

**ENZYMATYCZNE REAKCJE
ROZSZCZEPIENIA WIĄZANIA C-C.
ZASTOSOWANIE W SYNTEZIE ZWIĄZKÓW
ZAPACHOWYCH, FARMACEUTYKÓW
ORAZ W BIOREMEDIACJI**

**ENZYMATIC REACTIONS OF THE C-C BOND
CLEAVAGE. APPLICATIONS IN SYNTHESIS OF
AROMA COMPOUNDS, PHARMACEUTICALS
AND IN BIOREMEDIATION**

Anna Panek*, Natalia Milecka-Tronina, Alina Świzdor

*Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,
ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław
e-mail: anna.szpineter@up.wroc.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. Enzymatyczne reakcje rozszczepienia wiązania C-C
2. Wykorzystanie reakcji rozszczepienia wiązania C-C w syntezie
 - 2.1. Synteza związków zapachowych
 - 2.1.1. Otrzymywanie γ -laktonów
 - 2.1.2. Otrzymywanie metyloketonów
 - 2.1.3. Otrzymywanie waniliny
 - 2.2. Enzymatyczna modyfikacja steroli do produktów użytecznych w syntezie leków steroidowych
 - 2.2.1. Surowce do produkcji leków steroidowych
 - 2.2.2. Przebieg enzymatycznej degradacji łańcucha bocznego steroli
 - 2.2.3. Wykorzystanie produktów degradacji steroli w syntezie leków
3. Biodegradacja związków aromatycznych

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Anna Panek jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Uzyskała tytuł doktora nauk biologicznych z zakresu biotechnologii na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu. Obecnie jest adiunktem w Katedrze Chemii Wydziału Nauk o Żywności UP we Wrocławiu. Głównym obszarem jej zainteresowań badawczych jest enzymatyczna modyfikacja związków naturalnych, głównie izoprenoidów, z uwzględnieniem układów steroidowych.

Natalia Milecka-Tronina w roku 2009 ukończyła studia z zakresu biotechnologii na Wydziale Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, gdzie w 2013 roku uzyskała tytuł doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia. Obecnie jest asystentem w Katedrze Chemii wspomnianej uczelni. Wiodącym tematem jej badań są mikrobiologiczne przekształcenia związków steroidowych.

Alina Świzdor po ukończeniu studiów chemicznych na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego podjęła pracę w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, gdzie uzyskała stopień doktora oraz doktora habilitowanego nauk biologicznych z zakresu biotechnologii. Obecnie jest adiunktem na Wydziale Nauk o Żywności tej uczelni. Główne kierunki jej pracy naukowej to przekształcenia mikrobiologiczne naturalnych związków izoprenoidowych, w szczególności biotransformacje układów steroidowych.

ABSTRACT

The microorganisms are able to utilize natural and synthetic compounds of broad structural diversity as a source of carbon and energy, converting these substrates into low molecular weight products (mainly H_2O , CO_2 and NH_3). The main role in this metabolism is played by the enzymes that catalyze reactions of the C-C bond cleavage. Such reactions are the key step of the primary metabolism of fatty acids in eukaryotic cells by the β -oxidation. The enzymatic systems associated with the C-C bond cleavage have been applied in the synthesis of valuable natural products and in the bioremediation processes.

Microbial transformations of natural compounds, in which the reactions of β -oxidation cycle are used, allow the formation of natural aromatic compounds (used as food additives), pharmaceuticals and ingredients of cosmetic compositions. Using this path one can obtain methyl ketones (e.g. responsible for the characteristic smell of cheeses), γ -lactones determining the scent of several popular fruits, and vanillin.

A modification of the natural steroids: saponins, alkaloids, sterols, bile acids to products useful in the synthesis of steroid drugs is the most important area of use of the enzymatic C-C bond cleavage, due to the practical significance of the products. Enzymes that catalyze the C-C bonds cleavage are important in the process of biodegradation of toxic aromatic hydrocarbons and their derivatives (bioremediation).

Keywords: β -oxidation, vanillin, γ -decalactone, methyl ketones, steroid drugs, bioremediation

Słowa kluczowe: β -oksydacja, wanilina, γ -dekalakton, metyloketony, leki steroidowe, bioremediacja

WPROWADZENIE

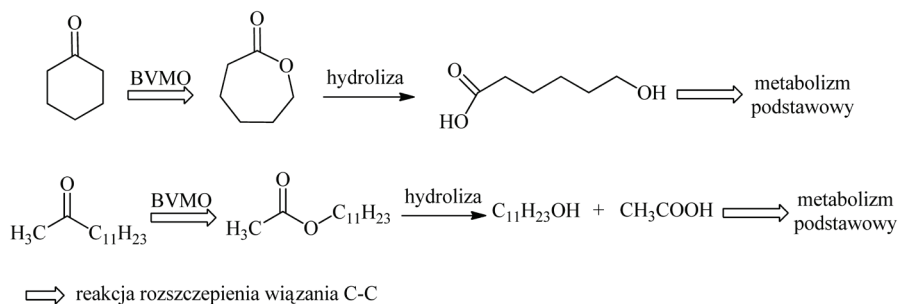
Zastosowanie biokatalizy w syntezie systematycznie wzrasta, głównie ze względu na wysoką aktywność katalityczną enzymów, selektywność ich działania, w tym chemo-, regio- stereo- i enancjoselektywność. Wyniki licznych doświadczeń wykazały, że stereochemia cząsteczki wpływa na aktywność biologiczną związku, m.in. właściwości sensoryczne, aktywność hormonalną i działanie terapeutyczne [1, 2]. Stanowi to uzasadnienie podjęcia intensywnych badań, których celem jest opracowanie metod syntezy chiralnych, biologicznie aktywnych cząsteczek w postaci wybranego enancjomeru. Zastąpienie niektórych tradycyjnych technologii przemysłowych procesami bazującymi na biokatalizie pozwoliło na efektywniejszą i bardziej ekologiczną produkcję np. licznych środków spożywczych, leków czy innych związków chemicznych. Naturalne zdolności mikroorganizmów do rozkładu związków organicznych coraz większego znaczenia nabierają w redukcji zanieczyszczeń środowiskowych. W opisanych powyżej procesach wykorzystywane są między innymi enzymy uczestniczące w reakcjach rozszczepienia wiązania C–C, np. monooksygenazy biorące udział w reakcji utlenienia typu Baeyera-Villigera oraz enzymy cyklu β -oksydacji

W niniejszym artykule dokonano krótkiej charakterystyki biotechnologicznych metod syntezy ważniejszych naturalnych związków zapachowych, w tym dodatków do żywności oraz leków steroidowych, w których rozszczepienie wiązania C–C jest jednym z istotnych etapów reakcji. Omówiono także wybrane przykłady wykorzystania mikroorganizmów w bioremediacji.

1. ENZYMATYCZNE REAKCJE ROZSZCZEPIENIA WIĄZANIA C–C

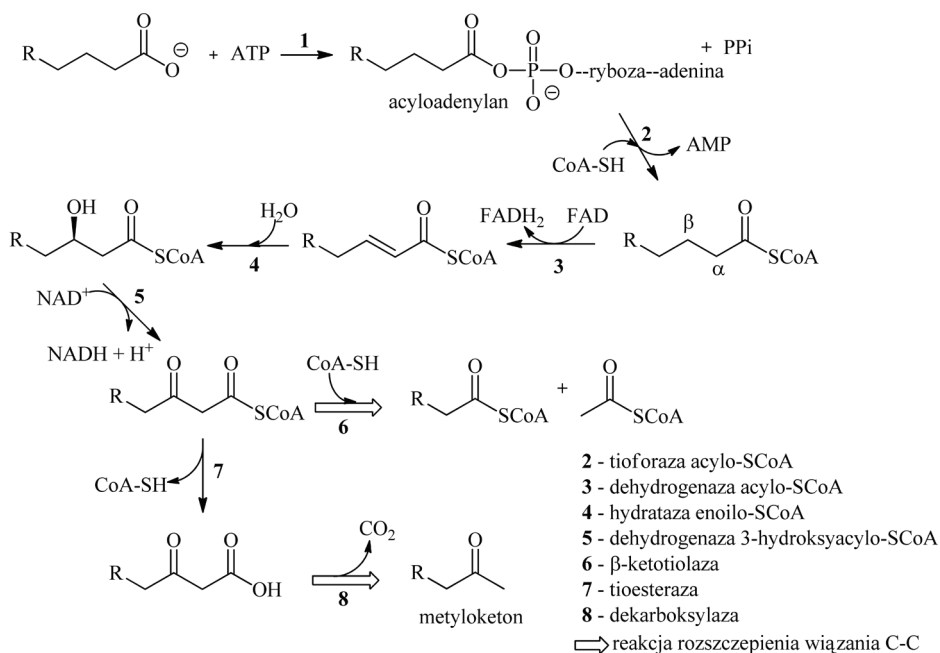
Substraty wykorzystywane przez mikroorganizmy jako źródło węgla i energii są związkami o różnorodnym składzie i strukturze. Mikroorganizmy syntetyzują enzymy, które w cyklu następujących kolejno po sobie reakcji katalizują przekształcenie tych związków do niskocząsteczkowych produktów (głównie H_2O , CO_2 i NH_3).

Dziki szczepy, występujące w środowisku zanieczyszczonym produktami przemysłu petrochemicznego produkują m.in. monooksygenazy Baeyera-Villigera (BVMO), które katalizują pierwszy etap metabolizmu ketonów – reakcję utlenienia do laktonów lub estrów (Schemat 1) [3]. Produktem następującej kolejno hydrolizy jest hydroksykwasy lub kwas, który degradowany jest ostatecznie do niskocząsteczkowych produktów na drodze β -oksydacji. Mechanizm enzymatycznego utlenienia Baeyera-Villigera oraz wykorzystanie tego typu reakcji zostało opisane w naszym artykule opublikowanym uprzednio w tym czasopiśmie [4].



Schemat 1. Utlenczenie Baeyera-Villigera jako pierwszy etap mikrobiologicznej degradacji ketonów
 Scheme 1. The Baeyer-Villiger oxidation as the first microbial step of ketones' degradation

β -Oksydacja jest podstawową ścieżką metabolizmu kwasów tłuszczowych w komórkach eukariotycznych, w której z kwasu tłuszczowego o nierozgałęzionym łańcuchu powstaje acetylo-SCoA i ester kwasu (R-COSCoA) krótszego o dwa atomy węgla (Schemat 2).



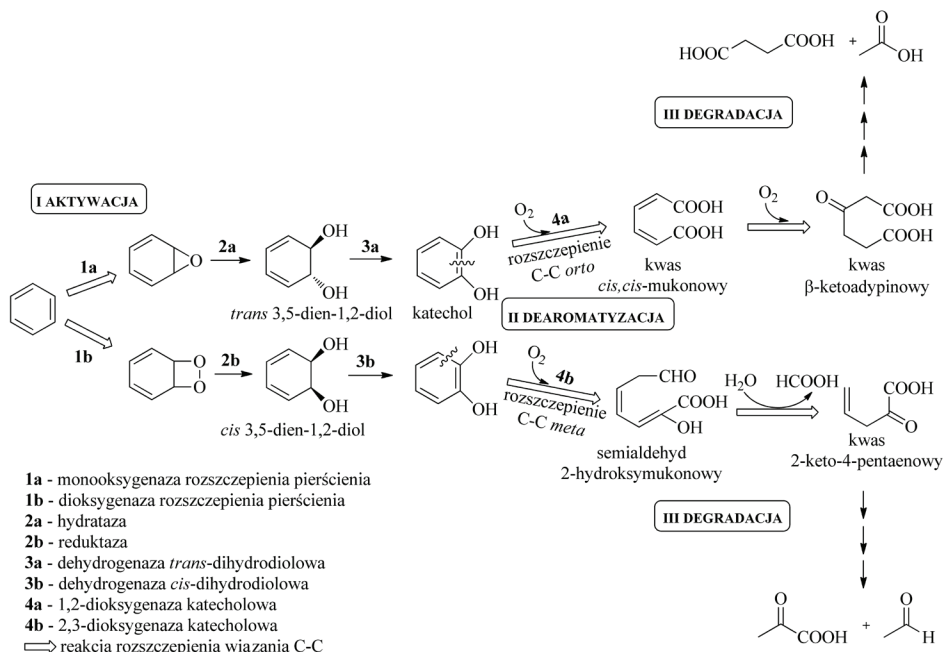
Schemat 2. Enzymy katalizujące cykl β -oksydacji i syntezę metyloketonu
 Scheme 2. Enzymes catalyzing the β -oxidation cycle and the methyl ketone synthesis

Pierwszym etapem cyklu przemian jest aktywacja grupy karboksylowej kwasu. Kwas, z udziałem ATP, przekształcany jest w odpowiedni acyloadenylan a ten kolejno w ester koenzymu A (Schemat 2, etapy 1 i 2) [5]. Następnie od tioestru odszczepiana

jest cząsteczka wodoru i powstaje enoilo-SCoA, z którego po hydratacji tworzy się 3-hydroksy-acylo-SCoA. Etapy odszczepienia cząsteczki wodoru (powstaje *trans* enoilo-SCoA) oraz addycji wody charakteryzują się stereoselektywnością (Schemat 2, etapy 3 i 4). Ta sama hydratataza katalizuje addycję cząsteczki wody do *trans* i *cis* enoilo-SCoA, jednakże produktem hydratacji wiązania *trans* jest L-hydroksy-produkt, a w wyniku hydratacji *cis* substratu powstaje D-izomer. Następnie, w wyniku utlenienia wprowadzonej grupy hydroksylowej powstaje β -ketoacylo-SCoA (Schemat 2, etap 5). Ostatnim etapem cyklu β -oksydacji jest tiolityczne rozszczepienie β -ketoacylo-SCoA, które prowadzi do acetylo-SCoA i tioestru kwasu (R-COSCoA) o krótszym łańcuchu węglowym (Schemat 2, etap 6) [5].

