

UNIVERZITA KARLOVA v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Jan Andrejch

Asymetrická biotransformace 2-tetralonů na příslušné alkoholy

Asymmetric biotransformation of certain tetralones to tetralols

Klíčová slova: biotransformace, asymetrická redukce, 2-tetralony, 2-tetraloly,
Saccharomyces uvarum, *Torulopsis sphaerica*, *Candida tropicalis*

Key words: biotransformation, asymmetric reduction, 2-tetralones, 2-tetralols,
Saccharomyces uvarum, *Torulopsis sphaerica*, *Candida tropicalis*

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jitka Poljaková, Ph.D.

Odborný konzultant: Ing. Eva Kyslíková, CSc.

Praha, 2011

Tímto bych chtěl poděkovat ing. E. Kyslíkové, CSc. a Mgr. P. Babiakovi, PhD. za poskytnutí odborné konzultace a RNDr. P. Kyslíkovi, CSc. za umožnění provádění této práce v Laboratoři enzymových technologií MBÚ AVČR, Praha.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Místo a datum:

Podpis:

Obsah:

Seznam zkratk:	- 4 -
1. Abstrakt.....	- 5 -
2. Teoretický úvod	- 7 -
2.1 Biokatalýza.....	- 7 -
2.1.1 Historie a průmyslové využití	- 7 -
2.2 Enzymové katalyzátory	- 8 -
2.3 Celobuněčné katalyzátory	- 8 -
2.4 Enzymy	- 9 -
2.5 Rozdělení enzymů	- 10 -
2.6 Alkoholdehydrogenasy	- 13 -
2.6.1 Kofaktory a koenzymy	- 15 -
2.7 Enantiosektivita	- 18 -
2.8 Produkční mikroorganismy	- 19 -
2.8.1 Nároky na produkční mikroorganismy a jejich zdroje.....	- 19 -
2.8.2 Kultivace a živná media	- 20 -
2.9 β -tetralony a jejich deriváty	- 21 -
2.9.1 Farmakologické vlastnosti.....	- 21 -
2.9.2 1-tetralony	- 23 -
2.9.3 Syntéza 2-tetralonů.....	- 24 -
2.9.4 Konverze 2-tetralonů na 2-tetraloly	- 25 -
Cíl práce	- 27 -
3. Materiál a metody	- 28 -
3.1 Chemikálie	- 28 -
3.2 Substráty a produkty biotransformace	- 29 -
3.3 Biologický materiál.....	- 30 -
3.4 Použité přístroje	- 31 -
3.5 Živná media.....	- 32 -
3.6 Obecné metody.....	- 32 -

3.6.1	Příprava kultivačních medií.....	- 33 -
3.6.2	Extrakce.....	- 33 -
3.6.3	Chromatografické metody	- 33 -
3.6.4	Příprava standardních vzorků.....	- 34 -
3.6.5	Příprava biomasy	- 35 -
3.7	Provedení jednotlivých experimentů.....	- 35 -
3.7.1	Zavedení detekčních metod pro 2-tetralony a 2-tetraloly	- 35 -
3.7.2	Ověření biotransformační aktivity.....	- 36 -
3.7.3	Závislost míry konverze a enantioselektivity na formě substrátu	- 36 -
3.7.4	Vliv kultivační teploty na enantioselektivitu a míru konverze.....	- 36 -
3.7.5	Porovnání míry biotransformace v celých a rozbitých buňkách	- 37 -
3.7.6	Vliv zdroje uhlíku a energie na růst a expresi žádaných enzymů ...	- 37 -
3.7.7	Růstové křivky vybraných kmenů.....	- 37 -
3.7.8	Závislost enantioselektivity a konverze na růstové fázi.....	- 38 -
4.	Výsledky a diskuze	- 39 -
4.1	Zavedení detekčních metod pro 2-tetralony a 2-tetraloly	- 39 -
4.2	Ověření biotransformační aktivity	- 42 -
4.3	Závislost míry konverze a enantioselektivity na formě substrátu	- 43 -
4.4	Vliv kultivační teploty na enantioselektivitu a míru konverze	- 44 -
4.5	Porovnání míry biotransformace v celých a rozbitých buňkách	- 46 -
4.6	Vliv zdroje uhlíku a energie na růst a expresi žádaných enzymů	- 48 -
4.7	Růstové křivky vybraných kmenů	- 50 -
4.8	Závislost enantioselektivity a konverze na růstové fázi.....	- 53 -
5.	Souhrn.....	- 57 -
6.	Citovaná literatura.....	- 58 -

Seznam zkratk:

ADH	alkoholdehydrogenasa
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
ee	enantiomeric excess (nadbytek enantiomeru)
FAD	flavinadenindinukleotid
glc	glukosa
glyc	glycerol
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADP	nikotinamidadenindinukleotid fosfát
OD	optická densita
TMSCN	trimethylsilyl cyanide (kyanotrimethylsilan)
YP	druh kultivačního media (z angl. „yeast extract + peptone“)

1. Abstrakt

Preparation of pure enantiomers is very important part of chemical synthesis of industrially and pharmaceutically useful compounds. In recent years traditional chemical synthesis is replaced by biotransformations. Biotransformation means the use of isolated enzymes, enzymatic systems or whole cells in catalysis of chemical reactions. In comparison with chemical synthesis it has certain advantages. In this work the activity of yeast strains *Saccharomyces uvarum* K8, *Saccharomyces cerevisiae* K12, *Torulopsis azyma* K43, *Torulopsis sphaerica* K46 and *Candida tropicalis* K49, K51 a K52 in catalysis of reduction 6-bromo-2-tetralone, 7-hydroxy-2-tetralone and 7-methoxy-2-tetralone was studied. Products of these reductions are used in preparation of pharmaceutical drugs.

Suitable conditions for biotransformations were found and it was proved that the yeast strains *Saccharomyces uvarum* K8 and *Candida tropicalis* K52 are able to produce 2-tetralones with ee greater than 90% with conversion 100% after four-hour biotransformation.

This thesis is written in Czech.

Příprava čistých enantiomerů je v současnosti klíčovou součástí chemické syntézy mnoha průmyslově a farmaceuticky významných látek a trendem posledních let je postupný odklon od tradiční chemické syntézy k využívání biotransformací. Biotransformace znamená využívání izolovaných enzymů, celých enzymových systémů nebo celých buněk ke katalyzování chemických reakcí a oproti chemické syntéze přináší řadu výhod. V této práci byla prověřována biotransformační aktivita kvasinkových kmenů *Saccharomyces uvarum* K8, *Saccharomyces cerevisiae* K12, *Torulopsis azyma* K43, *Torulopsis sphaerica* K46 a *Candida tropicalis* K49, K51 a K52 při katalýze redukce 6-bromo-2-tetralonu, 7-hydroxy-2-tetralonu a 7-methoxy-2-tetralonu na příslušné alkoholy, což je významný reakční krok při syntéze některých léčiv.

Byly nalezeny vhodné reakční podmínky pro biotransformaci a zjištěno, že kmeny *Saccharomyces uvarum* K8 a *Candida tropicalis* K52 jsou schopny poskytovat 2-tetraloly s ee vyšším než 90% při současné 100% konverzi substrátu při čtyřhodinové biotransformaci.

2. Teoretický úvod

2.1 Biokatalýza

2.1.1 Historie a průmyslové využití

Historie využívání biokatalýzy sahá do doby před více než 8000 lety do oblasti Sumeru, kde byly mikroorganismy využívány pro výrobu piva. Mikroorganismy byly využívány pro výrobu alkoholických nápojů velmi dlouho dobu před svým vlastním objevem. Mezi další takzvané tradiční biotechnologie se kromě výroby alkoholu řadí výroba octa, sýrů a mléčných výrobků obecně.

Mezi první průmyslově využívané procesy v moderní historii patří například výroba kyseliny octové z ethanolu pomocí mikroorganismu *Acetobacter* imobilizovaného na dřevěných hoblinách, která byla prováděna přibližně od roku 1815.

Další z průmyslově používaných biokatalytických metod je například produkce vitamínu C, používaná již více než 70 let, ve které je pomocí enzymů katalyzována oxidace sorbitanu na sorbosu. Průmyslově využívané jsou i hydroxylace steroidů ⁽¹⁾.

V současnosti existuje více než 130 různých, průmyslově využívaných biotransformací a jejich počet stále narůstá. Většinou se jedná o procesy sloužící k výrobě prekurzorů farmaceuticky nebo agrochemicky významných látek. Tyto výrobní procesy jsou nejčastěji katalyzovány hydrolasami, oxidoreduktasami nebo lyasami. Využívanější je sice katalýza pomocí enzymových katalyzátorů, ale je pravděpodobné, že v průběhu času bude docházet k častějšímu využívání celobuněčných katalyzátorů, protože již nyní je často možné zabránit nežádoucím bočním reakcím a metabolizaci požadovaných produktů (jako dalšímu kroku k požadované biotransformaci) metodami genového inženýrství. Navíc, při použití celobuněčných katalyzátorů, buňka sama zajišťuje regeneraci kofaktorů reakce. Zvláště zajímavou se jeví možnost kombinovat enzymy z různých mikrobiálních kmenů v rekombinantních mikroorganismech, což může vést k výrazně větším výtěžkům i čistotě produktů ⁽²⁾.

Hlavní výhoda biokatalýzy ovšem leží ve schopnosti enzymů katalyzovat chemické reakce za nenáročných reakčních podmínek, jako je teplota, pH nebo tlak, a jejich obvykle

velmi vysoká regio- a stereoselektivita. Opticky aktivní sekundární alkoholy, mezi něž patří i 2-tetraloly, jsou jedněmi z nejpoužívanějších intermediátů pro výrobu léčiv a dalších významných chemických látek. Jejich redukce z prochirálních ketonů je jedním z nejvyužívanějších způsobů, jak zavést do molekuly chirality, protože vznikající chirální alkoholy jsou snadno konvertovatelné na další deriváty. Díky těmto vlastnostem v současnosti roste množství průmyslově aplikovaných metod sloužících k zavádění chirálních center pomocí biokatalýzy ⁽³⁾. Nejrychleji přibývá průmyslových procesů využívajících alkoholdehydrogenasy.

2.2 Enzymové katalyzátory

Hlavní výhodou enzymových katalyzátorů je, že se ke katalýze používá jeden enzym, nebo systém dvou až tří, což znamená, že je možné se snáze vyhnout nežádoucím vedlejším reakcím a s nimi spojenému snížení enantioselektivity a výtěžnosti reakce. Při využití enzymové katalýzy je navíc relativně zrychlen přístup substrátu k enzymům. Díky tomu může být značně zjednodušen celý výrobní proces. Nevýhodou je nutnost doplňovat do reakční směsi potřebné kofaktory, případně zavést systém jejich regenerace. Regeneraci kofaktorů bude věnována část v kapitole 2.6.1.

Dalším faktorem znevýhodňujícím používání enzymových katalyzátorů je jejich obvykle značná citlivost vůči vysokým koncentracím substrátů nebo organickým rozpouštědlům ^{(4) (5)}.

2.3 Celobuněčné katalyzátory

Katalýza celobuněčnými katalyzátory je, z hlediska biokatalýzy, starší, než používání enzymových katalyzátorů. Především kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae* jsou pro biokatalýzu využívány již několik desetiletí ⁽⁶⁾. Vůči enzymovým katalyzátorům mají celobuněčné katalyzátory několik výhod, nejvýznamnější, alespoň při oxidačně-redukčních reakcích, jsou vnitřní buněčné systémy regenerace kofaktorů ⁽⁷⁾. Enzymy využívané v celobuněčných katalyzátorech jsou navíc zpravidla stabilnější díky jejich umístění uvnitř buněk.

Existuje velké množství mikroorganismů schopných provádět různé biokatalytické

reakce a jejich počet se neustále zvyšuje o rekombinantní mikrobiální kmeny. Cílem tvorby rekombinantních kmenů je především omezit nežádoucí boční reakce a pokud možno omezit tvorbu izoenzymů s různou enantioselektivitou.

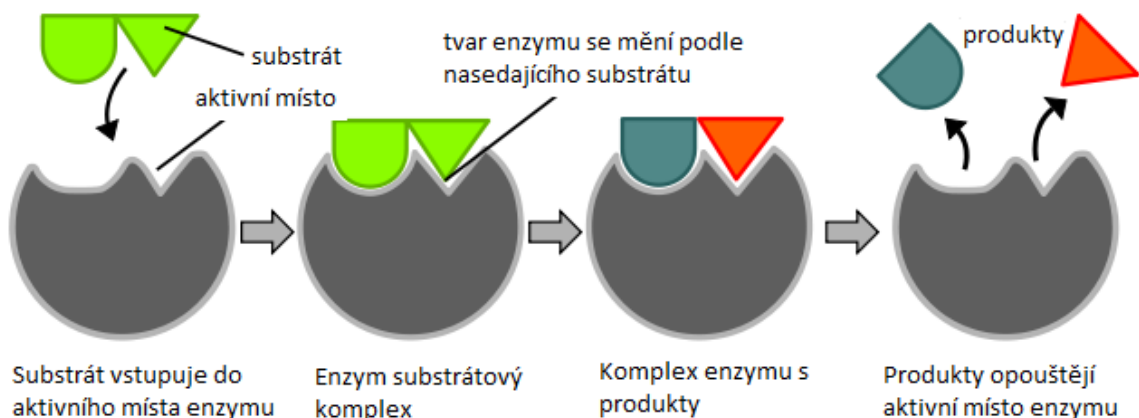
2.4 Enzymy

Enzymy jsou bílkoviny katalyzující chemické reakce v biologických systémech, kde umožňují, aby reakce probíhaly za fyziologických podmínek. Látka, která je na počátku enzymové reakce, se nazývá substrát, látka, která je jejím výsledkem se nazývá produkt. Rychlost reakce může být enzymy zvýšena přibližně o 6 až 17 řádů, podobně jako v případě použití anorganických katalyzátorů. Na rozdíl od většiny anorganických katalyzátorů pracují zpravidla při pH v rozsahu 5-8, za teplot do 100°C (ale nejčastěji v rozmezí 20-40°C) a při atmosférickém tlaku. Jejich největší výhodou je také jejich vysoká specifita vůči substrátu, vůči typu reakce, jež katalyzují a také velmi častá stereospecifita.

V roce 1894 navrhl Emil Fischer takzvaný model „zámku a klíče“ vysvětlující vysokou specifitu enzymů vůči substrátu. Podle tohoto modelu se enzym i substrát nacházejí ve specifických geometrických konformacích, které do sebe přesně zapadají ⁽⁸⁾. Tento model v roce 1958 doplnil Daniel Koshland na model „indukovaného přizpůsobení“ (Obr. 1, str. 12). Podle jeho návrhu je nutné zauvažovat vysokou flexibilitu proteinové struktury enzymu, což má za následek neustálé změny v konformaci enzymu během navazování substrátu do aktivního místa. Substrát tak svým navázáním změni geometrii molekuly enzymu, čímž mu umožní provádění jeho katalytické funkce ⁽⁹⁾.

Tento upravený model vysvětluje nejen vysokou substrátovou specifitu enzymů, ale i způsob, jakým jsou během reakce stabilizovány přechodové stavy molekuly. Právě prostřednictvím stabilizace přechodových stavů, společně se snižováním aktivační energie reakce, enzymy katalyzují chemické reakce.

Je důležité si také uvědomit, že enzymy obvykle mohou danou reakci katalyzovat v obou směrech, nicméně se tak neděje ve všech případech.



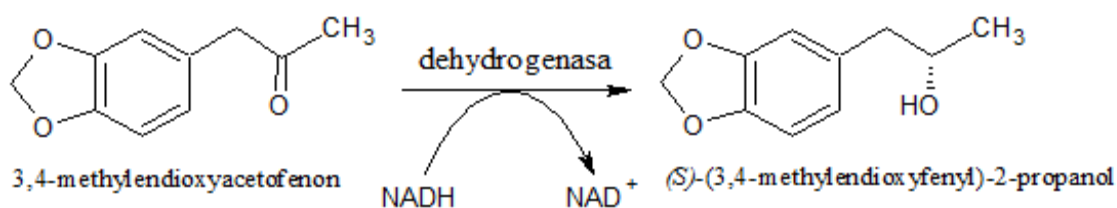
Obr. 1: Schéma enzymové reakce podle modelu indukovaného přizpůsobení (upraveno dle wikipedia.org)

2.5 Rozdělení enzymů

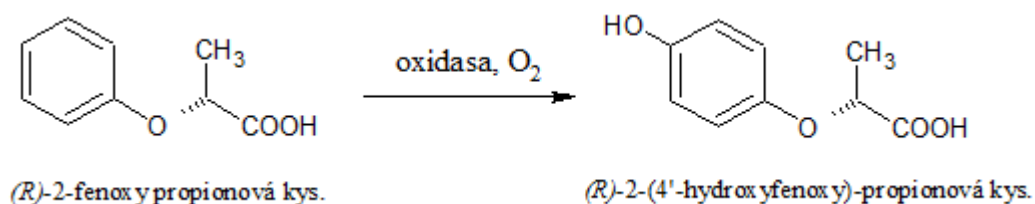
Enzymy lze na základě jejich aktivity dělit do šesti základních tříd. Následující text obsahuje jejich stručný popis a příklad biokatalytické reakce, která je v průmyslu v současnosti používána s využitím enzymu (nebo celobuněčného katalyzátoru) z dané třídy.

a) Oxidoreduktasy

Enzymy katalyzující různé oxidační nebo redukční reakce, které zahrnují přenos vodíkového atomu nebo elektronů. Zahrnují širokou škálu enzymů, jako příklad lze uvést dehydrogenasy, katalyzující přenos vodíkového atomu ze substrátu na akceptor NAD^+ , NADP^+ nebo flavin⁽¹⁰⁾ (Obr. 2), nebo oxidasy, které katalyzují přenos vodíkového atomu ze substrátu na molekulární kyslík⁽¹¹⁾ (Obr. 3, str. 13).



