



Dobór układu reakcyjnego dla enzymatycznej syntezy dipeptydów

Anna Trusek-Hołownia, Andrzej Noworyta

Zakład Inżynierii Bioprosesowej

Instytut Inżynierii Chemicznej i Urządzeń Ciepłych

Politechnika Wroclawska, Wrocław

Selection of reaction system for dipeptides enzymatic synthesis

Summary

Synthesis of dipeptides in water, in the solution of water/organic cosolvent and in the binary aqueous-organic system was studied. A set of equilibrium equations was determined and used to predict a product yield. Reagents activities served as variable. Verification of equation's validity was performed in the synthesis of ZAlaPheOMe dipeptide catalysed by thermolysin. The reaction was carried out in water, metanol-water solution and in – the binary system ethyl acetate – water.

It was shown that the synthesis in the binary system was the most effective. It was concluded that the efficiency of ethyl acetate – water system resulted from: 1) improvement of the reagents solubility; 2) product extraction into the organic phase. An insignificant difference in enzyme stability when thermolysin was immersed in water or in the ethyl acetate – water system was observed.

Process kinetics in the binary system will be the aim of the next studies.

Key words:

dipeptide synthesis, equilibrium equation, organic solvent.

1. Wprowadzenie

W ostatnich latach dużą uwagę poświęca się poszukiwaniom związków charakteryzujących się silnymi zdolnościami smakowymi. Największym zainteresowaniem cieszą się produkty o słodkim smaku jako potencjalne substytuty wysokoenergetycznej sacharozy. Do tej grupy związków zaliczane są m.in. pewne białka roślinne [1], syntetyczne analogi kwasu arylosulfonowego [2] oraz aspartam (AspPheOMe), wykryty przez Schlattera w roku 1965 i od wielu lat produkowany na skalę przemysłową [3]. Jest on jednym z wielu dipeptydów smakowych, które w zależności od swojego składu aminokwasowego charakteryzują się słodkim, gorzkim, słonym lub kwaśnym smakiem [4,5].

Adres do korespondencji

Andrzej Noworyta,
Instytut Inżynierii
Chemicznej i Urządzeń
Ciepłych,
Politechnika Wroclawska,
ul. Norwida 4/6,
50-373 Wrocław;
e-mail:
noworyta@iic.pwr.wroc.pl

biotechnologia

1 (48) 156–170 2000

W celu otrzymania dipeptydów coraz częściej prowadzi się syntezę enzymatyczną przy udziale proteaz, enzymów z klasy hydrolaz. Metoda enzymatyczna uwzględniająca (w odróżnieniu od licznych metod chemicznych) istnienie dwóch izomerów aminokwasu oraz eliminująca reakcje z udziałem ich grup bocznych, pozwala na otrzymanie związków zawierających pożądaną wiązaną peptydową [6,7].

Pierwsza enzymatyczna reakcja syntezy wiązania peptydowego przeprowadzona przez Bergmanna i Fraenkel-Conrata w 1938 r. przebiegała z wydajnością 22% [8]. Obecnie rozwinięto metody mające na celu jej zwiększenie, z których większość oparta jest na zastosowaniu odpowiednio dobranego rozpuszczalnika organicznego jako fazy gromadzącej reagenty słabo rozpuszczalne w wodzie [9,10].

Znaczna grupa enzymów proteolitycznych nie traci aktywności w obecności pewnych rozpuszczalników organicznych, które dobiera się indywidualnie dla danego enzymu, przy czym większość biokatalizatorów wykazuje wyższą aktywność i stabilność w rozpuszczalnikach hydrofobowych. W przypadku zastosowania rozpuszczalnika hydrofilowego, wysokie stężenie substancji organicznej wokół cząsteczki enzymu zwiększa prawdopodobieństwo zniszczenia struktury IV-rzędowej enzymu, zmian konformacyjnych w centrum aktywnym i/lub destabilizacji kompleksu enzym – substrat [11,12].

Ilość wody w układzie niezbędna do zapewnienia aktywności enzymu jest niewielka; w granicznym przypadku odpowiada monowarstwie zgromadzonej wokół hydrofilowej części cząsteczki białka. Stąd, w tego typu reakcjach, udział fazy organicznej dochodzi do 97% v/v [13,14]. Stosowane układy różnią się między sobą zakresem stężeń substratów używanych w reakcji wynikającym z ich rozpuszczalności w danym układzie, aktywnością i stabilnością enzymu, wydajnością reakcji oraz łatwością oddzielenia produktu od katalizatora i pozostałych reagentów.

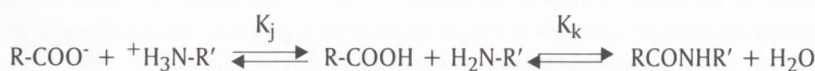
Celem prezentowanej pracy jest analiza możliwości wykorzystania w syntezie dipeptydów różnych układów, tj. roztworu wodnego, jednofazowego roztworu rozpuszczalnika organicznego w wodzie, układu dwufazowego rozpuszczalnik organiczny – woda. Praca dotyczy wyznaczenia równowagowego stopnia przereagowania oraz efektywności procesu w każdym z wymienionych układów. W części teoretycznej pracy przedstawiono analizę tych układów pod względem osiąganego równowagowego stopnia przereagowania. Część doświadczalna pracy dotyczy reakcji syntezy ZAlaPheOMe, związku będącego prekursorem gorzkiego dipeptydu – AlaPhe.

2. Równowaga reakcji syntezy dipeptydów

2.1. Reakcja w roztworze wodnym

Proteazy, enzymy katalizujące reakcję syntezy wiązania peptydowego, są także katalizatorami hydrolizy tego wiązania. Reakcja syntezy wiązania peptydowego pozostaje w równowadze z reakcją hydrolizy, a wartość stałej równowagi dla danej reakcji zależy od warunków prowadzenia reakcji (temperatura, pH, siła jonowa). W roztworze wodnym równowaga reakcji przesunięta jest w kierunku hydrolizy.

