

**BIOTRANSFORMACJE Z UDZIAŁEM
GENETYCZNIE MODYFIKOWANYCH DROŹDŹY
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**BIOTRANSFORMATIONS WITH GENETICALLY
MODIFIED BAKER'S YEAST
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**Ewa Bialecka-Florjańczyk, Wanda Zamojska*,
Agata Kapturowska**

*Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
ul. Nowoursynowska 166, 02-776 Warszawa
e-mail: ewa_bialecka_florjanczyk@sggw.pl
*Międzywydziałowe Studium Biotechnologii,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa*

Abstract

Wstęp

1. Reakcje redukcji związków karbonylowych
2. Reakcje utleniania
3. Reakcje hydrolizy, estryfikacji i transestryfikacji
4. Reakcje addycji do wiązań podwójnych
5. Kierunki doskonalenia katalitycznych właściwości drożdzy piekarskich

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



dr hab. Ewa Bialecka-Florjańczyk prof. SGGW ukończyła studia (1970) i stopień naukowy doktora (1976) uzyskała na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, a stopień naukowy doktora habilitowanego (2002) na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej. Obecnie jest kierownikiem Katedry Chemii Wydziału Nauk o Żywności SGGW. Prowadzi wykłady z chemii organicznej i chemii związków naturalnych dla studentów Międzywydziałowego Studium Biotechnologii SGGW. Współautorka podręcznika „Chemia organiczna” WNT 2007. Zainteresowania naukowe – chemia organiczna,

biotransformacje z udziałem drożdży, fizykochemia ciekłych kryształów.



mgr inż. Agata Kapturowska, absolwentka Międzywydziałowego Studium Biotechnologii SGGW (2009), jest doktorantką w Katedrze Chemii Wydziału Nauk o Żywności SGGW. Zainteresowania naukowe biotransformacje z udziałem drożdży, degradacje mikotoksyn przez bakterie fermentacji mlekowej.



inż. Wanda Zamojska, absolwentka Międzywydziałowego Studium Biotechnologii SGGW (2010), wykonuje pracę magisterską w Katedrze Chemii Wydziału Nauk o Żywności SGGW.

ABSTRACT

Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* is quite commonly applied as a whole-cell biocatalysts in biotransformations – reactions based on enzymatic transformations of chemical compounds. Yeast cells are easy in cultivation and use. They are usually used to catalyze such reactions as bioreduction or hydrolysis. The full sequencing of its genome accompanied with achievements of genetic engineering allowed to design new yeast strains characterized by high conversion yield and reaction selectivity. Genetically modified cells of *Saccharomyces cerevisiae* catalyze biotransformations, which lead to chiral building blocks important in pharmaceutical industry (especially those obtained by reduction of α - and β -oxoesters). „Designer yeast” is a new catalyst for Baeyer–Villiger oxidation. Recombinant yeast lipases have been discussed as useful means in biodiesel production because the microbiological method of producing of this kind of fuel has many advantages. There is a growing interest in application of modified yeast in biotransformation reactions. Modern directions to improve catalytic abilities of baker's yeast include: the use of surface display technology of enzymes, optimization or increase in availability of cofactor required for bioreduction reactions or gene knock-out, which eliminates the activity of enzymes with conflicting and unwanted stereoselectivities. Commonly used technique is also overexpression of the desired protein or expression of heterologous enzymes in yeast cells.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, biotransformations, whole-cell biocatalysts, genetic engineering

Słowa kluczowe: *Saccharomyces cerevisiae*, biotransformacje, biokatalizatory komórkowe, inżynieria genetyczna

WSTĘP

Przez biotransformacje rozumiemy reakcje przekształcania związków chemicznych przy katalitycznym udziale enzymów lub zawierających je komórek czy tkanek. Jest to dynamicznie rozwijająca się dziedzina chemii i biotechnologii ze względu na dużą selektywność reakcji enzymatycznych i ich proekologiczny charakter [1–4].

Wykorzystanie czystych preparatów enzymatycznych w syntezie organicznej jest ograniczone przez ich wysoki koszt. O wiele tańszym rozwiązaniem jest zastosowanie całych komórek mikroorganizmów produkujących odpowiednie enzymy. Szczególną uwagę zwraca się na zastosowanie drożdży piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*), które są organizmami bezpiecznymi (posiadającymi status GRAS – *generally recognized as safe*, nadany przez American Food and Drug Administration). Drożdże piekarskie są od stuleci wykorzystywane w tradycyjnych procesach biotechnologicznych stąd też ingerencja metodami inżynierii genetycznej w ich metabolizm, a co za tym idzie poszerzenie ich potencjalnego stosowania, cieszy się dużym zainteresowaniem. Dotyczy to nie tylko procesów fermentacyjnych przeprowadzanych w dużej skali lecz także wytwarzania przez komórki drożdży cennych produktów chemicznych takich jak kwasy organiczne, alkohole cukrowe, steroidy czy izoprenoidy [5].

Z punktu widzenia reakcji biotransformacji drożdże piekarskie stanowią tanie i ogólnie dostępne źródło różnorodnych enzymów oraz, co najważniejsze dla chemików, są łatwe w użyciu w laboratorium chemicznym nie dysponującym z reguły zapleczem mikrobiologicznym [6–8]. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* można stosować w postaci prasowanej, suchej, liofilizowanej czy immobilizowanej, a reakcje z ich udziałem zachodzą zarówno w wodzie jak i w rozpuszczalnikach organicznych. Drożdże produkują enzymy należące praktycznie do wszystkich klas [9] i w związku z tym są przydatne w wielu dziedzinach syntezy.

Zdarza się jednak, że mikroorganizmy katalizują równolegle kilka reakcji, co prowadzi do obniżenia wydajności każdej z nich. Z tego powodu podejmuje się próby ingerencji w przebieg reakcji za pomocą inhibicji konkretnych enzymów lub przez zastosowanie odpowiednich modyfikacji genetycznych drożdży *S. cerevisiae*. W dalszym ciągu pracy zostaną omówione te grupy reakcji, w których zastosowanie modyfikacji genetycznych pozwoliło na poprawienie przebiegu poszczególnych biotransformacji.

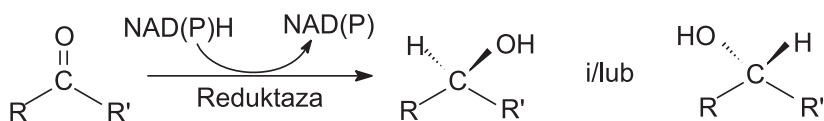
2. REAKCJE REDUKCJI ZWIĄZKÓW KARBONYLOWYCH

Drożdże piekarskie znalazły najszerze zastosowanie w stereoselektywnych reakcjach redukcji, przede wszystkim związków karbonylowych takich jak ketony, α - i β -diony, α - i β -oksoestry oraz aldehydy [10]. Powstające w ten sposób chiralne alkohole są ważnymi blokami budulcowymi w syntezie cennych półproduktów lub produktów farmaceutycznych takich jak karnityna, czy Taxol®.

