



Wybrane zagadnienia z enzymologii niekonwencjonalnej

Część I – Charakterystyka procesów enzymatycznych prowadzonych w środowisku o subkrytycznie niewielkiej zawartości wody

Tadeusz Antczak, Mirosława Szczęsna-Antczak
Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

Selected issues of non-conventional enzymology Part I – Characterisation of enzymatic processes carried out in a medium with subcritically low water content

Summary

Enzymology of non-aqueous media, also termed a non-conventional enzymology, is a discipline focused on chemical reactions catalysed by enzymes in the media other than water. However, such environments always contain certain amount of water, either dissolved in a solvent or enzyme-bound. The latter fraction of water is called an essential one, and it is crucial for the non-aqueous enzymology, since it stabilises the conformation of protein molecule and determines its enzymatic activity. The paper presents structure, function, and methods of assays of the enzyme-bound water together with other water forms that can also be found in reaction milieu. The methods of regulation of enzymatic activity in non-aqueous media by using compounds capable of associating with polar atoms of amino acid residues involved in catalysis, and thus positively influencing activity of enzymes, have also been discussed. The factors giving rise to a decrease in catalytic activity of enzymes under non-aqueous conditions, and methods of prevention against this phenomenon have also been analysed.

Key words:

non-conventional enzymology, enzymes, water activity, essential water layer, non-aqueous media.

Adres do korespondencji

Tadeusz Antczak,
Instytut Biochemii
Technicznej,
Politechnika Łódzka,
ul. Stefanowskiego 4/10,
90-924 Łódź;
e-mail:
tad45an@snack.p.lodz.pl

1. Wstęp

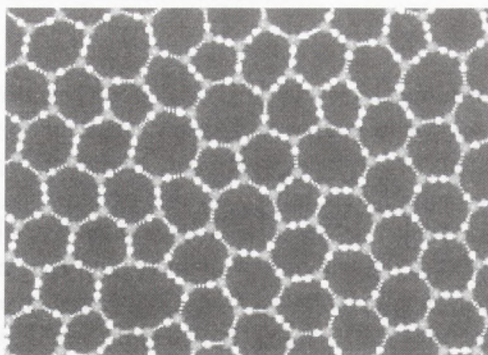
Życie powstało w środowisku wodnym i nadal woda jest niezbędna do kontynuacji jego istnienia. Środowisko wodne jest zatem naturalnym miejscem, w którym przebiegają procesy katalizowane enzymatycznie. Jednakże dowiedziono eksperymentalnie, że enzymy mogą katalizować również reakcje zachodzące w środowiskach innych niż woda. Wykrycie możliwości stosowania takich niekonwencjonalnych środowisk niewodnych (np. rozpuszczalniki organiczne, ciekły CO₂) do prowadzenia reakcji chemicznych katalizowanych enzymatycznie znacznie rozszerzyło zakres zastosowania enzymów (lub komórek mikroorganizmów będących ich źródłem) w procesach biotechnologicznych (biokonwersji, biotransformacji). Powstał nowy kierunek nauki: enzymologia niekonwencjonalna nazywana także enzymologią niewodną (*non-water* lub *nonaqueous enzymology*) (1,2).

W niekonwencjonalnych, tzn. innych niż woda środowiskach reakcji, jako katalizatory wykorzystuje się obecnie coraz szerzej zarówno preparaty enzymatyczne, jak i całe komórki mikroorganizmów (*biokatalizatory*), a ich potencjał katalityczny wciąż zaskakuje badaczy. W odróżnieniu od enzymów stosowanych *in vitro*, w przypadku konieczności wykorzystywania w procesie żywych komórek mikroorganizmów, *in vivo*, obok zamierzonego procesu katalitycznego zachodzą równolegle różnorodne przemiany metaboliczne związane z funkcjami życiowymi komórki. W tym przypadku oddziaływanie środowiska reakcji na biokatalizator jest bardziej złożone, a kierowanie procesem bardziej skomplikowane oraz podlegające szeregu ograniczeniom, które nie występują w reakcjach katalizowanych przez enzymy zawarte w oczyszczonych preparatach enzymatycznych (3-5). Prezentowany przegląd zagadnień z enzymologii niekonwencjonalnej zawężony został do problemów związanych z wykorzystaniem preparatów enzymatycznych w niewodnych środowiskach reakcji.

2. Rola mikrozwartości wody w środowisku reakcji

Określenie środowisko niewodne dla przemian katalizowanych enzymatycznie nie oznacza, że reakcje te zachodzą w medium całkowicie pozbawionym wody. Woda, choć w niewielkiej ilości jest zawsze obecna w tym, tzw. niewodnym środowisku reakcji, a jej rolę w katalizie enzymatycznej należy uznać za podstawową. Wprowadzana jest zazwyczaj do środowiska reakcji jako zanieczyszczenie: substratów, rozpuszczalnika, nośnika czy samego biokatalizatora. Często bywa też, że jest celowo dodawana w niewielkich ilościach, a w szczególnych przypadkach stanowi produkt reakcji (np. w reakcjach syntez katalizowanych przez lipazy i proteazy) lub specjalnie wytworzoną drugą fazę medium reakcyjnego (reakcje prowadzone w układach dwufazowych).

Enzymy nie wykazują aktywności katalitycznej w środowisku całkowicie pozbawionym wody (przynajmniej jeszcze tego nie dowiedziono). Obecność cząsteczek



Rys. 1. Model amorficznej struktury wody (6). Szare i białe punkty obrazują odpowiednio atomy tlenu i atomy wodoru, jasnoszare linie – wiązania wodorowe.

wody (*hydration of protein*) jest bardzo ważna dla stabilizacji 3D struktury oraz aktywności białek. O podstawowej roli wody w procesie katalizy enzymatycznej w środowiskach niewodnych decyduje właściwość tworzenia przez nią na powierzchni cząsteczki białka enzymatycznego bardzo cienkiej, molekularnej warstewki, która jest z nią ściśle związana i stabilizuje katalityczną konformację enzymu – dlatego określana jest terminem „woda niezbędna” tzn. niezbędna dla katalitycznej aktywności enzymu (*enzyme's essential water layer*). Molekuły wody wykazują właściwość tworzenia wiązań wodorowych z wieloma atomami cząsteczki białka znajdującymi się przy jej powierzchni, jak również – z sąsiadującymi cząsteczkami wody.