Stała równowagi złożonej reakcji syntezy jest kombinacją stałych dwóch reakcji: dysocjacji substratów K_j i kondensacji K_k .



Przyjmując, że reakcje te są elementarne, równowaga może zostać przedstawiona zależnością:

$$K = \frac{c_P \cdot c_{\text{H}_2\text{O}}}{c_{\text{A}^-} \cdot c_{\text{B}^+}} \cdot \frac{\gamma_P \cdot \gamma_{\text{H}_2\text{O}}}{\gamma_{\text{A}^-} \cdot \gamma_{\text{B}^+}} = K_j \cdot K_k \quad (1)$$

K – stała równowagi,

c – stężenie molowe,

γ – współczynnik aktywności,

a indeksy dotyczą: P- RNHCOR', A⁻ – RCOO⁻, B⁺ – R'NH₃⁺.

Dla wartości stężeń reagentów stosowanych w badanej reakcji można z dobrym przybliżeniem przyjąć, że ich współczynnik aktywności równy jest jedności.

Gdy reakcje kondensacji zachodzą w roztworach o pH 6-7, tj. około 3 rzędy różnym od $\text{p}K_{\text{COOH}}$ i $\text{p}K_{\text{NH}_2}$ aminokwasów, dany reagent występuje głównie w postaci form zjonizowanych. Stąd równanie (1) można wyrazić w postaci:

$$K = \frac{c_P \cdot c_{\text{H}_2\text{O}}}{\sum c_A \cdot \sum c_B} \quad (2)$$

gdzie:

$$\sum c_A = [\text{RCOO}^-] + [\text{RCOOH}] \cong [\text{RCOO}^-]$$

$$\sum c_B = [\text{R}'\text{NH}_3^+] + [\text{R}'\text{NH}_2] \cong [\text{R}'\text{NH}_3^+]$$

Reakcje syntezy dipeptydów prowadzi się z reguły przy niedomiarze substratu A, gorzej rozpuszczalnego w wodzie niż substrat B; stąd substrat ten przyjęto jako limitujący, względem którego określano stopień postępu reakcji.

W stanie równowagi, stężenia poszczególnych reagentów wynoszą:

$$c_A^* = c_{A0} (1 - \alpha_A^*), \quad c_B^* = c_{A0} (M - \alpha_A^*), \quad c_P^* = c_{A0} \cdot \alpha_A^*$$

gdzie:

$$M = \frac{c_{B0}}{c_{A0}}$$

α_A^* – równowagowy stopień przereagowania substratu A

c_{A0}, c_{B0} – stężenie początkowe substratów

Równanie (2) wyrażone za pomocą równowagowego stopnia przereagowania substratu A przyjmuje postać:

$$K = \frac{\alpha_A^* \cdot c_{H_2O}}{c_{A0} \cdot (1 - \alpha_A^*) \cdot (M - \alpha_A^*)} \quad (3)$$

2.1.1. Reakcja w roztworze wodnym z wytrąceniem produktu

Wobec niewielkiej rozpuszczalności dipeptydów w wodzie (<1 mM (50°C, pH 7,0)), dla pewnych wartości stężeń początkowych reagentów, stężenie równowagowe produktu może być wyższe aniżeli jego rozpuszczalność. Wówczas powstały produkt reakcji wystąpi w układzie w formie rozpuszczonej o stężeniu C_P^N i w formie stałej o stężeniu C_P^S , a równowagowy stopień przereagowania będzie dodatkowo funkcją rozpuszczalności produktu.

W takim przypadku, w stanie równowagi, stężenie produktu w roztworze jest równe C_P^N , a substratów odpowiednio $c_A^* = c_{A0} - c_P^N - c_P^S$ i $c_B^* = c_{B0} - c_P^N - c_P^S$. Równanie (2) przyjmuje postać:

$$K = \frac{c_P^N \cdot c_{H_2O}}{(c_{A0} - c_P^N - c_P^S) \cdot (c_{B0} - c_P^N - c_P^S)} \quad (4)$$

Określając stopień przereagowania składnika A:

$$\alpha_A = \frac{c_P^N + c_P^S}{c_{A0}}$$

uzyskuje się równanie:

$$K = \frac{c_P^N \cdot c_{H_2O}}{c_{A0}^2 \cdot (1 - \alpha_A) \cdot (M - \alpha_A)} \quad (5)$$

Prowadzenie reakcji syntezy z wytrąceniem produktu oprócz znacznego zwiększenia równowagowego stopnia przereagowania substratu wiąże się dodatkowo z łatwością izolacji produktu z mieszaniny poreakcyjnej. Jednakże, aby nastąpiło wytrącenie produktu należy użyć do reakcji odpowiednio wysokich stężeń substratów. W przypadku aminokwasów, związków słabo rozpuszczalnych w wodzie, stosowanie wysokich stężeń jest ograniczone, co rzutuje na wydajność procesu.

2.2. Reakcja w jednofazowych układach rozpuszczalnika organicznego i wody

Wzrost rozpuszczalności substratów w układzie można osiągnąć m.in. poprzez dodanie hydrofilowego rozpuszczalnika organicznego. W zależności od użytych stężeń początkowych reagentów, reakcje syntezy w jednofazowych układach rozpuszczalnika organicznego i wody mogą przebiegać analogicznie jak w roztworze wodnym, z wytrąceni-

niem produktu z roztworu lub bez wytrącenia. Spośród hydrofilowych rozpuszczalników organicznych w reakcjach syntezy dipeptydów najczęściej stosowany jest metanol, etanol, aceton, acetonitril lub dimetyloformamid [15,16].