W kulturach niektórych mikroorganizmów β -ketoacylo-SCoA może być przekształcany również do metyloketonu w reakcji dekarboksylacji β -ketokwasu – produktu hydrolizy β -ketoacylo-SCoA (Schemat 2, etapy 7 i 8).

Enzymatyczne rozszczepienie wiązania C–C jest również ważnym etapem mikrobiologicznej degradacji węglowodorów aromatycznych, która może przebiegać zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Metabolizm węglowodorów aromatycznych obejmuje trzy zasadnicze etapy: (I) aktywację cząsteczki substratu, (II) rozszczepienie wiązania C–C w pierścieniu aromatycznym, (III) degradację acyklicznego kwasu karboksylowego (Schematy 3 i 4) [6].



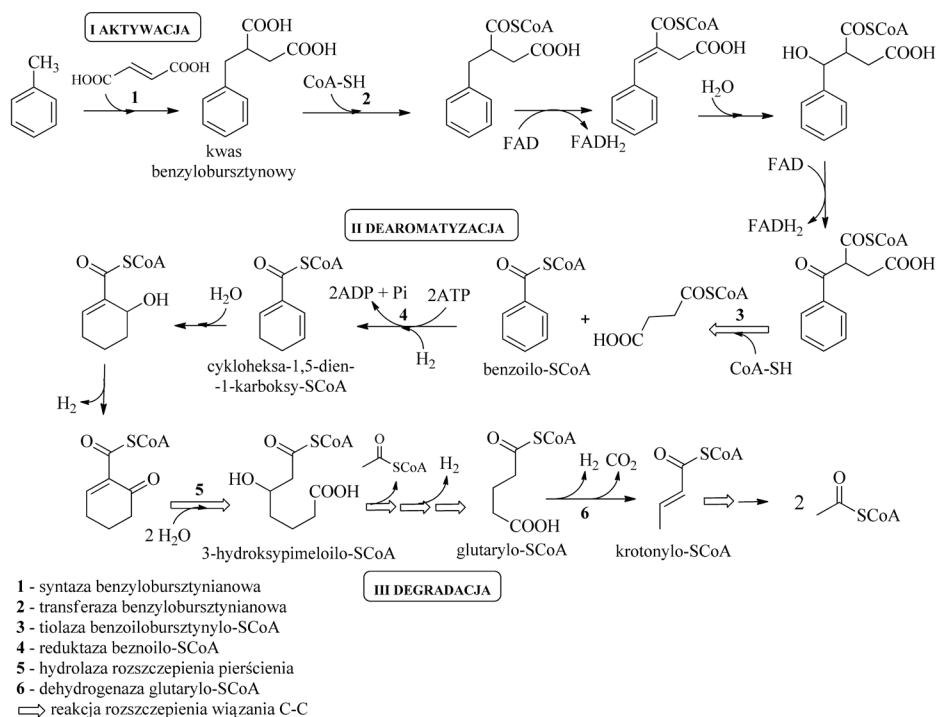
Schemat 3. Mikrobiologiczne utlenienie benzenu w warunkach tlenowych

Scheme 3. Microbial oxidation of benzene in aerobic conditions

W warunkach tlenowych w reakcji katalizowanej przez monoooksygenazę lub diooksygenazę, węglowodór aromatyczny np. benzen utleniany jest do tlenku lub nadtlenu (Schemat 3, etapy 1a i 1b) [7, 8] przekształcanych w kolejnym etapie do *trans* lub *cis* 3,5-dien-1,2-diole (Schemat 3, etapy 2a i 2b). Oba izomeryczne diole pod wpływem selektywnych dehydrogenaz ulegają następnie rearomatyacji do katecholu (Schemat 3, etapy 3a i 3b) [9].

Dalszy mikrobiologiczny metabolizm katecholu związany jest z rozczepieniem wiązania C-C_{orto} lub C-C_{meta} (Schemat 3, etapy 4a lub 4b) [10]. Powstające produkty ulegają dalszej degradacji na drodze β -oksydacji do kwasu bursztynowego i octowego (rozszczerzenie C-C_{orto}) lub kwasu pirogronowego i acetaldehydu (rozszczerzenie C-C_{meta}) (Schemat 3). Rozszczerzenie wiązania *orto* katalizowane jest przez dioksygenazę „wewnątrzdiolową”, a oksygenaza „zewnątrzdolowa” odpowiedzialna jest za rozszczerzenie wiązania *meta* [11].

W warunkach beztlenowych mikrobiologiczna degradacja węglowodorów aromatycznych rozpoczyna się reakcją, w której tworzy się nowe wiązanie C-C. Na przykład z toluenu, w wyniku enzymatycznej addycji cząsteczki kwasu fumarowego, powstaje kwas benzylobursztynowy (etap aktywacji) (Schemat 4, etap 1) [12, 13]. Produkt addycji, w cyklu β -oksydacji, przekształcany jest kolejno do benzylobursztynylo-SCoA i benzoilo-SCoA (Schemat 4, etapy 2 i 3) [14]. Ten ostatni związek jest produktem pośrednim większości przemian substratów aromatycznych. Z benzoilo-SCoA, przy udziale reduktazy benzoilo-SCoA, powstaje cykloheksa-1,5-dien-1-karboksy-SCoA (Schemat 4, etap 4). Addycja cząsteczki wody do układu skoniugowanego dienu prowadzi do produktu z allilową grupą hydroksylową w pierścieniu cykloheksanowym, która w następnym etapie utleniana jest do ketonu. Po addycji dwóch cząsteczek wody, powstaje dalej acykliczny 3-hydroksypimeloilo-SCoA (Schemat 4, etap 5). W cyklu β -oksydacji ester ten ulega przekształceniu do glutarylo-SCoA, który po dehydrogenacji przez dehydrogenazę glutarylo-SCoA i kolejno dekarboksylacji tworzy krotonylo-SCoA (Schemat 4, etap 6). Dalsze utlenienie krotonylo-SCoA prowadzi do dwóch cząsteczek acetylo-SCoA.



Schemat 4. Mikrobiologiczna degradacja toluenu w warunkach beztlenowych

Scheme 4. Microbial degradation of toluene in anaerobic conditions

2. WYKORZYSTANIE ROZSZCZEPIENIA WIĄZANIA C-C W SYNTYZIE

Enzymatyczne reakcje rozszczepienia wiązania C-C, które umożliwiają drobnoustrojom rozwój w środowisku, znalazły zastosowanie m.in. w syntezie związków biologicznie czynnych, głównie naturalnych aromatów i leków steroidowych oraz w procesach bioremediacji [15–24].

2.1. SYNTeza ZWIĄZKÓW ZAPACHOWYCH

Konkurencyjność przemysłu spożywczego oraz wzrost świadomości społeczeństwa podążającego za zdrowym trybem życia sprawiają, że konsumenci preferują produkty określone jako „naturalne”. Zgodnie z przepisami Unii Europejskiej (EU 88/388/EEC) związek klasyfikowany jest jako naturalny, jeśli otrzymywany jest w procesie biotransformacji naturalnego substratu. Ten sam produkt uzyskany na drodze chemicznej określany jest terminem „identyczny z naturalnym” [15]. Dążenie do żywności atrakcyjnej i spełniającej oczekiwania konsumentów powoduje

stały wzrost zainteresowania naturalnymi dodatkami spożywczymi, których produkcja opiera się na zastosowaniu procesów biotechnologicznych.

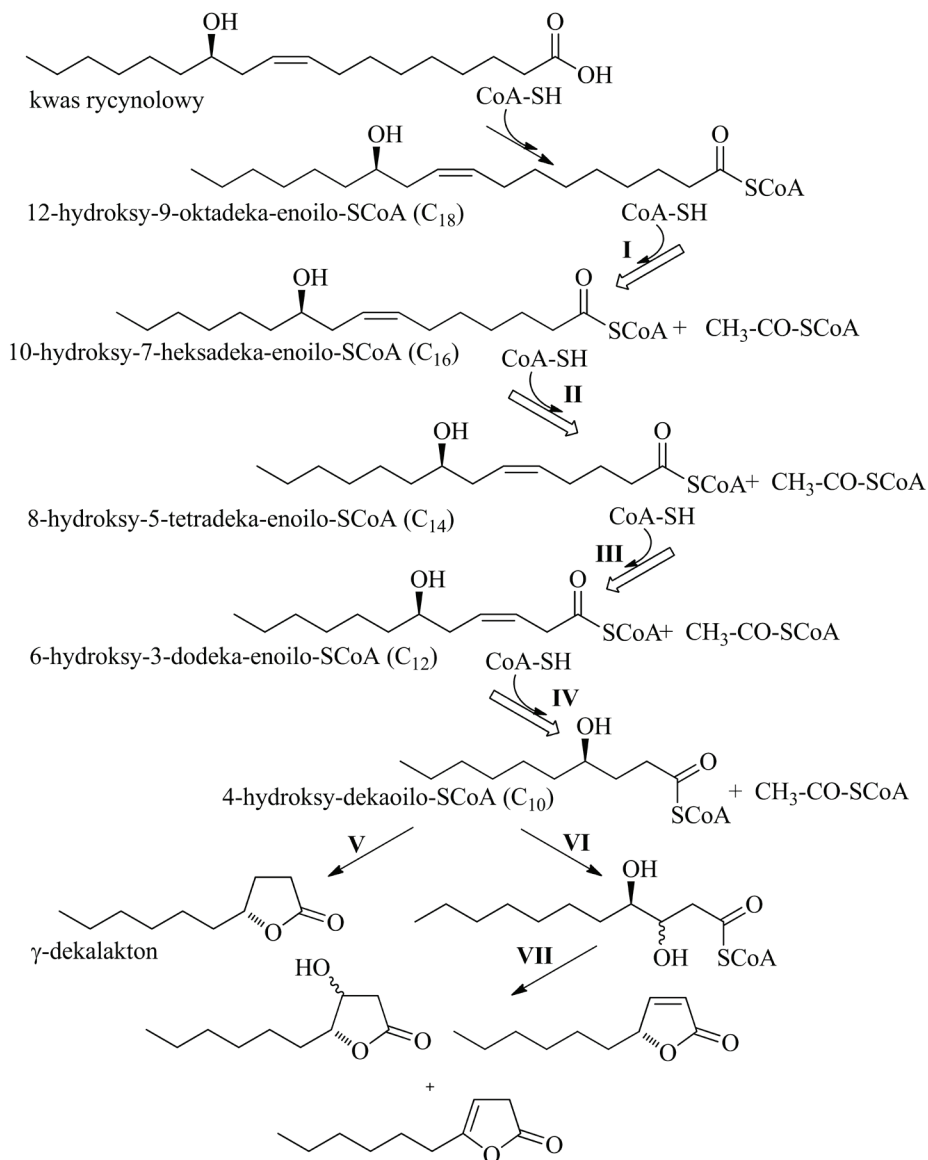
2.1.1. Otrzymywane γ -laktonów

Cennym dodatkiem aromatycznym stosowanym w produkcji żywności są γ - i δ -laktony. Laktony obecne w owocach i fermentowanych produktach decydują o ich charakterystycznej nucie zapachowej. γ -Dekalakton o owocowo-oleistym aromacie ma zasadniczy wpływ na zapach brzoskwiń, moreli i truskawek. Cena γ -dekalaktonu, przed opracowaniem biotechnologicznych metod jego uzyskiwania, wynosiła 20 tys. \$/kg.

Pierwszym etapem badań nad syntezą γ -dekalaktonu na drodze biokatalizy była selekcja szczepu, w kulturze którego następowało utlenienie kwasu rycynolowego do kwasu 4-hydroksydekanowego [25]. Kwas rycynolowy ((12*R*)-hydroksy-*cis*-9-oktadekenowy) to jeden z nielicznych naturalnych hydroksykwasów tłuszczowych dostępny w znacznych ilościach; przykładowo produkt hydrolizy oleju rącznikowego zawiera 90% kwasu rycynolowego. Produkcja γ -dekalaktonu z tego kwasu obejmuje dwa główne etapy: enzymatyczne utlenienie hydroksykwasu do kwasu 4-hydroksydekanowego a następnie jego cyklizację w środowisku kwasowym i podwyższonej temperaturze [16].

Pierwszy etap procesu katalizowany może być przez szereg szczepów drożdży, m.in. *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida maltosa*, *C. tropicalis*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Sporidiobolus spp.*, *S. salmonicolor*, *S. ruinenii*, *S. johnsonii*, *S. pararoseus* [16, 26-28].