Wykorzystanie drożdży piekarskich w przemianach oksydacyjnoredukcyjnych jest szczególnie interesujące ze względu na to, że komórki drożdży są w stanie syntetyzować nie tylko odpowiednie oksydoreduktazy, lecz także koenzymy niezbędne do przebiegu reakcji utleniania i redukcji [1], podczas gdy przy zastosowaniu wyizolowanych enzymów koenzymy muszą być dodatkowo dostarczane do środowiska reakcji.

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* wytwarzają enzymy, które należą do różnych rodzin, z czego największą liczbę stanowią: rodzina aldo-keto reduktaz (AKR) i rodzina dehydrogenaz/reduktaz (SDR) substratów krótkołańcuchowych. Reakcje z ich udziałem wymagają obecności kofaktorów nikotynoamidowych (zazwyczaj NADPH), produkowanych przez komórki drożdży [11].

Enancjoselektywność (lub diastereoselektywność) reakcji wiąże się z powstaniem nowego centrum asymetrii w cząsteczce alkoholu (Rys. 1).



Rysunek 1. Enancjoselektywność w reakcji redukcji ketonów [10]

Figure 1. Enantioselectivity in ketone reduction [10]

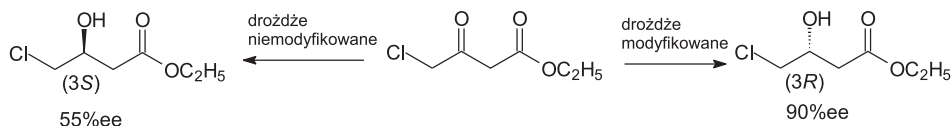
W systematycznie przeprowadzonych badaniach redukcji ketonów alifatycznych wykazano, że ketony metylowe są źródłem drugorzędowych alkoholi o konfiguracji (*S*) [6, 7]. Natomiast na stereochemiczny przebieg redukcji β -oksoestrów ma wpływ zarówno długość łańcucha węglowodorowego cząsteczki kwasu jak i alkoholu. Krótszy podstawnik (do czterech atomów węgla) powoduje redukcję do enancjomeru (*S*), a dłuższy, hydrofobowy, sprzyja powstawaniu enancjomeru (*R*) [10].

Drożdże piekarskie mogą produkować około dwudziestu reduktaz i z reguły każda z nich charakteryzuje się dużą stereoselektywnością. Jednak w praktyce w redukcji określonego substratu uczestniczy zazwyczaj większa ilość wzajemnie konkurencyjnych enzymów, stąd zazwyczaj otrzymuje się mieszaninę stereoisomerów [12].

Nakamura i współpracownicy wydzielili i scharakteryzowali cztery podstawowe oksydoreduktazy uczestniczące w reakcji redukcji estru acetyloooctowego, różniące się masą cząsteczkową, aktywnością i specyficznością działania. Dwie z nich katalizowały powstawanie enancjomeru (*R*), dwie pozostałe (*S*), przy czym każda z osobna dawała enancjoselektywność ponad 99%. Sumaryczne konkurencyjne działanie tych enzymów obniża stereoselektywność reakcji katalizowanej przez komórki drożdży [13].

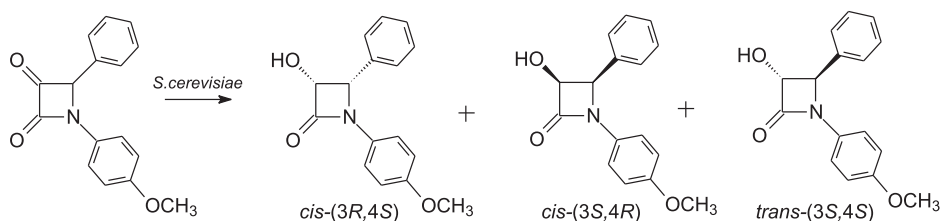
Stereoselektywność reakcji może być poprawiona między innymi przez dodatek inhibitorów konkretnej reduktazy (np. chlorek fenacylu, czy związku siarki [8]). Alternatywnym sposobem jest zastosowanie mutantów drożdży pozbawionych konkretnej reduktazy [10]. W ten sposób eliminowana jest aktywność jednego spośród

konkurencyjnych enzymów, co zwiększa stereoselektywność reakcji. Pierwszym przykładem wykorzystania takiej strategii (Rys. 2) była redukcja 4-chloroacetylooctanu etylu [14].



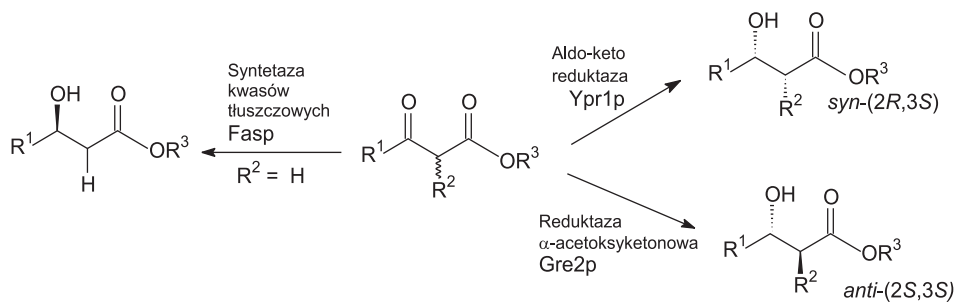
Rysunek 2. Redukcja 4-chloroacetylooctanu etylu przez drożdże *S. cerevisiae*
Figure 2. Bioreduction of ethyl 4-chloroacetylacetate with *S. cerevisiae* yeast

Powołując się na analogię strukturalną pomiędzy substratem i cząsteczkami β -oksooestrów uczestniczących w biosyntezie kwasów tłuszczowych, wykorzystano do redukcji szczep drożdży z punktową mutacją genu FAS-2 (syntazy kwasów tłuszczowych). Takie podejście z dobrym skutkiem zastosowano w chemoenzymatycznej syntezie taksolu, gdzie użycie szczepu FAS pozwoliło na wyeliminowanie produktu *trans*, który powstawał równoległe do dwóch pozostałych związków (Rys. 3) [15].