Wiadomo, że w roztworach wodnych cząsteczki wody tworzą amorficzną sieć (rys. 1) przechodzącą w różnej wielkości klasterzy (*clusters*). Te niewielkie ugrupowania cząsteczek są relatywnie stabilne, ponieważ każda cząsteczka wody zaangażowana jest zwykle w tworzenie od 1 do 4 wiązań wodorowych z sąsiednimi. Udział wielokrotnych wiązań wodorowych w klasterze wody wzrasta wraz ze zwiększaniem się liczby molekuł w tym ugrupowaniu. Na przykład, w klasterze zawierającym 120 molekuł wiązania wodorowe stanowią aż 95% ogółu wiązań, w których 80% to wiązania pomiędzy czterema cząsteczkami wody (dwie cząsteczki jako donor i dwie – jako akceptor) oraz 20% – to wiązania wodorowe pomiędzy trzema molekułami wody (7). Ich wzajemne interakcje powodują prawdopodobnie powstawanie większych, np. dwudziestościennych klasterów. Woda obecna w środowisku apolarnych rozpuszczalników może występować właśnie w postaci takich cyklicznych struktur o różnej wielkości.

W środowisku niewodnym, podobnie jak w środowisku wodnym, polarne atomy obecne w enzymie, a także w cząsteczkach substratów i produktów są, w największym stopniu, otaczane molekułami wody. Tworzą one (tzn. polarne atomy wraz z cząsteczkami wody) struktury przestrzenne stabilizowane wielokrotnymi wiązaniami wodorowymi oraz oddziaływaniami jonowo-dipolowymi. Dzięki coraz dosko-

nalszym technikom modelowania molekularnego (*molecular modeling*) umożliwiającym komputerowe symulacje efektów interakcji między atomami i cząsteczkami (*molecular dynamics simulation*) można obecnie coraz szybciej i dokładniej wyjaśniać oraz przewidywać w jaki sposób woda obecna w środowisku reakcji wpływać może na strukturę przestrzenną białek enzymatycznych i zmieniać dynamiczne właściwości tych cząsteczek.

Woda niezbędna związana z powierzchnią białka enzymatycznego w środowisku apolarnym usztywnia jego konformację katalityczną oraz pozwala na przemieszczanie się ładunków elektrycznych między polarnymi grupami aminokwasów. Pełen zasięg jej oddziaływania na enzym nie jest jednak całkowicie poznany. W jednej z hipotez mówi się, że woda niezbędna pełni rolę „smaru” lub tzw. „plastyfikatora” enzymu, który zwiększa jego elastyczność umożliwiając zmiany konformacyjne białka (polegające m.in. na zrywaniu i tworzeniu wiązań wodorowych) optymalne dla katalizy (8-11). W drugiej hipotezie szerzej rozpatruje się rolę wody wychodząc z przesłanki, że nie można w sposób jednoznaczny zinterpretować zależności pomiędzy dynamiką zmian konformacji cząsteczki enzymu a jego aktywnością. Twierdzi się w niej, że ważniejszy od zwiększania ruchliwości cząsteczki białka, jest wpływ wody na inne właściwości enzymu, np. na konformację samego centrum aktywnego enzymu i/lub polarność środowiska w jego otoczeniu (12,13). Jednakże wiadomo już, że z pewnością woda dodana do środowiska reakcji wykazuje szeroki zasięg oddziaływań wpływających na aktywność enzymów, jak również, iż zasięg ten zależy jest od stosowanego jako medium reakcyjne rozpuszczalnika organicznego (14).

Zachowanie się cząsteczek wody znajdujących się w najbliższym otoczeniu białka w medium wodnym było badane szczegółowo za pomocą spektroskopii NMR (*nuclear magnetic resonance*). Stwierdzono, że wzajemne wiązanie molekuł wody w najbliższym sąsiedztwie białka (*microenvironment*) oraz ich interakcja z powierzchnią enzymu, a także cechy fizykochemiczne i dynamiczne różnią się od tych, charakterystycznych dla molekuł wody obecnych w fazie ciekłej (*bulk phase*) (15-20).

W środowisku rozpuszczalników organicznych, siła wiązania, rejony występowania i grubość warstwy „wody niezbędnej” jest cechą indywidualną, charakterystyczną dla danego białka enzymatycznego, uzależnioną od jego struktury przestrzennej oraz usytuowania i rodzaju grup funkcyjnych znajdujących się w strefie powierzchniowej. Rozmieszczenie cząsteczek wody w molekułach białek badać można wykonując analizy spektroskopowe, np. NMR i FTIR (*Fourier-transform infrared spectroscopy*) oraz rentgenograficzne (7,21). Na przykład w przeprowadzonej analizie rentgenograficznej glukoamylazy *Aspergillus awamori* wykazano, że sieć wiązanych wzajemnie wiązaniami wodorowymi dziesięciu cząsteczek wody łączy dwa oddalone od siebie fragmenty tego białka (7).

3. Wpływ zawartości wody w „niewodnym” środowisku reakcji

Zmiany zawartości wody w tzw. niewodnym środowisku reakcji (np. rozpuszczalniku organicznym) wpływają w sposób istotny na przebieg biokatalizy. Zawartość wody w mieszaninie reakcyjnej można określać podając jej realne stężenie (oznaczane np. metodą Karla Fischera) lub mierząc w środowisku aktywność wody. Na podstawie wyników licznych prac eksperymentalnych udowodniono, że stan uwodnienia medium reakcyjnego opisywany jest z większą realnością przez określanie aktywności wody (a_w) (22-27). Parametr ten najtrafniej wyraża ciągłość zmian stanów energetycznych wody, definiowanych czasem jako woda: wolna, związana lub dostępna.

W urządzeniach do pomiaru aktywności wody detekcji podlega jedynie obecna w próbce, tzw. woda wolna, czasem nazywana niezwiązaną lub aktywną. Poza nią, w próbce obecna jest zawsze woda na różnych poziomach wiązania (poprzez wiązania wodorowe, jonowo-dipolowe lub inne, silniejsze wiązania chemiczne). Związanie to powoduje ograniczenie jej dostępności jako rozpuszczalnika dla komponentów znajdujących się w środowisku próbki. Z tych też powodów rezultaty uzyskiwane metodami analitycznymi, służącymi do oznaczania całkowitej zawartości wody w próbce (np. metodą Karla Fischera), zazwyczaj odbiegają od tych, otrzymywanych za pomocą urządzeń do pomiaru aktywności wody, w których pomiar sprowadza się do wyznaczenia stężenia pary wodnej nad rozpuszczalnikiem.