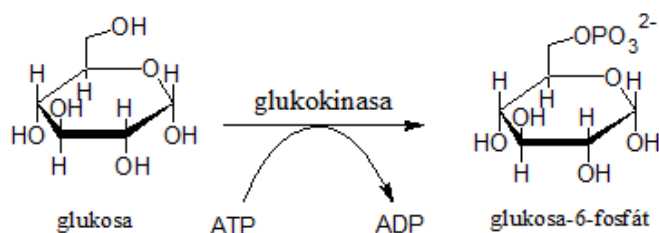
Obr. 2: Syntéza (S)-(3,4-dimethyldioxyacetofenyl)-2-propanolu katalyzovaná dehydrogenasou



Obr. 3: Syntéza (R)-2-(4'-hydroxyfenoxypropionové kyseliny využitím oxidasy

b) Transferasy

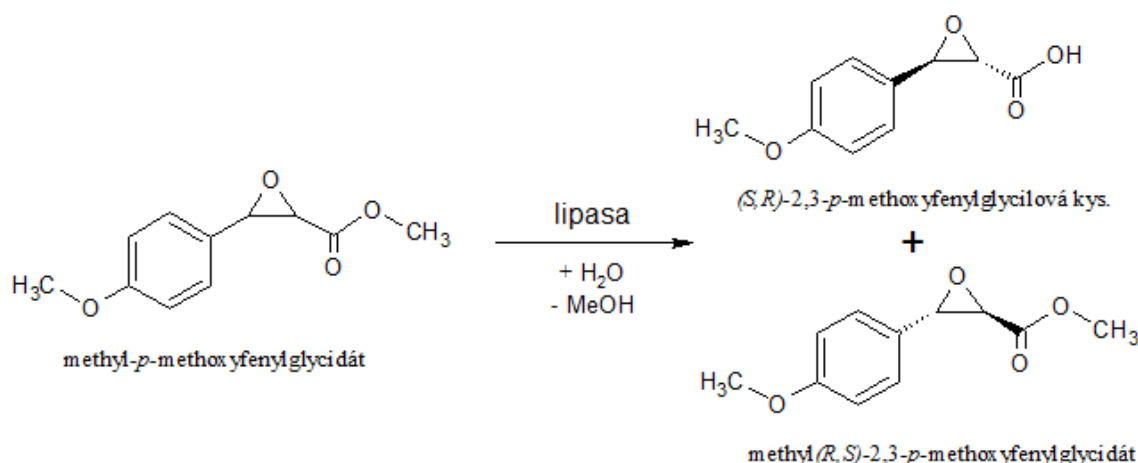
Enzymy ze skupiny transferas katalyzují přenos funkčních skupin obsahujících uhlík, dusík, fosfor nebo síru, jako jsou například acetyl, methyl nebo fosfát. Jako příklad je uvedena výroba glukosa-6-fosfátu z glukosy (tedy přenos fosfátové skupiny), katalyzovaná enzymem glukokinase⁽¹²⁾ (Obr. 4).



Obr. 4: Syntéza glukosa-6-fosfátu použitím glukokinasy

c) Hydrolasy

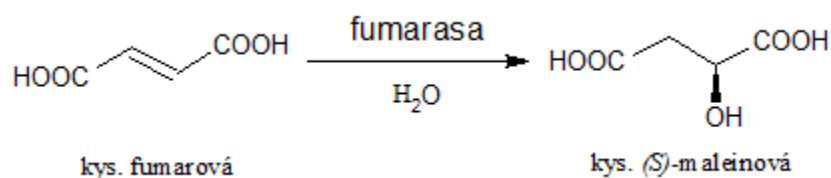
Hydrolasy katalyzují hydrolytické štěpení molekul, při nichž je substrát rozdělen na dvě nebo více menších molekul za adice vody. Podle formy substrátu jsou děleny na lipasy (esterasy; štěpí esterovou vazbu), proteasy (štěpí peptidickou vazbu), nukleasy (štěpí vazby v nukleových kyselinách) a fosfatasy (katalyzují defosforylaci molekul). Jako příklad je uvedena lipasou katalyzovaná hydrolýza methyl-*p*-methoxyfenylglycidátu⁽¹³⁾ (Obr. 5, str. 14).



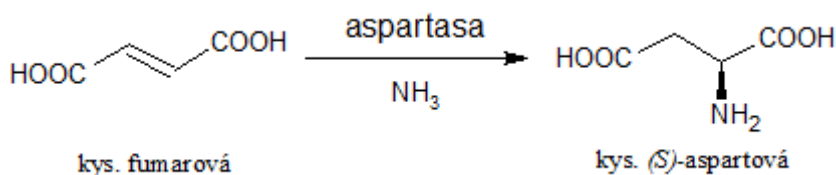
Obr. 5: Lipasou katalyzovaná hydrolyza methyl-*p*-methoxyfenylglycidátu

d) Lyasy

Lyasy, někdy také nazývané synthasy jsou enzymy katalyzující štěpení vazeb C-C, C-O, C-S, C-N nebo C-halogen jiným způsobem, než je oxidace nebo hydrolyza, a opačné reakce. Od ostatních enzymů se odlišují tím, že vyžadují pouze jeden substrát pro svou reakci, ale dva pro reakci opačnou. Příkladem využití lyas je syntéza (*S*)-aspartové kyseliny nebo (*S*)-maleinové kyseliny z kyseliny fumarové^{(14) (11)} (Obr. 6 a 7).



Obr. 6: Syntéza kys. (*S*)-maleinové fumarasou



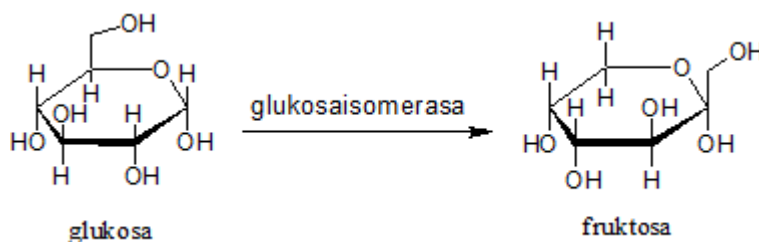
Obr. 7: Syntéza kys. (*S*)-aspartové aspartasou

e) Isomerasy

Isomerasy obecně katalyzují konformační změny v molekule nebo intramolekulární přenosy funkčních skupin. Nejčastěji využívaným procesem

katalyzovaným isomerasami je přeměna glukosy na fruktosu, prováděná pomocí enzymu glukosaisomerasa (Obr. 8).

Isomerasy, především racemasy, jsou z průmyslového hlediska potenciálně velmi přínosné enzymy, protože teoreticky umožňují přeměnu jednoho enantiomeru na opačný. Možnosti průmyslového využití racemas jsou prozatím nulové, především kvůli jejich nedostatečné aktivitě i stabilitě.



Obr. 8: Isomerace glukózy katalyzovaná glukosaisomerasou

f) Ligasy

Ligasy jsou enzymy katalyzující spojování dvou molekul. Jejich využití v průmyslovém měřítku, je prozatím spíše minimální nebo žádné, mohou být ale využity pro mimoribozomální syntézu peptidů, případně k syntéze nukleových kyselin ⁽²⁾.

2.6 Alkoholdehydrogenasy

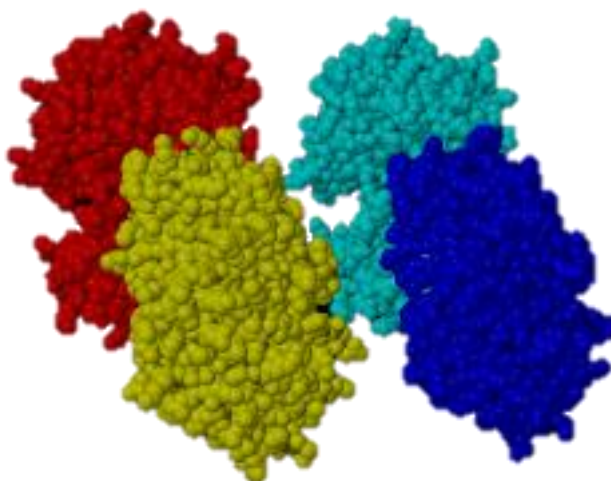
Alkoholdehydrogenasy, zkráceně ADH, enzymy ze skupiny oxidoreduktas, jsou s výjimkou hydrolas průmyslově nejvyužívanějšími enzymy. ADH jsou v současnosti jedněmi z nejlépe prozkoumaných enzymů a byly mezi prvními oligomerními enzymy, u nichž byla určena sekvence aminokyselin a jejich struktura. Jsou přítomny v podstatě ve všech živých organismech a díky své schopnosti zpracovávat široké spektrum substrátů (lineární i větvené alifatické alkoholy, primární a sekundární alkoholy, polyoly, fenoly a k nim příslušející ketony a aldehydy) jsou zapojeny do velkého množství metabolických drah. U vyšších živočichů a mnohých mikroorganismů slouží tyto enzymy především k přeměně toxických alkoholů na aldehydy. V některých případech ale oxidace alkoholu může vést k zvýšení toxicity, jako je tomu například v případě methanolu, který je

oxidován na vysoce toxický formaldehyd. Většina kvasinek a mnohé bakterie využívají ADH ke katalýze opačné reakce. ADH se tak velmi významně podílí na procesu fermentace glukosy, kterou lze zapsat souhrnně jako



Během glykolýzy je glukosa konvertována na acetaldehyd a pyruvát a acetaldehyd je následně redukován na ethanol působením ADH, čímž se regeneruje kofaktor NAD^+ . Energetický výtěžek glykolýzy není vysoký a zdá se, že primárním účelem tvorby ethanolu je likvidace konkurenčních mikroorganismů v prostředí. Některé druhy kvasinek jsou schopny oxidovat vznikající ethanol zpět na acetaldehyd a využívat ho tak jako alternativní zdroj energie v případě, že v živném mediu je nízká koncentrace glukosy.

Většina organismů může exprimovat několik různých alkoholdehydrogenas, v případě člověka je to obvykle nejméně šest, u kvasinek obvykle jedna nebo dvě. Kvasinková ADH se skládá nejčastěji ze čtyř podjednotek a má molekulovou hmotnost přibližně 140 kDa (Obr. 9).



Obr. 9: Trojrozměrné zobrazení kvasinkové ADH I

V aktivním místě ADH se ve většině případů nachází atom zinku, který je klíčový pro vazbu substrátu.

Mechanismus katalýzy je dobře prozkoumaný u lidské ADH a reakce probíhá v

celkem osmi krocích:

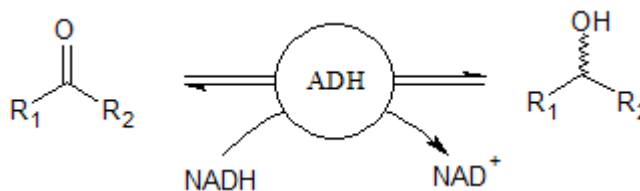
1. Navázání koenzymu NAD^+ na enzym
2. Navázání substrátu (alkoholu) koordinační vazbou na zinek
3. Deprotonace na His-51
4. Deprotonace nikotinamid ribosy
5. Deprotonace na Ser-48
6. Deprotonace navázaného alkoholu
7. Přesun H^+ z alkoxidového iontu na NAD^+ , čímž vzniká NADH a aldehyd/keton vázaný koordinačně na atom zinku
8. Uvolnění produktu (aldehyd/keton)

U kvasinek probíhá daná reakce obdobným způsobem, ale opačným směrem ⁽¹⁶⁾.

2.6.1 Kofaktory a koenzymy

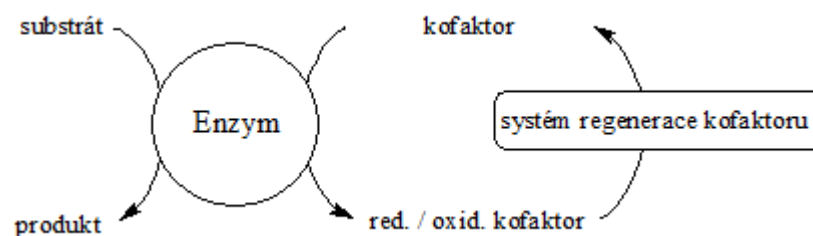
Některé enzymy vyžadují neproteinovou složku, která se naváže na samotný enzym, pro svou katalytickou aktivitu. Tyto neproteinové složky jsou nazývány kofaktory nebo koenzymy, a mohou být i anorganické (ionty kovů) i organické (hem, flavin). Je-li kofaktor trvale navázán na enzym, označuje se jako prostetická skupina. Kofaktor obvykle není na enzymy vázán kovalentně.

Většina ADH potřebuje ke své funkci jako kofaktor nikotinamidové kofaktory NAD(P)H , které slouží jako donory vodíkových iontů (nebo jako akceptory, v případě NAD(P)^+), výjimečněji flavinové kofaktory (FAD^+/FADH) ⁽¹⁷⁾ nebo methoxanthiny ⁽¹⁸⁾ (Obr. 10). ADH závislé na FAD^+/FADH a methoxanthinech jsou využívány především pro reakce prováděné v laboratorním měřítku ⁽¹⁹⁾, dále se zde proto budu zabývat pouze ADH závislými na nikotinamidových kofaktorech a regenerací těchto kofaktorů.



Obr. 10: Schéma redukce katalyzované NAD-dependentní alkoholdehydrogenasou

Při použití ADH jako enzymového katalyzátoru je nutné doplňovat do reakční směsi příslušné kofaktory. Vzhledem k jejich vysoké ceně je velmi výhodné při biokatalýze používat systém regenerace kofaktoru ⁽²⁰⁾ (Obr. 11).



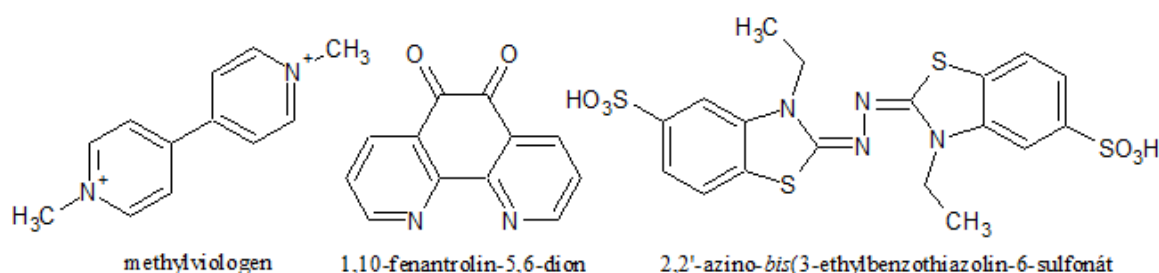
Obr. 11: Obecné schéma regenerace kofaktoru

Pro regeneraci kofaktoru při enzymové katalýze lze využít tyto základní postupy:

a) Elektrochemická regenerace

Protože kofaktory v podstatě pouze „přepínají“ mezi oxidovaným a redukováným stavem, elektrochemické metody se nabízejí jako logická metoda jejich regenerace. Přímá katodová redukce NAD(P)^+ ovšem dosahuje nízké účinnosti kvůli nežádoucím bočním reakcím, které v reakční směsi probíhají ⁽²¹⁾ ⁽²²⁾ ⁽²³⁾.

Z tohoto důvodu byly vyvinuty organické i anorganické přenašeče elektronů (z angl. „electron shuttle“) ⁽²⁴⁾. Typické organické přenašeče sestávají z rozsáhlých konjugovaných systémů (Obr. 12), jako příklad anorganického přenašeče lze uvést molekulu $[(\text{C}_5\text{Me}_5)^*\text{Rh}(2,2'\text{-bipyridin})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ ⁽²⁵⁾.



Obr. 12: Příklady typických přenašečů elektronů používaných při elektrochemické regeneraci kofaktoru

b) Chemická regenerace

K chemické regeneraci kofaktorů lze využít anorganických solí, jako je

například $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, které poskytují poměrně dobré výsledky, ale při jejich vyšších koncentracích dochází k vysolování enzymu z roztoku ⁽²⁶⁾. Další možností je využití organokovových sloučenin jako katalyzátorů přenosu a plynného vodíku jako zdroje vodíkových iontů ⁽²⁷⁾.

c) Fotochemická regenerace

Pro fotochemickou regeneraci kofaktoru NAD(P)H lze využít světlem indukovanou produkci methylviologenu (Obr. 12) v přítomnosti dihydrolipoamiddehydrogenasy nebo ferredoxinreduktasy a přidavkem látek zvyšujících fotosenzitivitu (komplexní sloučeniny ruthenia nebo zinku), polovodičů (sulfidy kadmia nebo oxidy titanu) nebo vhodných barviv (metylenová modř) ^{(28) (29) (30)}.

d) Enzymatická regenerace

K provádění enzymatické regenerace existují dva základní možné přístupy – enzymově spřažená a substrátově spřažená regenerace (z angl. „enzyme-coupled“ a „substrate-coupled“).

Při enzymově spřaženém postupu se do reakce zavádí druhý enzym a kosubstrát, který je jím zpracováván opačnou redoxní reakcí, než jakou provádí první enzym, čímž se regeneruje kofaktor. Kosubstrát je při reakci spotřebováván a je nutné ho doplňovat ⁽³¹⁾.

Biotransformační reakce s enzymově spřaženou regenerací kofaktoru vyžadují použití dvou enzymů, proto je substrátově spřažená reakce jejich výhodnou alternativou. Při substrátově spřažené regeneraci kofaktoru se využívá původního enzymu ke zpracování přidaného kosubstrátu (např. 2-propanol) na koprodukt (2-propanon). V reakční směsi tak dochází důsledkem kompetice substrátu a kosubstrátu ke vzniku dynamické rovnováhy. Odváděním produktu nebo koproduktu z reakční směsi lze tuto rovnováhu vhodným způsobem měnit, aby docházelo k regeneraci kofaktoru reakce ⁽³²⁾.

Při provádění biotransformací s použitím ADH ve formě celobuněčných katalyzátorů se ve většině případů využívá přidavku glukosy, isopropanolu, kyseliny mravenčí nebo glycerolu, případně se využije buněk bez jakéhokoliv přidavku, a vnitřní

metabolické systémy samy zajišťují regeneraci kofaktorů. Míra regenerace kofaktoru může velmi výrazně záviset na koncentraci i druhu přidané látky ⁽³³⁾.

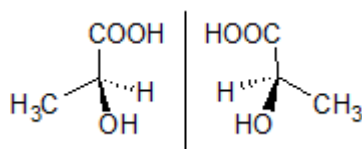
V případě využívání rekombinantních kmenů často nastává problém, kdy je požadovaný enzym rekombinantním mikrobiálním kmenem exprimován v mnohem větší míře, než u normálního kmene, a vnitřní metabolické pochody buňky nedokáží dostatečně rychle a efektivně regenerovat kofaktor. Podpořit regeneraci kofaktoru lze, podobně jako v případě enzymových katalyzátorů, enzymovým nebo substrátovým spřažením.

V případě enzymového spřažení se kromě exprese požadovaného enzymu v buňce podpoří i exprese glukosadehydrogenasy, což zajistí rychlejší glykolýzu a rychlejší regeneraci kofaktorů ⁽³⁴⁾.

Při substrátovém spřažení se využívá kmenů s vysokou odolností vůči organickým rozpouštědlům a přidavku 2-propanolu jako kosubstrátu, podobně jako u enzymových katalyzátorů ⁽³⁵⁾.