Rysunek 3. Redukcja α -keto- β -laktamu za pomocą drożdży piekarskich
Figure 3. Baker's yeast reduction of α -keto- β -lactam

Inną metodę stanowi poddanie nadekspresji określonej specyficznej reduktazy karbonylowej, przez co uzyskuje się szczepy drożdży wytwarzające w nadmiarze pożądany enzym. Rodriguez, Kayser i Stewart zmodyfikowali komórki drożdży, otrzymując szczepy różniące się stopniem ekspresji trzech enzymów odgrywających ważną rolę w reakcjach redukcji, a mianowicie: syntetazy kwasów tłuszczowych, reduktazy α -acetoksyketonowej i aldo-keto reduktazy [16]. Redukcja β -oksoestrów w obecności wyizolowanych enzymów prowadzi do różnych stereoisomerów (Rys. 4).



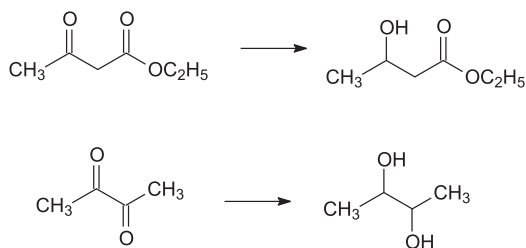
Rysunek 4. Redukcja β -oksoestrów w obecności enzymów (reduktaz i syntetazy)

Figure 4. β -Oxoesters reduction in the presence of the enzymes (reduktases and syntetazy)

Przeprowadzając reakcję w obecności drożdży modyfikowanych genetycznie, zaobserwowano zmiany w stereoselektywności reakcji. W przypadku redukcji katalizowanej szczepem z wyeliminowaną syntetazą kwasów tłuszczowych otrzymano izomery o konfiguracji (3*S*) z wysokim nadmiarem enancjomerycznym. Dobre wyniki uzyskano także dla reakcji z udziałem drożdży wytwarzających w nadmiarze aldo-ketoreduktazę (powstawał głównie produkt *syn*) i reduktazę α -acetoksyketonową (powstawał tylko produkt *anti*). Natomiast reakcje redukcji katalizowane przez szczepy pozbawione aldo-keto reduktazy oraz reduktazy α -acetoksyketonowej nie przyniosły widocznych zmian w stereoselektywności przemiany [16].

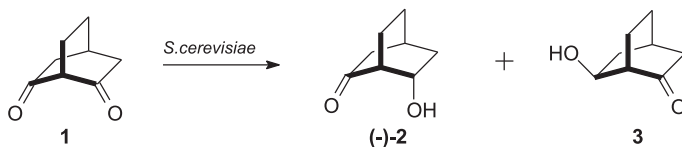
Z kolei Engelking i in. zastosowali szczep *Saccharomyces cerevisiae* z nadekspresją genu FAS oraz dehydrogenazy glukozowej z *Bacillus subtilis* do redukcji 4-chloroacetylooctanu etylu i benzoiloctanu etylu osiągając nadmiar enancjomeryczny odpowiednio 90% lub 97% [17].

W badaniach nad identyfikacją NADPH zależnej reduktazy, która jest zaangażowana w specyficzną redukcję grup karbonylowych, jako związki modelowe wybrano biacetyl i acetyloctan etylu (Rys. 5). Stwierdzono, że białka kodowane przez YBR149w, YMR226c (NADP⁺-zależne dehydrogenazy) i YDR368w (NADPH-zależna aldo-keto reduktaza) są (*S*) specyficznymi reduktazami biacetylu, natomiast acetyloctan redukują enzymy kodowane przez geny YOL151w (NADPH-zależna reduktaza) YHR104w (Gre3p), YGL157w (NADPH-zależne aldoreduktazy), YOR120w (NADP⁺-zależna dehydrogenaza) (Gcy1p) i YDR368w (NADPH-zależna aldo-keto reduktaza)(Ypr1p). Ponadto stwierdzono, że białko Gcy1p jest katalizatorem redukcji obu substratów [12].



Rysunek 5. Redukcja β -oksoestru i biacetylu
Figure 5. Reduction of β -oxoester and biacetyl

Przykładem skutecznej ingerencji inżynierii genetycznej w reakcję otrzymywania chiralnych ketoalkoholi, wykorzystywanych jako substraty do syntezy chiralnych katalizatorów [18], mogą być prace nad syntezą optycznie czystego (1*R*, 4*S*, 6*S*)-6-hydroksybicyklo [2.2.2]oktan-2-onu (związek nr 2, Rys. 6) [19]. O ile pierwsze prace z zastosowaniem drożdży piekarskich pozwalały na otrzymanie diastereoizomeru (–)-(2) o czystości optycznej 92–97% z wydajnością 92% [20], to nadekspresja genu reduktazy YDR368w w komórkach szczepu TMB4110 drożdży *Saccharomyces cerevisiae* umożliwiła syntezę tego związku z 99% nadmiarem enancjometrycznym przy zachowaniu zbliżonej proporcji diastereoizomeru *egzo* (3) [21].

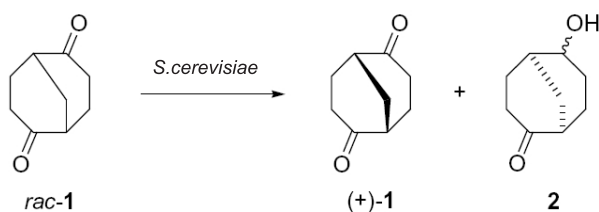


Rysunek 6. Redukcja bicyklo[2.2.2]oktano-2,6-dionu (1) [19, 21]
Figure 6. Reduction of bicyclo[2.2.2]octane-2,6-dione (1) [19, 21]

Odrębnym procesem, w który można ingerować metodami genetycznymi, jest regeneracja kofaktora nieodłącznie związanego z przebiegiem reakcji. Regeneracja ta odbywa się poprzez kataboliczny metabolizm kosubstratu, takiego jak glukoza, sacharoza bądź etanol. Glukoza może być wykorzystywana jako kosubstrat zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Wadą jej stosowania jest dość niska wydajność regeneracji NADPH, a dodatkowo w procesach jej przemiany powstaje wiele produktów ubocznych. Stosowanie etanolu jako kosubstratu w reakcjach biotransformacji jest korzystniejsze, jako że jedynym produktem ubocznym powstającym podczas jego katabolizmu jest dwutlenek węgla. Niestety regeneracja z jego udziałem zachodzi jedynie w warunkach anaerobowych, a sam etanol w wysokich stężeniach jest toksyczny dla komórki. Zadania stojące przed inżynierią genetyczną to między innymi: przekierowanie przepływu węgla w komórce w kierunku szlaków regeneracji NADPH, zwolnienie zużycia kosubstratu tak, aby zbalansować tempo redukcji oraz zwiększyć wydajność kosubstratu (stosunku ilości produktu powstałego do ilości zużytego kosubstratu). W tym celu skonstruowano mutanty drożdży piekarskich

o obniżonej aktywności enzymu izomerazy fosfoglukozowej (PGI) oraz szczep z delecją genu kodującego enzym dehydrogenazę alkoholową, powodując tym samym inhibicję niektórych funkcji komórki, w tym prawdopodobnie konsumpcji glukozy bez zmiany aktywności reduktaz [11].