Kwas 4-hydroksydekanowy powstaje z kwasu rycynolowego w wyniku czterech cykli β -oksydacji (produktami pośrednimi są: C16-, C14-, C12- i C10-SCoA) (Schemat 5). Hydroliza 4-hydroksy-dekaido-SCoA prowadzi do kwasu 4-hydroksydekanowego, który ulega wewnątrzcząsteczkowej estryfikacji do γ -dekalaktonu [16]. W procesie biotransformacji kwasu rycynolowego uzyskuje się ten sam enancjomer γ -dekalaktonu, który występuje w brzoskwiniach i innych owocach. Efektywnym biokatalizatorem w tej syntezie jest szczep *Y. lipolytica* [17]. W kulturze *Y. lipolytica*, obok γ -dekalaktonu jako głównego produktu, identyfikowano m.in. 3-hydroksy- γ -dekalakton i analogi γ -dekalaktonu z wiązaniem podwójnym w pierścieniu laktonowym (Schemat 5) [25, 26, 29]. Mimo że, 3-en- γ -dekalakton odznacza się intensywniejszą nutą owocową niż γ -dekalakton, z powodu braku prostej metody oddzielenia go od 2-en izomeru (o zapachu grzybowym), nie jest stosowany w praktyce [27].

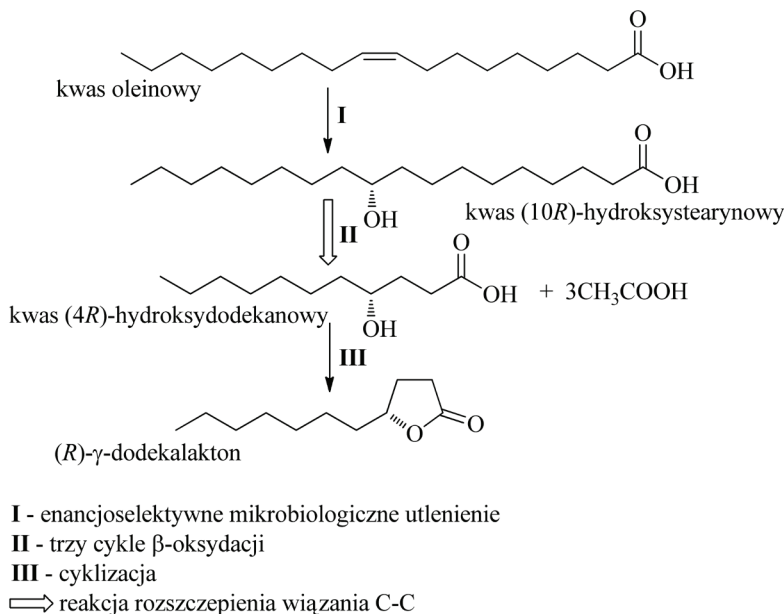


Schemat 5. Przekształcenie kwasu rycynolowego do γ -dekalaktonu z użyciem szczepu *Y. lipolytica*

Scheme 5. Transformation of ricinoleic acid to γ -decalactone using *Y. lipolytica*

Inny zapachowy lakton – γ -dodekalakton, otrzymywany jest z kwasu oleinowego. W przekształceniu tym uczestniczą dwa biokatalizatory [30]. Gram-dodatni

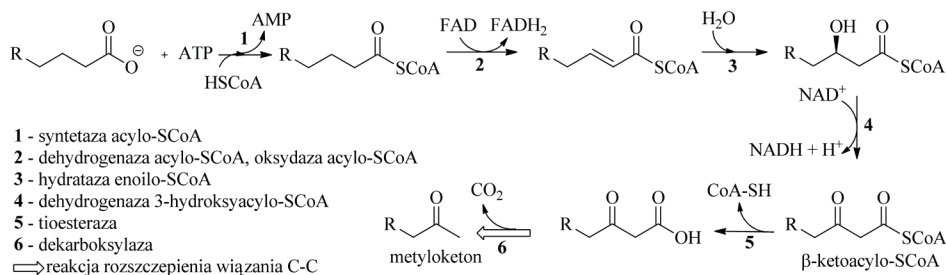
szczep bakterii katalizuje utlenienie kwasu oleinowego do kwasu (10*R*)-hydroksystearynowego [16], który kolejno utleniany jest przez drożdże piekarskie do kwasu (4*R*)-hydroksydodekanowego (Schemat 6). Cyklizacja powstałego produktu prowadzi do γ -dodekalaktonu. Wydajność całego procesu wynosi ponad 22%.



Schemat 6. Przekształcenie kwasu oleinowego do (*R*)- γ -dodekalaktonu na drodze biokatalizy
 Scheme 6. Transformation of oleic acid to (*R*)- γ -dodecalactone by biocatalysis

2.1.2. Otrzymywanie metyloketonów

Metyloketony o nieparzystej liczbie atomów węgla (C7, C9, C11) odznaczają się aromatem o charakterystycznej orzechowej nucie. Są one odpowiedzialne za specyficzny zapach serów pleśniowych oraz odgrywają istotną rolę w dostarczaniu aromatów kojarzonych z pieczonymi lub gotowanymi potrawami zawierającymi masło (3-hydroksybutanon i butanodion). W produkowanym klasycznie niebieskim serze pleśniowym (szczep *Penicillium roqueforti*) obecne są: 2-heptanon, 2-nonanon, 2-pentanon i 2-undekanon [18]. Metyloketony powstają w procesie dojrzewania sera, podczas którego obecne w pleśni enzymy katalizują hydrolizę trójglicerydów mleka w wolne kwasy tłuszczowe, które następnie są utleniane do metyloketonów [30] (Schemat 7).



Schemat 7. Enzymatyczne utlenienie kwasu karboksylowego do metyloketonu

Scheme 7. Enzymatic oxidation of a carboxylic acid to methyl ketone

Początkowe etapy transformacji kwasu tłuszczowego katalizowane są przez enzymy cyklu β -oksydacji (Schemat 7, etapy 1–4). Tworzący się β -keto-acyloSCoA ulega kolejno hydrolizie pod wpływem tioesterazy do β -ketokwasu, z którego w wyniku dekarboksylacji powstaje metyloketon, zawierający o jeden atom węgla mniej niż substrat [30, 31].

Metyloketony charakteryzują się nie tylko atrakcyjnymi właściwościami zapachowymi, ale także wysoką liczbą cetanową (LN). Liczba cetanowa świadczy o jakości paliwa do silników wysokoprężnych. Wartość LN dla 2-undekanonu wynosi 56,6 a dla mieszaniny (50/50 v/v) 2-undekanonu i 2-tridekanonu – 58,4. Oleje napędowe stosowane w USA mają LN nie niższe niż 40 [32].

W ostatnich latach podjęto intensywne badania nad mikrobiologicznym utlenieniem kwasów karboksylowych do metyloketonów, głównie w zakresie biochemii i genetyki. Ich rezultatem jest identyfikacja u jednej z odmian pomidora (*Solanum habrochaites*) metyloketonowej syntazy I (ShMKS1) i metyloketonowej syntazy II (ShMKS2). Postuluje się, że ShMKS1 wykazuje aktywność tioesterazy i dekarboksylazy, a ShMKS2 odpowiedzialny jest za hydrolizę wiązania estrowego β -ketoacylo-SCoA (Schemat 7, etapy 6 i 5) [33].

Innym genetycznie zmodyfikowanym mikroorganizmem zdolnym do efektywnej syntezy metyloketonów jest szczep *Escherichia coli*, który produkuje 700-krotnie więcej nasyconych i jednonienasyconych metyloketonów, w tym 2-undekanonu i 2-tridekanonu, względem szczepu z nadprodukcją kwasu tłuszczowego [32]. Modyfikacja genetyczna tego szczepu obejmowała nadekspresję dehydrogenazy acyl-SCoA z *M. luteus*, nadekspresję natywnej hydratyzę enoilo-SCoA, delecję genu β -ketotiolazy i nadekspresję natywnej tioesterazy.

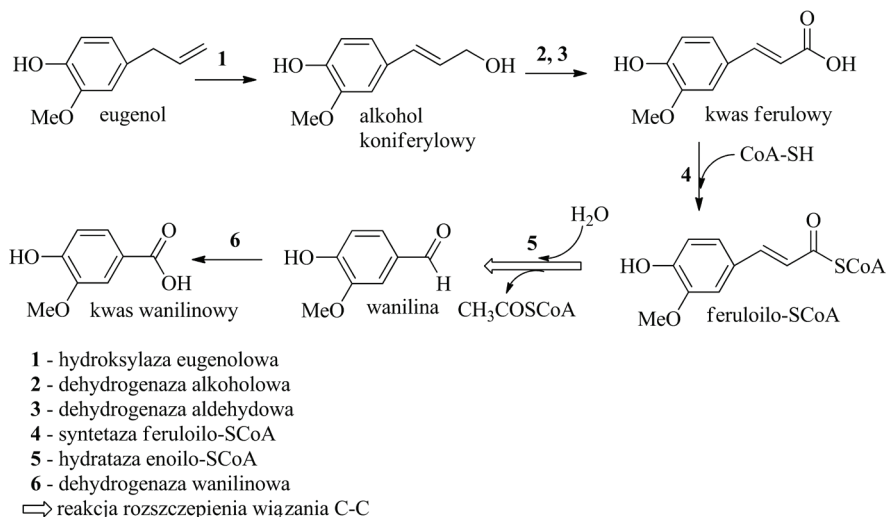
Rekombinant *E. coli* (EGS560) po nadekspresji tioesterazy do szczepu z nadprodukcją β -ketoacylo-SCoA syntezował 9-krotnie więcej 2-tridekanonu niż wyjściowy mikroorganizm [32]. Szczep ten, uznany za najlepszy do produkcji metyloketonów, produkował oprócz wymienionego składnika również 2-undekanon, 2-tridecenon, 2-tridekanon, 2-pentadecenon i 2-pentadekanon. Inny rekombinant *E. coli*, oznaczony symbolem DH1 (po nadekspresji natywnej hydratyzę enoilo-SCoA i heterologicznej oksydazy acyl-SCoA- w miejsce dehydrogenazy acyl-

-SCoA – przy równoczesnej delecji genu β -ketotiolazy), odznaczał się szczególnie wysoką aktywnością katalityczną. Zastosowanie *E. coli* DH1 pozwoliło na uzyskanie blisko 75-krotnie więcej metyloketonów, głównie 2-tridekanonu. Heterologiczna oksydaza acylo-SCoA charakteryzowała się dobrą rozpuszczalnością i wysoką specyficznością [32].

Przedstawione rezultaty wskazują, że wykorzystanie inżynierii genetycznej pozwoli na opracowanie wydajnej metody syntezy metyloketonów na drodze biokatalizy. Otrzymane na tej drodze metyloketony będą mogły być zastosowane jako komponenty biopaliw.

2.1.3. Otrzymywanie waniliny

Intensywne badania nad opracowaniem biokatalitycznych, efektywnych metod uzyskiwania związków zapachowych dotyczą również waniliny [34–40]. Wanilina (4-hydroksy-3-metoksybenzaldehyd) wchodzi w skład kompozycji zapachowych żywności (głównie wyrobów cukierniczych i napojów), perfum, kosmetyków oraz farmaceutyków [15]. Roczne, globalne zapotrzebowanie na wanilinę sięga ponad 10 000 ton, a aktualnie udział naturalnej waniliny nie przekracza 0,5%. Syntetyczna wanilina jest tania (12 \$/kg), podczas gdy cena waniliny pozyskiwanej z *Vanilla planifolia*, z racji niskiej jej zawartości w strąkach (nieprzekraczającej 2%) to około 3 tys. \$/kg. Badania nad opracowaniem efektywnych metod otrzymywania naturalnej waniliny koncentrują się głównie na poszukiwaniu odpowiedniego naturalnego surowca oraz biokatalizatora zdolnego do jego przekształcenia. Niewielkie ilości waniliny i jej pochodnych (kwasu wanilinowego, dehydrodiwanilinowego) identyfikowane były m.in. w mieszaninie po degradacji ligniny przez grzyby białej zgnilizny drewna. Znacznie wyższe wydajności waniliny uzyskuje się w mikrobiologicznych transformacjach eugenolu lub kwasu ferulowego (Schemat 8). Kwas ferulowy przekształcany jest przez szereg szczepów bakterii, kultury tkankowe *Capsicum frutescens* i linie komórkowe *Vanilla planifolia* [15]. W kulturach mikroorganizmów *Bacillus subtilis*, *Polyporus versicolor*, *Pseudomonas acidovorans*, *Streptomyces setoni* i in. kwas ten utleniany jest do waniliny w reakcjach katalizowanych przez enzymy cyklu β -oksydacji [15, 34, 40]. Aktywację kwasu ferulowego do tioestru katalizuje syntetaza feruloilo-SCoA (Schemat 8, etap 4). Po hydratacji wiązania podwójnego następuje rozszczepienie wiązania C-C, którego produktami są wanilina i acetylo-SCoA (Schemat 8, etap 5). W kulturach wielu mikroorganizmów może zachodzić dalsze utlenienie produktu, co skutkuje obniżeniem zawartości akumulowanej waniliny (Schemat 8, etap 6). Reakcja ta jest elementem mechanizmu obronnego szczepu, ponieważ wanilina ma toksyczne działanie wobec większości mikroorganizmów [15].