W takich układach aktywność wody ma mniejszą wartość niż w roztworze wodnym, co powoduje przesunięcie stanu równowagi na korzyść produktu. Istotne jest uwzględnienie współczynnika aktywności wody, skutkiem czego równanie (1) przyjmuje postać:

$$K = \frac{\alpha_A^* \cdot c_{H_2O}}{c_{A0} \cdot (1 - \alpha_A^*) \cdot (M - \alpha_A^*)} \cdot \gamma_{H_2O} \quad (6)$$

2.3. Reakcja w układzie dwufazowym

Zastosowanie układu dwufazowego rozpuszczalnik organiczny-woda w reakcji syntezy dipeptydów pozwala na użycie znacznie wyższych stężeń substratów oraz uzyskanie wyższego stopnia przereagowania substratu w wyniku przejścia produktu do fazy organicznej (pozareakcyjnej). Efekt ten występuje wyraźnie, gdy współczynnik podziału definiowany jako $P_i = \frac{c_{iO}}{c_{iW}}$, przyjmuje dla produktu wartość > 1 . W takim przypadku równowagowy stopień przereagowania substratu zależy nie tylko od wartości stałej równowagi rozpatrywanej reakcji oraz stężeń początkowych reagentów, ale jest także funkcją współczynników podziału reagentów oraz objętościowego stosunku faz.

Równowaga reakcji syntezy dotyczy fazy wodnej, stąd stałą równowagi opisuje równanie:

$$K = \frac{c_{PW}^*}{c_{AW}^* \cdot c_{BW}^*} \cdot c_{H_2O} \cdot \gamma_{H_2O} \quad (7)$$

Przy założeniu, że:

$$c_{A00} = c_{A0}, c_{A0W} = 0, c_{B00} = 0, c_{B0W} = c_{B0}, c_{P00} = 0, c_{P0W} = 0$$

całkowita masa substratu A w układzie wynosi:

$$N_A = c_{AW} \cdot V_W + c_{A0} \cdot V_O = c_{AW} \cdot (V_W + P_A \cdot V_O) \quad (8)$$

gdzie V_W , V_O odpowiednio objętości fazy wodnej i organicznej.

Stopień przereagowania substratu A równy jest:

$$\alpha_A = \frac{\Delta N_A}{N_{A0}} = \frac{N_{A0} - N_A}{N_{A0}} \quad (9)$$

Po podstawieniu równania (8) uzyskuje się:

$$\alpha_A = \frac{N_{A0} - c_{AW} \cdot (V_W + P_A \cdot V_O)}{N_{A0}} \quad (10)$$

Stąd:

$$c_{AW} = \frac{N_{A0} \cdot (1 - \alpha_A)}{V_W + P_A \cdot V_O} \quad (11)$$

Oznaczając:

$$M = \frac{N_{B0}}{N_{A0}}$$

uzyskuje się:

$$c_{BW} = \frac{N_{A0} \cdot (M - \alpha_A)}{V_W + P_B \cdot V_O} \quad (12)$$

Analogicznie:

$$c_{PW} = \frac{N_P}{V_W + P_P \cdot V_O} = \frac{N_{A0} \cdot \alpha_A}{V_W + P_P \cdot V_O} \quad (13)$$

Wykorzystując równania (7), (11), (12), (13) otrzymuje się postać wyrażenia na stałą równowagi reakcji syntezy przy ekstrakcji reagentów z/do fazy organicznej.

$$K = \frac{\alpha_A^* \cdot c_{H_2O}}{c_{A0} \cdot (1 - \alpha_A^*) \cdot (M - \alpha_A^*)} \cdot \frac{(1 + P_A \cdot \beta) \cdot (1 + P_B \cdot \beta)}{\beta \cdot (1 + P_P \cdot \beta)} \quad (14)$$

gdzie:

$$\beta = \frac{V_O}{V_W}$$

Dobór fazy organicznej jest sprawą podstawową w rozpatrywanych reakcjach. Winna ona prowadzić nie tylko do osiągnięcia jak najwyższego stężenia produktu w układzie, ale również nie zmniejszać aktywności i stabilności enzymu. Ekstrakcja produktu do fazy organicznej, przy równoczesnym pozostawieniu enzymu w fazie wodnej ułatwia proces izolacji produktu i stwarza możliwość wielokrotnego wykorzystania katalizatora.

3. Materiały i metody

Reakcję syntezy wybranego dipeptydu ZAlaPheOMe prowadzono przy udziale termolizyny [EC 2.4.24.4], katalizatora następującej reakcji:



(Z- grupa benzyloksykarbonylowa)

Reakcję prowadzono w roztworze wodnym, 25% metanolu i układzie dwufazowym octan etylu-woda przy stosunku faz 1:1, 9:1 v/v.

3.1. Materiały i aparatura

- termolizyna z firmy Sigma (aktywność proteolityczna oznaczona testem Kunitza [17] – 484 U/mg),
- ZAlaOH, PheOMe · HCl, ZAlaPheOMe (jako standard) z firmy Bachem,
- składniki eluentu (HPLC): metanol, woda, kwas nadchlorowy z firmy Merck,
- aparat HPLC-LC Module firmy Waters,
- gęstościomierz DMA 38 firmy Paar,
- spektrofotometr UV-160A firmy Shimadzu.

3.2. Metody

3.2.1. Synteza ZAlaPheOMe w roztworze wodnym

Reakcję prowadzono w 0,25 M buforze Tris-HCl, pH 7,0, przy początkowym stężeniu ZAlaOH 1,6; 3,2; 5,6; 8,0; 10,4; 15; 17,6; 20 mM i przy stężeniu PheOMe odpowiednio pięć razy wyższym. Stężenie enzymu w układzie, oznaczone metodą Lowry'ego [18], wynosiło 5, 10 i 20 μ M. Reakcję prowadzono w temperaturze 50°C. Produkt analizowano za pomocą HPLC (kolumna C18, faza ruchoma metanol-woda-kwas nadchlorowy 65:35:0,05, przepływ 1,2 ml/min, detekcja UV-258 nm).