Przekierowanie wykorzystania źródła węgla obecnego w pożywce do szlaku pentozofosforanowego poprzez częściowe wyciszenie genu izomerazy glukozy-6-fosforanowej (PGI) pozwoliło zwiększyć regenerację NADPH, a dodatkowa nadekspresja genu krótkołańcuchowej dehydrogenazy/reduktazy YMR226c w komórkach *S. cerevisiae* umożliwiła rozdział kinetyczny racemicznego bicyklo[3.3.1]nonano-2,6-dionu w reakcji stereospecyficznej redukcji jednego z izomerów wg schematu na Rysunku 7 [22].

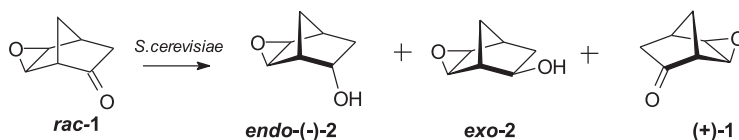


Rysunek 7. Kinetyczny rozdział racemicznego bicyklo[3.3.1]nonano-2,6-dionu z udziałem modyfikowanych genetycznie komórek drożdży piekarskich [22]

Figure 7. Kinetic resolution of bicyclo[3.3.1]nonane-2,6-dione by genetically modified baker's yeast [22]

Szkielet bicyklo[3,3,1]nonanu jest szeroko wykorzystywany w syntezie związków biologicznie czynnych (wykazujących właściwości cytostatyczne, antybakteryjne i hamujących aktywność acetylocholinesterazy) jak i w chiralnych kompleksach supramolekularnych [22].

Autorzy modyfikacji osiągnęli 100% wydajność enancjomeryczną dla izomeru (+)-1 przy 75% konwersji substratu [22]. Co więcej modyfikowane drożdże *S. cerevisiae* okazały się bardziej przydatne w reakcjach przeprowadzanych w sposób ciągły niż modyfikowany szczep *E. coli* [23]. Ten sam szczep modyfikowanych drożdży został skutecznie wykorzystany do kinetycznego rozdziału (\pm) 5,6-epoksybicyklo[2.2.1]heptan-2-onu (Rys. 8). W wyniku redukcji racematu otrzymano *endo*(-)-5,6-epoksybicyklo[2.2.1]heptan-2-ol – *endo*(-)-2 (80% nadmiaru diastereoizomerycznego i 74% enancjomerycznego) oraz (+)-5,6-epoksybicyklo[2.2.1]heptan-2-on – (+)-1 (95% ee) [23].



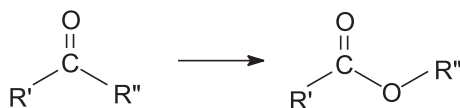
Rysunek 8. Rozdział kinetyczny 5,6-epoksy-bicyklo[2.2.1]heptan-2-onu [23]

Figure 8. Kinetic resolution of 5,6-epoxy-bicyclo[2.2.1]heptan-2-one [23]

Komplikacji wynikających z równoczesnego uczestnictwa kilku przeciwstawnie działających reduktaz można uniknąć dokonując ekspresji odpowiednich genów z *Saccharomyces cerevisiae* w organizmach, które nie mają własnych endogennych enzymów tej klasy. I tak ekspresja genów GCY1 i GRE3 z *S. cerevisiae* w komórkach *E. coli* pozwoliła na osiągnięcie nadmiaru diastereoizomerycznego powyżej 98% w przypadku α -podstawionych- β -oksoestrów [24, 25].

2. REAKCJE UTLENIANIA

Najbardziej interesującą reakcją utleniania, w której zastosowano drożdże piekarskie jest reakcja Baeyera-Villigera (Rys. 9).

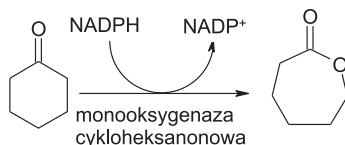


Rysunek 9. Reakcja Baeyera-Villigera

Figure 9. Baeyer-Villiger reaction

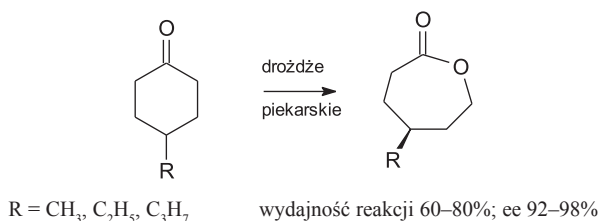
Reakcja Baeyera-Villigera, czyli utlenianie ketonów nadkwasami jest dogodną metodą syntezy estrów lub laktonów. Dzięki zastosowaniu w tej reakcji enzymów eliminuje się toksyczne bądź niestabilne nadkwasy, zyskując jednocześnie możliwość syntezy produktów chiralnych z wysoką enancjoselektywnością. Enzymy biorące udział w omawianych typach reakcji, należą do grupy flawoenzymów, w których koenzymami są nukleotydy flawinowe: FMN lub FAD i określane są mianem „monooksygenaz Baeyera-Villigera” (BVMOs). Przede wszystkim katalizują one nukleofilowe utlenianie ketonów, ale także elektrofilowe utlenianie różnych heteroatomów takich jak bor, siarka, selen, azot czy fosfor w związkach organicznych. W zależności od rodzaju kofaktora, niezbędnego do przebiegu reakcji, BVMO dzieli się na dwa typy: typ pierwszy – enzymy FAD- i NADPH- zależne oraz typ drugi- FMN i NADH- zależne. Monooksygenazy Baeyera-Villigera produkują między innymi bakterie (np. rodzaj *Acinetobacter*, *Pseudomonas*) i grzyby (np. rodzaj *Aspergillus*) [26].

NADPH-zależna monooksygenaza cykloheksanonowa (EC 1.14.13.22) katalizuje drugi etap w katabolicznym szlaku bakteryjnym (Rys. 10) umożliwiającym użycie cykloheksanonu jako jedyne źródła węgla i energii.



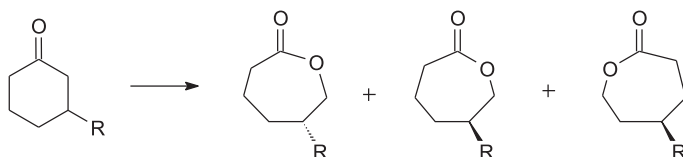
Rysunek 10. Reakcja Baeyera-Villigera z udziałem monooksygenazy cykloheksanonowej
 Figure 10. Baeyer-Villiger reaction with cyclohexanone monooxygenase

Gen kodujący wspomniany enzym, pochodzący z bakterii *Acinetobacter* sp. NCIB 9871, poddano ekspresji w komórkach drożdży piekarskich. Otrzymany metodami inżynierii genetycznej szczep utleniał enancjoselektywnie prochiralne 4-alkilcykloheksanony (Rys. 11) z dobrą wydajnością (także enancjomeryczną) do odpowiednich kaprolaktanów [11].