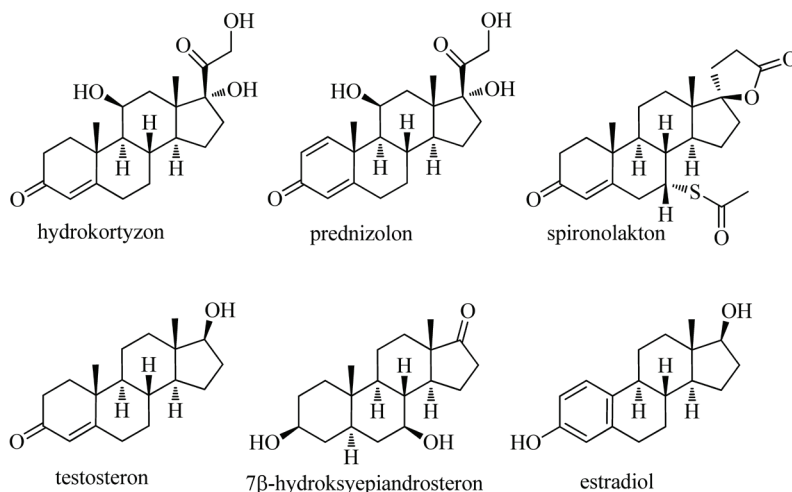


Schemat 8. Enzymatyczne przekształcenie eugenolu do waniliny

Scheme 8. Enzymatic transformation of eugenol to vanillin

2.2. ENZYMATYCZNA MODYFIKACJA STEROLI DO PRODUKTÓW UŻYTECZNYCH W SYNTEZIE LEKÓW STEROIDOWYCH

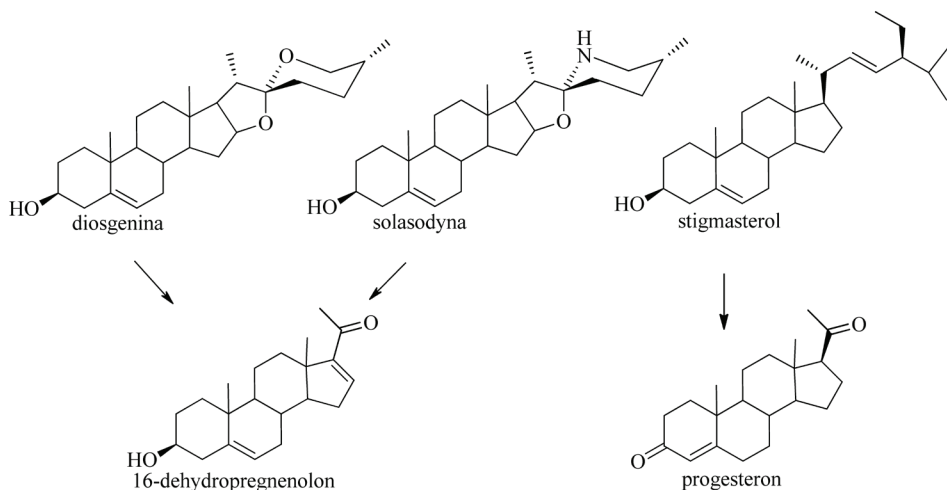
Naturalne związki steroidowe i ich syntetyczne analogi wykazują różnorodne działanie biologiczne m.in.: przeciwzapalne (hydrokortyzon, prednizolon), moczopędne (spironolakton), anaboliczne (testosteron, metylotestosteron), neuroprotektory (7 β -hydroksyepiandrosteron), poprawiające pracę serca (estradiol). Leki steroidowe stosowane są w terapii osteoporozy, nowotworów prostaty, w zaburzeniach pracy nadnerczy oraz profilaktyce chorób wieńcowych [19]. Struktury wybranych związków steroidowych o aktywności biologicznej przedstawione są na Schemacie 9.



Schemat 9. Struktury związków steroidowych wykazujących różną aktywność biologiczną
 Scheme 9. Structures of steroid compounds exhibiting diverse biological activity

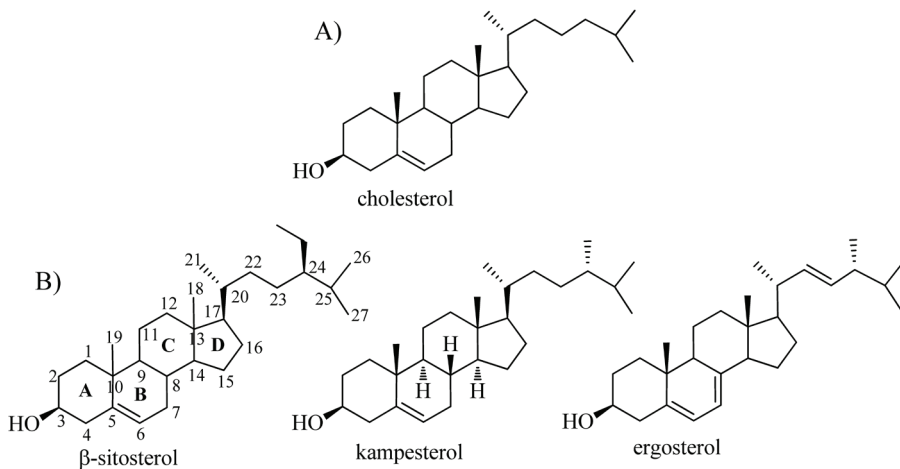
2.2.1. Surowce do produkcji leków steroidowych

Roczna wartość rynkowa produkowanych steroidów szacowana jest na 4–8 miliardów dolarów USA, w tym miliard dolarów przypada na androstendion (AD) i androstadiendion (ADD), które są substratami stosowanymi w syntezie szeregu leków steroidowych.



Schemat 10. Diosgenina, solasodyna i stigmasterol modyfikowane na drodze chemicznej do C21-steroidów
 Scheme 10. Chemical modification of diosgenine, solasodyne and stigmasterol to C21-steroids

Do lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku podstawowym surowcem do ich produkcji była diosgenina, uzyskiwana z bulw meksykańskiej rośliny *Dioscorea composita*. Następnie opracowano metodę, w której wykorzystuje się solasodynę (Schemat 10) [19].



Schemat 11. Struktury pospolitych steroli zwierzęcych A) i roślinnych B)

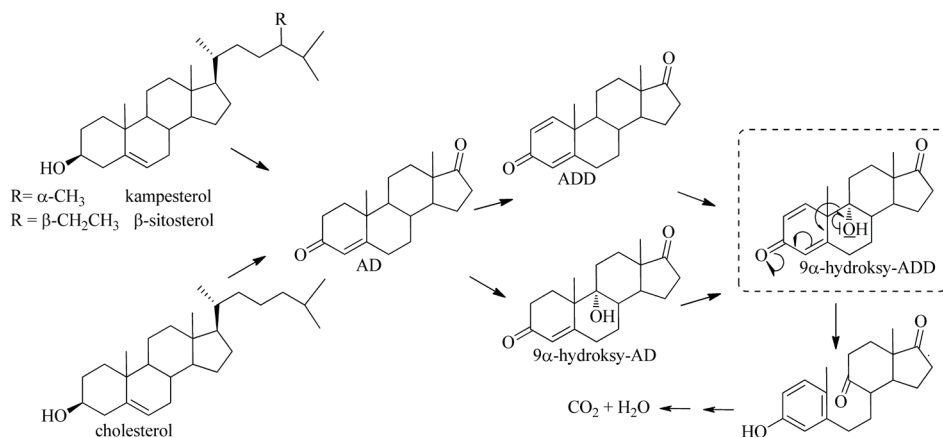
Scheme 11. Structures of commonly occurring sterols derived from A) animals and B) plants

Ze względu na rosnące zapotrzebowanie na leki steroidowe i ograniczoną oraz niestabilną (m.in. ze względu na warunki pogodowe) podaż diosgeniny, podjęto prace nad poszerzeniem bazy surowcowej o sterole, głównie cholesterol, stigmasterol i β -sitosterol (Schematy 10 i 11).

Znaczne ilości steroli głównie stigmasterolu, β -sitosterolu i kampesterolu zawierają oleje sojowy i rzepakowy a także miazga roślinna uzyskiwana np. z trzciny cukrowej czy odpady przemysłu papierniczego. Stigmasterol, sterol z wiązaniem podwójnym w łańcuchu bocznym, może być przekształcany na drodze chemicznej w reakcji utleniającego rozszczepienia wiązania C-22–C-23 do progesteronu (Schemat 10), podczas gdy układy z nasyconym łańcuchem węglowodorowym przez szereg lat stanowiły niepotrzebny balast [41]. Podjęte próby opracowania metody chemicznej modyfikacji łańcucha bocznego tych steroli nie dały zadowalających rezultatów. Uzyskiwano mieszaninę wielu produktów przy jednocześnie niewysokim stopniu konwersji substratów.

Założono, że ze względu na selektywność działania enzymów, możliwe będzie opracowanie metody selektywnego odszczepienia łańcucha bocznego steroli metodą transformacji mikrobiologicznej. Podstawą tej hipotezy była znana zdolność szczepów bakterii gram-dodatnich (*Brevibacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*) i gram-ujemnych (*Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Comamonas*, *Pseudomonas*) do wykorzystywania steroli jako źródła węgla [42]. Wiele grup badaczy przeprowadziło prace, które miały na celu wyselekcjonowanie ze środowiska natu-

ralnego szczepów zdolnych do selektywnej degradacji łańcucha bocznego steroli. Przetestowano setki mikroorganizmów, ale żaden z nich nie prowadził pożądanego przekształcenia: sterol → C19- (C21- lub C22-) steroid. Badania wykazały, że dzięki szczepy katalizują utleniającą degradację łańcucha bocznego steroli, ale obok niej następuje utlenienie szkieletu steroidowego; końcowymi produktami transformacji były dwutlenek węgla i woda (Schemat 12). Po biotransformacji β -sitosterolu, kampesterolu czy cholesterolu w mieszaninie metabolitów identyfikowano niewielkie ilości użytecznych syntetycznie C19-steroidów: androsta-4-en-3,17-dionu (AD) i androsta-1,4-dien-3,17-dionu (ADD) (Schemat 12).

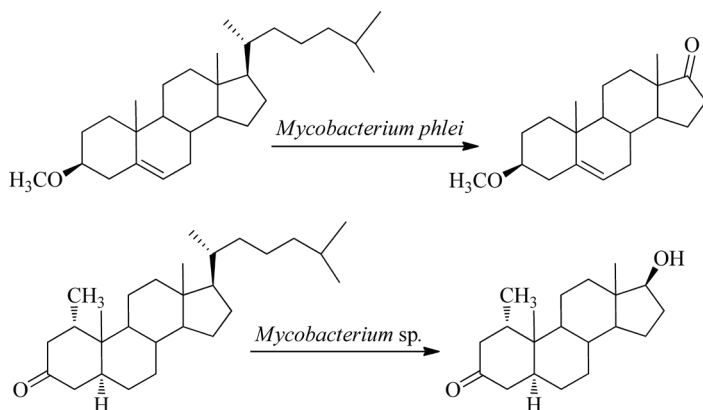


Schemat 12. Mikrobiologiczne przekształcenia kampesterolu, β -sitosterolu i cholesterolu do użytecznych C19-steroidów

Scheme 12. Microbial transformations of campesterol, β -sitosterol and cholesterol to useful C19-steroids

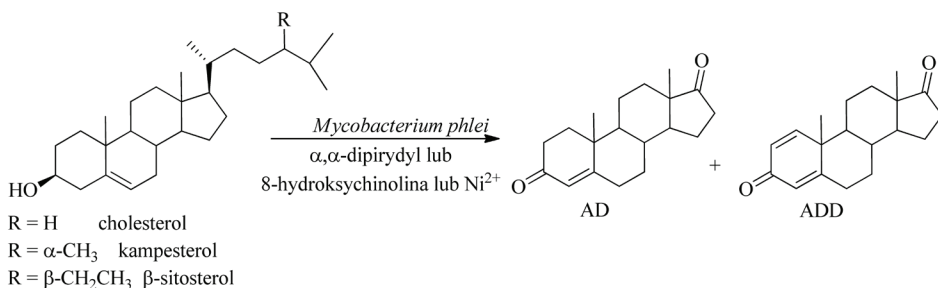
W przeprowadzonych doświadczeniach ustalono, że kluczową rolę w degradacji szkieletu steroidowego odgrywają utleniające reakcje w pierścieniach A i B: 1,2-dehydrogenacja i 9 α -hydroksylacja. Powstanie 9 α -hydroksy-androsta-1,4-dien-3,17-dionu (9 α -hydroksy-ADD) oznacza rozpad charakterystycznej struktury steroidowej [43], ponieważ związek ten ulega samorzutnej izomeryzacji do B-seko produktu z aromatycznym pierścieniem A (Schemat 12).

C19-Steroidy izolowano po transformacji przez dzikie szczepy pochodnych cholesterolu ze zmodyfikowanym pierścieniem A (Schemat 13) [43, 44]. W wyniku podstawienia atomu wodoru C-3-OH lub eliminacji wiązania podwójnego przy C-5, zablokowane było utlenienie grupy hydroksylowej przy C-3 lub powstawanie produktu z układem sprzężonych wiązań w pierścieniu A i w konsekwencji nie następowało rozszczepienie wiązania C-9-C-10.



