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanolobacteria*. Journal of General Microbiology 1979, **111**, 1.
18. Aiba S., Ogawa T.: *Assessment of growth yield of a blue-green alga Spirulina platensis in axenic and continuous culture*. Journal of General Microbiology 1977, **1**, 179.
19. Żymańczyk-Duda E., Skwarczyński M., Lejczak B., Kafarski P.: *Accurate assay of enantiopurity of 1-hydroxy- and 2-hydroxyalkylphosphonate esters*. Tetrahedron: Asymmetry 1996, **7**, 1277.
20. Havel J., Weuster-Botz D.: *Cofactor regeneration in phototrophic cyanobacteria applied for asymmetric reduction of ketones*. Applied Microbiology and Biotechnology 2007, **75**, 1031.
21. Yamanaka R., Nakamura K., Murakami A.: *Reduction of exogenous ketones depends upon NADPH generated photosynthetically in cells of the cyanobacterium Synechococcus PCC 7942*. AMB Express 2011, **1**, 24.

* Mgr inż. Monika GÓRAK ukończyła Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej (2010). Jest doktorantką w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej. Zainteresowania naukowe: zastosowanie cyjanobakterii w biotransformacji ketofosfonianów.

e-mail: monika.gorak@pwr.wroc.pl, tel. +48 71 320 46 14

Dr hab. inż. Ewa ŻYMAŃCZYK-DUDA, prof. PWr jest absolwentką Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Pracuje w Zakładzie Chemii Bioorganicznej. Zainteresowania naukowe: zastosowanie biokatalizatorów, całych komórek mikroorganizmów oraz enzymów, w transformacji ksenobiotyków do odpowiednich chiralnych produktów o zdefiniowanej konfiguracji absolutnej; synteza związków fosforoorganicznych zawierających jedno lub dwa centra asymetrii z zastosowaniem biokatalizy.

Z prasy światowej – innowacje: odkrycia, produkty i technologie

From the world press – innovation: discoveries, products and technologies

Nowa metoda diagnostyki malarii

Naukowcy z Rice University opracowali szybki, mało inwazyjny test do wykrywania malarii, który używa lasera, eliminując konieczność pobrania krwi. Metoda jest bardzo obiecująca – przede wszystkim tania, szybka, czuła i selektywna. W czasie, gdy klimat się ociepla i malaria staje się coraz bardziej niebezpieczna – skuteczna diagnostyka ma ogromne znaczenie. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) wyznaczyła sobie cel – odnalezienie skutecznej metody wykrywania malarii. Powinna być ona czuła, specyficzna, minimalnie wolna od błędów, prosta w użyciu, szybka, niezawodna, nie wymagająca specjalistycznego sprzętu a przede wszystkim dostępna w rejonach występowania malarii. Lista „życzeń" wydaje się zbyt długa i nie do spełnienia – jednak naukowcy z Rice University opracowali nową, rewolucyjną metodę diagnostyki malarii – która ma szansę spełnić wymagania WHO. Zarodźce malarii, bytujące w erytrocytach, zawierają niewielkie ilości hemazoiny – kryształków żelaza pozostałych po trawieniu hemoglobiny. Przepływająca wiązka lasera w ułamku sekundy nagrzewa kryształy – tworzą one pęcherzyk, który parując, wyskakuje – zmiana ta jest wykrywalna dzięki urządzeniu. Wynalazca nowego urządzenia – Dmitri O. Lapotko, przedstawia dodatkowe zalety testu – może być zasilany z akumulatora, będzie można go stosować w niesprzyjających warunkach – miejscach gdzie trudno o higienę (ma na myśli kraje trzeciego świata) i w gorącym klimacie. Zaletą jest także duża przepustowość i niski koszt badań, w porównaniu do tradycyjnej diagnostyki – za pomocą sondy światłowodowej skierowanej do palca lub płatka ucha, można badać jedną osobę co 20 sekund za mniej niż pół dolara! Gdyby nowa metoda weszła w życie, zrewolucjonizowałaby diagnostykę malarii. Obecne, i tak szybkie testy, wymagają ukłucia w palec, trwają 15 minut i ze względu na gorący klimat – odczyt może być niewiarygodny. Ponadto kosztują około 1 USD. Test nie został jeszcze wypróbowany u chorych ludzi – przeprowadzono jedynie doświadczenia na myszach. Test wykrywał malarię nawet wówczas, gdy jedna na milion czerwonych krwinek została zaatakowana przez zarodźca. Wyniki zostały opisane w badaniu opublikowanym w Proceedings of the National Academy of Sciences. Technologia została już uznana za bezpieczną u zdrowych ludzi. Naukowcy zapowiadają rozpoczęcie prób klinicznych na ludziach z objawami malarii. *(kk)*

(http://biotechnologia.pl, 22.01.2014)

Nano-szpiedzy do diagnostycznych zadań specjalnych

Bardzo ważnym wyzwaniem, przed którym staje dzisiejsza medycyna jest stworzenie inteligentnych systemów dostarczania leków. Co konkretnie oznacza, że chcemy, aby leki działały tylko w taki sposób, w takim miejscu i w takim czasie, by zapewnić pacjentowi bezpieczeństwo oraz maksymalną skuteczność. Niedawno na łamach czasopisma „Nanoscale" ukazał się artykuł świadczący o tym, że jesteśmy coraz bliżej celu: zespół profesora Camerona Alexandra z University of Nottingham stworzył unikalną nanocząstkę – nośnik, który ujawnia swoją prawdziwą tożsamość jedynie w odpowiednich warunkach.

Nanocząstka ma formę miceli tworzącej się automatycznie w środowisku wodnym i składa się z kilku warstw. Warstwa wewnętrzna to hydrofobowy rdzeń zbudowany z cholesterolowych ogonów, do których z kolei przyczepiony jest jednoniciowy DNA. Zewnętrzna warstwa składa się z komplementarnej do niego nici DNA związanego z resztami glikolu polietylenowego – ten koniec łańcucha z racji swojego hydrofilowego charakteru będzie skierowany na zewnątrz nanocząstki. Całość rozpadnie się tylko pod wpływem konkretnego sygnału – sekwencji komplementarnej do ssDNA warstwy zewnętrznej np. materiału genetycznego wirusa czy innego patogenu. Wówczas nanocząstka odrzuca swój „maskujący płaszcz" (związany już z obcym kwasem nukleinowym), a odsłonięte zostają wewnętrzne łańcuchy DNA, na których końcach znajduje się specyficzny ligand. Może nim być znacznik wykrywany w badaniu diagnostycznym lub też terapeutyk przeciwko danej chorobie – wszystko zależy od zastosowania naszej nanocząstki.

Taka konstrukcja jest bardzo uniwersalna – właściwie dobrany biomarker pozwala stworzyć zarówno specyficzne narzędzie diagnostyczne jak i wydajny system dostarczania leków czy monitorowania leczenia. Jej działanie zostało na razie potwierdzone w testach ex vivo: metodą FRET i PAGE udowodniono rozplatanie i odłączanie się zewnętrznego płaszcza pod wpływem komplementarnego fragmentu DNA, odsłaniając ligand – biotynę. Naukowcy liczą na to, że w przyszłości można będzie dokonywać takich detekcji samodzielnie – nie technikami biologii molekularnej lecz za pomocą telefonów komórkowych wyposażonych w odpowiednie aplikacje. *(kk)*

(http://biotechnologia.pl, 31.02.2014)

dokończenie na stronie 128