2.7 Enantioselektivita

Enantiomery, nebo také optické isomery, jsou molekuly, které nejsou ztotožnitelné se svým zrcadlovým obrazem (Obr. 13). Zpravidla se jedná o molekuly, které nemají rovinu symetrie. Dva různé enantiomery se neliší ve většině fyzikálně-chemických charakteristik, ovšem jejich odlišnost je velmi důležitá z hlediska biologické aktivity. Různé enantiomery mohou mít v živých soustavách často velmi odlišné účinky, zatímco jeden může mít žádoucí terapeutický efekt, druhý bývá velmi často toxický. Výhodou biokatalýzy před chemickou syntézou je, kromě jiného, právě možnost přípravy čistých enantiomerů.



Obr. 13: Typický příklad dvou enantiomerů – (*S*) a (*R*) kyselina mléčná

V případě syntézy 2-aminotetralinů je tímto krokem právě redukce 2-tetralonů na 2-tetraloly. Molekula 2-tetralonu je planární (nebereme-li v úvahu možné postranní řetězce),

zatímco vznikající 2-tetralol již může být ve formě dvou různých enantiomerů.

Enantiomerická čistota se obvykle uvádí jako tzv. „nadbytek enantiomeru“ (z angl. „enantiomeric excess“), zkráceně ee [%], definovaný jako

$$ee[\%] = \frac{|[R]-[S]|}{[R]+[S]} \cdot 100 \quad (1)$$

kde $[R]$ a $[S]$ jsou relativní koncentrace jednotlivých enantiomerů. Ee může formálně nabývat hodnot v intervalu od 0 do 100%, přičemž je nutné vyznačit, který z enantiomerů je ve směsi v nadbytku. Kvůli přehlednosti je v této práci uváděno ee v intervalu od -100% do 100%, kdy kladných hodnot nabývá pro nadbytek enantiomeru (R) (případně (A)) u neznámých enantiomerů a záporných hodnot pro nadbytek enantiomeru (S) (případně (B)).

2.8 Produkční mikroorganismy

Produkční mikroorganismy jsou nedílnou součástí biokatalýzy, ať již jako celobuněčné katalyzátory nebo producenti enzymů. Kritéria pro jejich výběr se velmi liší v závislosti na konkrétní aplikaci, nicméně existují určitá obecná pravidla, jimiž se jejich výběr řídí.

2.8.1 Nároky na produkční mikroorganismy a jejich zdroje

Při výběru vhodného produkčního mikroorganismu pro provádění biotransformace je důležité sledovat několik faktorů. Nejdůležitější je schopnost transformovat substrát na požadovaný produkt, případně exprimovat požadovaný enzym, v co nejkratším čase a bez toxických vedlejších produktů nebo za současné produkce enzymů s nežádoucí aktivitou. Mikroorganismus musí být geneticky co nejstabilnější, aby u něj nedocházelo k rychlým mutacím způsobujícím ztrátu požadované aktivity, případně k vývoji patogenity nebo nežádoucích vedlejších drah transformujících substrát. Dalšími požadovanými vlastnostmi jsou co nejrychlejší růst a metabolismus, vysoká tolerance vůči koncentraci substrátu i produktům biokatalýzy, případně vůči organickým rozpouštědlům, a co nejmenší

požadavky na živné medium.

Výhodné je, má-li mikroorganismus vlastní mechanismus na obranu před mikrobiální kontaminací, jako je například změna pH živného media nebo produkce metabolitů inhibujících růst cizích mikroorganismů. Tyto faktory však nesmí rušit správný průběh biotransformace.

Zdrojem čistých kultur produkčních mikroorganismů mohou být přírodní materiály, časté je také použití mikrobiálních kultur ze sbírek různých laboratoří nebo institucí. Hledáme-li nový produkční mikroorganismus v přírodě, nejčastěji je možné jej nalézt v materiálech dlouhodobě zatížených substrátem nebo jeho analogem, například v kontaminované půdě, odpadních vodách, apod.

Dalším krokem je pak optimalizace podmínek pro růst mikroorganismu a pro samotnou biotransformaci, které ovšem nejsou vždy totožné, někdy mikroorganismy mohou potřebné enzymy exprimovat pouze na základě nutričního stresu nebo nepříznivých podmínek, v některých případech také záleží na růstové fázi mikroorganismu.

2.8.2 Kultivace a živná media

Využití živých buněk při biotransformacích s sebou nese nutnost jejich kultivace. Živné medium musí obecně vyhovovat všem nárokům na živiny daného mikroorganismu. Živná media musí bezpodmínečně obsahovat zdroj energie, uhlíku, dusíku a ostatních biogenních prvků a pro náročnější mikroorganismy nebo speciální účely i zvláštní růstové faktory (vitaminy, aminokyseliny, anorganické soli apod.). Kromě toho musí živné medium také mít vhodnou vlhkost, optimální pH, vhodný osmotický tlak a optimální redox potenciál. Požadavky na živné půdy se u různých mikroorganismů liší a neexistuje žádné kultivační medium vhodné pro všechny mikroorganismy. Znalost kultivačních nároků mikroorganismu je klíčová pro úspěšnou kultivaci a umožňuje zvolit medium tak, aby jeho složení zároveň potlačovalo růst nežádoucích mikroorganismů.

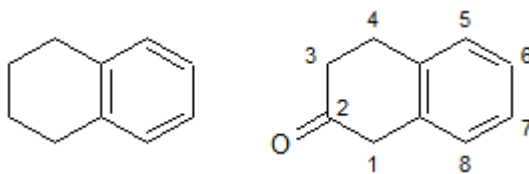
K provádění jednorázových i kontinuálních kultivací se téměř výhradně používají tekutá media, protože ta umožňují nejsnadnější odvod metabolitů a požadovaných produktů a zároveň přidávání nových substrátů a živin. Výhodou, oproti ztuženému mediu, je také možnost okamžitého stanovení hodnoty pH, obsahu živin a metabolitů a množství biomasy.

Kromě nároků na živné medium je při kultivaci nutné dbát i na nároky mikroorganismu na vnější prostředí – například relativní vlhkost vzduchu, teplotu, přítomnost kyslíku apod.

2.9 β -tetralony a jejich deriváty

β -tetralony, neboli 2-tetralony, jsou ketonové deriváty tetralinu, cyklické sloučeniny se systematickým názvem 1,2,3,4-tetrahydronaftalen (Obr. 14). Tetralony mají slabě polární charakter, ve vodě jsou téměř nerozpustné, rozpouští se dobře v organických rozpouštědlech. Díky přítomnosti delokalizovaného elektronového systému ve struktuře molekuly tetralony absorbují světlo v UV oblasti.

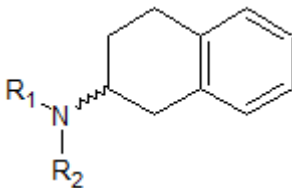
Kromě značného významu pro farmacii se 2-tetralonů a jejich derivátů využívá v průmyslu při výrobě barviv a plastů a v minulosti měly značný význam při studiu receptorů neurotransmiterů.



Obr. 14: Vzorce tetralinu (vlevo) a 2-tetralonu s vyznačeným číslováním atomů

2.9.1 Farmakologické vlastnosti

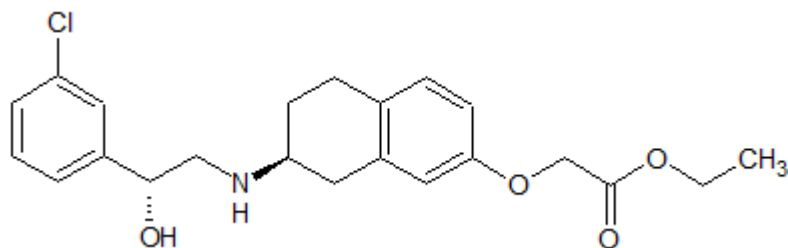
Samotné 2-tetralony mají malý nebo žádný farmaceutický význam, jsou ale vhodným reaktantem k přípravě chirálních 2-tetralolů, které jsou důležitými stavebními bloky fyziologicky aktivních látek, především 2-aminotetralinů (Obr. 15).



Obr. 15: Obecný vzorec 2-aminotetralinu

2-aminotetraliny jsou strukturní analogy amfetaminů a při testování na zvířatech byl prokázán i podobný stimulační efekt, ale s výrazně nižší účinností ⁽³⁶⁾. Hydroxy deriváty 2-aminotetralinů se váží na serotoninové, dopaminové a adrenalinové receptory ^{(37) (38) (39) (40)}, methoxy deriváty 2-aminotetralinů jsou schopny reagovat s melatoninovými receptory ⁽⁴¹⁾. Chlorované deriváty 2-aminotetralinů ovlivňují hladinu serotoninu ⁽⁴²⁾. Prostřednictvím těchto efektů mohou být využity při léčbě depresí a úzkostných poruch a dalších duševních onemocnění, nebo k potlačení násilného chování. Mohou být také použity při léčbě alkoholové závislosti a je popsán i jejich účinek na sexuální chování ⁽⁴³⁾.

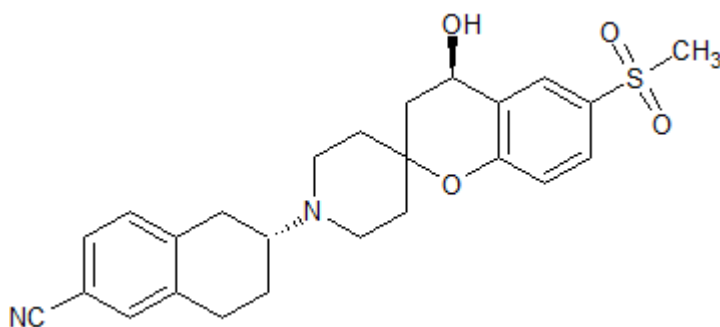
Mezi farmaceuticky významné sloučeniny obsahující 2-aminotetralinový skelet patří látka nazvaná amibegron (Obr. 16). Amibegron je sloučenina vyvinutá firmou Sanofi-Aventis a jedná se o první objevenou látku, která je selektivním agonistou β_3 -adrenoreceptoru a současně dokáže při orálním podávání účinně pronikat do centrálního nervového systému přes hematoencefalickou bariéru. Prostřednictvím amibegronu bylo také prokázáno, že i působení na β_3 -adrenoreceptor může mít antidepresivní účinky ⁽⁴⁴⁾.



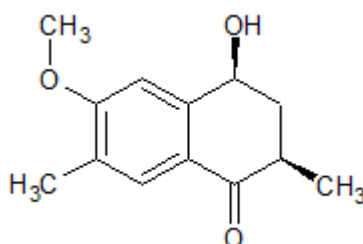
Obr. 16: Amibegron

Kromě již zmíněného antidepresivního účinku amibegron potlačuje úzkost a stres, jak bylo prokázáno testy na zvířatech a později i klinickým testováním. Firma Sanofi-Aventis nicméně oznámila v roce 2008 zastavení vývoje během třetí fáze klinického testování kvůli vážným vedlejším účinkům léku, které zahrnují poruchy vnímání, motorických funkcí a vývoj silné závislosti ^{(45) (46)}.

Jako další farmaceuticky významné deriváty 2-tetralonů lze zmínit sloučeninu s názvem MK-0499 (Obr. 17, str. 25), jež je zkoumána pro své antiarytmické vlastnosti a je potenciálním lékem k prevenci některých srdečních chorob ⁽⁴⁷⁾ a flossonol (Obr. 18, str. 25), který vykazuje cytotoxické vlastnosti a je potenciálně využitelný při léčbě leukémie ⁽⁴⁸⁾.



Obr. 17: MK-0499

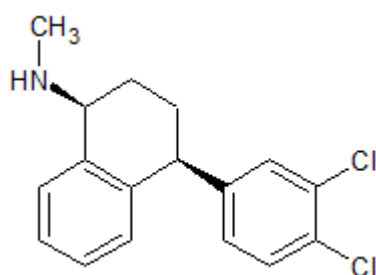


Obr. 18: Flossonol

2.9.2 1-tetralony

Podobné účinky jako deriváty 2-tetralonů mají i některé deriváty 1-tetralonů. Jejich analoga se využívají při syntéze léků užívaných při léčbě schizofrenie a inhibitorů β -sekretas, které jsou potenciálně účinné při léčbě Alzheimerovy choroby ⁽⁴⁹⁾.

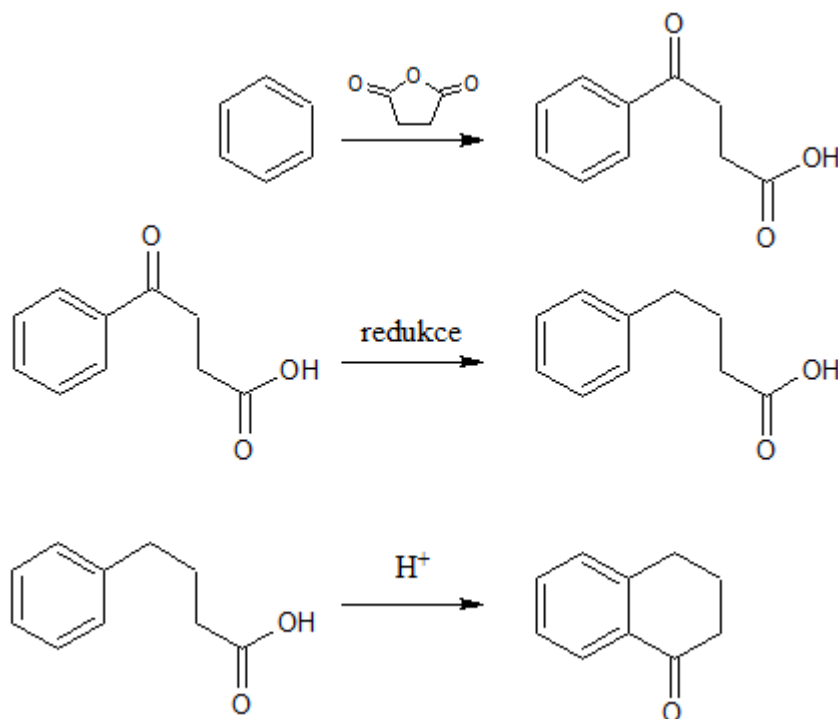
Nejznámějším derivátem 1-tetralonů je sloučenina nazývaná setralin (Obr. 19), obsažená v přípravcích s obchodním názvem Zoloft nebo Lustral. Setralin působí jako selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu (z angl. „selective serotonin reuptake inhibitor“), používá se při léčbě depresí a úzkostných poruch. Jeho účinek je podobný jako u ostatních antidepresiv, jeho velkou výhodou je vyšší účinnost a menší závažnost vedlejších účinků, souvisejících s poruchami vnímání ⁽⁵⁰⁾.



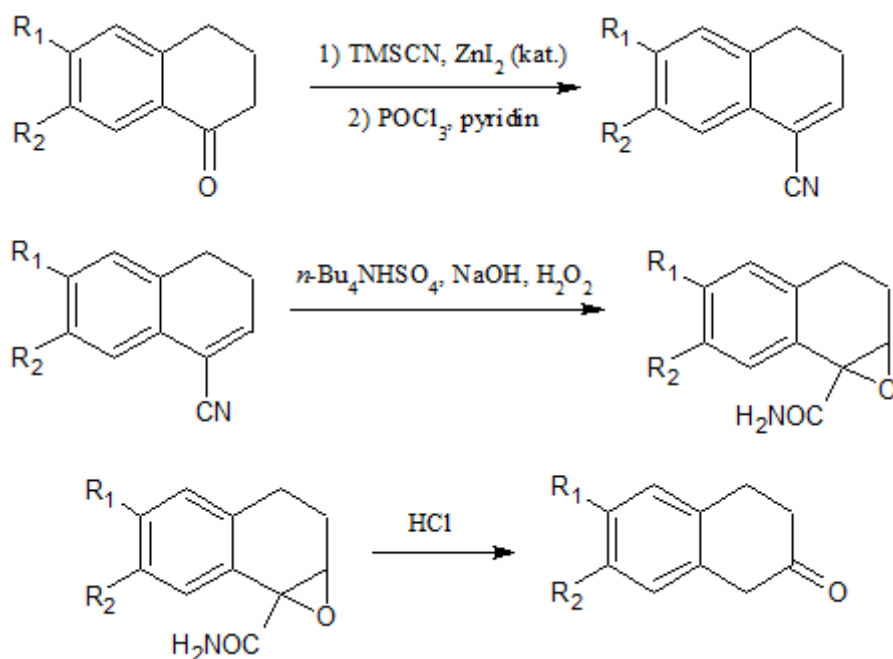
Obr. 19: Setralin

2.9.3 Syntéza 2-tetralonů

Existuje mnoho způsobů přípravy 2-tetralonů, často parciálními redukcemi z derivátů naftalenu, ale jsou i jiné možnosti. Jako příklad je uvedena syntéza 1-tetralonů Haworthovou reakcí z benzenu a sukcinyl anhydridu ⁽⁵¹⁾ (Obr. 20) a následný sled reakcí, kterými je 1-tetralon isomerizován na 2-tetralon ⁽⁵²⁾ (Obr. 21, str. 27). Samotná isomerizace 1-tetralonů na 2-tetralony probíhá s relativně vysokými mezivýtěžky, celková výtěžnost sledu reakcí je asi 33-57%.



Obr. 20: Syntéza 1-tetralonů Haworthovou reakcí



Obr. 21: Isomerizace 1-tetralonů na 2-tetralony

2.9.4 Konverze 2-tetralonů na 2-tetraloly

Jak již bylo uvedeno, právě redukce 2-tetralonů na 2-tetraloly je klíčovým krokem při syntéze biologicky aktivních tetralinových derivátů, protože tímto krokem se do molekuly zavádí chirální centrum.

2.9.4.1 Chemická

Chemickou redukcí, například pomocí $NaBH_4$, vzniká racemická směs obou enantiomerů, což je samozřejmě nežádoucí, a čištění směsi s cílem získat pouze jeden enantiomer bývá náročné, drahé a nepříliš účinné. Chceme-li provádět enantioselektivní redukci 2-tetralonů na 2-tetraloly, je nutné zavádět speciální postupy, často zahrnující nákladné a vysoce toxické katalytické systémy, jako je například ruthenium^{(53) (54)}. Tímto postupem se ovšem zpravidla zvyšuje nebezpečí kontaminace některým z reaktantů.

2.9.4.2 Biokatalytická

Alternativou k tradičním postupům chemické syntézy je biokatalýza. Je popsáno mnoho mikroorganismů, schopných redukovat 2-tetralony na příslušné 2-tetraloly, například *Trichosporon capitatum*, *Rhodococcus erythropolis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Phaseolus aureus*, *Aspergillus niger* a další ^{(55) (56) (57) (58) (59)}. Především rekombinantní systémy založené na *E. Coli* a genech z těchto mikroorganismů dosahují velmi vysoké enantioselektivity. Velkou měrou ale enantioselektivitu ovlivňuje také struktura substrátu, při bio redukci různě substituovaných 2-tetralonů pomocí kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* se enantioselektivita pohybuje od téměř žádné po velmi vysokou v závislosti na tom, o jak substituovaný 2-tetralon se jedná ⁽⁶⁰⁾.