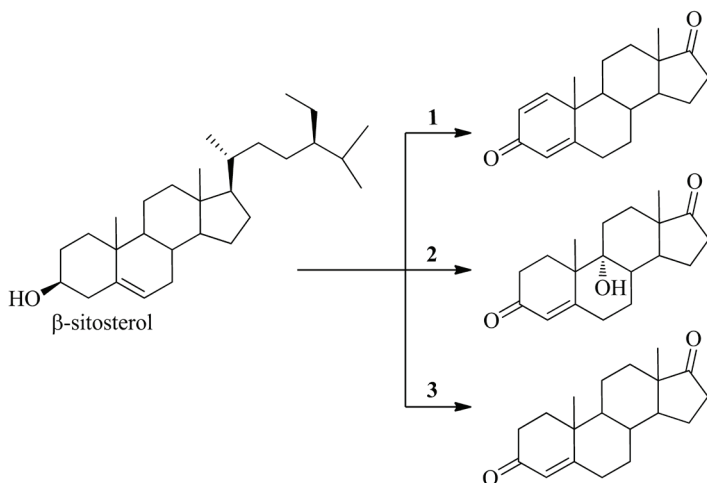
Schemat 13. Selektywna, mikrobiologiczna degradacja łańcucha bocznego pochodnych cholesterolu
 Scheme 13. Selective microbial side-chain degradation of cholesterol derivatives

AD lub mieszaninę AD i ADD uzyskiwano po transformacji steroli przez dzikie szczepy, prowadzonych w obecności znanych inhibitorów mikrobiologicznych hydroksylaz (8-hydroksychinoliny, α,α -dipirydyłu czy kationu Ni^{2+} , Schemat 14). Stanowiło to dodatkowe potwierdzenie kluczowej roli hydroksylacji w pozycji 9α - dla procesu degradacji szkieletu steroidowego [43].



Schemat 14. Selektywne, mikrobiologiczne utlenienie steroli w obecności inhibitora 9α -hydroksylazy
 Scheme 14. Selective microbial oxidation of sterols in the presence of 9α -hydroxylase inhibitor

Troska o ochronę środowiska i związane z nią koszty decydują o tym, że optymalną metodą selektywnego utleniania steroli jest użycie jako biokatalizatora mutantu dzikiego szczepu z deficytem 9α -hydroksylazy, 1,2-dehydrogenazy lub obu wymienionych enzymów. Takie mutanty wyselekcjonowano po chemicznej lub fizykochemicznej mutagenizacji (Schemat 15) [43, 45–48].



- 1 - mutant *Mycobacterium fortuitum* z deficytem 9 α -hydroksylazy
 2 - mutant *Mycobacterium fortuitum* z deficytem 1,2-dehydrogenazy
 3 - mutant *Mycobacterium fortuitum* z deficytem 9 α -hydroksylazy i 1,2-dehydrogenazy

Schemat 15. Mutanty *Mycobacterium fortuitum* katalizujące selektywne utlenienie β -sitosterolu do C19-produktu

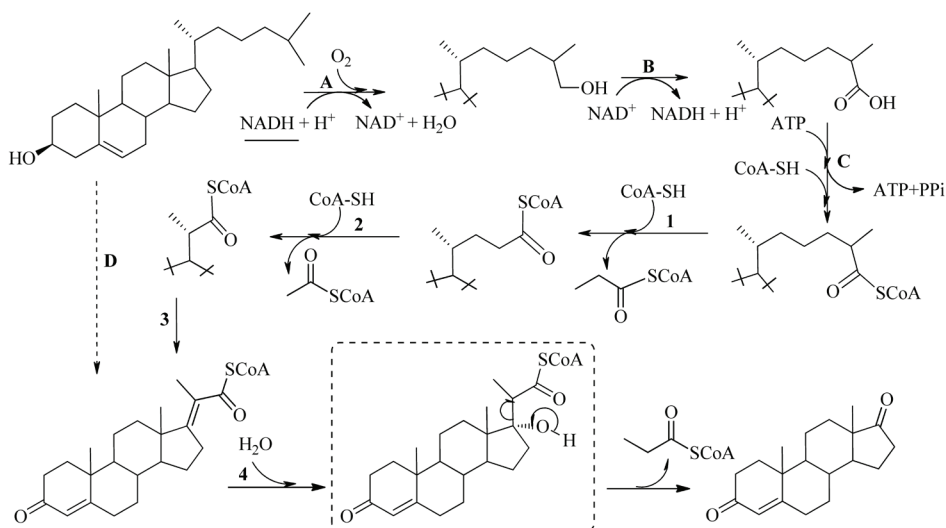
Scheme 15. *Mycobacterium fortuitum* mutants catalyzing selective oxidation of β -sitosterol to C19-product

Aktualnie mikrobiologiczne transformacje steroli przez zmutowane lub rekombinowane szczepy dostarczają substratów do produkcji ponad 1000 ton steroidów rocznie [49].

2.2.2. Przebieg enzymatycznej degradacji łańcucha bocznego steroli

Mimo, że znany jest przebieg degradacji łańcucha bocznego zarówno cholesterolu jak i steroli zawierających podstawnik alkilowy przy C-24 (kampesterol, β -sitosterol) [43, 50], a sekwencja reakcji w tym procesie została ustalona w 1968 roku [51], wciąż prowadzone są badania, których celem jest identyfikacja niektórych enzymów i znacznej części genów kodujących te enzymy. Na podstawie przeprowadzonych badań ustalono, że pierwszym etapem przemian jest hydroksylacja terminalnej grupy metylowej (ω -hydroksylacja). Powstały hydroksy-produkt przekształcany jest do kwasu. W ostatnich latach zidentyfikowano enzym odpowiedzialny za wprowadzenie grupy hydroksylowej przy C-26 w układ steroidowy – C-26-hydroksylazę (CYP125) [52]. Postuluje się, że enzym ten katalizuje również utlenienie tej grupy (Schemat 16, etapy A i B). Utworzony C26-karboksy-produkt, po odszczepieniu kolejno: propionilo-SCoA, acetylo-SCoA i propionilo-SCoA, przekształcany jest do AD. Dwie pierwsze odszczepione cząsteczki to produkty utlenienia w cyklu β -oksydacji (Schemat 16, etapy 1 i 2). Powstający równocześnie C22-tioester w zachodzących kolejno: C-17–C-20-dehydrogenacji, hydratacji (Schemat 16,

etapy 3 i 4) i reakcji retro-aldolowej, przekształcany jest ostatecznie do C-17-ketonu (AD) i propionilo-SCoA [43, 51, 52]. Nie ustalono dotychczas, czy przekształcenie fragmentu 3 β -hydroksy-5-en sterolu do układu 4-en-3-okso (Schemat 16, etap D) następuje przed degradacją łańcucha bocznego; nie jest też pewne, czy całkowita degradacja łańcucha jest niezbędna dla utleniających reakcji w pierścieniu A [52].

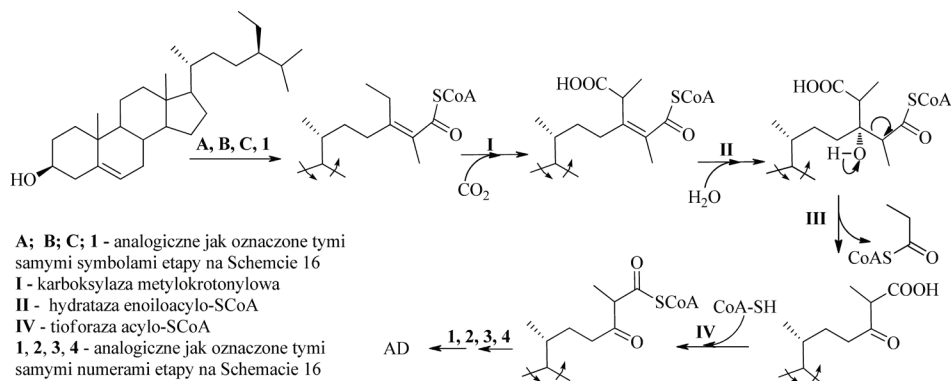


- A - ω -oksygenaza - CYP125
 B - dehydrogenaza alkoholowa lub CYP125
 C - tioforaza acylo-SCoA
 D - dehydrogenaza/ izomeraza 3 β -hydroksysteroidowa
 1, 2 - cykl β -oksydacji
 3 - dehydrogenaza acylo-SCoA
 4 - hydrataza enoilo-SCoA

Schemat 16. Mikrobiologiczne przekształcenie cholesterolu do AD

Scheme 16. Microbial transformation of cholesterol to AD

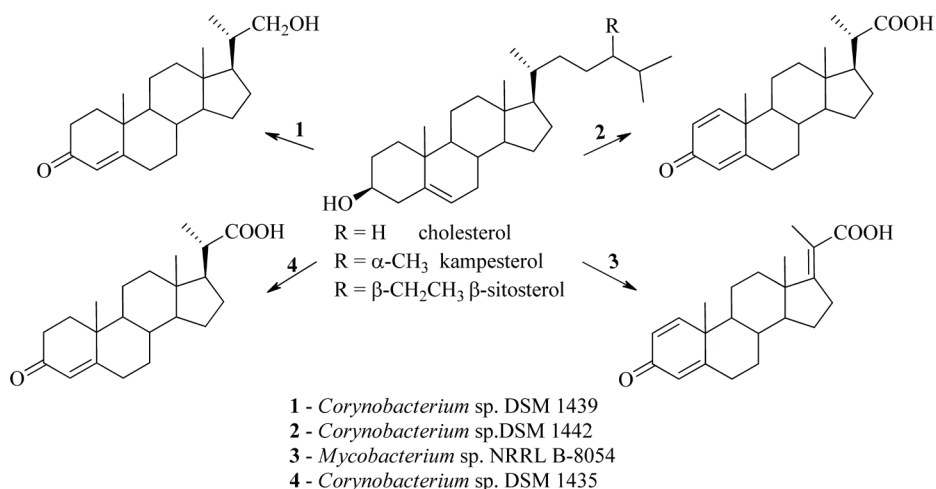
Mikrobiologiczny metabolizm cholesterolu i steroli z podstawnikiem alkilowym przy C-24 przebiega w znacznej części identycznie, z tym że podczas degradacji rozgałęzionych steroli zachodzi dodatkowo reakcja karboksylacji i jeden cykl β -oksydacji więcej (Schemat 17, etap III). Produktem pierwszych czterech etapów utlenienia β -sitosterolu jest α,β -nienasycony ester-SCoA (Schemat 17, etapy: A-C, 1). Ester ten ulega karboksylacji w pozycji allilowej (Schemat 17, etap I), po której ma miejsce hydratacja wiązania podwójnego C-24–C-25. Z produktu hydratacji, w wyniku reakcji retro-aldolowej (Schemat 17, etap III) odzłącza się propionilo-SCoA. Utworzony równocześnie β -ketokwas, po aktywacji do tioestru, utleniany jest do AD w sekwencji reakcji analogicznych jak w degradacji cholesterolu.



Schemat 17. Degradacja łańcucha bocznego β -sitosterolu
 Scheme 17. β -Sitosterol side-chain degradation

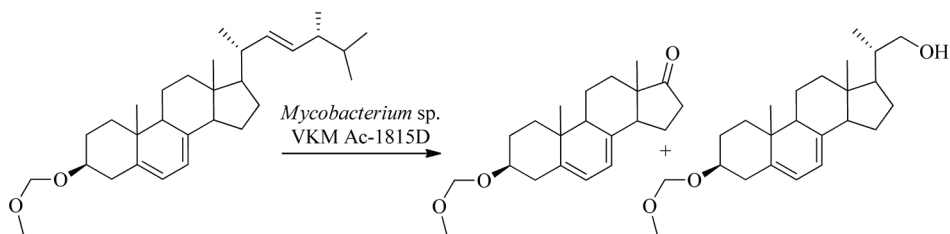
Badania, których celem było poznanie przebiegu metabolizmu steroli w kulturach mikroorganizmów, dostarczyły również informacji o tym, jaki jest wpływ parametrów, takich jak skład pożywki, pH, stężenie substratu, natlenienie, obecność induktorów lub inhibitorów na wydajność procesu. Ustalono, że enzymy katalizujące degradację steroli należą do indukowanych przez substraty. Aktywność indukowanej ω -hydroksylazy zależy od ilości rozpuszczonego w środowisku tlenu – wyższą aktywność enzymu obserwowano przy niskiej zawartości tlenu [43]. Już w początkowym okresie badań nad degradacją β -sitosterolu przez *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 ustalono, że wprowadzenie jonu HCO_3^- wyraźnie zwiększa stopień przekształcenia substratu, co sugerowało, że etap karboksylacji ma istotne znaczenie dla szybkości degradacji rozgałęzionych steroli [43]. Wyniki badań wykazały, że CO_2 jest lepszym odczynnikiem karboksylującym niż jon HCO_3^- , prawdopodobnie ze względu na łatwiejszy transport obojętnej cząsteczki przez błony komórkowe bakterii [43, 53]. β -Sitosterol jest induktorem C-28-karboksylazy, natomiast cholesterol nie indukuje tego enzymu [43]. Poznanie enzymów katalizujących niektóre etapy degradacji łańcucha bocznego steroli jest utrudnione głównie z powodu braku genetycznie stabilnych mutantów. Ostatnio zidentyfikowano gen SCoA-ligazy, która jest odpowiedzialna za metabolizm steroli z rozgałęzionym łańcuchem [54]. Mutant *R. rhodochrous* DSM43269 z deficytem genu *fadD19* nie był zdolny do utlenienia łańcucha β -sitosterolu, natomiast metabolizował cholesterol.

