



Nowe metody immobilizacji enzymów

Marianna Turkiewicz, Krzysztof Makowski

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

New methods of enzyme immobilization

Summary

This article reviews new methods of enzymes immobilization. Due to high activity under harsh conditions cross-linked enzyme crystals (and aggregates) and biocatalytic plastics are used for catalysis of reactions usefull for pharmaceutical, food and chemical industries, and for medicine. General information about CLECs, CLEAs, and biocatalytic plastics, including methods of their preparation, examples of immobilized enzymes, some chemical and physical properties, and their potential applications are presented.

Key words:

cross-linked enzyme crystals, CLECs; cross-linked enzyme aggregates, CLEAs; biocatalytic plastics; smart polymers.

1. Wstęp

Preparaty immobilizowanych enzymów, całych komórek, bądź też ich fragmentów są szeroko rozpowszechnione i stosowane w licznych przemysłowych procesach (1). Oprócz tego, że można je wykorzystać wielokrotnie, jak również, iż nie powodują zanieczyszczeń środowiska reakcyjnego, wykazują inne zalety, przede wszystkim zwiększoną termostabilność, a często także korzystnie zmienioną wartość optymalnego pH. Niewątpliwą wadą immobilizowanych białek jest ich wysoka cena w porównaniu z enzymami natywnymi, wynikająca zarówno z konieczności przeprowadzenia samego procesu unieruchomienia, jak i z ceny nośnika, która zwykle stanowi znaczną część wszystkich kosztów.

Adres do korespondencji

Krzysztof Makowski,
Wydział Biotechnologii
i Nauk o Żywności,
Instytut Biochemii
Technicznej,
Politechnika Łódzka,
ul. Stefanowskiego 4/10,
90-924 Łódź;
e-mail: krzymak@o2.pl

Współczesne produkty biotechnologii powstają w głównej mierze dzięki wykorzystaniu enzymów wytwarzanych przez rekombinowane drobnoustroje, czasem też są syntetyzowane przez enzymy dzikich szczepów pochodzących ze środowisk ekstremalnych (wysoka/niska temperatura, wysokie zasolenie, podwyższone ciśnienie), dlatego też ceny osiągnięte przez takie związki są zwykle bardzo wysokie. Największym popytem cieszą się enzymy charakteryzujące się specyficznymi właściwościami w odniesieniu do katalizowanej reakcji, jak również pożądanymi parametrami fizykochemicznymi. Ważna jest także ilość komercyjnie dostępnego enzymu, która często, np. ze względu na trudności w hodowli, nie zaspokaja potrzeb coraz bardziej chłonnego rynku. Z tego względu wzrasta znaczenie prac mających na celu otrzymywanie wydajnych, immobilizowanych biokatalizatorów.

Pierwotnie termin „immobilizacja” określał techniki przeprowadzania enzymu ze stanu rozpuszczalnego do nierozpuszczalnego, głównie przez mechaniczne wiązanie go z nośnikiem (2). Obecnie definicja immobilizowanych biokatalizatorów jest dużo szersza i odnosi się nie tylko do wiązania białka z nośnikiem, ale także do metod pozwalających na wykorzystanie biokatalizatorów w procesach ciągłych.

Biorąc pod uwagę fakt, że oprócz reakcji w typowych dla białek enzymatycznych środowiskach, czyli w roztworach wodnych, coraz częściej reakcje z ich udziałem prowadzi się w środowiskach rozpuszczalników organicznych, które dużo szybciej niż środowiska wodne powodują spadek aktywności, unieruchamianie enzymów jest jedną z metod pozwalających na przedłużenie użytkowania biokatalizatorów w takich warunkach. Matryce wykorzystywane z myślą o reakcjach prowadzonych w środowiskach wodnych często nie nadają się do środowisk organicznych, dlatego też trwają poszukiwania nie tylko innych materiałów, ale i nowych rozwiązań, które sprawdzałyby się w reakcjach prowadzonych zarówno w środowiskach wodnych, jak i organicznych. W artykule przedstawimy Czytelnikom takie właśnie nowatorskie rozwiązania w obszarze immobilizacji biokatalizatorów, rozszerzające możliwości ich wykorzystania w różnorodnych środowiskach i warunkach.

2. Sieciowane kryształy białek enzymatycznych (CLECs – *Cross-Linked Enzyme Crystals*)

Pierwsze próby sieciowania kryształów białek podjęli już 40 lat temu Doscher i Richards (3), traktując karboksypeptydazę A aldehydem glutarowym. Doświadczenia przez nich przeprowadzone miały na celu zbadanie, czy sieciowanie kryształów tego enzymu podniesie ich stabilność wydłużając tym samym przydatność do analiz dyfraktometrycznych oraz czy czynnik sieciujący nie spowoduje zmiany konformacji białka. Okazało się, zgodnie zresztą z przypuszczeniami autorów, że sieciowanie zdecydowanie zwiększa stabilność białka, nie powodując większych zmian w jego strukturze. Stwierdzono ponadto, że CLECs karboksypeptydazy A są nierozpuszczalne w środowisku wodnym i zachowują w nim znaczną część (około 30%) wyjścio-

wej aktywności katalitycznej. To doświadczenie pokazało, że usieciowane kryształy są właściwie immobilizowanym enzymem, w którym białko pełni podwójną rolę: matrycy i biokatalizatora. Do idei sieciowania kryształów powrócono dopiero w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia (4), wykorzystując jako model termolizynę (5), stosowaną w syntezie peptydów, m.in. w syntezie niskokalorycznego środka słodzącego, znanego pod handlową nazwą aspartam. Obecnie immobilizacja enzymów w formie CLECs stała się dość popularną, choć jeszcze w niewielkim stopniu skomercjalizowaną metodą otrzymywania biokatalizatorów charakteryzujących się szczególnymi właściwościami.

2.1. Ogólna charakterystyka CLECs

CLECs otrzymuje się w dwóch etapach: należy z roztworu wykryształować białko enzymatyczne, a następnie poddać jego kryształy sieciowaniu, wykorzystując jakiś czynnik sieciujący, zwykle aldehyd glutarowy. Użycie takiego czynnika jest niezbędne dla zwiększenia trwałości kryształu. Co prawda, jest już on stabilizowany licznymi oddziaływaniami niekowalencyjnymi, powodującymi, że molekuly białka w kryształach są dużo bardziej sztywne niż cząsteczki białka rozpuszczonego, jednakże nie są one wystarczające by kryształ nie uległ rozpuszczeniu po przeniesieniu do innego medium z roztworu, w którym następował proces krystalizacji (6). Aby uzyskać preparat o jak najlepszych właściwościach, zarówno w pierwszym, jak i w drugim etapie przeprowadza się optymalizację procesu (4,7).