3.2.2. Synteza ZAlaPheOMe w 25% metanolu

Syntezę ZAlaPheOMe w jednofazowym roztworze metanolu w wodzie prowadzono w sposób analogiczny jak w roztworze wodnym. Do badań użyto ZAlaOH o początkowym stężeniu 3,2; 5,85; 10; 15; 20; 25 mM i pięciokrotnie wyższe stężenie PheOMe. Stężenie enzymu wynosiło 5, 10, 20 μ M.

3.2.3. Synteza ZAlaPheOMe w układzie dwufazowym octan etylu-woda

Reakcję prowadzono w termostатовanym (50°C) reaktorze mieszalnikowym o wymiarach $h = 90$ mm, $d = 22$ mm; przy dobrym przemieszaniu każdej z faz, bez ich wzajemnej dyspersji. Stosunek objętościowy octan etylu-woda wynosił 1:1 i 9:1. Stężenie początkowe ZAlaOH w fazie organicznej równe było 10, 25, 50 mM, zaś PheOMe w fazie wodnej odpowiednio 50, 125, 250 mM. Reakcję prowadzono przy stężeniu enzymu w fazie wodnej 10 i 20 μ M. W czasie trwania reakcji pobierano próbki z obu faz i oznaczano w nich stężenie produktu za pomocą HPLC.

3.2.4. Wyznaczanie współczynnika podziału reagentów w układzie dwufazowym octan etylu- woda

Współczynniki podziału reagentów (ZAlaOH, PheOMe, ZAlaPheOMe) zostały wyznaczone w warunkach prowadzenia reakcji (50°C, pH fazy wodnej 7,0), przy stosunku objętościowym faz 1:1. Początkowo ZAlaOH i ZAlaPheOMe znajdowało się w fazie organicz-

nej, w stężeniu 4, 10, 20, 40 i 60 mM, a PheOMe w stężeniu 20, 50, 100, 200 i 300 mM w fazie wodnej. Po dodaniu drugiej fazy próby wytrząsano przez jedną dobę, po czym oznaczano stężenie reagentów w obu fazach. Pomiary wykonano zarówno dla każdego reagenta osobno, jak i w obecności współreagentów.

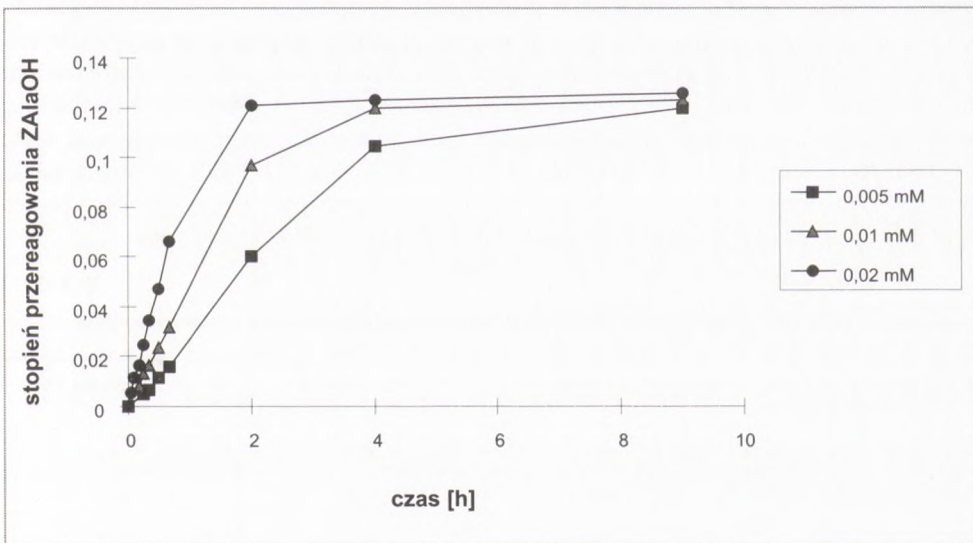
3.2.5. Wyznaczanie stabilności aktywności enzymu

W celu określenia stabilności termolizyny w wybranych układach reakcyjnych, 20 μM roztwór enzymu inkubowano w temperaturze 50°C, przy pH fazy wodnej 7,0. Co określony przedział czasu przeprowadzano test aktywnościowy (reakcja syntezy ZAlaPheOMe w obecności 5,6 mM ZAlaOH, 28 mM PheOMe, przez 90 min). Za 100 % aktywności przyjęto aktywność w danym układzie w momencie rozpoczęcia inkubacji.