Stwierdzono, że optymalna wartość aktywności wody, tzn. ta, przy której dany enzym wykazuje najlepsze uzdolnienia katalityczne, jest cechą indywidualną zależną od właściwości enzymu, rodzaju rozpuszczalnika organicznego oraz typu katalizowanej reakcji. Tłumaczy się, że przy zbyt niskiej wartości aktywności wody nie jest zapewniona dostateczna hydratacja białka enzymatycznego, a przy zbyt wysokiej – zachodzi aglomeracja enzymu (28). W wykonanych badaniach kinetycznych lipaz w reakcji syntezy estrów wykazano, że zmiany wartości a_w środowiska niewodnego wpływają na wartość V_{max} , a nie zmieniają stałych Michaelisa (zatem powinowactwa) względem obu substratów (kwasu i alkoholu), co wskazuje, że woda w nadmiarze działa jak inhibitor kompetycyjny enzymu (29). Powyższą hipotezę potwierdzono na podstawie wyników badań kinetycznych lipaz w reakcjach hydrolizy triacylogliceroli dowodząc, że enzymy te wykazują wyższe powinowactwo względem wody (będącej substratem w reakcji hydrolizy) niż względem triacyloglicerolu (30,31).

Aktywność wody jest pochodną stężenia wody w środowisku. Zatem prowadząc reakcję w środowisku rozpuszczalników organicznych wielkość tę można regulować *in plus* – poprzez bezpośrednie dodanie wody lub jej wprowadzenie pośrednie (wraz z enzymem, substratem czy rozpuszczalnikiem) albo *in minus* – przez jej usuwanie za pomocą specjalnych pochłaniaczy wody (np. sita molekularne, silikażele) czy zastosowanie podciśnienia. Aktywność wody w rozpuszczalnikach organicznych można ustalać na żądanym, stałym poziomie dodając do nich odpowiednich, uwodnionych soli nieorganicznych (32-36).

Woda zawarta w nośniku immobilizowanego enzymu (a takie preparaty są szczególnie przydatne w prowadzeniu reakcji w środowiskach niewodnych) także powoduje wzrost aktywności wody w środowisku reakcji (34). Należy wziąć pod uwagę, że aktywność wody w immobilizowanych biokatalizatorach przechowywanych na powietrzu w temperaturze pokojowej zależy od wartości a_w otoczenia, może się zatem zmieniać. Dlatego wskazane jest przechowywanie preparatów enzymatycznych w szczelnie zamkniętych naczyniach, a także dodatkowe kontrolowanie (i/lub regulacją) aktywności wody przed zastosowaniem ich w reakcji prowadzonej w środowisku niewodnym.

Metodą NMR badano wodę związaną z subtylizyną Carlsberg, którą zawieszano w heksanie, benzenie lub toluenie oraz z α -chymotrypsyną umieszczoną w heksanie (32). W celach badawczych molekule wody związanej zamieniano uprzednio na molekule wody deuterowanej. Stwierdzono, że izotermy sorpcji wody dla subtylizyny we wszystkich badanych rozpuszczalnikach są bardzo podobne. W badaniach wykazano, że mierząc aktywność wody można przewidywać ilość wody związanej z białkiem umieszczonym w niepolarnym organicznym rozpuszczalniku. Porównanie stopni hydratacji białek enzymatycznych osiąganych w niepolarnych rozpuszczalnikach i w powietrzu wskazuje, że medium o niskiej stałej dielektrycznej powoduje adsorpcję i silne związanie wody z białkiem, natomiast ilość wody luźno związanej znacznie się w tych warunkach zmniejsza. Sugeruje to, że hydrofobowe regiony powierzchni białek są w tych warunkach solwatowane raczej przez molekule rozpuszczalnika organicznego i, że w środowisku niepolarnym tworzenie warstwy wody niezbędnej na całej powierzchni białka nie jest termodynamicznie uprzywilejowane (32).

W termograwimetrycznych badaniach homogennych lipaz *Candida rugosa* pokazano, na przykład, że warstwa wody niezbędnej dla dwóch form tych enzymów, A i B, jest różna. Zmierzono, że molekule lipazy A pokryta jest 522 cząsteczkami wody, podczas gdy forma B tej lipazy – tylko 220 molekułami wody. Przyjmując, że powierzchnia lipazy ma kształt kuli o średnicy 69 Å, a woda – o średnicy 0,9 Å, wyliczono, że w przypadku formy A cząsteczki wody pokrywają ok. 10% powierzchni tego białka, a dla formy B – ok. 4% powierzchni (33).

Całkiem odrębnym zagadnieniem jest biokataliza w środowiskach dwufazowych: woda-rozpuszczalnik organiczny. Układy tego typu stosowane są w wielu procesach biotransformacji, szczególnie przy wykorzystaniu całych, żywych komórek mikroorganizmów jako źródła enzymu. Zwyczajowo zawartość wody w takich układach jest wyrażana za pomocą współczynnika stosunku objętościowego faz A (definiowanego wzorem: $A = V_{org} / V_{wody}$, gdzie: V_{org} jest objętością fazy organicznej, a V_{wody} – objętością fazy wodnej). Istotny – podczas optymalizacji warunków procesu prowadzonego w środowisku dwufazowym – jest dobór odpowiednich proporcji woda-rozpuszczalnik organiczny, gdyż wielkość współczynnika A wywiera znaczący wpływ na wydajność reakcji katalizowanej przez enzymy (37-41).

