

UNIVERZITA KARLOVA

Prírodovedecká fakulta

Katedra Biochémie



DIPLOMOVÁ PRÁCA

Andrea Tóthová

Enzymová hydrolýza α -substituovaných akrylonitrilov

Enzyme hydrolysis of α -substituted acrylonitriles

Praha 2001

Vedúci práce: RNDr. Ján Konvalinka, CSc.

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala samostatne pod vedením školiteľa RNDr. J. Konvalinku, CSc. a všetky použité pramene som riadne citovala.

V Prahe dňa 31. 8. 2001

podpis

Ďakujem svojej konzultantke Ing. L. Martínkovej a svojmu školiteľovi Dr. J. Konvalinkovi za zadanie a vedenie diplomovej práce a za cenné rady a pripomienky. Poďakovanie patrí samozrejme aj Doc. V. Křenovi za pozitívnu motiváciu a tak isto celému pracovnému kolektívu Laboratória biotrasformácií MBÚ AV ČR za podporu a pomoc pri práci na zadanej úlohe, predovšetkým však Ing. Márii Ovesnej, Ing. Veronike Mylerovej a M. Balvínovej.

Za meranie a interpretáciu NMR spektier ďakujem Dr. P. Sedmerovi a Ing. M. Kuzmovi, za meranie a interpretáciu MS spektier Dr. V. Havlíčkovi, Ing. P. Haladovi a Ing. P. Novákovi a za izoláciu produktov preparatívnej HPLC Dr. V. Přikrylovej.

Za prípravu substrátov a návrh spolupracovať na ich biotransformáciách ďakujem laboratóriu Prof. J. Boltého z Univerzity Blaise Pascal v Aubière vo Francúzsku.

No predovšetkým chcem poďakovať svojim rodičom za morálnu a finančnú podporu počas celého môjho štúdia.

Kľúčové slová: Rhodococcus erythropolis; Nitrilhydratáza; Amidáza; rozvetvené a substituované nitrily; Chirálna HPLC; Cross-linked enzymové agregáty.

Keywords: Rhodococcus erythropolis; Nitrile hydratase; Amidase; Branched and substituted nitriles; Chiral HPLC; Cross-linked enzyme aggregates.

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo ověřit schopnost kmene A4 náležejícího do rodu *Rhodococcus* transformovat chirální α -substitutované akrylonitrily, které jsou prekursory stavebních bloků pro syntetickou organickou chemii. Zmíněný kmen produkoval komplex enzymů – nitrilhydratasu a amidasu – umožňující transformaci nitrilů na karboxylové kyseliny s amidy jako intermediáty.

Transformace α -substitutovaných akrylonitrilů byla provedena pomocí celých buněk této bakterie nebo částečně purifikované nitrilhydratasu. Reakční produkty byly izolovány a identifikovány pomocí spektrálních metod jako amidy, kyseliny nebo lakton. Koncentrace substrátů a produktů v reakčních směsích byly sledovány pomocí HPLC na reverzní fázi. Pro tento účel byly vypracovány originální metody, podobně jako metody chirální HPLC, které byly využity ke stanovení enantiomerní čistoty chirálních produktů.

Katalyzátory obsahující celé buňky nebo částečně purifikovanou nitrilhydratasu byly vhodné pro přípravu α -substitutovaných akrylamidů a akrylových kyselin, z nichž některé jsou intermediáty pro syntézu biologicky aktivních látek.

ABSTRACT

The aim of the diploma work was to examine the ability of strain A4 belonging to *Rhodococcus* to transform chiral α -substituted acrylonitriles, which are the precursors of building blocks for synthetic organic chemistry. The aforementioned strain produced a complex of enzymes – nitrile hydratase and amidase – enabling to transform nitriles into carboxylic acids with amides as intermediates.

The transformation of α -substituted acrylonitriles were carried out using whole cells of the bacterium or the partially purified nitrile hydratase. The reaction products were isolated and identified by spectral methods as the corresponding amides, acids or a lacton. The concentrations of the substrates and products in the reaction mixtures were monitored by reversed-phase HPLC. Original HPLC methods were worked out for this purpose, as well as the chiral HPLC methods, which were used to determined the enantiomeric purity of the chiral products.

The catalysts consisting of whole cells or the partially purified nitrile hydratase proved to be suitable for the preparation of α -substituted acrylamides and acrylic acids, some of which are intermediates for the synthesis of biologically active compounds.

DOPORUČENÁ LITERATÚRA

1. Martínková L., Křen V.: Nitrile- and amide- converting microbial enzymes: stereo-, regio- and chemoselektivita, podané do tlače (Review 2001)
2. Martínková L.: Mikrobiální transformace nitrilů, *Chem. Listy* **87**, 187-197 (1993)
3. Přepechalová I., Martínková L., Stolz A., Ovesná M., Bezouška K., Kopecký J. and Křen V.: Purification and characterization of enantioselective nitrile hydratase from *Rhodococcus equi* A4, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 150-156 (2001)
4. Bell K. S., Philp J. C., Aw D. W. J. and Christofi N.: The genus *Rhodococcus*, *J. Appl. Microb.* **85**: 195-210 (1998)
5. DiGeronimo M. J., Antoine A. D.: Metabolism of acetonitrile and propionitrile by *Nocardia rhodochrous* LL100-21, *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 900-906 (1976)

ELEKTRONICKÉ INFORMAČNÉ ZDROJE:

Vyhľadávanie článkov:

1. Databázy: Current Contents
Beilstein
2. <http://www.suwecco.cz>
3. <http://www.PUBMed.net>

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. ZOZNAM SKRATIEK	3
3. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	5
3.1 Rod <i>Rhodococcus</i>	5
3.2 <i>Enzýmy hydrolyzujúce nitrily</i>	5
3.2.1 Nitriláza	5
3.2.2 Nitrilhydratáza	6
3.2.3 Amidáza	7
3.3 <i>Stereoselektívna biotransformácia nitrilov rodom Rhodococcus</i>	8
3.4 <i>Chemoselektívna biotransformácia nitrilov rodom Rhodococcus</i>	11
3.5 <i>Regioselektívna biotransformácia nitrilov rodom Rhodococcus</i>	12
3.6 <i>Priemyslové využitie mikrobiálnej biotransformácie nitrilov</i>	14
3.6.1 Chemický a farmaceutický priemysel	14
3.6.2 Biodegradácia polutantov	14
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	16
4.1 <i>Materiály</i>	16
4.1.1 Mikroorganizmus	16
4.1.2 Kultivačné a udržiavacie média	16
4.1.3 Pufre a ostatné roztoky	16
4.1.4 Chemikálie a materiály	17
4.1.5 Prístroje a zariadenia	20
4.2 <i>Mikrobiologické metódy</i>	21
4.2.1 Uchovávanie mikroorganizmov	21

4.2.2 Kultivácia mikroorganizmov	21
4.2.2.1 Kultivácia v kvapalnom médiu	21
4.2.2.2 Kultivácia na pevnom médiu	21
4.2.3 Sterilizácia	21
4.3 Biotransformácie α-substituovaných akrylonitrilov	22
4.3.1 Stanovenie aktivity buniek <i>Rhodococcus equi</i> A4	22
4.3.2 Biotransformácie katalyzované celými bunkami <i>Rhodococcus equi</i> A4	22
4.3.3 Biotransformácie katalyzované enzýmom nitrilhydratázou z kmeňa <i>Rhodococcus equi</i> A4	23
4.4 Chromatografické metódy	24
4.4.1 Vysokoučinná kvapalinová chromatografia (HPLC)	24
4.4.1.1 HPLC na reverznej kolóne	24
4.4.1.2 HPLC na chirálnej kolóne	25
4.4.2 Tenkovrstvá chromatografia (TLC)	26
4.5 Spektrálne metódy	27
4.5.1 Nukleárna magnetická rezonancia (NMR)	27
4.5.2 Hmotnostná spektrometria (MS)	27
4.6 Izolačné techniky	28
4.6.1 Extrakcia	28
5. VÝSLEDKY A DISKUSIA	29
5.1 Stanovenie nitrilov a produktov ich enzýmovej transformácie	30
5.2 Biotransformácie 2-(3'-butenyl-2'-hydroxy)- akrylonitrilu	33
5.3 Biotransformácie 2-(2'-hydroxy-3', 3'-bis (metoxy) propyl)-akrylonitrilu	35
5.4 Biotransformácie 2-(2'-acetoxy- 3', 3'-bis (metoxy) propyl)-akrylonitrilu	38
5.5 Biotransformácie 2-(2'-acetoxy-1'-hydroxyetyl)-akrylonitrilu	40

5.6 Biotransformácie 2-(2'-hydroxypropyl)-akrylonitrilu	42
5.7 Biotransformácie 2-(2'-fenyl-2'-hydroxymetyl)-akrylonitrilu	44
5.8 Biotransformácie 2-(1'-hydroxybutyl)-akrylonitrilu	47
5.9 Biotransformácie 2-(1'-hydroxyetyl)-akrylonitrilu	49
5.10 Biotransformácie 2-(2',3',4'-trihydroxy-5'-oxyhexanoyl)-akrylonitrilu , 2-(2',3'-dihydroxy-4'-oxypentanoyl)-akrylonitrilu a 2-(2',3',4',5'-tetrahydroxy-hexanoyl)-akrylonitrilu	51
6. ZÁVER	52
7. LITERATÚRA	53

1. ÚVOD

Nitrily sú substituované deriváty kyseliny kyanovodíkovej, ktoré môžu byť prírodného pôvodu, alebo produktami chemických syntéz.

V organickej chémii slúžia ako prekurzory hydrolýzy, ktorou vznikajú amidy a karboxylové kyseliny. Nevýhodou tejto hydrolýzy sú extrémne reakčné podmienky (vysoká teplota, kyslé alebo zásadité pH), pri ktorých u citlivých substrátov dochádza k nežiadúcim vedľajším produktom. Tak isto ako prítomnosť labilnej funkčnej skupiny v substráte sťažuje previesť túto transformáciu, tak aj stereoselektívna a regioselektívna hydrolýza nitrilov je takmer nemožná.

V posledných rokoch sa skúma a nahradzuje chemická konverzia nitrilov biokonverziou pomocou mikroorganizmov, ktoré sú vybavené enzymovým aparátom schopným odbúravať nitrily. Táto schopnosť bola zistená u baktérií, húb, rias, vyšších rastlín, hmyzu, morských húb a cicavcov.²³ V súčasnej dobe je pozornosť zameraná na baktérie zo skupiny aktinomycét (rody *Corynebacterium*,^{46,16} *Rhodococcus*,⁶⁶ *Arthrobacter*,⁶⁸ *Nocardia*¹³ a pod.), ktoré sú schopné degradovať nitrily, to sa využíva ako jedna z možností prípravy amidov, karboxylových kyselín, opticky aktívnych látok a tak isto aj na biodegradáciu polutantov v životnom prostredí.

Mikrobiálna hydrolýza nitrilov prebieha dvomi metabolickými dráhami. Prvá (1) - priama konverzia nitrilu na karboxylovú kyselinu a amoniak - je katalyzovaná nitrilázami. Druhá cesta je dvojstupňová a prebieha v dvoch reakciách, kde v prvej je nitril transformovaný na amid za katalýzy nitrilhydratázy (2) a v druhej - katalyzovanej amidázou - následuje premena amidu na karboxylovú kyselinu a amoniak (3).



Veľkou výhodou týchto biotransformácií je, že prebiehajú za miernych podmienok kde nevznikajú vedľajšie produkty. Reakcie sú stereo- a regiošpecifické a výtťažky sú vyššie ako pri chemickej konverzii.^{50,43}

Použitím týchto biotransformácií je možné pripraviť α -aminokyseliny, α -hydroxykyseliny, 2-arylpropionové kyseliny (tzv. „profény“) a mnoho ďalších

významných látok používaných vo farmaceutickom, kozmetickom, či chemickom priemysle.

Nitrilhydratázová a amidázová aktivita baktérie *Rhodococcus equi* A4 bola v tejto práci využitá k príprave karboxylových kyselín a amidov z nitrilov, ktorých chemická hydrolýza je takmer nemožná. Akrylonitrily substituované v polohe α - s hydroxylovaným postranným reťazcom sú látky veľmi citlivé k drastickým podmienkam chemickej hydrolýzy. Pokusy pripraviť z týchto nitrilov α -substituované akrylové kyseliny chemickou cestou viedli k ich dehydratácii a k vzniku ďalších vedľajších produktov. Oproti tomu sa pre ich prípravu osvedčila enzýmová hydrolýza, popísaná v tejto práci pre radu akrylonitrilov s postranným reťazcom rôznych štruktúr.

2. ZOZNAM SKRATIEK

AcCN	acetonitril
AGP	chirálna kolóna z angl. "Acid Glycoprotein"
APT	protón pridávajúci test z angl. "Attached Proton Test"
BSB	základné minerálne médium
COSY	korelačná spektroskopia z angl. "Correlation Spectroscopy"
DMOA	dimetyloktylamín
d ₆ -DMSO	hexadeutériodimetylsulfoxid
d.e.	diastereomérený výťažok (%)
E	enantiomérený pomer
e.e.	enantiomérený prebytok (%) $e.e. = (S-R) / (S+R) \times 100,$ kde S je koncentrácia S-enantioméru (mM) R je koncentrácia R-enantioméru (mM)
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
ESI	iónizácia elektroprayom
EtOH	etanol
FAB	rýchle bombardovanie atómov z angl. "Fast Atom Bombardment"
FB-aldoláza	fruktóza 1,6-bisfosfátaldoláza
HSA	chirálna kolóna - "Human Serum Albumin"
HPLC	vysokoučinná kvapalinová chromatografia z angl. "High Performance Liquid Chromatography"
KDH	3-deoxy-D-manno-2-heptoulosonová kyselina
KDO	3-deoxy-D-manno-2-oktoulousoňová kyselina
LPS	lipopolysacharidy
MetOH	metanol
MPA	mäsopeptónový agar
MS	hmotnostná spektroskopia z angl. "Mass Spectroscopy"
Na/K-P	sodno-draselný fosfátový pufer
Na-P	sodnofosfátový pufer
NMR	nukleárna magnetická rezonancia z angl. "Nuclear Magnetic Resonance"

OD _{610nm}	optická hustota - suspenzia buniek meraná spektrofotometricky pri 610 nm z angl. "Optical Density"
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovom géle
PPAc	2-fenylpropiónová kyselina
PPAm	2-fenylpropiónamid
PPNi	2-fenylpropiónitril
2-PrOH	2-propanol
<i>R. equi</i> A4	<i>Rhodococcus equi</i> A4
SDS	dodecylsulfát sodný
TIA	acetát 1-thiol-1,2- <i>O</i> -izopropylidénu
TK	transketoláza
TLC	tenkovrstvá chromatografia z angl. "Thin Layer Chromatography"
UV-VIS	ultrafialová spektroskopia vo viditeľnej oblasti

3. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

3.1. ROD *RHODOCOCCUS*

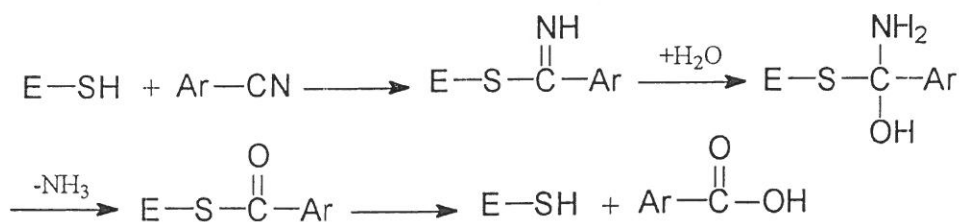
Široké spektrum využívania rodu *Rhodococcus* v enviromentálnej, alebo priemyslovej biotechnológii je zamerané na chemické transformácie a degradácie rovnako tak, ako na syntézy takých produktov ako sú biodetergenty, bioflokulanty, amidy, kyseliny, alebo polyméry. Uplatnenie tohto rodu nájdeme aj v potravinárskom priemysle (napr. pri degradácii limonínu - zlúčeniny horkej chuti, ktorá sa vyskytuje v ovocnom džúse - bakteriálnym kmeňom *Rhodococcus fascians*).