Ponieważ struktura kryształu jest nieporównywalnie bardziej spójna niż molekuly białka natywnego, wydawałoby się, że dodatkowe usieciowanie do formy CLECs może spowodować istotne problemy z dyfuzją substratu i produktu przez kryształ, przez co enzym stanie się nieefektywny. Jest jednak inaczej. Od 35 do 65% objętości kryształu zajmują kanały wypełnione rozpuszczalnikiem, które umożliwiają swobodny transport substratu do wnętrza struktury i produktu w odwrotnym kierunku (4,8,9). W doświadczeniach z termolizyną wykazano, że przy wysokich stężeniach substratu, stosowanego w syntezie heksapeptydów, kryształy proteiny charakteryzują się podobną aktywnością jak enzym wolny. Potwierdzono tę tezę przeprowadzając badania, w których również wykorzystano kryształy termolizyny, ale za substrat posłużył łańcuch B utlenionej insuliny, zbudowany z 30 aminokwasów (10). CLECs termolizyny przejawiały co prawda tylko 4% aktywności charakteryzującej enzym rozpuszczalny, ale białko immobilizowane na agarozie charakteryzowało się aż 30-krotnie niższą aktywnością niż CLECs, mimo że użyto je w ponad 10-krotnie większym stężeniu. Warto wspomnieć, że kryształy termolizyny tworzą się wokół sześciokrotnej osi symetrii i zawierają duże pory przebiegające przez całą długość kryształu. Ich średnica wynosi w przybliżeniu 25 Å (10). Łańcuch B insuliny w środowisku wodnym przyjmuje strukturę globularną, co mogłoby stanowić istotną przeszkodę przy przenikaniu substratu w głąb katalitycznego kryształu termolizyny, jed-

nak omawianą reakcję przeprowadzono w 90% mieszaninie dimetyloformamidu (DMF) i etanolu, w którym peptyd ulega znacznej linearyzacji, co w pewnej mierze zmniejszyło opory dyfuzyjne i umożliwiło penetrację substratu do wnętrza kryształu.

W badaniach oporów dyfuzyjnych enzymów immobilizowanych metodami klasycznymi dowodzi się, że zależą one m.in. od średnicy cząsteczek nośnika. W pewnym stopniu problem ten dotyczy również kryształów sieciowanych enzymów (4,11), bowiem od wielkości kryształu zależy dalsze wykorzystanie sieciowanego biokatalizatora. Najlepsze wyniki uzyskuje się zwykle dla kryształów, których długość nie przekracza 100 μm ; charakteryzują się one wysoką aktywnością, dobrymi parametrami filtracyjnymi, a opory dyfuzyjne wewnątrz struktury są zminimalizowane (4,5,12). Zastosowanie znalazły nawet CLECs o długości nie przekraczającej 5 μm , bowiem w bardziej szczegółowych badaniach wykazano, że dla aktywności usieciowanych kryształów ważniejsza od długości jest ich grubość (4,6,11). Stwierdzono nawet, że w kryształach o grubości do 5 μm te opory nie występują, a długość kryształu nie ma znaczenia dla aktywności enzymu, jeżeli jego grubość nie przekracza tej granicznej wartości. Okazało się, że grubość 5 μm jest krytyczna przy powstawaniu oporów dyfuzyjnych w kryształach rozmaitych enzymów, np. termolizyny (kryształy w kształcie pręcików), subtylizyny (kryształy w kształcie igieł), acylazy penicylanowej (kryształy w kształcie płytek) oraz lipaz: bakteryjnej *Pseudomonas cepacia* i drożdżowej *Candida rugosa* (w obu przypadkach kryształy w formie płytek), zatem zjawisko ma szerszy charakter i wartość tę można przyjąć za kryterium przy selekcji najbardziej odpowiednich dla katalizy kryształów enzymów.

Szczegółowe badania porównawcze oporów dyfuzyjnych przeprowadzili Tischer i in. (12), wykorzystując wspomnianą już acylazę penicylanową, immobilizowaną na różnych nośnikach (Eupergit C, Eupergit 250 L) oraz usieciowane kryształy tego enzymu o średnicy 7,5 μm . Wykazali oni, że kryształy o wielkości nie przekraczającej dziesiątej części zastosowanych w doświadczeniu cząsteczek nośników z immobilizowanym białkiem, wykazują stukrotnie wyższą aktywność, a ponadto nie stwierdzili negatywnego wpływu rosnących oporów dyfuzyjnych na aktywność CLECs acylazy penicylanowej.

Ciekawy eksperyment z użyciem CLECs wspomnianej już lipazy z *Candida rugosa* przeprowadzili Overbeeke i in. (13). Enzym ten, podobnie jak spora grupa lipaz, w obszarze okalającym centrum aktywne posiada tzw. wieczko (ang. *lid*), zamykające dostęp do kieszeni katalitycznej. Proces krystalizacji przeprowadzono w taki sposób, aby uzyskać kryształy zarówno z wieczkiem otwartym, jak i z zamkniętym. CLECs otrzymane z formy enzymu z otwartym wieczkiem wykazywały większą enancjoselektywność względem wszystkich użytych substratów niż usieciowane kryształy cząsteczek lipazy z zamkniętym wieczkiem. Oprócz wyższej enancjoselektywności wariant kryształu z otwartym wieczkiem wykazywał także wyższą aktywność niż CLECs z cząsteczkami lipazy, w których wieczko musiało zostać dopiero otwarte, czyli zachodziła konieczność pokonania dodatkowej bariery energetycznej.

Podobne wyniki uzyskali Lalonde i in. (8) w reakcji hydrolizy estru chloroetylu keto-profenu przy użyciu tej samej drożdżowej lipazy.

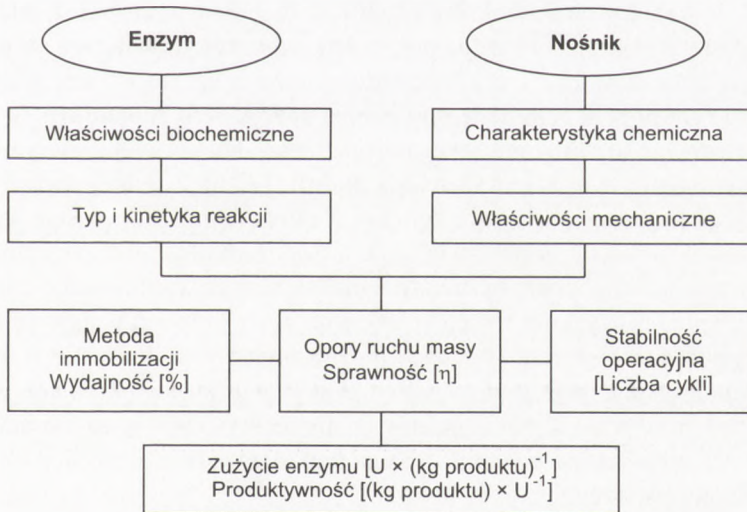
2.2. Wady i zalety CLECs

Przy komercjalizacji enzymów najważniejszym czynnikiem, decydującym o ewentualnej aplikacji białka katalitycznego, jest koszt wdrożenia produkcji i zyski uzyskane ze sprzedaży nowego produktu.