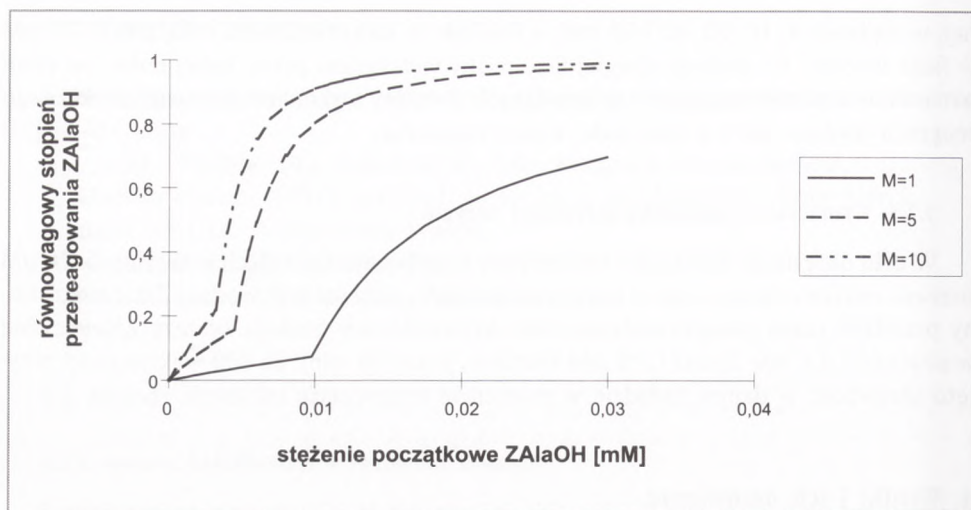
4. Wyniki i ich omówienie

4.1. Synteza w roztworze wodnym

Reakcję syntezy ZAlaPheOMe w roztworze wodnym prowadzono przy początkowym stężeniu ZAlaOH 1,6; 3,2; 5,6; 8,0; 10,4; 15,0; 17,6; 20 mM i PheOMe odpowiednio pięć razy wyższym. Reakcja przebiegała z wytrąceniem produktu, z wyjątkiem syntezy prowadzonej przy dwóch najniższych stężeniach. Przykładowy przebieg reakcji syntezy w roztworze wodnym dla stężenia ZAlaOH 3,2 mM przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Stopień przereagowania dla reakcji syntezy ZAlaPheOMe w 0,25 M buforze Tris-HCl, pH 7,0. Stężenia początkowe: ZAlaOH = 3,2 mM, PheOMe = 16 mM. Poszczególne linie odpowiadają różnym stężeniom enzymu.



Rys. 2. Wpływ stężenia początkowego ZAlaOH na równowagowy stopień przereagowania w reakcji przebiegającej w roztworze wodnym. Punkt przegięcia krzywej odpowiada początkowi wytrącania produktu z roztworu.

Równowagowe przereagowanie substratu wynosiło $\alpha_A^* = 0,0676$ i $\alpha_A^* = 0,120$ odpowiednio dla stężeń początkowych ZAlaOH 1,6 i 3,2 mM. Na podstawie sześciu serii pomiarowych, z równania (3) wyznaczono wartość stałej równowagi, która wynosi 472,7; przy średnim błędzie 1,5%.

Znajomość wartości stałej równowagi reakcji syntezy w roztworze wodnym oraz rozpuszczalności produktu w warunkach prowadzenia reakcji ($c_p^N = 0,714$ mM) pozwoliła obliczyć za pomocą równania (5) wartość równowagowego stopnia przereagowania substratu w reakcji przebiegającej z wytrąceniem produktu. Wyniki obliczeń przedstawiono na rysunku 2, zaś porównanie z wartościami doświadczalnymi w tabeli 1. Średnia różnica wartości stopnia przereagowania obliczonego i uzyskanego doświadczalnie wynosi 4,9%.

Pomimo znacznego przereagowania substratu i łatwej izolacji produktu, w przypadku reakcji przebiegającej z jego krystalizacją z roztworu, zasadniczą wadą procesu prowa-

Tabela 1

Równowagowy stopień przereagowania ZAlaPheOMe w przypadku wytrącenia produktu z roztworu wodnego

Stężenie początkowe ZAlaOH (mM)	α^* teoretyczny	α^* doświadczalny	Błąd względny (%)
8,0	0,71	0,70	1,4
10,4	0,80	0,89	10,1
15,0	0,91	0,94	3,2
17,6	0,93	0,95	2,1
20,0	0,95	0,96	1,0

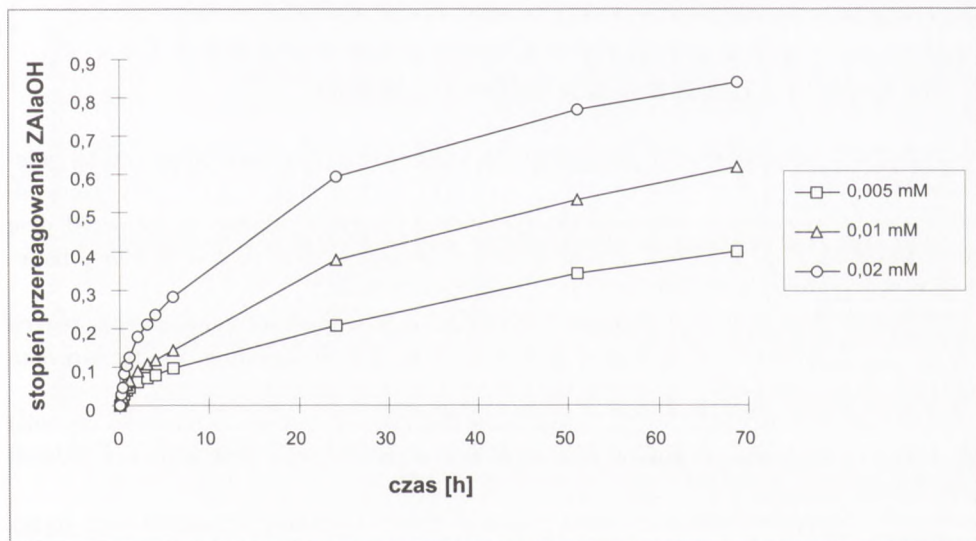
zonego w roztworze wodnym jest jego mała efektywność wynikająca z niskiej rozpuszczalności substratów reakcji. Maksymalne stężenie produktu nie przekracza 30 mM.