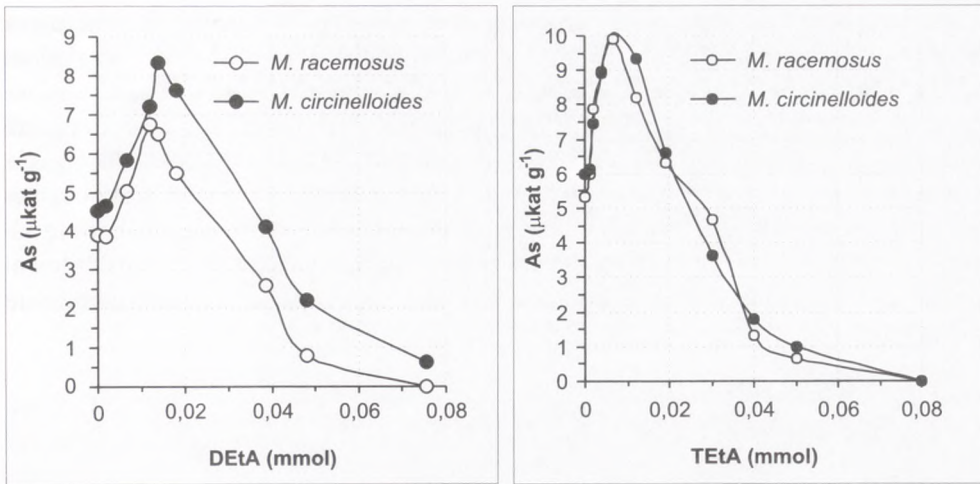
4. Modyfikacje warstwy wody niezbędnej na powierzchni enzymów

Substancje obecne w medium reakcyjnym wnikają w ściśle związaną z cząsteczką enzymu warstwę wody niezbędnej z efektywnością, która zależy od stopnia ich polarności. Substancje polarne (np. rozpuszczalniki polarne typu: acetonitryl, aceton) łatwiej niż apolarne (np. heksan, izooktan) zmieniają strukturę tej warstwy wody. W ten sposób obecność w bezpośrednim otoczeniu molekuly białka cząsteczek innych niż woda powoduje tzw. modyfikację lub zakłócenie warstwy wody niezbędnej i może prowadzić do zmian aktywności enzymu. Mechanizmem tym wyjaśniane są zmiany aktywności enzymów w różnych mediach niewodnych.

Rozpuszczalniki hydrofilowe, łatwo „wnikające” między cząsteczki wody, mogą doprowadzić do usunięcia warstwy wody niezbędnej z powierzchni enzymu, co przejawia się zazwyczaj destabilizacją konformacji białka i często inaktywacją enzymu. Na przykład, w pracach (42,43) dowiedziono, że lipaza *Mucor circinelloides* ogrzewana przez godzinę w temp. 100°C, w środowisku apolarnych rozpuszczalników organicznych (jak eter naftowy, cykloheksan, heptan, benzen), których cząsteczki w ograniczonym stopniu zmieniają strukturę warstwy wody niezbędnej enzymu, wykazywała wysoką stabilność. Natomiast w tych samych warunkach, lecz w środowisku rozpuszczalników hydrofilowych (woda, etanol, glicerol) enzym ten ulegał szybko denaturacji.

W innych badaniach (44) wykazano, że subtylizyna w dioksanie i acetonitrylu ma taką samą strukturę krystalograficzną jak w wodzie. Budowa centrum katalitycznego enzymu w tych trzech rozpuszczalnikach jest podobna. Stwierdzono poza tym, że zarówno molekuly dioksanu jak i acetonitrylu wiążą się z białkiem, przy czym w różnych miejscach (44). W kolejnej pracy (45) podano, że struktury krystaliczne przejściowych form acylo-enzymu w wodzie i w acetonitrylu są takie same, co dowodzi, że mechanizm reakcji katalizowanej przez subtylizynę w obu tych rozpuszczalnikach jest identyczny. Zatem, można przypuszczać, że obserwowany odmienny sposób wiązania molekuł różnych rozpuszczalników w centrum aktywnym z acylową formą pośrednią i wolnym enzymem może być odpowiedzialny za zmiany stereospecyficzności enzymów w różnych rozpuszczalnikach.

Wbrew powszechnemu przekonaniu prezentowanemu w dotychczasowym piśmiennictwie naukowym stwierdzono ostatnio, że enzymy podlegać mogą aktywacji również w środowisku apolarnych rozpuszczalników organicznych. Zjawisko to związane jest w pewien sposób właśnie z modyfikacją warstwy wody niezbędnej na powierzchni enzymów. Pozytywne oddziaływanie na cząsteczki enzymów w mediach niewodnych wywierają niektóre substancje syntetyczne i naturalne, generujące tworzenie wiązań wodorowych. Co interesujące, substancje takie jak, np. NN-dimetyloformamid, pirydyna, piperazyna, bromek cetylopirydyniowy mogą wydawnie zwiększyć aktywność enzymu (46,47). W cytowanych badaniach wykazano ponadto, że omawiane substancje działać mogą w dwojaki sposób, tzn. w zależności



Rys. 2. Wpływ stężenia dietanoloaminy (DEtA) i trietanoloaminy (TEtA) na aktywność lipaz *Mucor* w reakcji syntezy oleinianu butylu w środowisku eteru naftowego (cyt. za (31)).

od ich stężenia w środowisku reakcji mogą być aktywatorami lub inhibitorami enzymów. Na przykład, wprowadzenie dietanoloaminy (DEtA) lub trietanoloaminy (TEtA) w ilości 0,0067-0,012 mmola do środowiska reakcji katalizowanej przez lipazy *Mucor circinelloides* i *M. racemosus* zwiększa aktywność tych enzymów w reakcji syntezy oleinianu butylu od 1,7 do 1,9 razy (rys. 2) (42,43). Podczas gdy przy dodatku 0,08 mmola tych substancji – aktywność lipaz jest bliska zeru.

Wykryto również, że grupą substancji, których dodatek do niewodnego środowiska reakcji powoduje wzrost aktywności enzymów są etery koronowe. Zastosowano je, np. do aktywacji proteiny serynowej i α -chymotrypsyny w reakcjach prowadzonych w rozpuszczalnikach organicznych (48-50).