Obok mutantów prowadzących utlenienie steroli do C19-produktów wyselekcjonowano również takie, które katalizowały przekształcenie sterol \rightarrow C22-steroidy. Po transformacji izolowano: 21-hydroksy-20-metylo-pregna-4-en-3-on, 20-karboksypregna-4-en-3-on, 20-karboksypregna-1,4-dien-3-on, 20-karboksy-17(20)-dehydro-pregna-1,4-dien-3-on (Schemat 18) [43].



Schemat 18. Mutanty *Corynebacterium* sp. i *Mycobacterium* sp. utleniające sterole do C22- produktów
 Scheme 18. *Corynebacterium* sp. and *Mycobacterium* sp. mutants oxidizing sterols to the C22-products

Przez wiele lat ergosterol (podstawowy składnik błon komórkowych grzybów) nie był traktowany jako potencjalny surowiec do syntezy leków steroidowych. Pierwsze doświadczenia nad degradacją łańcucha bocznego ergosterolu wykazywały, że sterol z układem wiązań podwójnych w pierścieniu B przekształcany jest znacznie wolniej niż inne sterole [55, 56]. W 2010 roku opublikowano wyniki transformacji ergosterolu przez szczep *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1815D [57]. Szczep ten przekształcał ergosterol i octan ergosterolu do AD, natomiast produktami O-metoksymetylo-ergosterolu była mieszanina 3-metoksymetoksy-androsta-5,7-dien-17-onu (główny metabolit) i 3-metoksymetoksy-20-hydroksymetylo-pregna-5,7-dieniu (Schemat 19).



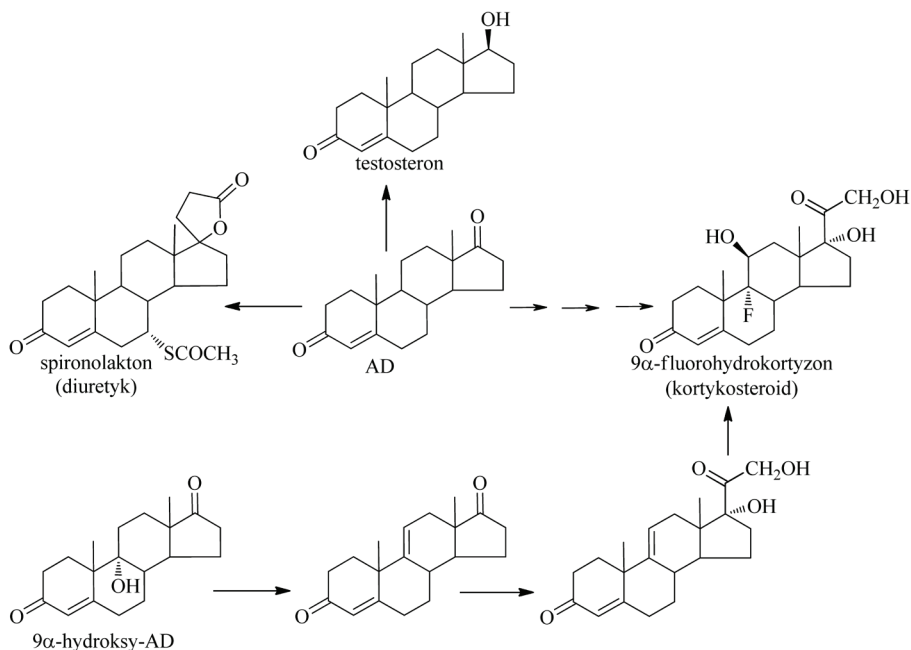
Schemat 19. Mikrobiologiczne przekształcenie O-metoksymetylo-ergosterolu
 Scheme 19. Microbial transformation of O-methoxymethyl-ergosterol

Uzyskane produkty z układem 5,7-dieniu są pożądanymi substratami syntez pochodnych witaminy D [58]. Występujące w naturze formy witaminy D (np. 1 α ,25-dihydroksy pochodne ergo- lub cholekalcyferolu) mogą, przy podaniu ich w dawkach farmakologicznych, wywołać hiperkalcemię lub hiperfosfatemię (stany podwyższonego stężenia jonów wapnia lub fosforanów nieorganicznych we krwi). Z tego

powodu, szeroko badane są naturalne i syntetyczne analogi witamin D_2 i D_3 zwane delfanoidami [59, 60]. Synteza witaminy D lub jej pochodnych oparta o 3-metoksymetoksy-androsta-5,7-dien-17-on jest korzystna, bowiem pozwala na pominięcie etapu zabezpieczenia grupy hydroksylowej przy C-3. Dodatkowo 3-metoksymetoksy-androsta-5,7-dien-17-on jest prekursorem $3\beta,17\beta$ -dihydroksy-androsta-5,7-dieniu i jego pochodnych o działaniu stymulującym system immunologiczny [61].

2.2.3. Wykorzystanie produktów degradacji steroli w syntezie leków

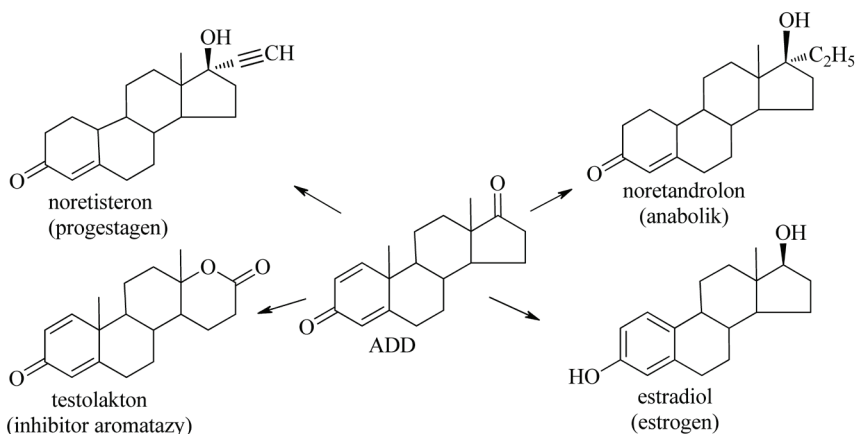
Przedstawione na Schemacie 9 wzory reprezentują trzy podstawowe struktury steroidów: C21-steroidy (hydrokortyzon, prednizolon), C19-steroidy (testosteron, 7β -hydroksyepiandrosteron) i C18-steroidy (estradiol). W mikrobiologicznych transformacjach otrzymuje się substraty do syntez naturalnych C19- i C21- steroidów oraz ich analogów (Schematy 20 i 21).



Schemat 20. Synteza C19- i C21- steroidów z AD i 9α -hydroksy-AD

Scheme 20. Synthesis of C19- and C21-steroids from AD and 9α -hydroxy-AD

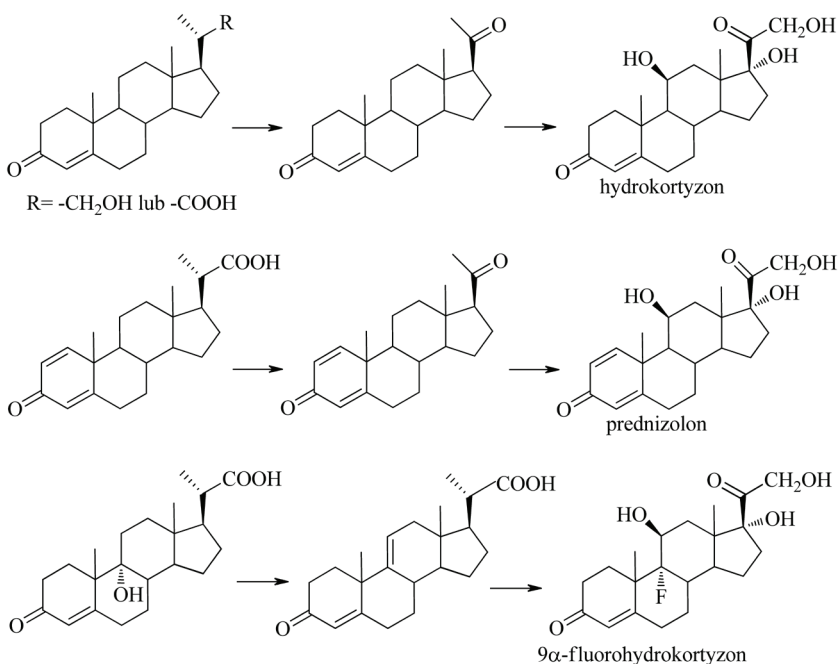
Sterole będące produktami reakcji enzymatycznych, podobnie jak inne naturalne chiralne połączenia, występują w postaci jednego enancjomeru (efekt enancjoselektywności enzymu). Dlatego w cyklu mikrobiologicznej degradacji łańcucha bocznego steroli otrzymuje się optycznie czyste syntony naturalnych steroidów, o zdefiniowanej konfiguracji podstawników przy chiralnych atomach węgla.



Schemat 21. ADD jako substrat w produkcji leków o właściwościach estrogennych, progestagennych i anabolicznych

Scheme 21. ADD as the substrate in production of drugs with oestrogenic, progestogenic and anabolic properties

Aktualnie wiele firm farmaceutycznych (Henkel, Schering, Searle, Mitsubishi) wykorzystuje C22-steroidy w syntezie hydrokortyzonu i jego analogów [43] (Schemat 22).



Schemat 22. Synteza hydrokortyzonu i jego analogów z C22-steroidowych substratów

Scheme 22. Synthesis of hydrocortisone and its analogues from C22-steroid substrates

Pomimo tego, iż biologiczne i terapeutyczne działanie steroidów jest znane od ponad 60 lat, wciąż prowadzone są badania nad opracowaniem nowych metod syntezy leków steroidowych. Lista naturalnych steroidów wciąż się wydłuża, co jest związane z postępowaniem w zakresie izolowania związków, określaniem ich struktury i właściwości. Aktualnie w centrum zainteresowania są, syntetyzowane m.in. w mózgu ssaków, neurosteroidy: pregnenolon, dehydroepiandrosteron (DHEA), epiandrosteron i ich pochodne. Wymienione związki mają działanie neuroprotektorowe, przeciwdrgawkowe, antydepresyjne i przeciwłękowe [62, 63].

3. BIODEGRADACJA ZWIĄZKÓW AROMATYCZNYCH

Związki aromatyczne, ze względu na ich toksyczne właściwości, stanowią zagrożenie dla środowiska i zdrowia ludzi. Rosnąca systematycznie zawartość w środowisku aromatycznych połączeń o różnorodnej budowie była impulsem do podjęcia badań nad opracowaniem skutecznych, ekologicznych metod eliminowania tych toksycznych związków. Obiecującą metodą jest bioremediacja, w której zanieczyszczenia są degradowane przez autochtoniczne mikroorganizmy (bioremediacja naturalna, biostymulacja) lub drobnoustroje wyselekcjonowane względem określonego skażenia czy ksenobiotyku (bioaugmentacja).

W środowiskach skażonych węglowodorami aromatycznymi zidentyfikowano wiele szczepów, głównie bakterii glebowych i grzybów, które są zdolne do przekształceń zanieczyszczeń w nietoksyczne, niskcząsteczkowe produkty. Biodegradacja węglowodorów aromatycznych jest zazwyczaj wieloetapowym procesem, przebiegającym z udziałem kilku współpracujących ze sobą mikroorganizmów [64, 65]. Aktywność produkowanych enzymów (głównie monoooksygenaz, dioksygenaz, dehydrogenaz, dehalogenaz i hydrolaz) jest zasadniczym kryterium przydatności drobnoustroju w biodegradacji. Produkty enzymatycznego rozerwania wiązania C-C w aromatycznym pierścieniu są kolejno, głównie w cyklach β -oksydacji, przekształcane w niskcząsteczkowe, neutralne dla środowiska połączenia (Schematy 23–28).

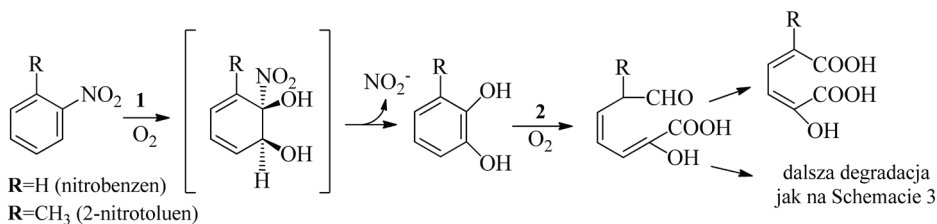
Szczególnie wysoką aktywnością degradacji związków aromatycznych charakteryzują się bakterie z rodzaju *Pseudomonas* (Tab. 1). Zalety szczepów bakterii tego rodzaju to: różnorodność szlaków metabolicznych, adaptacja do warunków środowiska oraz fakultatywne przełączanie aparatu metabolicznego na warunki beztlenowe. W genomie tych gram-ujemnych bakterii obecne są plazmidy kodujące enzymy odpowiedzialne za degradację m.in. oktanu, naftalenu, ksylenu i toluenu [64, 65].