Mezi 2-tetralony, jejichž biotransformace je v literatuře popsána, patří především 6-bromo-2-tetralon (prekurzor amibegronu), různé methoxy- (substituované v polohách 5, 6, 7 a 8) a dimethoxy- deriváty (polohy 5,6; 6,7; 7,8, 5,8), hydroxy deriváty (polohy 5 a 8) a karbomethoxy deriváty (substituované v polohách 1 a 3). Popsány jsou i biotransformace 2-tetralonů různě substituovaných v poloze 1.

Cíl práce

Cílem této práce bylo prověřit aktivitu sedmi vybraných kmenů kvasinek (*Saccharomyces uvarum* K8, *Saccharomyces cerevisiae* K12, *Torulopsis azyma* K43, *Torulopsis sphaerica* K46, *Candida tropicalis* K49, K51, K52) při biotransformaci 6-bromo-2-tetralonu, 7-hydroxy-2-tetralonu a 7-methoxy-2-tetralonu na příslušné alkoholy a nalézt optimální podmínky, při nichž tato biotransformace bude probíhat s nejvyšší konverzí a enantioselektivitou.

3. Materiál a metody

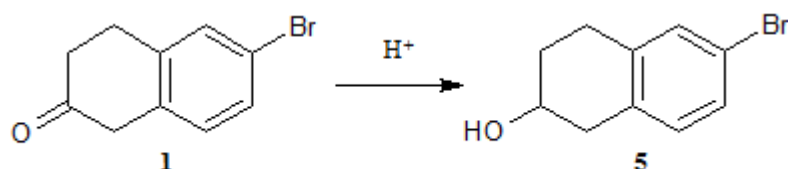
3.1 Chemikálie

Chemikálie:	Výrobce:
Agar	Oxoid, Ltd.
D-glukosa	Lachema s.r.o.
Ethanol	J.T. Baker
Ethylacetát	Lach:ner s.r.o.
Glycerol	Penta
HCl	Lach:ner s.r.o.
Hexan	J.T. Baker
Isopropanol	J.T. Baker
Kvasničný autolyzát (YE)	BD
NaBH ₄	Lachema s.r.o.
NaHCO ₃	Lachema s.r.o.
NaOH	Lach:ner s.r.o.
Pepton (Bacto-pepton)	BD
Sladina (malt extract)	HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.

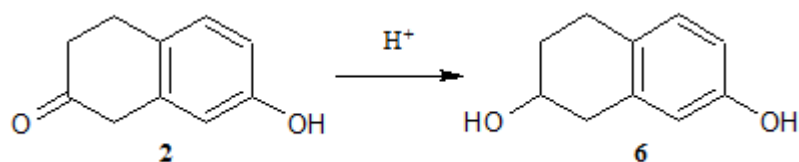
Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a. nebo vyšší.

3.2 Substráty a produkty biotransformace

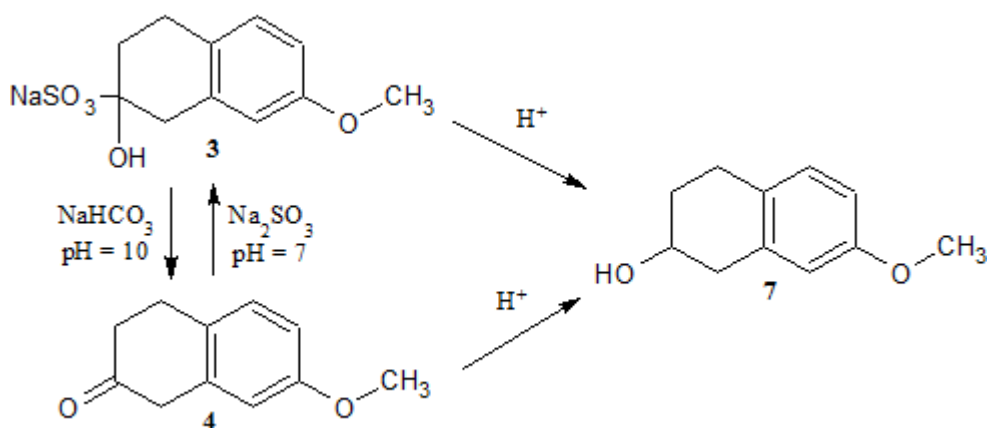
Používané substráty a produkty jejich redukce a jejich číselné značení jsou znázorněny na obrázcích 22, 23 a 24.



Obr. 22: Schéma redukce 6-bromo-2-tetralonu (1) na 6-bromo-2-tetralol (5)



Obr. 23: Schéma redukce 7-hydroxy-2-tetralonu (2) na 7-hydroxy-2-tetralol (6)



Obr. 24: Schéma vzájemné přeměny 7-methoxy-2-tetralonu (4) a jeho sodnosířičitého aduktu (3) a jejich redukce na 7-methoxy-2-tetralol (7)

Substráty 1, 2 a 3 byly poskytnuty firmou Zentiva a.s., substrát 4 a produkty 5, 6 a 7 byly připraveny dle metod 3.6.4 a 3.7.3.

Enantiomery alkoholů 5, 6 a 7 jsou označeny písmeny (*R*) a (*S*), případně (*A*) a (*B*) u neidentifikovaných enantiomerů (např. 6(*R*), 6(*A*)).

3.3 Biologický materiál

Saccharomyces uvarum - K8

Saccharomyces cerevisiae - K12

Torulopsis azyma - K43

Torulopsis sphaerica - K46

Candida tropicalis - K49, K51 a K52

Všechny používané kmeny kvasinek pocházely ze Sbírky průmyslově využitelných mikroorganismů VUPP, Praha. Kmeny byly uchovávány jako glycerinové konzervy při teplotě -80°C.

3.4 Použité přístroje

Analytické váhy AE200	Mettler, Švýcarsko
Aparatura pro evaporaci za sníženého tlaku RV-10	IKA, Německo
Centrifuga Universal 32R	Hettich, Německo
HPLC – set odplyňovač DGU-20A5	Shimadzu, Japonsko
chromatograf LC-20 AD	
vzorkovač SIL-20 AHT	
termostat CTO-10 ASVP	
UV/VIS detektor SPD-20 A	
kolona Chiralpak AD-H, 0,46cm/25 cm	Daicel, USA
pH metr inoLab pH Level 1	WTW s.r.o., ČR
Laboratorní třepačka Minishaker MS1	IKA, Německo
Laboratorní třepačka Lab-Shaker	Adolf Kühner AG, Švýcarsko
Laminární box BIO96	Labox, ČR
Orbitální inkubátor RBC9043	Gallenkamp, Velká Británie
Spektrofotometr UV-120-02	Shimadzu, Japonsko
Zařízení k rozbíjení buněk ultrazvukem XL-2000	Microson, Belgie

3.5 Živná media

Složení medií je uvedeno pro výsledný objem 1000 ml.

YP medium (pH = 5,5)

pepton 20 g

YE 10 g

YP + glc

složení viz YP medium + glukosa 2 g

YP + glyc

složení viz YP medium + glycerol 2 g

Sladina (pH = 5,4)

sladina (malt extract) 20 g

pepton 5 g

Sladinový agar

složení viz Sladina + agar 23 g

3.6 Obecné metody

Provedení experimentů se v konkrétních případech lišilo, v tomto oddílu jsou proto uvedeny postupy obecných metod a v následující kapitole provedení jednotlivých experimentů. Všechny experimenty byly prováděny jako tři paralelní stanovení a výsledné hodnoty jsou uvedeny jako průměry výsledků těchto paralelních stanovení (statisticky odlehle hodnoty nebyly pro výpočet průměru použity).

3.6.1 Příprava kultivačních medií

Media byla připravována smísením všech jejích složek, doplněním vodou na požadovaný objem a úpravou pH pomocí NaOH nebo HCl. Media poté byla rozlívána v potřebných množstvích do baněk a sterilizována při 120°C 30 minut. Sladinový agar byl po sterilizaci rozlíván na sterilní Petriho misky.

3.6.2 Extrakce

Extrakce byla prováděna vždy z 1 ml vzorku v 2 ml Eppendorfově zkumavce. Vzorek byl extrahován 2x0,5 ml ethylacetátu 20 minut na laboratorní třepačce, odstředěn, organická fáze byla oddělena a evaporována za sníženého tlaku v exikátoru. Pevný podíl byl poté znovu rozpuštěn v 1 ml hexanu. Tímto postupem byl vzorek připraven ke chromatografickému stanovení na HPLC nebo TLC.

Pomocí extrakce ethylacetátem bylo možné extrahovat ze směsi i substrát **3**, přestože byl díky své formě málo rozpustný v organických rozpouštědlech. U substrátu **3** se ve vodném prostředí ustanovuje rovnováha mezi **3** a **4**; extrakcí je ketoforma odebírána z vodného prostředí a dochází k posunu rovnováhy, díky čemuž je substrát **3** z vodného prostředí vyextrahován jako **4**. Obsah substrátu **3** byl proto vždy stanovován jako obsah vyextrahovaného substrátu **4**.

3.6.3 Chromatografické metody

Pro orientační detekci všech tří substrátů biotransformace i její produkty byly využívány chromatografické metody TLC. Ke stanovení TLC byly použity plastové destičky pro TLC (typ 60 F₂₅₄, vrstva silikagelu 0,2 mm, Merck). Jako mobilní fáze byla používána směs rozpouštědel o složení 50% hexan a 50% ethylacetát. Stanovení bylo pouze orientační, sloužící k ověření přítomnosti substrátu nebo produktů biotransformace a pro porovnání signálů bylo nutné používat standardní vzorky. K detekci signálů bylo použito barvení jodem.

Pro přesná stanovení byla využívána metoda HPLC s chirální kolonou a detekcí signálu spektrofotometricky při vlnové délce 220 nm, ve které mají 2-tetralony i 2-tetraloly

vysokou absorbanci. Nalezení složení mobilní fáze a parametrů metody vhodných pro detekci bylo předmětem experimentu 3.1 (metoda 3.7.1).

Pro obě stanovení byly jako vzorky použity extrakty v organických rozpouštědlech připravené dle metody 3.6.2.

Metodou HPLC byly stanovovány především dva parametry, nadbytek enantiomeru (z anglického „enantiomeric excess“, *ee*), zde definovaný jako

$$ee = \frac{[R]-[S]}{[R]+[S]} \cdot 100 [\%] \quad (2)$$

kde $[R]$ a $[S]$ jsou relativní koncentrace jednotlivých enantiomerů, a míru konverze k definovanou jako

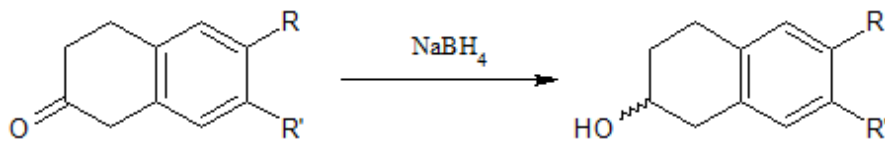
$$k = \frac{[R]+[S]}{[R]+[S]+[VL]} \cdot 100 [\%] \quad (3)$$

kde $[VL]$ je relativní koncentrace výchozí látky.

3.6.4 Příprava standardních vzorků

Jako standardní vzorky substrátů sloužily roztoky substrátů **1** a **2** v ethanolu a substrátu **3** v destilované vodě o koncentraci 100 g/l. Jako standardní vzorky 2-tetralolů byly používány vzorky substrátů **5**, **6** a **7** zredukovaných ze substrátů **1**, **2** a **4** na racemickou směs alkoholů pomocí NaBH_4 .

Tato redukce probíhala podle schématu na obr. 25. Byla prováděna v Eppendorfově zkumavce v ethanolu dvojnásobkem molárního množství NaBH_4 oproti substrátu, který byl přítomen v koncentraci 1 g/l. Reakce probíhala 30 minut za současného míchání, reakční směs byla následně odstředěna a zfiltrována.



Obr. 25: Obecné schéma redukce 2-tetralonů pomocí NaBH_4

3.6.5 Příprava biomasy

Není-li uvedeno jinak, kultivace na tekutých mediích i biotransformace vždy probíhala za přístupu vzduchu na třepacím stroji s amplitudou 25 mm při 200 otáčkách za minutu, a při teplotě 27,5°C. Kultivace na ztužených mediích probíhala na Petriho miskách při teplotě 27,5°C

Práce s mikroorganismy byla prováděna asepticky v laminárním boxu.

Inokulum bylo připraveno z pracovních glycerinových konzerv vyočkováním na sladidinový agar. Z misek bylo po 24-hodinové kultivaci připraveno tekuté inokulum (1 klička do 25 ml YP media v 50 ml Erlenmayerově baňce, kultivace 24 hodin). 1 ml tohoto inokula bylo použito k zaočkování 100 ml kultivačního media v 500 ml kultivačních baňkách.

10% buněčná suspenze byla připravena z 24 hodin rostoucí kultury na sladidinovém mediu odstředěním a resuspendováním buněk v 0,1M fosfátovém pufru nebo tekutém živném mediu na 10% w/v.

Množství biomasy v živném mediu bylo stanovováno jako hodnota OD₆₀₀, tedy absorbance kultivační kapaliny při vlnové délce 600 nm.

3.7 Provedení jednotlivých experimentů

3.7.1 Zavedení detekčních metod pro 2-tetralony a 2-tetraloly

Ke zjištění vhodného složení mobilní fáze bylo využito standardních roztoků 2-tetralonů a příslušných alkoholů, připravených dle metody 3.6.4 a naředěných příslušným rozpouštědlem na koncentraci 0,1 g/l. Zkoušeno bylo několik různých poměrů směsí organických rozpouštědel, především směsí hexan-isopropanol a hexan-etanol. Složení používaných mobilních fází a podmínky stanovení jsou uvedeny v kapitole 4.1.

Extrakce a následná analýza pomocí HPLC byla provedena i pro samotné buňky kvasinek, aby bylo následně možné takto získané pozadí odečíst od chromatogramů a nedocházelo k rušení stanovení látkami, které se přirozeně vyskytují v buňkách.

3.7.2 Ověření biotransformační aktivity

Při inokulaci 25 ml sladiny v 50 ml baňkách byl do kultivační kapaliny přidán standardní roztok substrátu **1**, **2** nebo **3** tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 0,1 g/l. Po 24-hodinové kultivaci byl 1 ml kultivační kapaliny extrahován a analyzován HPLC.

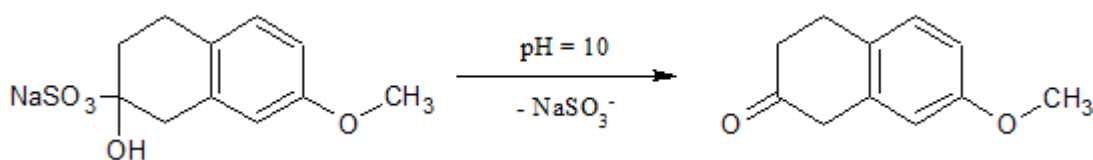
Experiment byl proveden tak, aby byly prověřeny všechny možné kombinace substrátů a kmenů.

3.7.3 Závislost míry konverze a enantioselektivity na formě substrátu

Substrát **4** byl připraven přidavkem NaHCO_3 do standardního roztoku substrátu **3**, čímž bylo upraveno pH na hodnotu 10, při které dochází k uvolnění ketonu z aduktu. Reakce probíhala dle schématu na obr. 26. Substrát **4** byl následně vyextrahován z reakční směsi obdobně jako v metodě 3.6.2.

Kultivační kapalina (24-hodinová kultivace na sladině) byla rozplněna do dvanáctijamkové kultivační destičky a doplněna substrátem **3** nebo **4** o výsledné koncentraci 0,1 g/l.

Experiment byl proveden se všemi zkoumanými kmeny.



Obr. 26: Schéma uvolnění **4** z **3** při vysokém pH

3.7.4 Vliv kultivační teploty na enantioselektivitu a míru konverze

V případě tohoto experimentu byly použity tři kombinace kvasinkových kmenů a substrátů, vybrané na základě výsledků experimentu 4.2 (metoda 3.7.2), konkrétně K46 + **1**, K12 + **2** a K52 + **3**.

2 ml 10% buněčné suspenze v sladině v kultivačních destičkách s příslušným

substrátem o koncentraci 0,1 g/l bylo inkubováno při teplotách 27,5°C a 37°C. V časových intervalech byly odebírány vzorky, extrahovány a pomocí HPLC stanovena konverze substrátu a ee produktů.

3.7.5 Porovnání míry biotransformace v celých a rozbitých buňkách

Rozbíjení balotiny: K 1 ml 10% buněčné suspenze v pufru bylo přidáno 0,5 ml balotiny (Ø 0,4 – 0,7 mm), směs byla třepána na laboratorní třepačce při 800 otáčkách za minutu po dobu 30 minut.

Rozbíjení ultrazvukem: 1 ml 10% buněčné suspenze v pufru byl podroben sonikaci ultrazvukem o frekvenci 22,5 kHz. Sonikace probíhala 1 minutu v ledové lázni.

Do všech zkumavek byl přidán příslušný substrát (K12 + 2, K46 + 1, K52 + 3) tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 0,1 g/l a glukosa, aby její výsledná koncentrace byla 5% (w/v). Po čtyřhodinové biotransformaci byly vzorky vyextrahovány a byla u nich stanovena konverze a ee.

3.7.6 Vliv zdroje uhlíku a energie na růst a expresi žádaných enzymů

Po 24-hodinové kultivaci kvasinek K8, K46 a K52 na čtyřech různých mediích (YP, YP+glc, YP+glyc a sladina) byl u těchto kultur stanoven nárůst biomasy a následně z nich připraveny 10% buněčné suspenze v pufru. Po 2 ml takto získané buněčné suspenze bylo rozpipetováno na kultivační destičku, doplněno příslušnými substráty o výsledné koncentraci 0,1 g/l a inkubováno 4 hodiny. Poté byly vzorky vyextrahovány a analyzovány pomocí HPLC.

3.7.7 Růstové křivky vybraných kmenů

24-hodinové kultivace jednotlivých kvasničných kmenů (K8, K46 a K52) probíhaly v 500 ml kultivačních baňkách se 100 ml media (YP pro K46 a K52, YP+glyc pro K8) paralelně bez substrátu a s příslušným substrátem o koncentraci 0,1 g/l. V časových intervalech byly odebírány vzorky ke stanovení OD₆₀₀. V případě přítomnosti substrátu

byla stanovena i konverze a ee.