Negatívum tohto rodu je veľké množstvo infekcií u ľudí a zvierat. Napríklad *Rhodococcus rhodochrous* bol izolovaný z chronického rohovkového vredu, *Rhodococcus rhodinii* je prenosným vektorom americkej trypanozómy. U zvierat je *Rhodococcus equi* definovaný ako patogén a spôsobuje dýchacie infekcie vedúce k usmrteniu žriebät koní.⁶

3.2. ENZÝMY HYDROLYZUJÚCE NITRILY

3.2.1 Nitriláza

Systematický názov tohto enzýmu je nitrilaminohydroláza (EC 3.5.5.1). Katalyzuje priamu hydrolyzu nitrilov na karboxylové kyseliny, pri ktorej nevzniká intermediát – amid. Predpokladaný mechanizmus reakcie katalyzovanej nitrilázou je založený na ataku uhlíkového atómu nitrilovej skupiny tiolom a protonácii dusíkového atómu za tvorby tioimidátu (vid' Obr. 1). Ten po reakcii s vodou prechádza na tetrahedrálny intermediát, kde následuje jeho rozpad na amónne ióny a acetylenzým, ktorý je hydrolyzovaný na voľný enzým a kyselinu.⁶⁰

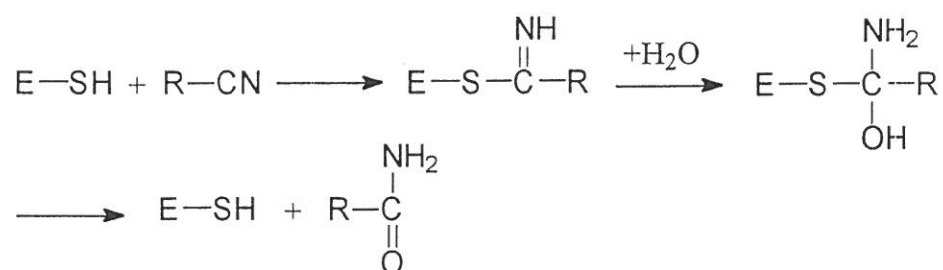


Obr. 1: Mechanizmus reakcie katalyzovanej nitrilázou

Nitrilázy je možné rozdeliť do troch skupín podľa ich substrátovej špecificity na: aromatické, alifatické a arylacetonitrilázy. Na rozdiel od nitrilhydratáz obsahujú nitrilázy spravidlá väčšie množstvo identických podjednotiek a neboli u nich zistené kovové kofaktory. Inhibítormi týchto enzýmov sú ióny ťažkých kovov, močovina a chlorid vápenatý. Optimálne hodnoty pH sa líšia podľa zdroja enzýmu v rozmedzí 7,0-9,1. Optimálna teplota enzýmu je uvádzaná medzi 20 °C až 40 °C. Nitrilázy boli purifikované z baktérií *Rhodococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp. a *Klebsiella pneumoniae* a húb *Gibberella fujikuroi*, *Penicillium chrysogenum* a *Aspergillus niger*.⁵⁷

3.2.2 Nitrilhydratáza

Nitrilhydratáza (EC 4.2.1.84) je enzým podieľajúci sa na premene nitrilovej skupiny na amidovú. Predpokladaný reakčný mechanizmus je znázornený na obr. 2 a spočíva v nukleofilnom ataku nitrilového uhlíku sulfhydrylovou skupinou, kde vzniká komplex imínu s naviazaným enzýmom, ktorý je ďalej hydratovaný na tetrahedrálny intermediát. Ten sa v konečnom kroku rozpadá na amid a voľný enzým.³



Obr. 2: Mechanizmus reakcie katalyzovanej nitrilhydratázou

Najlepšími substrátmi tohto enzýmu sú spravidlá alifatické nasýtené a nenasýtené nitrily, ale sú ním akceptované aj nitrily aromatické, heterocyklické, alebo arylalifatické. Väčšina známych nitrilhydratáz sa skladá z dvoch podjednotiek mierne sa líšiacich v molekulovej hmotnosti. Tie môžu u niektorých enzýmov tvoriť podľa koncentrácie proteínu v roztoku buď heterodimér, alebo heterotetramér.⁵⁴ V molekulách týchto enzýmov nájdeme kovové ióny (Fe^{3+} alebo Co^{3+}) ako prostetické skupiny. Silnými inhibítormi pre tieto enzýmy sú ióny ťažkých kovov, ale najmä fenyldiazín a sulfhydrylové činidlá. Aktivita enzýmu je najväčšia v neutrálnom až mierne alkalickom prostredí do pH 7,8 a už

pri pH nižšom ako 6 vykazuje enzým nízku aktivitu. Optimálna teplota sa pohybuje v rozmedzí 20 °C až 40 °C s výnimkou termofilných nitrilhydratáz, napr. enzýmu z *Bacillus* sp. RAPc8 s optimálnou teplotou 60 °C. Nitrilhydratázy z bakteriálnych kmeňov *Rhodococcus*, *Pseudomonas* a *Agrobacterium*. už boli purifikované.²⁵

3.2.3 Amidáza

Amidáza s aktivitou k primárnym amidom (acylamidamidohydroláza EC 3.5.1.4) sa zúčastňuje na hydrolýze amidov za vzniku karboxylových kyselín, ale aj na prenose acylov na iné nukleofilné činidlá ako hydroxylamín¹⁷, alebo hydrazín²⁹. Jej inhibítormi sú napr. chlorid ortuťnatý, hydroxylamín, kyselina octová a acetaldehyd. Tieto amidázy môžeme rozdeliť do niekoľkých podskupín podľa ich primárnej štruktúry, substrátovej špecifity a enantioselektivity. Hranice jednotlivých podskupín však nie sú jasne definované.

Najväčšia skupina amidáz je tvorená enzýmami charakterizovanými prítomnosťou typickej aminokyselinovej sekvencie – GGSSGG, ktorá je pravdepodobne súčasťou aktívneho centra enzýmu. Ďalšou spoločnou vlastnosťou týchto enzýmov je substrátová špecifita pre alifatické a arylalifatické amidy. Tieto enzýmy často tvoria operón spolu s génmi pre nitrilhydratázu a sú často označované ako „enantioselektívne amidázy“, hoci ich enantioselektivita nebola dokázaná pre túto skupinu. Amidázy s výraznou homológiou aminokyselinových sekvencií boli purifikované z *Rhodococcus* sp.⁴⁴, *Rhodococcus rhodochromus* J1²⁹, *Rhodococcus erythropolis* MP50²² a z ďalších bakteriálnych rodov. Tieto enzýmy väčšinou obsahujú 2-8 identických podjednotiek.

Druhou skupinou sú „širokospektrálne amidázy“, ktoré akceptujú alifatické a aromatické amidy a aminoamidy ako substráty. Tento enzým⁶² je produkovaný rovnakým kmeňom *Rhodococcus* sp. ako enantioselektívne amidázy. Ďalšie amidázy sú označované ako „aromatické“, alebo „alifatické“. Niektoré aromatické amidázy vykazujú veľmi úzku substrátovú špecifitu, ako napr. pre nikotínamid a pyrazínamid, alebo L-karnitínamid²⁴. Nikotínamid hydroláza sa pravdepodobne zúčastňuje metabolizmu NAD.¹⁸

3.3. STEREOSELEKTÍVNA BIOTRANSFORMÁCIA NITRILOV RODOM *RHODOCOCCUS*

Na rozdiel od amidáz boli nitrilhydratázy dlho považované za nestereoselektívne enzýmy.¹⁵ V devädesiatych rokoch však bola popísaná rada stereoselektívnych biotransformácií 2-arylpropiónitrilov celými bunkami baktérií,^{26, 9, 7, 32, 4, 42, 38} hlavne kmeňmi rodu *Rhodococcus*. Spravidla vykazovali tieto konverzie miernu až dobrú enantioselektivitu. Nitrilhydratáza prítomná v imobilizovanom preparáte SP 361, ktorý bol po určitú dobu v poloprevádzkovom režime, vyrábaný firmou NOVO Nordisk, hydratovala s čiastočnou *R*-selektivitou niektoré (*R,S*)-2-arylpropiónitrily substituované na aromatickom jadre, ako napr. (*R,S*)-2-(4'-isobutylfenyl)-propiónitril.⁹ Oproti tomu (*R,S*)-2-(4'-metylfenyl)-propiónitril bol týmto biokatalyzátorom hydratovaný s určitou *S*-selektivitou.⁷ To ukazuje na významný vplyv substituentov na aromatickom jadre na selektivitu nitrilhydratázy. *R*-Selektivita k substituovaným 2-arylpropiónitrilom- 2-(4'-metoxyfenyl)-propiónitrilu a k 2-(4'-chlórfenyl)-propiónitrilu - bola zistená tiež u celobunkového biokatalyzátora *Rhodococcus butanica*.²⁶ Nitrilhydratáza v bunkách *Rhodococcus* sp. predovšetkým transformovala prednostne *R*-enantiomér 6-metoxy- α -metyl-2-naftalénacetonitrilu (naproxénitrilu).³² Prítomnosť čiastočne *S*-selektívnych nitrilhydratáz bola pozorovaná tiež u ďalšieho kmeňa *Rhodococcus* sp., ktorý okrem naproxénitrilu transformoval tiež (*S*)-2-(3'-benzoylfenyl)-propiónitril na príslušný amid. Celé bunky *Rhodococcus equi* vykazovali veľmi dobrú *S*-selektivitu nitrilhydratázy voči 2-(4'-metoxyfenyl)-propiónitrilu.³⁸ V tomto prípade sa opäť potvrdil významný vplyv substituenta aromatického jadra na schopnosť enzýmu rozlíšiť dva izoméry; analogický substrát substituovaný atómom chlóru v polohe 4 bol hydratovaný s omnoho nižšou stereoselektivitou.

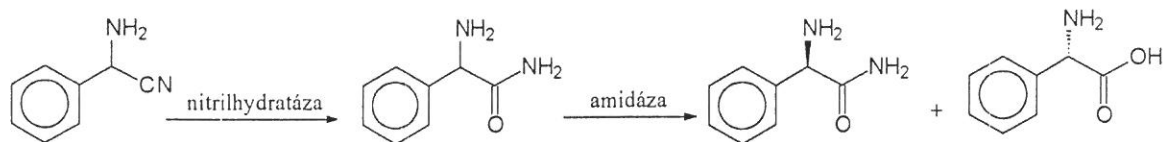
Purifikované stereoselektívne nitrilhydratázy boli popísané až pomerne nedávno: prvé boli enzýmy z *Pseudomonas putida*⁵⁵ a *Agrobacterium tumefaciens*.⁵ Nitrilhydratáza z bakteriálneho kmeňa *Rhodococcus equi* A4 bola prvý krát purifikovaná a charakterizovaná v tomto roku.⁵⁶ Táto nitrilhydratáza z *R. equi* A4 vykazovala najlepšiu enantioselektivitu voči naproxénitrilu a to v prostredí organických kosolventov.

O stereoselektivite nitriláz je zatiaľ k dispozícii ešte menej informácií ako o stereoselektívnych nitrilhydratázach. Väčšina celobunkových biokatalyzátorov popísaných v prácach autorov^{31,33} vykazovala nízke stereoselektivity k

O-acetylmandelonitrilu a 2-fenylpropionitrilu. Ďalšia nitriláza, prítomná v bunkách kmeňa *Rhodococcus rhodochromus* však hydrolyzovala 2-fenylpropionitril s výraznou preferenciou k *S*-izoméru.²⁰ Čiastočne purifikovaná nitriláza z *Pseudomonas fluorescens*³⁴ vykazovala veľmi dobrú stereoselektivitu, v tomto prípade k (*R*)-2-(metoxy)-mandelonitrilu.

Amidázy majú spravidla ďaleko vyššiu stereoselektivitu než enzýmy konvertujúce nitrily a to k substrátom s chirálnym centrom v polohe α -. Vysoko stereošpecifická hydrolyza β - substituovaného amidu – L-karnitínamidu²⁴ - je vzácna. Rada amidáz s aktivitou k primárnym amidom katalyzuje reakcie vedúce k opticky aktívnym látkam významným ako produkty, alebo medziprodukty farmaceutického priemyslu, ako napr. 2-arylpropionové kyseliny (nesteroidné protizapáľové látky). *Rhodococcus butanica* bol použitý pri hydrolyze racemických α -arylpropionitrilov, pričom vznikali opticky čisté karboxylové kyseliny.⁹ *Rhodococcus* AJ270 je vhodným biokatalyzátorom pre hydrolyzu ibuprofénamidu na príslušnú kyselinu. Pri hydrolyze racemického (*R,S*)-2-(4'-izobutylfenyl)propionamidu je uprednostňovaný *S*-enantiomér a vzniká tak *S*(+)-ibuprofén ((*S*)-(+)-2-(4'-izobutylfenyl)propionová kyselina), biologicky aktívny enantiomér, s enantiomérnym prebytkom 90-94 %.⁵⁸

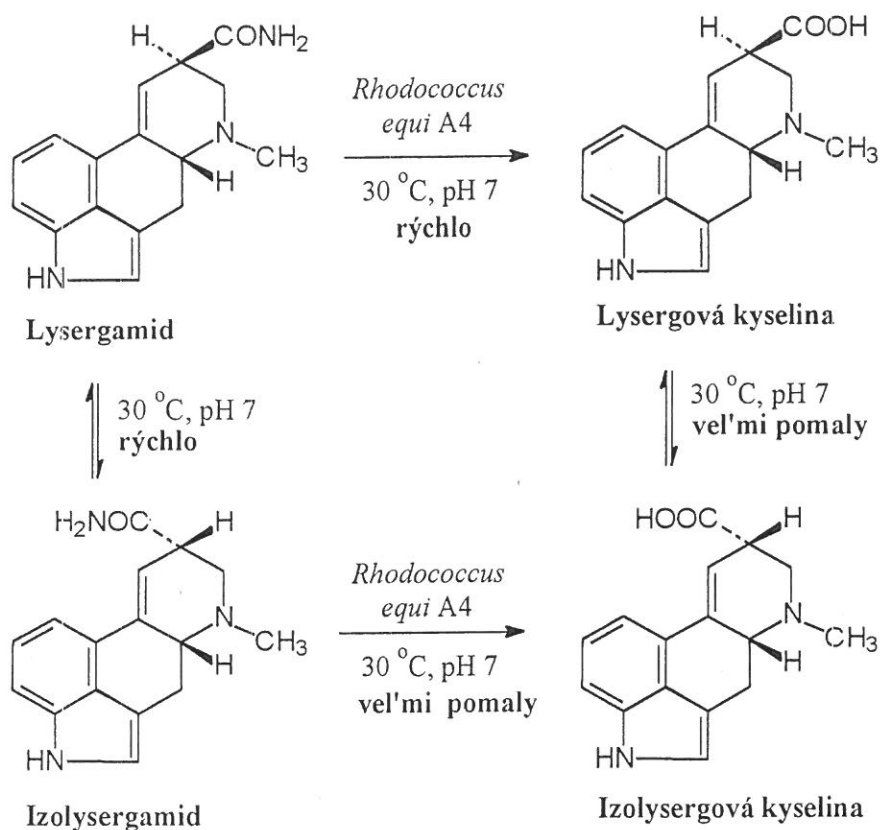
Amidáza izolovaná z *Rhodococcus erythropolis* MP50 je vysoko *S*-selektívna k 2-fenylpropionamidu, naproxénamidu, ketoprofénamidu, 2-aminofenylacetamidu; stereoselektivita k amidom aminokyselín bola negatívna.³² Ďalšie produkty, ktoré vznikajú pôsobením amidáz na racemické amidy, sú opticky čisté aminokyseliny. Racemický D,L-fenylglycinnitril (viz Obr. 3) bol pomocou kmeňa *Rhodococcus* sp., ktorý obsahuje neselektívnu nitrilhydratázu a extrémne L-selektívnu amidázu, transformovaný na D,L-fenylglycínamid a v ďalšom kroku enantioselektívna amidáza konvertovala D,L-fenylglycínamid na D-fenylglycínamid s enantiomérnym prebytkom > 99 % pri konverzii 48 %.



Obr. 3: Hydrolyza D,L-fenylglycinnitrilu baktériou *Rhodococcus* sp.