Na koszt immobilizowanych biokatalizatorów wpływa cena enzymu (zależy głównie od warunków biosyntezy i kosztów procesów prowadzonych po jej zakończeniu, tzw. *downstream processing*) oraz cena nośnika i koszty jego przygotowania do immobilizacji.

W procesach wydzielania i oczyszczania enzymów bardzo istotne jest uzyskanie odpowiedniej formy białka, takiej, aby odpowiadała zadaniu jakie ma pełnić immobilizowany biokatalizator. Na końcowy efekt immobilizacji wpływa ponadto wiele czynników: stopień upakowania białka w nośniku, stopień zachowanej aktywności unieruchomionego biokatalizatora względem formy wolnej, a także stabilność operacyjna preparatu, która jest bardzo istotnym parametrem, zwłaszcza dla procesów prowadzonych w układzie ciągłym (12). Określa on czas, po którym unieruchomiony biokatalizator traci 50% początkowej aktywności. Zbyt mała stabilność operacyjna powoduje spadek wydajności procesu, a co za tym idzie konieczność wydłużenia czasu kontaktu medium z biokatalizatorem.

Najważniejsze czynniki wpływające na użyteczność immobilizowanych biokatalizatorów zostały przedstawione na rysunku 1.



Rys. 1. Parametry enzymu i nośnika wpływające na końcową przydatność immobilizowanego enzymu (wg Tischera W. i Kasche V. [12]).

Wykorzystanie w immobilizacji nośnika innego niż unieruchamiane białko powoduje, że dużą część preparatu stanowi nieaktywny katalitycznie materiał, co jest niekorzystne z ekonomicznego punktu widzenia. Z reguły enzym osadzony na nośniku stanowi zaledwie około 5% całej objętości preparatu, pozostałe 95% to nośnik (5,14-16). W tym kontekście zasadniczą zaletą CLECs jest fakt, że składają się wyłącznie z homogenego białka, dzięki czemu ta forma immobilizowanego enzymu nie tylko przejawia znacznie wyższą aktywność, ale czyni niemożliwym zajście w środowisku reakcji konkurencyjnych, zatem selektywność takiego procesu znacznie przekracza uzyskiwaną w reakcjach z użyciem immobilizowanych preparatów białek niehomogennych. Homogenność kryształów sieciowanych enzymów jest niewątpliwą zaletą także z innego względu. W przypadku użycia CLECs jako biosensorów lub potencjalnych leków ulega minimalizacji zagrożenie organizmu reakcją immunologiczną. Byłoby ono dużo wyższe, gdyby w skład użytego biosensora wchodziły dodatkowe związki, np. towarzyszące białka, bądź też związki tworzące nośnik dla enzymu (4). Wysoka aktywność CLECs w przeliczeniu na jednostkę objętości pozwala konstruować biosensory o bardzo wysokiej czułości (5).

Co prawda, w kryształach może nastąpić zjawisko współkrystalizacji z nieaktywnymi formami enzymu, powodujące pewne „rozcieńczenie” aktywności (12), jednak w porównaniu z enzymami immobilizowanymi metodami klasycznymi, CLECs wykazują tak wysoką aktywność, że zjawisko współkrystalizacji można pominąć. Wysoka aktywność sieciowanych kryształów daje znaczne oszczędności związane z pełniejszym wykorzystaniem objętości bioreaktorów, które w całości wypełnione są aktywnym enzymem, a nie jak w przypadku innych form immobilizowanych biokatalizatorów także nieaktywnym katalitycznie nośnikiem.

Niewątpliwą zaletą sieciowanych kryształów białek enzymatycznych jest wspomniana już uporządkowana struktura kanałów przebiegających przez całą objętość kryształu, która zapewnia swobodną penetrację substratu do wnętrza. W przypadku użycia innych nośników zbyt mała porowatość stanowi często istotny problem, który rozwiązuje się poprzez dodanie do nośnika specjalnych substancji. Tak na przykład przy stosowaniu chitozanu jako matrycy, związkami zwiększającymi porowatość są zwykle alginian bądź poliwinylpyrolidon (17,18). Z jednej strony wpływ takich dodatków jest korzystny, gdyż zgodnie z założeniem rzeczywiście wzrasta porowatość nośnika, często jednak związki te nie wiążą białka podczas immobilizacji, albo też po zakończeniu procesu utwardzenia nośnika są wypłukiwane z jego struktury. W ten sposób uzyskuje się co prawda bardziej porowatą matrycę, jednakże o mniejszej zdolności wiązania białka w porównaniu z nośnikiem nie traktowanym dodatkowymi substancjami. Usunięcie z nośnika związku zwiększającego porowatość może też spowodować zmniejszenie liczby reaktywnych grup biorących udział w kowalencyjnym wiązaniu enzymu, a co za tym idzie, obniżyć stopień upakowania matrycy biokatalizatorem.

Kolejną zaletą CLECs jest wysoka stabilność i odporność na czynniki denaturujące, takie jak temperatura i rozpuszczalniki organiczne, co wynika z obecności

licznych oddziaływań elektrostatycznych i hydrofobowych powstających w białku w trakcie procesu krystalizacji, a następnie sieciowania (10). Zwarta struktura kryształu zapewnia też wysoką odporność na działanie proteinaz, które łatwo degradują enzymy rozpuszczane, a także immobilizowane w konwencjonalny sposób. W przypadku syntez, w których substratami są nie występujące w przyrodzie aminokwasy, wykorzystuje się m.in. enzymy proteolityczne. Enzymy te, pozostając w roztworze, często ulegają zjawisku autodegradacji, polegającym na hydrolizie wiązań peptydowych wewnątrz jednej molekuly biokatalizatora przez inną jego cząsteczkę. Konsekwencją autodegradacji jest uwolnienie do medium reakcyjnego aminokwasów nie będących substratami pożądanej reakcji enzymatycznej (10,19). Zanieczyszczenia te są niepożądane, zwłaszcza w przypadku technologii wymagających otrzymania produktu o wysokiej czystości, jak ma to miejsce np. w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym, bądź kosmetycznym. Ich obecność w końcowym produkcie może wywołać reakcję alergiczną, a nawet zagrażający życiu szok anafilaktyczny. Oczyszczenie medium z niepożądanych produktów wiąże się z koniecznością stosowania kosztownych i pracochłonnych procesów, a często jest nawet niemożliwe do wykonania. Wysoką odporność na działanie proteinaz wykazują, np. kryształy termolizyny, które inkubowane przez 4 doby z dodatkiem pronazy (mieszanina enzymów proteolitycznych z *Streptomyces griseus*) nie tracą aktywności, podczas gdy enzym natywny traci ją po 90 minutach. Podobne wyniki uzyskano przy trawieniu pronazą CLECs esterazy pochodzącej z wątroby świni i sieciowanych kryształów wieprzowej elastazy trzustkowej (5).