3.7.8 Závislost enantioselektivity a konverze na růstové fázi

24-hodinové kultivace kmenů K8, K46 a K52 probíhaly v 500 ml kultivačních baňkách se 100 ml media (YP pro K46 a K52, YP+glyc pro K8). V časových intervalech bylo odebíráno po 2 ml kultivační kapaliny, které byly inkubovány v kultivačních destičkách s příslušným substrátem o koncentraci 0,1 g/l po dobu 4 hodin. Poté byla u těchto vzorků stanovena konverze a ee.

4. Výsledky a diskuze

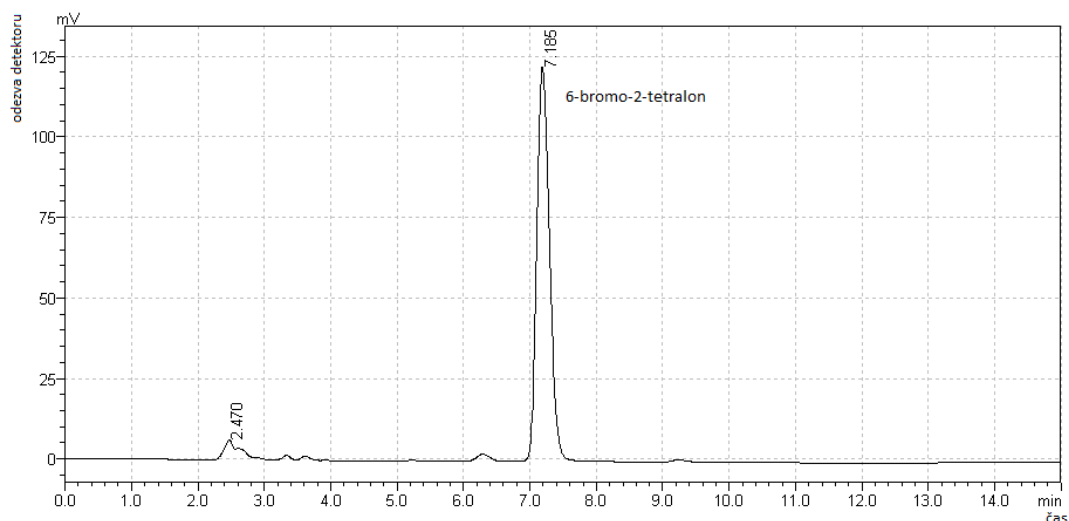
4.1 Zavedení detekčních metod pro 2-tetralony a 2-tetraloly

Pro přesnou detekci všech používaných substrátů i produktů biotransformace byla zavedena metoda HPLC s chirální kolonou s použitím směsi hexanu a isopropanolu v různých poměrech pro každý ze substrátů a detekci analytů spektrofotometrickým detektorem při vlnové délce 220 nm. Grafy 1-6 (str. 41 a 42) jsou chromatogramy názorně zobrazující polohy píků pro jednotlivé výchozí látky i produkty, v jejich popisu je uvedeno příslušné složení a rychlost průtoku mobilní fáze.

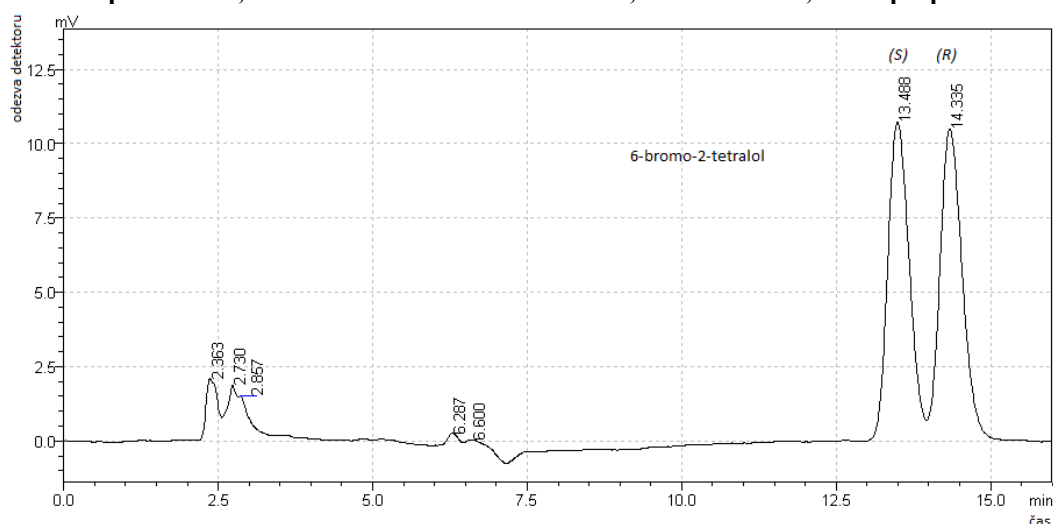
Při hledání optimálního složení mobilní fáze bylo cílem především dostatečné rozlišení píků při relativně krátkém čase analýzy. Obojího bylo dosaženo, chromatogramy ukazují, že píky jsou od sebe dostatečně vzdálené a jejich plochy se nepřekrývají, analýza jednoho vzorku trvala 15 minut.

Enantiomery **5** (vzniklé redukcí **1**), při rozdělení pomocí HPLC, byly identifikovány s využitím literatury, pro ostatní nebylo možné tato data dohledat. Identifikace jednotlivých enantiomerů by přesahovala rámec této práce, je dále používáno obecné označení. Neznámé enantiomery jsou označeny jako (*A*) a (*B*), například tedy **6(A)** a **6(B)**.

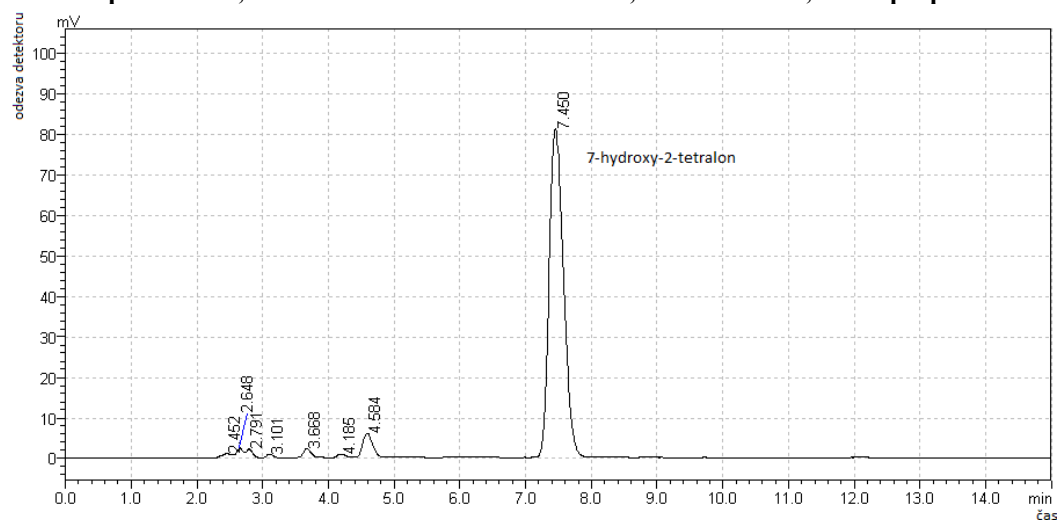
Nevýhodou používané mobilní fáze je, že se na chromatogramu při analýze extraktu z buněk objevuje i velké množství vyextrahovaných nečistot, což v některých případech částečně interferovalo s měřením. Dobrou alternativou k použití směsi hexanu a isopropanolu jako mobilní fáze, je i směs etanolu a hexanu, která poskytuje dobré rozlišení píků při kratším čase analýzy a je méně ovlivněna interferujícími látkami v analyzovaném vzorku, nicméně používání těchto rozpouštědel by bylo výrazně nákladnější, proto tato směs nebyla používána.



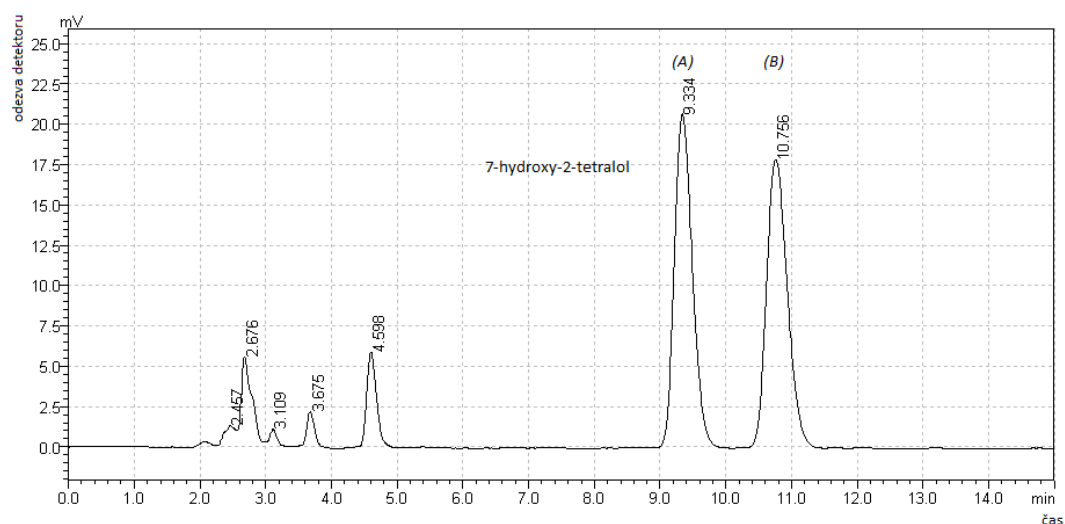
Graf 1: Chromatogram pro substrát 1 s vyznačeným píkem a retenčním časem při průtoku rozpouštědla 1,3 ml/min a složení mobilní fáze 97,5% hexanu a 2,5% isopropanolu.



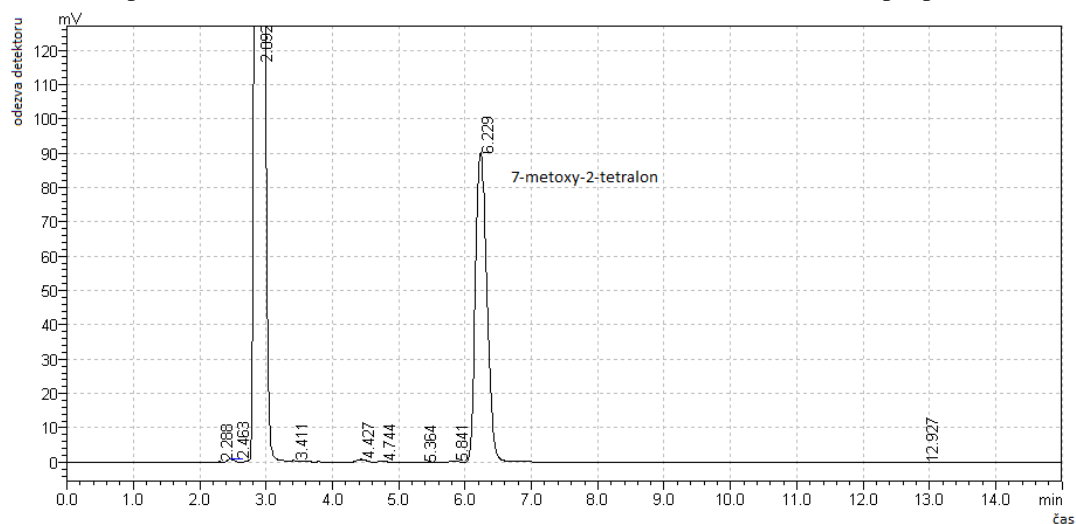
Graf 2: Chromatogram pro produkty 5(S) a 5(R) s vyznačenými píky a retenčními časy při průtoku rozpouštědla 1,3 ml/min a složení mobilní fáze 97,5% hexanu a 2,5% isopropanolu.



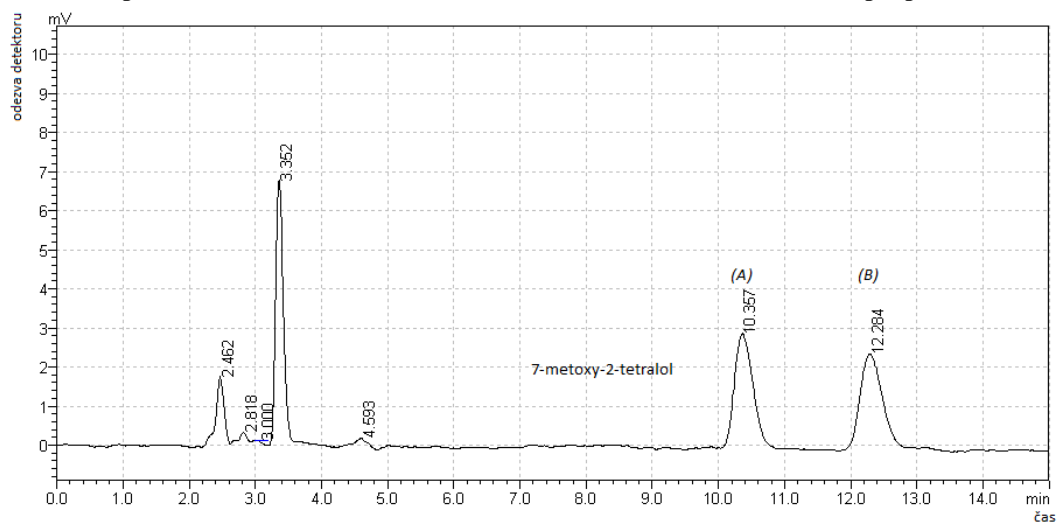
Graf 3: Chromatogram pro substrát 2 s vyznačeným píkem a retenčním časem při průtoku rozpouštědla 1,3 ml/min a složení mobilní fáze 85% hexanu a 15% isopropanolu.



Graf 4: Chromatogram pro produkty 6(A) a 6(B) s vyznačenými píky a retenčními časy při průtoku rozpouštědla 1,3 ml/min a složení mobilní fáze 85% hexanu a 15% isopropanolu.



Graf 5: Chromatogram pro substrát 4 s vyznačeným píkem a retenčním časem při průtoku rozpouštědla 1,3 ml/min a složení mobilní fáze 95% hexanu a 5% isopropanolu.

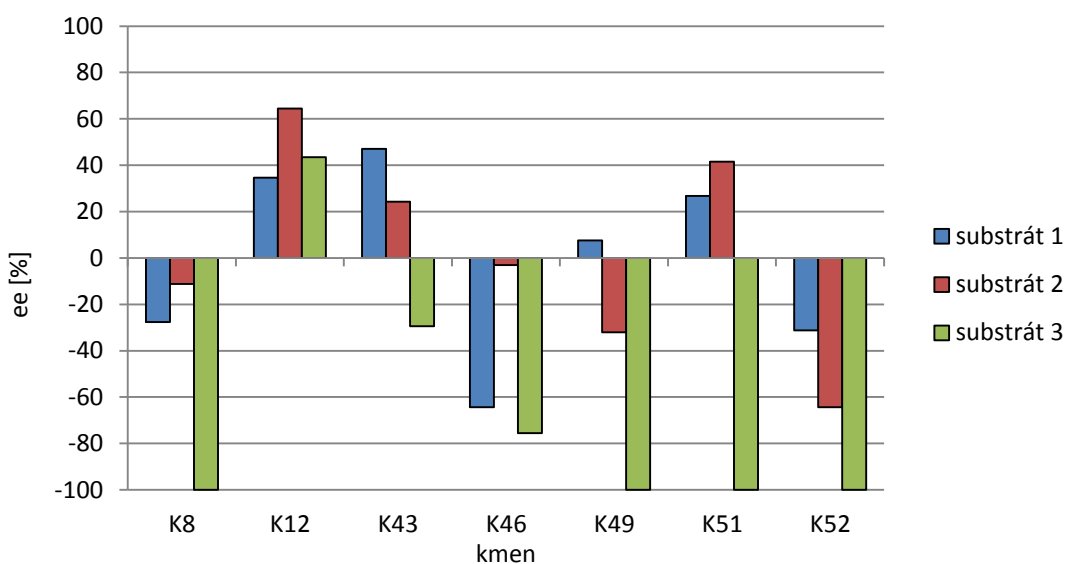


Graf 6: Chromatogram pro produkty 7(A) a 7(B) s vyznačenými píky a retenčními časy při průtoku rozpouštědla 1,3 ml/min a složení mobilní fáze 95% hexanu a 5% isopropanolu.

4.2 Ověření biotransformační aktivity

Screening kvasinek ze „Sbírký průmyslově využitelných mikroorganismů“ VUPP, Praha na biotransformaci 2-tetralonů na příslušné alkoholy byl proveden pracovníky Laboratoře enzymových technologií MBÚ AV. Prvním následujícím krokem bylo ověření biotransformační aktivity u 7 vybraných kmenů kvasinek pro substráty 1, 2 a 3.

Graf 7 zobrazuje ee jednotlivých kvasinek pro každý ze tří substrátů po 24-hodinové kultivaci s přidáním substrátu biotransformace pouze na začátku kultivace. V tabulce 1 jsou zobrazena přesná data.



Graf 7: Ee jednotlivých kmenů kvasinek pro tři různé substráty po 24-hodinové kultivaci

Tabulka 1: Ee a konverze jednotlivých kmenů kvasinek pro tři různé substráty po 24-hodinové kultivaci

substrát kmen	1		2		3	
	ee [%]	konverze [%]	ee [%]	konverze [%]	ee [%]	konverze [%]
K8	-27,6	99,9	-11,2	99,9	-99,9	99,9
K12	34,6	99,9	64,4	99,9	43,5	99,9
K43	47,0	99,9	24,3	83,8	-29,4	99,9
K46	-64,4	99,9	-3,1	99,9	-75,6	99,9
K49	7,6	97,6	-32,0	69,9	-99,9	96,9
K51	26,7	99,9	41,6	92,6	-99,9	99,9
K52	-31,2	83,7	-64,4	65,5	-99,9	99,9

Schopnost redukovat 2-tetralony na 2-tetraloly se u všech sedmi kmenů potvrdila,

navíc na základě tohoto pokusu bylo možné vyvodit předběžné závěry. Především to, že schopnost biotransformace je zjevně vázána na různé typy ADH, protože u stejných substrátů měly různé kvasinky zcela odlišnou enantioselektivitu biotransformace. Dále je vidět, že po přibližně 24 hodinách je ve většině případů téměř všechno substrát přeměněn na produkty.

Na základě těchto výsledků byly pro další pokusy vybrány pouze některé kombinace substrátů a kvasinkových kmenů, přehledně je zobrazuje tabulka 2.