Príkladom priemyslového uplatnenia amidáz, ktoré zatiaľ nie je veľmi rozšírené, je chirálna diskriminácia (*R,S*)-2,2-dimetylcyklopropénkarboxamidu vedúca k opticky čistému *S*-izoméru tejto látky.⁴¹

Potenciálna aplikácia biokatalyzátora s amidázovou aktivitou je biokatalytická výroba kyseliny lysergovej, dôležitého medzi produktu pri výrobe semisyntetických alkaloidov s rôznorodými farmaceutickými účinkami, ktorá sa vyrába v priemyslovom rozmere hydrolýzou námeľových alkaloidov z poľnej produkcie. Drastické podmienky prípravy vedú k veľkým stratám cenného materiálu. S výbornými výťažkami však môžeme z námeľových alkaloidov získať zmes lysergamidu a isolysergamidu. Kľudové bunky *R. equi* A4 hydrolyzujú lysergamid na lysergovú kyselinu za mierných podmienok. Táto enzymová reakcia vychádza z lysergamidu ((*5R,8R*)-9,10-didehydro-6-metylergolín-8 β -karboxyamid) a isolysergamidu ((*5R,SR*)-9,10-didehydro-6-metylergolín-8 β -karboxyamid) a s vysokou C-8 stereoselektivitou poskytuje vhodnú cestu k lysergovej kyseline ((*5R, 8R*)-9,10-didehydro-6-metylergolín-8 β -karboxylová kyselina). (vid' Obr. 4) Diastereomérený výťažok (d.e.) lysergovej kyseliny (*5R, 8R*) bol 93 % pri 94 % konverzii. Stereoselektivita lysergovej hydrolýzy bola daná vlastnosťou amidázy a nie fenoménom bunkového transportu. Amidáza z bunkového extraktu poskytla d.e. lysergovej kyseliny > 95 % pri 31 % konverzii.⁴⁰



Obr. 4: Konverzia zmesi lysergamidu a izolysergamidu na lysergovú kyselinu kmeňom *Rhodococcus equi* A4

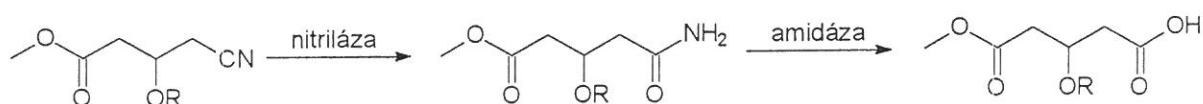
3.4. CHEMOSELEKTÍVNA BIOTRANSFORMÁCIA NITRILOV RODOM *RHODOCOCCUS*

Použitie enzýmov je perspektívnym prístupom k chemoselektívnej konverzii kyanoskupiny substrátov nesúcich ďalšie hydrolyzovateľné skupiny, ako napr. esterové, epoxidové, alebo éterové. Enzýmová hydrolýza týchto skupín môže komplikovať použitie celobunkových biokatalyzátorov. Mikroorganizmy sú totiž veľmi často zdrojom vedľajších enzýmových aktivít (esteráz, epoxidhydroláz).⁵⁹ Esterová aktivita bola napr. zistená v enzýmovom preparáte SP 409 dánskej firmy NOVO obsahujúcom nitrilhydratázu a amidázu ako hlavné enzýmové aktivity.²⁸ Za vhodných podmienok prípravy a použitia celobunkového biokatalyzátora však hydrolýza esterových skupín nemusí predstavovať podstatný problém.

Kľudové bunky *Rhodococcus equi* A4 (voľné, alebo imobilizované v hydrogélach) produkujú z metyl-3-kyanobenzoátu, alebo metyl-4-kyanobenzoátu príslušné hemiestery,

t.j. monometylizoftalát, alebo monometylteraftalát. Príslušné amidy týchto hemiesterov môžeme rovnako získať pomocou tohto celobunkového biokatalyzátora.³⁹ Ten istý biokatalyzátor bol použitý k príprave hemiesterov a ich amidov z metyl (*R,S*)-3-benzoyloxy-4-kyanobutanátu a z metyl (*R,S*)-3-benzyloxy-4-kyanobutanátu (vid' Obr. 5).⁴¹

U tohto biokatalyzátora prevažuje nitrilhydratázová a amidázová aktivita nad nežiadúcou aktivitou esterázovou. Rovnako ďalšie kmene patriace k rodu *Rhodococcus rhodochrous* boli vhodné pre chemoselektívnu hydrolýzu metoxy derivátu benzonitrilu a metyl-4-kyanobenzoátu⁴⁵ a alifatických nitrilov obsahujúcich vo svojej molekule acetálovú a esterovú skupinu.²⁸



1 R = Bz, 2 R = Bn

Obr. 5: Biotransformácia metyl (*R,S*)-3-benzoyloxy-4-kyanobutanátu (1) a metyl (*R,S*)-3-benzyloxy-4-kyanobutanátu (2) kmeňom *Rhodococcus equi* A4

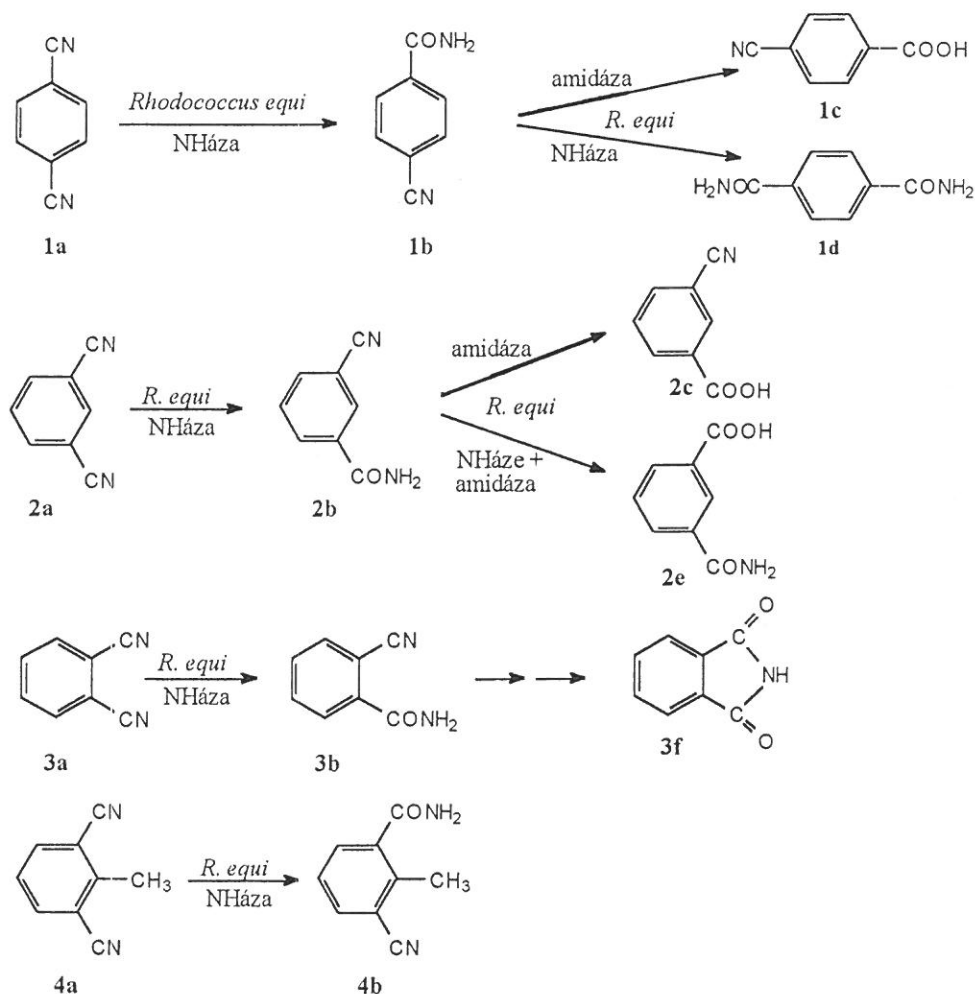
Tento chemoselektívny biokatalyzátor je tiež vhodný pre spracovanie kopolyméru polyakrylových vlákien a vinylacetátu.⁶¹ Nitrilové skupiny sú transformované na amidové, hoci neboli transformované esterové väzby vinylacetátu. Účinnosť farbenia vlákien je výrazne zvýšená prítomnosťou amidových skupín.

3.5 REGIOSELEKTÍVNA BIOTRANSFORMÁCIA NITRILOV RODOM *RHODOCOCCUS*

Princíp regioselektivity nitrilhydratázy *Rhodococcus rhodochrous* AJ270 je aspoň u niektorých substrátov zrejme založený na chelatačnej deaktivácii nitrilhydratázy.⁴⁵ Hydratácia nitrilovej skupiny totiž predchádza vytvoreniu komplexu medzi atómom dusíka v nitrilovej skupine a kovovým kofaktorom nitrilhydratázy (železo alebo kobalt). Karboxylové skupiny v polohách γ -, δ -, ε -, alebo heteroatómy (kyslík, dusíkový atóm v β -, γ -, alebo δ - pozícií, tak isto síra v β -, alebo γ - pozícií substrátu nitrilu) sú schopné

inhibovať nitrilovú hydratáciu počas vytvárania komplexu s kovovým kofaktorom enzýmu; výsledkom je monohydrolyza príslušných α,ω -dinitrilov. Dinitrily s alifatickým reťazcom obsahujúce dvojitú väzbu, alebo aromatické jadro^{14,56} a trans-cyklohexán-1,4-diacetonitril⁴⁵ boli tiež transformované na monoamidy, alebo na monokyseliny.

Biokatalytická hydrolyza α,ω -dinitrilov je perspektívna cesta k príprave kyanokarboxylových kyselín a príslušných laktámov. Regioselektívna chemická hydrolyza totiž vyžaduje zastavenie reakcie pri čiastočnej konverzii (cca 20 %), recykláciu substrátu a opakovanie reakcie.¹⁹ Oproti tomu enzýmová hydrolyza často umožňuje získanie žiadaného produktu v jednom kroku. Produkty hydrolyzy 1, 3- a 1, 4-dikyanobenzénu biokatalyzátorom SP 361 NOVO boli kyseliny 3-, a 4-kyanobenzoová.^{8,12} Použitie tohto kmeňa *Rhodococcus equi* A4 umožnilo pripraviť vedľa týchto látok tiež príslušné amidy a to aj z 1,2-dikyanobenzénu (vid' Obr. 6).³⁷



Obr. 6: Regioselektívna biotransformácia 1,2-dikyanobenzénu použitím kmeňa *Rhodococcus equi* A4

3.6 PRIEMYSLOVÉ VYUŽITIE MIKROBIÁLNEJ KONVERZIE NITRILOV

3.6.1 Chemický a farmaceutický priemysel

Niektoré nitrilhydratázy, nitrilázy a amidázy boli aplikované v priemyselnom rozmere. Množstvo biokatalytických procesov spomínaných v tomto prehľade zostáva zatiaľ priemyslom nevyužitých.

Začiatkom osemdesiatych rokov boli publikované a patentované návrhy mikrobiálnej výroby akrylamidu,^{23,3,64} ktorého ročná chemická výroba v priemysle predstavuje 200 000 ton. Pre výrobu akrylamidu sú vhodné kmene baktérií *Brevibacterium* R 312,²³ *Corynebacterium* N-774⁶⁶ a *Pseudomonas chloraphis* B23³. Biokonverzia je takmer stopercentná a nedochádza tu k vzniku kyseliny akrylovej ako vedľajšieho produktu a predstavuje 30 000 ton ročne.⁵⁰ Podobne ako akrylamid je možné vyrobiť metakrylamid bakteriálnym rodom *Rhodococcus*.^{53,27} Zámenou nitrilhydratázy ako biokatalyzátora za nitrilázu z kmeňa *Rhodococcus rhodochrous* J1 sa získa konverziou akrylonitrilu alebo metakrylonitrilu kyselina akrylová, poprípade metakrylová.⁵¹

Priemyslová výroba 5-kyanoveralramidu, medziproduktu syntézy herbicídov, bola vypracovaná firmou DuPont.²¹

Chemoselektívna enzýmová hydratácia 2-kyanopyridínu poskytuje vitamín nikotínamid, ktorý nie je kontaminovaný kyselinou nikotínovou, ako produkt chemickej výroby.⁴⁹ Tento proces využíva kmeň *Rhodococcus rhodochrous* imobilizovaný v polyakrylamide (rovnaký biokatalyzátor ako pre výrobu akrylonitrilu) a je používaný vo švajčiarskej firme Lonza v množstve 4 000 ton nikotínamidu za rok.

3.6.2 Biodegradácia polutantov

Syntetické nitrily znečisťujúce pôdu a vodu, sú pre cicavce toxické a predstavujú vážny problém pre ekológov. Zdrojom takejto kontaminácie je petrochemický priemysel, výroba plastických hmôt, aplikácia herbicídov a splodiny spaľovania motorových palív. Pri degradácii týchto kontaminantov majú kľúčovú úlohu mikroorganizmy. Kmene baktérie *Corynebacterium* využívajú alifatické nitrily, ktoré sú súčasťou aktivovaného kalu z čistiarní odpadových vôd petrochemického priemyslu.⁴⁶ Kyanamid, používaný ako herbicíd

a hnojivo (produktom jeho metabolickej konverzie je močovina), je odburávaný hubou *Myrothecium verrucaria*.³⁵ Pri odstraňovaní kontaminácie životného prostredia nitrilovými zlúčeninami sa cielene uplatňuje inokulácia znečistených miest mikróbnyimi kultúrami, schopnými odburávať nitrily na netoxické produkty.³⁶

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. MATERIÁLY

4.1.1. Mikroorganizmus

Na katalýzu biotransformácií nitrilov bol používaný bakteriálny kmeň *Rhodococcus equi* A4 zo zbierky Laboratória biotransformácií Mikrobiologického ústavu AV ČR. Tento kmeň bol identifikovaný Referenčným laboratóriom pre Korynebaktérie 3. Lekárskej fakulty UK v Prahe.

4.1.2. Kultivačné a udržiavacie média

Základné minerálne médium (BSB, “basal salts broth”) (v g/l destilovanej vody)¹³: NaCl 0.1, K₂HPO₄ 1.03, KH₂PO₄ 0.75, EDTA 0.015, MgSO₄·7H₂O 0.2, CaCl₂·2H₂O 0.031, ZnSO₄·7H₂O 0.0067, MnSO₄·H₂O 0.0013, FeSO₄·7H₂O 0.0015, CoCl₂·6H₂O 0.00049, CuSO₄·5H₂O 0.00072, NaMoO₄·2H₂O 0.00045, glycerol 10. Hodnota pH bola upravená na 7.0 40 % KOH. Roztoky MgSO₄ a CaCl₂ sa sterilizovali osobitne a pridávali sa do sterilného média za aseptických podmienok (1 ml/100 ml média). Ako zdroj uhlíku bol v experimente použitý glycerol, ktorý bol pridávaný do BSB média pred sterilizáciou vo výslednej koncentrácii 10 mM. Zdrojom uhlíku bol acetonitril vo výslednej koncentrácii 20 mM, pridávaný po sterilizácii.

Mäsopeptónový agar (MPA) (v g/l destilovanej vody)⁶⁵: Bacto beef extract (Difco) 3, peptón 10, NaCl 5, agar 25, pH upravené na 7.1 (40 % KOH).

4.1.3. Pufre a ostatné roztoky

54 mM Na/K fosfátový pufer, pH 7.5, podľa Sørensen:

Roztok A - Na₂HPO₄·12H₂O 19.33 g/l

Roztok B - KH₂PO₄ 7.35 g/l

Roztoky A a B sa zmiešajú v pomere 85:15

10 mM sodnofosfátový pufer (Na - P) + 1 mM dimetyloktylamín (DMOA), pH 7.0

Roztok A - Na₂HPO₄ · 12 H₂O 3.6 g/l

Roztok B - NaH₂PO₄ · H₂O 1.4 g/l

Roztoky A a B sa zmiešajú v pomere 3:2, DMOA sa pridá v množstve 200 μl/l, t.j. do výslednej koncentrácie 1 mM.

100 mM Na - P, pH 7.0

Roztok A - Na₂HPO₄ · 12 H₂O 35.8 g/l

Roztok B - NaH₂PO₄ · H₂O 13.8 g/l

Roztoky A a B sa zmiešajú v pomere 3:2.

Fyziologický roztok: NaCl 8.5 g/l

Detekčný roztok pro TLC: 5 % H₂SO₄ v etanole

4.1.4. Chemikálie a materiály

Ako substráty biokonverzií boli použité tieto α -substituované akrylonitrily (vid' Ob. 7) poskytnuté Univerzitou B. Pascala (Aubière, Francúzsko):

1a : 2-(2'-hydroxy-3'-butenyl)-akrylonitril,

2a : 2-(2'-hydroxy- 3', 3'-bis(metoxy)propyl)-akrylonitril,

3a : 2-(2'-acetoxy- 3', 3'-bis (metoxy) propyl)-akrylonitril,

4a : 2-(2'-acetoxy-1'-hydroxyetyl)-akrylonitril,

5a : 2-(2'-hydroxypropyl)-akrylonitril,

6a : 2-(2'-fenyl-2'-hydroxymetyl)-akrylonitril,

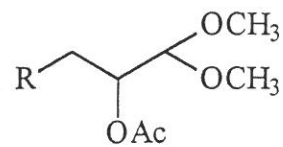
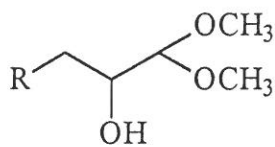
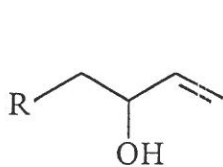
7a : 2-(1'-hydroxyetyl)-akrylonitril,

8a : 2-(1'-hydroxybutyl)-akrylonitril,

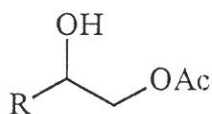
9a : 2-(2',3',4'-trihydroxy-5'-oxyhexanoyl)-akrylonitril,

10a : 2-(2', 3'-dihydroxy-4'-oxypentanoyl)-akrylonitril,

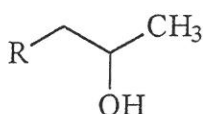
11a : 2-(2',3',4',5'-tetrahydroxy-hexanoyl)-akrylonitril.



