

Biotransformace ve výzkumu a výrobě Výzkumného ústavu antibiotik a biotransformací

RNDr. MIROSLAV BARTA, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Biotransformace zahrnují širokou paletu přeměn, jimž podléhají organické molekuly působením enzymů nebo enzymových systémů živých organismů [1]. Z mnoha reakcí v přírodě probíhajících je lze vymezit jako takové přeměny, při nichž je molekula buď částečně odbourána, nebo naopak jsou k ní připojeny další atomy nebo skupiny atomů, přičemž však výchozí sloučenina představuje převažující část nově vzniklé látky. Z toho vyplývá, že mezi biotransformace náleží jednoduché chemické reakce na základní molekule, jako oxidace, redukce, izomerace, adice, kondenzace atd., ne však složité syntézy sekundárních metabolitů, byť jejich část byla vytvořena prekurzorovými molekulami.

I když enzymových biokonverzí je využíváno po staletí, provádění specifických a přesně definovaných reakcí umožnily až objevy v mikrobiologii a zrod biochemie na konci minulého století. Tyto techniky, využívající převážně mikrobiálních buněk jako zdroje enzymů či jako vlastních katalyzátorů, jsou dnes poměrně široce využívány v chemickém a farmaceutickém průmyslu. Jejich uplatnění má smysl především tam, kde použití konvenčních chemických metod je spojeno s reakčními podmínkami příliš drastickými pro složité organické molekuly nebo je příliš nákladné, ale zvláště výhodné se ukazuje v případech, kdy reakce probíhají stereospecificky.

Snad první důležitá aplikace biotransformací ve farmaci byla nalezena ve 30. letech v souvislosti s výrobou efedrinu, který obsahuje 2 asymetrické atomy uhlíku. Metoda využívající Neubergova objevu, že kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* katalyzují v přítomnosti glukózy konverzi benzaldehydu na fenylacetylmetanol, byla patentována v roce 1934.

Významnou skupinu reakcí spadajících do této oblasti představují mikrobiální přeměny steroidů. I když první patenty jsou z roku 1937, zvláště důležitými se staly poté, co skupina pracovníků fy. Upjohn v roce 1950 ukázala, že při syntéze kortisonu je možno dosáhnout hydroxylace progesteronu na 11-hydroxyprogesteron pomocí buněk *Rhizopus arrhizus*. Na tomto příkladu lze zvláště názorně ukázat efektivnost podobných postupů. Zatímco původní cena 1 g syntetického kortisonu byla 200 \$, po zavedení uvedené reakce spolu s poklesem reakčních stupňů z 37 na 11 klesla na 6 \$. Nakonec pak použitím dalších mikrobiálních stupňů klesla v roce 1980 cena 1 g kortisonu na 40 c. V současné době je k dispozici široká paleta reakcí modifikujících steroidní látky.

Rozsáhlé možnosti dává použití enzymových konverzí i při modifikaci sacharidů. Za jiné lze jmenovat přípravu kyseliny askorbové a glukonové. Při přípravě aminokyselin konkurují v několika případech biotransformace přímé biosyntéze. Je to např. při výrobě kyseliny asparagové z fumarové, L-fenylalaninu z kyseliny trans-skrořicové a při dělení racemických aminokyselin. Další příklad lze uvést z oblasti modifikací antibiotik, kde mimořádný význam má výroba 6-aminopenicilánové kyseliny z penicilinu známá od 50. let, a perspektivní je i analogická výroba 7-aminodesacetoxycefalosporánové a 7-aminocefalosporánové kyseliny. Potenciálních postupů tohoto typu je v oblasti antibiotik celá řada.

K těmto dnes již téměř klasickým aplikacím lze za-

řadit i modifikace peptidových účinných látek. Snad nejnázornější jsou příklady výroby lidského inzulinu. V prvním případě, který zavedla dánská firma NOVO, se jedná o enzymově katalyzovanou výměnu koncové aminokyseliny B-řetězce vepřového inzulinu, ve druhém, který je ve vývoji firmy Hoechst, pak o „opracování“ lidského proinzulinu produkovaného geneticky manipulovanými mikroorganismy.

Zvládnutí biotransformací v průmyslovém měřítku vyžaduje dobrou znalost jak mikrobiologie, tak biochemie mikroorganismů a často nelze dosáhnout přiměřené ekonomie procesů bez uplatnění genetických přístupů. V současné době se jako perspektivní ukazuje i použití jiných než mikrobiálních buněk, především tkáňových kultur buněk rostlinných a živočišných [2]. Výrazný pokrok v řadě biotransformačních procesů přineslo rozpracování technik imobilizace enzymů na konci 60. let a imobilizace buněk v 70. letech. Využití vázaných biokatalyzátorů umožnilo výraznou ekonomizaci řady postupů nejen snížením nákladů na katalyzátor, ale i použitím nových typů reaktorů známých dosud jen z čistě chemických procesů. Zatímco nativních buněk lze použít prakticky výhradně ve vsádkovém reaktoru, aplikace imobilizovaných systémů dovolila kontinualizaci, ať již v míchaných reaktorech, či reaktorech s pevným ložem.

Výzkum biotransformačních procesů, ale i výroba na nich založená má ve VÚAB dlouholetou tradici. Na konci 50. let byla ve spolupráci s ČSAV vypracována technologie výroby 6-azauracil ribosidu, která byla později realizována v n. p. Biotika a současně jako licence prodána do Velké Británie.