Molekularny mechanizm zwiększania aktywności enzymów (w szerszym pojęciu jej regulacja) w mediach niewodnych przez omawiane substancje, nie jest do końca poznany. W efekcie badań nad lipazami wymienianych szczepów *Mucor* postawiono hipotezę, że polega ona na wytworzeniu katalitycznie korzystnych asocjacji pomiędzy substancją modyfikującą a resztami aminokwasów ważnymi dla aktywności enzymu. Zbadano, że pozytywne, z punktu widzenia katalizy, oddziaływanie niektórych substancji na badane lipazy związane jest z generowanymi przez nie zmianami przestrzennego usytuowania tryptofanu leżącego na powierzchni tzw. wieczka (*lid*, *flap*) lipaz. Wskazuje to na wpływ tych substancji na położenie wieczka względem aktywnego centrum lipazy. Oznaczałoby to, że molekularne podstawy aktywacji lipaz *M. circinelloides* i *M. racemosus* w środowisku niewodnym są identyczne jak aktywacji międzyfazowej w środowisku wodnym w obecności substratów hydrofobowych, chociaż przyczyna jej zaistnienia jest inna. Przypuszcza się, że opisywane zjawisko zachodzi w efekcie utworzenia wiązań wodorowych pomiędzy indolową

resztą tryptofanu znajdującą się na powierzchni „wieczka” a substancją generującą te wiązania (pirydyna, TETa, DEtA, itp.), co zmienia położenie „wieczka” względem centrum aktywnego enzymu na korzystne katalitycznie (31).

W interpretacji efektów działania eterów koronowych uważa się, że tworzą one kompleksy z białkiem poprzez aminowe grupy lizyny. Te makrocycliczne interakcje zmniejszają możliwość formowania międzycząsteczkowych i wewnątrzkomórkowych mostków elektrolitycznych w enzymie, co w konsekwencji obniża barierę kinetyczną oraz umożliwia konformacyjne zmiany białka. Na skutek zmian sfałdowania molekuly enzymu powstaje konformacja bardziej aktywna i termodynamicznie stabilna (50).

5. „Pamięć pH”

W rozpuszczalnikach apolarnych pojęcie pH środowiska reakcji nie ma sensu fizycznego. Nie oznacza to, że ładunek elektryczny polarnych grup czynnych białka enzymatycznego (tak ważny dla regulacji aktywności enzymu w środowisku wodnym) nie wpływa na szybkość przemian katalizowanych przez enzymy w środowisku niewodnym.

Klibanov i in. (51,52) stwierdzili, że enzymy umieszczone w środowisku niewodnym „posiadają pamięć” pH. Pod tym pojęciem należy rozumieć właściwość białek enzymatycznych polegającą na tym, że w rozpuszczalniku organicznym polarne grupy reszt aminokwasów wykazują ładunek elektryczny „wyniesiony” z roztworów wodnych, w których białko przebywało przed umieszczeniem w medium niewodnym. Najprostszy sposób regulacji tego parametru polega na liofilizacji biokatalizatora rozpuszczonego (lub zawieszonego) w roztworze o żądanym, optymalnym pH. Enzym o odpowiednio „nastawionym” pH stosowany następnie w medium niewodnym wykazuje najwyższą aktywność katalityczną. Stan jonizacji białek enzymatycznych można też w pewnym zakresie zmienić wprowadzając do rozpuszczalnika organicznego składniki buforów, tzn. odpowiednio mieszaniny kwasów rozpuszczalnych w fazie organicznej i ich skoniugowanych zasad (52-54).

6. Potencjał elektrostatyczny enzymu

Potencjał elektrostatyczny powierzchni enzymu odgrywa znaczącą rolę w katalizie prowadzonej zarówno w środowisku wodnym jak i niewodnym. Jego wartość i usytuowanie jest pochodną liczby oraz rodzaju atomów polarnych zlokalizowanych na powierzchni enzymu jak również stopnia ich jonizacji. Jääskeläinen i in. (55) liczyli metodą molekularnego modelowania potencjały elektrostatyczne kompleksów lipazy *Rhizomucor miehei* z różnymi substratami. Stwierdzili, że katalitycznie ważne wiązania wodorowe są tworzone łatwiej, kiedy kwas jest zlokalizowany w hydrofobowym, a es-

ter w hydrofilowym regionie centrum aktywnego. Postawiono hipotezę, że różnice między wartościami potencjałów elektrostatycznych na powierzchni cząsteczki lipazy mogą pomagać w odpowiedniej orientacji tego białka w przestrzeni międzyfazowej. Petersen i in. (56) wykazali, że rozkład elektrostatycznego potencjału na powierzchni molekuly lipazy (będący funkcją pH) oddziałuje w dużym zakresie na profil pH aktywności enzymów.

7. Aktywność enzymów w środowisku niewodnym

Aktywność enzymów w środowisku niekonwencjonalnym (niewodnym) jest zazwyczaj niższa niż w środowisku wodnym (57). Wyjątek stanowią enzymy hydrolytyczne katalizujące reakcje rewersji – w środowisku wodnym ($a_w \approx 1$) praktycznie nie wykazują one aktywności syntetycznej. Natomiast ich zdolność do katalizowania reakcji hydrolizy jest uzależniona od stężenia wody (będącej jednym z substratów) w środowisku reakcji. W środowisku rozpuszczalników organicznych stężenie molowe wody jest zawsze niższe niż w wodzie (w której wynosi ono maksymalnie 55,55 M), co niewątpliwie wywiera niekorzystny wpływ na szybkość reakcji hydrolizy prowadzonej w takich mediach. Często trudno jest, w takim przypadku, podwyższyć rozpuszczalność wody bezpośrednio w środowisku, ale można zwiększyć dostępność cząsteczek wody dla enzymu, prowadząc procesy w dwufazowych układach micelialnych. Reakcje hydrolytyczne biegnące w takich układach, inaczej niż w wodzie, charakteryzuje się podając stałe kinetyczne wyznaczone oddzielnie względem obu substratów reakcji, np. estru i wody w reakcjach hydrolizy estrów.

Uważa się, że katalityczna aktywność enzymów w rozpuszczalnikach niewodnych może ulegać obniżeniu z następujących powodów, wg (57):

1. Ograniczonej dyfuzji substratów.
2. Zmniejszonej dostępności substratów do centrum aktywnego enzymu.
3. Strukturalnych zmian w białku enzymatycznym.
4. Ograniczenia możliwości zmian konformacyjnych enzymu.
5. Wzrostu energii aktywacji.
6. Niewłaściwego pH mikrootoczenia enzymu (ściślej niewłaściwego stanu jonizacji polarnych grup enzymu).