Odporność kryształów sieciowanych enzymów na atak proteolityczny dotyczy właściwie wszystkich rodzajów immobilizowanych w ten sposób enzymów. Struktura kryształu jest zbyt zwarta aby enzym proteolityczny mógł spowodować rozkład białka, a kanały występujące w CLECs zbyt wąskie, aby proteazy mogły penetrować do wnętrza struktury krystalicznej.

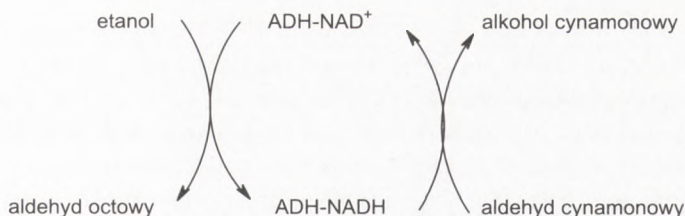
Wzrastające zainteresowanie biokatalizą w środowiskach niewodnych spowodowało, że zaczęto szukać rozwiązań, które doprowadziłyby do zwiększenia stabilności białek enzymatycznych w rozpuszczalnikach organicznych. W początkowej fazie do immobilizacji enzymów o takim przeznaczeniu stosowano nośniki klasyczne. Okazały się jednak nieprzydatne ze względu na swój hydrofilowy charakter, który uniemożliwiał dostateczny kontakt substratu rozpuszczonego w niepolarnym środowisku z biokatalizatorem związanym z polarnym nośnikiem. Dalsze prace pozwoliły znaleźć hydrofobowe matryce nadające się do stosowania w roztworach organicznych, jednak otrzymywane z ich użyciem preparaty unieruchamianych enzymów wykazywały te same wady jak otrzymane na nośnikach hydrofilowych i przeznaczone do środowisk wodnych. Mając do dyspozycji CLECs postanowiono określić jaki wpływ mają rozpuszczalniki organiczne na stabilność i aktywność kryształów enzymów i porównać je z tymi wartościami natywnych białek i preparatów immobilizowanych klasycznymi metodami. StClair (10) wykazała np., że kryształy termolizyny po inkubacji w 40°C w 50% wodnym roztworze tetrahydrofuranu zachowały ponad 95%

aktywności początkowej, podczas gdy enzym rozpuszczalny tylko 36%. Podobną tendencję zaobserwowano podczas inkubacji kryształów w wyższych temperaturach i w denaturujących warunkach pH (5). Okazało się ponadto, że również niewykryształizowane, ale liofilizowane białka enzymatyczne przejawiają wysoką stabilność w rozpuszczalnikach organicznych nawet w wysokich temperaturach, jednak jest to spowodowane brakiem cząsteczek wody w środowisku; jej wprowadzenie, nawet w minimalnej ilości, powoduje natychmiastową denaturację enzymu (19). O wysokiej stabilności CLECs subtylizyny Carlsberg w środowisku organicznym donosili też Bull i in. (20). Czas półtrwania sieciowanych kryształów tego enzymu w oktanie wynosił 200 dni w 45°C, zatem okazały się prawie 40 razy bardziej stabilne niż enzym rozpuszczalny. Kolejnych dowodów na wysoką stabilność CLECs dostarczyli Sobolov i in. (21) uzyskując kryształy aldolazy 1,6-bisfosfofruktozy z mięśni królika, enzymu o szerokim zastosowaniu w stereoselektywnej kondensacji aldolowej między fosforanem dihydroksyacetonu a aldehydami (22). Rozpuszczalna forma tego enzymu traciła aktywność po 3-5 dniach, natomiast dla kryształów nie stwierdzono spadku aktywności nawet po 6 miesiącach przechowywania w temperaturze pokojowej. Wyższą stabilność w porównaniu z formą rozpuszczalną kryształy aldolazy wykazywały także w rozpuszczalnikach organicznych.

Bardzo ważne z technologicznego punktu widzenia może okazać się doświadczenie przeprowadzone przez Fry i in. (23,24), w którym sieciowaniu poddano mieszaninę kryształów dwóch enzymów: dehydrogenazy liponoamidowej i dehydrogenazy mleczanowej, uzyskując CLECs wykazujące aktywność obydwu enzymów. Może to zapoczątkować produkcję multizymów katalizujących ciąg reakcji prowadzących do pożądanego produktu, jakkolwiek dość problematyczny jest, jak się wydaje, taki dobór białek, aby działały równie wydajnie w tym samym środowisku reakcyjnym.

Okazało się także, że istnieje możliwość uzyskania CLECs katalitycznych białek wykorzystujących kofaktory. Lee i in. (25), otrzymali np. kompleks dehydrogenazy alkoholowej (ADH) z wątroby konia z nukleotydem nikotynamidoadeninowym (NAD) i dimetylosulfotlenkiem (DMSO), sieciowany aldehydem glutarowym. Uzyskane kryształy wykazywały aktywność względem alkoholu etylowego, działając wg schematu przedstawionego na rysunku 2. Kryształy wykazywały w środowisku organicznym dużo wyższą aktywność niż enzym rozpuszczalny: w roztworze 16% dimetoksyetanu enzym natywny przejawiał zaledwie 16% początkowej aktywności, podczas gdy kryształy zachowały aż 75% wyjściowej aktywności. Przy 24% stężeniu dimetoksyetanu enzym rozpuszczalny ulegał całkowitej inaktywacji, natomiast forma krystaliczna zachowała jeszcze 69% aktywności wyjściowej. Wykazano też, że dodatek do środowiska reakcji jonów Zn^{2+} powodował znaczne zwiększenie aktywności CLECs ADH, nie dawał natomiast podobnego efektu w przypadku enzymu rozpuszczalnego.

Badania Lee i in. (25) nie są odosobnione. Podobne doświadczenia z wykorzystaniem kryształów dehydrogenaz przeprowadzano już na przełomie lat siedemdziesiątych.



Rys. 2. Reakcja katalizowana przez kompleks (ADH-NAD) dehydrogenazy alkoholowej z NAD i DMSO.

siątych i osiemdziesiątych XX w., wykorzystując cytoplazmatyczną dehydrogenazę jabłczanową i dehydrogenazę aldehydu-3-fosfoglicerynowego (26,27).