4.2. Synteza w jednorodnym roztworze rozpuszczalnika organicznego – 25% metanolu

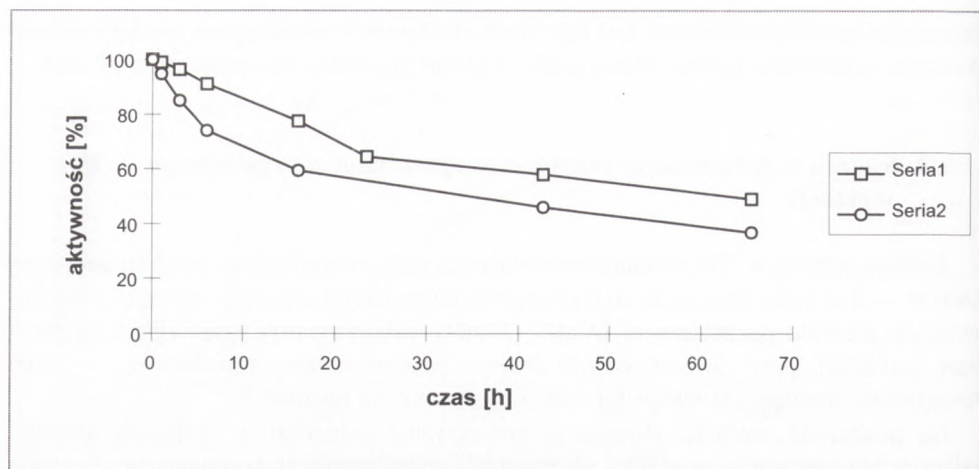
Reakcję syntezy w 25% metanolu prowadzono przy początkowym stężeniu substratu ZAlaOH – 3,2; 5,85; 10,0; 15,0; 20,0 i PheOMe odpowiednio pięć razy wyższym. Przy najwyższym stężeniu początkowym ZAlaOH (25mM) reakcja syntezy przebiegła z wytrąceniem produktu, przy równowagowym stopniu przereagowania substratu $\alpha_A^* = 0,90$. Początkowe stadium przebiegu tej reakcji pokazano na rysunku 3.

Na podstawie wartości stopnia przereagowania substratu w reakcjach przebiegających bez wytrącenia produktu, wg równania (3) obliczono stałą równowagi. Stężenie molowe wody w 25% metanolu określono na podstawie pomiaru gęstości roztworu i jej zależności od stężenia masowego metanolu w wodzie; uzyskując wartość 42,87 mol/l. Współczynnik aktywności wody obliczono na podstawie równań Margulesa [19] i van Laar'a [20], dla których wartości współczynników zaczerpnięto z literatury [21]. Uzyskana wartość współczynnika aktywności wody wynosi 1,021, a wyznaczona wartość stałej równowagi zachodzącej w 25% roztworze metanolu jest równa 443,4; co jest wartością zbliżoną do uzyskanej dla reakcji zachodzącej w roztworze wodnym (rozbieżność 6,2%).

Znajomość wartości stałej równowagi oraz rozpuszczalności substratów w układzie pozwoliła na oszacowanie maksymalnego stężenia produktu w procesie syntezy w 25% metanolu na wartość 130 mM.



Rys. 3. Stopień przereagowania ZAlaOH w 25% metanolu. Poszczególne linie odpowiadają różnym stężeniom termolizyny w układzie. Stężenie początkowe ZAlaOH = 25 mM, a PheOMe = 125 mM.



Rys. 4. Stabilność aktywności termolizyny (50°C, pH 7,0) w roztworze wodnym (1) i w 25% metanolu (2).

Częstym problemem związanym z użyciem rozpuszczalnika organicznego w układach zawierających biokatalizator jest stopniowa utrata jego aktywności. W celu oszacowania zmiany aktywności w czasie, zbadano stabilność aktywności termolizyny w 25% roztworze metanolu, w warunkach prowadzenia reakcji (50°C, pH 7,0). Wyniki przedstawiono na rysunku 4, gdzie dla porównania pokazano również stabilność enzymu w roztworze wodnym.

Czas połowicznego zaniku aktywności proteolitycznej termolizyny określono na 77 h w roztworze wodnym i 39 h w 25% roztworze metanolu, co wskazuje na inaktywujący wpływ tego rozpuszczalnika.

4.3. Synteza w układzie dwufazowym octan etylu-woda

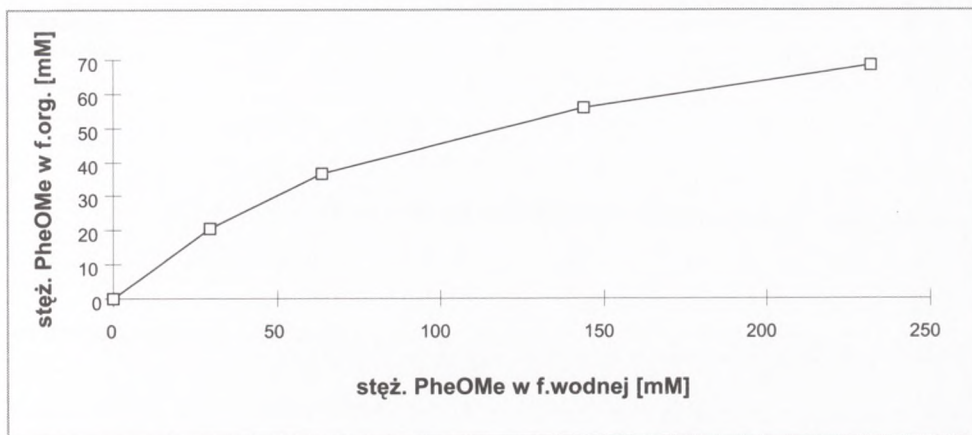
W buforze nasyconym rozpuszczalnikiem organicznym (7,1% mas. octanu etylu) przeprowadzono reakcję syntezy w sposób i warunkach analogicznych jak w roztworze wodnym. Wartość stałej równowagi, po uwzględnieniu niższego stężenia wody w układzie i przy założeniu $\gamma_{H_2O} = 1,0$ wynosi 468,1, co jest wartością zbliżoną do uzyskanej dla reakcji przebiegającej w czystym buforze (rozbieżność 0,98%).