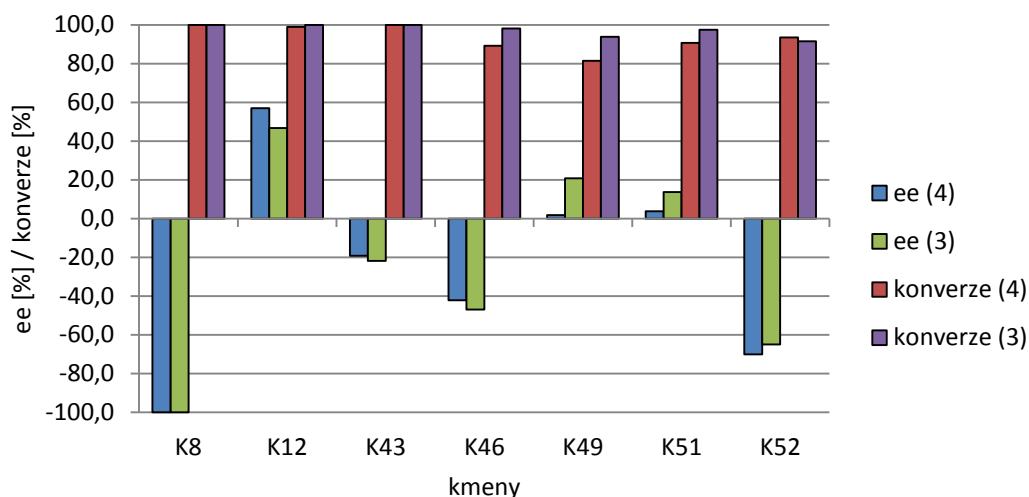
Tabulka 2: Kombinace substrátů a kvasinkových kmenů používané v následujících experimentech

substrát	1	2	2	3
kmen	K46	K8	K12	K52

Kombinace byly vybrány s ohledem na nejvyšší možnou enantioselektivitu vůči danému substrátu, s výjimkou substrátu 2. Kmen K12 je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* jejíž aktivita při biotransformaci 2-tetralonů již byla v literatuře poměrně dobře popsána ⁽⁶⁰⁾, pro další pokusy byl proto vybrán kmen K8, tedy *Saccharomyces uvarum*, u kterého tato biotransformační aktivita dosud popsána nebyla. S kmenem K12 bylo provedeno několik srovnávacích pokusů, nicméně některé specifické parametry již byly stanovovány pro kmen K8. Není-li v následujících experimentech uvedeno jinak, pak byly k biotransformacím tyto vybrané kvasinkové kmeny použity vždy v kombinaci se substrátem přiřazeným k nim v tabulce 2.

4.3 Závislost míry konverze a enantioselektivity na formě substrátu

Substrát 3 byl k dispozici ve formě aduktu se siřičitanem sodným. To zvyšuje rozpustnost tohoto substrátu ve vodě a snižuje rozpustnost v organických rozpouštědlech, což může ovlivňovat jeho biologickou dostupnost, míru konverze a enantioselektivitu. Pokud ano, mohlo by být výhodné změnit formu všech substrátů na adukty se siřičitanem sodným a dosáhnout tím vyšší enantioselektivity nebo konverze substrátu. Výsledky pokusu jsou uvedeny v grafu 8 (str. 45)



Graf 8: Porovnání biotransformace substrátu 3 a 4

Je zřejmé, že enantioselektivita procesu ani konverze nebyla téměř ovlivněna formou substrátu, s výjimkou kmenů K49 a K51. Enantioselektivita u těchto kmenů byla u různých forem substrátu **3** poměrně výrazně odlišná, ale vzhledem k tomu, že v dalších experimentech tyto kmeny již nebyly sledovány, nebyla tomuto faktu věnována další pozornost.

Molekula substrátu **3** se v obou formách při biotransformaci pravděpodobně chová zcela totožně, nebylo proto již nutné ověřovat případné odlišnosti v biotransformaci, v případě, kdy by substráty **1** a **2** byly převedeny na formu aduktu. Jedinou výhodou odlišné formy substrátu **3** tak zůstává jeho rozpustnost ve vodě, díky čemuž se lze vyhnout nutnosti používat organická rozpouštědla. Na druhou stranu, v množstvích, která byla pro stanovení používána, není toxicita rozpouštědel pro kvasinky vysoká a jejich použití proto nemělo prakticky žádný vliv na růst kvasinek ani biotransformaci.

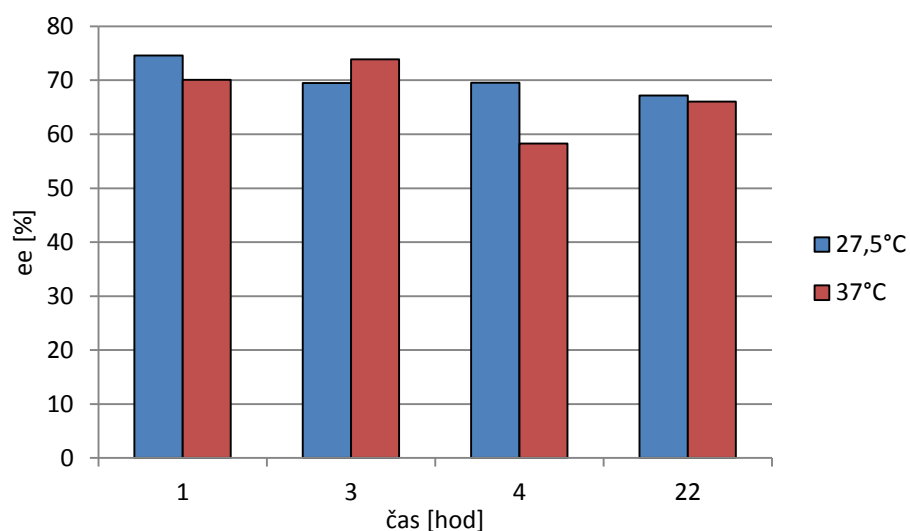
4.4 Vliv kultivační teploty na enantioselektivitu a míru konverze

Je jednoznačným faktem, že růst a rychlost dělení buněk je ovlivněna teplotou. Protože se ale některé enzymy mohou více exprimovat při fyziologicky ne zcela příznivých podmínkách, je vhodné prověřit více teplot pro kultivace a biotransformace.

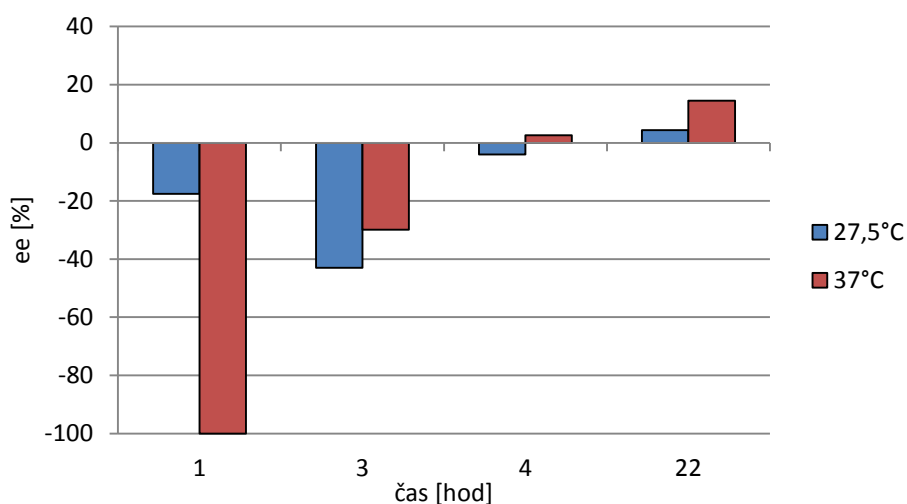
Grafy 9-11 (str. 46 a 47) srovnávají postupné změny v míře konverze a poměr

enantiomerů v čase pro jednotlivé kombinace kvasinek a substrátů.

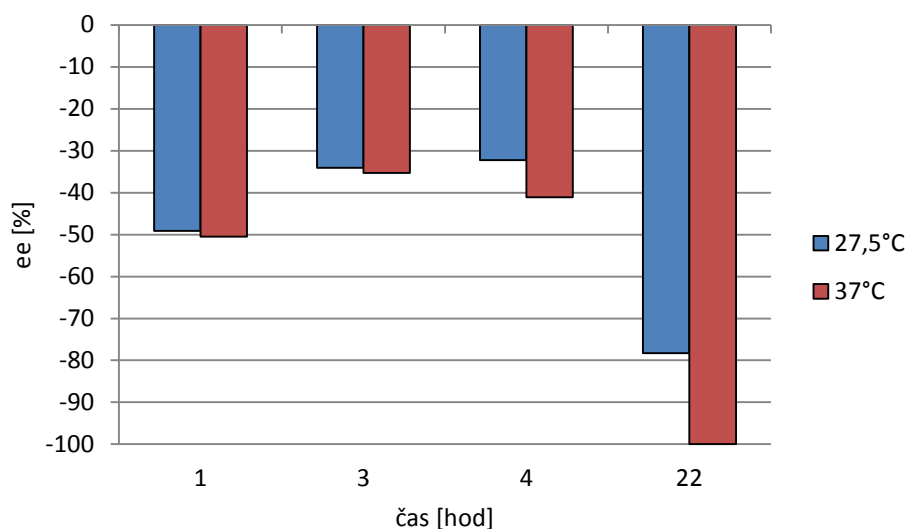
Konverze substrátů byla velmi vysoká (>95%) již po třech hodinách, proto není v grafu uvedena. Orientačně je možné říct, že nárůst biomasy byl vyšší při teplotě 27,5°C, což je očekávaný výsledek, vzhledem k obvyklým růstovým charakteristikám kvasinek, přesné hodnoty OD₆₀₀ ale nebyly v tomto experimentu stanovovány.



Graf 9: Graf závislosti ee na čase během kultivace a biotransformace pro kmen K12 a substrát 2 při různých teplotách



Graf 10: Graf závislosti ee na čase během kultivace a biotransformace pro kmen K46 a substrát 1 při různých teplotách



Graf 11: Graf závislosti ee na čase během kultivace a biotransformace pro kmen K52 a substrát 3 při různých teplotách

Jak je vidět, míra enantioselektivity je v daném rozmezí téměř nezávislá na teplotě. První hodnota v grafu 10 (str. 46) je velmi odlišná, ale to mohlo být způsobeno nízkou mírou konverze a tedy i velkou chybou při stanovení ee.

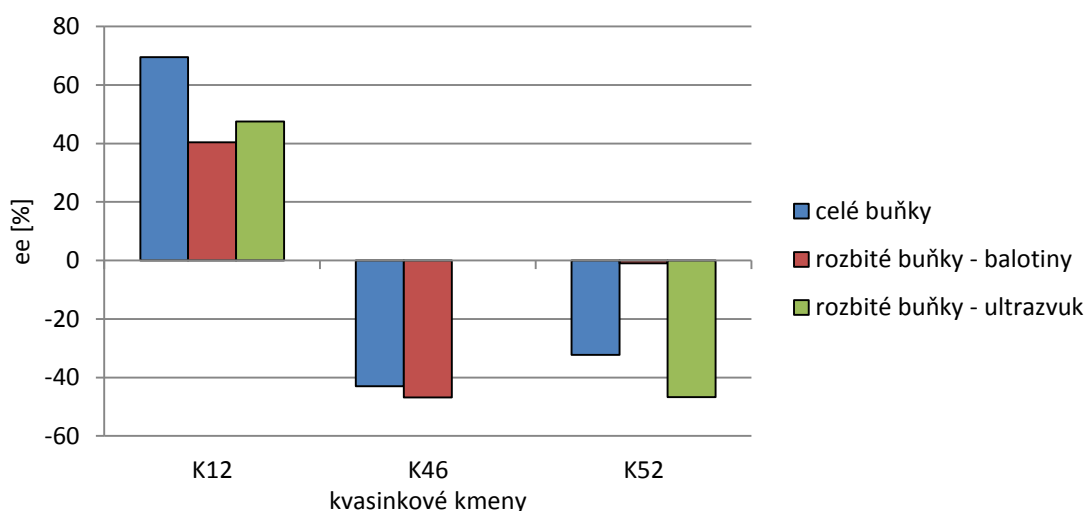
Z výsledků dále vyplývá, že zatímco u kmene K12 (Graf 9, str. 46) se poměr enantiomerů v průběhu biotransformace téměř nemění, u kmenů K46 (Graf 10, str. 46) a kmene K52 (Graf 11) je zřejmá výrazná změna v čase. Tomuto jevu bude věnována část diskuze v kapitole 4.8 (str. 54).

4.5 Porovnání míry biotransformace v celých a rozbitých buňkách

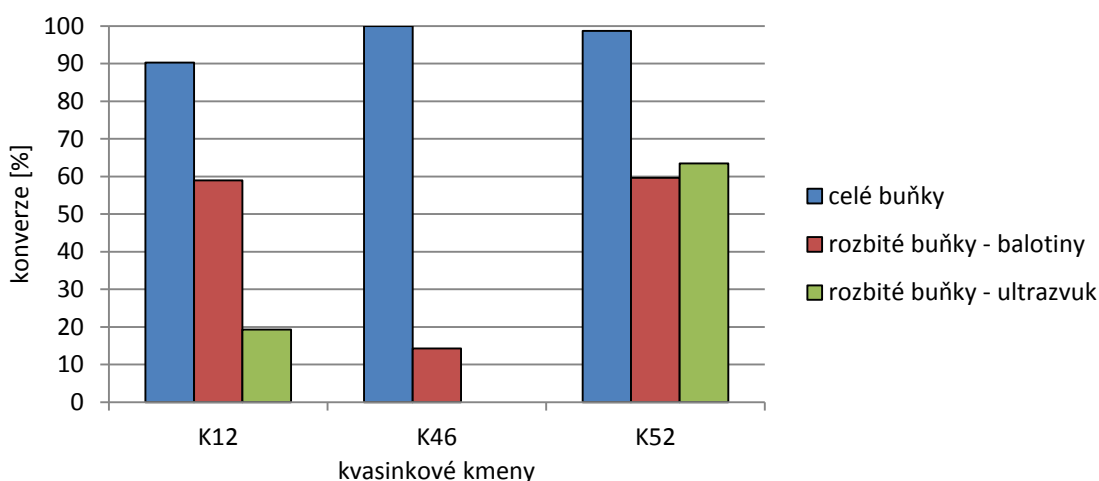
Protože využití izolovaných enzymů přináší jisté výhody oproti použití živých buněk, je vhodné se alespoň okrajově zabývat i tímto problémem. Cílem tohoto experimentu bylo ověřit možnosti rozbíjení buněk (ultrazvukem nebo balotinami) a následně zjistit, nakolik si homogenizát buněk zachovává schopnost biotransformovat substrát.

Grafy 12 a 13 (str. 48) ukazují rozdíly v ee a konverzi substrátu po čtyřhodinové biotransformaci mezi živými buňkami, buňkami rozbitými ultrazvukem a buňkami

rozbitými balotinami.



Graf 12: Porovnání ee biotransformace celými a dezintegrovanými buňkami



Graf 13: Porovnání konverze při biotransformaci celými a dezintegrovanými buňkami

Hodnota ee pro kmen K46 pro buňky rozbité ultrazvukem nemohla být stanovena, vzhledem k tomu, že konverze substrátu po čtyřhodinové biotransformaci byla nulová. Z toho vyplývá, že ultrazvuku nebo nedostatečné chlazení během sonikace vedly k nevratnému poškození enzymů zprostředkovávající redukci substrátu nebo regeneraci kofaktorů reakce (případně obou těchto systémů).

S výjimkou kmene K46 se zdá, že si kvasinky i po rozbití zachovávají schopnost biotransformace, byť je jejich aktivita snížena. U všech použitých kmenů je vidět výrazné snížení konverze u dezintegrovaných buněk oproti celým buňkám. Během dezintegrace tak zcela zjevně dochází k poškození enzymových systémů buňky. Snížení aktivity může být způsobeno, kromě všeobecné zástavy nebo narušení metabolických pochodů, i destrukcí

membrán, na nichž mohou být potřebné enzymy lokalizovány, nebo narušením systému regenerace kofaktoru NAD^+ , jak již bylo uvedeno výše.

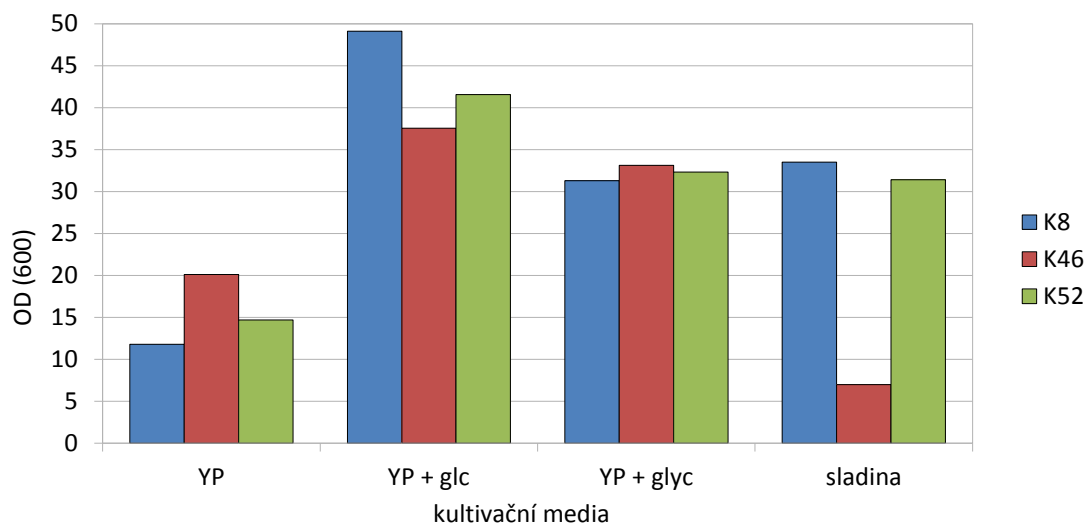
U kmene K52 je vidět i výrazný rozdíl v ee v závislosti na způsobu dezintegrace buněk. Jedna z isoform ADH je zřejmě, v případě této kvasinky, citlivější k rozbíjení balotinami a náchylnější k denaturaci. V případě kmene K12 enantioselektivita viditelně při dezintegraci buněk klesá, u kmenů K52 a K46 je naopak vidět, že ee může být v případě použití rozbitých buněk naopak vyšší.

Při zhodnocení rozdílů mezi rozbíjením buněk balotinami nebo ultrazvukem se zdá, že pro každý kmen bude vhodnější jiná metoda dezintegrace, přestože obecně se k rozbíjení kvasinkových buněk téměř výhradně používají balotiny. Pro kmen K52 má použití balotiny viditelně velmi negativní efekt na ee, u kmene K46 zjevně není možné k rozbíjení použít ultrazvuk.