Oprócz zastosowań katalitycznych CLECs, lub raczej CLPCs (*Cross-Linked Protein Crystals*), są ze względu na swoją chiralną budowę obiecującym materiałem, mogącym służyć do rozdziału mieszanin racemicznych (9). Wykazano, że kryształy są odporne na działania sił mechanicznych podczas takich jednostkowych procesów jak: mechaniczna dezintegracja, mieszanie, filtracja i przepompowywanie.

Obecnie bardzo często w procesach separacji stosuje się zeolity. Są to krystaliczne, uwodnione glinokrzemiany sodu, potasu, wapnia i magnezu. Związki te charakteryzują się porami o wielkości 0,3-1 nm i są stosowane jako materiał filtracyjny ze względu na dobrze rozwiniętą powierzchnię, odporność na działanie kwasów i podwyższonej temperatury, wysoką pojemność adsorpcyjną, zdolność molekularno-sitową, znaczną selektywność i pojemność jonowymienną. Wykorzystywane są do rozdziału jonów, węglowodorów o łańcuchach prostych i rozgałęzionych, a także w procesach oczyszczania wody i gazów (28-30). Zasadniczą zaletą CLPCs w porównaniu z zeolitami jest ponad ośmiokrotnie większa objętość porów (0,9-3,6 [ml/g]), dzięki czemu łatwiejsza jest penetracja do wnętrza kryształu. Wcześniej wspomniano, że CLPCs mogą być wykorzystane do rozdziału mieszanin racemicznych bezpośrednio po uzyskaniu kryształów, podczas gdy zeolity należy poddać procesom modyfikacji poprzez przyłączanie związków optycznie czynnych, co wiąże się z dużymi kosztami.

W doświadczeniu mającym określić zdolności rozdzielcze CLPCs termolizyny wykazano, że można je wykorzystywać do separacji związków optycznie czynnych, takich jak fenyloglicyna, ibuprofen i kwas foliowy, uzyskując bardzo obiecujące wyniki (9). Pozwala to sądzić, że wkrótce kryształy białek znajdą zastosowanie jako materiał filtracyjny w rozdzielach mieszanin racemicznych.

Sieciovane kryształy białek enzymatycznych nie są oczywiście pozbawione wad. Podobnie jak przy procesach immobilizacji metodami klasycznymi, także w przypadku CLECs obserwuje się utratę aktywności względem enzymu wolnego. Schmitdke i in. (21,31) stwierdzili, że usieciovane kryształy subtilizyny, wykazują 27-krotny spadek aktywności względem wyjściowego enzymu rozpuszczalnego. Znacznie mniej obniżoną aktywność CLECs w stosunku do enzymu natywnego odnotowali Sobolov i in. (21) dla kryształów aldolazy 1,6-bifosfofruktozowej z mięśni

królika; zachowały one aż 82% aktywności kryształów nie sieciowanych i 65% aktywności enzymu rozpuszczalnego. Zjawisko utraty aktywności w procesie immobilizacji nie jest zatem obligatoryjne, czego dowiedli także Khalaf i in. (32), uzyskując kryształy lipaz z drożdży *Candida rugosa* i bakterii *Pseudomonas cepacia*, wykazujące wyższą aktywność w porównaniu z enzymem rozpuszczalnym.

Pewną niedogodnością CLECs jest absolutna konieczność optymalizacji ich otrzymywania, bowiem na właściwości CLECs mają wpływ liczne czynniki: warunki krystalizacji, wielkość uzyskanych kryształów, stężenie czynnika sieciującego i czas trwania procesu sieciowania (33). Ich optymalizacja jest pracochłonna i trzeba ją przeprowadzić dla każdego preparatu kryształów sieciowanych białek. Bardzo trudnym etapem jest uzyskanie odpowiednich kryształów, które spełniają wymogi narzucone przez ograniczenia dyfuzyjne. Problem krystalizacji dotyczy zwłaszcza białek pochodzących z organizmów psychrofilnych, które ze względu na specyficzne warunki działania *in vivo* są bardzo elastycznymi i giętkimi molekułami, bardzo trudnymi do wykrystalizowania.

Poważne trudności w uzyskaniu krystalicznych form białek enzymatycznych i ponoszone w związku z tym koszty zmusiły do poszukiwań innych rozwiązań będących kompromisem pomiędzy klasycznymi metodami immobilizacji a sieciowaniem kryształów białek enzymatycznych.

3. Sieciowane agregaty białek enzymatycznych (CLEAs – *Cross-Linked Enzyme Aggregats*)

Aby łatwiej uzyskać immobilizowane białka, zachowujące się podobnie jak CLECs, można się posłużyć inną metodą. Najpierw w niedenaturujących warunkach wytwarza się agregaty molekuł enzymu, a następnie się je usieciowuje, uzyskując formę immobilizowaną białka katalitycznego. Proces agregacji można prowadzić z użyciem różnych czynników strącających: soli, rozpuszczalników organicznych bądź polimerów niejonowych (34). W ten sposób Cao i in. (35) otrzymali agregaty acylazy penicylanowej, wykazujące od 60 do 86% aktywności przejawianej przez CLECs i prawie 100-krotnie wyższą aktywność (w przeliczeniu na 1 g mokrego preparatu) niż enzym immobilizowany na klasycznym nośniku. Podczas procesu formownia CLEAs utracono wprawdzie około 40% aktywności wyjściowej, jednak efekt ten nie był spowodowany sieciowaniem i agregacją, lecz filtracją i rozpuszczeniem się części nietrwałych agregatów. Cytowani autorzy stwierdzili ponadto, że CLEAs acylazy wykazują 4-krotnie wyższą produktywność w porównaniu z CLECs, a ponad 200-krotnie wyższą niż enzym natywny. Stwierdzili ponadto, że specyficzność substratowa CLEAs jest bardzo zbliżona do specyficzności CLECs. Usieciowane agregaty enzymów mogą być zatem atrakcyjną alternatywą dla białek trudno krystalizujących, tym bardziej, że proces ich otrzymywania jest dużo mniej pracochłonny i skomplikowany od krystalizacji. Istotny problem stanowi natomiast dobór odpo-

wiedniego czynnika strącającego, wpływającego na aktywność CLEAs w środowisku rozpuszczalników organicznych (34).