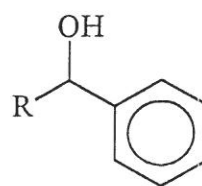
1a



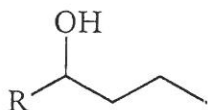
2a



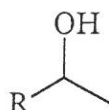
3a



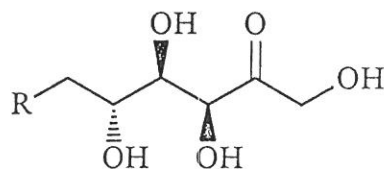
4a



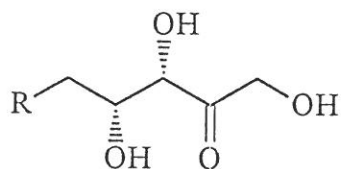
5a



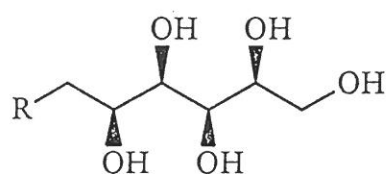
6a



7a

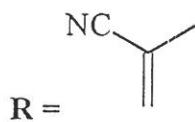


8a



9a

10a



11a

Ob. 7: Substráty biokonverzií využívané v tejto práci

Rozpúšťadlá :

Metanol (suchý redestilovaný), etanol, hexán, dichlormetán a chloroform (redestilované), etylester kyseliny octovej (redestilovaný), metanol, 2-propanol a acetonitril (pre HPLC; Merck), *d*₆-DMSO (Chromservis, ČR), nitrobenzylalkohol (Sigma, USA). Použitá voda bola čistená prístrojom MiliQ (Millipore).

Enzým:

Nitrilhydratáza (EC 4.2.1.84) bola purifikovaná z kmeňa *Rhodococcus equi* A4⁵⁶ a skladovaná pri -70 °C ako roztok proteínu v Tris/HCl pufru, pH 7,5 (1,49 mg proteínu /ml).

Chromatografické kolóny:

chirálné analytické - AGP 100.4, 100 x 4 mm, 5µm silikagél (ChromTech, Švédsko),
HSA 100.4, 100 x 4 mm, 5µm silikagél (ChromTech, Švédsko)
reverzná analytická - Nova-Pak C18, 5µm, 3.9 x 150 mm (Waters Associates, USA)
reverzná preparatívna - Nukleosil 120-5µm, C18, 250 x 4 mm (Watrex, ČR)

Ostatné použité chemikálie boli získané z komerčných zdrojov a s najvyšším stupňom dostupnej čistoty.

4.1.5. Prístroje a zariadenia

pH meter WTW pH 90 D812 (Weilheim, Nemecko)
UV-spektrofotometer 1202 (Shimadzu, Japonsko)
Centrifúga J2-21 (Beckman, USA)
Mikrocentrifúga 12VDC (Denver Instrument Company, USA)
Mikrocentrifúga Mini Spin Plus (Eppendorf, Nemecko)
Analytické váhy AE200 (Mettler, SRN)
Trepáčka, priemer 17 mm, 220 ot./min. (Vývojové dielne ČSAV, ČR)
Thermomixer Compact 5350 (Eppendorf-Hamburg, Nemecko)
Thermomixer Comfort 22331 (Eppendorf-Hamburg, Nemecko)
Očkovací box MSC 9 (Jouan, Francúzsko)
Čerpadlo s riadiacou jednotkou Waters 600 Controller (Waters Associates, USA)
Detektor PDA 996 (Waters, USA)
Detektor RI (Waters, USA)
Autosampler 717 Plus (Waters, USA)
Injektor Rheodyne model 7725 (Rheodyne Inc., USA)
Vákuová pumpa DOA V130NB (Waters-Millipore, USA)
SP 8800 ternárna gradientová pumpa (Spectra Physics, USA)
SP 8800 autosampler (Spectra Physics, USA)
Spectra Focus scanning UV/VIS detector (Spectra Physics, USA)
SP 8810 Ti pumpa (Spectra Physics, USA)
UV lampa CAMAG (Mettenz, Švajčiarsko)
NMR spektrometer Varian INOVA- 400 (Varian Inc., USA)
FAB MS: Finnigan MAT 95 (Finnigan MAT, Nemecko)
ESI MS: LCQ^{DECA} Finnigan (ThermoFinnigan San Jose, USA)
Parný sterilizátor PS 261A (Chirana, ČR)
Lyofilizátor LYOVAC GT2 (Leybold-Heraeus, Nemecko)
Prístroj na výrobu vody pro HPLC: Milli-Q reademic (Millipore.S.A., Francúzsko)
Vákuová odparka BÜCHI Vacuum Controller V-800, Rotavapor R-200, Heating Bath B-490 (Švajčiarsko)
Vodný kúpeľ VL-05 (ÚOCHB, ČR)
Hardware: PC AT Pentium II 466 MHz, 64 MB RAM
Software: Millennium Chromatography Manager 2.0, Spectra System DOS-OS2, Microsoft Word 97, Microsoft Excel 97, Chem Window 5.0

4.2. MIKROBIOLOGICKE METODY

4.2.1. Uchovavanie mikroorganizmu

Mikroorganizmus *R. equi* A4 bol uchovavany na „šikmom“ mäsopeptonovom agare MPA (zloženie pôdy – vid' oddiel 4.1.2) v chladničke pri 4 °C po dobu troch mesiacov. Po uplynutí tejto doby bol vždy preočkovaný.

4.2.2. Kultivácia mikroorganizmu

4.2.2.1. Kultivácia v kvapalnom médiu

Bakteriálna populácia bola submerzne kultivovaná v 500 ml Erlenmeyerových bankách so 100 ml minerálneho média BSB (vid' oddiel 4.1.2), ktoré obsahovalo glycerol ako hlavný uhlíkový zdroj a acetonitril ako jediný dusíkový zdroj (v konečnej koncentrácii 20 mM), za aerobných podmienok pri teplote 30 °C na rotačnej trepačke (220 ot./min.). 100 ml sterilného média v 500 ml bankách bolo inokulované kultúrou *R. equi* A4 z MPA agaru, resuspendovanou v 10 ml sterilného fyziologického roztoku, s východnou hodnotou $OD_{610nm} = 0.06$. Kultivácia trvala približne 24 hod. ($OD_{610nm} = 1.5$), kedy bunky *R. equi* A4 vykazujú najväčšiu nitrilhydratázovú aktivitu. Získaná biomasa bola odstredená na centrifúge (5000 ot./min., 25 min., 4 °C) a dvakrát premytá 54 mM Na/K-fosfátovým pufrom s pH 7.5 a znova odstredená. Časť kľudových buniek bola použitá k stanoveniu aktivity (vid' oddiel 4.3.1) a zvyšná časť bola skladovaná pri teplote -18 °C.

4.2.2.2. Kultivácia na pevnom médiu

„Šikmý agar“- MPA (vid' oddiel 4.1.2) bol používaný pre uchovavanie mikroorganizmu *R. equi* A4 a inokuláciu kvapalného média. Agar bol po zaočkovaní jednou kľučkou odobranou z pevného média MPA s kultúrou *R. equi* A4 inkubovaný po dobu 48 hod. v termostate pri teplote 28 °C.

4.2.3. Sterilizácia

Všetky pôdy, pufre, roztoky a laboratorne sklo používané pri sterilnej práci s mikroorganizmom boli sterilizované v parnom sterilizátore za podmienok: 100 kPa, 30 min., pri teplote 120 °C.

4.3. BIOTRANSFORMÁCIE α -SUBSTITUOVANÝCH AKRYLONITRILOV

4.3.1. Stanovenie aktivity buniek *R. equi* A4

Odstredené bunky boli resuspendované v 54 mM Na/K-P pufrí, pH 7,5, na $OD_{610nm}=0.5$. Reakčná zmes v mikroskúmavke (Eppendorf) bola zložená z 50 μ l 10 mM substrátu 2-fenylpropiónnitrilu (PPNi; vo výslednej koncentrácii 0,625 mM) a 750 μ l suspenzie buniek. Reakcia prebiehala v Thermomixéri Compact (Eppendorf, Nemecko) pri 32 °C a 850 otáčkach za minútu. Vzorky boli odoberané po 5, 10 a 15 minútach a reakcia bola ukončená pridaním 1/10 objemu 1M roztoku kyseliny chlorovodíkovej. Bunky boli odstredené na mikrocentrifúge Mini Spin Plus (Eppendorf, Nemecko). Získané vzorky boli riedené 25-krát a analyzované na HPLC spolu so štandardmi PPNi, kyselinou 2-fenylpropiónovou (PPAc) a 2-fenylpropiónamidom (PPAm) o koncentrácii 0,1 mM. HPLC analýza prebiehala za podmienok zhrnutých v kapitole Chromatografické metódy (vid' oddiel 4.4.1.1). Retenčné časy daných látok boli 2,1 min. (PPAm), 3,3 min. (PPAc) a 6,0 min. (PPNi). Aktivita buniek vhodných pre biotransformácie bola okolo 1 μ mol spotrebovaného PPNi/min./mg sušiny buniek pri 30 °C a pH 7.5.

4.3.2. Biotransformácie katalyzované celými bunkami *R. equi* A4

Odstredené bunky boli resuspendované v 54mM Na/K-fosfátovom pufrí, pH 7.5 na OD_{610nm} medzi 2,5 - 20. Hodnota $OD_{610nm} = 1$ odpovedá 22 mg sušiny/100 ml. Konkrétne hodnoty koncentrácie buniek sú uvedené pri jednotlivých biotransformáciách (vid' kapitola 5). Suspenzia buniek bola preinkubovaná v mikroskúmavkách (Eppendorf) na Thermomixéri Compact alebo Comfort 5 min. pri teplote 32 °C a otáčkach 850 rpm. Reakcia začala pridaním príslušného substrátu zo 100 mM zásobného roztoku a prebiehala za rovnakých podmienok ako preinkubácia. Počiatočné koncentrácie substrátov v reakčných zmesiach sú uvedené v kapitole 5. Vzorky boli odoberané v rôznych časových intervaloch po 200 μ l a reakcia bola ukončená prídavkom 20 μ l 1M HCl. Bunky boli následne odstredené mikrocentrifúgou (Mini Spin Plus, Eppendorf). Získané vzorky boli analyzované TLC a HPLC (vid' kapitola 5).

4.3.3. Biotransformácie katalyzované enzýmom nitrilhydratázou z kmeňa *R. equi* A4

Biotransformácie niektorých α -substituovaných akrylonitrilov boli uskutočnené pomocou nitrilhydratázy. Enzým (1,5 – 7,3 mg proteínu/ml reakčnej zmesi) bol najprv 5 minút preinkubovaný spolu s 54mM Na/K-fosfátovým pufrom, pH 7.5 v Thermomixéri pri 32 °C a otáčkach 850 rpm, potom bol do reakcie pridaný substrát o danej koncentrácii zo 100 mM zásobného roztoku. Koncentrácie enzýmu a počiatočné koncentrácie substrátov v reakčných zmesiach sú uvedené v kapitole 5. Vzorky boli odoberané v rôznych časových úsekoch po 100 μ l. Reakcia bola ukončená pridaním 10 μ l 1M HCl a odstredení vyzrážaných proteínov na mikrocentrifúge (vid' oddiel 4.1.5). Vzorky boli analyzované metódami TLC a HPLC (vid' oddiel 5.1).

4.4. CHROMATOGRAFICKÉ METÓDY

4.4.1. Vysokoučinná tlaková chromatografia (HPLC)

4.4.1.1. HPLC na reverznej kolóne

Princíp separácie je založený na rozdelení látok medzi nepolárnou fázou kolóny a polárnou mobilnou fázou. Jednotlivé látky sú eluované v poradí klesajúcej polarity. Na analýzu bol použitý systém HPLC Millenium Chromatography Manager 2.0, vybavený pumpou 600 Controller, detektorom PDA 996, injektorom Rheodyne a autosamplerom 717 Plus od firmy Waters Associates, USA. Mobilná fáza bola prefiltrovaná cez membránový filter 0,22 μm na vákuovej pumpe DOA V130NB, čím bola zbavená nečistôt a zároveň odplynená. Vzorky boli spravidla riedené na koncentráciu 0,1-0,5 mM. Množstvo stanovených látok bolo určené integráciou a porovnaním so signálmi štandardných roztokov o koncentrácii 0,1 mM. Podmienky analýzy sú zahrnuté v nasledujúcej Tabuľke 1 a získané výsledky zhrnuté v oddieli 5.1 a Tabuľke 5.

Tabuľka 1: Podmienky analýzy pre HPLC na reverznej kolóne

kolóna	Nova-Pak C ₁₈ , 3,9 x 150 mm, 5 μm ,
mobilná fáza	10 % acetonitril vo vode (+ 0,1 % H ₃ PO ₄) 40 % acetonitril vo vode (+ 0,1 % H ₃ PO ₄)
tlak na kolóne	800 – 1300 psi = 5,49 – 8,1 Mpa
objem nástreku	10 μl
prietok mobilnej fázy	0,9 ml/min.
doba analýzy	10 – 30 min.
teplota	35 °C
UV detekcia	210 nm

Preparatívnou HPLC boli izolované karboxylové kyseliny **1c** a **2c**. Analýza bola uskutočnená za podmienok uvedených v Tabuľke 2 na HPLC modulárnom systéme firmy Spectra Physics (San Jose, USA) vybaveným SP 8810 Ti pumpou, injektorom Rheodyne so slučkou 100 μl a Spectra 100 UV-VIS detektorom (variabilná vlnová dĺžka) s použitím softwaru DOS-OS2. Retenčné časy separovaných látok sú uvedené v Tabuľke 7 a 8.

Tabuľka 2: Podmienky pre preparatívnu HPLC na reverznej kolóne

kolóna	C18, 250 x 8 mm, Nucleosil 120-5 μm
mobilná fáza (v/v)	7 % (obj.) acetonitrilu vo vode 10% (obj.) acetonitrilu vo vode (s 0,1 % CH_3COOH)
stacionárna fáza	Nucleosil 120-5 μm
tlak na kolóne	34 bar = 3,4 MPa
objem nástreku	100 μl
prietok mobilnej fázy	1 ml/min.
doba analýzy	10- 15 min.
teplota	laboratórna

4.4.1.2. HPLC na chirálnej kolóne

Na separáciu enantiomérov substrátov **6a** a **7a** bola použitá analýza na chirálnej kolóne v už opísanom systéme HPLC firmy Waters (vid' oddiel 4.4.1.1). Vzorky boli danou mobilnou fázou (vid' Tabuľka 3) nariedené na koncentráciu 0,2 mM a množstvo stanovených látok určené integráciou porovnávané so štandardmi o koncentrácii 0,2 mM. Chirálna kolóna bola pred analýzou premývaná fázou cca 3 hodiny. Analýza prebiehala za podmienok zhrnutých v Tabuľke 3. Po ukončení analýzy bol použitý 15 % roztok 2-propanolu vo vode na premývanie kolony AGP, alebo 8 % roztok propanolu vo vode na premývanie kolóny HSA (cca 1,5 hodiny). Po premytí boli kolóny uskladnené v chladničke pri 4 °C. Retenčné časy separovaných látok sú uvedené v Tabuľke 6.

Tabuľka 3: Podmienky analýzy HPLC na chirálnej kolóne

kolóna	Chiral-AGP 100.4, 100 x 4 mm (5 μm silikagél) Chiral-HSA 100.4, 100 x 4 mm (5 μm silikagél)
mobilná fáza	10 mM Na-P + 1 mM DMOA, pH 7.0 (pre kolónu AGP) 100 mM Na-P, pH 7.0 (pre kolónu HSA)
tlak na kolóne	750 psi = 5,15 Mpa
objem nástreku	10 μl
prietok mobilnej fázy	0.9 ml/min.
doba analýzy	20 - 40 min.
teplota	laboratórna
UV detekcia	210 nm

4.4.2. Tenkovrstvá chromatografia (TLC)

Tenkovrstvá chromatografia bola využitá k sledovaniu priebehu všetkých uskutočnených reakcií. Touto chromatografickou metódou je možné rýchlo a jednoducho detekovať prítomnosť organických látok, tak isto amidov a kyselín vzniknutých biotransformáciou α -substituovaných akrylonitrilov. Stacionárnou fázou pre TLC boli doštičky s tenkou vrstvou silikagélu a fluorescenčným indikátorom F₂₅₄ (Merck) a mobilné fázy; vyvíjacie sústavy zahrnuté v nasledujúcej Tabuľke 4.