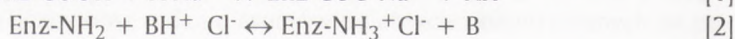
Istnieje zatem wiele fizykochemicznych czynników, które mogą obniżać aktywność enzymów w rozpuszczalnikach organicznych. Efekty działania niektórych z tych czynników można zminimalizować (tab.).

Przyczyny obniżenia aktywności enzymów w rozpuszczalnikach organicznych (wg 57)

Czynnik obniżający aktywność enzymu	Komentarz	Środki zaradcze
ograniczenie procesów dyfuzji	wpływ nie tak duży, jak się powszechnie uważa	– intensywne mieszanie w trakcie procesu – stosowanie bardzo dobrze rozdrobnionych preparatów enzymatycznych
blokada centrum aktywnego	odpowiada za kilkukrotne obniżenie aktywności	– jeśli możliwe, używać raczej formy krystaliczne niż amorficzne białek enzymatycznych
zmiany konformacyjne	występują podczas liofilizacji i innych zabiegów dehydratacji. Forma CLC jest bardziej odporna. Zazwyczaj nie są spowodowane przez kontakt z rozpuszczalnikiem	– stosować <i>lioprotektanty</i> – alternatywą jest tworzenie kompleksów enzymu z substancjami amfifilnymi, rozpuszczalnymi w rozpuszczalnikach organicznych – stosowanie formy CLC enzymów
niekorzystna energetycznie desolwatacja substratu	hydrofobowy rozpuszczalnik silnie „wiąże” hydrofobowy substrat. Oddziaływanie to może powodować nawet 100-krotną redukcję aktywności	– dobieranie rozpuszczalnika, dla którego nie występują niekorzystne interakcje rozpuszczalnik – substrat (zbyt silne wiązanie)
destabilizacja stanu przejściowego	prawdopodobna gdy stan przejściowy (<i>transition state</i>) jest przynajmniej częściowo dostępny dla rozpuszczalnika	– wybranie rozpuszczalnika korzystnie oddziałującego z kompleksem enzym-substrat w stanie przejściowym
zredukowana możliwość zmian konformacyjnych	bezwodny, hydrofilowy rozpuszczalnik może usunąć warstwę wody niezbędnej, co wywołuje co najmniej 100-krotne obniżenie aktywności	– optymalizowanie wartości a_w – uwodnienie rozpuszczalnika – stosowanie hydrofobowego rozpuszczalnika – stosowanie substancji modyfikujących warstwę wody niezbędnej
nieoptymalne pH	może powodować nawet 100-krotny spadek aktywności	– odwadnianie enzymu z roztworów wodnych o pH optymalnym – stosowanie buforów fazy organicznej

CLC – *cross-linked crystals*.

Rozszerzając informacje zawarte w tabeli należy dodać, że do korygowania jednego z najważniejszych parametrów, tzn. stanu jonizacji białka enzymatycznego w środowisku niewodnym stosować można specjalne bufony dla fazy organicznej (*organo-soluble buffers*). Są to mieszaniny rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych kwasów i ich soli sodowych bądź amin i ich chlorowodorków (58-61). Równania ukazują zasadę kontroli równowagi stanu jonizacji enzymu przez te dwie klasy buforów (61):



Dobór buforu uzależniony jest od właściwości enzymu i hydrofobowości (polarności) rozpuszczalnika. Na przykład odpowiedni stan jonizacji lipazy z *Rhizomucor miehei* w środowisku pentanonu-3 uzyskiwano przez dodatek trójzooktyloaminy

i jej chlorowodoru, a subtylizyny Carlsberg w heksanie i toluenie – poprzez dodatek trój-dodecyloaminy (TDA) i jej chlorowodoru (61). Udowodniono, że w ten sposób zapewnić można wysoką aktywność preparatów różnych enzymów (liofilizowanych i CLC) stosowanych w rozpuszczalnikach organicznych.

Z kolei, aby uniemożliwić denaturację enzymów podczas ich odwadniania stosuje się lioprotektanty, takie jak: różne sacharydy, glikol polietylenowy lub sole mineralne (zwłaszcza KCl), substratopodobne ligandy i etery koronowe (57,59). Innym rozwiązaniem jest tworzenie kompleksów enzymów z cząsteczkami surfaktantów (lub innych substancji amfipatycznych) rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach organicznych (57,62). Enzymy posiadają najwidoczniej w tych kompleksach konformację zbliżoną do naturalnej. Rozwiązania te doprowadzić mogą do podwyższenia aktywności enzymów w rozpuszczalnikach organicznych, nawet od 3 do 4 rzędów wielkości.

Bardziej efektywną metodą uzyskiwania aktywnych w środowiskach rozpuszczalników organicznych enzymów jest tzw. *bioimprinting* (wykonanie odcisku) – sposób polegający na umieszczaniu w cząsteczkach enzymu, przed jego odwodnieniem (np. przez liofilizację), odpowiedniego liganda, najczęściej takiego, który lokuje się w centrum katalitycznym (są to np. analogi substratów) i usunięciu go z odwodnionego białka (o usztywnionej już strukturze) odpowiednim rozpuszczalnikiem organicznym (63). Białko „zapamiętuje” konformację korzystną dla katalizy i można je dodatkowo zimmobilizować, np. usieciować (metoda CLIP, *crosslinked imprinted proteins* (64,65)). Uzyskano w ten sposób wysoko aktywne w niewodnych środowiskach, często o zaprojektowanej enancjo- czy stereospecyficzności, proteazy (α -chymotrypsynę, subtylizynę) (66,67), hydrolazę epoksydową (68) i lipazy (69-72). W ostatnim przypadku *imprinting* polega na odwadnianiu lipazy, np. w obecności substancji amfifilnej (technika IAMI, *interfacial activation based molecular bioimprinting*). Idea tych metod zaczerpnięta jest z techniki nazywanej w skrócie MIP (*molecular imprinting polymer*) wykorzystywanej w chemii do wytwarzania polimerów stosowanych w rozdzielaczach chromatograficznych, w separacji enancjomerów oraz w biosensorach.