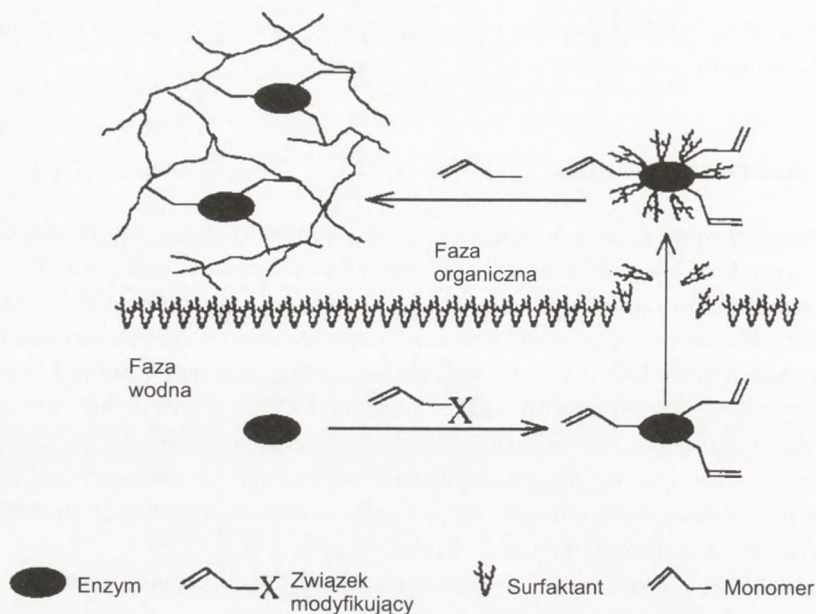
4. Biokatalityczne polimery

Do tej pory opracowano procedury otrzymywania CLECs i CLEAs nielicznych enzymów, jednak żadna z nich nie została jeszcze skomercjalizowana. Zapotrzebowanie na immobilizowane biokatalizatory nowej generacji jest jednak duże, intensywnie zatem bada się możliwość wykorzystania szerszej niż dotąd gamy syntetycznych i naturalnych materiałów matrycowych. Ze wspomnianych problemów z oczyszczaniem i krystalizacją białek wynika także powrót do „klasycznych” metod immobilizacji wykorzystujących nośniki, tym bardziej, że znaleziono nowe matryce, które charakteryzują się interesującymi i unikatowymi właściwościami, pozwalającymi na pełniejsze i bardziej kontrolowane wykorzystanie immobilizowanych biokatalizatorów, także w niekonwencjonalnych środowiskach.

W badaniach enzymów w środowiskach bezwodnych dowiedziono, że bardzo ciekawe właściwości wykazują lipazy i proteinyazy, co czyni te enzymy potencjalnie użytecznymi w syntezie leków bądź półproduktów do syntezy farmaceutyków. Wykorzystaniu na szeroką skalę przeszkadza jednak z reguły znaczna hydrofilowość tych białek, utrudniająca prowadzenie reakcji w hydrofobowych rozpuszczalnikach organicznych. Problem ten częściowo rozwiązano, dołączając do cząsteczek wspomnianych enzymów związki niepolarne, zwiększające rozpuszczalność w środowiskach hydrofobowych (36,37). Wykorzystanie związków modyfikujących o określonych cechach pozwala nie tylko uzyskać białko o odpowiedniej hydrofobowości, ale także unieruchomić je. Odpowiednimi do takich celów właściwościami charakteryzuje się większość monomerów winylowych, które można przed uformowaniem „biokatalitycznego polimeru” wykorzystać do wstępnej modyfikacji enzymu, zwiększającej hydrofobowość cząsteczki. Również właściwości mechaniczne predystynują te związki do wykorzystania w charakterze matrycy (38).

Ogólny schemat otrzymywania biokatalitycznych tworzyw przedstawiono na rysunku 3.

W pierwszym etapie do enzymu dołączany jest związek modyfikujący, np. wspomniany już monomer winylowy, który zwiększa hydrofobowość białka i stanowi łącznik między enzymem a tworzącym się w końcowej fazie łańcuchem polimerowym. Następnie zmodyfikowany katalizator przechodzi z fazy wodnej do organicznej, gdzie do zmodyfikowanego białka przyłączają się cząsteczki wprowadzonego do układu surfaktanta, dodatkowo zwiększając efekt hydrofobowy. W końcowym etapie procesu następuje polimeryzacja, w wyniku której uzyskuje się biokatalityczny polimer. Często wykorzystywanym w tej procedurze związkiem jest też amfifilowy glikol polietylenowy (PEG) (39). Po kowalencyjnym związaniu enzymu z PEG zmodyfikowane białko wiązano z polimerem akrylowym uzyskując biokatalityczne tworzywo wykorzystywane zarówno w środowiskach organicznych, jak i wodnych (40).



Rys. 3. Synteza biokatalitycznych tworzyw (wg Wang P. i in. [36]).

Dodatkową zaletą biokatalitycznych polimerów jest możliwość ich formowania w dowolny sposób. Zależnie od wykorzystania mogą to być np. kulki przydatne do reaktorów kolumnowych, bądź cienkie filmy wykorzystywane w diagnostyce i medycynie.

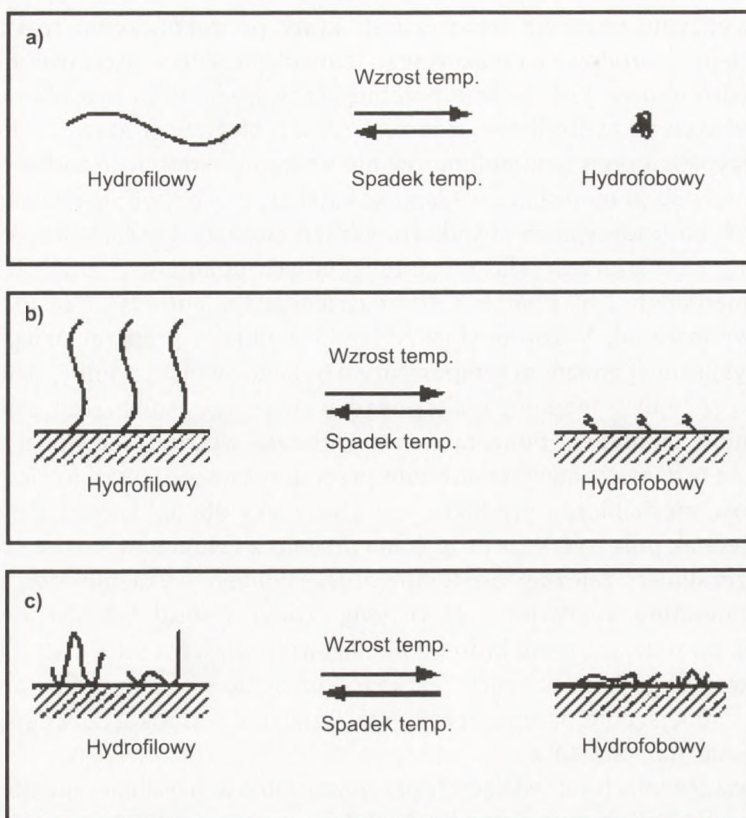
Bardzo ciekawą grupą polimerów, mających duże walory aplikacyjne są tzw. „inteligentne polimery” (ang. *smart polymers*) (41), w których w odpowiedzi na bodźce ze środowiska zewnętrznego następują określone zmiany konformacyjne. Obserwuje się je po przekroczeniu pewnego krytycznego punktu, a do czynników sprawczych należą: temperatura, pH, światło, pole elektryczne, siła jonowa lub obecność określonych związków chemicznych, np. sacharydów. Wprawdzie zmiany w obrębie pojedynczych merów są bardzo niewielkie, jednakże biorąc pod uwagę, że w skład cząsteczki polimeru wchodzi ich tysiące, końcowe zmiany są wyraźne i istotnie wpływają na właściwości materiału. Zastosowanie tego rodzaju polimerów może być bardzo szerokie, z konstrukcją sztucznych kończyn i elementów napędowych (41) włącznie. „Inteligentne tworzywa” mogą się też okazać niezwykle przydatne do immobilizacji biokatalizatorów. Krytyczny punkt, po przekroczeniu którego polimer wykazuje zmiany konformacyjne, może być traktowany jako swoisty przełącznik, dzięki któremu można sterować procesami biokatalitycznymi. Znane są np. rozpuszczalne w wodzie polimery, które po przekroczeniu pewnej granicznej wartości przez jakiś parametr środowiska zmieniają swoje właściwości z hydrofilowych na hydrofobowe (42), co powoduje ich wytrącanie się. Wykorzystując taki polimer jako