Rysunek 11. Utlenianie 4-alkilcykloheksanonu z udziałem komórek drożdży [11]
 Figure 11. 4-alkilcyclohexanone oxydation with baker's yeast [11]

Ten sam szczep zastosowano także w reakcji utleniania 2 i 3-podstawionych cykloheksanonów i cyklopentanonów otrzymując różne stereoizomery w zależności od rozmiaru pierścienia i rodzaju grupy alkilowej (Rys. 12). W wyniku tej modyfikacji została także zminimalizowana uboczna reakcja redukcji grupy karbonylowej [27–29].



Rysunek 12. Reakcja Baeyera-Villigera 3-podstawionych cykloheksanonów [27–29]
 Figure 12. Baeyer-Villiger reaction of 3-substituted cyclohexanones [27–29]

Powstałe laktany są atrakcyjnymi związkami dla przemysłu farmaceutycznego. Szczególną uwagę zwrócono na bi- i policykliczne gamma-laktany ze względu na ich działanie przeciwnowotworowe, możliwość aktywacji sercowej Ca^{2+} -ATP-azy oraz zastosowanie jako półproduktów w syntezie silnych leków przeciw jaskrze i nadciśnieniu [26].

3. REAKCJE HYDROLIZY, ESTRYFIKACJI I TRANSESTRYFIKACJI

Około dwóch trzecich opisanych w literaturze biotransformacji można skategoryzować jako hydrolityczne transformacje wiązań estrowych i amidowych z udziałem proteaz, esteraz bądź lipaz [4]. Zarówno esterazy (hydrolazy estrów kwasów karboksylowych) jak i lipazy (hydrolazy triacylogliceroli) zaliczane są do ogólnej grupy karboksyloesteraz, różniąc się preferencjami w stosunku do długości łańcucha substratu i kinetyką reakcji. Esterazy hydrolizują częściowo rozpuszczalne w wodzie cząsteczki estrów krótkołańcuchowych kwasów karboksylowych, podczas gdy lipazy hydrolizują długołańcuchowe triacyloglicerole nierozpuszczalne w wodzie. Centrum katalityczne lipaz zawiera triadę złożoną z trzech aminokwasów: seryny, histydyny i kwasu asparaginowego bądź glutaminowego. Ponadto większość lipaz posiada elastyczne wieczko chroniące centrum aktywne enzymu w wodzie w czasie spoczynku. Pokrywa zmienia konformację na wodno-lipidowej powierzchni międzyfazowej, aktywując lipazę [30].

Drożdże piekarskie produkują wprawdzie obydwa rodzaje enzymów hydrolitycznych [31], ale w praktyce chemicznej wykorzystywane dotychczas były głównie esterazy np. do hydrolitycznego rozdzielania enancjomerycznych estrów (najczęściej octanów), podczas którego selektywnej reakcji ulega tylko jeden z enancjomerów [6].

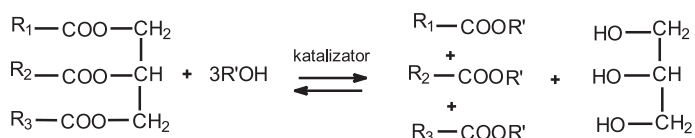
W porównaniu z esterazami zastosowanie lipaz w syntezie organicznej jest o wiele szersze, przede wszystkim ze względu na ich powinowactwo do substratów nierozpuszczalnych w wodzie; są one także aktywne w rozpuszczalnikach organicznych [32]. Lipazy są wykorzystywane zarówno w syntezach (także stereospecyficznych) estrów, w modyfikacjach acylogliceroli, a ostatnio w syntezie paliwa typu biodiesel. Konsekwencją tak szerokich zastosowań są próby ekspresji genów lipaz pochodzenia mikrobiologicznego w komórkach innych organizmów, w tym drożdży piekarskich.

Spośród wielu lipaz pochodzenia mikrobiologicznego lipaza B z *Candida antarctica* (Novozyme 435, CALB) znajduje duże zastosowanie w reakcjach chemicznych jak i w procesach restrukturyzacji triacylogliceroli [33]. Ekspresji tej lipazy dokonano w *Saccharomyces cerevisiae* MT8-1, po czym drożdże w postaci liofilizowanej użyto w reakcji syntezy adipinianu butylu. Autorzy zwracają uwagę na dość dużą stabilność termiczną preparatu, ponieważ synteza była przeprowadzona w temperaturze 60°C [34]. Podobny biokatalizator zastosowano także do syntezy związku zapachowego – kapronianu etylu estryfikując kwasu kapronowy etanolem w heptanie, z wydajnością 98%; był on również aktywny w reakcji hydrolizy maślanu *p*-nitrofenylu [35].

Ostatnio szczególne zainteresowanie budzi lipaza ROL produkowana przez pleśń z gatunku *Rhizopus oryzae*, która jest lipazą 1,3-specyficzną, wykorzystywaną w restrukturyzacji lipidów. Modyfikowane komórki *Saccharomyces cerevisiae* produkujące lipazę z *Rhizopus oryzae* zastosowano do rozdzielania enancjomerów 1-fenyletanolu: (*RS*)-1-fenyletanol poddano estryfikacji octanem winylu w rozpusz-

czalniku węglowodorowym (mieszanka heksan-oktan lub cykloheksan); estryfikacji ulegał enancjomer R (wydajność około 97%), a osiągnięta najwyższa wydajność enancjomeryczna wynosiła 94% [36].

Podejmowane są także próby wykorzystania lipazy ROL w przemyśle oleochemicznym w procesie produkcji biodiesla (Rys. 13). Nazwa biodiesel odnosi się do estrów metylowych i etylowych syntetyzowanych z naturalnych triglicerydów i metanolu bądź etanolu na drodze alkoholizy chemicznej lub enzymatycznej:



Rysunek 13. Reakcja syntezy paliwa typu biodiesel

Figure 13. Biodiesel synthesis

Proces mikrobiologiczny jest alternatywą dla transestryfikacji alkalicznej. Podobnie jak lipaza B z *Candida antarctica*, enzym produkowany przez *Rhizopus oryzae* może być wykorzystywany do produkcji i polepszenia jakości paliwa typu biodiesel, obniżając lepkość oraz poprawiając jego właściwości fizyczne. Efektywnej ekspresji lipazy ROL dokonano także w komórkach drożdży piekarskich [37]. Dzięki zastosowaniu komórek drożdży jako katalizatorów redukuje się liczbę operacji w procesie produkcji, a usuwanie produktu ubocznego – glicerolu jest stosunkowo łatwe [38–40]. Komórki *S. cerevisiae* szczepu MT8-1 produkowały wewnątrzkomórkowo lipazę ROL w podwyższonej ilości, a ich zastosowanie po uprzedniej permeabilizacji pozwoliło na syntezę estrów metylowych z 71% wydajnością po 165 h [42].