Tabela 1. Szczepy bakterii z rodzaju *Pseudomonas* użyteczne w procesach bioremediacji
 Table 1. Bacterial strains of *Pseudomonas* genus useful in bioremediation processes

Szczep	Pochodzenie	Degradowane skażenie(a)	Literatura
<i>P. aeruginosa</i>	obszar skażony ściekami rafinerijnymi	ropa naftowa	[66]
<i>P. pseudoalcaligenes</i> JS45	gleba i wody gruntowe zanieczyszczone nitrobenzenem	nitrobenzen	[67]
<i>P. putida</i>	gleba skażona 2- i 3-nitrofenolem	2- i 3-nitrofenole	[68]
<i>Pseudomonas</i> sp. H12	ścieki	benzen, toluen, ksylen, heksylobenzen, butylobenzen	[69]
<i>Pseudomonas</i> sp. JS42	gleba zanieczyszczona nitrobenzenem	2-nitrotoluen	[70]
<i>P. stutzeri</i>	gleba skażona ropą naftową	alkilo-aromatyczne składniki oleju napędowego	[71]
<i>P. stutzeri</i> ZWLR2-1	gleba skażona chloronitrobenzenem	2-chloronitrobenzen	[72]
<i>P. pickettii</i> PKO1	mutant	toluen, benzen, fenol, <i>m</i> -krezol	[73]

Zbadano, że szczep *Pseudomonas* sp. H12, wyizolowany ze ścieku w Egipcie, w ciągu 24 godzin degradował petrochemiczne zanieczyszczenia środowiska z prawie 90% wydajnością [69]. Ustalono, że mieszanina aromatycznych węglowodorów była degradowana w wyższym stopniu niż poszczególne jej składniki, poddane działaniu biokatalizatora w analogicznych warunkach.

Efektywną degradację nitrobenzenu prowadził *Comamonas* sp. JS765 [67]. Ustalono, że w warunkach tlenowych, degradacja nitrobenzenu następuje w cyklu reakcji podanych na Schemacie 23.



1 - 1,2-dioksygenaza nitrobenzenowa

2 - 2,3-dioksygenaza katecholowa

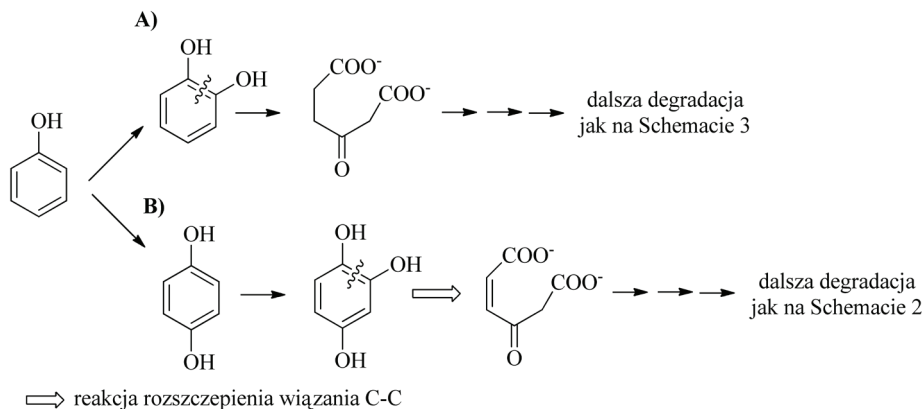
Schemat 23. Bakteryjna degradacja nitrobenzenu i 2-nitrotolueniu

Scheme 23. Bacterial degradation of nitrobenzene and 2-nitrotoluene

Badania wykazały, że *Corynebacterium glutamicum*, stosowany w produkcji aminokwasów i witamin metodą fermentacji metabolizuje m.in. benzoesy, fenole, protokatechol i *p*-krezol [74].

W bioremediacji węglowodorów aromatycznych, w tym wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), ważną rolę odgrywają również drożdże i grzyby strzępkowe m.in.: *Arxula adenivorans* [75], *Aspergillus ochraceus* [76], *Candida tropicalis* [77], *Cunninghamella elegans* [76], *Saccharomyces cerevisiae* [78] czy *Trichosporon cutaneum* [79].

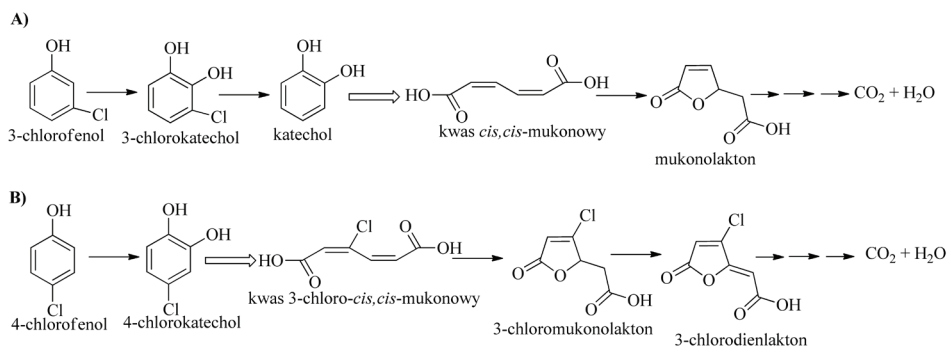
Szczep *Aspergillus fumigatus* ATCC 28282 wykorzystuje fenol, *p*-krezol i 4-etylofenol jako jedyne źródło węgla [80, 81]. Na podstawie analizy wyników doświadczeń, których celem było ustalenie drogi metabolizmu fenolu, postuluje się, że utlenienie tego substratu zachodzi na dwóch drogach (Schemat 24) [82]: *o*-hydroksylacji lub dihydroksylacji do 1,2,4-trihydroksybenzenu. Kolejno następuje *orto* rozszczepienie wiązania C-C układu *o*-diolu. Produkty rozszczepienia ulegają dalszej degradacji na drodze β -oksydacji.



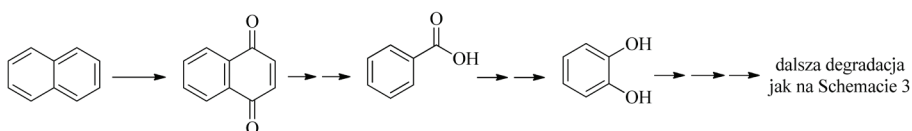
Schemat 24. Metabolizm fenolu w kulturze *A. fumigatus* ATCC 28282

Scheme 24. Phenol metabolism in *A. fumigatus* ATCC 28282 culture

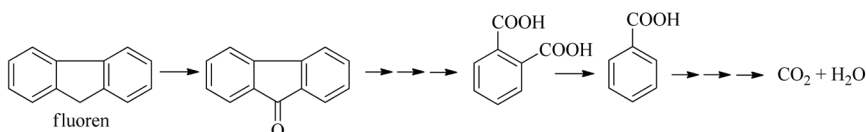
Inny szczep rodzaju *Aspergillus* (*A. nidulans*) degradował 3-chloro- i 4-chlorofenol. Chlorofenole akumulują się w glebie i mogą być przekształcane do toksycznych, trudno degradowanych metabolitów np. kwasu 2-chloromukonowego. Izomeryczne chlorofenole metabolizowane są przez *A. nidulans* w nieco odmienny sposób: 3-chlorofenol po utlenieniu do diolu (3-chlorokatecholu) ulega dehalogencji do katecholu, z którego kolejno powstaje mukonolakton (Schemat 25 A), natomiast produktem utleniania 4-chlorokatecholu jest 3-chloro-1,3-dienlakton. Oba γ -laktony ulegają również dalszej degradacji na drodze β -oksydacji (Schemat 25 B) [83].

Schemat 25. Schemat degradacji: A) 3-chlorofenolu, B) 4-chlorofenolu w kulturze *A. nidulans*Scheme 25. Degradation scheme of A) 3-chlorophenol, B) 4-chlorophenol in *A. nidulans* culture

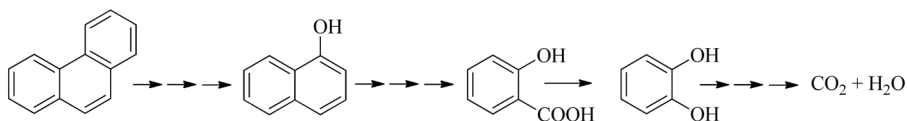
W deszczowych lasach tropikalnych występuje szczep *Pleurotus eryngii* wykorzystujący naftalen jako źródło węgla [84]. Proces degradacji naftalenu przez ten gatunek bocznika, rozpoczyna utlenienie przy C-1 i C-4 (Schemat 26). Powstały 1,4-naftochinon utleniany jest do kwasu benzoowego, z którego w reakcji katalizowanej przez dioksygenazę, powstaje katechol (Schemat 26).

Schemat 26. Degradacja naftalenu przez *P. eryngii*Scheme 26. Degradation of naphthalene by *P. eryngii*

Szczep *P. eryngii* utylizuje również fluoren (Schemat 27) [85]. Taka aktywność mikroorganizmu spowodowana jest zdolnością do produkcji m.in. lakkazy i peroksydazy ligninowej.

Schemat 27. Degradacja fluorenu przez *Pleurotus eryngii*Scheme 27. Degradation of fluorene by *Pleurotus eryngii*

Fenantren jest utylizowany przez szczep *Sphingomonas* sp. GY2B. Zidentyfikowano trzy kolejne produkty pośrednie metabolizmu fenantrenu przez ten mikroorganizm: 1-naftol, kwas salicylowy i katechol (Schemat 28) [86].

Schemat 28. Degradacja fenantrenu przez *Sphingomonas* sp. GY2BScheme 28. Degradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. GY2B

Wyizolowano również szczep *Mycobacterium* sp., który utlenia piren. Po 72 godz. inkubacji w kulturze tego szczepu blisko 50% pirenu ulegało mineralizacji. Dodatkowo ustalono, że enzymy odpowiedzialne za rozkład pirenu są indukowane obecnością substratu [87].

Wśród drobnoustrojów metabolizujących WWA jest także wiele szczepów ekstremofilnych bakterii (odpornych na skrajne warunki środowiska) metabolizujących WWA. Należą do nich m.in.: *Bacillus thermooleovorans* [88], *Halomonas aromativorans* [89], *Halomonas organivorans* [90], *Thermus brockii* [91].

Czynnikiem znacząco ograniczającym proces biodegradacji WWA jest ich słaba rozpuszczalność w wodzie oraz adsorpcja w glebie [11, 71]. Dlatego też poszukuje się sposobów na zwiększenie solubilizacji tych związków. Szczególnie użyteczne dla zwiększenia rozpuszczalności WWA są wytwarzane przez mikroorganizmy biosurfaktanty. W odróżnieniu od syntetycznych odpowiedników biosurfaktanty odznaczają się niższą toksycznością i często wyższą stabilnością w ekstremalnych temperaturach i pH. Chociaż z uwagi na niskie koszty produkcji powszechnie stosowane są syntetyczne surfaktanty, naturalne związki powierzchniowo czynne preferowane są ze względu na ich biodegradowalność. Prowadzone są prace nad uzyskaniem rekombinowanych mikroorganizmów zdolnych do rozkładu węglowodorów aromatycznych i produkcji związków obniżających napięcie powierzchniowe [92, 93].

PODSUMOWANIE

Syntetyczne zastosowanie biokatalizy jest aktualnie przedmiotem intensywnych badań. Otrzymywanie nowych pochodnych dla potrzeb przemysłu farmaceutycznego, chemicznego a także spożywczego na drodze biotransformacji, jest obecnie uważane za dogodniejszą metodę, niż opracowanie syntezy chemicznej zarówno z ekonomicznego, jak i ekologicznego punktu widzenia. Dodatkowym atutem biokatalizy, głównie z użyciem całych komórek, jest możliwość modyfikacji substratu w wyniku szeregu następujących kolejno po sobie reakcji.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że mikroorganizmy izolowane ze skażonego środowiska posiadają duży potencjał w zakresie rozkładu związków aromatycznych, będących ważnym elementem składowym zanieczyszczeń. Niewielka inwazyjność, stosunkowo niskie koszty procesu, w którym wykorzystywany jest naturalnie istniejący potencjał katabolizny mikroorganizmów, stanowią istotne zalety bioremediacji [21, 94–96].