nośnik dla enzymu uzyskuje się preparat, który po zakończeniu reakcji bardzo łatwo oddzielić ze środowiska reakcyjnego, zmieniając jego właściwości z hydrofilowych na hydrofobowe, jeśli reakcja przebiegała w środowisku hydrofilowym, bądź z hydrofobowych na hydrofilowe, jeśli reakcja przebiega w środowisku hydrofobowym. W przypadku tego typu polimerów nie występują właściwie żadne ograniczenia dyfuzyjne, często obniżające wydajność katalizy, gdy używa się enzymów immobilizowanych na tradycyjnych nośnikach. Bardzo ciekawe rozwiązanie, pokonujące opory dyfuzyjne z użyciem właśnie „inteligentnych polimerów” znaleźli Park i in. (43). Do unieruchomienia komórek *Arthrobacter simplex* autorzy ci zastosowali termokurczliwy materiał, N-izopropylakryloamid. Poddając preparat pułapkowanych komórek cyklicznym zmianom temperatury uzyskano swoistą pompę, dzięki czemu wymuszano przepływ medium reakcyjnego wewnątrz nośnika. Ten sam polimer w połączeniu z alkoholem poliwinylowym próbował wykorzystać Nonaka i in. (44) do uzyskania termowrażliwego materiału przepuszczalnego, okazało się jednak, że wytrzymałość mechaniczna produktu jest zbyt niska dla aplikacji. Dalsze badania pozwoliły jednak połączyć N-izopropylakryloamid z celofanem, co dało membrany o przepuszczalności zależnej od temperatury. Polimer wykazuje tzw. niską krytyczną temperaturę roztworu – LCST (ang. *Lower Critical Solution Temperature*) w 32°C (45), po przekroczeniu której zmienia swoje właściwości z hydrofilowych na hydrofobowe, czego konsekwencją jest jego kurczenie się i zamykanie porów celofanu, czyli zmniejszenie przepuszczalności. Działanie termokurczliwego materiału przedstawiono na rysunku 4.

W doświadczeniach określających przepuszczalność uzyskanej membrany przeprowadzonych z wykorzystaniem glikolu polietylenowego (PEG) o masach cząsteczkowych od 300 do 2000 Da wykazano, że membrany pozwalają na dyfuzję cząsteczek o maksymalnej masie 1 kDa, przy czym wyraźnie był widoczny wpływ temperatury na przepuszczalność błony.

W innej pracy (38) w wyniku połączenia N-izopropylakryloamidu z leukocyjanem trifenylometanu uzyskano polimer termo- i fotowrażliwy. Przepuszczalność uformowanego w membranę materiału zbadano wykorzystując glikol dietylenowy (DEG) i glikol polietylenowy (PEG) o masach od 300 do 1000 Da. Potwierdzono w uzyskanych rezultatach, że przepuszczalność polimeru można regulować za pomocą dwóch czynników, tzn. temperatury i światła, a szybkość dyfuzji związków wzorcowych jest odwrotnie proporcjonalna do masy cząsteczkowej.

Poli-N-izopropylakryloamid wykorzystany do unieruchomienia trypsyny (46) dał preparat, którego aktywność można było regulować zmianami temperatury. Jego dodatkową zaletą była wyższa termostabilność w stosunku do enzymu natywnego: podczas 60-minutowej inkubacji w 60°C enzym związany z polimerem zachował 80% aktywności początkowej, podczas gdy trypsyna natywna zachowała jedynie 10% pierwotnej aktywności.



Rys. 4. Zachowanie się poli-N-izopropylakryloamidu w zależności od temperatury; a) zachowanie polimeru w roztworze wodnym; b) zachowanie się polimeru po punktowym związaniu z nośnikiem (roztwór wodny); c) zachowanie się polimeru po wielomiejscowym związaniu z nośnikiem (roztwór wodny) wg Takei (45).

5. Podsumowanie

Immobilizowane preparaty białek enzymatycznych, bądź to w postaci usieciowanych kryształów lub agregatów, bądź tzw. biokatalitycznych polimerów umożliwiają już obecnie (co prawda na razie w skali laboratoryjnej, choć trwają prace nad opracowaniem wysokowydajnych metod otrzymywania CLECs (47)) prowadzenie reakcji enzymatycznych w warunkach, w których enzymy rozpuszczalne lub unieruchamiane metodami standardowymi ulegają szybkiej denaturacji. Co więcej, w przypadku użycia katalitycznych tworzyw istnieje możliwość kontrolowania przebiegu reakcji poprzez oddziaływanie na polimer odpowiednim bodźcem, który zmienia określone właściwości katalizatora.

Opisane w artykule nowe rozwiązania w zakresie immobiizacji biokatalizatorów pozwalają przypuszczać, że w najbliższej przyszłości będzie także możliwe uzyski-

wanie preparatów multizymów i w efekcie kontrolowanie przebiegu kolejnych reakcji katalizowanych przez skonstruowany kompleks wieloenzymatyczny. Nowe rodzaje immobilizowanych biokatalizatorów umożliwią również stworzenie bardzo czułych biosensorów, mogących znaleźć zastosowanie w medycynie, naukach biologicznych i analizie żywności. Zachęcające rezultaty wstępnych badań nad wykorzystaniem biokatalitycznych polimerów w kontrolowanym uwalnianiu leków, np. insuliny (47,48) lub witamin (49), dodatkowo poszerzają możliwość tzw. „inteligentnych tworzyw” i innych, nowych rodzajów immobilizowanych białek katalitycznych.