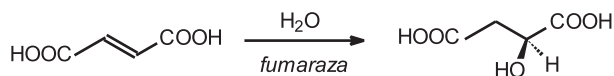
Aktywność lipaz w reakcjach biotransformacji zależy w decydującym stopniu od ich lokalizacji: mogą się one znajdować w cytozolu komórkowym oraz w ścianie komórkowej lub, podczas wzrostu komórki drożdży, mogą być także wydzielane na zewnątrz komórki [43, 44]. Stosując metody inżynierii genetycznej można sterować lokalizacją enzymu ważnego z punktu widzenia przeprowadzanej przez niego biotransformacji. Washida i in. [41] dokonali ekspozycji aktywnej lipazy z *Rhizopus oryzae* na powierzchni ściany komórkowej *Saccharomyces cerevisiae*. Takie białko było kowalencyjnie połączone ze ścianą komórkową poprzez glikozylofosfatydyloinozytolową lipidową kotwicę błonową (GPI), co umożliwiło swobodne kontaktowanie się enzymu z substratami znajdującymi się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Zaobserwowano, że lipaza prezentowana na powierzchni ściany komórkowej wykazywała wyższą aktywność od lipazy wydzielanej zewnątrzkomórkowo. Dodatkowo zastosowano peptydy linkerowe (ang. *spacers*) składające się z powtórzonych sekwencji Gly/Ser, których obecność zwiększała odległość pomiędzy centrum aktywnym lipazy a powierzchnią komórki. Po wprowadzeniu linkera otrzymano szczególnie korzystne właściwości. Zmianom uległ metabolizm drożdży – o ile niemodyfikowane

komórki *Saccharomyces cerevisiae* nie zużywały trioleiny obecnej w podłożu, o tyle modyfikowany szczep mógł na niej wzrastać, wykorzystując ten substrat jako jedyne źródło węgla [30, 38, 41]. Łatwy dostęp do substratów podczas alkoholizy eliminuje konieczność dezintegracji komórki w celu uwolnienia enzymów [39] a zatem zastosowanie tego typu strategii eliminuje proces oczyszczania enzymów przyczyniając się do obniżenia kosztów biokatalizy.

Podejmowane są również podobne próby zwiększania efektywności produkcji lipaz przez drożdże przy wykorzystaniu innych drobnoustrojów. Na przykład dokonano ekspresji lipazy CaLIP4 (z *Candida albicans*) aktywnej w stosunku do triglicerydów [45], a także lipazy A z *Bacillus subtilis* na powierzchni komórek drożdży piekarskich; oba enzymy wykazywały dużą aktywność – 400 U/ml płynu pochodowlanego [46, 47]. Natomiast w hodowli modyfikowanego szczepu *S. cerevisiae* 2805 zaobserwowano siedmiokrotny wzrost sekrecji zewnątrzkomórkowej lipazy L1 z *Bacillus stearothermophilus* o właściwościach termoalkalicznych i posiadającej aktywność hydrolityczną w stosunku do substratów o średniej długości łańcucha węglowego [31, 45].

4. REAKCJE ADDYCJI DO WIĄZAŃ PODWÓJNYCH

Biotransformacje z udziałem genetycznie modyfikowanych drożdży piekarskich mogą znaleźć praktyczne zastosowania w syntezie kwasu L-jabłkowego. Kwas jabłkowy, będący produktem metabolizmu cukrów w komórce, jest wykorzystywany w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i spożywczym jako regulator kwasowości (E 296). Enzymatyczna metoda produkcji kwasu L-jabłkowego polega na reakcji addycji wody do kwasu fumarowego katalizowanej przez fumarazę (EC 4.2.1.2). Do mikroorganizmów cechujących się wysoką aktywnością tego enzymu należą *Brevibacterium ammoniagenses* oraz *Brevibacterium flavum* [48].



Rysunek 14. Biotransformacja kwasu fumarowego w kwas L-jabłkowy
Figure 14. Biotransformation of fumaric acid to L-malic acid

Próby wykorzystania w tej reakcji szczepów drożdży piekarskich podejmowane były już od lat 90. ubiegłego stulecia, a prowadzona z udziałem tego biokatalizatora reakcja charakteryzowała się minimalną zawartością produktów ubocznych. W celu poprawy wydajności biotransformacji Peleg i in. zastosowali do produkcji kwasu L-jabłkowego modyfikowany szczep drożdży *S. cerevisiae*, który posiadał wiele kopii genu fumarazy, a tym samym cechował się nadprodukcją tego enzymu [49]. W syntezie kwasu L-jabłkowego zastosowano także szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* DMM1-15A, w którym dokonano nadekspresji genu fumarazy FUM1.

Reakcję przeprowadzono w bioreaktorze, wykorzystując drożdże unieruchomione w matrycy alginianowo-krzemianowej. Zaletą procesu w porównaniu z dotychczas stosowanymi metodami była wyższa wydajność i czystość otrzymanego produktu (brak zanieczyszczeń innymi kwasami, a zwłaszcza kwasem bursztynowym), którą osiągnięto przy 100 % konwersji substratu [50].

6. KIERUNKI DOSKONALENIA KATALITYCZNYCH WŁAŚCIWOŚCI DROŻDŻY PIEKARSKICH

Przed erą inżynierii genetycznej naukowcy próbowali doskonalić szczepy drobnoustrojów metodą sterowania warunkami hodowli (temperaturą, źródłem węgla, szokiem osmotycznym bądź oksydacyjnym, czy też zastosowaniem inhibitorów) w celu wzrostu bądź osłabienia aktywności określonego enzymu. Współcześnie pożądane cechy reakcji przeprowadzanych przez mikroorganizmy uzyskuje się dzięki modyfikacjom ich genomu, polegającym najczęściej na metodzie mutagenizacji typu „knockout”, nadekspresji określonych genów, ekspresji heterologicznych białek enzymatycznych czy fuzji translacyjnej białek enzymatycznych z białkami ściany komórkowej w celu ich ekspozycji na powierzchni komórki.

Stosowanie modyfikowanych szczepów mikroorganizmów nie może eliminować etapu optymalizacji warunków ich hodowli. W celu uzyskania maksymalnej wydajności reakcji katalizowanej przez komórki drożdży produkujące enzymy rekombinowane lub też cechujące się zwiększoną sekrecją wybranych białek enzymatycznych, niezbędny jest obok prawidłowo przeprowadzonej modyfikacji genetycznej, także właściwy dobór składu pożywki hodowlanej, w tym źródła węgla, azotu, substancji indukujących czy soli mineralnych [36].