Współczynniki podziału reagentów wyznaczono w warunkach prowadzenia reakcji (50°C, pH 7,0) zarówno w obecności jak i przy braku współreagentów. Zaobserwowano następujące tendencje:

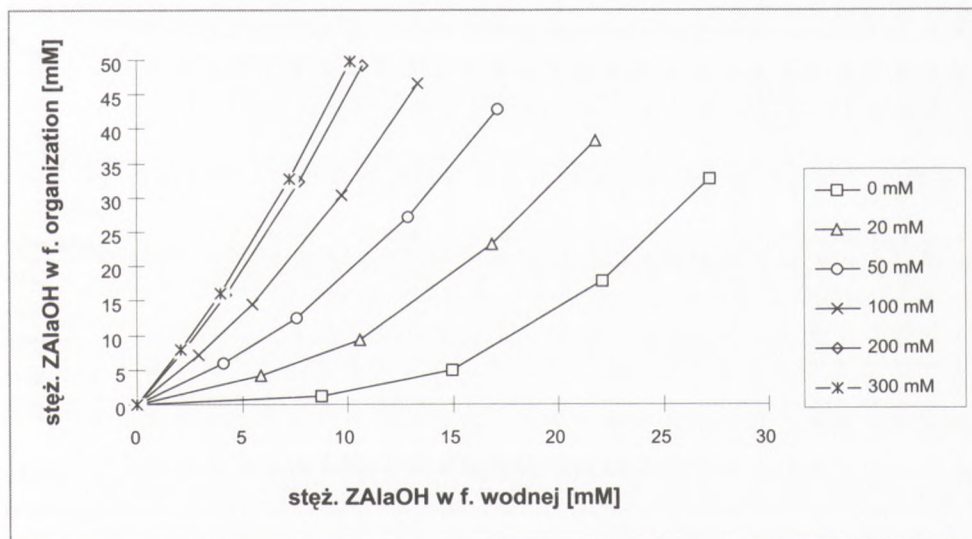
- spadek wartości współczynnika podziału PheOMe wraz ze wzrostem jego stężenia (w badanym zakresie stężeń 50-300 mM) – rysunek 5 oraz brak wpływu ZAlaOH i ZAlaPheOMe na jego wartość;
- wzrost wartości współczynnika podziału ZAlaOH wraz ze wzrostem jego stężenia w układzie (w badanym zakresie stężeń 10-60 mM) oraz silny wpływ PheOMe na jego wartość – rysunek 6. Nie zaobserwowano zmiany jego wartości w obecności produktu;

– stałą wartość współczynnika podziału $ZAlaPheOMe$ ($P = 258,5$) w badanym zakresie stężeń 10-60 mM.

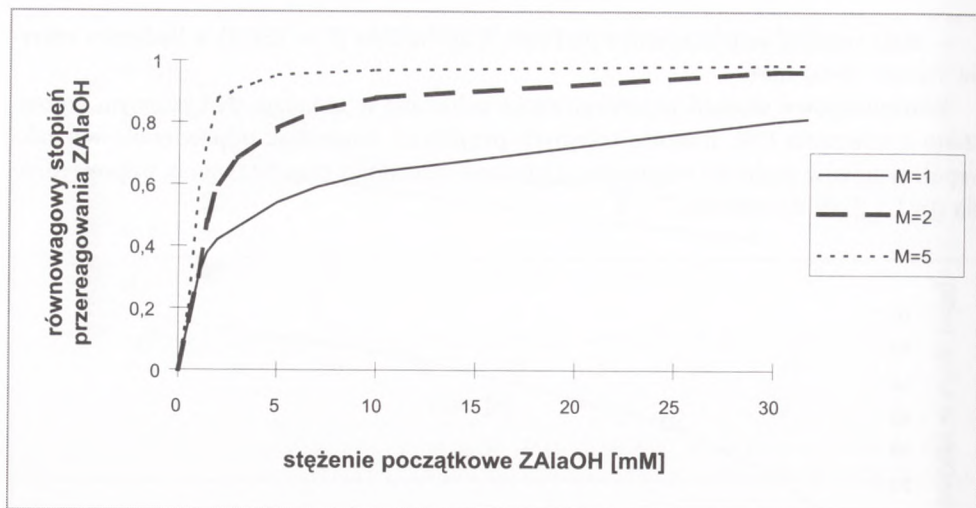
Równowagowy stopień przereagowania substratu w układzie dwufazowym wyznaczono z równania (14), metodą kolejnych przybliżeń dobierając odpowiednie wartości współczynników podziału reagentów. Uzyskane zależności przedstawiono, odpowiednio dla $\beta=1$ i $\beta=9$ na rysunku 7 i 8.



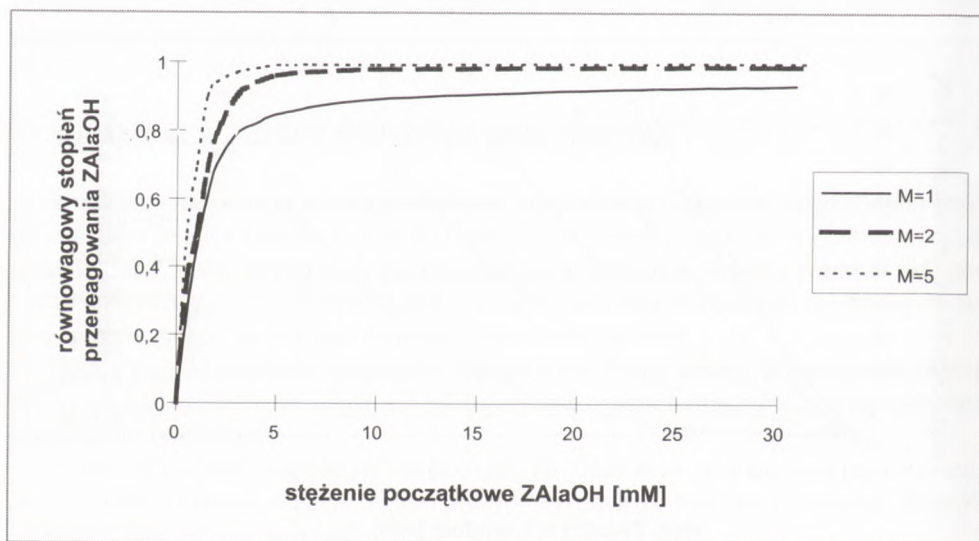
Rys. 5. Podział substratu PheOMe na fazę organiczną (octan etylu) i wodną (0,25 M bufor Tris-HCl, pH 7,0).