Innym, wydajnym sposobem zwiększania katalitycznych uzdolnień enzymów w rozpuszczalnikach niewodnych jest „rozluźnienie” ich struktury za pomocą wody. W efekcie dodania małej ilości wody do rozpuszczalnika organicznego, lub przez podwyższenie aktywności wody (a_w) w środowisku oraz przez dodanie wodopodobnych współrozpuszczalników do niewodnego środowiska reakcji aktywność enzymatyczną można podwyższyć 100-1000-krotnie (w porównaniu do wartości w bezwodnym rozpuszczalniku organicznym) (57). Więcej sposobów zabezpieczania aktywności enzymów – będącej podstawą ich wydajnego funkcjonowania w środowisku niewodnym – podano w tabeli. W tabeli nie wspomniano o najefektywniejszych metodach podwyższania aktywności enzymów w środowiskach niewodnych, mianowicie o sposobach którymi dysponuje inżynieria genetyczna, gdyż wymagałyby one oddzielnego, obszernego omówienia.

8. Podsumowanie

Na podstawie dostępnej literatury wykazano, że aktywność enzymów w środowisku niewodnym jest zazwyczaj niższa niż w wodzie. Być może w przyszłości możliwe będzie uzyskanie enzymów wykazujących wyższą aktywność w rozpuszczalnikach organicznych aniżeli w wodzie, na przykład w efekcie optymalizacji ich aktywności w rozpuszczalnikach organicznych z wykorzystaniem metody *bioimprinting*, tzn. przez odcisk cząsteczki substratu (57), która stosowana będzie w połączeniu z modyfikacjami enzymów metodami inżynierii genetycznej. Warunkiem jest poznanie, obok przestrzennej struktury enzymu, zasad rozpoznawania substratu przez enzym oraz nabycie umiejętności w pełni kontrolowanego kształtowania centrum aktywnego z wykorzystaniem metod komputerowego modelowania oraz inżynierii genetycznej. Przyszłe biokatalizatory efektywnie działające w mediach niekonwencjonalnych będą, być może, przygotowywane na bazie polimerów, np. syntetycznych, trwałych w tych środowiskach, po nadaniu im kształtu i wprowadzeniu grup funkcyjnych odpowiednich dla centrum katalitycznegożądanego enzymu (jest to jeden z rozwijanych już kierunków MIP, *molecular imprinting polymer*) (73-75).

W badaniach struktury cząsteczek DNA w środowisku rozpuszczalników organicznych udowodniono zarówno zachowywanie jak i tworzenie się podwójnej helisy w środowiskach 99% glicerolu i 99% glikolu etylenowego. Taka struktura DNA nie występowała natomiast w 99% amidzie kwasu mrówkowego, metanolu i DMSO. Oddziaływanie rozpuszczalników na DNA, generalnie podobne do ich oddziaływania na białka, wskazuje na duże znaczenie hydrofobowych interakcji dla stabilności struktury tych cząsteczek. Sugeruje to, że woda nie jest wyjątkowym i jedynym medium, w którym białka i kwasy nukleinowe posiadają natywną (aktywną) strukturę (76).

Przedstawione przykłady zastosowania enzymów w mediach niekonwencjonalnych rozwiało dotychczasowe, popularne przekonanie, że biokatalizatory te powinny być jedynie aktywne w wodzie, ponieważ „tak... zaplanowała natura”.

Praca finansowana była z grantu Komitetu Badań Naukowych PBZ KBN 021/P06/99/22.

Literatura

1. Öhrner N., Martinelle M., Matison A., Norin T., Hult K., (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 328-331.
2. Adlercreutz P., (1994), *Biocatalysis in non-conventional media. Applied Biocatalysis*. Eds. J. M. S., Cabral D., Best L., Boross J., Tramper, Harwood Academic Publishers GmbH, Chur, Switzerland, 279-298.
3. León R., Fernandes P., Pinheiro H. M., Cabral J. M. S., (1998), *Enzyme Microb. Technol.*, 23, 483-500.
4. Giri A., Dhingra V., Giri C. C., Singh A., Ward O. P., Narasu M. L., (2001), *Biotech. Adv.*, 19, 175-199.
5. Cabral J. M. S., Aires-Barros M. R., Pinheiro H. M., Prazeres D. M. F., (1997), *J. Biotechnol.*, 59, 133-143.