Na przykładzie doświadczeń związanych z nokautowaniem genów określonych reduktaz widać, że często niemożliwe jest całkowite wyeliminowanie aktywności enzymów o niepożądanych lub konkurujących selektywnościach. Można jednak zastosować metody alternatywne, polegające na klonowaniu genów reduktaz *Saccharomyces cerevisiae* i ich ekspresji w komórkach innego gospodarza np. bakterii *Escherichia coli* [10].

Pomimo postępującego rozwoju różnych metod prezentacji białek na powierzchni komórki, wiele problemów z nimi związanych nie zostało jeszcze do końca wyjaśnionych. Ważną kwestię stanowi redukcja aktywności enzymu na powierzchni komórki w porównaniu z jego wolną formą. Przyczyną tego zjawiska mogą być: przeszkody natury przestrzennej, niepełna ekspozycja białka, nieprawidłowe sfałdowanie białka lub brak jego sfałdowania, a także odpychanie substratu na skutek hydrofobowego oddziaływania ze ścianą komórkową. Strategią mającą zapobiec wyżej wymienionym wadom jest fuzja białka mającego ulec ekspresji z peptydami ściany komórkowej. Dodatkowe zastosowanie łącznika peptydowego określonej długości pomaga w właściwym sfałdowaniu obu białek oraz zapobiega ich funkcjonalnej interferencji między sobą oraz z elementami ściany komórkowej. Łącznik

może odgrywać także pozytywną rolę w modyfikacji właściwości katalitycznych rekombinowanych enzymów. Wyzwaniem stanowi ekspozycja białka składającego się z więcej niż jednej podjednostki. Należy jednak pamiętać, że prezentacja wielu białek na powierzchni ściany komórkowej może być dużym obciążeniem dla komórki, powodując osłabienie jej wzrostu, a nawet śmierć [51].

Wykorzystanie drożdży piekarskich jako katalizatorów w biotransformacjach stanowi przydatne rozwiązanie ze względu na brak konieczności wprowadzania kosztownych i pracochłonnych etapów oczyszczania enzymów. Zastosowanie całych komórek pozwala na samorzutny proces regeneracji kofaktora oraz sterowanie stopniem jego regeneracji. Strategie zwiększania wydajności i selektywności reakcji katalizowanych przez drożdże piekarskie wykorzystujące techniki rekombinowanego DNA, stanowią alternatywę dla strategii opierających się na zmianach warunków hodowli, czy stosowania selektywnej inaktywacji bądź inhibicji enzymów. Skonstruowanie i selekcja wybranego szczepu wymagają czasu i nakładów finansowych, jednak takie podejście daje w ostatecznym efekcie wymierne rezultaty i cechuje się łatwością zastosowania w praktyce [16].

Przyszłość wydajnych biotransformacji, a w szczególności bioredukcji z udziałem komórek drożdży wymaga połączenia różnych podejść – zastosowania zarówno inżynierii genetycznej obejmującej modyfikację szczepów, jak i optymalizacji dostępności kofaktora, a także optymalizacji warunków hodowlanych i składników podłoża [11]. Zagadnienia, nad którym skupią się naukowcy obejmować będą między innymi: usprawnienie transportu substratów do wnętrza komórki oraz procesu uwalniania z niej produktów, poprawienie czasu reakcji oraz zastosowanie immobilizacji w celu wielokrotnego użycia drożdży. Uwaga poświęcona zostanie enzymom, których ekstrakcja z komórek drożdży i otrzymywanie jest trudne i drogie, a znacznie łatwiej jest je otrzymać na powierzchni komórki. Ponadto odrębny problem stanowić będzie powiększenie skali procesu ze skali laboratoryjnej z użyciem laboratoryjnych szczepów, na warunki przemysłowe z użyciem szczepów przemysłowych [52].

Prowadzone badania nad ekspresją heterologicznych niespecyficznym lipaz z *Candida antarctica*, *Pseudomonas cepacia* bądź lipaz tolerancyjnych w stosunku do metanolu, mogą prowadzić do rozwoju rekombinowanych biokatalizatorów pozwalających na jeszcze wydajniejszą transestryfikację olejów roślinnych [38].

Rozwojem badań nad ekspresją białek (nie tylko enzymów) w różnych drożdżach, w tym *Saccharomyces cerevisiae* zainteresowany jest także przemysł farmaceutyczny, szczególnie w aspekcie otrzymywania preparatów takich jak albumina surowicy ludzkiej, oksydaza glukozowa, insulina, interferon beta, szczepionka przeciwko żółtacze [53, 54].

PODSUMOWANIE

Biotransformacje z udziałem drożdży piekarskich stosowane są coraz szerzej na skalę przemysłową, z uwagi na ich konkurencyjność pod względem ekonomicznym w stosunku do metod chemicznych. Ponadto spełniają one wszelkie wymagania ekologiczne. Procesy z ich zastosowaniem stanowią klasyczny przykład tzw. „zielonej chemii”, ponieważ wykorzystuje się w nich surowce odnawialne (drożdże oraz glukozę lub sacharozę), a reakcje najczęściej zachodzą w środowisku wodnym i w temperaturze pokojowej oraz nie przyczyniają się do produkcji toksycznych odpadów. Enzymy komórkowe nie zawsze jednak wykazują satysfakcjonującą aktywność, stabilność, a co najważniejsze selektywność reakcji. Obecny rozwój biotechnologii, a w szczególności inżynierii genetycznej, stwarza nowe perspektywy dla rozszerzenia zakresu zastosowań i poprawienia wydajności enancjomerycznych reakcji katalizowanych przez drożdże z gatunku *Saccharomyces cerevisiae*. Za pomocą technologii rekombinowanego DNA ulepsza się cechy komórek drożdży, bądź konstruuje szczepy o nowych cechach, przydatnych z punktu widzenia przeprowadzanych przez nie biotransformacji. Przytoczone w pracy przykłady, dotyczące modyfikacji ekspresji lipaz i oksydoreduktaz, ilustrują możliwości projektowania szczepów drożdży piekarskich na drodze inżynierii szlaków metabolicznych i inżynierii białek.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry*, Springer Verlag 2000.
- [2] A. Niemiec, W. Szeja, *Biotechnologia*, 2001, **3**, 104.
- [3] S.M. Roberts, I. Trans, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2000, 611.
- [4] W.A. Loughlin, *Biosource Technol.*, 2000, **74**, 49.
- [5] E. Nevoigt, *Microb. Mol. Biol. Rev.*, 2008, 379.
- [6] R. Csuk, B.I. Glanzer, *Chem. Rev.*, 1991, 49.
- [7] S. Servi, *Synthesis*, 1990, 1.
- [8] E. Białecka-Florjańczyk, E. Majewska, *Biotechnologia*, 2006, **3**, 113.
- [9] G.M. Walker, *Yeast physiology and biotechnology*, John Wiley & Sons Ltd., West Sussex 1998.
- [10] J.D. Stewart, *Curr. Op. Biotech.*, 2000, **11**, 363.
- [11] T. Johanson, M. Katz, M.F. Gorwa-Grauslund, *FEMS Yeast Res.*, 2005, **5**, 513.
- [12] M. Katz, B. Hahn-Hagerdal, M.F. Gorwa-Grauslund, *Enz. Microb. Technol.*, 2003, **33**, 163.
- [13] K. Nakamura, Y. Kawai, N. Nakajima, A. Ohno, *J. Org. Chem.*, 1999, **56**, 4778–4783.
- [14] W.R. Shieh, A.S. Gopalin, C.J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 2993.
- [15] M.M. Kayser, M.D. Mihovilovich, J. Kearns, A. Feicht, J.D. Stewart, *J. Org. Chem.*, 1999a, **64**, 6603.
- [16] S. Rodriguez, M.M. Kayser, J.D. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 1547.
- [17] H. Engelking, R. Pfaller, G. Wich, D. Weuster-Botz, *Enz. Microb. Technol.*, 2006, **38**, 536.
- [18] I. Sarvary, F. Almqvist, T. Frejd, *Chem. Eur. J.*, 2001, **10**, 2158–2166.
- [19] M. Katz, I. Sarvary, T. Frejd, B. Hahn-Hagerdal, B. Gorwa-Grauslund, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, **59**, 641.
- [20] F. Almqvist, L. Eklund, T. Frejd, *Synth Commun.*, 1993, **6**, 957–960.