Prace, które mają na celu opracowanie efektywnych metod biokatalizy, stymulują równocześnie rozwój badań w zakresie fizjologii mikroorganizmów, biochemii i genetyki. Przykładowo, w doświadczeniach nad selektywną mikrobiologiczną degradacją łańcucha bocznego steroli ustalono, że patogenne szczepy *Mycobacterium* (*M. tuberculosis*, *M. bovis* i *M. avium*) mają zdolność do transformacji cholesterolu. Wykazano korelację między aktywnością szczepu względem metabolizowania cholesterolu a jego działaniem patogennym [97]. Wciąż izolowane są ze środowiska mikroorganizmy, których właściwości katalityczne różnią się od wcześniej opisanych, a także selekcionowane są mutanty i rekombinanty pozwalające na zwiększenie wydajności syntezy pożądaných produktów. Liczne prace badawcze zmierzają w kierunku obniżenia kosztów produkcji tych związków lub w kierunku wykorzystania produktów odpadowych do ich syntezy.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.C. Leffingwell, *Leffingwell Rep.*, 2003, **3**, 1.
- [2] E. Brenna, C. Fuganti, S. Serra, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 2003, **14**, 1.
- [3] N.A. Donoghue, D.B. Norris, P.W. Trudgill, *Eur. J. Biochem.*, 1976, **63**, 175.
- [4] T. Kołek, A. Świzdor, A. Szpineter, *Wiad. Chem.*, 2004, **68**, 245.
- [5] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa, 2009.
- [6] E. Díaz, J.I. Jiménez, J. Nogales, *Curr. Opin. Biotech.*, 2013, **24**, 431.
- [7] W.J. van Berkel, N.M. Kamerbeek, M.W. Fraaije, *J. Biotechnol.*, 2006, **124**, 670.
- [8] J.G. Leahy, P.J. Batchelor, S.M. Morcomb, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2003, **27**, 449.
- [9] D.T. Gibson, R.E. Parales, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000, **11**, 236.
- [10] A.L. Juhasz, R. Naidu, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 2000, **45**, 57.
- [11] S. Husain, *Remediation Journal*, 2008, **18**, 131.
- [12] A.M. Spormann, F. Widdel, *Biodegradation*, 2000, **11**, 85.
- [13] C. Leutwein, J. Heider, *Microbiology*, 1999, **145**, 3265.
- [14] J. Heider, G. Fuchs, *Eur. J. Biochem.*, 1997, **243**, 577.
- [15] H. Priefert, J. Rabenhorst, A. Steinbüchel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **56**, 296.
- [16] S. Gocho, N. Tabogami, M. Inagaki, C. Kawabata, T. Komai, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1995, **59**, 1571.
- [17] J. Schrader, M.M. Etschmann, D. Sell, J.M. Hilmer, J. Rabenhorst, *Biotechnol. Lett.*, 2004, **26**, 463.
- [18] P. Chalier, J. Crouzet, *Food Chem.*, 1998, **63**, 447.
- [19] P.M. Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd Edition, J. Wiley & Sons, Chichester, 2009.
- [20] L. Sedlaczek, *CRC. Crit. Rev. Biotechnol.*, 1988, **7**, 187.
- [21] O. Marchut-Mikołajczyk, E. Kwapisz, T. Antczak, *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, 2013, **16**, 39.
- [22] H. Liu, S.-J. Wang, N.-Y. Zhou, *Biotechnol. Lett.*, 2005, **27**, 275.
- [23] A. Belhaj, N. Desnoues, C. Elmerich, *Res. Microbiol.*, 2002, **153**, 339.
- [24] T. Ishiguro, Y. Othake, S. Nakayama, Y. Inamori, T. Amagai, M. Soma, H. Matsusita, *Environ. Technol.*, 2000, **21**, 1309.
- [25] Y. Waché, M. Aguedo, A. Choquet, I.L. Gatfield, J.M. Nicaud, J.M. Belin, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**, 5700.

- [26] I.L. Gatfield, M. Güntert, H. Sommer, P. Werkhoff, *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, 1993, **15**, 165.
- [27] Y. Waché, M. Aguedo, J.M. Nicaud, J.M. Belin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **61**, 393.
- [28] M. Alchihab, J. Destain, M. Aguedo, L. Majad, H. Ghalfi, J.P. Wathelet, P. Thonart, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2009, **158**, 41.
- [29] Y. Waché, M. Aguedo, M.T. LeDall, J.M. Nicaud, J.M. Belin, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2002, **19-20**, 347.
- [30] H.-J. Rehm, G. Reed, *Biotechnology: Biotransformations II*, **8b**, Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
- [31] J.E. Kinsella, D.H. Hwang, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1976, **8**, 191.
- [32] E.-B. Goh, E.E.K. Baidoo, J.D. Keasling, H.R. Beller, *Appl. Environ. Microb.*, 2012, **78**, 70.
- [33] G. Yu, T.T.H. Nguyen, Y. Guo, I. Schauvinhold, M.E. Auldridge, N. Bhuiyan, I. Ben-Israel, Y. Iijima, E. Fridman, J. P. Noel, E. Pichersky, *Plant Physiol.*, 2010, **154**, 67.
- [34] D. Di Gioia, F. Luziatelli, A. Negroni, A.G. Ficca, F. Fava, M. Ruzzi, *J. Biotechnol.*, 2011, **156**, 309.
- [35] D. Havkin-Frenkel, F.C. Belanger, *Biotechnology in Flavor Production*, Wiley-Blackwell: Oxford, 2008.
- [36] A. Muheim, K. Lerch, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **51**, 456.
- [37] S. Achterholt, H. Priefert, A. Steinbuchel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, **54**, 799.
- [38] M. Brunati, F. Marinelli, C. Bertolini, R. Gandol, D. Daffonchio, F. Molinari, *Enzyme. Microb. Technol.*, 2004, **34**, 3.
- [39] H.B. Bode, R. Müller, *Plant Physiol.*, 2003, **132**, 1153.
- [40] S. Ghosh, A. Sachan, S.K. Sen, A. Mitra, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, **34**, 131.
- [41] A.C.P. Dias, P. Fernandes, J.M.S. Cabral, H.M. Pinheiro, *Bioresource Technol.*, 2002, **82**, 253.
- [42] H.-J. Rehm, G. Reed, *Biotechnology, A Comprehensive Treatise in 8 Volumes*, **6a**, Verlag-Chemie, Weinheim, 1984.
- [43] A. Szentirmai, *J. Ind. Microbiol.*, 1990, **6**, 101.
- [44] C.J. Sih, S.S. Lee, Y.Y. Tsong, K.C. Wang, F.M. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, **87**, 2765.
- [45] FR Patent 2,408,621 Pat., 1977.
- [46] Ger. Patent 2,647,895 Pat., 1975.
- [47] U.S. Patent 4,345,033 Pat., 1982.
- [48] R. van der Geize, G.I. Hessels, L. Dijkhuizen, *Microbiology*, 2002, **148**, 3285.
- [49] A. Schmid, J.S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature*, 2001, **409**, 258.
- [50] H.M. Alvarez, *Microbiology Monographs: Biology of Rhodococcus*, Springer-Verlag, Berlin, 2010.
- [51] C.J. Sih, H.H. Tai, Y.Y. Tsong, S.S. Lee, R.G. Coombe, *Biochemistry*, 1968, **7**, 808.
- [52] K.Z. Rosłonec, M.H. Wilbrink, J.K. Capyk, W.W. Mohn, M. Ostendorf, R. van der Geize, L. Dijkhuizen, L.D. Eltis, *Mol. Microbiol.*, 2009, **74**, 1031.
- [53] M.H. Wilbrink, *Microbial sterol side chain degradation in Actinobacteria*, Praca doktorska, 2011, <http://irs.ub.rug.nl/ppn/332744558>.
- [54] M.H. Wilbrink, M. Petrusma, L. Dijkhuizen, R. van der Geize, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, **77**, 4455.
- [55] M.M. Klimashina, I.V. Viktorovskii, N.P. Mikhailova, K.A. V'iunov, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 1988, **24**, 647.
- [56] L. Pollegioni, L. Piubelli, G. Molla, *FEBS J.*, 2009, **276**, 6857.
- [57] D.V. Dovbnaya, O.V. Egorova, M.V. Donova, *Steroids*, 2010, **75**, 653.
- [58] T.G. Lobastova, S.M. Khomutov, L.L. Vasiljeva, M.A. Lapitskaya, K.K. Pivnitsky, M.V. Donova, *Steroids*, 2009, **74**, 233.
- [59] E.S. Agoston, M.A. Hatcher, T.W. Kensler, G.H. Posner, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 2006, **6**, 53.
- [60] U.S. Patent 6, 600,058, Pat. 2003.
- [61] U.S. Patent 5,776,921, Pat. 1998.

- [62] E. El Kihel, *Steroids*, 2012, **77**, 10.
- [63] C.N. Ahlem, T.M. Page, D.L. Auci, M.R. Kennedy, K. Mangano, F. Nicoletti, Y. Ge, Y. Huang, S.K. White, S. Villegas, D. Conrad, A. Wang, C.L. Reading, J.M. Frincke, *Steroids*, 2011, **76**, 145.
- [64] J. Nowak, *Biotechnologia*, 2008, **1**, 97.
- [65] J. Zamorska, D. Papiak, *Zeszyty Naukowe Politechniki Rzeszowskiej. Budownictwo i Inżynieria Środowiska*, 2004, z. 38, nr **218**.
- [66] A. Belhaj, N. Desnoues, C. Elmerich, *Res. Microbiol.*, 2002, **153**, 339.
- [67] S.F. Nishino, J.C. Spain, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 2520.
- [68] J. Zeyer, P.C. Kearney, *J. Agric. Food Chem.*, 1984, **32**, 238.
- [69] R.A. Amer, M.M. Nasier, E.R. El-Helow, *Biotechnology*, 2008, **7**, 630.
- [70] B.E. Haigler, W.H. Wallace, J.C. Spain, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**, 3466.
- [71] E. Kaczorek, K. Sałek, U. Guzik, T. Jesionowski, Z. Cybulski, *Chemosphere*, 2013, **90**, 471.
- [72] H. Liu, S.-J. Wang, N.-Y. Zhou, *Biotechnol. Lett.*, 2005, **27**, 275.
- [73] J.J. Kukor, R.H. Olsen, *J. Bacteriol.*, 1991, **173**, 4587.
- [74] X.H. Shen, N.Y. Zhou, S.J. Liu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, **95**, 77.
- [75] W.J. Middelhoven, A. Coenen, B. Kraakman, M.D.S. Gelpke, Antonie Van Leeuwenhoek, *J. Microbiol.* 1992, **62**, 181.
- [76] C.E. Cerniglia, R.H. Dodge, D.T. Gibson, *Botanica Marina*, 1980, **23**, 121.
- [77] M. Krug, G. Straube, *J. Basic. Microbiol.*, 1986, **26**, 271.
- [78] A. Wiseman, L.F.J. Woods, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1979, **29**, 320.
- [79] A. Gaal, H.Y. Neujahr, *J. Bacteriol.*, 1979, **137**, 13.
- [80] K.H. Jones, P.W. Trudgill, D.J. Hopper, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**, 1125.
- [81] K.H. Jones, P.W. Trudgill, D.J. Hopper, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**, 1978.
- [82] K.H. Jones, P.W. Trudgill, D.J. Hopper, *Arch. Microbiol.*, 1995, **163**, 176.
- [83] T.M. Martins, O. Nunez, H. Gallart-Ayala, M. C. Leitao, M.T. Galceran, C.S. Pereira, *J. Hazard. Mater.*, 2014, **268**, 264.
- [84] T. Hadibarata, Z.C. Teh, M.M.F.A. Rubiyatno, Zubir, A.B. Khudhair, A.R.M. Yusoff, M.R. Salim, T. Hidayat, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2013, **36**, 1455.
- [85] T. Hadibarata, R.A. Kristanti, *Fungal Biol.*, 2014, **118**, 222.
- [86] X.-Q. Tao, G.-N. Lu, Z. Dang, C. Yang, X.-Y. Yi, *Process Biochem.*, 2007, **42**, 401.
- [87] M.A. Heitkamp, W. Franklin, C.E. Cerniglia, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, **54**, 2549.
- [88] E. Annweiler, H.H. Richnow, G. Antranikian, S. Hebenbrock, C. Garms, S. Franke, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 518.
- [89] M.T. Garcia, A. Ventosa, E. Mellado, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2005, **54**, 97.
- [90] M.T. Garcia, E. Mellado, J.C. Ostos, A. Ventosa, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, **54**, 1723.
- [91] H. Feitkenhauer, R. Muller, H. Markl, *Biodegradation*, 2003, **14**, 367.
- [92] K.N. Timmis, D.H. Pieper, *Trends Biotechnol.*, 1999, **17**, 201.
- [93] N. Christofi, I.B. Ivshina, *J. Appl. Microbiol.*, 2002, **93**, 915.
- [94] M. Alcade, M. Ferrer, F.J. Plou, A. Ballesteros, *Trends Biotechnol.* 2006, **24**, 281.
- [95] T.D. Sutherland, I. Horne, K.M. Weir, C.W. Coppin, M.R. Williams, M. Selleck, R.J. Russel, J.G. Oakeshott, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2004, **31**, 817.
- [96] D. Paul, G. Pandey, J. Pandey, R.K. Jain, *Trends Biotechnol.*, 2005, **23**, 135.
- [97] R. van der Geize, K. Yam, T. Heuser, M.H. Wilbrink, H. Hara, M.C. Anderton, E. Sim, L. Dijkhuizen, J.E. Davies, W.W. Mohn, L.D. Eltis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007, **104**, 1947.