Literatura

1. Griffin M., Hammonds E.J., Leach C.K., (1993). *Enzyme Immobilisation*, in: *Technological Applications of Biocatalysts*, Ed. Barker R.D.J., Butterworth-Heinemann Ltd., 75-118.
2. A. Chmiel, (1991), *Biotechnologia leków*, PWN, Warszawa.
3. Doscher M. S., Richards F. M., (1963), *J. Biol. Chem.*, 238, 2399-2406.
4. Margolin A., (1996), *Tibitech*, 14, 223-230.
5. St. Clair N., Navia M. A., (1992), *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 7314-7316.
6. Zelinski T., Waldman H., (1997), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 36, 7, 722-724.
7. Govardhan C., (1999), *Cur. Opin. Biotechnol.*, 10, 331-335.
8. Lalonde J. J., Govardhan C., Khalaf N., Martinez A. G., Visuri K., Margolin A. L., (1995), *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 6845-6852.
9. Vilenchik L. Z., Griffith J. P., St. Clair N., Navia M. A., Margolin A. L., (1998), *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 4290-4294.
10. Persichetti R. A., St. Clair N., Griffith J. P., Navia M. A., Margolin A. L., (1995), *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 2732-2737.
11. Sluyterman L. A., de Graa M. J. M., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, 171, 277-287.
12. Tischer W., Kasche V., (1999), *Trends in Biotechnol.*, 17, 326-335.
13. Overbeeke P. L. A., Govardhan C., Khalaf N., Jongejan J. A., Heijen J. J., (2000), *J. Mol. Cat. B.*, 10, 385-393.
14. Lalonde J.J., Navia M.A., Margolin A.L., (1997), *Methods Enzymol.*, 286, 443-464.
15. Govardhan C., Margolin A. L., (1995), *Chem. Ind.*, 689-693.
16. Cao L., van Lagen L., Sheldon R. A., (2003), *Cur. Opin. Biotechnol.*, 14, 387-394.
17. Ehab T., Mansoor A., (2004), *Biomat.*, 25, 1937-1945.
18. Berger J., Reist M., Mayer J. M., Felt O., Peppas N. A., Gurny R., (2004), *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 57, 19-34.
19. Yi-Fong W., Yakolevsky K., Margolin A. L., (1996), *Tetrahed. Lett.*, 37, 30, 5317-5320.
20. Bull A. T., Bunch A. W., Robinson G. K., (1999), *Cur. Opin. Microbiol.*, 2, 246-251.
21. Sobolv S. B., Bartoszko-Malik A., Oeschger T. R., Montelbano M. M., (1994), *Tetrahed. Lett.*, 35, 42, 7751-7754.
22. Bednarski M. D., Ethan S. S., Bischofberger N., Fessner W. D., Kim M. J., Lees W., Saito T., Waldman H., Whitesides G. M., (1989), *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 627-635.
23. Fry A. J., Sobolov S. B., Leonida M. D., Voivodov K. I., Fenton J., (1997), *Elektrochem. Soc. Proc.*, 97, 913-922.
24. Häring D., Schreier P., (1999), *Cur. Opin. Chem. Biol.*, 3, 35-38.
25. Lee M. L., Blaghen M., Samama J. P., Biellmann J. F., (1986), *Bioorg. Chem.*, 14, 202-210.
26. Zimmerle C. T., Alter G. M., (1983), *Biochem.*, 22, 6273-6281.
27. Berni R., Mozzarelli A., Pellacani L., Rossi G. L., (1977), *J. Mol. Biol.*, 110, 405-415.
28. Schmitdke J. L., Wescott C. R., Klibanov A. M., (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 3360-3365.
29. <http://www.arem.com.pl/zeolity.htm> – strona opracowana przez pracowników Zakładu Technologii Wody i Ścieków, Wydziału Budownictwa i Inżynierii Środowiska Politechniki Koszalińskiej.

30. <http://chem.amu.edu.pl/~tryton/chem2.html> – strona Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu.
31. Z. Witkiewicz, (2000), *Podstawy chromatografii*, WNT, Warszawa.
32. Khalaf N., Govardhan C., Lalonde J. J., Persichetti R. A., Yi-Fong W., Margolin A. L., (1996), *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 5494-5495.
33. Lee T. S., Vaghjiani J. D., Lye G. J., Turner M. K., (2000), *Enz. Microb. Techn.*, 26, 582-592.
34. Cao L., van Rantwijk F., Sheldon R. A., (2000), *Org. Lett.*, 2, 10, 1361-1364.
35. Cao L., van Lagen L. M., van Rantwijk F., Sheldon R. A., (2001), *J. Mol. Cat., B.*, 11, 665-670.
36. Wang. P., Sergeeva M., Lim L., Dordick J. S., (1997), *Nat. Biotechnol.*, 15, 789-793.
37. Schmid A., Dordick J. S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Witholt B., (2001), *Nature*, 409, 258-268.
38. Zimmerle C. T., Alter G. M., (1983), *Biochem.*, 22, 6273-6281.
39. Takanashi K., Ajima A., Yoshimoto T., Okada M., Matsushima A., Tamaura Y., (1985), *J. Org. Chem.*, 50, 3414-3415.
40. Yang Z., Mesiano A. J., Venkatasubramanian S., Gross S. H., Harris J. M., Russel A. J., (1995), *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 4843-4850.
41. Galaev I. Y., Mattiasson B., (1999), *Tibitech*, 17, 335-339.
42. Galaev I. Y., Gupta M. N., Mattiasson B., (1996), *CHEMTECH*, Dec., 19-25.
43. Park T. G., Hoffman A. S., (1990), *Biotech. Bioeng.*, 35, 152-159.
44. Nonaka T., Hashimoto K., Kurihara S., (1997), *J. Appl. Pol. Sci.*, 66, 209-216.
45. Takei Y. G., Aoki T., Sanui K., Ogata N., Sakurai Y., Okano T., (1994), *Macromol.*, 27, 6163-6166.
46. Shiroya T., Yasui M., Fujimoto K., Kawaguchi H., (1995), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 4, 275-285.
47. Kim Y. H., Kwon I. C., Bae Y. H., Kim S. W., (1995), *Macromol.*, 28, 939-944.
48. Aiman A. A., Park K., (1997), *Biomat.*, 18, 801-806.
49. Lee Y. M., Shim J. K., (1997), *Polymer*, 38, 1227-1232.