- [21] Y. Johanson, M. Carlquist, C. Olsson, A. Rudolf, T. Frejd, M.F. Gorwa-Grauslund, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008, **77**, 1111.
- [22] M. Carlquist, C. Wallentin, K. Warnmark, M.F. Gorwa-Grauslund, *Tetrahedron Asymm.*, 2008, **19**, 2293.
- [23] M. Carlquist, C. Olsson, B. Bergdahl, E.W.J. van Niel, M.F. Gorwa-Grauslund, T. Frejd, *J. Mol. Catal. B*, 2009, **58**, 98.
- [24] N.S. Parachin, M. Carlquist, M.F. Gorwa-Grauslund, *Appl. Microb. Biotechnol.*, 2009, **84**, 487–497.
- [25] S. Rodriguez, K.T. Schroeder, M.M. Kayser, J.D. Stewart, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 2586–2587.
- [26] V. Alphand, G. Carrea, R. Wohlgemuth, R. Furstoss, J.M. Woodley, *Trends Biotechnol.*, 2003, **21**, 318.
- [27] M.M. Kayser, G. Chen, J.D. Stewart, *Syntet.*, 1999, **1**, 153.
- [28] J.D. Stewart, K. Reed, M.M. Kayser, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1996**, 755.
- [29] J.D. Stewart, K.W. Reed, C.A. Martinez, J. Zhu, G. Chen, M.M. Kayser, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 3541.
- [30] M. Ueda, S. Takahashi, M. Washida, S. Shiraga, A. Tanaka, *J. Mol. Catal. B*, 2002, **17**, 113.
- [31] E. Białecka-Florjańczyk, J. Krzyczkowska, I. Stolarzewicz, *Biocatalysis and Biotransformation*, 2010, **28**, 288.
- [32] J.O. Ahn, E.S. Choi, H.W. Lee, S.H. Hwang, C.S. Kim, H.W. Jang, S.J. Haam, J.K. Jung, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, **64**, 833.
- [33] M. Adamczak, W. Bednarski, *Biotechnologia*, 1994, **4**, 140.
- [34] T. Tanino, T. Ohno, T. Aoki, H. Fukuda, A. Kondo, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, **75**, 1319.
- [35] S.Y. Han, Z.Y. Pan, D.F. Huang, M. Ueda, X.N. Wang, Y. Lin, *J. Mol. Catal. B*, 2009, **59**, 168.
- [36] T. Matsumoto, M. Ito, H. Fukuda, A. Kondo, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, **64**, 481.
- [37] T. Matsumoto, S. Takahashi, M. Ueda, A. Tanaka, H. Fukuda, A. Kondo, *J. Mol. Catal. B*, 2002, **17**, 143.
- [38] H. Fukuda, S. Hama, S. Tamalampudi, H. Noda, *Trends Biotechnol.*, 2008, **26**, 668.
- [39] S. Takahashi, M. Ueda, H. Atomi, H.D. Beer, U.T. Bornscheuer, R.D. Schmid, A. Tanaka, *J. Ferment. Bioeng.*, 1998, **86**, 164.
- [40] S. Takahashi, M. Ueda, A. Tanaka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **52**, 534.
- [41] M. Washida, S. Takahashi, M. Ueda, A. Tanaka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **56**, 681.
- [42] T. Matsumoto, S. Takahashi, M. Kaieda, H. Fukuda, M. Ueda, A. Tanaka, A. Kondo, *Appl. Microb., Biotechnol.* 2001, **57**, 5175.
- [43] F.J. Deive, E. Carvalho, L. Pastrana, M.L. Rua, M.A. Longo, M.A. Sanroman, *Bioresource Technol.*, 2009, **100**, 3630.
- [44] J. Krzyczkowska, I. Stolarzewicz, D. Nowak, E. Białecka-Florjańczyk, 2010, artykuł w druku.
- [45] F. Breinig, M.J. Schmitt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, **58**, 637.
- [46] M. Mormeneo, I. Andres, C. Bofill, P. Diaz, J. Zuezo, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **80**, 437.
- [47] J.L. Roustan, A. Rascon Chu, G. Moulin, F. Bigey, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, **68**, 203.
- [48] A.V. Presečki, B. Zelić, D. Vasić-Rački, *Enzyme Microb. Techn.*, 2007, **41**, 605.
- [49] Y. Peleg, J.S. Rokem, I. Goldberg, O. Pines, *Appl. Environ. Microb.*, 1990, **56**, 2777.
- [50] E. Bressler, O. Pines, I. Goldberg, S. Braun, *Biotechnol. Prog.* 2002, **18**, 445.
- [51] S.Y. Lee, J.H. Choi, Z. Xu, *Trends Biotechnol.*, 2003, **21**, 45.
- [52] S. Dequin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **56**, 577.
- [53] R.F. Schmidt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, **65**, 363–372.
- [54] R. Wohlgemuth, *Chimia*, 2005, **59**, 735.