Tabuľka 4: Mobilné fázy pre TLC chromatografiu

Sústava	Zloženie zmesi	Doba vyvíjania (min.)
I	CHCl ₃ : MetOH (10 : 1)	8-9
II	CH ₂ Cl ₂ : MetOH (10 : 1)	10
III	CHCl ₃ : MetOH (8 : 2)	8-9
IV	CHCl ₃ : MetOH (7 : 3)	9-10
V	2-PrOH : H ₂ O : NH ₃ (7 : 2 : 1)	15
VI	CHCl ₃ : MetOH : EtOH : H ₂ O (2 : 4 : 1 : 1)	20

Testované boli všetky vyvíjacie sústavy, no ako najlepšie deliace s relatívne najkratšou dobou vyvíjania sa osvedčili I, II, III. Mobilné fázy IV, V a VI boli používané v opakovanom vyvíjaní, pretože po prvom vyvíjaní sa dané látky od seba nedostatočne oddelili a ako druhé negatívum týchto fáz sa ukázalo posunutie oddelených látok do čela mobilnej fázy. Vzorky a štandardy o koncentrácií 25 mM boli nanášané kapilárkou a po vyvíjaní v mobilnej fáze detekované pod UV lampou (254 nm), alebo následne detekované vo vyvíjacom roztoku (vid' oddiel 4.1.3) a zahriate na 100 °C. Ako UV aktívna látka bol stanovený substrát **6a** a produkty jeho biotransformácie (**6b**, **6c**).

4.5. SPEKTRÁLNE METÓDY

4.5.1. Nukleárna magnetická rezonancia (NMR)

NMR spektrá boli merané na spektrometri Varian INOVA - 400 (pozorovacia frekvencia 399.90 MHz pre ^1H , 100.56 MHz pre ^{13}C) v d_6 -DMSO (vid' kapitola 2) pri teplote 30°C . Ako vnútorný štandard slúžil zvyškový signál rozpúšťadla (δ_{H} 2.50, δ_{C} 39.6). Chemické posuny a interakčné konštanty v ^1H NMR spektrách boli odpočítané zo spektier získaných doplnením dát o dvojnásobný počet bodov pamäti a pred Fourierovou transformáciou vynásobených vážiacich funkcií zvyšujúcich rozlíšenie (exponenciála so záporným exponentom plus Gaussová funkcia). Pri ^{13}C NMR spektrách bolo naopak použité umelé rozšírenie čiar (1 Hz) kvôli zvýšeniu pomeru signál/šum. Chemické posuny sú uvádzané v δ -stupnici (ppm), interakčné konštanty v Hz. Použité digitálne rozlíšenie (0.05 a 0.67 Hz pre ^1H resp. ^{13}C) oprávňuje k udávaniu chemických posunov protónov s platnosťou na tri, pri uhlíku na dva a protónových interakčných konštánt na jedno desatinné miesto.⁶³

4.5.2. Hmotnostná spektrometria (MS)

Molekulová hmotnosť produktov biotransformácií (vid' oddiel 4.1.4) bola meraná na spektrometri Finnigan Mat 95 (Nemecko). Produkty boli podrobené ionizácií rýchlymi atómami FAB (vid' kapitola 2), ako zdroj neutrálnych častíc bol použitý Xe. Urýchľovacie napätie bolo 5 kV a ako používané matrice slúžili glycerín a nitrobenzylalkohol.

Niektoré produkty (vid' kapitola 5) boli zmerané na LCQ DECA spektrometri Finnigan. Ku generovaniu pozitívnych a negatívnych iónov bola použitá iónizácia elektrosprejom (ESI) (vid' oddiel 2) pri iónizačnom napätí 3 kV. Vzorky boli rozpustené v zmesi metanol : voda v pomere (1:1) a zavádzané do ESI iónového zdroja pomocou nehrdzavej kapiláry.

4.6. IZOLAČNÉ TECHNIKY

4.6.1. Extrakcia

Po ukončení reakcie bolo pH média upravené v prípade izolácie amidov pomocou 1M NaOH na hodnotu pH 8.3. V prípade izolácie kyselín bolo pH média upravené použitím 1M HCl na hodnotu pH 2. Potom bola uskutočnená trojnásobná extrakcia etylacetátom. Etylacetátové frakcie boli spojené, vysušené bezvodým síranom sodným, zfiltrované a odparené na vákuovej odparke. Produkty boli analyzované HPLC, TLC, NMR a MS (vid' kapitola 5).

5. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Skupina nitrilov, ktoré boli popísané ako substráty rôznych nitrilhydratáz a nitriláz, obsahujú stovky látok. Patria medzi ne nitrily alifatické - nasýtené aj nenasýtené, aromatické, heteroaromatické, arylalifatické aj alicyklické. K biokatalyzátorom s neobvykle širokou substrátovou špecifitou patria bunky kmeňa *R. equi* A4 a nitrilhydratáza z neho purifikovaná, ktorá je používaná v tejto práci. Doposiaľ bolo nájdených viac ako 60 nitrilov, ktoré sú touto nitrilhydratázou transformované na príslušné amidy.^{37, 38, 39, 41, 56} Cieľom nižšie popísaných pokusov je rozšíriť poznatky o substrátovej špecifite nitrilhydratázy a amidázy z bakteriálneho kmeňa *R. equi* A4.

Jedným z prvých popísaných substrátov bakteriálnych nitrilhydratáz je akrylonitril. Skutočnosť, že k tomuto nitrilu vykazovali mnohé nitrilhydratázy (z *Rhodococcus* sp. N-774, *Rhodococcus* sp. J-1 a *Pseudomonas chlororaphis* B23,⁵⁰ vysokú aktivitu, bola využitá v priemyselnej výrobe akrylamidu. Predpokladom úspešného výrobného postupu bolo aj to, že akrylamid nebol enzýmovým systémom spomínaných baktérií ďalej hydrolyzovaný a nevznikala tak kyselina akrylová ako nežiadúci kontaminant produktu.

O biotransformáciach α -substituovaných akrylonitrilov (viď Obr. 7) nebolo však zatiaľ nič publikované. Tieto látky sú pri tom užitočnými intermediátmi organických syntéz, medzi ktoré patria tiež postupy vedúce k biologicky aktívnym látkam ako sú laktóny, alebo ulosonové kyseliny. Tak ako aj nitrilhydratáza, tak aj celé bunky mikroorganizmu *R. equi* A4 boli pre svoju širokú substrátovú špecifitu perspektívnymi biokatalyzátormi pre transformácie akrylonitrilov substituovaných v polohe α - na príslušné amidy a eventuálne karboxylové kyseliny (v prípade využitia celobunkového biokatalyzátora). V niektorých prípadoch bola konverzia nitrilov na amidy v preparatívnej príprave uskutočnená pomocou celých buniek. Tento spôsob je výhodný pre oveľa nižšiu náročnosť, aj cenu prípravy celobunkového biokatalyzátora.

Nižšia aktivita nitrilhydratázy voči substrátom testovaným v tejto práci v porovnaní s alifatickými nitrilmi (napr. propiónnitrilom;⁵⁶) nie je prekvapivá, lebo elektróny dvojitej väzby môžu znižovať reaktivitu nukleofilnej kyanoskupiny pri hydratácii nitrilu. Významnú úlohu môžu hrať tiež sterické vplyvy (vetvenie uhlíkatého reťazca a prítomnosť objemných funkčných skupín).

5.1. Stanovenie nitrilov a produktov ich enzýmovej transformácie

Pre stanovenie substrátov a produktov biokonverzií bolo potrebné zvoliť vhodné metódy kvapalinovej HPLC (na reverznej a na chirálnej kolone) a TLC. Vzhľadom k tomu, že sa jedná o látky, u ktorých neboli analytické metódy v literatúre doposiaľ uvedené, bola príslušná metodika vypracovaná v rámci tejto štúdie. Taktiež boli vypracované metódy reverznej HPLC pre väčšinu substrátov (nitrily **1a - 8a**) a niektoré amidy (**1b, 2b, 5b - 8b**) a karboxylové kyseliny (**1c, 2c, 5c-8c**) (viď Tab. 5). U ostatných látok, kde sa zatiaľ nepodarilo nájsť vhodné metódy separácie nitrilov od amidov a karboxylových kyselín pomocou HPLC na reverznej kolóne (napr. z dôvodov vysokej polarita látok), boli k monitorovaniu biotransformácií a kontrole čistoty produktov využité metódy tenkovrstvej chromatografie, t.j. zvolené vhodné mobilné fázy pre separáciu látok na tenkej vrstve silikagélu (viď Tab. 4). Priradenie pík (v prípade HPLC) a škvŕn (v prípade TLC) v chromatogramoch k príslušným látkam vyžadovalo izoláciu produktov a ich identifikáciu pomocou spektroskopických metód (NMR a MS). Pomocou týchto meraní, ktoré boli uskutočnené v Laboratóriu molekulárnej štruktúry Mikrobiologického ústavu AV ČR, boli stanovené štruktúry takmer všetkých produktov transformácií. ^{13}C NMR umožnila jasne rozlíšiť nitrily od produktov biotransformácií, avšak v oblasti rezonancií skupín CONH_2 a COOH dochádza k vzájomným prekryvom, čo znemožňuje ^{13}C NMR spektrometrii určiť príslušnú skupinu amidu, alebo kyseliny. V ^1H NMR spektrách meraných v rozpúšťadlách (DMSO) potlačujúcich výmenné procesy, amidové protóny neboli magneticky ekvivalentné. V prípade látok, u ktorých boli tieto amidové protóny detekované, tak bolo možné odlišiť amidy a kyseliny pomocou ^1H NMR. Veľmi spoľahlivo boli od seba odlišené nitril, amid a kyselina pomocou MS, keďže tieto látky sa od seba líšia či už molekulovými hmotnosťami, tak aj elementárnym zložením.

S chirálnymi chromatografickými kolónami, ktoré boli k dispozícii (t.j. Chiral-AGP a Chiral-HSA), boli vypracované metódy pre rozlíšenie enantiomérov u substrátov **6a** a **7a** (viď Tab. 3). Tieto kolóny však neboli vhodné pre rozlíšenie enantiomérov príslušných amidov (**6b, 7b**) a karboxylových kyselín (**6c, 7c**) a ani ostatných nitrilov. Identifikovanie izomérov (*R*, *S*) bolo mimo rámec tejto práce. Separácia aspoň dvoch substrátov nitrilhydratázy však umožnila predbežný záver o nízkej enantiosektivitve nitrilhydratázy k substrátom so stereogenným uhlíkom v polohe β - vzhľadom ku kyanoskupine (viď oddiel 5.7 a 5.8).

Tab. 5: Separácia nitrilov, amidov a karboxylových kyselín pomocou HPLC na reverznej kolóne

Zlúčenina ^a	Mobilná fáza	Retenčný čas (min.)
1a	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	6,0
1b	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	3,4
1c	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	2,1
2a	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	6,0
2b	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	3,4
2c	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	2,1 a 1,3 ^b
3a	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	42,1
4a	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	3,6
4d	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	1,8
5a	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	3,0
5b	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	2,7
5c	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	2,2
6a	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	26,4
6b	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	12,0
6c	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	5,3
7a	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	2,9
7b	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	2,0
7c	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	1,6
8a	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	2,8
8b	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	2,1
8c	10 % acetonitril + 0,1 % H ₃ PO ₄	1,5

^a vid' Obr. 7

^b chemický pripravená látka

K separáciám bola použitá kolóna Nova-Pak C₁₈ column (5 μm, 3,9 x 150 mm, Waters) za podmienok uvedených v oddieli 4.4.1.1.

Tabuľka 6: Separácia nitrilov pomocou HPLC na chirálnej kolóne

Zlúčenina ^a	Mobilná fáza	Retenčný čas (min.)
6a	10 mM NaP + 1 mM DMOA	2,9 a 7,8
7a	10 mM NaP + 1 mM DMOA	1,6 a 2,1

^a vid' Obr. 7

K separáciám bola použitá kolóna AGP 100.4, 100 x 4 mm, 5µm silikagél za podmienok uvedených v oddieli 4.4.1.2

5.2. Biotransformácie 2-(3'-butenyl-2'-hydroxy)-akrylonitrilu

2-(3-Butenyl-2-hydroxy-)-akrylonitril **1a** bol purifikovanou nitrilhydratázou ľahko hydratovaný na príslušný amid **1b** (vid' Obr. 8).

1b: ^1H NMR: 2.309 (1H, ddd, $J = 1.0, 7.2, 13.6$ Hz, H-3a), 2.359 (1H, ddd, $J = 1.0, 5.8, 13.6$ Hz, H-3b), 4.050 (1H, m, H-4), 4.976 (1H, d, $J = 4.6$ Hz, OH), 4.979 (1H, ddd, $J = 1.4, 2.1, 10.4$ Hz, H-6a), 5.119 (1H, ddd, $J = 1.5, 2.1, 17.2$ Hz, H-6b), 5.349 (1H, ddd, $J = 1.0, 1.0, 1.2$ Hz, H-1'a), 5.731 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-1'b), 5.795 (1H, ddd, $J = 5.5, 10.4, 17.2$ Hz, H-5), 6.959 (1H, br s, NH-a), 7.490 (1H, br s, NH-b).

^{13}C NMR: 40.3 (t, C-3), 70.4 (d, C-4), 113.5 (t, C-6), 120.9 (t, C-1'), 141.2 (s, C-2), 141.

MS(FAB) 164[M+Na]⁺ [C₇H₁₁O₂N]

1b bol detekovaný pomocou HPLC a TLC ako intermediát aj v počiatočnej fáze biotransformácií substrátu **1a** celými bunkami a potom pomaly transformovaný na príslušnú karboxylovú kyselinu **1c** (vid' Obr. 8). Reakčné podmienky danej konverzie sú zahrnuté v nasledujúcej Tabuľke 7.

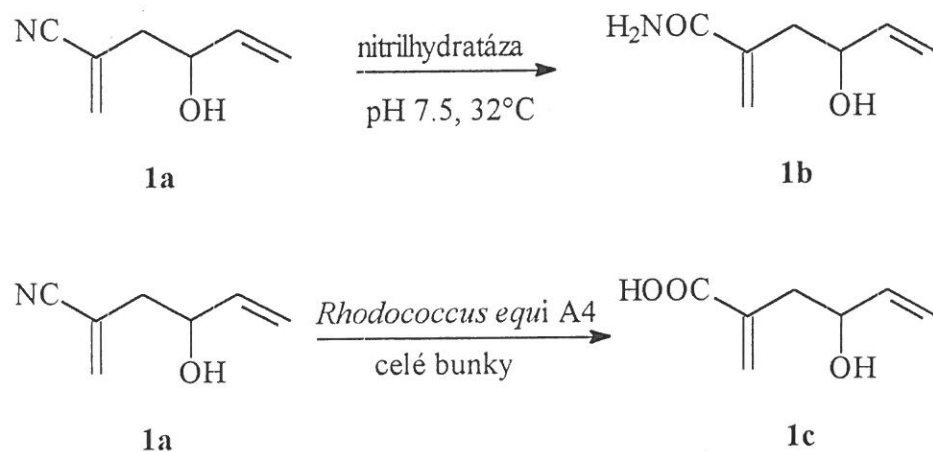
1c: ^1H NMR: 2.238 (ddd, 1H, $J = 0.7, 7.9, 13.2$ Hz, H-3a), 2.349 (ddd, 1H, $J = 0.6, 3.4, 13.2$ Hz, H-3b), 3.964 (m, 1H, $J = 1.4, 1.5, 3.4, 5.1, 7.9$ Hz, H-4), 4.918 (ddd, 1H, $J = 1.4, 2.5, 10.4$ Hz, H-6_{cis}), 5.054 (ddd, 1H, $J = 0.6, 0.7, 3.4$ Hz, H-7a), 5.131 (ddd, 1H, $J = 1.5, 2.5, 17.1$ Hz, H-6_{trans}), 5.686 (d, 1H, $J = 3.4$ Hz, H-7b), 5.800 (ddd, 1H, $J = 5.1, 10.4, 17.1$ Hz, H-5).

^{13}C NMR: 41.8 (C-3), 71.9 (C-4), 112.0 (C-6), 119.5 (C-7), 143.2 (C-5), 146.0 (C-2), 171.7 (C-1).

MS(FAB) 165[M+Na]⁺ [C₇H₁₀O₃]

K príprave amidu by preto popri purifikovanej nitrilhydratázy bolo možné využiť tiež celobunkový biokatalyzátor. Nitrilhydratázová aktivita celých buniek totiž v prípade tohto substrátu výrazne prevyšuje amidázovú aktivitu k príslušnému amidu a reakciu je potom možné zastaviť v okamihu, keď v reakčnej zmesi prevláda amid. Vzhľadom k nízkej aktivite amidázy voči tomuto amidu nepreběhla reakcia s amidázou až do úplnej

konverzie amidu a k izolácii príslušnej karboxylovej kyseliny bola preto použitá preparatívna HPLC (viď oddiel 4.4.1.1).