6. Bradley D., (2002), Water, water, <http://www.chemweb.com/alchem/articles/985883672133.html>
7. Chaplin M., (2002), Water structure and behaviour, <http://www.sbu.ac.uk/water>
8. Zaks A., Klibanov A. M., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 8017-8021.
9. Suzawa V., Khmielnitsky Y. L., Giarro L., Dordick J. S., Clark D. S., (1995), *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 8435-8440.
10. Affleck R., Xu Z., Suzawa V., Focht K., Clark D. S., Dordick J. S., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1100-1104.
11. Broos J., Visser A. J. W. G., Engbersen J. F. J., Verboom W., van Hoek A., Reinhold D. N., (1995), *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 12657-12663.
12. Partridge J., Dennison P. R., Halling P. J., Moore B. D., (1998), *Biochim. Biophys. Acta*, 1386, 79-89.
13. Burke P. A., Griffin R. G., Klibanov A. M., (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 87-94.
14. Burke P. A., Griffin R. G., Klibanov A. M., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 20057-20064.
15. Kakalis L. T., Kumosinski T. F., (1992), *Biophys. Chem.*, 43, 39-49.
16. Kimmich R., Gneiting T., Kotitschke K., Schnur G., (1990), *Biophys. J.*, 58, 1183-1197.
17. Andrew E. R., Bone D. N., Bryant D. J., Cashell E. M., Gaspar R., Meng Q. A., (1982), *Pure Appl. Chem.*, 54, 585-594.
18. Otting G., Liepinsh E., (1995), *Acc. Chem. Res.*, 28, 171-177.
19. Otting G., Liepinsh E., Wüthrich K., (1991), *Science*, 254, 974-980.
20. Belton P. S., (1994), *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 61, 61-79.
21. Vassel B., Hecht H.-J., Schmid R. D., Schomburg D., (1993), *J. Biotechnol.*, 28, 99-115.
22. Soumanou M. M., Bornscheuer U. T., Schmid U., Schmid R. D., (1999), *Biocatal. Biotrans.*, 16, 443-459.
23. Wu J.-Y., Liu S.-W., (2000), *Enzyme Microb. Technol.*, 25, 124-130.
24. Halling P. J., (1984), *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 513-516.
25. Halling P. J., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 178-206.
26. Bell G., Janssen A. E. M., Halling P. J., (1997), *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 471-477.
27. Bell G., Halling P. J., Moore B. D., Partridge J., Rees D. G., (1995), *Trends Biotechnol.*, 13, 468-473.
28. Valivety R. H., Halling P. J., Peilow A. D., Macrae A. R., (1992), *Biochim. Biophys. Acta*, 1122, 143-146.
29. Matsumoto M., Odachi D., Kondo K., (2001), *J. Chem. Eng. of Japan*, 34(3), 437-440.
30. Inada Y., Takahashi K., Yoshimoto T., Aijma A., Matsushima A., Saito Y., (1986), *Trends Biotechnol.*, July, 190-194.
31. Antczak T., (2001), *Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej*, 884, 1-175.
32. Parker M. C., Moore B. D., Blacker A. J., (1995), *Biotechnol. Bioeng.*, 46, 452-458.
33. de la Casa R. M., Sánchez-Montero J. M., Rojas R., Sinisterra J. V., (1998), *Biotechnol. Tech.*, 12, 823-827.
34. Materiały informacyjne firmy Roche, (1999), kat. nr 1865455.
35. Bhandarkar S. V., Neau S. H., (2000), *Electronic J. Biotechnol.*, 3, 195-201.
36. Halling P. J., (1992), *Biotechnol. Tech.*, 6, 271-276.
37. Martinek K., Semenov A. N., Berezin I. V., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, 658, 76-89.
38. Antczak T., Galas E., (1997), *Biotechnologia*, 38, 121-133.
39. Antczak T., Krystynowicz A., Hiler D., Bielecki S., Galas E., (1999), *Biotechnologia*, 44, 151-163.
40. Antczak T., Hiler D., Krystynowicz A., Bielecki S., Galas E., (2001), *J. Mol. Catal.*, B, 11, 1043-1050.
41. Antczak T., Hiler D., Krystynowicz A., Szczęśna M., Bielecki S., Galas E., (2000), *Progress in Biotechnology*, vol. 17, *Food Biotechnology*, Eds. S. Bielecki, J. Tramper, J. Polak, Elsevier Sci., 221-227.
42. Antczak T., Morowiec-Białoń J., Bielecki S., Jarzębski A. B., Malinowski J. J., Lachowski A. I., Galas E., (1997), *Biotechnol. Tech.*, 11, 9-11.
43. Antczak T., Hiler D., Galas E., (1993), *Biotechnologia*, 20, 59-67.
44. Schmitke J. L., Stern L. J., Klibanov A. M., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4250-4255.
45. Schmitke J. L., Stern L. J., Klibanov A. M., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 12918-12923.
46. Zaks A., Russell A. J., (1988), *J. Biotechnol.*, 8, 259-270.
47. Antczak U., Góra J., Antczak T., Galas E., (1991), *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 589-593.

48. Grebienow K., Klibanov A. M., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 53, 351-362.
49. van Unen D. J., Engbersen J. F. J., Reinhoudt D. N., (2000), *J. Mol. Cat. B*, 11, 877-882.
50. van Unen D. J., Engbersen J. F. J., Reinhoudt D. N., (2002), *Biotechnol. Bioeng.*, 77, 248-255.
51. Klibanov A. M., (1995), *Nature*, 374, 596.
52. Ke T., Klibanov A. M., (1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 57, 746-750.
53. Khmielnitsky Y. L., Welch S. H., Clark D. S., Dordick J. S., (1994), *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 2647-2648.
54. Zacharis E., Halling P. J., Rees D. G., (1999), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 96, 1201-1205.
55. Jääskeläinen S., Linko S., Raaska T., Laaksonen L., Linko Y.-Y., (1997), *Biotechnology*, 52, 267-275.
56. Petersen M. T. N., Fojan P., Petersen S. B., (2001), *J. Biotechnol.*, 85, 115-147.
57. Klibanov A. M., (1997), *Trends in Biotechnol.*, 15, 97-101.
58. Blackwood A. D., Curran L. J., Moore B. D., Halling P. J., (1994), *Biochim. Biophys. Acta*, 1206, 161-165.
59. Xu K., Klibanov A. M., (1996), *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 9815-9818.
60. Halling P. J., Blackwood A. D., Moore B. D., (1996), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 799, 251-256.
61. Harper N., Moore B. D., Halling P. J., (2000), *Tetrahedron Lett.*, 41, 4223-4227.
62. Okahata Y., Ijiri K., (1992), *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 65, 2411-2420.
63. Dabulis K., Klibanov A. M., (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, 39(2), 176-185.
64. Stewart N. A. S., Taralp A., Kaplan H., (1997), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 240, 27-31.
65. Peibker F., Fischer L., (1999), *Bioorgan. Medicin. Chem.*, 7(10), 2231-2237.
66. Månsson M. O., Ståhl M., Mosbach K., (1992), *Progres in Biotechnology*, vol. 8, *Biocatalysis in Non-Conventional Media*, Eds. J. Tramper, M. H. Vermüe, H. H. Beefink, U. von Stockar, Elsevier Sci., 321-327.
67. Stehl M., Jeppsson-Wistrand U., Mensson M-O., Mosbach K., (1991), *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 9366-9368.
68. Kronenburg N. A. E., de Bont J. A. M., Fischer L., (2001), *J. Mol. Catal.*, B, 16, 121-129.
69. Mingarro I. C., Abad C., Braco L., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92, 3308-3312.
70. Gonzalez Navarro H., Braco L., (1997), *J. Mol. Catal.*, B, 3(1-4), 111-119.
71. Gonzalez Navarro H., Braco L., (1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 59, 122-127.
72. Kamiya N., Goto M., (1998), *J. Ferment. Bioeng.*, 85(2), 237-239.
73. Kalmakar R. N., Kulkarni M. G., Mashelkar R. A., (1996), *Macromol.*, 29(4), 1366-1368.
74. Lele B. S., Kulkarni M. G., Mashelkar R. A., (1999), *React. & Funct. Polym.*, 40(3), 215-229.
75. Wulff G., Gross T., Schvnfeld R., (1997), *Macromol. Rap. Comm.*, 17(12), 871-874.
76. Bonner G., Klibanov A. M., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 68, 339-344.