Provádění biotransformací prostřednictvím enzymových katalyzátorů představuje velmi zajímavou alternativu k biotransformacím pomocí celobuněčných katalyzátorů, cílem práce ovšem bylo prověřit především možnosti biotransformace pomocí celých buněk.

4.6 Vliv zdroje uhlíku a energie na růst a expresi žádaných enzymů

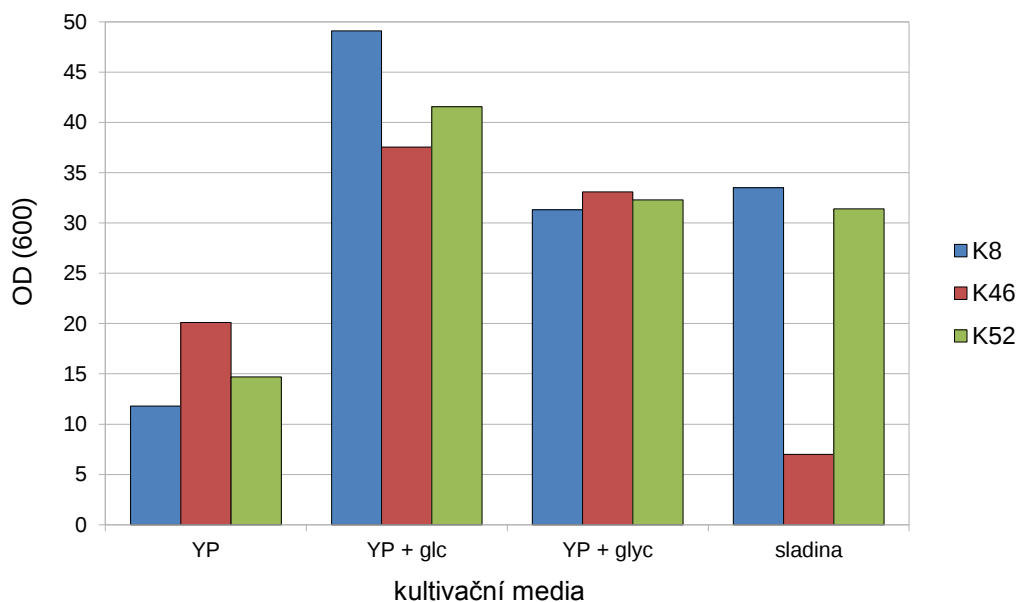
Dalším, již dříve jmenovaným faktorem, který může mít vliv na expresi žádaných enzymů a tím na enantioselektivitu procesu a míru konverze substrátu, je zdroj uhlíku a energie při růstu kvasinek. Graf 14 (str. 50) zobrazuje míru přírůstku biomasy na jednotlivých médiích po 24-hodinové kultivaci.



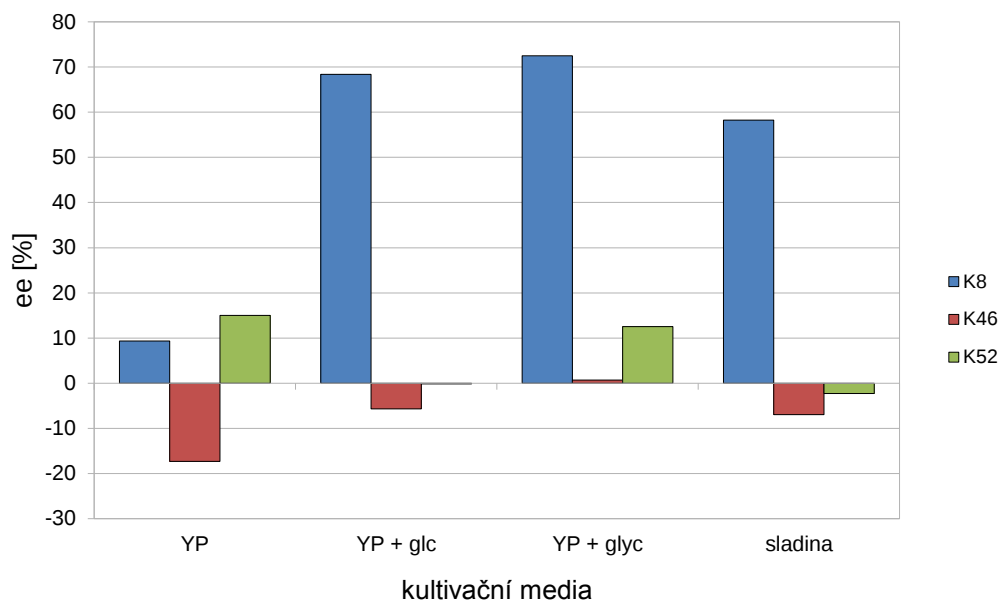
Graf 14: Porovnání přírůstku biomasy po 24-hodinové kultivace na médiích s různými zdroji uhlíku a energie

Z grafu je zřejmé, že optimálním zdrojem uhlíku pro všechny tři kmeny byla glukosa, velmi dobrých výsledků bylo dosaženo i u glycerolu a s výjimkou kmene K46 i u sladiny (obsahující velké množství oligo- a polysacharidů).

V grafech 15 a 16 (str. 50 a 51) je vidět vliv zdroje uhlíku a energie při růstu kvasinek na míru konverze a enantioselektivitu při následné čtyřhodinové biotransformaci v pufru.



Graf 15: Konverze substrátů po čtyřhodinové biotransformaci v závislosti na zdroji uhlíku v kultivačním médiu



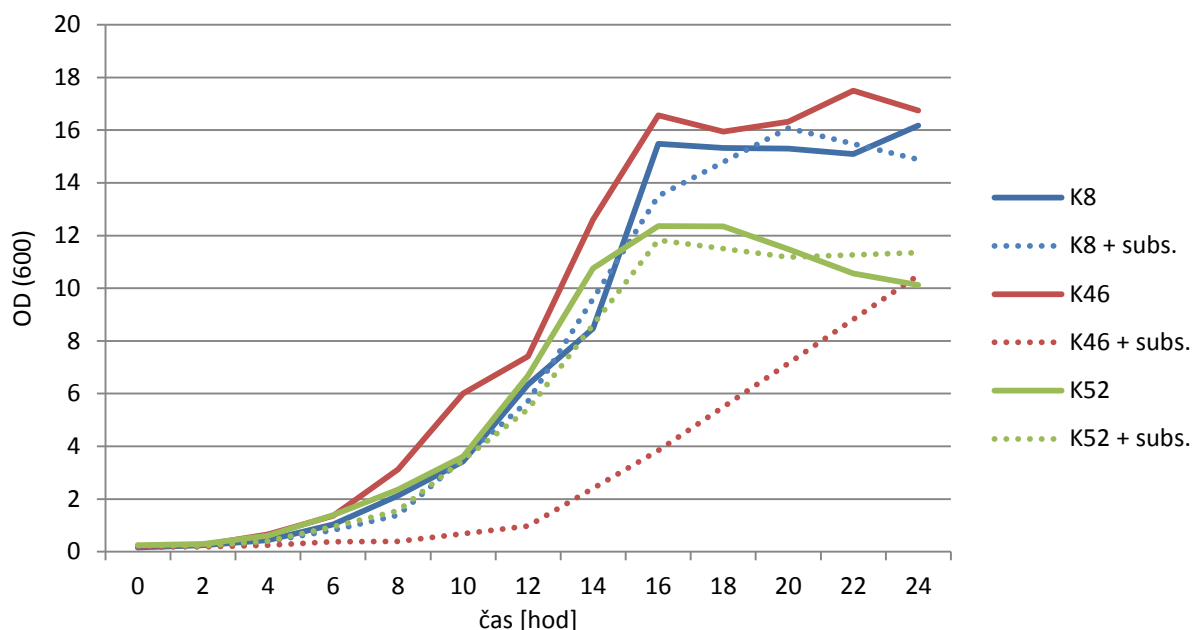
Graf 16: Ee produktů po čtyřhodinové biotransformaci v závislosti na zdroji uhlíku v kultivačním médiu

Jak je vidět, míra konverze je na všech živných médiích téměř stejná, naproti tomu ee záviselo na zdrojích uhlíku a energie. Kmen K8 dosahuje vyšších hodnot ee na médiích s vyšším obsahem sacharidů nebo glycerolu, zatímco kmeny K46 a K52 dosahovaly nejvyšších hodnot ee na YP médiu bez jakýchkoliv aditivních látek.

4.7 Růstové křivky vybraných kmenů

Graf 17 (str. 52) zobrazuje růstové křivky pro kmeny K8, K46 a K52. Pro každý kmen je zobrazena růstová křivka v YP médiu, v případě kmene K8 v YP+glyc. Živná média byla vybrána na základě předchozího pokusu s cílem prověřit růstové křivky při podmínkách, ve kterých vznikají v nejvyšším podílu čisté enantiomery.

V grafu jsou porovnány růstové křivky pro kultivaci v médiu bez přidaného substrátu biotransformace a s přidaným substrátem.

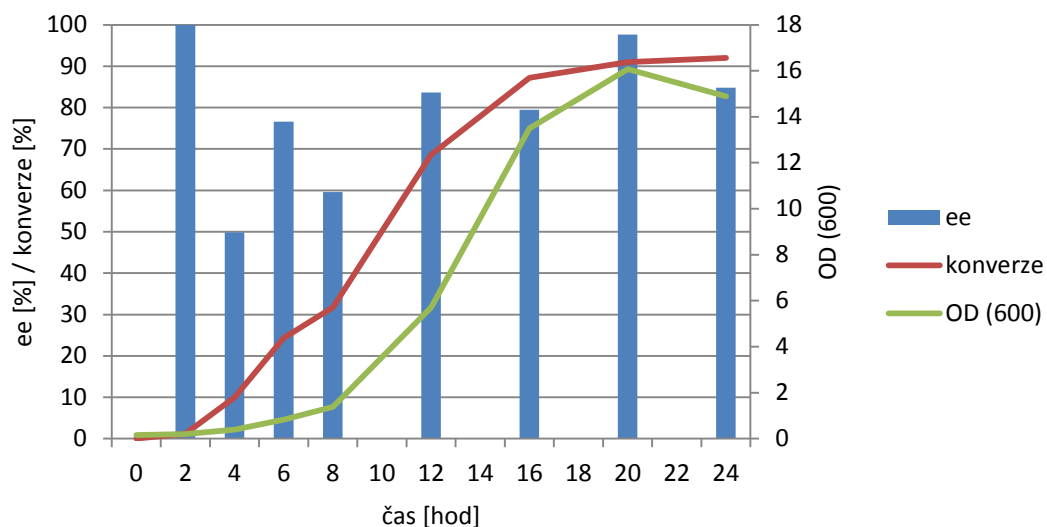


Graf 17: Růstové křivky kvasinkových kmenů při kultivaci s a bez přidaného substrátu biotransformace

Růstové parametry pro jednotlivé kmeny jsou, alespoň v médiu bez přidaného substrátu biotransformace, zjevně velmi podobné. Lag fáze pro vybrané kmeny v použitém živném médiu trvá přibližně 4-6 hodin a nastupující fáze exponenciálního růstu trvá dalších asi 10-12 hodin. Po přibližně desetihodinové fázi stacionárního růstu, tedy po 22 hodinách od zaočkování, již začíná nastupovat fáze postupného odumírání.

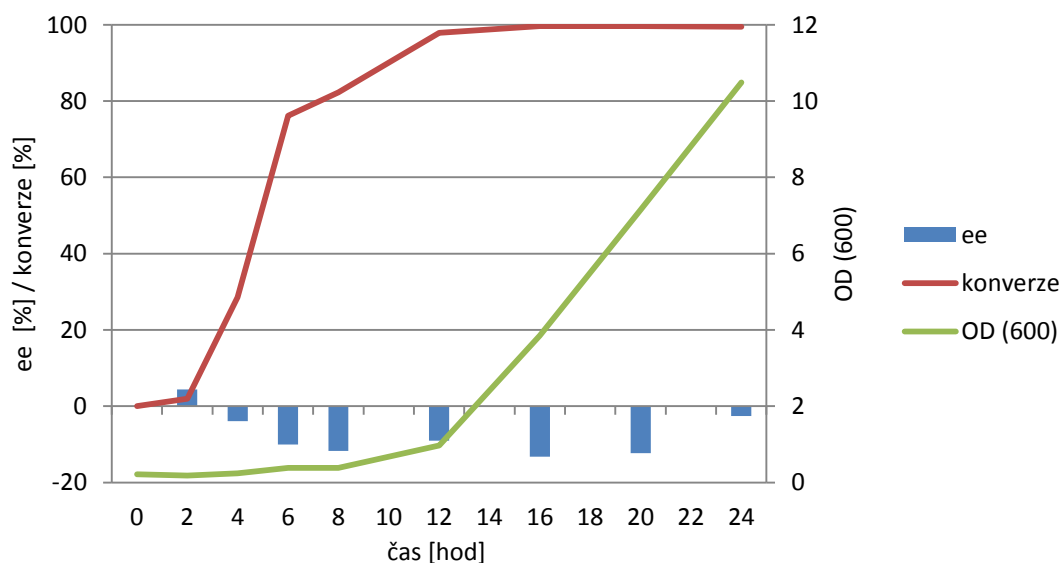
Jak je vidět, rychlost růstu buněk byla výrazněji ovlivněna přidáním substrátu pouze u kmene K46. Je možné, že pro tuto kvasinku je substrát toxický a nebo je v důsledku redukce substrátu zahlcen systém regenerace kofaktoru, což následně limituje růst buněk.

Korelaci mezi nárůstem biomasy, konverzí substrátu a změnou ee v čase při kultivaci s přidáním substrátu při zaočkování zobrazují grafy 18-20 (str. 53 a 54).



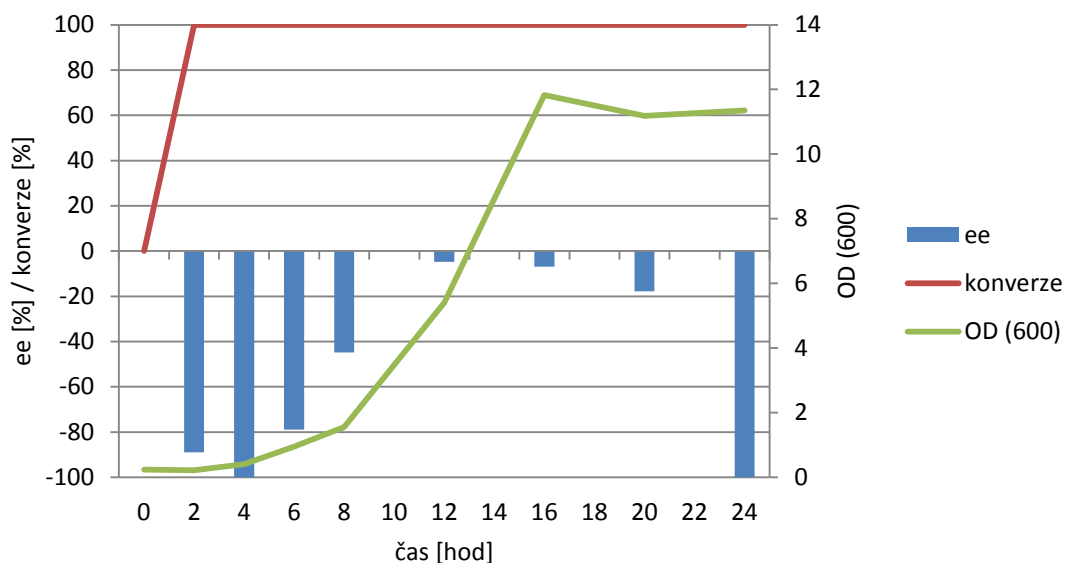
Graf 18: Konverze, OD₆₀₀ a ee při kultivaci s přidavkem substrátu od začátku kultivace pro kmen K8

První hodnota ee u kmene K8 byla pravděpodobně ovlivněna velmi nízkou konverzí substrátu v této fázi růstu. Je vidět, že konverze substrátu je v tomto případě relativně pomalá, zatímco ee se v čase téměř nemění a zůstává konstantní.



Graf 19: Konverze, OD₆₀₀ a ee při kultivaci s přidavkem substrátu od začátku kultivace pro kmen K46

U kmene K46 je konverze výrazně rychlejší, než u kmene K8, relativně velmi malé množství buněk dokáže velmi rychle redukovat substrát. Poměr enantiomerů se během kultivace mění, ale tato změna není příliš velká.



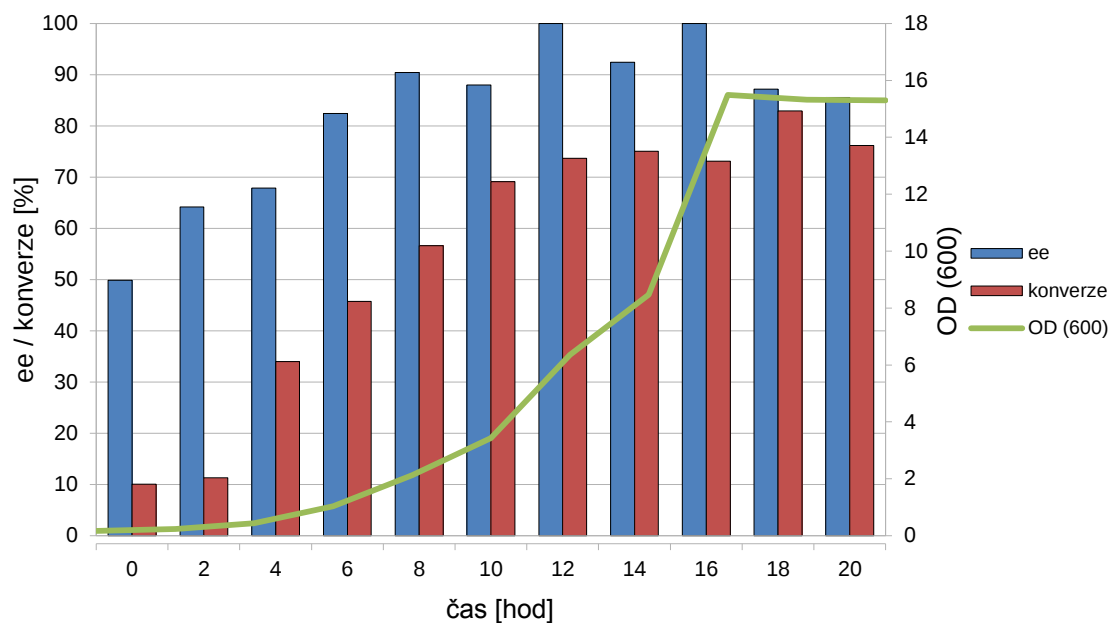
Graf 20: Konverze, OD₆₀₀ a ee při kultivaci s přidavkem substrátu od začátku kultivace pro kmen K52

U kmene K52 probíhala konverze nejrychleji ze všech tří kmenů, stejně tak je u tohoto kmene nejvýrazněji vidět změna ee v průběhu kultivace.