Obr. 8: Biotransformácie 2-(3'-butenyl-2'-hydroxy)-akrylonitrilu **1a** purifikovanou nitrilhydratázou a celými bunkami *R. equi* A4

Tabuľka 7: Výťažky biotransformácií 2-(3'-butenyl-2'-hydroxy)-akrylonitrilu **1a**; viď Obr. 8)

Substrát	Biokatalyzátor	Reakčný čas [h]	Nezreagovaný substrát [%]	Produkt	Výťažok [%]
1a (25mM)	nitrilhydratáza (3 mg proteínu /100 ml)	0,5	0	1b	67 (izolovaný)
1a (10mM)	celé bunky (4,4 g sušiny /1l)	7	0	1c	42 ^a (izolovaný)

^apurifikácia preparatívnou HPLC

5.3. Biotransformácie 2-(2'-hydroxy-3',3'-bis(metoxy)propyl)-akrylonitrilu

Keď bol 2-(2'-hydroxy-3',3'-bis(metoxy)propyl)-akrylonitrilu **2a** pridaný do reakčnej zmesi v rovnakej koncentrácii ako predchádzajúci substrát 25 mM, nebol pomocou chromatografických metód ani po jednom dni zistený produkt. Koncentrácia substrátu bola preto znížená na 2,5 mM. V tomto prípade bol po 20 hodinách detekovaný produkt, ktorý bol izolovaný preparatívnou HPLC a identifikovaný ako amid **2b** (viď Obr. 9).

2b: ^1H NMR: 2.111 (1H, dd, $J = 9.3, 14.3$ Hz, H-3a), 2.478 (1H, dd, $J = 3.0, 14.3$ Hz, H-3b), 3.304 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3\text{O}$), 3.546 (1H, ddd, $J = 3.0, 5.6, 9.3$ Hz, H-4), 4.053 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-5), 5.362 (1H, m, H-1'a), 5.730 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-1'b), 6.971 (1H, br s, NH-a), 7.486 (1H, br s, NH-b).

^{13}C NMR: 34.93 (t, C-3), 54.02 (q, CH_3O), 54.64 (q, CH_3O), 69.54 (d, C-4), 106.76 (d, C-5), 120.23 (t, C-1'), 141.77 (s, C-2), 170.24 (s, C-1).

Výtťažok tohto amidu sa trochu zlepšil po cca. päťnásobnom zvýšení koncentrácie nitrilhydratázy v reakčnej zmesi (viď Tab. 8). Použitie pomerne vysokých koncentrácií enzýmu v reakčnej zmesi je však nevýhodné pre veľkú spotrebu daného enzýmu a jeho samotná purifikácia z *R. equi* A4 je veľmi pracná.

Pomocou celých buniek bola z nitrilu **2a** pripravená príslušná kyselina **2c** v dobrom výtťažku (viď Obr. 9, Tab. 8).

2c: ^1H NMR: 2.206 (1H, ddd, $J = 1.0, 8.5, 13.3$ Hz, H-3a), 2.336 (1H, ddd, $J = 0.9, 2.6, 13.3$ Hz, H-3b), 3.273 (3H, s, CH_3O), 3.283 (3H, s, CH_3O), 3.382 (1H, ddd, $J = 2.6, 6.1, 8.4$ Hz, H-4), 3.976 (1H, d, $J = 6.1$ Hz, H-5), 5.017 (1H, ddd, $J = 0.9, 1.0, 3.5$ Hz, H-6a), 5.657 (1H, d, $J = 3.5$ Hz, H-6b).

^{13}C NMR: 36.3 (C-3), 53.3 (CH_3O), 54.4 (CH_3O), 71.0 (C-4), 106.7 (C-5), 119.4 (C-6), 146.6 (C-2), 171.1 (C-1).

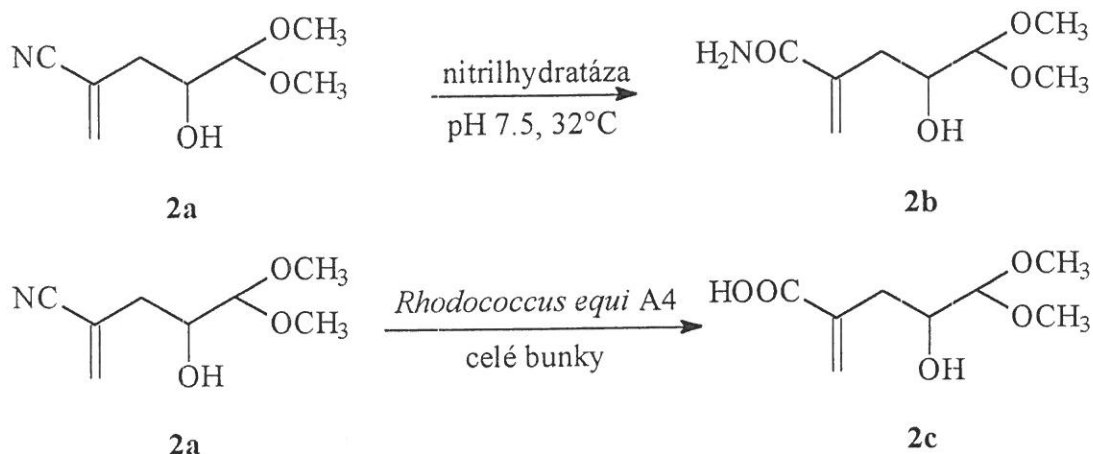
MS(FAB) 213[M+Na]⁺ [$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_5$]

Táto látka bola ako jediná z produktov pripravených v tejto práci získaná tiež chemickou cestou (spolupracujúcim laboratóriom Univerzity B. Pascala v Clermont-Ferrard). Retenčný čas, pri ktorom bola táto chemicky pripravená kyselina **2c** eluovaná z kolóny s reverznou fázou, sa však prekvapivo nezhodoval s retenčným časom látky získanej biotransformáciou (vid' Tab. 5), hoci tá bola spektrometricky identifikovaná ako kyselina **2c** (vid' Tab. 5). Je to možné vysvetliť tým, že za podmienok biotransformácie pravdepodobne dochádza k vzniku laktónu z dvoch, alebo viac molekúl tejto látky, ktorá vedľa karboxylovej skupiny obsahuje aj skupinu hydroxylovú. Skutočnosť, že sa jedná o dimér, alebo oligomér, nemôžeme pomocou NMR stanoviť. Za podmienok MS zrejme dochádza k jeho rozpadu.

Dôvodom nižšej reaktivity nitrilu **2a** pri enzýmovej hydratácii sú pravdepodobne stericke efekty rozvetveného reťazca. Je známe, že aktivita nitrilhydratázy je obmedzená na substráty pomerne malých rozmerov molekuly.

Pretože kyselina **2c** a prípadne aj amid **2b** majú byť využité pri chemickej syntéze ulosonových kyselín (v spolupráci s francúzskym laboratóriom), bolo potrebné pripraviť ich v množstve stoviek miligramov. Tieto preparatívne pokusy boli vykonané pomocou celých buniek z dôvodov veľkej spotreby biokatalyzátora. Takto bola žiadaná kyselina pripravená v dobrom výťažku (vid' Tab. 8).

V prípade nitrilu **2a** boli na rozdiel od predchádzajúceho substrátu **1a** rýchlosti reakcií riadených nitrilhydratázou a amidázou porovnateľné a dôsledkom toho bolo obtiažné reakciu zastaviť vo fáze, keď by v reakčnej zmesi výrazne prevládal amid. Reakcia bola preto ukončená vo fáze, keď vedľa amidu bol v reakčnej zmesi ešte prítomný nitril. Ten bol vzhľadom k oveľa nižšej polarite ľahšie separovateľný od amidu (vytrepaním do etylacetátu) než karboxylová kyselina. Amid **2b** bol tak pripravený v dobrom výťažku a v žiadanom množstve (vid' Tab. 8). Tento pokus vyžadoval aplikáciu buniek s veľmi vysokou nitrilhydratázovou aktivitou. Tie boli preto použité ihneď po kultivácii a neboli skladované pri $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, aj keď strata aktivity spôsobená týmto uchovávaním enzýmu nie je spravidla príliš významná (úbytok aktivity $< 20\%$ za týždeň).



Obr. 9: Biotransformácie 2-(3',3'-bis(metoxy)-2'-hydroxypropyl)-akrylonitrilu **2a** purifikovanou nitrilhydratázou a celými bunkami *R. equi* A4

Tabuľka 8: Výťažky biotransformácií

2-(3',3'-bis(metoxy)-2'-hydroxypropyl)-akrylonitrilu **2a** (vid' Obr. 9)

Substrát	Biokatalyzátor	Reakčný čas [h]	Nezreagovaný substrát [%]	Produkt	Výťažok [%]
2a (2,5 mM)	nitrilhydratáza (15 mg proteínu/l)	20	26	2b	73 (analytický)
	nitrilhydratáza (73 mg proteínu/l)	18	0		27 ^a (izolovaný)
2a (2,5 mM)	celé bunky (4,4 g sušiny/l)	7	0	2c	40 (izolovaný)
2a (10 mM)	celé bunky (2,2 g sušiny /l)	33	0	2c	83 ^b (izolovaný)
2a (5 mM)	celé bunky (2,8 g sušiny /l)	2	20	2b	70 ^b (izolovaný)

^a purifikácia preparatívnou HPLC

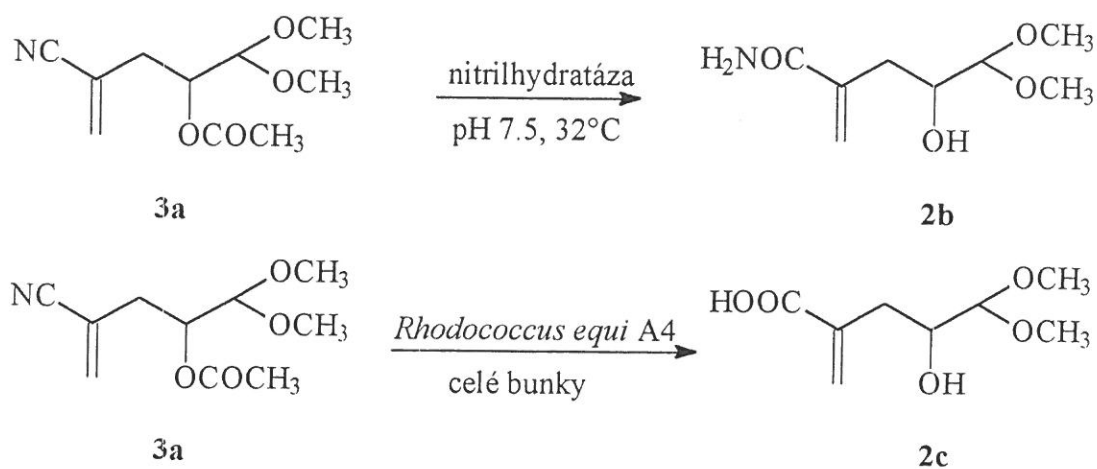
^b izolácia extrakciou (v preparatívnom množstve cca. 500 mg)

5.4. Biotransformácie 2-(2-acetoxy-3',3'-bis(metoxy)propyl)-akrylonitrilu

Ďalší α -substituovaný akrylonitril **3a** nesúci v postrannom reťazci acetoxy skupinu miesto hydroxyly bol celými bunkami *R. equi* A4 a nitrilhydratázou transformovaný na rovnaké produkty ako predchádzajúci substrát **2a**, t.j. karboxylovú kyselinu a jej amid **2b** (viď Obr. 10 a Tab. 9), čo je dôsledok deacetylácii východzieho substrátu. Je pravdepodobné, že bunky *R. equi* A4 obsahujú esterázu, ktorej výskyt je u mikroorganizmov bežný. Pôsobenie esterázy sa prejavilo i v prípade ďalších nitrilov obsahujúcich v molekule ďalšie esterové väzby, napr. metyl kyanobenzoáty,³⁹ alebo metyl kyanobutanoáty.⁴¹ Pri týchto látkach však esterázy len mierne znižovali výťažky produktov, metylamidokarboxylátov a príslušných hemiesterov. Zdá sa, že aktivita esterázy *R. equi* A4 závisí na polarite substrátov.³⁹ Esterové väzby nepolárnych látok sú hydrolyzované vo väčšej miere než pri látkach polárnych. Nitril **3a** je pravdepodobne pre svoju nízku polaritu dobrým substrátom tejto esterázy a dochádza k jeho intenzívnej deacetylácii hneď v počiatočnej fáze reakcie.

Pretože k deacetylácii dochádzalo aj vtedy, keď bol ako substrát použitý purifikovaný enzým, je pravdepodobná prítomnosť zvyškovej esterázovej aktivity v použiteľnom preparáte nitrilhydratázy. Tá podľa elektroforézy (SDS-PAGE) vykazovala vysokú čistotu, nebola však celkom homogénna. Aby bol enzým pre biotransformácie získaný v dobrom výťažku, bola jeho purifikácia obmedzená na dva chromatografické kroky.⁵⁶ (Homogénny enzým bol použitý iba pre stanovenie molekulovej hmotnosti a sekvenovanie.) V prípade ostatných doposiaľ študovaných nitrilov s acetylovými skupinami^{39,41} však táto esterázová aktivita nepredstavovala žiadny problém. To potvrdzuje, že nitril **3a** bol neobyčajne vhodným substrátom pre esterázu z *R. equi* A4. Látka, ktorá by mohla byť príslušným amidom **3b** so zachovanou esterovou väzbou, bola detekovaná pomocou HPLC (RT = 9,2 min v mobilnej fáze obsahujúcej 10 % acetonitrilu vo vode s 0,1 % kyselinou fosforečnou), pre nízke percentuálne zastúpenie v komplexnej reakčnej zmesi však nebola izolovaná.

Na rozdiel od esterových väzieb nebola hydrolyza metoxyskupín substrátov zistená. To súhlasí s pozorovaním o stabilite esterových väzieb k mikrobiálnemu štiepeniu, týkajúceho sa napr. metyl-3-*O*-benzyl-4-kyanobutanoátu.⁴¹



Obr. 10: Biotransformácie 2-(2'-acetoxy-3',3'-bis(metoxy)propyl)-akrylonitrilu **3a** purifikovanou nitrilhydratázou a celými bunkami *R. equi* A4

Tabuľka 9: Výťažky biotransformácie
2-(2'-acetoxy-3',3'-bis(metoxy)propyl)-akrylonitrilu **2a** (vid' Obr. 10)

Substrát	Biokatalyzátor	Reakčný čas [h]	Nezreagovaný substrát [%]	Produkt	Výtťažok [%]
3a (2,5mM)	nitrilhydratáza (73mg proteínu/l)	24	10	2b	76 (analytický)
3a (2,5 mM)	celé bunky (4,4 g sušiny/l)	48	0	2c	67 (analytický) 25 ^a (izolovaný)

^a purifikácia preparatívnou HPLC

5.5. Biotransformácie 2-(2'-acetoxy-1'-hydroxyetyl)akrylonitrilu

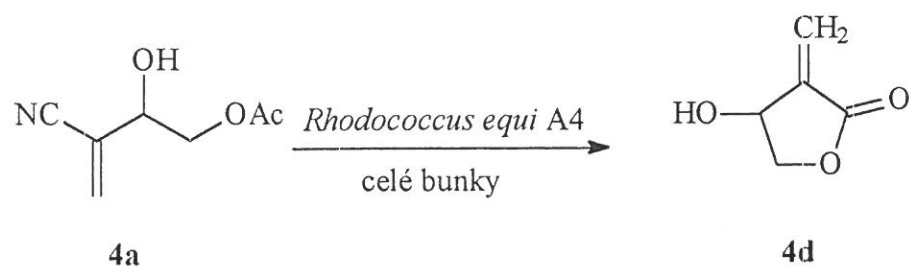
Pri biotransformácii **4a** 2-(2'-acetoxy-1'-hydroxyetyl)akrylonitrilu bunkami *R. equi* A4 bol získaný produkt, pri ktorom sme predpokladali štruktúru amidu **4b**, no analýza NMR ukázala v spektre tejto vzorky heteronukleárnu koreláciu medzi oxymetylénom a kvartérnym signálom s chemickým posunom $\delta_C = 169.6$ ppm. Okrem toho bol uhlíkový signál metylénu posunutý smerom k nižšiemu poľu ($\delta_C = 73.3$ ppm), čo odpovedá substitúcii na atóme kyslíku. Tieto informácie dovoľujú predpokladať, že počas biotransformácie došlo k vzniku laktónu a nie amidu (viď Obr. 11). O tom svedčí aj chýbajúci acetylovaný zvyšok a spontánne uzavretie zlúčeniny do kruhu. MS sa nepodarilo potvrdiť molekulovú hmotnosť laktónu. Tento produkt, α -metylén- γ -laktón **4d**, ktorý sa vyskytuje v prírodných terpenoidových laktónoch, vykazuje inhibičnú vlastnosť v rastovej fáze baktérií a húb. Okrem tejto antibiotickej vlastnosti má aj protinádorovú – potláča SOS- indukovanú aktivitu troch mutagénov a antiseptickú aktivitu.⁴⁷ Reakčné podmienky sú zobrazené v Tabuľke 10.

4d: ¹H NMR: 3.973 (1H, dd, J = 3.8, 9.5 Hz, H-4a), 4.449 (1H, dd, J = 6.7, 9.5 Hz, H-4b), 4.816 (1H, m, H-3), 5.948 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-1'a), 6.180 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-1'b).