Rys. 6. Podział substratu ZAlaOH na fazę organiczną (octan etylu) i wodną (0,25 M bufor Tris-HCl, pH 7,0). Poszczególne linie odpowiadają różnym stężeniom PheOMe w układzie.



Rys. 7. Wpływ początkowego stężenia ZAlaOH na równowagowy stopień przereagowania dla $\beta=1$. Poszczególne linie dotyczą różnego stosunku początkowych stężeń substratów.



Rys. 8. Wpływ początkowego stężenia ZAlaOH na równowagowy stopień przereagowania dla $\beta=9$. Poszczególne linie dotyczą różnego stosunku początkowych stężeń substratów.

Obliczony równowagowy stopień przereagowania porównano z doświadczalnym, uzyskanym przy stężeniu początkowym ZAlaOH 10, 25, 50 mM i $M = 5$ (tab. 2). Zaobserwowano nieco mniejszą wartość doświadczalnego stopnia przereagowania we wszystkich pomiarach. Odstępstwo od wartości teoretycznej wynosi średnio 5,0%.

Tabela 2

Równowagowy stopień przereagowania substratu w układzie dwufazowym octan etylu-woda dla stosunku faz 1:1 i 9:1 v/v. Reakcję prowadzono przy $M=5$.

Stężenie początkowe ZAlaOH (mM)	Stosunek faz β	α^* teoretyczny	α^* doświadczalny	Błąd względny (%)
10	1:1	0,88	0,81	8,6
25	1:1	0,95	0,92	3,3
50	1:1	0,96	0,94	2,1
10	9:1	0,98	0,92	6,5
25	9:1	0,99	0,92	7,6
50	9:1	0,99	0,97	2,1

Mając na uwadze rozpuszczalność substratów w układzie dwufazowym octan etylu-woda, maksymalne stężenie produktu w układzie wynieść może 420 mM.

Połowiczny zanik aktywności enzymatycznej w układzie dwufazowym octan etylu-woda występuje po czasie 61 h, co jest wartością zbliżoną do uzyskanej w roztworze wodnym (67 h). Świadczy to o niewielkim ujemnym wpływie octanu etylu na stabilność aktywności termolizyny.

5. Podsumowanie

Rozpatrzono równowagę reakcji syntezy dipeptydów w następujących układach: w roztworze wodnym, w jednorodnym roztworze rozpuszczalnika organicznego i wody oraz w układzie dwufazowym rozpuszczalnik organiczny-woda. Przedstawiono równania opisujące stałą równowagi reakcji w wymienionych układach. Wyniki uzyskane dla reakcji syntezy ZAlaPheOMe, prowadzonej przy udziale termolizyny, pozwoliły pozytywnie zwerifikować te równania. Uzyskana średnia wartość $K = 461,4$ opisuje z dobrą dokładnością równowagę badanej reakcji w rozważanych układach.

Stwierdzono, że reakcja syntezy najbardziej efektywnie (ze względu na możliwość użycia wysokich stężeń substratów i bliski jedności stopień przereagowania) zachodzi w układzie dwufazowym octan etylu-woda. Stwierdzono również zadowalającą stabilność biokatalizatora w tym układzie, porównywalną ze stabilnością w roztworze wodnym. Układ octan etylu-woda został wybrany do dalszych badań mających na celu określenie kinetyki rozpatrywanej reakcji.

Autorzy składają serdeczne podziękowania prof. Antoniemu Polanowskiemu z Uniwersytetu Wrocławskiego za inspirację tematem oraz cenne uwagi przy jego opracowywaniu.

Literatura

1. Szwaćka M., Malepszy S., (1998), *Biotechnologia*, 1, 40, 64-81.
2. Ratajczak A., Sobalska I., Polański J., (1998), *Materiały Konferencji – XLI Zjazd Naukowy PTCh we Wrocławiu*, 347.
3. Nakanishi K., Matsuno R., (1998), *Food Biotechnol.*, Ed. Elsevier, London, 219-249.
4. Kirimura J., Shimizu A., Kimizuka A., Ninomiya T., Katsuya N., (1969), *J. Agr. Food Chem.*, 17, 4, 689-695.
5. Solms J., (1969), *J. Agr. Food Chem.*, 17, 4, 686-688.
6. Jakubke H., Jeschkeit H., (1989), *Aminokwasy, peptydy, białka*, PWN, Warszawa, 92-173.
7. Oyama K., Irino S., (1987), *Method Enzymol.*, 136, 503-516.
8. Jakubke H., (1987), *The peptides*, Vol. 9, Academic Press, New York, 103-165.
9. Hwang K., Lee S., Lee K., (1995), *Biotechnol. Lett.*, 17, 1, 71-76.
10. Jakubke H., Kuhl P., Konnecke A., (1985), *Angew. Chem. Eng. Ed.*, 24, 2, 85-93.
11. Ghatore A., Guerra M., Bell G., Halling P., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 1355-1361.
12. Yang Z., Robb D., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 365-370.
13. Klibanov A., (1989), *Trends Biochem. Sci.*, 4, 141-144.
14. Parker M., Moore B., Blacker A., (1995), *Biotechnol. Bioeng.*, 46, 452-458.
15. Lozano P., Diego T., Iborra J., (1995), *Biotechnol. Lett.*, 6, 603-608.
16. Zaks A., Klibanov A., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 7, 8017-8021.
17. Kunitz M., (1947), *J. Gen. Physiol.*, 30, 291-310.
18. Lowry O., Rosenbrough N., (1951), *Biol. Chem.*, 193, 265-392.
19. Margules M., (1895), *S-B. Akad. Wiss. Wien Math-natur, Kl II*, 104, 1234.
20. J. van Laar., (1910), *Z. Phys. Chem.*, 72, 723-751.
21. Gmehling J., Onken U., (1977), *Vapor-liquid equilibrium data collection*, Vol. I, P. 1B, Dechema, Frankfurt Main, 32.