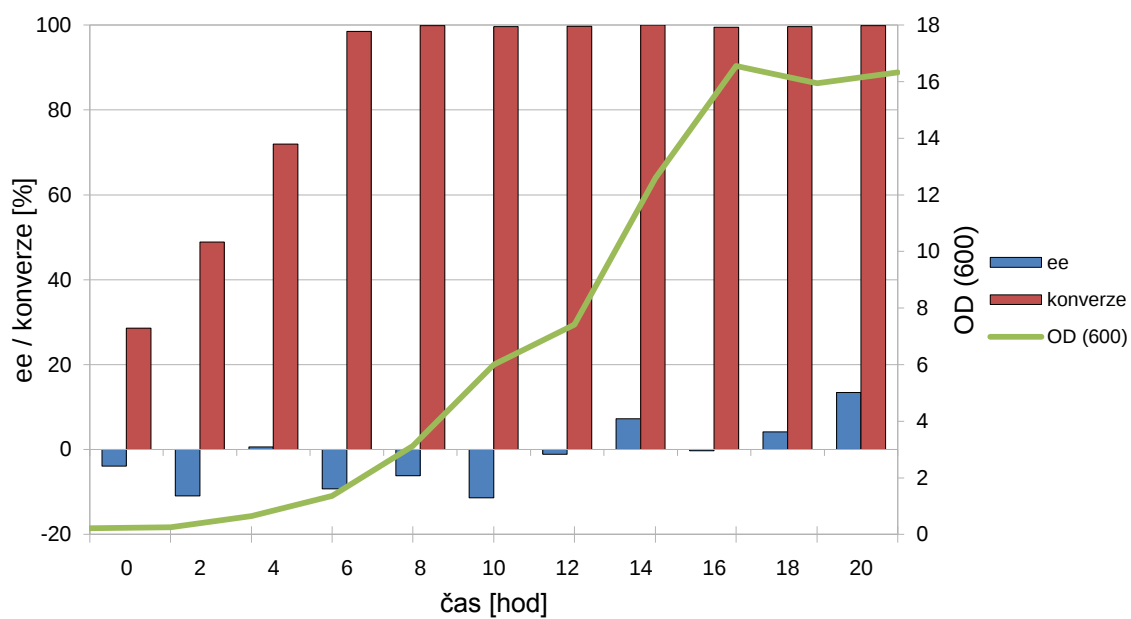
Na základě výsledků je zřejmé, že enzymy potřebné k biotransformaci jsou v buňce přítomny neustále, jejich exprese tedy není indukována substrátem.

4.8 Závislost enantioselektivity a konverze na růstové fázi

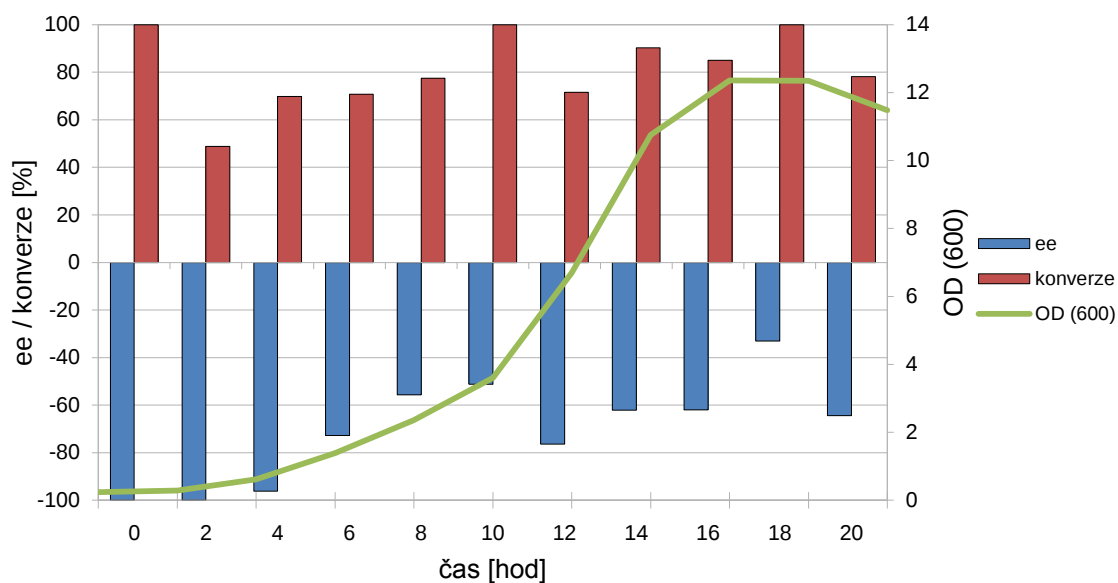
Jak již bylo řečeno, v různých fázích růstu se mohou exprimovat různé enzymy v jiném množství. Grafy 21-23 (str. 55 a 56) zobrazují konverzi a ee pro jednotlivé kvasinky při biotransformaci provedené v daném objemu kultivační kapaliny. Sloupce v grafech ukazují míru konverze a ee po čtyřhodinové biotransformaci, křivka OD₆₀₀ znázorňuje růstovou fázi, ze které byl odběr kultivační kapaliny proveden.



Graf 21: Srovnání ee a konverze po čtyřhodinové biotransformaci s buňkami odebranými v různé fázi růstu pro kmen K8



Graf 22: Srovnání ee a konverze po čtyřhodinové biotransformaci s buňkami odebranými v různé fázi růstu pro kmen K46



Graf 23: Srovnání ee a konverze po čtyřhodinové biotransformaci s buňkami odebranými v různé fázi růstu pro kmen K52

U kmenů K8 a K46 je míra konverze při odběru do šesté hodiny kultivace relativně nízká, což je způsobeno malým množstvím buněk v odebraném objemu média. U kvasinek K52 je schopnost konvertovat substrát na produkty viditelně větší. Míra konverze je celkově nejvyšší u odběrů přibližně od 8 hodin kultivace a následně se drží v přibližně stejně vysokých hodnotách, tj. okolo 90-100%. Lepší rozlišení aktivity v jednotlivých fázích růstu by bylo možné získat při použití vyšších koncentrací substrátů.

Postupně se měnící hodnoty ee poukazují na měnící se podmínky (jako je pH, množství enzymů apod.) během kultivace nebo biotransformace. Reakce katalyzovaná ADH probíhá částečně i v opačném směru a následně je znovu oxidovaný substrát redukován, což při různých podmínkách vede k rozdílným hodnotám ee.

Aby bylo možné prověřit, do jaké míry probíhá tato přeměna, bylo by vhodné sledovat měnící se ee v čase při inokulaci kvasinkového kmene do živného média obsahujícího racemickou směs 2-tetralolů.

Změna exprese enzymů provádějících biotransformaci je velmi důležitým faktorem při biotransformaci, a získání přesnějších dat v tomto ohledu by bylo nezbytné pro izolaci enzymů.

Data získaná provedenými experimenty poskytují důležité informace pro případ, kdy by byla redukce 2-tetralonů převáděna do průmyslového měřítka. V takovém případě

by ovšem bylo velmi důležité experimentálně zjistit o vybraných kmenech další charakteristiky, jako je například vliv koncentrace substrátu, vliv koncentrace živin apod. Dalším vhodným cílem by mohla být identifikace enzymů provádějících redukci 2-tetralonů na příslušné 2-tetraloly a jejich exprese v rekombinantních mikroorganismech s cílem zvýšení výtěžků biotransformace.

Nutné by dále bylo i identifikovat enantiomery produkované jednotlivými kmeny a optimalizovat metodu jejich izolace z reakční směsi a purifikace.

5. Souhrn

Provedenými experimenty bylo dosaženo těchto výsledků:

- Byla nalezena vhodná složení mobilní fáze pro detekci jednotlivých substrátů i produktů biotransformace, a to sice směs hexanu a isopropanolu v poměru 97,5:2,5 pro 6-bromo-2-tetralon (1) a příslušné alkoholy (5), 85:15 pro 7-hydroxy-2-tetralon (2) a příslušné alkoholy (6) a 95:5 pro 7-methoxy-2-tetralon (3, 4) a příslušné alkoholy (7).
- Z celkem sedmi testovaných kvasinkových kmenů ze Sbírký průmyslově využitelných mikroorganismů VUPP, Praha byly jako nejvhodnější pro biotransformace 2-tetralonů na základě hodnot ee vybrány kmeny *Saccharomyces cerevisiae* K12, *Saccharomyces uvarum* K8, *Torulopsis sphaerica* K46 a *Candida tropicalis* K52.
- Byla ověřena skutečnost, že biotransformace probíhá u většiny testovaných kvasinkových kmenů se stejnou enantioselektivitou a konverzí u substrátu ve formě ketonu i ve formě sodnosířičitého aduktu.
- Vliv teplot v rozsahu 27,5°C - 37°C na průběh biotransformace se ukázal jako velmi malý.
- Dezintegrace buněk měla negativní vliv na konverzi substrátů, v případě kvasinek K46 a K52 v malé míře pozitivně ovlivnila enantioselektivitu biotransformace.
- Jako nejvhodnější zdroj uhlíku z hlediska rychlosti růstu byla pro kvasinky K8, K46 a K52 glukosa. Zatímco u kmene K8 přidavek sacharidů (případně glycerolu) výrazně zvýšil enantioselektivitu reakce, v případě kvasinek K46 a K52 došlo k jejímu snížení. Míra konverze nebyla zdrojem uhlíku ovlivněna.
- Bylo ověřeno, že u kmenů K52 a K46 se, na rozdíl od kmene K8, mění ee biotransformace v závislosti na růstové fázi kvasinky, konverze substrátu byla ve všech růstových fázích přibližně stejná.
- U kmenů K8 a K52 se podařilo nalézt podmínky, jako je složení media, teplota, růstová fáze kvasinek apod., kdy je při biotransformaci možné dosáhnout velmi vysoké hodnoty ee produktů (>90%), kmen K46 dosahoval ve většině případů pouze nízkých hodnot ee a pro využití k biotransformacím proto není vhodný.

6. Citovaná literatura

1. Peterson, D., Murray, H., Epstein, S., Reineke, L., Weintraub, A., Meister, P., a další. (1952). *Journal of American Chemical Society*, str. 74.
2. Wandrey, C., Liese, A., & Kihumbu, D. (2000). *Organic Process & Development*, str. 286-290.
3. Honda, K., Ishige, T., Kataoka, M., & Shimizu, S. (2006). *Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industry*, str. 529-546.
4. Liese, A., Karutz, M. K., Wandrey, C., & Kragl, U. (1996). *Biotechnol. Bioeng.* (51), str. 544-550.
5. Schmid, A., Dordick, J., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., & Witholt, B. (2001). *Nature* (409), str. 258-268.
6. Csuk, R. (1991). *Chem. Rev.* (91), str. 49-97.
7. Faber, K. (2004). *Biotransformations in organic chemistry*. Berlin: Springer.
8. Fischer, E. (1984). *Chem. Ges.*(27), str. 2985-2993.
9. Koshland, D. (1958). *Proc. Natl. Acad. Sci.* (44), str. 98-104.
10. Andreson, B., Hansen, M., Harkness, A., Henry, C., Vinzenzi, J., & Zmijewski, M. (1995). *J. Am. Chem. Soc.*, str. 117.
11. Tanaka, A., Tosa, T., & Kobayashi, T. (1993). *Industrial application of immobilized biocatalysts*. New York: Marcel Dekker.
12. Nakajima, H., Kondo, H., Tsurutani, R., Dombou, M., Tomioka, I., & Tomita, K. (1991). *ACS Symp. Ser.*, str. 466.
13. Schmidt, E., Ghisalba, O., Gygax, D., & Sedelmeier, G. (1992). *J. Biotechnol* (24), str. 315.
14. Daneel, H.-J., & Faurie, R. (1994). Patent č. 4424664, Německo.
15. Cox, M., Nelson, D., & Lehninger, A. (2005). *Lehninger: Principles of biochemistry*. San Francisco: W.H. Freeman.
16. Hammes-Schifer, S., & Benkovic, S. (2006). *Annu. Rev. Biochem*(75), str. 519-541.
17. Walsh, C. (1980). *Acc. Chemistry. Res.* (13), str. 148-155.
18. McWhirter, R., & Klapper, M. (1990). *Biochemistry* (29), str. 6919-6926.
19. Liese, A., Seelbach, C., & Wandrey, C. (1996). *Industrial Biotransformations*, 2nd edition. Weinheim: GmbH.

20. Wichmann, R., & Vasic-Racki, D. (2005). *Advances in biochemical engineering/biotechnology* (92), str. 225-260.
21. Biade, A., Bourdillon, C., Lava, J., Mairesse, G., & Moiroux, J. (1992). *J. Am. Chem. Soc.* (117), str. 893-897.
22. Simon, H., Bader, J., Gunther, H., Neumann, S., & Thanos, J. (1985). *Angew. Chem.* (97), str. 539-553.
23. Hollman, F., & Schmid, A. (2004). *Biocatal Biotransform* (22), str. 63-88.
24. Steckhann, E., Hermann, S., Ruppert, R., Dietz, E., Frede, M., & Spika, E. (1991). *Organometallics* (10), str. 1568-1577.
25. Hollman, F., Kleeb, A., Otto, K., & Schmid, A. (2006). *Tetrahedron Asymmetry* (17), str. 867-868.
26. Jones, J., Sneddon, D., Higgins, W., & Lewis, A. (1972). *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, str. 856-857.
27. Wagenknecht, P., Penney, J., & Hembre, R. (2003). *Organometallics* (22), str. 1180-1182.
28. Juliard, M., Le Petit, J., & Ritz, P. (2004). *Biotechnol. Bioeng.* (28), str. 1774-1779.
29. Willner, I., Maidan, R., & Shapira, M. (1990). *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. (2)*, str. 559-564.
30. Rickus, J., Tobin, A., Zink, J., & Dunn, B. (2002). *Mater. Res. Soc. Symp. Pro.* (723), str. 155-160.
31. Seelbach, K., Riebel, B., Hummel, W., Kula, M., Tishkov, V., Egorov, A., a další. (1996). *Tetrahedron Lett.* (31), str. 1377-1380.
32. Goldberg, K., Schroer, K., Lütz, S., & Liese, A. (2007). *Appl. Microbial. Biotechnol.* (76), str. 237-248.
33. Kyslíková, E., Babiak, P., Marešová, H., Palyzová, A., Hájíček, J., & Kyslík, P. (2010). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (67), str. 266-270.
34. Kizaki, N., Yasohara, Y., Hasegawa, J., Wada, M., Kataoka, M., & Shimizu, S. (2001). *Appl. Microbial. Biotechnol.* (55), str. 590-595.
35. Edegger, K., Gruber, C., Faber, K., Hafner, A., & Kroutil, W. (2006). *Eng. Life. Sci.* (6), str. 149-154.
36. Oberlender, R., & Nichols, D. (1991). *Pharmacol. Biochem. Behav.* (38), str. 581-586.
37. van Vliet, L., Tepper, P., Dijkstra, D., Damsma, G., Wikström, H., Pugsley, T., a další. (1996). *J. Med. Chem.* (39), str. 4233-4237.

38. Feenestra, M., Rollema, H., Dijkstra, D., Grol, C., Horn, A., & Westerink, B. (1980). *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* (313), str. 213-219.
39. Bogoslovova, T., & Staneva-Stoychevna, D. (1988). *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.* (14), str. 39-45.
40. Ishibashi, T., Wakabayashi, J., & Ohno, Y. (2002). *Jpn. Pharmacol.* (89), str. 309-315.
41. Copinga, S., Tepper, T., Grol, C., Horn, A., & Dubocochovic, M. (1991). *J. Med. Chem.* (36), str. 2891-2898.
42. Feenstra, M., Rollema, H., Horn, A., Dijkstra, D., Grol, C., & Westerink, B. (1980). *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* (310), str. 219-225.
43. Lin, C.-H., Pinetree, P., Haadsma, S., Piercey, M., Romero, A., & Darlington, W. (1990). *Mezinárodní patent č. WO90/15047.*
44. Overstreet, D., Stemmelin, J., & Griebel, G. (2008). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, str. 623-626.
45. Stemmelin, J., Cohen, C., Terranova, J., Lopez-Grancha, M., & Pichat, P. (2008). *Neuropsychopharmacology*, str. 574-587.
46. Výroční tisková zpráva Sanofi-Aventis za druhé čtvrtletí 2008.
http://en.sanofi-aventis.com/press/press_releases/2008/ppc_20376.asp (14.4.2011)
47. Reddy, J., Tschaen, D., Shi, Y.-J., Pecoore, V., Katz, L., Greasham, R., a další. (1996). *Journal of Fermentation and Bioengineering* (81), str. 304-309.
48. Nan-Jun, S., Ching-Jer, C., & Cassady, J. (1987). *Phytochemistry* (26), str. 3051-3053.
49. Kaluzna, I., Rozzell, J., & Kambourakis, S. (2005). *Tetrahedron Asymm.* (16), str. 3682-3689.
50. Lépine, J., Goger, J., Blashko, C., Probst, C., Moles, M., Kosolowski, J., a další. (2000). *International Clinical Psychopharmacology* (15), str. 263-271.
51. Haworth, R. (1932). *J. Chem. Soc.*, str. 1125.
52. Pryde, D., Henry, S., & Meyers, A. (1996). *Tetrahedron Letters* (37), str. 3243-3246.
53. Dupau, P., Hay, A.-E., Bruneau, C., & Dixneuf, P. (2001). *Tetrahedron Asymm.* (12), str. 863-867.
54. Solladié-Cavallo, A., Martin-Cabrejas, L., Caravatti, G., & Lang, M. (2001). *Tetrahedron Asymm.* (12), str. 967-969.
55. Świzdor, A., & Kolek, T. (2009). *Biocatalysis and Biotransformation* (27), str. 179-185.
56. Kumaraswamy, G., & Ramesh, S. (2003). *Green Chemistry* (5), str. 306-308.

57. Bräutigam, S., Bringer-Meyer, S., & Weuster-Botz, D. (2007). *Tetrahedron Asymm.* (18), str. 1883-1887.
58. Hussain, W., Pollard, D., & Lye, G. (2007). *Biocatalysis and Biotransformations* (25), str. 443-452.
59. Bigley, F., Daniel, M., & DiPrima, J. (1995). Patent č. 5464762, USA.
60. Manitto, P., Speranza, G., Monti, D., Fontana, G., & Panosetti, E. (1995). *Tetrahedron* (51), str. 11531-11546.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]