¹³C NMR: 66.2 (d, C-3), 73.3 (t, C-4), 124.9 (t, C-1'), 138.8 (s, C-2), 169.6 (s, C-1).

Podľa HPLC môžeme predpokladať, že pôsobením purifikovaného enzýmu tiež vzniká α -metylén- γ -laktónu (podľa zhody retenčných časov produktov získaného touto biotransformáciou a štandardu izolovaného z reakčnej zmesi s celobunkovým biokatalyzátorom).

Vznik laktónu svedčí o tom, že sa pri látke **4a** opäť prejavilo pôsobenie mikrobiálnej esterázy; aj tento nitril bol podobne ako nitril **3a** vhodným substrátom pre tento enzým.



Obr. 11: Biotransformácie 2-(2'-acetoxy-1'-hydroxyetyl)akrylonitrilu **4a**
celými bunkami *R. equi* A4

Tabuľka 10: Výťažok biotransformácie

2-(2'-acetoxy-1'-hydroxyetyl)akrylonitrilu **4a**, (vid' Obr. 11)

Substrát	Biokatalyzátor	Reakčný čas [h]	Nezreagovaný substrát [%]	Produkt	Výťažok [%]
4a (2,5 mM)	nitrilhydratáza (75mg proteínu/1l)	15 min.	0	4d	84 (analytický)
4a (25 mM)	celé bunky (3,3 g sušiny/1l)	2,5	0	4d	97 (izolovaný)

5.6. Biotransformácie 2-(2'-hydroxypropyl)-akrylonitrilu

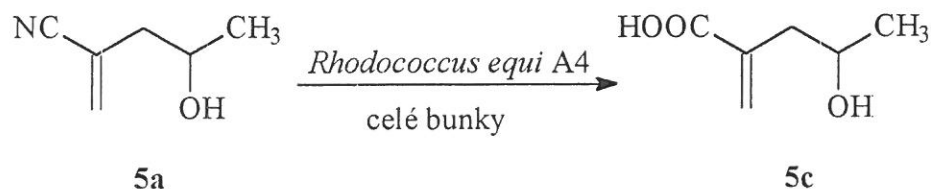
2-(2'-hydroxypropyl)-akrylonitril **5a** poskytoval biotransformáciou s celými bunkami príslušnú karboxylovú kyselinu **5c** (vid' Obr. 12).

5c: $^1\text{H NMR}$: 1.024 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-5), 2.235 (1H, ddd, $J = 1.1, 5.9, 13.5$ Hz, H-3a), 2.317 (1H, ddd, $J = 1.1, 7.0, 13.5$ Hz, H-3b), 3.755 (1H, m, H-4), 5.590 (1H, m, H-1'a), 6.049 (1H, d, $J = 2$ Hz, H-1'b).

$^{13}\text{C NMR}$: 23.26 (q, C-5), 41.50 (t, C-3), 64.90 (d, C-4), 126.11 (t, C-1'), 138.60 (s, C-2), 168.30 (s, C-1).

MS(ESI) 129[M-H] $^+$ [$\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_3$]

Reakčné rýchlosti nitrilhydratázy k **5a** a amidázy k amиду **5b** boli v tomto prípade porovnateľné a pomocou celých buniek potom nebolo možné pripraviť tento amid. Rýchlosť konverzie nitrilu a tiež amidu bola veľmi nízka, takže kyselina **5c** bola pripravená po pomerne dlhej reakčnej dobe. Pretože aktivita nitrilhydratázy k tomuto substrátu bola nízka, nebol pre preparatívny pokus použitý purifikovaný enzým (pre jeho prepokladanú príliš veľkú spotrebu). Dôvodom nízkej aktivity nitrilhydratázy k substrátu **5a** by mohla byť prítomnosť kyslíkového atómu v polohe δ -. Heteroatómy v tejto polohe sa môžu viazať v aktívnom centre nitrilhydratázy a interferovať s hydratáciou nitrilovej skupiny.⁴⁵



Obr. 12: Biotransformácie 2-(2'-hydroxypropyl)-akrylonitrilu **5a** celými bunkami *R. equi* A4

Tabuľka 11: Výťažok biotransformácie 2-(2'-hydroxypropyl)-akrylonitrilu 5a, (vid' Obr. 12)

Substrát	Biokatalyzátor	Reakčný čas [h]	Nezareagovaný substrát [%]	Produkt	Výťažok [%]
5a (25 mM)	celé bunky (4,4 g sušiny/l)	55	0	5c	59 (izolovaný)

5.7. Biotransformácie 2-(2'-fenyl-2'-hydroxymetyl)-akrylonitrilu

2-(2'-Fenyl-2'-hydroxymetyl)-akrylonitril **6a** bol celými bunkami ľahko transformovaný na príslušný amid **6b**. Nitrilhydratáza z *R. equi* A4 sa vyznačuje dobrou aktivitou pre arylalifatické nitrily, napr. 2- arylpropiónnitrily.^{38,56} Vplyv aromatického jadra na elektrónovu hustotu na uhlíku nitrilovej skupiny neinhbuje aktivitu nitrilhydratázy, aj keď táto aktivita je nižšia k arylalifatickým nitrilom, než nitrilom alifatickým ako napr. k propiónnitrilu. Toto pozorovanie sa potvrdilo aj v prípade nitrilu **6a**. Rovnaký produkt ako pri použití celých buniek bol získaný aj pomocou enzýmu, ako bolo zistené pomocou TLC a HPLC.

6b: ¹H NMR: 5.507 (1H, m, H-3), 5.601 (1H, m, H-1'a), 5.673 (1H, d, J = 4.9 Hz, OH), 5.809 (1H, m, H-1'b), 6.955 (1H, br s, NH-a), 7.221 (1H, m, H-para), 7.267 - 7.349 (4H, m, H-ortho, H-meta), 7.420 (1H, br s, NH-b).

¹³C NMR: 71.23 (d, C-3), 117.57 (t, C-1'), 126.70 (d, C-ortho), 126.92 (d, C-para), 127.89 (d, C-meta), 143.28 (s, C-ipso), 147.46 (s, C-2), 168.71 (s, C-1).

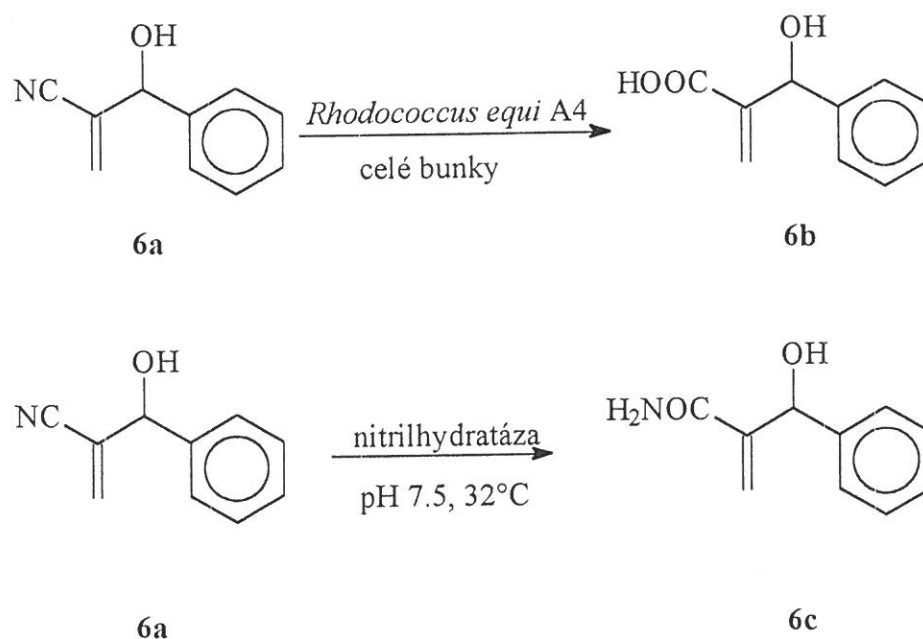
Ďalšia konverzia intermediátu **6b** bola veľmi pomalá (viď Obr. 13). Toto pozorovanie je v súlade s poznatkom o veľmi nízkej aktivite amidáz k arylalifatickým amidom.³⁸ Východzia koncentrácia nitrilu **6a** musela byť pri tom znížená, aby bol zaručený dobrý stupeň konverzie substrátu. Ďalší produkt bol získaný až po dvojdnovej inkubácií substrátu s bunkami. Jednalo sa pravdepodobne o karboxylovú kyselinu **6c**.

Podľa NMR sa môže jednať aj o kyselinu **6c**, tak aj o amid **6b**. Hmotnostnej spektrofotometrii sa v tomto prípade nepodarilo získať reprodukovateľný výsledok (za podmienok tohto merania došlo zrejme k polymerizácii produktu s karboxylovými a hydroxylovými skupinami, pretože molekulová hmotnosť bola podstatne vyššia, než očakovaná). Avšak skutočnosť, že sa tento produkt pomocou TLC delí od príslušného amidu, naznačuje štruktúru **6c**.

6c: ^1H NMR: 5.424 (1H, dd, $J = 1.1, 1.6$ Hz, H-3), 5.915 (1H, dd, $J = 1.6, 2.0$ Hz, H-1'a), 6.145 (1H, dd, $J = 1.1, 2.0$ Hz, H-1'b), 7.223 (1H, m, H-*para*), 7.264 – 7.339 (4H, m, H-*ortho*, H-*meta*).

^{13}C NMR: 70.77 (d, C-3), 122.80 (t, C-1'), 127.03 (d, C-*ortho*), 127.08 (d, C-*para*), 127.99 (d, C-*meta*), 143.45 (s, C-*ipso*), 145.01 (s, C-2), 167.34 (s, C-1).

Enantioméry nitrilu **6a** sa veľmi dobre delili na chirálnej chromatografickej kolóne Chiral-AGP. Preto mohla byť skúmaná prípadna enantioselektivita enzýmu k tomuto substrátu. Sledovanie spotreby obidvoch enantiomérov substrátu pri jeho biotransformácii purifikovanou nitrilhydratázou naznačilo určitú, aj keď veľmi nízku enantioselektivitu enzýmu. Enantiomérny prebytok e.e. jedného z izomérov bol 56 % pri 92 %-nej konverzií substrátu.



Obr. 13: Biotransformácie 2-(2'-fenyl-2'-hydroxymetyl)-akrylonitrilu **6a** nitrilhydratázou a celými bunkami *R. equi* A4

Tabuľka 12: Výt'ažky biotransformácií

2-(2'-fenyl-2'-hydroxymetyl)-akrylonitrilu **6a**, (vid' Obr. 13)

Substrát	Biokatalyzátor	Reakčný čas [h]	Nezareagovaný substrát [%]	Produkt	Výt'ažok [%]
6a (2,5 mM)	nitrilhydratáza (75mg proteínu/1l)	3	0	6b	69 (izolovaný)
6a (25 mM)	celé bunky (4,4 g sušiny/l)	2,5	0	6b	70 (izolovaný)
6a (5 mM)	celé bunky (3,3 g sušiny/l)	48	0	6c	87 (izolovaný)

5.8. Biotransformácie 2-(1'-hydroxybutyl)-akrylonitrilu

Enzýmová transformácia 2-(1'-hydroxybutyl)-akrylonitrilu **7a** prebiehala podobne ako v prípade jeho homológu **8a**. Hydrolýza prebehla ľahko až na karboxylovú kyselinu **7c** a pre získanie jeho amidu **7b** bolo potrebné koncentráciu biokatalyzátora podstatne znížiť.

7b: ^1H NMR: 0.849 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-6), 1.216 – 1.489 (4H, m, H-4, H-5), 4.329 (1H, m, H-3), 4.879 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, OH), 5.455 (1H, dd, $J = 1.5, 1.5$ Hz, H-1'a), 5.668 (1H, dd, $J = 0.9, 1.5$ Hz, H-1'b), 6.969 (1H, br s, NH-a), 7.426 (1H, br s, NH-b).

^{13}C NMR: 13.92 (q, C-6), 18.43 (t, C-5), 38.45 (t, C-4), 69.07 (d, C-3), 116.54 (t, C-1'), 148.34 (s, C-2), 169.29 (s, C-1).

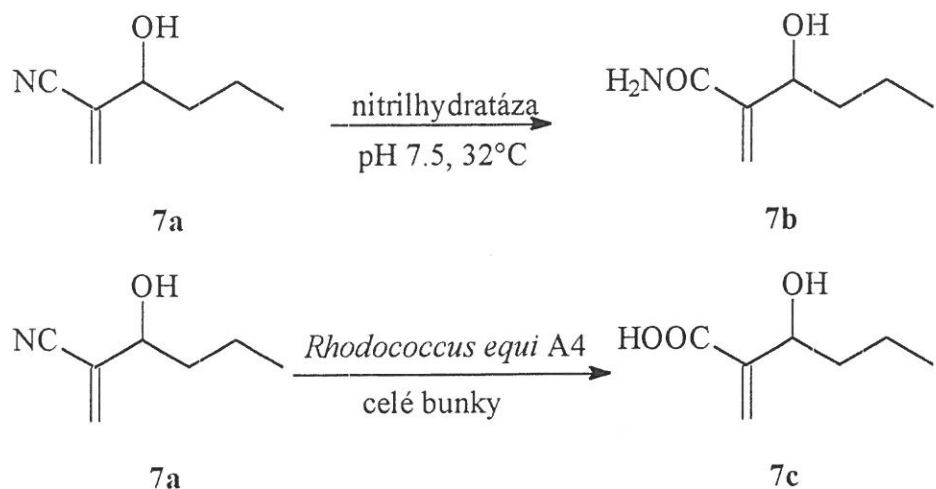
MS(ESI) 144[M+H]⁺ [C₇H₁₃O₂N]

7c: ^1H NMR: 0.847 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, H-6), 1.257 (1H, m, H-5a), 1.341 (1H, m, H-5b), 1.430 (2H, m, H-4), 4.053 (1H, m, H-3), 5.099 (1H, dd, $J = 1.1, 3.2$ Hz, H-1'a), 5.653 (1H, d, $J = 3.2$ Hz, H-1'b).

^{13}C NMR: 13.9 (q, C-6), 18.5 (t, C-5), 39.3 (t, C-4), 71.6 (d, C-3), 116.2 (t, C-1'), 149.3 (s, C-2), 170.6 (s, C-1).

MS(ESI) 143[M-H]⁺ [C₇H₁₂O₃]

Pri substráte **7a** sa podarilo pomocou chirálnej HPLC rozdeliť obidva enantioméry (vid' Tab. 13). K štúdiu prípadnej enantioselektivity nitrilhydratázy bol použitý purifikovaný enzým. Koncentrácie obidvoch enantiomérov sa počas reakcie znižovali približne rovnako rýchlo. Enzým potom pravdepodobne nepreferoval určitý enantiomér nitrilu **7a**.



Obr. 14: Biotransformácie 2-(1'-hydroxybutyl)-akrylonitrilu **7a** nitrilhydratázou a celými bunkami *R. equi* A4

Tabuľka 13: Výťažky biotransformácií 2-(1'-hydroxybutyl)-akrylonitrilu **7a**, (vid' Obr. 14)

Substrát	Biokatalyzátor	Reakčný čas [h]	Nezreagovaný substrát [%]	Produkt	Výtťažok [%]
7a (2,5 mM)	nitrilhydratáza (75mg proteínu/l)	2,5	0	7b	73 izolovaný
7a (2,5 mM)	celé bunky (4,4 g sušiny/l)	2,5	0	7b	70 izolovaný
7a (2,5 mM)	celé bunky (3,3 g sušiny/l)	8	0	7c	87 izolovaný

5.9. Biotransformácie 2-(1'-hydroxyetyl)-akrylonitrilu

Z 2-(1'-hydroxyetyl)-akrylonitrilu **8a** bola pomocou celobunkového katalyzátora pripravená kyselina a amid. Obidve enzýmové reakcie – hydratácia nitrilu aj hydrolýza amidu - prebiehali veľmi rýchlo, takže po dvoch hod. už v reakčnej zmesi prevládala kyselina **8c**, ktorá tak mohla byť izolovaná s dobrým výťažkom.

8c: ^1H NMR: 1.174 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-4), 4.434 (1H, qdd, $J = 1.0, 1.7, 6.4$ Hz, H-3), 5.802 (1H, dd, $J = 1.6, 2.1$ Hz, H-1'a), 6.027 (1H, dd, $J = 1.0, 2.1$ Hz, H-1'b).

^{13}C NMR: 23.4 (q, C-4), 64.4 (d, C-3), 121.7 (t, C-1'), 146.6 (s, C-2), 167.5 (s, C-1).