V roce 1960 byla podle podkladů VÚFB zavedena výroba steroidních hormonů ve dvou biotransformačních stupních. Základní surovinou byl Reichsteinův steroid S, který se pomocí mikroorganismu *Aspidia orchidis* převádí na směs kortisolu a epikortisolu. Druhou reakcí byla biotransformace kortisonu na prednison, katalyzovaná buňkami *Mycobacterium flavum* [3].

Další a zatím nejvýznamnější proces vyvinutý ve VÚAB je enzymová hydrolyza penicilinu na 6-aminopenicilánovou kyselinu [4]. Práce na tomto postupu, jehož produkt je surovinou pro výrobu polosyntetických penicilinů, probíhá na různých úrovních prakticky průběžně po více než 20 let a představuje do jisté míry modelový problém, na němž získaly odborné zkušenosti už 3 generace pracovníků. Při řešení státního úkolu v minulém pětiletce byla rozpracována technika imobilizace buněk s penicilinacylázovou aktivitou [5] a z ní vycházející technologie výroby 6-APK, která je na špičkové úrovni, byla ohodnocena Cenou federálního ministra pro technický a investiční rozvoj v roce 1983 a představuje významný licenční fond Spofy. Výroba 6-APK se po rozpačitých začátcích ve VÚAB v 60. letech, kdy byla limitována malým odbytem, stala v 70. letech a zvláště po zavedení vázaných buněk důležitou technologií VÚAB a později n. p. Biotika, kde je dnes vyráběno několik desítek tun 6-APK ročně.

Další biotransformační postup, který našel uplatnění ve Spofě, je zmíněná výroba fenylacetylmetanolu, jako meziproduktu při výrobě efedrinu. Tento postup byl do

výroby ve VÚAB zaveden na začátku 70. let. Výzkum, který je součástí stávajícího programu VVZ VÚAB, přinesl výraznou ekonomizaci procesu a odstranil sezónnost výroby zavedením kultivace vlastního mikroorganismu. Dnes představuje efedrin jednu z nosných výrob VÚAB s výraznými exportními možnostmi.

Z dalších postupů spadajících do kategorie biotransformací, které byly nebo jsou rozpracovány ve VÚAB, lze jmenovat výrobu L-lysinu z aminokaprolaktamu, využívající enzymů hydrolázy a racemázy, dvoustupňovou výrobu 7-aminocefalosporánové kyseliny z cefalosporinu C pomocí oxidázy a hydrolázy, výrobu fenylalaninu z kyseliny skořicové katalyzovanou fenylalaninamoniaklyázou nebo stereospecifickou hydrolázou N-acetyl-D, L-fenylalaninu pomocí L-aminoacylázy, přípravu doxycyklinu z anhydrooxytetracyklinu, výrobu 7-aminodesacetoxycefalosporánové kyseliny z desacetoxy-cefalosporinu C a výrobu L-asparágové kyseliny z fumarové, resp. maleinanhydridu katalyzovanou aspartátamoniaklyázou. Oba posledně jmenované postupy, při nichž je využíváno imobilizovaných buněk produkčních organismů, budou v dohledné době realizovány ve výrobě.

Literatura

- [1] FLYNN E. H., ed., „Cephalosporins and Penicillins“, Acad. Press Inc., N. Y. 1972.
 - [2] BRODELIUS, P.: Production of biochemicals with immobilized plant cells — possibilities and problems, Biochem. Engin., III, Ann. N. Y. Acad. Sci. **143**, 1983, 383.
 - [3] DAVIS, P. J.: Microbial transformation of alkaloids. In: J. P. Rosazza [ed]: Microbial transformations of bioactive compounds. CRC Press, Inc, Boca Raton 1982.
 - [4] VOJTÍŠEK, V., ZEMAN, R., BARTA, M., ČULÍK, K., čs. pat. 203 607 (1980).
 - [5] VOJTÍŠEK, V., ZEMAN, R., BARTA, M., ČULÍK, K., DROBNÍK, J., ŠVEC, F.: Vázané mikrobiální buňky jako průmyslové biokatalyzátory, Biol. listy, **44** (3), 1979, 192—211.
- Bárta, M.: Biotransformace ve výzkumu a výrobě Výzkumného ústavu antibiotik a biotransformací.** Kvas. prům. **30**, 1984, č. 9, s. 202—203.
- Článek přináší přehled o využití biotransformačních procesů ve světě a přínosu, který v této oblasti představuje práce Výzkumného ústavu antibiotik a biotransformací.
- Барта, М.: Биотрансформации исследовательской и производственной деятельности в Научно-исследовательском институте антибиотиков и биотрансформаций.** Квас. прум. **30**, 1984, № 9, стр. 202—203.
- Статья приносит обзор использования биотрансформаций в мире и участии Научно-исследовательского института антибиотиков и биотрансформаций в этой научной области.
- Bárta, M.: Biotransformations in Research and Industrial Production of Research Institute of Antibiotics and Biotransformations.** Kvas. prům. **30**, 1984, No. 9, pp. 202—203.
- The paper deals with the survey of the biotransformations use in the world and the contribution of the Research institute of antibiotics and biotransformations in this field.
- Bárta, M.: Biotransformationen in der Forschung und Erzeugung des Forschungsinstitutes für Antibiotika und Biotransformationen.** Kvas. prům. **30**, 1984, No. 9, S. 202—203.
- Der Artikel bringt die Übersicht der Biotransformationenausnutzung in der Welt und des Anteils des Forschungsinstitutes für Antibiotika und Biotransformationen in diesem Fachgebiet.