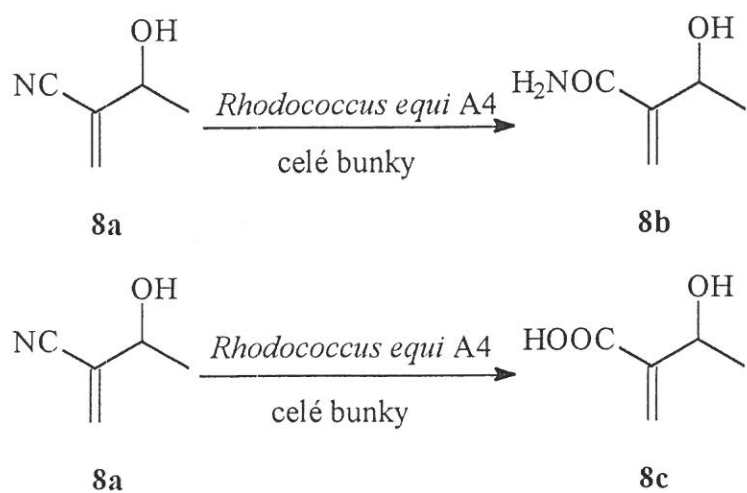
MS(FAB) 145[M-H]⁺ [C₅H₈O₃]

Pre získanie amidu tejto karboxylovej kyseliny bolo nutné niekoľkonásobne znížiť koncentráciu buniek. Pretože reakčné rýchlosti nitrilhydratázy a amidázy boli rozdielne, bolo možné biotransformáciu ukončiť v okamihu (po jednej hod. inkubácie), kde v reakčnej zmesi bol prítomný hlavne amid **8b**, ktorý bol potom izolovaný s dobrým výťažkom.

8b: ^1H NMR: 1.147 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-4), 4.471 (1H, m, H-3), 4.931 (1H, br s, OH), 5.484 (1H, m, H-1'a), 5.663 (1H, m, H-1'a), 6.984 (1H, br s, NH-a), 7.436 (1H, br s, NH-b).

^{13}C NMR: 23.10 (q, C-4), 65.22 (d, C-3), 115.91 (s, C-1'), 149.21 (s, C-2), 169.13 (s, C-1).

MS(FAB) 115[M-H]⁺ [C₅H₉O₂N]



Obr.15: Biotransformácie 2-(1'-hydroxyetyl)-akrylonitrilu **8a** nitrilhydrazou a celými bunkami *R. equi* A4

Tabuľka 14: Výťažky biotransformácií 2-(1'-hydroxyetyl)-akrylonitrilu **8a**, (vid' Obr. 15)

Substrát	Biokatalyzátor	Reakčný čas [h]	Nezreagovaný substrát [%]	Produkt	Výťažok [%]
8a (25 mM)	celé bunky (0,54 g sušiny/l)	1	0	8b	52 (izolovaný)
8a (25 mM)	celé bunky (4,4 g sušiny/ml)	2	0	8c	62 (izolovaný)

5.10. Biotransformácie 2-(2',3',4'-trihydroxy-5'-oxyhexanoyl)-akrylonitrilu, 2-(2', 3'-dihydroxy-4'-oxypentanoyl)-akrylonitrilu, 2-(2',3',4',5'-tetrahydroxy-hexanoyl)-akrylonitrilu

Príslušné látky **9a**, **10a** a **11a** (vid' Obr. 7) boli testované ako substráty na tvorbu hypotetických prekursorov pre syntézu ulosonových kyselín: KDH (3-deoxy-D-manno-2-heptoulosonová kyselina) a KDO (3-deoxy-D-manno-2-oktoulousoňová kyselina) sú kľúčové komponenty lipopolysacharidov (LPS) vonkajšej membrány Gram-negatívnych baktérií.³⁰ Syntetické analógy týchto kyselín ako napr. (TIA) acetát 1-tiol-1,2-*O*-izopropylidénu,³⁰ alebo 4-deoxy-7-ox-KDO-8-fosfát¹⁰ sú potenciálne antibakteriálne inhibitory LPS.^{48, 30, 10} Doposiaľ nebola popísaná kompletná syntéza týchto kyselín. Časť tejto syntézy zahŕňa dva enzýmy: transketolázu (TK) a fruktózu 1,6-bisfosfátaldolázu (FB-aldoláza), ktoré veľmi dobre reagujú so substituovanými butanalmi obsahujúcimi α -hydroxylovú skupinu v postrannom reťazci.¹⁰ Takto boli syntetizované substráty **9a**, **10a** a **11a** v prípade, že substituentom bola nitrilová skupina. Hypotéza zahŕňajúca ďalší krok syntézy ulosonových kyselín cez enzýmovú hydrolyzu nitrilovej skupiny a ozonolýzu na C₂ – uhlíku vedúcu k tvorbe kyselín s hydroxylovými skupinami v postrannom reťazci – prekursorov KDO a KDH, nebola v tomto prípade potvrdená. Dôvodom mohli byť stérické efekty substrátov **9a**, **10a** a **11a**, ku ktorým aktivita nitrilhydratázy bola obmedzená na substráty pomerne malých rozmerov. V tomto prípade amidázová aktivita nebola zaznamenaná, pretože tu nevznikal príslušný amid, ktorý by bol transformovaný na kyselinu.

6. ZÁVER

Cieľom tejto práce bolo overiť schopnosť biotransformácie kmeňa *Rhodococcus equi* A4 k doteraz netestovaným α -substituovaným akrylonitrilom, dôležitým intermediátom organických syntéz vedúcim k vzniku biologicky aktívnych látok, príkladom sú laktóny, alebo ulosonové kyseliny. Substráty (viď Obr. 7) boli testované z hľadiska substrátovej špecificity a enantioselektivity enzýmového systému nitrilhydratáza/amidáza bakteriálneho kmeňa *R. equi* A4, pričom boli vypracované reakčné podmienky, metódy pre izoláciu a stanovenie príslušných produktov biokonverzií nitrilov (**1a - 8a**).

Bola vypracovaná metóda analýzy na reverznej kolóne HPLC pre substráty (nitrily **1a, 2a, 3a, 4a, 5a, 6a, 7a a 8a**), amidy (**1b, 2b, 5b, 6b, 7b a 8b**) a kyseliny (**1c, 2c, 5c, 6c, 7c a 8c**) s príslušnými retenčnými časmi uvedenými v Tabuľke 5 (viď oddiel 5.1).

Bola vypracovaná metóda analýzy na chirálnej kolóne HPLC pre substráty **6a** a **7a**, pričom enzým nitrilhydratáza vykazoval pomerne nízku enantioselektivitu k substrátu **7a**, koncentrácia obidvoch enantiomérov sa znižovala približne rovnako rýchlo. Oproti tomu substrát **6a** mal e.e. jedného z izomérov 56 % pri 92 %-nej konverzii.

Bolo izolované veľké množstvo produktov biotransformácií kmeňom *Rhodococcus equi* A4 (**1b, 1c, 2c, 4d, 5c, 6b, 6c, 7b, 7c, 8b a 8c**) a taktiež produktov vzniknutých biotransformáciou pomocou čiastočne purifikovanej nitrilhydratázy (**1b, 2b, 4d, 6b, 7b**). Štruktúra pripravených amidov a kyselín bola následne potvrdená NMR spektroskopiou (**1b, 1c, 2b, 2c, 4d, 5c, 6b, 6c, 7b, 7c, 8b, 8c**) a molekulové hmotnosti a elementárne zloženie bolo potvrdené MS spektroskopiou (**1b, 1c, 2c, 5c, 7b, 7c, 8b a 8c**).

Biotransformáciou celými bunkami *R. equi* A4 bol zo substrátu **4a** pripravený α -metylén- γ -laktón s 97 % výťažkom, kde bola potvrdená aj aktivita esterázy k acetálovej skupine tohto substrátu.

Boli testované konverzie substrátov (**9a, 10a a 11a**) pomocou bakteriálneho kmeňa *R. equi* A4 s predpokladom vzniku prekursorov ulosonových kyselín, kde nebola zistená aktivita nitrilhydratázy pre tieto nitrily.

7. LITERATÚRA

1. André C., Guérard Ch., Gefflaut T., Hesquet L., Lemaire M., C., Bolte J.: *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **5**, 113-118 (1997)
2. André C., Guérard Ch., Hesquet L., Demuynck C., Bolte J.: *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **5**, 459-466 (1998)
3. Asano Z., Fujishiro K., Tani Y., Yamada H.: *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1165 (1982)
4. Bauer R., Hirrlinger B., Layh N., Stolz A., Knackmuss H-J.: *Appl. Microbiol Biotechnol* **42**: 1—7 (1994)
5. Bauer R., Knackmuss H-J., Stolz A.: *Appl. Microbiol Biotechnol* **49**: 89-95 (1998)
6. Bell K. S., Phippl J.C., Aw D.W.J. and Christofi N.: *Appl. Microbiology* **85**: 195-210 (1998)
7. Beard T., Cohen M.A., Parratt J.S., Turner N.J.: *Tetrahedron Assymetry* **4**: 1085-1104 (1993)
8. Cohen M.S., Sawden J., Turner N.J.: *Tetrahedron Lett* **31**: 7223-7226 (1990)
9. Cohen M.S., Parratt J.S., Turner N.J. and Crosby J.: *Tetrahedron Assymetry* **3**: 1543-1546 (1992)
10. Cresta D., Gusérard C., Bolte J., Demuyack C.: *J. Mol. Cat. B:* **11**, 297-212 (2001)
11. Crosby J.A., Parrat J.S. and Turner N.J.: *Tetrahedron Assymetry* **3**: 1547-1550 (1990)
12. Crosby J.A., Moilliet J., Parrat J.S. and Turner N.J.: *J.Chem. Soc. Perkin Transiacion* **1**, 1679-87 (1994)
13. DiGeronimo M.J., Antoine A.D.: *Appl. Environ.Microbiol.* **31**, 900-906 (1976)
14. Effenberger F. and Graef B. W.: *J. Biotechnol.* **60**, 165-174 (1998)
15. Faber K.: *Biotransformations in Organic Chemistry.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 23-134. (1992)
16. Fakuda Y., Fukui M., Harada T., Izumi Y.: *J. Ferment. Technol.* **49**, 1011 (1971)
17. Fournand D.A., Bigey F. and Arnaud A.: *Appl. Environm. Microbiol.* **64**: 2844-2852 (1998)
18. Frothingham R., Meeker-OConnell W.A., Talbot E.A., George J.W. and Kreuzer K.N.: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**: 1426-1431 (1996)
19. Gavagan, J.E., Fager S.K., Fallon R.D., Folsom P.W., Herkes F.E., Eisenberg.:*J. Org. Chem.* **63**, 4792-4801 (1998).
20. Gradley M.L., Knowles C.J.: *Biotechnol Lett* **16**: 41—46 (1994)

21. Hann, E.C., Eisenberg, A., Fager, S.K., Perkins, N.E., Gallagher, F.G., Cooper, S.M. *et al.*: *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 2239-2245 (1999)
22. Hirrlinger B., Stolz A., Knackmuss H-J.: *J Bacteriol* **178**: 3501-3507 (1996)
23. Jallageas J.S., Arnaud A., Galzy P.: *Adv. Biochem.Eng* **14**, 124-130 (1980)
24. Joeres U. and Kula M.R.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 606-610 (1994)
25. Kato Y., Tsuda T., Asano Y.: *Eur. J. Biochem.* **263**, 662-670 (1999)
26. Kakeya H., Sakai N., Sugai T., Ohta H.: *Tetrahedron Lett* **10**: 1343-1346 (1991)
27. Kawakami K., Jap.patent 01 171 479 (1989)
28. Klempier N., de Raadt, A., Faber K., Griengl. H.: *Tetrahedron Lett.* **32**, 341-344 (1991)
29. Kobayashi M., Komeda H., Nagasawa T., Yamada H. and Shimizu S.: *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 1949-1950 (1993)
30. Kumaran G. and Mootoo D.R.: *Tetrahedron Lett.* **42**, 3783-3785
31. Layh N., Stolz A., Förster S., Effenberger F., Knackmuss H-J. : *Arch Microbiol* **158**: 405-411 (1992)
32. Layh N., Stolz A., Böhme J., Effenberger F., Knackmuss H.J.: *J. Biotechnol.* **33**: 175-182 (1994)
33. Layh N., Hirrlinger B., Stolz A. and Knackmuss H-J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 668-674 (1997)
34. Layh N., Willetts A.: *Biotechnol Lett* **20**: 329-331(1998)
35. Maier-Greiner U.H., Obermaier-Skrobranek B.K., Estermaier L.M.,Kamerloher W.: *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4260 (1991)
36. Martínková L.: *Chem. Listy* **87**, 187-197 (1993)
37. Martínková L., Přepechalová I., Olšovský P., Křen V.: *Biotechnol Lett* **17**: 1219-1222 (1995)
38. Martínková L., Stolz A., Knackmuss H-J.: *Biotechnol Lett* **18**: 1073-1076 (1996)
39. Martínková L., Klempier N., Přepechalová I., Přikrylová V., Ovesná M., Griengl H. and Křen V.: *Biotechnol. Lett.* **20**, 909-912 (1998).
40. Martínková L., Křen V., Cvak L., Ovesná M. and Přepechalová, I.: *J. Biotechnol.* **84**, 63-66 (2000)
41. Martínková L., Klempier N., Bardakji J., Kandelbauer A., Ovesná M., Podařilová T. *et al.*: *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, in press. (2001)
42. Masumoto S., Inoue A., Kumagai K., Murai R., Mitsuda S.: *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**: 720-722 (1995)

43. Mauger J., Nagasawa T., Yamada H.: *Arch. Microbiol.* **155**, 1 (1990)
44. Mayaux J.F., Cerbelaud E., Soubrier F., Yeh P., Blanche F. and Pétré D.: *J. Bacteriol.* **173**: 6694-6704 (1991).
45. Meth-Cohn O., Wang M-X.: *J Chem Soc, Perkin Trans 1*: 1099-1104 (1997)
46. Mimura A., Kawano T., Yamaga K.: *J. Ferment. Technology* **47**, 631 (1969)
47. Miyazawa M., Shimabayashi H., Hayashi S., Hasimito S., Nakamura S., Kosaka H. and Kameoka H.: *J.Agric Food Chem.* **48**, 5406-5410 (2000)
48. Mlynarski J., Banaszek: *Tetrahedron: Asymmetry* **11**, 3737-3746 (2000)
49. Nagasawa T., Mathew C.D., Mauger J. and Yamada. H.: *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1766-1769 (1988)
50. Nagasawa T., Yamada. H., Ambramowicz D.A.: *Biocatalysis* str.227 Nostrand Reinhold New York (1990)
51. Nagasawa T. and Yamada. H.: *Pure Appl.Chem.* **62(7)**: 1441-1444 (1990)
52. Nagasawa T., Ryuno K., Yamada. H.: *Appl. Microbiol.Biotech.* **34**, 322 (1990)
53. Nagano O., Kawakami K., Gomi K.: Jap.patent 63 137 688 (1998)
54. Nakasako M., Odaka M., Yohda M., Dohmae N., Takio K., Kamiya N., Endo I.: *Biochemistry* **38**: 9887-9898 (1999)
55. Payne M.S., Wu S., Fallon R.S., Tudor G., Stieglitz B., Turner I.M. Jr., Nelson M.J.: *Biochemistry* **36**: 5447-5454 (1997)
56. Přepechalová I., Martínková L., Stolz A., Ovesná M., Bezouška K., Kopecký J. and Křen V.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 150-156 (2001)
57. Schomburg D., Salzmann M.: *Enzyme Handbook*, GBF Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1991)
58. Snell D. and Colby J.: *Enzyme and Microbial Technology* **24**: 160-163 (1999)
59. Sugai T., Yamazaki T., Yokoyama M., Ohta H.: *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 1419-1427 (1997)
60. Stevenson D.E., Fehg R., Storer A. C.: *FEBS Lett.* **227**, 112 (1990)
61. Tauber M.M., Cavaco-Paulo A., Robra K-H. and Gübitz G.M.: *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1634-1638 (2000)
62. Thiéry A., Maestracci M., Arnaud A., Galzy P. and Nicolas M.: *J. Basic Microbiol.* **26**: 299-311 (1986)
63. Uhrin D., Barlow P.N.: *J.Magn. Reson.* **126**, 248-255 (1997)
64. Yamaguchi Y., Watanabe I., Satoh Y.: UK patent Application GB 2 054 563 A (1981)

65. Yanasa H., Sakai., Tonomura K.: *Agric. Biol. Chem.* **47**, 473 (1983)
66. Watanabe I., Satoh Y., Enomoto K., Seki S., Sakashita K.: *Agric. Biol. Chem.* **51**, 3201 (1987)
67. Wegman M.A., Heinemann U.F. van Rantwijk., Stolz A., Sheldon R.A.: *J.Mol.Catalysis B: Enzymatic* **11**: 249-253 (2001)
68. Zhang H., Li W., Yang H.: *Weishengwue Tongbao* **17**, 205 (1990)

Súhlasím s požičiavaním tejto práce pre študijné účely a prosím, aby bola riadne vedená evidencia vypožičiavateľov.

Meno a priezvisko s adresou	Číslo OP	Dátum vypožičania	Poznámka
--------------------------------	----------	-------------------	----------